







---

## **Universidad de Valladolid**

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL:

### **Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre de medida conforme a la norma ISO/IEC 17025**

**Aplicación al análisis de aguas residuales y continentales**

Presentada por **Marta Hernández Revilla** para optar al grado  
de doctora por la **Universidad de Valladolid**

Dirigida por:  
**Marisol Vega Alegre**





---

**Universidad de Valladolid****AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS**

*(Art. 2.1. c de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)*

Dña. María del Sol Vega Alegre, con D.N.I. nº 10.190.648 S, profesora del Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, como Directora de la Tesis Doctoral titulada:

**Validación de métodos de ensayo y estimación de la incertidumbre de medida conforme a la norma ISO/IEC 17025. Aplicación al análisis de aguas residuales y continentales.**

presentada por Dña. MARTA HERNÁNDEZ REVILLA, alumna del Programa de Doctorado QUÍMICA ANALÍTICA APLICADA. CONTAMINACIÓN Y MEDIO AMBIENTE impartido por el DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, autoriza la presentación de la misma, considerando que cumple todos los requisitos establecidos en la legislación vigente.

Valladolid, 2 de julio de 2013

La Directora de la Tesis,

Fdo.: María del Sol Vega Alegre

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



*A mi familia.*



## **Agradecimientos**

Y por fin llegó el final... Al contrario que para la mayoría de los doctorandos, para mí esta Tesis ha sido muy dura, solitaria y plagada de inconvenientes de todo tipo: cambios de laboratorio, falta de financiación... A pesar de ello, la persistencia (o cabezonería) ha dado su fruto.

A los pocos que han estado a mi lado y caben en apenas tres párrafos, muchísimas gracias:

En primer lugar mi más sincero agradecimiento a mi directora de tesis, la doctora Marisol Vega Alegre, por creer en la idea inicial que ha dado lugar a esta tesis, por su paciencia y por el seguimiento y la supervisión de este trabajo. Hago extensivo mi agradecimiento al Departamento de Química Analítica por el apoyo económico y humano que en todo momento me ha brindado.

En segundo lugar, a mis tres segundos analistas, Rafa Millán, Ángel Calleja y Natalia Garrote, y a los técnicos de laboratorio del Dpto. de Química Analítica, Rosario Gómez y Francisco de la Rosa. No es habitual incluir en los agradecimientos a comerciales o servicios técnicos, pero para mí han sido de gran ayuda: Esther Esteban de Scharlab, el servicio técnico de Gomensoro e Ingeniería Analítica; muchísimas gracias por vuestro tiempo.

Por último, por lo que pudo haber sido y no fue: a mis ex-compañeros del “Cártif”, en especial a Rubén Irusta por la idea que terminó en Tesis Doctoral, y a los de la “Sedam”. Gracias.



## Resumen

Todos aquellos laboratorios que pretenden acreditarse de acuerdo a la norma ISO/IEC 17025, están obligado cumplir unos requisitos técnicos que incluyen la estimación de la incertidumbre de medida y la validación de los métodos de análisis, es decir, deben confirmar mediante examen y la aportación de evidencias objetivas que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización específica prevista. Para llevar a cabo esta tarea el laboratorio debe realizar una serie de ensayos que confirmen las características técnicas del método tales como veracidad, precisión (repeticibilidad y reproducibilidad), linealidad, incertidumbre...

En este trabajo se han desarrollado metodologías basadas en el empleo de muestras de control junto con diseños de experimentos anidados para obtener la información necesaria para evaluar las características técnicas del método. Esta combinación nos ha permitido obtener la máxima información requerida para la validación, realizando un mínimo número de medidas. Estas metodologías se han aplicado a la determinación de parámetros físico-químicos en aguas residuales: (i) determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica, (ii) determinación de fenoles totales por espectrofotometría UV-vis y (iii) determinación de aceites y grasas mediante extracción en fase sólida y gravimetría.

Previamente a la validación se comprobó, mediante su calibración y/o verificación, que los equipos de medida estaban en perfecto uso, y que cumplían los requisitos específicos para el desarrollo de los métodos de análisis en los que estaban implicados.

Paralelamente, se realizaron ensayos previos necesarios para establecer determinadas condiciones experimentales tales como linealidad, requerimientos instrumentales, o tiempos máximos de conservación de muestras y patrones...

Los resultados del diseño de experimentos anidado nos permitieron evaluar para cada método de ensayo los parámetros de validación. El análisis de varianza, ANOVA, de dichos resultados nos ha permitido evaluar la repetibilidad de las medidas y las precisiones intermedias relacionadas con factores que previsiblemente pueden afectar a los resultados, tales como la realización de los análisis en distintos días o el cambio de analista. La incertidumbre de medida se estimó a partir de la información obtenida durante el proceso de validación. Este modelo generó, funciones matemáticas del tipo  $I=k_3 \cdot x^{k_4}$  que permitirán posteriormente estimar la incertidumbre asociada a la concentración,  $x$ , medida en una muestra en el laboratorio.

Finalmente, para comprobar la idoneidad del modelo de estimación de la incertidumbre se comparó con otros modelos alternativos: (i) el modelo tradicional “bottom-up”, que identifica, cuantifica y combina las fuentes de incertidumbre de cada etapa del proceso analítico, y (ii) el modelo “top-down”, que estima la incertidumbre de medida a partir de los resultados de ensayos de intercomparación de laboratorios, y que en este trabajo se extrapoló a los resultados de los ensayos intralaboratorio.

## Abstract

Chemical testing laboratories with a quality system accredited to ISO/IEC 17025 need to have established quality systems covering the management and technical issues specified in the standard. Technical issues include estimation of uncertainty of the test results and validation of test methods which implies the confirmation by examination and provision of objective evidence that the particular requirements for a specific intended use are fulfilled. Validation studies for quantitative analytical methods include the following parameters or technical characteristics: accuracy, scope, specificity, sensitivity, precision (repeatability and reproducibility), bias, linearity, detection limit, robustness, selectivity and uncertainty of the test results.

This work describes the design and application of methodologies based in the use of nested experimental designs and control samples to obtain the information necessary to validate analytical methods after evaluation of their technical characteristics while performing a minimum amount of measurements. Different analytical methods for the examination of wastewater and continental water have been selected for validation: (i) determination of dissolved anions by ion chromatography, (ii) determination of total phenols by UV-vis spectrometry and (iii) determination of total grease and oil by solid phase extraction and gravimetry.

Prior to method validation, calibration and/or verification of the analytical instruments was carried out to assess they were operative and in compliance with specific requirements for their application in the analytical methods of interest. Simultaneously, a series of experiments were performed to establish some experimental conditions such as linearity, instrumental requirements, or maximum period of conservation of samples and standard.

Results from the nested experimental designs have allowed the estimation of the validation parameters of the three methods. From the Analysis of Variance, ANOVA, of these results different contributions to total variance that likely affect the result of measurement such as change of analyst and time elapsed from sample collection to measurement, have been evaluated and quantified as repeatability and intermediate precisions.

Measurement uncertainty was estimated from the data collected during the validation experiments as a potential function,  $I=k_3x^{k^4}$ , of analyte concentration,  $x$ . From this function, it is possible to estimate the uncertainty associated to the measured concentration for a given sample.

Finally, the model proposed in this work for estimation of measurement uncertainty was compared with other available methods: (i) the classical *bottom-up* model which identifies, quantifies and combines the sources of uncertainty acting on each step of the analytical process, and (ii) the *top-down* method, which uses the results from interlaboratory trials (proficiency testing, method performance studies...) to estimate measurement uncertainty, model that was extrapolated to results from intralaboratory trials in this study.

## **ÍNDICE**

---



<b>1. OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN TEÓRICA .....</b>	<b>7</b>
2.1. Introducción .....	9
2.2. Selección de métodos de ensayo .....	10
2.3. Parámetros de validación.....	11
2.3.1. Parámetros de gestión .....	13
2.3.2. Parámetros técnicos.....	14
2.3.3. Incertidumbre .....	46
2.3.4. Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos .....	71
2.4. Validaciones de equipos de medida y ensayo .....	77
2.4.1. Calibración de equipos de medida.....	78
2.4.2. Verificación de equipos de medida y ensayo.....	85
2.4.3. Mantenimiento de equipos de medida y ensayo .....	86
2.5. Preparación de disoluciones .....	87
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>91</b>
3.1. Métodos analíticos.....	93
3.1.1. Determinación de aniones por cromatografía iónica. ....	93
3.1.2. Determinación de fenol por espectrofotometría UV-vis .....	98
3.1.3. Determinación de aceites y grasas mediante SPE y gravimetría .....	101
3.2. Matriz compuesta .....	107
3.3. Protocolo de validación.....	108
3.4. Equipos de medida empleados .....	116
3.4.1. Balanzas.....	116
3.4.2. Material volumétrico .....	122
3.4.3. Espectrofotómetro de UV-vis.....	129
3.4.4. Cromatógrafo iónico .....	134
3.4.5. Ordenadores y programas informáticos .....	136
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>137</b>
4.1. Validación de equipos de medida .....	139
4.1.1. Balanzas.....	139
4.1.2. Material volumétrico .....	141
4.1.3. Espectrofotómetro de UV-vis.....	145

---

---

## *Índice*

4.1.4. Cromatógrafo iónico .....	148
4.2. Validación del método analítico para la determinación de aniones en aguas.....	150
4.2.1. Ensayos previos a la validación .....	150
4.2.2. Diseño experimental .....	166
4.2.3. Evaluación de los parámetros de validación .....	169
4.3. Validación del método analítico para la determinación de fenol en aguas.....	186
4.3.1. Ensayos previos a la validación .....	186
4.3.2. Diseño experimental .....	192
4.3.3. Evaluación de los parámetros de validación .....	193
4.4. Validación del método de análisis para la determinación de A&G en aguas.....	200
4.4.1. Ensayos previos a la validación .....	201
4.4.2. Diseño experimental .....	206
4.4.3. Evaluación de los parámetros de validación .....	208
4.5. Análisis del modelo de estimación de la incertidumbre de medida propuesto.....	214
<b>5. OTROS MODELOS DE ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA.....</b>	<b>219</b>
5.1. Modelo “bottom-up” .....	222
5.1.1. Aplicación a la determinación de aniones en aguas .....	222
5.1.2. Aplicación a la determinación de fenoles en aguas .....	227
5.1.3. Aplicación a la determinación de aceites y grasas en aguas .....	230
5.1.4. Análisis del modelo “botom-up” .....	233
5.2. Modelo “top-down” .....	235
5.2.1. Aplicación a la determinación de aniones en aguas .....	235
5.2.2. Aplicación a la determinación de fenoles en aguas .....	240
5.2.3. Aplicación a la determinación de aceites y grasas en aguas.....	244
5.2.4. Análisis del modelo “top-down” .....	247
5.3. Comparación de los distinto modelos de estimación de la incertidumbre aplicados ...	249
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>253</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>263</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>297</b>
A.I. Tablas de datos .....	299
A.II. Resultados.....	313
A.III. Procedimientos normalizados de trabajo, PNT's.....	353

---

## **1. OBJETIVOS**

---



Antes de poner en práctica un método de ensayo, los laboratorios de análisis deben validarlo para demostrar que cumple los requisitos particulares para su uso específico previsto. Para llevar a cabo esta tarea el laboratorio debe realizar una serie de ensayos que confirmen las características técnicas del método tales como veracidad, precisión, incertidumbre... Este requisito es obligatorio para todos los laboratorios que pretenden acreditarse de acuerdo a la norma ISO 17025, pero cualquier laboratorio que aplique las Buenas Prácticas de Laboratorio también está obligado a validar sus métodos de ensayo.

El objetivo general de este trabajo es desarrollar metodologías fácilmente aplicables para la validación y estimación de la incertidumbre de los métodos analíticos que se utilizan de forma rutinaria en los laboratorios de ensayo, en especial aquellos en cuyo alcance estén incluidas las aguas residuales y continentales.

Para ilustrar convenientemente el proceso de validación y estimación de la incertidumbre se han elegido tres métodos analíticos para la determinación de parámetros físico-químicos en aguas residuales. La selección de los métodos se ha basado en criterios tales como: abarcar distintas técnicas analíticas de uso común en los laboratorios de ensayo y considerar analitos de naturaleza tanto inorgánica como orgánica comúnmente presentes en aguas residuales y continentales. Los métodos finalmente seleccionados para este estudio han sido: (i) determinación de aniones disueltos por cromatografía iónica, (ii) determinación de fenoles totales por espectrofotometría UV-vis y (iii) determinación de aceites y grasas mediante extracción en fase sólida y gravimetría.

La metodología empleada para la validación está basada en el empleo de diseños de experimentos para la obtención de datos que permitan evaluar las características técnicas del método y estimar la incertidumbre de medida de forma que, con un mínimo número de medidas, obtengamos la máxima información requerida para la validación, reduciendo así tiempo y costes.

Se ha desarrollado el siguiente plan de trabajo:

- ↗ Revisión bibliográfica de la evaluación e interpretación de las características técnicas necesarias para que los métodos de análisis sean válidos.
- ↗ Elaboración de un *Protocolo de Validación* general, documento que recoge los valores objetivo de los parámetros de validación, junto con toda la información y las estrategias a seguir para la validación de cada método de ensayo, así como los recursos materiales y humanos necesarios para la realización de las medidas analíticas requeridas para este fin.
- ↗ Establecimiento de la metodología necesaria para la validación previa de los equipos de medida implicados en los métodos a validar, incluyendo el desarrollo de procedimientos de calibración y verificación.

- Realización de los ensayos previos necesarios para el establecimiento de las condiciones experimentales para el desarrollo del método de análisis, tales como, linealidad, conservación de muestras, reactivos y patrones, requerimientos instrumentales...
- Preparación de muestras de control a medir durante los experimentos de validación.
- Planificación y ejecución de los diseños de experimentos más adecuados para la obtención de los datos necesarios para estimar los parámetros de validación.
- Estimación de la incertidumbre de medida de cada método mediante el modelo basado en la información obtenida durante el proceso de validación.
- Comparación de los resultados obtenidos durante la validación de los métodos de ensayo con los valores objetivo propuestos inicialmente en el *Protocolo de Validación*.
- Comparación de la incertidumbre de medida estimada mediante el procedimiento propuesto en este trabajo con la incertidumbre calculada mediante otros modelos alternativos ampliamente usados: (i) el modelo tradicional “bottom-up” o método de propagación de errores, que identifica y cuantifica y combina las fuentes de incertidumbre de cada etapa del proceso analítico, y (ii) el modelo “top-down”, que estima la incertidumbre de medida a partir de los resultados de ensayos de intercomparación de laboratorios, y que en este trabajo extrapolaremos a los resultados de los ensayos intralaboratorio.

Como ya se ha mencionado, el objetivo de validación en Química Analítica es comprobar la viabilidad de los métodos de análisis. Esto implica la validación no solo de equipos (instrumentos y aparatos), software y resultados, sino que puede incluir también la validación del procedimiento de muestreo, manipulación y transporte de la muestra, por el cual se garantiza la representatividad de los resultados. No obstante, en este trabajo se ha excluido la validación de las etapas de muestreo, manipulación y transporte de la muestra por considerar que con frecuencia el laboratorio de ensayo no es responsable de estas tareas, como es el caso de los laboratorios comerciales.

La Fig. 1.1 muestra esquemáticamente las etapas a seguir en el proceso de validación de los métodos de análisis. De acuerdo con este esquema, esta Tesis Doctoral se ha dividido en los siguientes capítulos:

En este el primer capítulo se describe el marco en el que se ha realizado el trabajo presentado y se justifica la necesidad de la validación de los métodos de ensayo y la estructura de la Tesis.

En el segundo capítulo se presenta una extensa bibliografía sobre los parámetros de validación o características de calidad que se exigen a los métodos de ensayo, así como las metodologías y herramientas estadísticas para evaluar cada una de ellas. Se ha hecho especial hincapié en la estimación de la incertidumbre de medida. Para este parámetro se hace una revisión de los principales modelos propuestos hasta la fecha para su estimación.

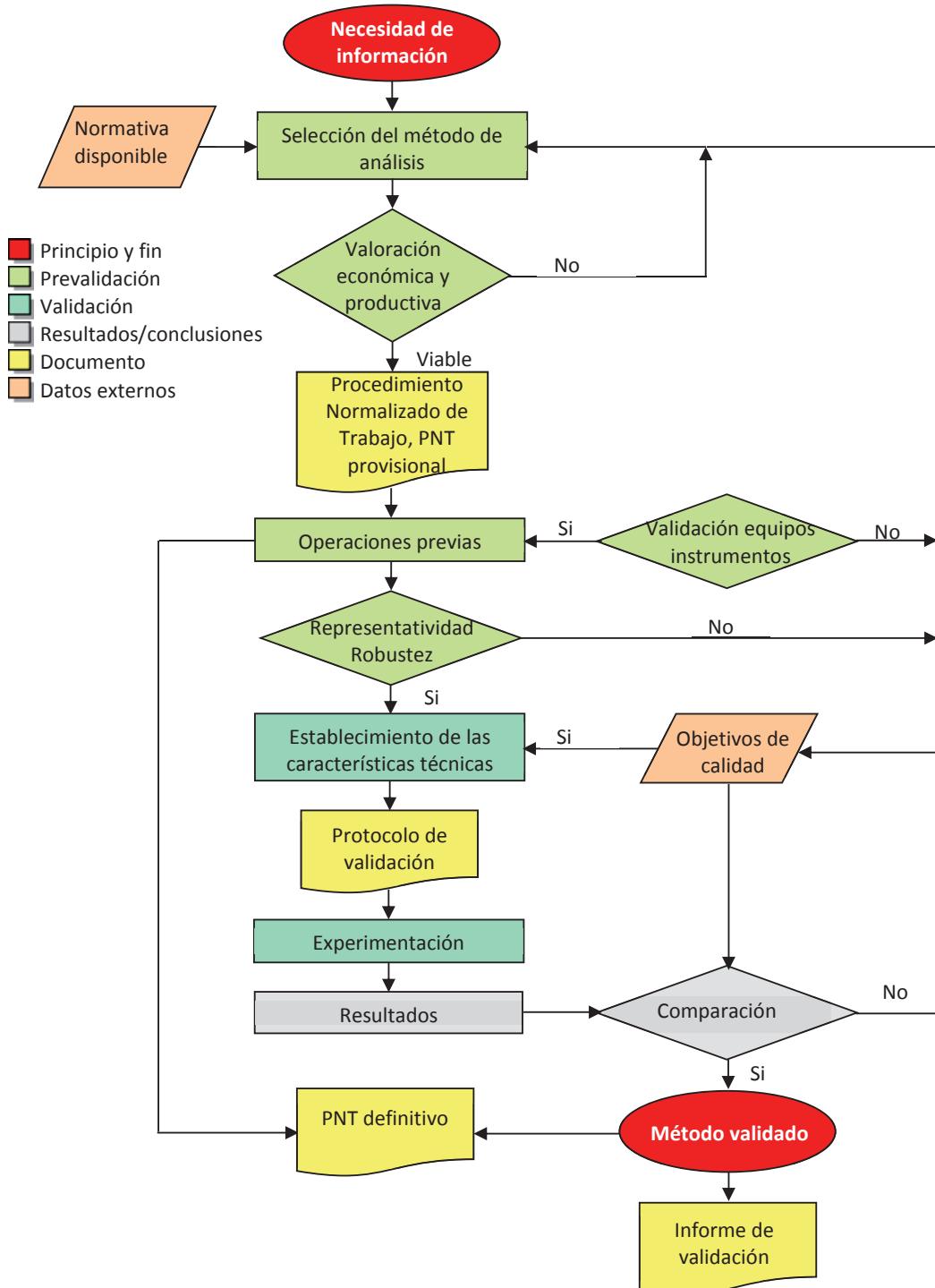


Fig. 1.1: Esquema del proceso de validación de un método de análisis

El tercer capítulo está dedicado a la aplicación del proceso de validación a los tres métodos de ensayo seleccionados. Para cada método de ensayo se ha descrito brevemente el Procedimiento Normalizado de Trabajo (PNT) que incluye la descripción y pasos a seguir para el desarrollo del método, así como los materiales y equipamiento

empleados. Se ha incluido en este capítulo un apartado en el que se describe la preparación de una matriz sintética con la que se han preparado las muestras de control empleadas para realizar los ensayos de validación. También se ha elaborado un *Protocolo de Validación* general en el que se ha incluido: los objetivos requeridos para cada método de análisis, los ensayos previos necesarios para completar cada PNT, los diseños experimentales que se han empleado en la validación y los cálculos a realizar para estimar los parámetros de validación. En este *Protocolo de Validación* general se ha incluido la descripción de la metodología a seguir para asegurar la calidad de los resultados en el tiempo. Por último, se ha dedicado un apartado a la validación de cada uno de los equipos de medida empleados en el desarrollo de los métodos de análisis, desde los procedimientos a seguir para su calibración, verificación y mantenimiento, hasta los criterios para la aceptación o rechazo de resultados.

En el cuarto capítulo se han recogido los resultados experimentales obtenidos durante la validación de los tres métodos de ensayo seleccionados. En primer lugar, se presentan los resultados de la validación de los equipos de medida y se comprueba que son aptos para el uso que se les va a dar. A continuación, se muestran los resultados obtenidos durante la validación de cada método de ensayo, tanto los resultados de los ensayos previos a la validación como los obtenidos durante la realización de los diseños de experimentos programados, realizando la evaluación de cada uno de los parámetros técnicos de validación de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo segundo, con especial énfasis en la estimación de la incertidumbre de medida.

El quinto capítulo se ha dedicado a la comparación de los resultados del modelo de estimación de la incertidumbre de medida propuesto en este trabajo y desarrollado en el capítulo cuatro, con los resultados obtenidos empleando otros modelos de estimación de la incertidumbre descritos en la bibliografía: modelo “bottom-up” y modelo “top-down”. Se han analizado las ventajas e inconvenientes de cada uno de los modelos.

En el último capítulo se presentan las conclusiones generales extraídas de esta Tesis Doctoral.

## **2. INTRODUCCIÓN TEÓRICA**

---



## 2.1. INTRODUCCIÓN

Los laboratorios de análisis desarrollan métodos de ensayo para los análisis demandados, pero antes de poder ponerlos en práctica debe someterlos a un proceso de validación. De acuerdo a la norma UNE EN ISO 17025 (*UNE EN ISO/IEC 17025, 2010*) *validación es la confirmación mediante examen y la aportación de evidencias objetivas de que se han cumplido los requisitos particulares para la utilización específica prevista.* Si esta definición la llevamos al campo de los laboratorios de análisis químicos, validar un método de ensayo consiste en demostrar, mediante una serie de experimentos, que el método es idóneo para el uso que se pretende hacer del mismo, manteniendo su eficacia a lo largo del tiempo y cumpliendo unos requisitos de calidad previamente establecidos. Estos requisitos de calidad son los que definen los criterios de calidad o características técnicas del método de análisis.

Como se mostró en la Fig. 1.1 podemos decir que la validación de un método de ensayo se divide en las siguientes etapas:

### ▲ Prevalidación

El primer paso es seleccionar el método de análisis de acuerdo con los requisitos impuestos, necesidades e infraestructura disponible. El método seleccionado puede estar descrito previamente en una norma o documento oficial, ser una modificación, o bien ser un nuevo método desarrollado por el laboratorio. En todo caso el método de ensayo debe estar descrito en un Procedimiento Normalizado de Trabajo interno (PNT) y aprobado por el laboratorio que lo va a poner en práctica (*UNE EN ISO/IEC 17025, 2005*).

También se incluye en esta etapa la validación de los instrumentos de medida y ensayo implicados en el método de análisis. Esto supone el desarrollo de métodos de calibración y verificación de los equipos y aparatos empleados para el desarrollo del método de ensayo.

### ▲ Validación

La validación implica el establecimiento de las características técnicas que debe poseer el método seleccionado y sus objetivos o márgenes permitidos. Estas características pueden diferir según el alcance del método de ensayo a validar. En ocasiones, estos valores se obtienen de la recopilación de información bibliográfica.

Se precisa elaborar un “Protocolo de validación” que recoja el alcance de la validación, las características a determinar y sus valores objetivo, que describa la preparación de muestras, los equipos y materiales necesarios, las precauciones y limitaciones del método, el personal necesario, el diseño experimental del proceso de validación, la toma de datos, los cálculos y la expresión de resultados, y toda la información necesaria para la realización completa de la validación.

Seguidamente, se determinarán las características técnicas del método de análisis por medio de la realización de experimentos diseñados explícitamente para validar el método de análisis seleccionado. Dentro de las características técnicas del método destaca la estimación de la incertidumbre de medida.

▲ Resultados y conclusiones

A continuación, se comparan los valores estimados experimentalmente de las características técnicas con los valores objetivo impuestos al método para demostrar que el método seleccionado es capaz de cumplir los requisitos de partida; para ello se emplean técnicas y métodos estadísticos.

Finalmente, se realiza una declaración de que el método de análisis es válido en las condiciones y circunstancias en las que el método ha sido validado y, por tanto, es aplicable (*Cámara et al., 2002; Díaz-Guerra et al., 2000*).

## 2.2. SELECCIÓN DE MÉTODOS DE ENSAYO

Cuando se plantea un problema analítico lo primero es seleccionar el método de análisis que nos proporcione la información requerida. El análisis de las aguas residuales es un área muy demandada hoy en día de modo que la bibliografía existente es muy extensa y completa. Por este motivo, los métodos de análisis seleccionados estarán basados en los publicados en normas internacionales, nacionales o regionales, así como métodos publicados por organizaciones técnicas reputadas, publicaciones científicas relevantes, o especificaciones de fabricantes de equipos involucrados en el análisis, asegurando siempre la utilización de la última edición válida de cada norma (*UNE EN ISO/IEC 17025, 2010*). En este trabajo, los métodos de ensayo seleccionados se basan en la siguiente normativa:

- ▲ Normativa de la Asociación Española de Normalización, AENOR. Recoge todas las normas españolas, UNE, equivalentes a las normas europeas ISO, *International Organization for Standardization*.
- ▲ Métodos normalizados para el análisis de aguas residuales y potables editado por la American Public Health Association-American Water Works Association-Water Pollution Control Facility, APHA-AWWA-WPCF (*APHA, 1998*).
- ▲ Métodos oficiales de análisis publicados por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, MAPA (*MAPA, 1993*).
- ▲ Métodos propuestos por la Agencia de Protección Medioambiental Norteamericana, EPA.
- ▲ Procedimientos y aplicaciones desarrollados por los fabricantes de los equipos de medida, la mayoría de ellos diseñados de acuerdo a estas normas internacionales.

Una vez seleccionado el método analítico, y previo al proceso de validación, se debe disponer de un documento o procedimiento normalizado de trabajo, PNT (*UNE EN ISO/IEC 17025, 2010*) que describa con todo detalle la metodología de análisis a seguir. El objetivo de estos PNT's es establecer los límites de aplicación y modo de realización

del ensayo de manera detallada y sin ambigüedad, con objeto de realizar las mediciones de forma correcta, reproducible y trazable.

## 2.3. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

La validación de un método de análisis implica demostrar que es adecuado para la aplicación que se pretende y que proporciona resultados de calidad. La calidad de los resultados obtenidos en un ensayo se demuestra realizando estudios de laboratorio que se concretan en unos parámetros o características de validación (*Eurachem/Citac, 1998; Taverniers et al., 2004*). Dichos parámetros se clasifican en parámetros de gestión, que son aquellos inherentes a la organización del laboratorio, y parámetros técnicos, que son característicos del método analítico (*Feinberg et al., 2004; Hubert, 2007*). La Tabla 2.1 muestra la clasificación de los parámetros de validación.

Tabla 2.1: Parámetros o características a considerar por los métodos de ensayo

Parámetros de gestión	Parámetros económicos ( <i>Díaz-Guerra et al., 2000; Feinberg et al., 2004</i> )	Inversión inicial Costes de puesta a punto del método Costes en función del nº de muestras/día Costes de formación Sueldo del personal cualificado Costes generales de laboratorio...
	Parámetros operativos o productivos ( <i>Díaz-Guerra et al., 2000; Feinberg et al., 2004</i> )	Rapidez, Grado de automatización Factores humanos: cualificación del personal, seguridad e higiene... Necesidades energéticas y de espacio...
Parámetros técnicos	Parámetros técnicos de prevalidación ( <i>Muñoz Benito 2001; Ramis Ramos et al., 2001</i> )	Robustez Representatividad
	Parámetros técnicos de validación ( <i>Díaz-Guerra et al., 2000; Eurachem/Citac, 1998; Eurachem/Citac, 2012; Hubert, 2007; Muñoz Benito 2001; Massart et al., 1997; Prichard et al., 2007; Ramis Ramos et al., 2001; Rius et al., 2000; Thompson et al., 2002</i> )	Selectividad/Especificidad Intervalo de trabajo o rango de ensayo, intervalo lineal y linealidad Sensibilidad Límite de detección y cuantificación Exactitud: veracidad (sesgo) y precisión (repetitibilidad, reproducibilidad) Incertidumbre Recuperación Intervalo de medida/Límite superior

Los parámetros de gestión se subdividen a su vez en parámetros económicos y parámetros productivos. En la mayoría de los casos solo son considerados en notas marginales cuando, en realidad, son imprescindibles desde el punto de vista práctico.

Muchos autores subdividen a su vez los parámetros técnicos en parámetros de prevalidación y parámetros de validación. Los parámetros técnicos de prevalidación normalmente se evalúan durante la fase de desarrollo del método junto con un estudio de la estabilidad de muestras y patrones que debe hacerse constar en el PNT. La etapa de muestreo es un parámetro que no se suele estudiar en la fase de desarrollo del método pero tiene una notable influencia en el resultado final.

Los parámetros técnicos de validación son, no obstante, los más importantes. Es primordial establecer un orden a la hora de desarrollar el proceso de validación por dos razones fundamentales: (i) poder interrumpir el proceso si no se cumplen los requisitos mínimos y claves que debe cumplir el método a validar y así ahorrar recursos y tiempo, y (ii) considerar la interdependencia de los parámetros, por lo que los de mayor relevancia e influencia deberán abordarse primero.

En la Tabla 2.1 se muestran los parámetros técnicos de validación en el orden en el que deberían ser evaluados. La selectividad/especificidad se abordaría primero dado que debe conocerse en qué grado la respuesta del método es únicamente proporcionada por el analito, sin interferencias (*Eurachem/Citac, 1998*). En segundo lugar, se abordaría el estudio de la sensibilidad y los límites de detección y cuantificación junto con el intervalo de trabajo y linealidad. Después se estimarían la veracidad, expresada como sesgo, y la precisión, expresada como repetibilidad y reproducibilidad.

La estimación de la incertidumbre de los resultados del método es ahora, de acuerdo con la norma UNE EN ISO/IEC 17025, imprescindible para tener un método analítico validado. Existen diversos modelos de estimación de la incertidumbre, algunos de los cuales exigen el conocimiento previo de los valores de la veracidad y de la precisión del método.

El intervalo de medida y el límite superior de concentración que se puede alcanzar con el método se confirman una vez evaluados la veracidad, precisión e incertidumbre.

Desde el punto de vista práctico es recomendable realizar unos ensayos preliminares para tener una estimación aproximada de la validez. Hay tres características que son cuellos de botella para decidir sobre la validez del método. En primer lugar, se debe confirmar la selectividad o especificidad. En segundo lugar se debe garantizar que el método es suficientemente sensible para el nivel de concentración de analito a cuantificar. En tercer lugar, se debe asegurar la recuperación de analito en procedimientos que incluyen procesos de extracción.

El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de validación necesitan ser caracterizados con el fin de validar un determinado método. La validación del método es un proceso costoso pero puede simplificarse por consideraciones de tiempo y coste. Una serie de experimentos cuidadosamente planificados pueden proporcionar la información necesaria sobre varios parámetros técnicos, minimizándose así el esfuerzo requerido para validar el método. El laboratorio deberá hacer balance entre las necesidades del cliente, la experiencia existente sobre el método y la necesidad de una

validación completa del método. Una validación parcial es permisible cuando el método no va a ser usado rutinariamente (*Eurachem/Citac, 1998*).

Los parámetros de validación pueden estar especificados en guías dentro de un sector particular y es recomendable seguir las si están disponibles. Esto asegurará que la terminología particular de validación, junto con la estadística empleada se interprete de una manera consistente dentro del sector (*Eurachem/Citac, 1998*). Así, por ejemplo, se han propuesto guías para la validación de métodos de análisis de alimentos (*AOAC, 2002b*), envases para alimentos (*Comisión Europea, 2009*), fármacos (*EMA, 2011; FDA, 2001; ICH, 2005*), análisis clínico y forense (*Wille et al., 2011*)...

Antes de abordar la evaluación de los parámetros de validación, se establecen unos valores para cada parámetro de acuerdo a las necesidades o finalidad del método, y atendiendo a la información recogida durante la fase de desarrollo del método de análisis. Una vez evaluados los parámetros se comprueba que están dentro de los rangos preestablecidos. Dado que es prácticamente imposible lograr niveles de excelencia para todos los parámetros técnicos de validación, el usuario debe llegar a un equilibrio o compromiso entre los mismos (*Ramis Ramos et al., 2001*).

### 2.3.1. PARÁMETROS DE GESTIÓN

El laboratorio debe tratar de seleccionar el método de ensayo de acuerdo a factores como: límite de cuantificación requerido, tipo de muestra, número de muestras a analizar por día, complejidad del análisis, gastos producidos durante la realización del ensayo, inversión inicial, etc.

El desarrollo y validación de un método de ensayo en un laboratorio supone unos costes económicos que deben ser evaluados ya que en muchos casos se precisa de una inversión inicial dedicada a la adquisición de nuevos equipos e instrumentación, formación del personal, sueldo de personal más cualificado, etc.

La reducción de costes en la gestión suele llevar parejo el empeoramiento de alguno de los parámetros técnicos de validación. Será necesario, por tanto, llegar a un compromiso entre los parámetros de gestión y los niveles que queremos alcanzar en los parámetros técnicos de validación.

Por otro lado, los parámetros productivos dependen fuertemente de factores humanos. En primer lugar, la dirección del laboratorio debe asegurar la competencia técnica de todos los miembros en plantilla que realicen actividades relacionadas con el manejo de equipos, realización de ensayos, evaluación de resultados y firma de informes. Para lograrlo definirá unos niveles mínimos de cualificación y experiencia necesarios para el personal del laboratorio y establecerá unos objetivos en materia de formación del personal, teniendo en cuenta las tareas desarrolladas y las previstas en un futuro. Hasta la aceptación por parte de la dirección de la cualificación requerida para el desarrollo del nuevo método de análisis, el personal afectado estará sometido a la supervisión por parte de personal cualificado (*UNE EN ISO/IEC 17025, 2010*).

En cuanto a las responsabilidades, deberes y funciones de cada uno de los miembros del personal del laboratorio, deberán estar claramente definidas y actualizadas para cada puesto de trabajo (*CGA-ENAC-LEC, 2009*).

### **2.3.2. PARÁMETROS TÉCNICOS**

A continuación se describen cada uno de los parámetros técnicos de validación, las pruebas estadísticas más habituales para su evaluación, y la interpretación de los resultados obtenidos.

#### **Robustez**

La robustez (*robustness*) es una propiedad de un método analítico que describe su capacidad para permanecer inalterado ante las pequeñas variaciones inevitables de las condiciones experimentales, e indica la fiabilidad del método durante su aplicación rutinaria. Es por tanto una propiedad que nos da idea de la estabilidad del método de análisis cuando este se trasfiere a otro laboratorio, instrumento o analista... (*ICH, 2005*).

El término *ruggedness* aplicado a un método analítico, y usado con frecuencia como sinónimo de robustez, se refiere al grado de reproducibilidad de los resultados de un método analítico obtenidos al analizar la misma muestra bajo condiciones experimentales diferentes tales como diferente laboratorio, instrumento, analista, o medidas separadas en el tiempo. Puede observarse que esta definición es equivalente a las definiciones de precisión intermedia y de reproducibilidad establecidas por las normas UNE 82009-2 y UNE 82002-3 (*USP 1225, 2010*).

Se recomienda realizar el estudio de la robustez en una etapa previa a la validación del método analítico para así identificar las variables que tienen un efecto más significativo, fijar sus niveles óptimos de forma que el método sea robusto, y controlar cuidadosamente aquellos factores que causan más variabilidad en la respuesta cuando se aplica el método. Si la evaluación de la robustez se realiza durante la validación se corre el riesgo de validar un método poco robusto, dando lugar a resultados variables, con la consiguiente pérdida de tiempo y dinero (*Vander Heyden et al., 2001*).

Todos los métodos de análisis son susceptibles de ser sometidos a un estudio de robustez. La forma de evaluar la robustez consiste en introducir deliberadamente variaciones razonables en las condiciones experimentales y observar su influencia. El esquema a seguir para la evaluación de la robustez de un método analítico es el siguiente (*Dejaegher et al., 2007*):

- ↗ En primer lugar, se seleccionan los factores que previsiblemente puedan afectar al resultado al cambiar de laboratorio, analista o instrumento; estos factores pueden ser tanto operacionales como medioambientales (*Vander Heyden et al., 1998*).
- ↗ Se establece el margen de variación de los factores cuya influencia se quiere investigar. El intervalo de fluctuación de los factores a ensayar debería representar

la variabilidad que podría producirse al trasferir el método entre laboratorios, instrumentos o analistas. Normalmente los márgenes de fluctuación de cada factor cuantitativo se distribuyen simétricamente respecto al valor nominal descrito en el método de análisis (*Vander Heyden et al., 1998*).

- ▲ Se evalúa la influencia de los factores seleccionados en la respuesta proporcionada por el método analítico. Puede hacerse de forma univariada, registrando la variación de la respuesta al cambiar el nivel del factor ensayado mientras se mantienen constantes los otros factores. No obstante este procedimiento conlleva dos problemas: (i) el efecto de modificar más de un factor a la vez puede ser diferente de lo observado al modificarlos de uno en uno; (ii) cuando hay bastantes factores esto representa mucho trabajo, tiempo y dinero. El empleo de diseños de experimentos permite investigar el efecto de los factores sobre la respuesta de forma más eficaz ya que permiten identificar qué factores influyen y en qué magnitud sin necesidad de experimentar todas las combinaciones posibles (*Dejaegher et al., 2007*). Habitualmente se aplican diseños de experimentos a dos niveles, tales como diseños factoriales fraccionales (*Vander Heyden et al., 1995*) o los diseños de Plackett-Burman (*Andrade et al., 1993; ASTM E1169, 1996; Barwick et al., 1998; Gutierrez et al., 2012; Marini et al., 2005a*) y de Youden-Steiner (*Haouet et al., 2006; Youden et al., 1987*), que permiten examinar  $f$  factores en  $f+1$  experimentos. La investigación del efecto de más de dos niveles de los factores exige realizar un mayor número de experimentos y resulta poco práctico. Los diseños de superficie de respuesta (*Hatambeygi et al., 2011*), muy empleados en optimización cuando el rango de valores de cada factor a ensayar es grande, son poco útiles en estudios de robustez cuando el número de factores a ensayar es mayor que tres pues requieren más experimentos que los diseños factoriales. El diseño de parámetros de Taguchi es una herramienta muy útil en este contexto pues permite simultáneamente optimizar los factores controlables que influyen en la respuesta del método, introduciendo en el diseño tanto factores de control como factores de ruido que causan variabilidad en la respuesta, de tal forma que la combinación óptima de niveles de los factores de control provoca una respuesta robusta, insensible a las variaciones en los niveles de los factores de ruido (*Oles, 1993; Grize, 1995; Peace, 1993; Taguchi et al., 2005*).
- ▲ Finalmente, se aplica un análisis de varianza a los resultados del diseño de experimentos para determinar si las variaciones de los factores ensayados tienen un efecto significativo sobre el resultado del método analítico. Otros criterios para evaluar si el factor influye significativamente en la respuesta del método son (*Dejaegher, 2007; Vander Heyden et al., 2001*): (i) realizar una prueba de significación para determinar si la diferencia entre las respuestas obtenidas a dos niveles diferentes del factor es significativamente diferente de cero; (ii) comprobar si el efecto producido por la variación es mayor que un valor crítico o; (iii) representar los valores obtenidos en gráficos de probabilidad normal y comprobar que están normalmente distribuidos entorno a cero. El método será considerado robusto frente a la variación incontrolada de un factor cuando su efecto sobre la respuesta no sea significativo.

### **Representatividad**

La representatividad en química analítica es sinónimo de coherencia, concordancia y consistencia de los resultados generados respecto a las muestras recibidas en el laboratorio. A su vez las muestras deben ser representativas del objeto de estudio (*Cámara et al., 2002*).

Durante la validación se evaluarán las características técnicas de un método analítico que posteriormente se aplicará a muestras con matrices analíticas de complejidad variable. Por tanto, para mantener la representatividad, los ensayos de validación deberán ser realizados sobre muestras de control o patrones lo más parecidos posible a las muestras reales. Esto implica el empleo, durante los experimentos de validación, de muestras reales dopadas con el analito de interés o, preferentemente, de materiales de referencia certificados.

### **Selectividad/especificidad**

Selectividad es la capacidad de detectar, simultáneamente o separadamente, sustancias químicas diferentes presentes en una misma muestra. Frecuentemente el término selectividad se utiliza como sinónimo de especificidad, siendo esta la capacidad de detectar el analito sin interferencias de ningún otro compuesto. Como existen muy pocos métodos que den respuesta sólo a un único analito, el término selectividad es normalmente más apropiado (*Aboul-Enein, 2000; Boqué, 2005; Den Boef et al., 1983; Vessman et al., 2001*). Pero la realidad es que los métodos no son selectivos y las interferencias o perturbaciones alteran alguna, varias o todas las etapas del proceso de análisis dando lugar a errores en los resultados finales.

La selectividad de un método de análisis depende del tipo de muestra, del propio método por la complejidad de las operaciones que conlleva, de la capacidad de discriminación de la técnica instrumental, etc. Su cuantificación es compleja dada la dificultad técnica de realizar un estudio de todas las interferencias a diferentes niveles de concentración y en varias matrices. El diseño del proceso experimental para su evaluación dependerá del conocimiento de las interferencias que potencialmente pueden perturbar el proceso analítico (químicas, físicas, instrumentales ...), del tipo de muestra y del grado de veracidad requerido para la validación del método.

Las pruebas a realizar para asegurar cualitativamente la selectividad de un método podrán ser diferentes en función del tipo de muestra a analizar, la técnica utilizada, la información bibliográfica disponible, etc. Usualmente, la selectividad de un método se investiga mediante el estudio de su capacidad para medir el analito de interés en alícuotas de muestra a las cuales se añaden deliberadamente interferencias específicas (aquellas que se cree probable estén presentes en las muestras). Si no se está seguro de que las interferencias están presentes, la selectividad de un método se puede investigar estudiando su capacidad de medir el analito mediante comparación con otros métodos o técnicas independientes insensibles a los interferentes potenciales

del método a validar (*Bagur et al., 2005; González et al., 2007a; Eurachem/Citac, 1998; AEFI, 2001*).

La selectividad se puede cuantificar mediante la evaluación de los siguientes parámetros:

- ▲ Relación máxima tolerada de un interferente, *RT*, es la relación entre la concentración máxima admisible de interferente para una concentración dada de analito por encima de la cual la perturbación causada por el interferente hace que la concentración de analito determinada difiera significativamente de la concentración de analito obtenida en ausencia de interferente (*González et al., 2007a; Thompson et al., 2002*).

$$RT = \frac{C_{int}}{C_{anal}} \quad ec. 2.1$$

- ▲ Relación de sensibilidades, *RS*. Cuando el interferente tiene una curva de calibración propia, la selectividad del método puede describirse como el cociente entre la sensibilidad del analito, *S<sub>anal</sub>* (pendiente de la línea de calibrado del analito) y la sensibilidad del interferente, *S<sub>int</sub>* (pendiente de la línea de calibrado del interferente).

$$RS = \frac{S_{anal}}{S_{int}} \quad ec. 2.2$$

- ▲ Cuando se trate de comparar la sensibilidad de dos métodos para un interferente dado se emplea el denominado factor de sensibilidad, *FS*, que es el cociente de las relaciones máximas toleradas en cada método para dicho interferente en la determinación de un mismo analito.

$$FS = \frac{RT_{método1}}{RT_{método2}} \quad ec. 2.3$$

Si las perturbaciones son notables, debe procederse a seleccionar un nuevo método como candidato a ser validado. No obstante, no es necesario desechar los métodos analíticos poco selectivos ya que se puede utilizar siempre que el interferente se encuentre en concentración inferior a la que causa una interferencia significativa en el resultado. Otra opción sería incluir en el método de ensayo un procedimiento complementario que demuestre que las sustancias interferentes están ausentes o se pueden eludir de alguna forma (*AEFI, 2001; UNE 77004, 2002*).

Cuando el laboratorio emplea métodos de ensayo que no son de nueva implantación sino adaptaciones de otros debidamente documentados, no se suelen realizar ensayos encaminados a verificar la selectividad/especificidad del método durante su validación, sino que esta se justifica en base a la información recogida en los métodos de referencia (*Muñoz Benito, 2001*).

En todo caso, cualquier interferencia o restricción conocida de la técnica analítica y las decisiones tomadas durante la validación deben estar justificadas documentalmente.

### Intervalo de trabajo, intervalo lineal y linealidad

El intervalo de trabajo se puede definir como el intervalo donde la respuesta analítica del método es proporcional a la concentración de analito en la muestra. Dentro del intervalo de trabajo suele existir un intervalo lineal donde la relación respuesta/concentración es constante.

Si representamos gráficamente la señal analítica obtenida para concentraciones crecientes de analito, al visualizar la curva se comprueba que se divide en tres intervalos, ver Fig. 2.1.

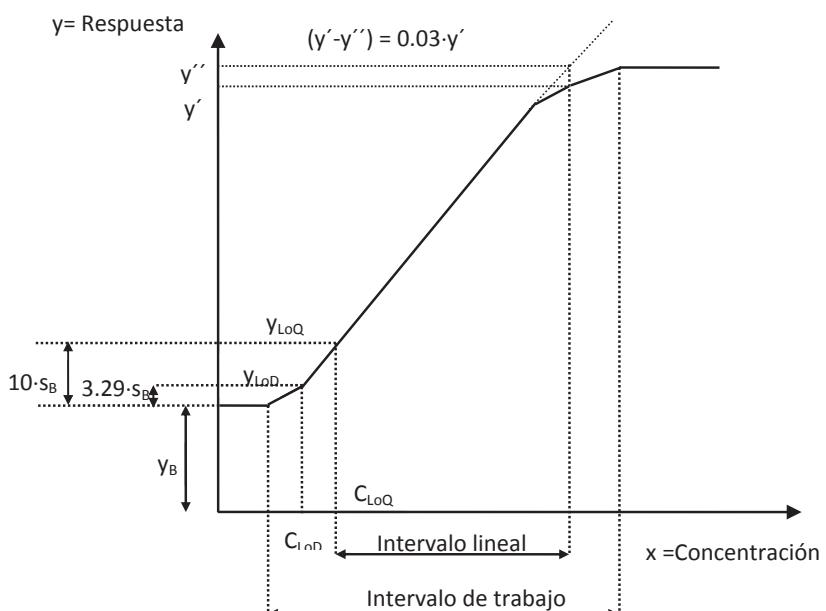


Fig. 2.1: Representación gráfica señal/concentración (Eurachem/Citac, 2011)

- ▲ Un primer intervalo a concentraciones muy bajas de analito donde no es posible detectar el analito ya que la única señal obtenida es la que corresponde al blanco.
- ▲ Un segundo intervalo a concentraciones intermedias del analito, llamado intervalo de trabajo o intervalo dinámico, donde la señal varía con la concentración. Dentro de este intervalo pueden diferenciarse tres tramos.
  - ◆ Un primer tramo acotado por la concentración cuya señal empieza a diferir de la señal del blanco y el límite de cuantificación.
  - ◆ Un segundo tramo que es el denominado intervalo lineal (también llamado intervalo de ensayo o rango de ensayo), cuyo límite inferior es el límite de cuantificación y el límite superior se establece como la concentración a partir de

la cual el equipo proporciona una señal que se aparta de la linealidad en un 3%. En este tramo la relación señal/concentración permanece constante.

El límite superior del intervalo lineal en ensayos que no requieren línea de calibrado se establece mediante las especificaciones técnicas del equipo de medida, material o reactivos (por ejemplo medida de  $\text{DBO}_5$  manométrica, volumen máximo dosificado, concentración de disoluciones valorantes...) involucrados en el procedimiento analítico.

- Un tercer tramo que se inicia en el límite superior donde la variación señal/concentración disminuye hasta hacerse cero.
- ▲ Por último, hay un tercer intervalo a concentraciones altas de analito donde la señal ya no varía con la concentración siendo la variación señal/concentración constante e igual a cero.

El proceso para evaluar el intervalo lineal de un método de análisis que se pretende validar consiste en examinar patrones de concentraciones crecientes conocidas de analito, representando gráficamente los datos señal/concentración, y determinar cuáles son los límites de concentración entre los cuales el método analítico es lineal.

La mayoría de los métodos basados en técnicas instrumentales necesitan una calibración mediante alguno de estos métodos: patrón externo, adiciones patrón (MAP), patrón interno (PI)... (*Cuadros Rodríguez et al., 2001b; Danzer et al., 1998*). Para estos métodos donde es necesario realizar un calibrado instrumental, la evaluación del intervalo lineal se realiza haciendo un estudio exhaustivo de su linealidad. Una vez establecido el intervalo lineal del método de análisis se recomienda preparar varias líneas de calibrado con cinco o más niveles de concentración. Estos niveles de concentración se preparan habitualmente por dilución de disoluciones patrón concentradas del analito. No obstante, siempre que sea posible es recomendable preparar cada nivel de concentración a partir de disoluciones patrón independientes, para eliminar el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada y realizando diluciones (*AOAC, 2002b; ISO 8466-1, 1990; Thompson et al., 2002*).

El número de medidas replicadas de cada nivel depende de la precisión del instrumento de medida, pero habitualmente se mide por triplicado. Estadísticamente lo correcto es analizar los niveles de forma aleatoria; no obstante, se establece como criterio práctico analizarlas en sentido creciente de concentración para minimizar posibles efectos memoria en el equipo.

En primer lugar, se realiza un análisis de regresión para estudiar la relación entre la respuesta del instrumento,  $y$ , y la concentración del patrón,  $x$ . Esta relación es expresada como una función matemática que puede ser empleada para predecir el valor de una de las variables una vez conocida la segunda. La técnica matemática de regresión más empleada, *Modelo I*, consiste en buscar la “mejor” relación lineal entre la señal analítica y la concentración. Este método obtiene una función lineal,  $y = bx + a$ , donde  $b$  es la pendiente y  $a$  es el término independiente,  $u$  ordenada en el origen. El *Modelo I*, esquematizado en la Fig. 2.2, supone que todos los errores residen en los

valores de  $y$ , y que las concentraciones de los patrones,  $x$ , se encuentran libres de error. Ya que se ha supuesto que todos los errores se encuentran en  $y$ , ahora se trata de buscar la recta que minimice las diferencias en la dirección  $y$ , es decir, entre los puntos experimentales y los predichos por la función lineal. Ya que algunas de estas diferencias serán positivas y otras negativas, es razonable intentar minimizar la suma de sus cuadrados pues estos serán todos positivos. Esto explica el uso frecuente del término método de los mínimos cuadrados para este procedimiento (Massart *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2002).

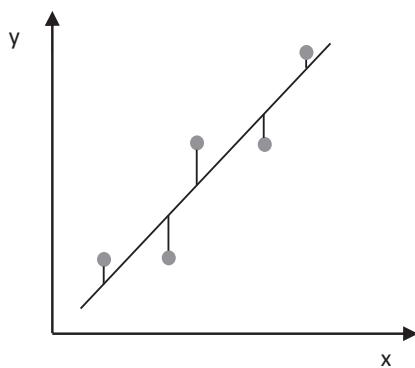


Fig. 2.2: Suposiciones hechas por el *Modelo I* para el análisis de la regresión lineal

Las ecuaciones que permiten calcular  $a$  y  $b$  son las siguientes:

$$a = \bar{y} - b \cdot \bar{x} = \frac{\sum y_i - b \cdot \sum x_i}{n} \quad \text{ec. 2.4}$$

$$b = \frac{\sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y})}{\sum (x_i - \bar{x})^2} = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \sum y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} \quad \text{ec. 2.5}$$

donde  $x_i$  e  $y_i$  son cada par de puntos concentración y respuesta,  $\bar{x}$  e  $\bar{y}$  son los valores promedio de las concentraciones y respuestas y  $n$  el número de pares de puntos de la línea de calibrado.

Otros supuestos que se hacen habitualmente son: (i) si se realizan varias medidas sobre un patrón, los valores resultantes de  $y$  tienen una distribución de errores normal o Gaussiana; (ii) la magnitud de los errores en los valores de  $y$  es independiente de la concentración del analito. Si es cierta esta segunda afirmación, implica que todos los puntos del gráfico deberían tener en los cálculos igual peso, es decir, que es igualmente importante que la línea pase cerca de los puntos con valores de  $y$  altos o bajos. Sin embargo, en la práctica hay ejemplos donde los errores en el valor de  $y$

aumentan cuando aumenta la concentración del analito; en estos casos se debe emplear el método de regresión ponderada (*Massart et al., 1997; Miller et al., 2002*).

En caso de que tanto  $x$  como  $y$  estén sujetas a error se usan técnicas de regresión de *Modelo II*, también llamado modelo de regresión de distancia ortogonal, esquematizado en la Fig. 2.3 (*Massart et al., 1997*).

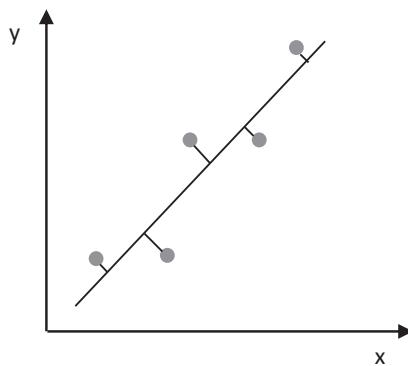


Fig. 2.3: Suposiciones hechas por el *Modelo II* para el análisis de regresión de distancia ortogonal

Una vez obtenida la función lineal, se representa gráficamente la recta de calibrado para una mejor visualización de la bondad del ajuste (*Díaz-Guerra et al., 2000*). No obstante, es preciso llevar a cabo un análisis de la linealidad que permita validar la línea de calibrado. Con este fin se aplican criterios y pruebas estadísticas como el análisis de residuales, criterios para detectar *outliers*, el coeficiente de correlación de Pearson o el análisis de varianza, (*Brüggemann et al., 2006; Massart et al., 1997; Miller et al., 2002; ISO 11095, 1996*).

Se llaman residuales  $e_i$  a las diferencias  $y_i - \hat{y}_i$  siendo  $y_i$  los valores experimentales de las respuestas e  $\hat{y}_i$  los valores predichos por el modelo lineal obtenido para los valores experimentales de  $x_i$ . El objetivo es hacer mínima la suma de cuadrados de los residuales ya que la situación ideal correspondería a valores residuales  $e_i = 0$ . La bondad del ajuste se expresa como la desviación estándar de los residuales,  $s_e$ , que debe ser mínima.

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad ec. 2.6$$

La representación gráfica de los residuales,  $e_i$ , frente a la concentración,  $x_i$ , aporta mucha información acerca de la validez del modelo. Los residuales deben ser homocedásticos, es decir, aleatoriamente distribuidos en torno a cero y de pequeña magnitud. Si los residuales aumentan con la concentración debe emplearse una regresión ponderada (*Miller et al., 2002*).

Para la detección de *outliers* u observaciones anómalas de la recta de calibrado existen varios criterios (*ISO 16269-4, 2010*):

- ▲ Comprobar que el error relativo de la concentración de un patrón dado, %Er, determinada con la línea de calibrado obtenida, no sea superior al  $\pm 5\%$  de la concentración nominal, excepto para el límite de inferior, para el que se admite hasta un 20% (*AIFI, 2001; Karnes et al., 1991*):

$$\%Er = \frac{x_i - \hat{x}_i}{x_i} \cdot 100 \quad ec. 2.7$$

siendo  $x_i$  el valor nominal de concentración y  $\hat{x}_i$  la concentración predicha por la línea de calibrado.

- ▲ Estimar el valor absoluto del residual estandarizado del valor sospechoso,  $e_i/s_e$ . Si dicho valor es mayor de 2 o 3 el punto se rechaza. Este criterio se basa en la distribución normal de los residuales, ya la probabilidad de que un residual sea superior a 2 o 3 veces  $s_e$  es despreciable. Por desgracia no suele ser concluyente pues los *outliers* "atraen" la línea ajustada.
- ▲ Calcular la distancia de Cook al cuadrado del valor sospechoso.

$$CD_{(*)}^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \hat{y}_i^{(*)})^2}{p \cdot s_e^2} \quad ec. 2.8$$

donde  $\hat{y}_i$  son los valores predichos con la línea de regresión calculada con todos los puntos,  $\hat{y}_i^{(*)}$  son los valores predichos con la línea de regresión calculada eliminando el sospechoso;  $p$  son los coeficientes del modelo de regresión (2 para una recta). Cuanto mayor es  $CD_{(*)}^2$ , mayor es la probabilidad de que el *outlier* no sea representativo de la regresión, siendo 1 el valor mínimo para rechazar el punto sospechoso. Este criterio es más sensible a los valores sospechosos de la línea de calibrado que el anterior (*Bonilla Campos et al., 2001; Henderson, 2006; Massart et al., 1997*).

El coeficiente de correlación de Pearson,  $r$ , nos indica el grado de relación entre la variable  $x$  y la variable  $y$ .

$$r = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 \cdot \sum (y_i - \bar{y})^2}} = \frac{\sum x_i \cdot y_i - \frac{\sum x_i \cdot \sum y_i}{n}}{\sqrt{\left( \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \right) \cdot \left( \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right)}} \quad ec. 2.9$$

Su valor puede estar comprendido entre -1 y 1. Un valor próximo a -1 o 1 significa que existe correlación, negativa o positiva, con una probabilidad elevada y un valor próximo o igual a 0 indica ausencia de relación lineal entre las variables. Sin embargo, valores próximos a 1 o -1 no deben tomarse como único indicador de linealidad o

valores muy bajos o intermedios como falta de ella (*Sonnergaard, 2006; Van Loco et al., 2002*), sino que debe ser demostrado aplicando por ejemplo una prueba estadística como *t de Student* adecuada (ver Tabla 2.2) para ver si la correlación es significativa (*Miller et al., 2002*).

El coeficiente de determinación,  $r^2$ , indica la proporción de la varianza total de *y* que se explica por el modelo de mínimos cuadrados. Puede expresarse en porcentaje.

Otra forma de demostrar que la relación que liga las variables es correcta y no hay falta de ajuste es mediante un análisis de varianza, ANOVA (ANalysis Of VAriance). Mediante este análisis se compara la varianza debida a la falta de ajuste, con la varianza experimental estimada a través de medidas replicadas de la variable observada, (*Comisión Europea, 2009; González et al., 2006; Massart et al., 1997*).

La presencia de error residual implica errores aleatorios en la estimación de la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de calibrado,  $s_a$  y  $s_b$ , que a su vez se propagan al resultado final ya que la concentración de las muestras se obtiene por interpolación en la recta de calibrado. Esos errores se estiman mediante las siguientes ecuaciones:

$$s_b = \frac{s_e}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad ec. 2.10$$

$$s_a = s_e \cdot \sqrt{\frac{\sum x_i^2}{n \cdot \sum(x_i - \bar{x})^2}} \quad ec. 2.11$$

Para estimar los intervalos de confianza de los parámetros de la curva de calibrado se deben obtener al menos cuatro líneas de calibración independientes realizadas en condiciones de reproducibilidad (durante cuatro días distintos, y a ser posible con distinto personal y equipos). Con los resultados obtenidos se estiman los valores promedio del coeficiente de correlación, de los coeficientes de regresión,  $\bar{b}$  y  $\bar{a}$ , y de sus errores aleatorios,  $\bar{s}_b$  y  $\bar{s}_a$ . Los intervalos de confianza para las curvas de calibrado se calculan entonces como:

$$b = \bar{b} \pm t \cdot \bar{s}_b \quad ec. 2.12$$

$$a = \bar{a} \pm t \cdot \bar{s}_a \quad ec. 2.13$$

donde *t* es el valor de la distribución *t de Student* para un test de dos colas con *n-2* grados de libertad y nivel de significación igual a 0.05 (*De Beer et al., 2007a; Fustinonia et al., 2010; Massart et al., 1997; Miller et al., 2002*). A la vista de los resultados podrá decidirse la frecuencia del calibrado (cada día, cada semana...).

Estos intervalos se incluirán posteriormente en el método de ensayo como criterios que deben cumplir las rectas de calibración. Cualquier desviación respecto de estos intervalos supondrá un aviso de anomalía (instrumental, experimental...) durante el desarrollo del método de análisis (*Carril et al., 1997; Ohlsson, 2012*).

En la Tabla 2.2 se recogen otras pruebas estadísticas ampliamente usadas para la validación de una recta de calibrado (*Massart et al., 1997; Miller et al., 2002*).

Tabla 2.2: Criterios estadísticos para la validación de líneas de calibrado

Parámetro	Criterio	Prueba de significación	Observaciones
Pendiente	$0 \notin b \pm t \cdot s_b$	$t_{cal} = \frac{ b }{s_b} > t_{critico(0.05, n-2)}$	Si $b = 0$ la recta es paralela al eje de abscisas y no habría correlación. A mayor $b$ mayor sensibilidad
Ordenada	$0 \in a \pm t \cdot s_a$	$t_{cal} = \frac{ a }{s_a} < t_{critico(0.05, n-2)}$	Si $a$ difiere significativamente de 0 evidencia errores sistemáticos (no aplicable al MAP)
Coeficiente de correlación	$r \neq 0$	$t_{cal} = \frac{ r  \cdot \sqrt{(n-2)}}{\sqrt{(1-r^2)}} > t_{critico(0.05, n-2)}$	$r \geq 0.990$ para líneas con $n \geq 4$
Factores de respuesta	$f = \frac{y_i}{x_i}$ $\%DER = \frac{s_f}{f} \cdot 100 < 10$	----	Deben ser semejantes y cercanos al valor de la pendiente. %DER > 10% indica falta de linealidad
Falta de ajuste	ANOVA	$F_{cal} = \frac{MS_{FdA}}{MS_{PE}} < F_{tab(0.05, (n-2) y (k-n))}$ MS: media cuadrática FdA: Falta de ajuste PE: Puro error	MS <sub>FDA</sub> y MS <sub>PE</sub> solo pueden ser comparadas cuando la variable en cada punto se repite ( $n$ , nº pares de puntos de la línea de calibrado y $k$ , nº total de medidas)

La respuesta de algunos métodos analíticos no se relaciona linealmente con la concentración de analito, sino que proporcionan gráficas de calibración curvas en una parte del intervalo de concentración de interés. Esto es usualmente válido y no impide que el método sea eficaz siempre y cuando la curva sea reproducible con el tiempo (*Barroso et al., 2006; Eurachem/Citac, 1998; ISO 8466-2, 2001; Kirkup et al., 2004, Miller et al., 2002*).

### Sensibilidad

Se define sensibilidad de un método analítico como la capacidad para discriminar concentraciones semejantes del analito a determinar. Una definición más general de sensibilidad es la relación entre la señal,  $y$ , y la concentración,  $x$ , esto es, la variación de la señal analítica por unidad de concentración. Por tanto, la sensibilidad es mayor

cuando un mínimo incremento de concentración conduce a un aumento notable de respuesta. Para métodos de ensayo que requieren calibración lineal esta coincide con la pendiente de la línea de calibrado,  $b$ , y se estima como el promedio de las pendientes de varias líneas de calibrado realizadas en condiciones de reproducibilidad (durante al menos 4 días distintos, distinto personal y equipos...).

Experimentalmente se calcula analizando como mínimo 5 patrones o materiales de referencia con concentraciones crecientes de analito en el intervalo lineal del método de ensayo y calculando los factores de respuesta,  $f$ . Si el rango de lineal es muy amplio recomendable efectuar el estudio de sensibilidad en dos intervalos de concentración (*Muñoz Benito, 2001*).

Para comparar dos métodos analíticos con la misma sensibilidad no es suficiente con conocer la pendiente de la línea de calibrado. La mínima concentración,  $d$ , que puede ser distinguida depende de la desviación estándar de la señal,  $s_y$ , de la pendiente de la recta de calibrado,  $b$ , y los riesgos de cometer errores  $\alpha$  y  $\beta$  (*Massart et al., 1997*).

$$d = \frac{\left( t_{1-\alpha/2} + t_{(1-\beta)} \right) \cdot s_y \cdot \sqrt{2}}{b} \quad ec. 2.14$$

### Límite de decisión (Ld), límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ)

Las definiciones más empleadas son las propuestas por la IUPAC, recogidas en el Compendium de Nomenclatura Analítica (*Currie, 1995; Inczedy et al., 1997*). Las definiciones de límite de detección y cuantificación han ido cambiando con el paso del tiempo. La IUPAC en un principio definía el límite de detección como la cantidad de analito que puede detectarse con una certeza razonable y proponía la siguiente ecuación:

$$(y_{LoD}) = \bar{y}_B + k_D \cdot s_B \quad ec. 2.15$$

Siendo  $\bar{y}_B$  el valor medio de una serie de medidas replicadas del blanco,  $s_B$  la desviación estándar de estas medidas y  $k_D$  una constante relacionada con el nivel de confianza deseado,  $\alpha$ , empleándose inicialmente un valor  $k_D = 3$ . En revisiones posteriores, la IUPAC distingue entre una mínima concentración estimada significativamente, límite de decisión y la mínima concentración verdadera detectable o límite de detección.

Si el error de *tipo I* o  $\alpha$  es la probabilidad de dar falsos positivos, y el error de *tipo II* o  $\beta$  la de dar falsos negativos, el límite de decisión, se elige atendiendo a la probabilidad máxima de cometer uno u otro error que se desee establecer, procurando siempre mantener  $\alpha$  a un nivel bajo para minimizar falsos positivos. La Fig. 2.4 ilustra la relación

entre los errores  $\alpha$  y  $\beta$  y el límite de decisión. Para un  $\alpha$  dado,  $\beta$  puede llegar a ser hasta un 50% cuando la señal detectada coincide con el límite de decisión.

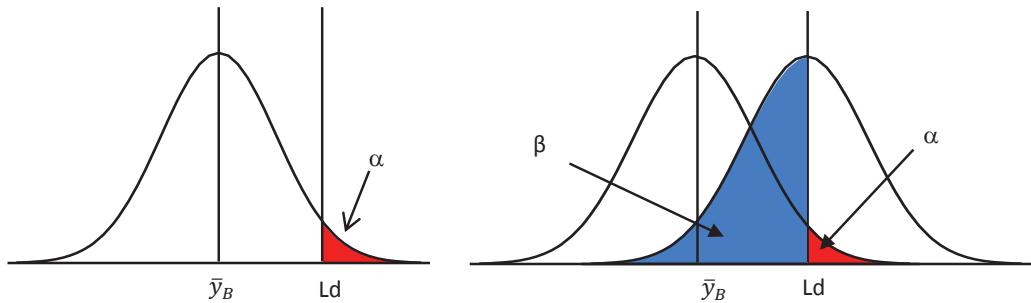


Fig. 2.4: Relación entre límite de decisión y los errores  $\alpha$  y  $\beta$  suponiendo que la señal analítica sigue una distribución normal

La IUPAC y la ISO prefieren hoy en día un  $\alpha$  del 5% lo cual se corresponde con un valor  $k_d = 1.645$  (ISO 11843-1, 1997).

$$(y_{Ld}) = \bar{y}_B + k_d \cdot s_B = \bar{y}_B + 1.645 \cdot s_B \quad ec. 2.16$$

Para reducir el error de *tipo II* o  $\beta$  (falsos negativos) es necesario aumentar el valor límite obteniéndose el límite de detección.

Anteriormente, se admitía  $k_D = 3$  con lo que  $\alpha = 0.13\%$ . Hoy en día, la IUPAC y la ISO proponen  $\alpha = \beta = 5\%$  por lo que el valor de  $k_D$  ahora es  $2 \times 1.645 = 3.29$  (ver Fig. 2.5).

$$(y_{LoD}) = \bar{y}_B + 3.29 \cdot s_B \quad ec. 2.17$$

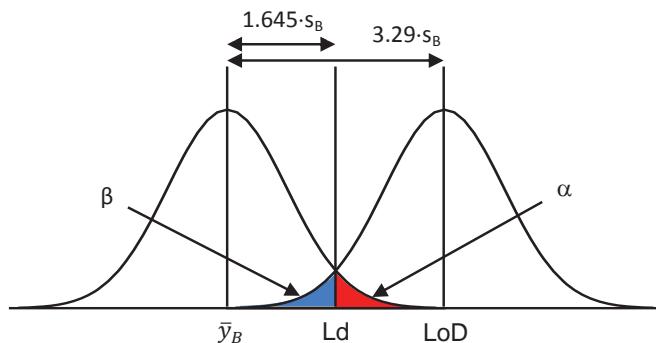


Fig. 2.5: Distribuciones normales del blanco y límite de detección para  $\alpha = \beta = 5\%$

El límite de cuantificación, LoQ, en cambio, se define como la concentración mínima de analito que puede determinarse con un nivel aceptable de exactitud y precisión, y se estima mediante la siguiente ecuación:

$$(y_{LoQ}) = \bar{y}_B + k_Q \cdot s_B = \bar{y}_B + 10 \cdot s_B \quad ec. 2.18$$

La IUPAC propone en este caso un valor de  $k_Q = 10$ .

Entre el límite de detección y el límite de cuantificación hay un rango de concentraciones en el que, si bien no puede cuantificarse el analito con razonable certeza, es posible detectar su presencia sin incurrir en falsos positivos.

En la práctica, los límites de detección y cuantificación se estiman por algunos de los procedimientos descritos a continuación (*Apostol et al., 2009; ICH, 2005; Comisión Europea, 2002; Eurachem/Citac, 1998; Massart et al., 1997; Vial et al., 1999*):

Si el blanco proporciona señal analítica, se realizan medidas replicadas ( $n = 4-10$ ) en condiciones de reproducibilidad, calculándose los límites de detección y cuantificación según la ec. 2.17 y ec. 2.18.

En el caso de que el blanco no proporcione señal analítica, se realizan medidas replicadas ( $n = 4-10$ ) en condiciones de reproducibilidad, de un blanco fortificado con la menor concentración de analito que proporcione una señal medible, calculándose los límites de detección y cuantificación de la siguiente forma.

$$(y_{LoD}) = 3.29 \cdot s_B \quad ec. 2.19$$

$$(y_{LoD}) = 10 \cdot s_B \quad ec. 2.20$$

Cuando el procedimiento de análisis utiliza una técnica instrumental, y el blanco proporciona una señal continua debida al ruido de fondo, los límites de detección y cuantificación se expresan, respectivamente, como las concentraciones de analito que proporcionan una señal 3.29 y 10 veces superior a dicho ruido de fondo. A estos límites se les suele denominar límites de detección y cuantificación instrumentales (*Ribani et al., 2007*).

Para el caso de métodos analíticos que requieran calibrado instrumental hay varias opciones (*Brüggeman et al., 2010; Verdon et al., 2006*):

Un requisito básico del ajuste por el método de mínimos cuadrados es que los residuales sigan una distribución normal con una desviación estándar estimada  $s_e$ ; es por tanto adecuado utilizar este valor en lugar de  $s_B$ . Del mismo modo, el valor de la ordenada en el origen,  $a$ , puede ser empleada como estimación de la señal del blanco,  $y_B$ , evitando múltiples determinaciones del blanco que consumen mucho tiempo.

$$(y_{LoD}) = a + 3.29 \cdot s_e \quad ec. 2.21$$

$$(y_{LoQ}) = a + 10 \cdot s_e \quad ec. 2.22$$

Otra posibilidad en extrapolar la recta de calibrado a concentraciones próximas al cero y asumir que la desviación de la ordenada en el origen,  $s_a$ , es una estimación de la desviación estándar del blanco,  $s_B$  (*Miller et al., 2002*).

Una vez estimados los valores de  $y_{LoD}$  e  $y_{LoQ}$  se calcula el valor de la concentración para el límite de detección  $C_{LoD}$  y  $C_{LoQ}$  despejando de la función matemática que relaciona la señal con la concentración.

Otro método para calcular el límite de cuantificación es el propuesto por Eurachem (*Eurachem/Citac, 1998*). Consiste en analizar repetidamente muestras con diferentes niveles de concentración, próximos al límite de cuantificación, y representar la desviación estándar relativa (%DER) en función de la concentración de analito. El límite de cuantificación se corresponde con la concentración de analito a partir de la cual se cumple un criterio de precisión previamente establecido, habitualmente un %DER=10%, aunque se puede llegar a aceptar hasta un 20%, en función de las características del método (*Vial et al., 2003*).

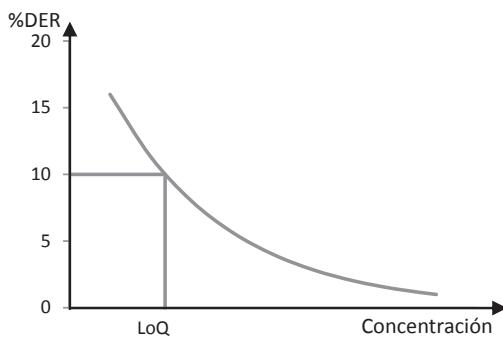


Fig. 2.6: Método Eurachem para el cálculo del LoQ

En aquellos métodos analíticos que sean adaptaciones de otros debidamente documentados se fija un límite de cuantificación en base al alcance del método de ensayo, a la información bibliográfica disponible, o de acuerdo con la experiencia (*Muñoz Benito, 2001*). Fijar límites de cuantificación por debajo de las exigencias del método supone un esfuerzo improductivo para conseguirlos y mantenerlos. Como hemos visto, para métodos de ensayo que requieren calibrado instrumental los límites de detección y cuantificación están relacionados con los parámetros de la recta de calibrado, por tanto hay que evitar que al menos el límite de cuantificación coincida con el extremo inferior del intervalo lineal, donde los errores son mayores. Cuando es difícil preparar muestras sintéticas con concentraciones próximas al límite de cuantificación, puede ser admisible imponer como límite de cuantificación la concentración más baja encontrada en patrones o materiales de referencia comerciales.

Una vez obtenidos unos LoD y LoQ teóricos resulta evidente la necesidad de hacer la comprobación experimental de que los valores obtenidos cumplen las condiciones de exactitud requeridas.

A la hora informar de los límites de detección y cuantificación de un método analítico hay que tener en cuenta algunas consideraciones:

Cuando para una muestra se informa de un resultado negativo, no se está diciendo que el analito no se encuentra en la muestra, sino que está en concentración inferior al límite de detección del método. El informe no debe decir “no existe”, sino “no se detecta”, indicando al mismo tiempo tanto el límite de detección como el límite de cuantificación del método (*Ramis Ramos et al., 2001*).

Con frecuencia estos límites se expresan en unidades de masa para lo cual se multiplican los límites, en unidades de concentración, por la masa o volumen de muestra requerido por el método.

Dado que en todos los casos los límites de detección y cuantificación se estiman a partir de la señal del blanco y su varianza, y esta suele aumentar con la complejidad de la matriz de la muestra y del método analítico, debe indicarse el tipo de estandares o muestras con las que se han medido los blancos (*Ramis Ramos et al., 2001*).

Una alta sensibilidad del método analítico no siempre implica límites de cuantificación y detección inferiores, ya que lo que definirá estos límites es la relación entre la señal debida al analito y el ruido; es decir, es preferible un sistema con bajo ruido de fondo a costa de una menor sensibilidad.

### Exactitud

El objetivo de un análisis químico es encontrar el valor verdadero,  $\mu$ . Sin embargo, esto en la realidad no es posible ya que normalmente los resultados obtenidos,  $x_i$ , están afectados por un error,  $e_i$ , que es la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero,  $e_i = x_i - \mu$ . Este error es lo que la ISO llama exactitud y define como *la concordancia entre un resultado de un test o resultado de medición y el valor verdadero (en la práctica valor de referencia aceptado)*. En el caso de disponer de varias medidas la concentración de analito se estima mediante la media de las medidas,  $\bar{x}_i$  pudiendo dividir la ecuación en dos términos:

$$e_i = x_i - \mu = (x_i - \bar{x}_i) + (\bar{x}_i - \mu) \quad ec. 2.23$$

El primer sumando es la componente del error aleatorio y el segundo corresponde con el error sistemático. Dado que el error sistemático produce un sesgo en el resultado y los errores aleatorios causan imprecisión, la exactitud hace referencia a una combinación de veracidad y precisión.

### Veracidad

La veracidad es la concordancia entre el valor medio de una serie de medidas,  $\bar{x}_i$  y el valor aceptado como referencia o valor verdadero,  $\mu$ . Se relaciona con la ausencia de sesgo o *bias*,  $\delta$ , esto es, con la ausencia de error sistemático. El sesgo se estima como la diferencia entre el valor medio experimental y el valor verdadero. La ISO define el valor verdadero como *el valor que caracteriza una cantidad perfectamente definida en las condiciones que existen en el momento en el que tal cantidad es observada (UNE-ISO 3534-1, 2006; UNE-ISO 3534-2, 2006)*.

Las desviaciones respecto al valor verdadero pueden ser tanto por exceso como por defecto. Algunas fuentes de error que producen frecuentemente sesgo en el resultado son: la presencia de interferencias analíticas, pérdidas de analito por extracción incompleta, volatilización o adsorción, contaminación de la muestra por los reactivos o por el material empleado... (*Magnusson et al., 2008*).

El valor de referencia,  $\mu$ , con el cual comparamos nuestro valor experimental se puede obtener de las siguientes formas:

- ▲ Analizando una muestra de referencia o muestra de control que puede ser: un material de referencia certificado (MRC), un material de referencia (MR)/Patrón Químico (PQ) o una muestra obtenida a partir de un ejercicio interlaboratorio. Estos materiales de referencia han de cumplir obligatoriamente una serie de propiedades como son: (i) la concentración del analito debe estar incluida en el intervalo de concentración indicado en nuestro método de ensayo y cuya matriz tenga una composición similar a las de las muestras, (ii) siempre que sea posible, el material de referencia debe poseer propiedades que se mantengan estables a lo largo del experimento, (iii) cuando un material de referencia se subdivida, es necesario tener cuidado para evitar la introducción de cualquier error adicional y para evitar la pérdida de homogeneidad, (iv) la cantidad de material de referencia debe ser suficiente para la evaluación de la veracidad, incluyendo una cierta cantidad de reserva (*Funk et al., 2007; Valcárcel et al., 1992*).

Cuando no se disponga de un material de referencia externo adecuado se puede recurrir a una de las siguientes técnicas (*Díaz-Guerra et al., 2000; Magnusson et al., 2008*):

- ▲ Comparación con un método de referencia. Comparación de los resultados obtenidos para una muestra analizada por el método a validar y por un método de referencia en el propio laboratorio. El método de referencia debe haber sido previamente validado y ser aplicable a nuestro tipo de muestras. El método de referencia elegido debe tener el mismo alcance que el método a validar (*De Beer et al., 2007b; Eurachem/Citac, 1998; Kuttatharmmakul et al, 1999; Nguyen Minh Nguyet et al., 2004; Sacré et al., 2011; UNE 82009-6, 1999*).
- ▲ Mediante la participación en un ejercicio interlaboratorio, ya sea del tipo colaborativo (*AOAC, 2002a; Wells, 1998*) o ensayos de aptitud (*Boqué et al., 2002; Willetts et al., 2000; Zeleny et al., 2009*), donde el valor de referencia es el valor consensuado por los participantes o bien un valor asignado por el organizador.

▲ Análisis de muestras dopadas. Es una técnica muy empleada cuando ninguna de las anteriores resulta factible. Consiste en analizar una serie de muestras a las que se les ha adicionado cantidades conocidas de analito,  $\mu = \mu_{añadido}$ . Si se dispone de muestra original exenta del analito objeto de estudio bastará con obtener la concentración presente en la matriz dopada,  $\bar{x}_i$ . Si la muestra contiene analito deberá además determinarse el analito en la muestra original,  $\bar{x}_{matriz}$ , y en la muestra dopada (Suárez et al., 2012):

Si se quiere evaluar la veracidad en todo el rango de trabajo se dopa la muestra con cantidades crecientes de analito y se representa gráficamente la cantidad analito determinada frente a la cantidad de analito añadida, como se muestra en la Fig. 2.7 (Ahlström et al., 2005; AOAC, 2002c; Basilicata et al., 2005; Compañó Beltrán et al., 2002; Eurachem/Citac, 1998; García Campaña et al., 1997; Xu et al., 2012).

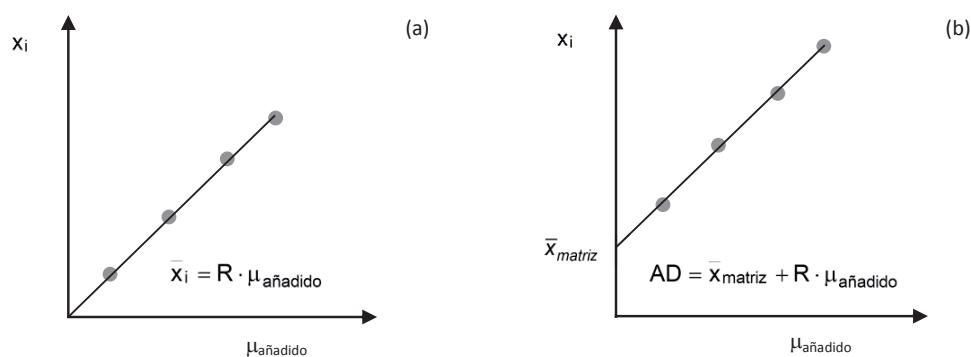


Fig. 2.7: Representación gráfica del análisis de muestras dopadas a varias concentraciones: (a) En una matriz ausente de analito (b) en una matriz contenido analito. R = Recuperación

Lo ideal es emplear este método dopando porciones de un material certificado de forma que la concentración inicial sea perfectamente conocida. De esta forma, el procedimiento permite identificar tanto errores sistemáticos constantes como proporcionales a la concentración, como se esquematiza en la Fig. 2.8 (Massart et al., 1997; Thompson et al., 2005).

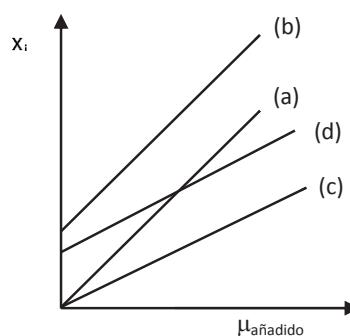


Fig. 2.8: Relación entre analito añadido y determinado: (a) ausencia de error sistemático ( $b=1$ ;  $a=0$ ), (b) presencia de error sistemático constante( $b=1$ ;  $a\neq0$ ), (c) presencia de error sistemático proporcional ( $b\neq1$ ;  $a=0$ ), (d) combinación de distintos errores ( $b\neq1$ ;  $a\neq0$ ),

La cantidad de analito añadida debe ser similar a la concentración inicialmente presente en la muestra, pero dentro del rango lineal del procedimiento analítico a usar. La sustancia dopante debe tener solubilidad análoga al componente en la muestra, similar reactividad y el mismo estado de oxidación. A ser posible se añadirá sólido o en disolución concentrada para no diluir la muestra ya que la dilución provocaría un cambio de la matriz analítica y errores de dilución. Si el volumen de muestra varía 0.5% debe recalcularse la concentración. En este método se pueden cometer errores por exceso ya que las interacciones entre el analito añadido y la matriz son más débiles que las del analito original y la matriz (Funk et al., 2007).

El sesgo o error sistemático se cuantifica numéricamente como error absoluto, ec. 2.24, como porcentaje de error relativo, ec. 2.25, o como porcentaje de recuperación, ec. 2.26. En el caso de emplear muestras dopadas, el sesgo se estima como el porcentaje de recuperación de analito, distinguiéndose dos casos: cuando la matriz está exenta de analito, ec. 2.27 (Barwick et al., 2000b), y cuando el analito está presente en la matriz original, ec. 2.28 (Barwick et al., 1998; Muñoz Benito, 2001).

$$\delta = \bar{x}_i - \mu \quad \text{ec. 2.24}$$

$$\%Er = \frac{\bar{x}_i - \mu}{\mu} \cdot 100 \quad \text{ec. 2.25}$$

$$\%R = \frac{\bar{x}_i}{\mu} \cdot 100 \quad \text{ec. 2.26}$$

$$\%R = \frac{\bar{x}_i}{\mu_{añadida}} \cdot 100 \quad \text{ec. 2.27}$$

$$\%R = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_{matriz}}{\mu_{añadida}} \cdot 100 \quad \text{ec. 2.28}$$

Inicialmente la IUPAC (Thompson et al., 1999) definió el término recuperación como la proporción de la cantidad de analito presente o añadido en una muestra analítica, que se extrae para posteriormente cuantificarla. Sin embargo, ante la presencia de dos contextos distintos en los que el término "recuperación" puede ser aplicado, la misma organización ha recomendado posteriormente la distinción entre los términos: (i) "recuperación" o "factor de recuperación", para el rendimiento de un analito en una etapa de preconcentración o extracción de un procedimiento analítico; y (ii) "recuperación aparente" para la relación entre el valor observado y el valor de referencia (MRC, muestra adicionada...) y que está relacionado, por tanto, con el sesgo (Cuadros Rodríguez et al., 2005; Burns et al., 2002).

El factor de recuperación es habitualmente aplicable a ciertos métodos analíticos, como los cromatográficos, donde hay operaciones previas que implican una separación o extracción del analito en una nueva fase. Este proceso puede ser completo o no. Esta etapa cuando es evaluada de forma independiente en este tipo de métodos se cuantifica mediante el factor recuperación, pero en ningún caso es un parámetro equivalente a la veracidad (AEFI, 2001; Srinivas *et al.*, 2008).

Es deseable que el método tenga una recuperación alta, próxima al 100%, pero recuperaciones inferiores al 50% pueden aceptarse siempre que sean reproducibles (AEFI, 2001).

La corrección del sesgo de un resultado analítico ha sido siempre un tema polémico pues determinados analistas consideran la corrección de los resultados como una extensión natural de los métodos de análisis, mientras que otros han rechazado esta práctica como algo similar a ajustar los resultados de una manera ilegítima. La clave para la resolución de este dilema radica en la distinción entre métodos "racionales" y "empíricos" (Thompson, 2008).

En un "método racional" el analito es una entidad química discreta bien definida y su concentración en el material de ensayo es la concentración total real. Para expresar el resultado del análisis de forma racional el sesgo debería ser corregido. En cambio, en un "método empírico" la definición del analito depende del procedimiento analítico aplicado, por lo que diferentes métodos (por ejemplo, empleo de distintos extractantes para un mismo analito en un material dado) pueden dar lugar a resultados diferentes al extraer diferente cantidad de analito. Por lo tanto, no se puede evaluar el sesgo pues se desconoce el valor verdadero (Hibbert, 2007). El sesgo de un resultado analítico debería ser corregido a menos que el método sea empírico, el método esté definido por la legislación o la recuperación sea del 100% (Comisión Europea, 1998a; Comisión Europea, 1999). No obstante diferentes autores han argumentado razones a favor y en contra de la corrección del sesgo de las medidas (Thompson *et al.*, 1999).

El planteamiento a seguir para determinar si se corrige o no el sesgo pasa en primer lugar por comprobar si es estadísticamente significativo, (Eurachem/Citac, 2012; Linsinger, 2008).

Para comprobar si la diferencia entre el valor verdadero y el valor obtenido es estadísticamente significativa o se debe exclusivamente a la presencia de error aleatorio se aplican pruebas de significación estadística, siendo los test de *t de Student* las pruebas más empleadas. En la Tabla 2.3 se resumen las pruebas de significación más adecuadas atendiendo al valor de referencia empleado (Barwick *et al.*, 1998; Hartman *et al.*, 1995; Kuttatharmmakul *et al.*, 1999; Massart *et al.*, 1997; Meeravali *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Tullols *et al.*, 2005; Vidigal *et al.*, 2012).

Tabla 2.3 Resumen de las pruebas de significación para la validación de la veracidad

Valor de referencia	Hipótesis	Estadístico	Criterio aceptación $H_0$
Evaluación en % Er	$H_0: \bar{X} = \mu \quad H_1: \bar{X} \neq \mu$	$t_{cal} = \frac{ \bar{X} - \mu }{S/\sqrt{n}} \cdot 100$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n-1))$
Evaluación en % R	$H_0: \% \bar{R} = 100 \quad H_1: \% \bar{R} \neq 100$	$t_{cal} = \frac{ \% \bar{R} - 100 }{S_{\% R}/\sqrt{n}}$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n-1))$
	$H_0: \bar{X} = \bar{X}_{ref} \quad H_1: \bar{X} \neq \bar{X}_{ref}$ $S^2 \text{ y } S_{ref}^2 \text{ comparables}$ (Prueba F)	$t_{cal} = \frac{ \bar{X} - \bar{X}_{ref} }{\sqrt{S^2 \cdot \left( \frac{1}{n_{ref}} + \frac{1}{n} \right)}}$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n_{ref}+n-2))$
Evaluación para única muestra	$H_0: \bar{X} = \bar{X}_{ref} \quad H_1: \bar{X} \neq \bar{X}_{ref}$ $S^2 \text{ y } S_{ref}^2 \text{ no comparables}$ (Prueba F)	$t_{cal} = \frac{ \bar{X} - \bar{X}_{ref} }{\sqrt{\left( \frac{S_{ref}^2}{n_{ref}} + \frac{S^2}{n} \right)}}$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, n_{ref})$
Comparación de métodos	Por parejas similar concentración $H_0: \bar{d}_i = 0 \quad H_1: \bar{d}_i \neq 0$ Recta de regresión (amplio rango de concentración) $H_0: a = 0, b = 1 \quad H_1: a \neq 0, b \neq 1$	$d = x - X_{ref} \quad t_{cal} = \frac{ \bar{d}_i }{S_d/\sqrt{n}}$ $t_{cal} = \frac{ a - 0 }{S_a} \quad t_{cal} = \frac{ b - 1 }{S_b}$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n-1))$ $t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n-2))$
Evaluación para diferentes muestras	Una única muestra	<i>Igual que: Material de referencia</i>	
Análisis de muestras dopadas	Concentración observada frente a añadida $K \neq 0$ Comparación: Rectas de calibrado patrón externo y adiciones patrón	$t_{cal} = \frac{ a - K }{S_a} \quad t_{cal} = \frac{ b - 1 }{S_b}$ $t_{cal} = \frac{ b_1 - b_2 }{\sqrt{(S_{b1}^2 + S_{b2}^2)}}$	$t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n-1))$ $t_{cal} < t_{crítico}(0.05, (n_1+n_2-4))$

Otros criterios para comprobar si el sesgo es significativo son (*Eurachem/Citac, 2012; Zamengo et al., 2011*): (i) el sesgo es menor que su incertidumbre,  $\delta < t_{(0.05, n-1)} \cdot u(\delta)$  o  $/1-R / < t_{(0.05, n-1)} \cdot u(R)$ , (ii) no hay diferencias significativas entre el sesgo y la incertidumbre combinada obtenida sin tener en cuenta el sesgo y, (iii) aun siendo significativo, el sesgo puede despreciarse si es más pequeño que 1/3 que la mayor componente de la incertidumbre (*Maroto et al., 2002c; Maroto et al., 2003*).

Si el sesgo no es significativo puede ser despreciado, pero su incertidumbre suele incluirse como una componente más de la incertidumbre total. Si el sesgo es significativo se presentan dos opciones: (i) corregir el sesgo, lo que supone reducir la incertidumbre, (ii) notificar el sesgo observado y añadirlo a la incertidumbre, para lo cual se han descrito distintos modelos matemáticos (*Magnusson et al., 2008; Philipps et al, 1997; Synek, 2005*). Esta segunda opción es más empleada en la práctica; no obstante, guías como la ISO o Eurachem recomiendan la corrección del sesgo como un requisito de aplicación general cuando se reconocen errores sistemáticos significativos (*Eurachem/Citac, 2012; JCGM 100, 2008*).

En caso de aplicar la corrección del sesgo a los resultados obtenidos por un método analítico, la metodología para su aplicación debe estar especificada en el PNT (*Thompson, 2008*).

Durante el proceso de validación de un método de análisis, la veracidad debe evaluarse en todo el rango especificado para ese método analítico. Para ello se estima el sesgo o bias, al menos por triplicado, para 3-5 niveles de concentración, eligiendo las dos concentraciones en los extremos del rango (límite de cuantificación y límite superior del rango de medida) y varias concentraciones intermedias. Además, así se comprueba si la veracidad depende del nivel de concentración, esto es, la presencia de errores sistemáticos proporcionales (*UNE 82009-1, 1998*).

### Precisión

Se define como grado de concordancia existente entre los resultados independientes de un ensayo, obtenidos en condiciones estipuladas. La precisión depende únicamente de la distribución de los errores aleatorios y no está relacionada con el valor verdadero o especificado (*UNE-ISO 3534-2, 2008*).

En general podemos decir de las fuentes de variación se pueden dividir en tres grupos: instrumentales y técnicos, humanos y ambientales. (*Eurolab 1/2002, 2002*). Entre las condiciones o factores operativos que pueden contribuir a la variabilidad de los resultados de un método de análisis, pero no pueden ser siempre controlados, pueden incluirse: (i) analista, pueden realizar la experimentación analistas de diferente experiencia o habilidad, o pueden ser, un equipo de analistas, (ii) tiempo, por mediciones hechas en el mismo tiempo se entiende aquellas realizadas en un intervalo de tiempo tan corto como sea posible, para minimizar los cambios en las condiciones ambientales, instrumentales, etc, (iii) calibración, como parte de las variaciones de condiciones instrumentales, (iv) instrumentación, hay que tener en cuenta si se usa el

mismo equipo de medida, o el laboratorio dispone de varios equipos para realizar un mismo ensayo, (v) concentración del analito, este es uno de los factores que más pueden influir en la precisión del método de análisis, (vi) variaciones en la matriz analítica de las muestras, y (vii) otros factores como humedad y temperatura diferentes, disolventes y reactivos de diferente calidad o lote, heterogeneidad del material... (*UNE 82009-1, 1998; UNE 82009-3, 1999*).

De la variación de todos estos factores durante la evaluación de la precisión nacen dos conceptos que matizan la precisión: repetibilidad y reproducibilidad.

- ▲ Llamamos repetibilidad a la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición sobre una misma muestra se obtienen con el mismo método, con el mismo analista, utilizando el mismo instrumento de medida y mismos reactivos, y durante un corto intervalo de tiempo. Se puede cuantificar la repetibilidad debida únicamente al instrumento midiendo repetidamente la señal analítica proporcionada por una misma muestra (*UNE-ISO 3534-2, 2008*).
- ▲ Llamamos reproducibilidad a la precisión bajo condiciones en las que los resultados de una medición se obtienen con el mismo método, sobre el mismo mensurado, con diferentes analistas, diferentes equipos de medida y/o reactivos, en diferentes laboratorios o en un largo lapso de tiempo. Para un laboratorio de análisis dado, la precisión que se estima es la precisión intermedia o reproducibilidad intermedia, efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra pero variando alguna de las condiciones operativas (diferentes analistas, aparatos, días, etc.) (*UNE-ISO 3534-2, 2008*). Las fórmulas para la evaluación de la precisión que desarrollaremos en adelante se refieren a esta situación.

La precisión debe evaluarse en todo el rango de ensayo definido en el método de análisis (*Eurachem/Citac, 1998*). Se recomienda un mínimo de 2-3 determinaciones sobre muestras diferentes que contengan el analito a 3-5 niveles de concentración, incluyendo las dos concentraciones en los extremos del rango (límite de cuantificación y límite superior del rango de medida) y varias concentraciones intermedias. Estas muestras deben ser representativas del alcance del método analítico (*UNE 82009-1, 1998*). En caso de no disponer de muestras reales es posible emplear muestras dopadas (*Karami et al., 2003; Pérez et al., 2002; Santosa et al., 2008; Wang et al., 1994*). También se pueden emplear muestras compuestas preparadas mezclando muestras con matrices diferentes, de forma que se obtenga una muestra sintética representativa de todas las incluidas en el alcance del método (*Li et al., 2010; Köhler et al., 2006*). El empleo de muestras compuestas permite minimizar el número de ensayos para la evaluación de la precisión, pero se corre el riesgo de encubrir o diluir los efectos de la matriz.

La precisión se estima mediante alguno de los siguientes parámetros estadísticos (*Eurachem/Citac, 1998; Massart et al., 1997; Valcárcel et al., 1992*).

Desviación estándar o típica muestral,  $s$ : es el parámetro más característico para estimar la precisión. Informa sobre la dispersión de los resultados alrededor del valor medio de forma que una menor precisión se refleja en una mayor desviación estándar:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad ec. 2.29$$

La desviación estándar muestral es un estimador de la verdadera desviación estándar de la población,  $\sigma$ , a la que pertenecen los valores obtenidos. Cuando el número de medidas es suficientemente grande ( $n > 30$ ) la desviación estándar muestral,  $s$ , se considera un estimador fiable de  $\sigma$ , calculándose esta como:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad ec. 2.30$$

Varianza, coincide con el cuadrado de la desviación estándar,  $s^2$  ( $n < 30$ ) o  $\sigma^2$  ( $n \geq 30$ ).

La información proporcionada por la desviación estándar puede ser equivoca si no se tiene en cuenta la magnitud de lo que se mide. La desviación estándar relativa, *DER*, ofrece una información más clara de la dispersión de los resultados en relación con la magnitud medida, ec. 2.31. En la ec. 2.32 la podemos ver expresada como porcentaje. Algunos autores denominan a este último coeficiente de variación, *C.V.* pero este término está en desuso.

$$DER = \frac{s}{\bar{x}} \quad ec. 2.31$$

$$\%DER = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad ec. 2.32$$

Cuando el número de observaciones es muy pequeño la desviación estándar no es un estimador fiable de la precisión; en estos casos, se emplea el rango o recorrido,  $R$ , para estimar la dispersión. El recorrido es la diferencia (absoluta o porcentual) entre el resultado más elevado y el más pequeño.

En el caso de hacer estudios de precisión a varios niveles de concentración o distintos tipos de materiales, si se desea dar un único valor de precisión para todo el rango estudiado, puede ser conveniente calcular la desviación estándar combinada o ponderada, ec. 2.33, siempre y cuando las varianzas individuales sean comparables (*Barwick et al., 1998*).

$$s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2 + \dots}{(n_1 - 1) + (n_2 - 1) + \dots}} \quad ec. 2.33$$

Para estimar la varianza total de un procedimiento analítico y las varianzas asociadas a cada factor de variación (analista, día, instrumento...) la herramienta más útil es el diseño de experimentos. Primero se identifican aquellos factores que pueden influir en el resultado, después se realizan los experimentos, y por último se realiza un análisis de varianza, ANOVA, de los resultados obtenidos para separar las contribuciones a la varianza total de los diferentes factores implicados. La ventaja de estos diseños es que proporcionan una buena estimación de la precisión intermedia ya que los factores se varían de forma ordenada. Además se puede saber cuáles son los factores que más afectan a la variabilidad de los resultados ya que proporcionan la precisión intermedia asociada a cada uno de los factores variados en el diseño. El diseño de experimentos tiene la ventaja adicional de permitir obtener la máxima información a partir de la realización de un mínimo número de ensayos (*Gutierrez et al., 2013; UNE 82009-3, 1999*).

Para obtener la precisión intermedia debida a cada factor la mejor opción son los diseños de experimentos anidados o jerárquicos. La norma UNE 82009-3:99 desarrolla los principios generales que son necesarios observar a la hora de diseñar experimentos anidados de varios factores y describe detalladamente el método de estimación de la varianza de los distintos factores. Para métodos analíticos especifica medidas intermedias de la precisión debidas a cambios en las condiciones de observación como tiempo, calibración, operador, equipo... Estas medidas intermedias pueden ser establecidas por un experimento dentro de un laboratorio concreto, o en un experimento interlaboratorio.

A continuación se incluyen los esquemas y las expresiones matemáticas del análisis de varianza para la realización de experimentos totalmente anidados de dos, tres y cuatro factores (*ISO/TS 21749, 2005; Kuttatharmmakul et al., 1999; Vander Heyden et al., 1999*).

- ▲ Diseño de experimentos anidado para dos factores, el factor 1 a p niveles y el factor 2 a n niveles:

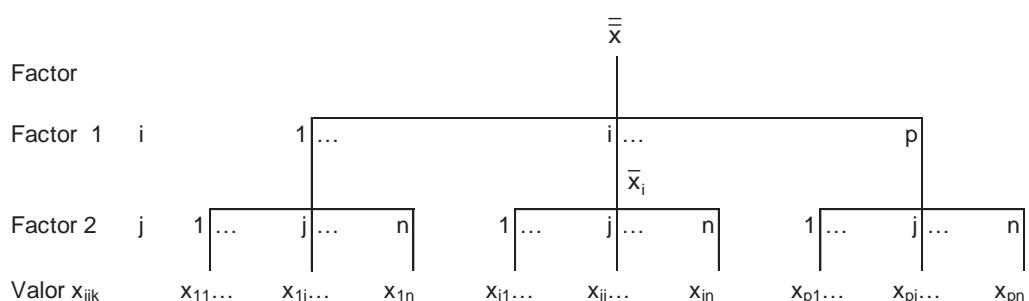


Fig. 2.9: Esquema del diseño experimental completamente anidado de dos factores para un nivel de concentración N

Tabla 2.4: ANOVA para un diseño completamente anidado de dos factores

Fuente	Media cuadrática	gdl	Estimador de	Varianza
Factor 1	$MS_1 = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^p (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{p-1}$	p-1	$n \cdot \sigma_1^2 + \sigma_2^2$	$\frac{MS_1 - MS_2}{n}$
Factor 2	$MS_2 = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p \cdot (n-1)}$	p·(n-1)	$\sigma_2^2$	$MS_2$

▲ Diseño de experimentos anidado para tres factores, donde los niveles de cada factor son q p y n niveles respectivamente

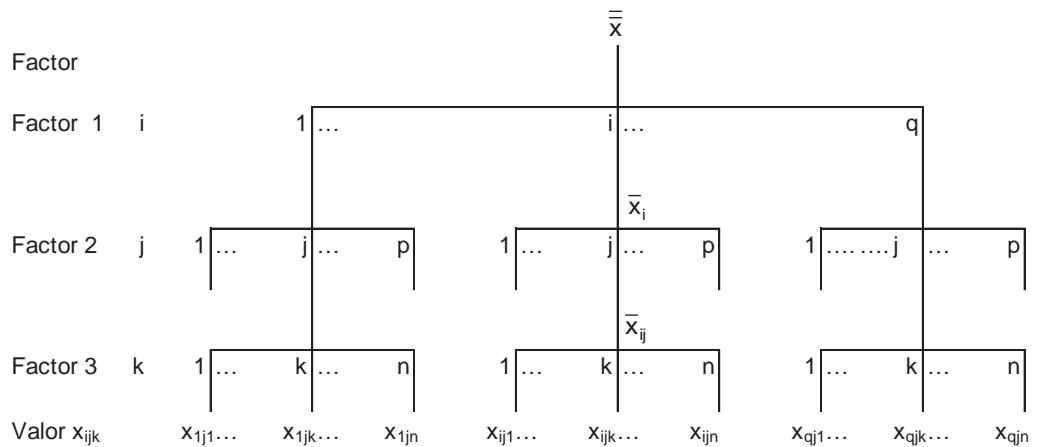


Fig. 2.10: Esquema del diseño experimental completamente anidado de tres factores para un nivel de concentración N

Tabla 2.5: ANOVA para un diseño completamente anidado de tres factores

Fuente	Media cuadrática	gdl	Estimador de	Varianza
Factor 1	$MS_1 = \frac{p \cdot n \cdot \sum_{i=1}^q (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{q-1}$	q-1	$p \cdot n \cdot \sigma_1^2 + n \cdot \sigma_2^2 + \sigma_3^2$	$\frac{MS_1 - MS_2}{p \cdot n}$
Factor 2	$MS_2 = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^q \sum_{j=1}^p (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2}{q \cdot (p-1)}$	q·(p-1)	$n \cdot \sigma_2^2 + \sigma_3^2$	$\frac{MS_2 - MS_3}{n}$
Factor 3	$MS_3 = \frac{\sum_{i=1}^q \sum_{j=1}^p \sum_{k=1}^n (x_{ijk} - \bar{x}_{ij})^2}{q \cdot p \cdot (n-1)}$	q·p·(n-1)	$\sigma_3^2$	$MS_3$

- ▲ Diseño de experimentos anidado para cuatro factores: donde m, q p y n representan los niveles de cada factor.

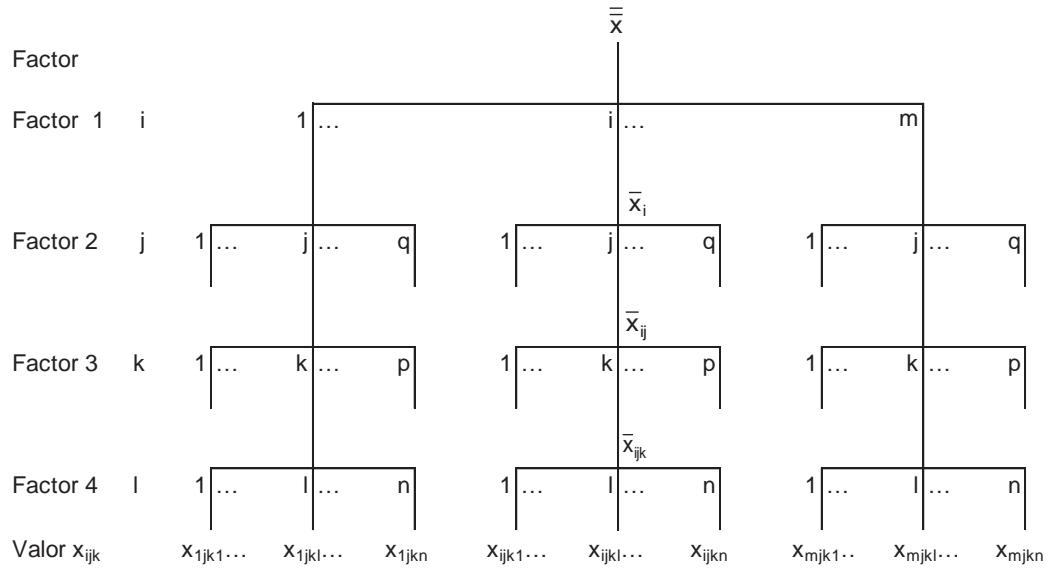


Fig. 2.11: Esquema del diseño experimental completamente anidado de cuatro factores para cada nivel de concentración N

Tabla 2.6: ANOVA para un diseño completamente anidado de 4 factores

Fuente	Media cuadrática	gdl	Estimador de	Varianza
Factor 1	$MS_1 = \frac{q \cdot p \cdot n \cdot \sum_{i=1}^m (\bar{x}_i - \bar{\bar{x}})^2}{m-1}$	m-1	$q \cdot p \cdot n \cdot \sigma_1^2 + p \cdot n \cdot \sigma_2^2 + n \cdot \sigma_3^2 + \sigma_4^2$	$\frac{MS_1 - MS_2}{q \cdot p \cdot n}$
Factor 2	$MS_2 = \frac{p \cdot n \cdot \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q (\bar{x}_{ij} - \bar{\bar{x}})^2}{m \cdot (q-1)}$	m·(q-1)	$p \cdot n \cdot \sigma_2^2 + n \cdot \sigma_3^2 + \sigma_4^2$	$\frac{MS_2 - MS_3}{p \cdot n}$
Factor 3	$MS_3 = \frac{n \cdot \sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^p (\bar{x}_{ijk} - \bar{\bar{x}}_{ij})^2}{m \cdot q \cdot (p-1)}$	m·q·(p-1)	$n \cdot \sigma_3^2 + \sigma_4^2$	$\frac{MS_3 - MS_4}{n}$
Factor 4	$MS_4 = \frac{\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^q \sum_{k=1}^p \sum_{n=1}^n (\bar{x}_{ijkl} - \bar{\bar{x}}_{ijk})^2}{m \cdot q \cdot p \cdot (n-1)}$	m·q·p·(n-1)	$\sigma_4^2$	$MS_4$

Si solo se desea estimar la repetibilidad y reproducibilidad se puede utilizar el diseño de experimentos de dos factores con n valores por celda indicado en la norma UNE 82009-2:99 para ejercicios interlaboratorio. La Tabla 2.7 recoge las expresiones matemáticas y cálculos intermedios para la estimación de la precisión, en términos de

varianza (*ASTM E691, 2009, SEQC, 2009; UNE 82009-2, 1999; Vander Heyden et al., 2007*).

Tabla 2.7: Cálculos para la estimación de la precisión según la UNE 82009-2 para un ensayo interlaboratorio

Fuente	Media cuadrática	gdl	Estimaciones insesgadas	Varianza
Factor 1 Reproducibilidad interlaboratorio	$MS_L = \frac{\sum_{i=1}^p n_i \cdot (\bar{x}_i - \bar{x})^2}{p-1}$	p-1	$\bar{n} \cdot \sigma_L^2 + \sigma_r^2$ $\bar{n} = \frac{1}{p-1} \left[ \sum_{i=1}^p n_i - \frac{\sum_{i=1}^p n_i^2}{\sum_{i=1}^p n_i} \right]$	$\frac{MS_L - MS_r}{\bar{n}}$
Factor 2 Repetibilidad	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} (x_{ij} - \bar{x}_i)^2}{N-p}$	N-p	$\sigma_r^2$ $N = \sum_{i=1}^p n_i$	$MS_r$ $s_r^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) \cdot s_i^2}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)}$

Esta norma, adaptada a un ejercicio intralaboratorio, permite estimar la repetibilidad,  $s_r$ , y la reproducibilidad intermedia,  $s_R$ , esta última como combinación de la reproducibilidad intralaboratorio,  $s_L$ , y la repetibilidad.

La ubicación de los factores en un diseño experimental completamente anidado o jerárquico se realiza de forma que aquellos más afectados por efectos sistemáticos deberían situarse en los niveles jerárquicamente más altos, colocando los restantes factores a ensayar tanto más abajo cuanto menor sea su previsible contribución a la variabilidad de la respuesta. El factor ubicado en el nivel jerárquico inferior se considera variación residual (*UNE 82009-3, 1999*). Por tanto, se espera que los valores de las medias cuadráticas aumenten desde el nivel inferior hasta el nivel superior del diseño, de modo que al restar a cada nivel el inmediatamente inferior, la varianza estimada debida a cada factor ensayado será positiva. Sin embargo, estas premisas no siempre se cumplen ya que en muchos casos no se conoce de antemano la magnitud de la contribución de cada factor del diseño experimental a la varianza total. Puede suceder que el efecto de factores no controlables (factores de ruido) sea mayor que el efecto de los factores ensayados en el diseño, lo que provoca una gran variabilidad en los resultados de las medidas replicadas para los mismos niveles de los factores controlados. Esto da lugar, en ocasiones, a estimaciones negativas de la varianza para algunos factores situados en los niveles más altos del diseño (*Vander Heyden et al., 1999*). Igualmente, el ANOVA aplicado a los ejercicios interlaboratorio puede generar valores de varianza entre los laboratorios menores que la varianza de repetibilidad,  $s_L^2 < s_r^2$  (*Dehouck et al, 2003a; Vander Heyden et al., 2007*).

Una de las causas que dan lugar a varianzas negativas es, como hemos dicho, una incorrecta situación de los factores en el diseño anidado, pero también pueden darse por la presencia de *outliers*, por un número de respuestas insuficiente para una adecuada estimación de la varianza, o que la variabilidad de las medidas sea muy grande por haber omitido factores influyentes que actúan como ruido.

Dado que valores negativos de la varianza carecen de sentido físico, para tratar estimaciones negativas de este estadístico existen varias opciones:

- ▲ Detectar la presencia de *outliers* durante el desarrollo del diseño de experimentos eliminándolos o repitiendo los análisis si fuera posible.
- ▲ Aceptar la estimación negativa reconociendo que, para cálculos subsecuentes, los resultados pueden no tener sentido.
- ▲ Suponer que el valor verdadero de la varianza del factor es cero, es decir, un cambio en el nivel del factor produce una variación insignificante en los resultados; la varianza estimada para ese factor no estará, por tanto, incluida en la varianza total de reproducibilidad (Boti et al., 2007; Kuttatharmmakul et al., 1999; Nguyen Minh Nguyet et al, 2004; Maroto et al, 2001a; Prado et al., 2009).
- ▲ Aplicar un modelo estadístico distinto, por ejemplo, combinando las varianzas obtenidas o aplicando el modelo de máxima verosimilitud restringida (REML) (Ellison et al., 2012; Vander Heyden et al., 1999).
- ▲ Una opción más drástica supondría repetir de nuevo el diseño de experimentos, recolocando los factores o aumentando el número de niveles de los factores y/o réplicas para tener más datos y estimar mejor las varianzas.

Cuando no se dispone de datos suficientes para una evaluación fiable de la precisión se puede hacer una estimación a partir de la ecuación de Horwitz (Horwitz, 1982). Esta ecuación modela una reproducibilidad teórica, llamada de Horwitz,  $s_H$ , en función de la concentración, ec. 2.34 y ec. 2.35, relacionando la variabilidad de los resultados obtenidos en pruebas interlaboratorios en función de la concentración del analito en muestras. El modelo es independientemente del analito, de la matriz, del método, y del tiempo de análisis (Albert, 1997). La curva es de gran ayuda en la interpretación de resultados permitiendo comparar la precisión estimada por el laboratorio y la predicha por la ecuación de Horwitz o para fijar los objetivos de calidad.

$$\%DER_H = 2^{(1-0.5\log C)} \quad \text{ec. 2.34}$$

$$s_H = 0.02 \cdot C^{0.8495} \quad \text{ec. 2.35}$$

La concentración,  $C$ , se expresa como fracción decimal (p.e. para  $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} = 10^{-6} \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Para un laboratorio concreto, suelen ser aceptables valores de reproducibilidad, como deviación estándar relativa,  $s_R$ , de 0.5 a 2 veces el valor predicho por la ecuación,  $s_H$ . Se ha encontrado, además, que la variabilidad de laboratorio,  $s_r$ , se espera que sea de 1/2

a 2/3 de la variabilidad entre laboratorios,  $s_R$  (*AOAC, 2002a; Boyer et al., 1985; Horwitz, 1982; Hund et al., 2003*).

Pero el modelo de Horwitz presenta desviaciones a bajas y altas concentraciones ya que no se ajustan los resultados experimentales con los predichos por el modelo. El modelo contemporáneo de Thompson trata de corregirlas dividiendo las concentraciones en tres zonas: (*Thompson, 2000; Thompson, 2004; Thompson, 2007*).

$$\begin{aligned} s_{H-T} &= 0.22 \cdot C & C < 1.2 \cdot 10^{-7} \\ s_{H-T} &= 0.02 \cdot C^{0.8495} & 1.2 \cdot 10^{-7} \leq C \leq 0.138 & ec. 2.36 \\ s_{H-T} &= 0.01 \cdot C^{0.5} & C > 0.138 \end{aligned}$$

Puede ser habitual examinar la diferencia observada entre dos o más resultados de ensayo determinados bajo condiciones de repetibilidad o reproducibilidad. Para ello es necesario contar con alguna medida parecida a una diferencia crítica, más que una desviación típica. Estos valores críticos son el límite de repetibilidad,  $r$ , y el límite de reproducibilidad,  $R$ . El límite de repetibilidad se calcula a partir de la desviación estándar de repetibilidad,  $\sigma_r$  o  $s_r$ , y el límite de reproducibilidad se calcula a partir de la desviación estándar de reproducibilidad  $\sigma_R$  o  $s_R$ :

$$r = t_\infty \cdot \sqrt{2} \cdot s_r = 2.8 \cdot s_r \quad ec. 2.37$$

$$R = t_\infty \cdot \sqrt{2} \cdot s_R = 2.8 \cdot s_R \quad ec. 2.38$$

donde  $t_\infty$  es el valor de la  $t$  de *Student* de una tabla de dos colas para  $v = \infty$  grados de libertad con un nivel de confianza del 95% cuyo valor es 1.96 (*UNE 82009-6, 1999*).

Todo el proceso de estimación de la precisión, niveles de concentración, tipo de muestras ensayadas, niveles de los factores operativos que son fuente de variación y desarrollo de experimentos para la estimación de la precisión deben quedar recogidos en el informe final de validación del método de ensayo, así como las incidencias que puedan afectar al resultado final (*UNE 82009-1, 1998*).

### **Detección de valores anómalos**

A partir de los datos recogidos debe tomarse una decisión acerca de determinados resultados individuales o de valores que parezcan ser inconsistentes y que pueden hacer variar las estimaciones de la veracidad y de la precisión. Los test de detección de valores anómalos más utilizados son: los test de consistencia gráficos  $h$  y  $k$  de Mandel y los test numéricos  $Q$  de Dixon,  $C$  de Cochran y  $G$  de Grubbs.

La prueba numérica  $Q$  de Dixon es la más habitual debido a la sencillez de los cálculos. Se basa en la comparación de la diferencia entre el valor sospechoso y el valor más

próximo con todo el intervalo. En la Tabla 2.8 se recogen las ecuaciones empleadas para el cálculo del estadístico,  $Q$ , dependiendo del tamaño muestral. El valor  $Q$  calculado se compara con un valor crítico,  $Q_{crítico}$  indicado en una tabla de dos colas para un nivel de significación  $\alpha$  y un tamaño muestral  $n$  (Massart et al., 1997; Miller et al., 2002).

Tabla 2.8: Test de consistencia numérico  $Q$  de Dixon

Tamaño muestral, $n$	Valor sospechoso	Estadístico	Criterio de aceptación
$3 \leq n \leq 7$	$x_1$	$Q_{10} = \frac{(x_2 - x_1)}{(x_n - x_1)}$	$Q < Q_{crítico}(\alpha, n)$ el valor sospechoso se toma como correcto $Q > Q_{crítico}(\alpha, n)$ el valor sospechoso se toma como anómalo
	$x_n$	$Q_{10} = \frac{(x_n - x_{n-1})}{(x_n - x_1)}$	
$8 \leq n \leq 12$	$x_1$	$Q_{11} = \frac{(x_2 - x_1)}{(x_{n-1} - x_1)}$	$Q < Q_{crítico}(\alpha, n)$ el valor sospechoso se toma como correcto $Q > Q_{crítico}(\alpha, n)$ el valor sospechoso se toma como anómalo
	$x_n$	$Q_{11} = \frac{(x_n - x_{n-1})}{(x_n - x_2)}$	
$n \geq 13$	$x_1$	$Q_{22} = \frac{(x_3 - x_1)}{(x_{n-2} - x_1)}$	
	$x_n$	$Q_{22} = \frac{(x_n - x_{n-2})}{(x_n - x_3)}$	

Las normas UNE (UNE 82009-2, 1999) y ASTM (ASTM E691, 2009) recomiendan aplicar test de consistencia gráficos  $h$  y  $k$  y test numéricos  $C$  y  $G$  para la detección de resultados anómalos obtenidos durante la realización de los diseños de experimentos (Dehouck et al., 2003b):

Aunque aplicados habitualmente a los resultados de los ensayos interlaboratorio, estos estadísticos se pueden adaptar a medidas intralaboratorio cambiando el factor laboratorio por el factor que se desea variar (analista, instrumento, tiempo...).

La Tabla 2.9 recoge las expresiones para el cálculo de los estadísticos  $h$  y  $k$  de Mandel. El estadístico  $h$  (entre-laboratorios) compara el valor medio para cada nivel de concentración con el valor asignado. A mayor valor absoluto,  $|h|$ , menor consistencia entre los resultados medios de un laboratorio particular respecto al resto de laboratorios. El estadístico  $k$  (intra-laboratorio) compara, en cambio, la desviación típica de las réplicas con la desviación típica combinada o de repetibilidad. Si  $k = 1$  la variabilidad de ese laboratorio es igual a la del resto, si  $k > 1$  su variabilidad es mayor y por último si  $k < 1$  su variabilidad es menor. Valores altos de  $k$  representan variabilidad intra-laboratorio mientras que valores pequeños pueden indicar escasa sensibilidad en las escalas de medición u otros problemas asociados a las mediciones (SEQC, 2009).

Tabla 2.9: Test de consistencia gráficos  $h$  y  $k$  de Mandel

	Estadístico	Criterio de aceptación
$h$ , Entre-laboratorios	$h = \frac{\bar{x}_{ij} - \bar{x}_j}{\sqrt{\frac{1}{(p_j - 1)} \cdot \sum_{i=1}^{p_j} (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_j)^2}}$	Si $h \leq h_{crítico}(0.05, p)$ el valor sospechoso se toma como correcto. Si $h_{crítico}(0.05, p) \leq h \leq h_{crítico}(0.01, p)$ el valor sospechoso se toma como extraño Si $h > h_{crítico}(0.01, p)$ el valor sospechoso es anómalo  $\bar{x}_{ij}$ es el promedio de los valores de cada laboratorio , $\bar{x}_j$ es la media general para un nivel de concentración $j$ $p$ el número de laboratorios participantes
$k$ , Intra-laboratorios	$k = \frac{s_{ij} \cdot \sqrt{p_j}}{\sqrt{\sum s_{ij}^2}}$	Si $k \leq k_{crítico}(0.05, p, n)$ el valor sospechoso se toma como correcto. Si $k_{crítico}(0.05, p, n) \leq k \leq k_{crítico}(0.01, p, n)$ el valor sospechoso se toma como extraño Si $k > k_{crítico}(0.01, p, n)$ el valor sospechoso se denomina anómalo  $s_{ij}$ es la desviación típica de los resultados de cada laboratorio particular $p$ el número de laboratorios participantes,

La Tabla 2.10 muestra los test numéricos de detección de resultados anómalos de Cochran y Grubbs.

 Tabla 2.10: Test de consistencia numéricos  $C$  de Cochran y  $G$  Grubbs

	Estadístico	Criterio de aceptación
Cochran	$C = \frac{s_{max}^2}{\sum_{i=1}^p s_i^2}$	Si $C \leq C_{crítico}(0.05, p, n)$ el valor sospechoso se toma como correcto. Si $C_{crítico}(0.05, p, n) \leq C \leq C_{crítico}(0.01, p, n)$ el valor sospechoso se toma como extraño Si $C > C_{crítico}(0.01, p, n)$ el valor sospechoso se denomina anómalo  Es un test de valores anómalos de una cola pues solo examina el valor más alto $s_{max}$ es la desviación típica de mayor valor del conjunto $p$ = nº de laboratorios participantes $n$ = nº de réplicas realizadas
Grubbs	$G_p = \frac{x_p - \frac{1}{p} \cdot \sum_{i=1}^p x_i}{\sqrt{\frac{1}{p-1} \cdot \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}}$ $G_1 = \frac{\frac{1}{p} \cdot \sum_{i=1}^p x_i - x_1}{\sqrt{\frac{1}{p-1} \cdot \sum_{i=1}^p (x_i - \bar{x})^2}}$	Si $G \leq G_{crítico}(0.05, p)$ el valor sospechoso se toma como correcto. Si $G_{crítico}(0.05, p) > G > G_{crítico}(0.01, p)$ el valor sospechoso se toma como valor extraño. Si $G > G_{crítico}(0.01, p)$ el valor sospechoso se considera valor anómalo.  En este test los valores deben ser ordenados de forma ascendente $x_i = (i=1,2,3,\dots,p)$ $p$ el número de laboratorios participantes

En principio se asume que solo existen pequeñas diferencias entre las varianzas inter-laboratorio; la experiencia, no obstante, indica que no siempre es este el caso y que debe incluirse el estadístico de Cochran para verificar la validez de esta hipótesis. Este se refiere a la variabilidad intra-laboratorio y debería ser aplicado en primer lugar. El estadístico de Grubbs es básicamente un ensayo de la variabilidad inter-laboratorios que detecta si las observaciones más alejadas son incompatibles con el resto. Puede ser utilizado solo si  $p > 2$  y allí donde el ensayo de Cochran haya detectado valores anómalos que afectan a las varianzas (*UNE 82009-2, 1999*).

Estos test se aplican secuencialmente hasta la eliminación de los *outliers*. En ningún caso se deben eliminar más de 2/9 de los valores y se deben mantener válidos como mínimo 8 valores (*AOAC, 2002a; UNE 82009-1, 1998*).

### Rango de medida

Durante la validación se debe comprobar que el método se aplica adecuadamente para el propósito que se quiere, en un rango de concentración de analito definido o rango de medida, definido como el intervalo comprendido entre el límite de cuantificación y la máxima concentración que se demuestre que se puede determinar (*Esters et al., 2006; FDA, 2000; FDA, 2001; ICH, 2005; Thompson et al., 2002*). En el caso de métodos de ensayo en que no esté permitido diluir, el límite superior del rango de medida coincidirá con el límite superior del intervalo de ensayo. En aquellos ensayos en los que se permite la dilución, se debe indicar la máxima dilución permitida (*Damen et al., 2009; Khan et al., 2005; Patel et al., 2008*).

Se establece inicialmente un límite superior de cuantificación (ULQ o LS) para el rango de medida teórico de acuerdo a las máximas concentraciones posibles a encontrar en las muestras reales o a la bibliografía. Una vez establecido el límite superior para el rango de medida solo queda comprobar que es posible determinarlo con un grado de confianza adecuado, es decir, la exactitud e incertidumbre estimadas a esta concentración deben estar por debajo del valor impuesto como objetivo de calidad y no debe diferir mucho de los estimados a otras concentraciones menores (*Findlay et al., 2000; Hubert et al., 2004; Shewiyo et al., 2012*).

Establecer límites superiores para el rango de medida muy por encima de los que se puedan encontrar comúnmente en las muestras reales complica la validación pues obliga a hacer diluciones, pudiéndose incluso superar los objetivos de calidad en cuanto a la veracidad, precisión o incertidumbre del método de ensayo.

### 2.3.3. INCERTIDUMBRE

Un requisito fundamental del proceso de validación es establecer la incertidumbre de medida del método de ensayo. Esta incertidumbre de medida viene definida en el *Vocabulario Internacional de Metroología, VIM (BIMP, 2008)* como “*la estimación que caracteriza el intervalo de valores en el que se sitúa, generalmente con una alta probabilidad, el valor verdadero de la magnitud de medida*”. La estimación de la

incertidumbre debe contemplarse como un requisito técnico indispensable por varios motivos (*Birch, 2003; Boyer et al., 1985; UNE 82009-5, 1999*): (i) como forma de búsqueda de posibles fuentes de error; (ii) es indispensable para aquellos laboratorios que pretenden acreditarse según la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025 ya que el apartado 5.4. “*Métodos de ensayo y calibración y validación de métodos*” de esta norma indica que “*los laboratorios de ensayo deben disponer y aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de medida*” (*ILAC, 2002*); (iii) porque se toman decisiones de gran relevancia económica en función de los resultados de los análisis.

En general, cualquier procedimiento de medida tiene imperfecciones que llevan a un error en el resultado. En la medida de lo razonable, dichos errores deben reducirse al mínimo controlando las variables que los provocan, o corregirse explícitamente, por ejemplo, aplicando un factor de corrección adecuado (en los errores sistemáticos). Es imposible conocer inequívocamente la desviación del resultado de una única medición frente al valor verdadero (desconocido) por lo que debe estimarse el rango probable de desviación. Por este motivo, la expresión del resultado de una medición solo está completa cuando contiene tanto el valor atribuido al mensurando como la estimación de la incertidumbre de medida asociada a dicho valor (*JCGM 100, 2008*).

La *ISO* elaboró en 1995 un primer documento, “*Guide to the expression of Uncertainty in Measurement*”, conocida como *GUM*, con las directrices a seguir para la estimación de la incertidumbre de medida. La metodología a seguir según esta guía consiste en la identificación y cuantificación de las fuentes que contribuyen a la incertidumbre final, llamadas incertidumbres típicas. Al identificar las fuentes de incertidumbre debe considerarse la secuencia completa de operaciones necesarias para obtener el resultado final del análisis. En análisis químicos estas etapas suelen ser: preparación de muestras, extracción, limpieza, concentración o dilución, calibración del instrumento (incluida la preparación del material de referencia), medida instrumental... Cada etapa del método analítico lleva asociadas a su vez unas fuentes de incertidumbre que deben estar claramente identificadas, determinando o estimando sus respectivas contribuciones a la incertidumbre global (*Eurachem/Citac, 2012; Eurolab, 2002; JCGM 100, 2008; Taylor et al., 1994*).

Las incertidumbres típicas, tanto si son de naturaleza aleatoria como si son errores sistemáticos, se clasifican generalmente en dos categorías, “A” y “B”, dependiendo del método empleado para estimarlas.

Tipo “A”: la incertidumbre típica se estima a partir de la repetición de observaciones y la aplicación de fórmulas estadísticas, como se esquematiza en la figura siguiente, (*JCGM 100, 2008*):

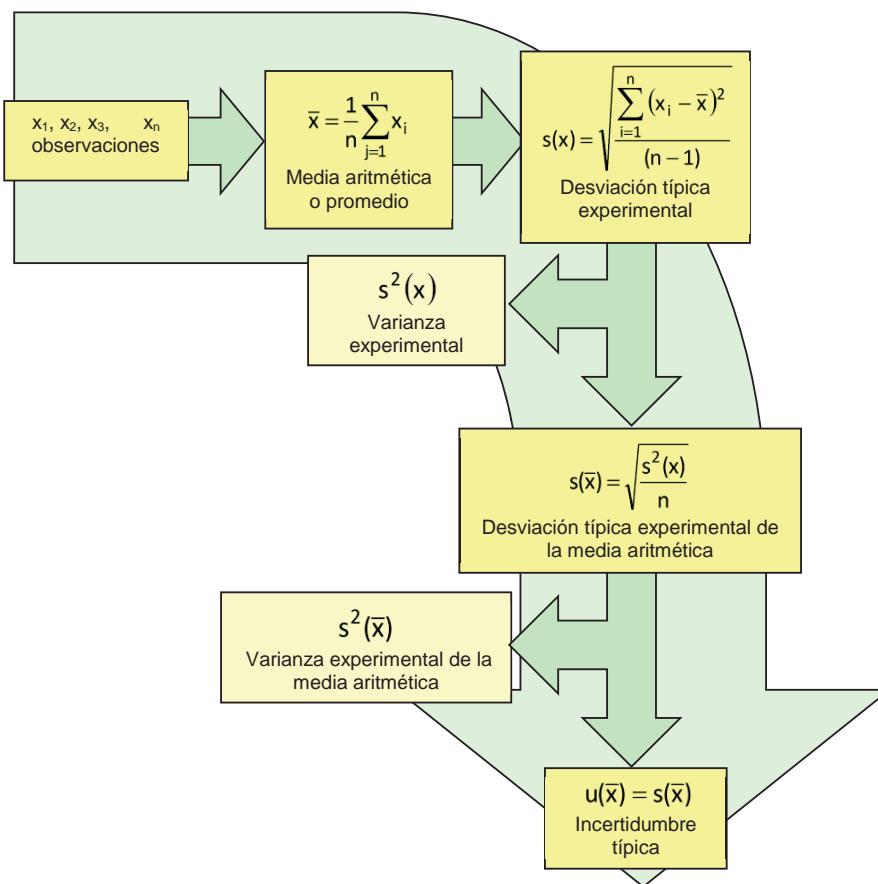


Fig. 2.12 Esquema de cálculo de incertidumbre tipo "A"

Tipo "B": La incertidumbre típica  $u(x)$  se evalúa aplicando un juicio científico basado en toda la información externa disponible sobre la posible variabilidad de la magnitud a estudiar. Dentro de esta categoría pueden incluirse: datos obtenidos de mediciones anteriores, experiencia o conocimientos generales sobre el comportamiento y las propiedades de los materiales e instrumentos, especificaciones de los fabricantes, datos obtenidos de calibraciones y de otros certificados, bibliografía, incertidumbres asignadas a los datos de referencia obtenidos de manuales, catálogos... (*JCGM 100, 2008*).

La incertidumbre típica de tipo "B" puede caracterizarse por diferentes tipos de distribución (*Eurachem/Citac, 2012; JCGM 100, 2008; Meyer, 2007*), siendo las más habituales:

- ▲ Normal, cuando la magnitud medida,  $X_i$ , viene caracterizada por su media,  $\bar{x}$ , y su desviación estándar,  $s$ . Esta distribución es habitual en los certificados de calibración emitidos por el fabricante donde se indica el valor de la incertidumbre del mensurando,  $I$ , junto con factor de cobertura,  $K$ , para un determinado grado de confianza,  $\alpha$  (normalmente para un  $\alpha = 95\%$ ,  $K=2$ ), por tanto su incertidumbre típica  $u(x_i) = s$  sería  $I/2$ .

- ▲ Rectangular, cuando solo conocemos los límites inferior,  $a^-$ , y superior,  $a^+$ , de la magnitud medida, siendo cualquiera de los valores intermedios igualmente probables. Un ejemplo de esta distribución rectangular sería la temperatura de un laboratorio sin aire acondicionado, si por ejemplo en el intervalo de un año los extremos de temperatura registrados son 18-25°C su incertidumbre típica sería de  $3.5/\sqrt{3}$  y cubriría el 58% de los valores.
- ▲ Triangular, si igualmente conocemos los límites inferior,  $a^-$  y superior,  $a^+$ , de la magnitud medida, pero los valores centrales tienen una alta probabilidad. Si seguimos con el mismo ejemplo de temperatura de un laboratorio, pero esta vez con aire acondicionado, y sabemos que la temperatura en un intervalo de un año es  $21 \pm 2.5^\circ\text{C}$  su incertidumbre típica sería de  $2.5/\sqrt{6}$  y cubriría el 65% de los valores.

La Fig. 2.13 representa esquemáticamente las tres distribuciones anteriormente mencionadas.

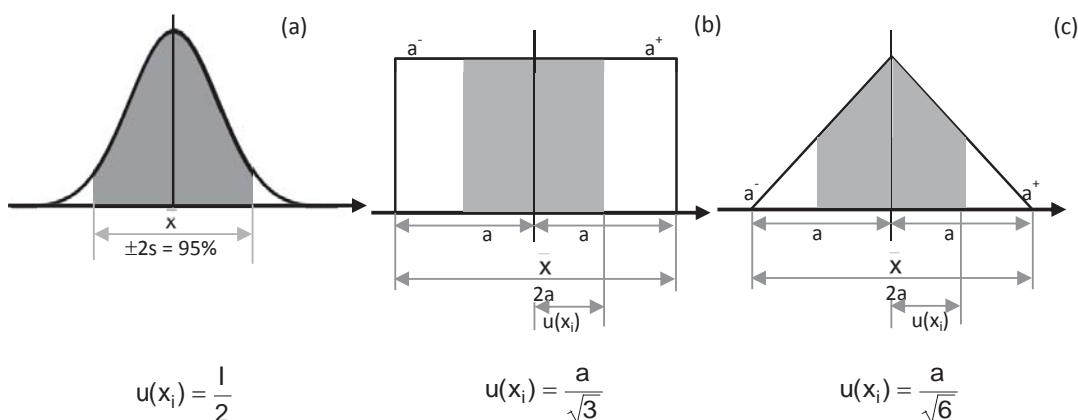


Fig. 2.13: Funciones de distribución de datos (a) normal, (b) rectangular y (c) triangular

La asignación del tipo de función de distribución a una fuente de incertidumbre depende sobre todo de la experiencia del analista. En los casos en los que no se disponga de información sobre la forma de la distribución, es recomendable asignar a la fuente de incertidumbre una distribución rectangular para evitar que sea subestimada.

Una vez identificadas las contribuciones a la incertidumbre de medida estas deben ser analizadas con detalle teniendo en cuenta: (i) si realizan una contribución significativa a la incertidumbre total del método, (ii) se puedan estimar con fiabilidad, (iii) la incertidumbre estimada sea concordante con el resultado de medida y (iv) el sentido común y la experiencia (ILAC-G17, 2002).

Una vez cuantificadas las contribuciones a la incertidumbre como incertidumbres típicas, se combinan según la ley de propagación de errores para obtener la incertidumbre combinada,  $u_c$ . Finalmente se calcula la incertidumbre expandida,  $U$ , mediante la ec. 2.39:

$$I = t_{\alpha/2,v} \cdot \sqrt{u_c^2} \quad ec. 2.39$$

donde  $u_c^2$  es la varianza combinada y  $t_{\alpha/2,v}$  es el estadístico  $t$  de *Student* de dos colas para una significación  $\alpha$  y  $v$  grados de libertad, calculados mediante la aproximación de Welch-Satterthwaite (*Satterthwaite, 1941*):

$$v = \frac{u_c^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u(x_i)^4}{v_i}} \quad ec. 2.40$$

Este estadístico suele ser sustituido por un factor de cobertura  $K = 2$  asumiendo que se trata de una distribución normal de las varianzas. De esta forma la incertidumbre expandida asociada a la medida se corresponde con una probabilidad de cobertura de, aproximadamente, un 95% (*JCGM 100, 2008*).

Más recientemente, distintos organismos internacionales como *Eurolab* (European Federation of National Associations of Measurement, Testing and Analytical Laboratories) (*Eurolab 1/2002, 2002; Eurolab 1/2007, 2007*), *Eurachem*, *ILAC* (International Laboratory Accreditation Cooperation), *EA* (European Co-operation for Accreditation) y la misma *ISO* han propuesto, en base a la *GUM*, otras normas y documentos de ayuda para la estimación de la incertidumbre asociada a las medidas de análisis químicos. Dependiendo de la información disponible, por ejemplo, datos obtenidos durante la validación de un método de ensayo, datos recopilados durante la participación en estudios colaborativos y/o ensayos de aptitud, datos obtenidos de los controles de calidad..., se diferencian distintos modelos para la estimación de la incertidumbre, algunos de los cuales se esquematizan en la Fig. 2.14.

La metodología a seguir en la estimación de la incertidumbre asociada a una medida química es, para todos los modelos, la indicada anteriormente. Su diferencia es el origen de la información para la cuantificación de las fuentes de incertidumbre. A continuación se describen con detalle los modelos de estimación de la incertidumbre más empleados e indicados en la Fig. 2.14.

A pesar de presentarlos de forma independiente, la tendencia actual es estimar la incertidumbre de medida mediante la combinación de varios modelos, denominándolos modelos híbridos (*Eurachem/Citac, 2012; Eurolab, 2007*).

En la práctica, los valores de incertidumbre estimados por los distintos modelos son diferentes por varias razones: (i) establecimiento de modelos matemáticos incompletos para la estimación de la incertidumbre, por ejemplo efectos desconocidos o, (ii) variaciones no representativas o incompletas de las fuentes de error durante su evaluación. La comparación de dos estimaciones es, en consecuencia, útil como aseguramiento de la integridad del modelo. La forma más habitual de corregir las deficiencias de un modelo una vez identificadas es mediante la adición de

contribuciones independientes una vez se ha evaluado si son significativas (*ISO/TS 21748, 2004*).

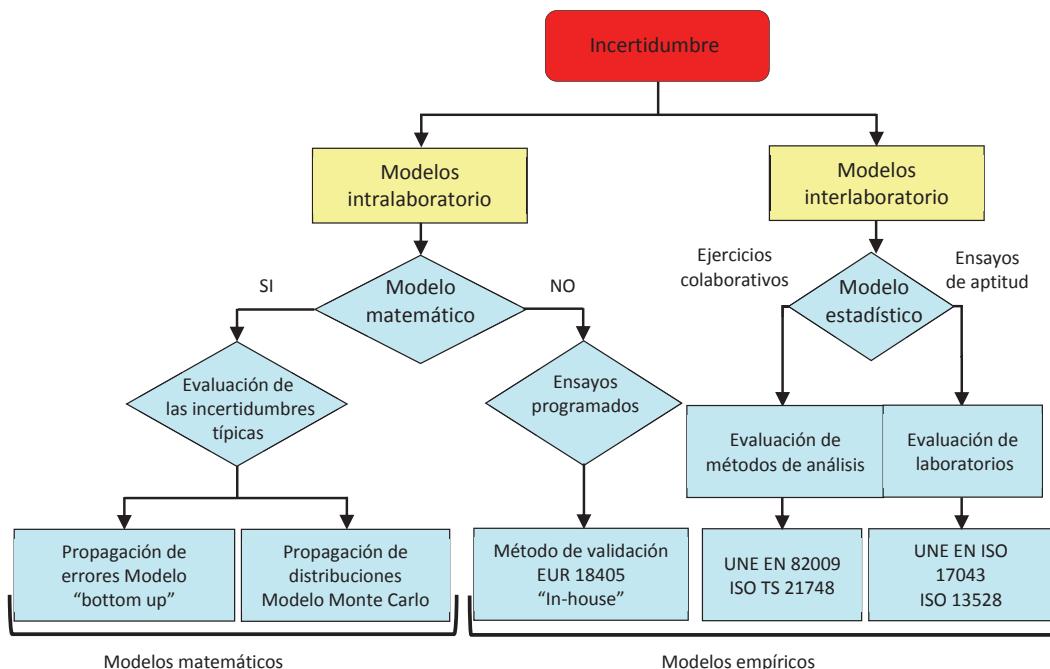


Fig. 2.14 Esquema de los distintos modelos para la estimación de la *incertidumbre* (*Desenfant et al., 2006*)

### Modelo por etapas o modelo “bottom-up”

Este modelo, descrito en el documento *“Guide to the expression of Uncertainty in Measurement”* (*JCGM 100, 2008*) fue propuesto inicialmente para medidas físicas y extrapolado para medidas químicas por el Foro Europeo para la Discusión de la Química Analítica, *EURACHEM*, en una guía denominada *“Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement”* (*Eurachem/Citac, 2012*). Esta guía define paso a paso las etapas necesarias para estimar la incertidumbre de un resultado (*Anglov et al., 1999; Barwick et al., 1998; Hlavay et al., 2001; Liandi, 2001*):

Etapa 1: Esquematización del proceso de medida según las instrucciones del procedimiento normalizado de trabajo vigente en el laboratorio, incluyendo la expresión matemática que relaciona los parámetros medidos con el resultado calculado.

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_i) \Rightarrow y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_i)$$

ec. 2.41

La primera función describe como se obtiene el valor del mensurando *Y* a partir de los valores de las variables de las que depende *X<sub>i</sub>*. Una estimación individual *y* de dicho

mensurando se obtiene a partir de los valores estimados de las variables de entrada  $x_i$  (*JCGM 100, 2008*).

**Etapa 2:** Identificación de las fuentes de incertidumbre. Es una etapa crítica ya que requiere un detallado examen del procedimiento de medida. Entre las fuentes de incertidumbre más habituales en análisis químico cabe mencionar (*Eurachem/Citac, 2012; ILAC-G17, 2002*):

- ▲ Preparación de la muestra, incluyendo operaciones de homogeneización, submuestreos, secado, disolución, extracción, tamizado, concentración, dilución, especiación... Todas estas operaciones son susceptibles de provocar contaminación o pérdida de analito causada por contaminación de los reactivos o del material, volatilización, adsorción, contaminación cruzada...
- ▲ Materiales de referencia: valores de incertidumbre asociados a los patrones de medida, MRC o MR...
- ▲ Calibración de instrumentos y equipos de medida. Incluye la incertidumbre del instrumento de medida, por ejemplo, incertidumbre en la medida de la masa y material volumétrico, condiciones de medida (T<sup>o</sup> y humedad)...
- ▲ Medida de la señal analítica. Errores personales en las lecturas de instrumentos, variabilidad de la señal analítica...
- ▲ Procesamiento de datos. Incluye errores derivados del cálculo usando inapropiados modelos de calibrado, aproximaciones y suposiciones en el método de medida, valores de constantes y otros parámetros obtenidos de fuentes externas y usados en los algoritmos, presentación de resultados, nivel de confianza usado en las estimaciones...

A parte de las fuentes de incertidumbre debidas al método de análisis hay que tener en cuenta otras fuentes de incertidumbre como, por ejemplo, las condiciones de almacenamiento de la muestra, analista...

Un diagrama de Ishikawa o causa y efecto (también llamado algunas veces diagrama de espina de pescado) es una herramienta de gran ayuda para identificar las fuentes de incertidumbre de un procedimiento de análisis o una etapa del mismo (*Ishikawa, 1991*).

Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre se pueden eliminar aquellas cuya contribución sea despreciable o estén duplicadas y reagrupar las que tengan un origen común. El objetivo de reagrupar las fuentes de incertidumbre en unas nuevas componentes es facilitar su cuantificación a partir de los datos disponibles. Se pueden reagrupar contribuciones con el mismo origen; por ejemplo, las incertidumbres debidas a los errores aleatorios de cada etapa del método analítico se pueden reagrupar en la precisión de la medida. También se pueden cancelar contribuciones debidas a errores sistemáticos cuando se determinan la magnitud por diferencia de medidas, por ejemplo, una masa por diferencia de pesadas, (*Ellison et al., 1998*).

Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre, tanto las asociadas a la expresión matemática del mensurando como las que no aparecen explícitamente, se cuantifican como tipo "A" o tipo "B". A continuación se indican algunas de las componentes

habituales de la incertidumbre total durante el proceso de medida analítica y su forma de estimarlas (*Eurachem/Citac, 2012*):

▲ Calibración de los equipos de medida

En la mayoría de los casos, la contribución a la incertidumbre final debida a la calibración de los equipos de medida empleados, como balanzas, material volumétrico, espectrofotómetros UV-vis... suele obtenerse del certificado de calibración como: (i) desviación estándar de una distribución normal acompañada de una factor de cobertura, (ii) expresada como intervalo de error, asumiendo una distribución rectangular limitada por dicho intervalo o (iii) distribución triangular cuando el valor certificado es del tipo “Valor $\pm$ Incertidumbre”.

▲ Medida de volumen

Esta magnitud de entrada está compuesta por tres componentes principales: una debida a la calibración del material volumétrico a 20°C; una segunda componente, la repetibilidad, debida a la variabilidad durante el llenado del material volumétrico hasta la marca por el analista, y la tercera debida a la diferencia entre la temperatura de calibración del material volumétrico y la temperatura durante su uso. La incertidumbre típica de calibración se puede estimar de dos formas: si se ha optado por calibrar el material volumétrico se estima a partir de la información obtenida durante el proceso de calibración; o, si no se ha calibrado el material, se puede hacer una estimación aproximada a partir de la tolerancia indicada por el fabricante, considerándola una distribución rectangular. La repetibilidad es una contribución tipo “A” y suele estimarse experimentalmente mediante el llenado y pesado del material volumétrico repetidas veces ( $n \geq 10$ ). Las fluctuaciones de la temperatura del laboratorio conllevan variaciones en el volumen del disolvente empleado, normalmente agua, y por tanto variaciones en la concentración de la disolución final. La variación de la temperatura da lugar a variaciones del volumen de acuerdo a la siguiente relación:

$$u(V) = V \cdot \gamma \cdot u(T^a) \quad \text{ec. 2.42}$$

donde  $V$  el volumen del material volumétrico a calibrar,  $\gamma$  el coeficiente de expansión cúbica del disolvente,  $2.1 \cdot 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}$  para el caso del agua a 20°C. El coeficiente de expansión del vidrio es mucho menor y por tanto no se tiene en cuenta, pero para el material volumétrico de plástico este coeficiente es similar al del líquido y por tanto no debería despreciarse. La influencia de la temperatura,  $u(T^a)$  seguirá una distribución triangular si el laboratorio dispone de un sistema de climatización que mantenga la temperatura controlada, o rectangular si no lo tiene. Una contribución que habitualmente no se tiene en cuenta es el envejecimiento del material volumétrico; este proceso se agrava y debe tenerse en cuenta cuando las disoluciones preparadas son fuertemente alcalinas (*Meyer, 2007*).

▲ Medida de masa

Esta magnitud está afectada por contribuciones como la repetibilidad, falta de linealidad en el rango de medida, sensibilidad, resolución... Normalmente las que más afectan a la incertidumbre de medida suelen estar incluidas en la incertidumbre de calibración de la balanza. De este modo, la forma más eficiente de evaluar la incertidumbre típica de la medida de masa es a partir de la incertidumbre indicada en el certificado de calibración de la balanza. Es una contribución que suele afectar mínimamente a la incertidumbre total excepto cuando se pesan productos muy volátiles o propensos a cargarse eléctricamente. En este caso se deben realizar experimentos adicionales de repetibilidad.

▲ Pureza de reactivos y concentración de disoluciones patrón

Cuando un reactivo químico es empleado para elaborar una disolución patrón se debe tener en cuenta su pureza para obtener la cantidad real de sustancia pesada. La pureza del reactivo, por tanto, es una contribución a la incertidumbre final. Si la pureza certificada por el fabricante del reactivo químico viene expresada como un valor central con un intervalo (por ejemplo  $99.8\%\pm0.1\%$ ), se considerará una distribución triangular, pero si se expresa como un rango de valores (por ejemplo 99.7%-99.8%) entonces se considerará del tipo rectangular. Cuando el certificado del reactivo no contiene información acerca de la incertidumbre pero indica que la pureza es superior a un valor dado (por ejemplo  $\geq 99.8\%$ ) se considerará el intervalo desde el valor mínimo hasta el 100% (99.8-100) como los límites de una distribución rectangular. Si el certificado de análisis solo indica un valor de pureza, por ejemplo 99.98, esto significa que este valor estará centrado en un intervalo  $99.98\pm\text{a}$  que el analista deberá decidir, por ejemplo, una o varias unidades de la última cifra significativa o un porcentaje del valor certificado. Las disoluciones patrón comerciales suelen venir acompañadas de un certificado que indica la concentración y su error junto con un factor de cobertura por lo que se asume una distribución normal; de lo contrario, el error indicado se corresponde con los límites de una distribución rectangular (*Meyer, 2007; van Look et al., 2002*).

▲ Masas atómicas y moleculares

Solo en algunas técnicas analíticas, como por ejemplo las volumetrías, aparecen las masas atómicas o moleculares en la ecuación del mensurando, las cuales deben ser consideradas como contribución a la incertidumbre. También aparecen en las ecuaciones de cálculo de concentración cuando el analito es solo una parte del compuesto químico, por ejemplo en la concentración de cloruro preparada a partir de una sal sódica (*Meyer, 2003*). Para el cálculo de esta incertidumbre la IUPAC publica regularmente los pesos atómicos y sus incertidumbres, las cuales deben ser tomadas como distribuciones rectangulares (*Coplen, 2001; de Laeter et al., 2003; Wieser et al., 2009; Wiese et al., 2011*).

▲ Recta de calibrado

En el apartado de linealidad se indicó que se empleará la técnica de regresión *Modelo I* para generar la ecuación que relaciona la respuesta analítica con la concentración y así obtener la concentración  $x_0$  de analito en una muestra la cual origina una respuesta observada en el instrumento,  $y_0$ . Este modelo asume que la principal fuente de incertidumbre a considerar para esta concentración,  $x_0$ , es la variación de las respuestas de los patrones de calibración,  $y_i$ . La determinación del error en la concentración debido a estas variaciones,  $u(x_0, y)$ , es extremadamente compleja y normalmente se emplea la siguiente fórmula aproximada:

$$u(x_0, y) = \frac{s_e}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} = \frac{s_e}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{ec. 2.43}$$

$m$  el número de lecturas realizadas para obtener  $y_0$  y los otros símbolos tienen su significado habitual (Massart et al., 1997; Miller et al., 2002).

El *Modelo I* de calibración considera despreciables los errores en las concentraciones de  $x_i$  comparadas con los errores de las respuestas  $y_i$ . Esta afirmación se puede comprobar de varias formas:

- ◆ suponer que el error en  $x_0$  debido a las variaciones en la concentración de los patrones de calibración es despreciable frente a la variación de sus respuestas,  $u(x_0, x_i) \ll u(x_0, y)$ ; esta contribución puede estimarse de forma aproximada como:

$$u(x_0, x_i) \approx \frac{u(x_i)}{n} \quad \text{ec. 2.44}$$

siendo  $u(x_i)$  la incertidumbre típica del patrón de calibrado más próximo al valor de  $x_0$  y  $n$  es el número de patrones empleados para realizar la línea de calibrado (Eurachem/Citac, 2012).

- ◆ comparar la pendiente,  $b$ , de la recta de calibrado obtenida de acuerdo al *Modelo I*, con la obtenida mediante el *Modelo II* que supone que los errores en las concentraciones de los patrones de calibración no son despreciables

$$b(\text{Modelo II}) \approx \frac{b(\text{Modelo I})}{\left(1 - \frac{s_{x_0}^2}{s_x^2}\right)} \quad \text{ec. 2.45}$$

donde  $s_{x_0}^2$  es la varianza de  $x_0$  y  $s_x^2 = \sum(x_i - \bar{x})^2 / (n-1)$ . Relaciones de las varianzas mayores de 0.2 suponen que el efecto de las variaciones de la concentración son significativas y no deben despreciarse (Massart et al., 1997). Esta verificación es solo válida cuando el rango de  $x_i$  es similar a las posibles variaciones de  $x_0$ .

Etapa 3: Estimación de la varianza combinada,  $u_c^2$ . Esta es el resultado de la combinación de las contribuciones de todas las fuentes y contiene toda la información esencial sobre la incertidumbre del mensurando. La contribución  $u_i(y, x_i)$  de cada fuente a la incertidumbre combinada depende de la incertidumbre típica  $u(x_i)$  de la propia fuente y del impacto de la fuente sobre el mensurando, denominado coeficiente de sensibilidad  $c_i$ :

$$u_i(y, x_i) = c_i \cdot u(x_i) \quad ec. 2.46$$

El coeficiente de sensibilidad asociado a la estimación de entrada  $x_i$  se calcula como la derivada parcial de la función modelo con respecto a  $X_i$  evaluada para las estimaciones  $x_i$  y describe el grado en que la estimación de salida se ve afectada por variaciones en la estimación de entrada.

$$c_i = \frac{\partial Y}{\partial X_i} \quad ec. 2.47$$

Suponiendo que las variables de entrada,  $x_i$ , son aleatorias e independientes, la combinación de las diferentes contribuciones,  $u_i(y, x_i)$ , mediante la ley de propagación de incertidumbres da como resultado la varianza combinada,  $u_c(y, (x_1, x_2, \dots))^2 = u_c^2$ , (JCGM 100, 2008).

$$u_c(y, (x_1, x_2, \dots))^2 = \sum_i \left( \frac{\partial Y}{\partial X_i} \right)^2 \cdot u_{x_i}^2 = u_c^2 \quad ec. 2.48$$

La ec. 2.48 se puede simplificar dependiendo del tipo de función matemática que relaciona las variables de entrada. La Tabla 2.11 resume las ecuaciones simplificadas para las funciones más frecuentes encontradas en análisis químico (Eurolab, 2002).

Tabla 2.11: Reglas de propagación de errores para la estimación de incertidumbre

Función que define el mensurando $y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_i)$	Varianza combinada $u_c(y, (x_1, x_2, \dots))^2 = u_c^2$
$y = k_0 + k_1 \cdot x_1 + k_2 \cdot x_2 + k_3 \cdot x_3$	$u_c(y) = \sqrt{u(x_1)^2 + u(x_2)^2 + u(x_3)^2 + \dots}$
$y = k_1 \cdot \frac{x_1 \cdot x_2 \dots}{x_{n-1} \cdot x_n}$	$u_c(y) = y \cdot \sqrt{\left[ \frac{u(x_1)}{x_1} \right]^2 + \left[ \frac{u(x_2)}{x_2} \right]^2 + \dots + \left[ \frac{u(x_{n-1})}{x_{n-1}} \right]^2 + \left[ \frac{u(x_n)}{x_n} \right]^2}$
$y = x^n$	$u_c(y) = y \cdot n \cdot \frac{u(x)}{x}$
$y = \ln x$	$u_c(y) = \frac{u(x)}{x}$

A la ec. 2.48 se le añaden las contribuciones a la incertidumbre no implícitas en la ecuación matemática,  $u_x^{2'}$ .

$$u_c = \sum_i \left( \frac{\partial Y}{\partial X_i} \right)^2 \cdot u_{X_i}^2 + \sum u_x^{2'} \quad \text{ec. 2.49}$$

Etapa 4: Cálculo de la incertidumbre expandida,  $I$ , de acuerdo a la ec. 2.39.

Entre las ventajas de la aplicación de este modelo cabe destacar que es relativamente menos costoso pues la estimación de la incertidumbre se realiza exclusivamente a partir de datos recopilados en el laboratorio. En segundo lugar, algunas etapas del método aportan información para ser utilizada por otros métodos como, por ejemplo, la preparación de disoluciones (*Maroto et al., 2002a*). Por último, el hecho de identificar y cuantificar todas las fuentes de incertidumbre del método analítico supone la obtención de información de las etapas del método que más contribuyan a la incertidumbre final del resultado, lo que permitiría actuar para su reducción, (*Rodomonte et al., 2006; Williams, 1996*).

En cuanto a los inconvenientes de este modelo debe resaltarse su complejidad, dado que el elevado número de operaciones y de fuentes de error de los métodos analíticos hacen que sea muy tedioso, cuando no difícil, identificar o estimar correctamente la incertidumbre. Otro inconveniente es que se realizan muchas suposiciones no siempre ciertas al asignar distribuciones de probabilidad para estimar algunas componentes de la incertidumbre (*JCGM 100, 2008*). Generalmente no suele ser práctico cuantificar todas las fuentes de incertidumbre asociadas a cada tipo de ensayo y muestra debido a la laboriosidad del modelo y, a veces, se invierte tiempo y recursos en cuantificar fuentes de incertidumbre que son despreciables. Otro inconveniente es el riesgo de ignorar contribuciones significativas a la incertidumbre total (*Rodomonte et al., 2006; Vissier, 2002; Vissier, 2004; Wampfler et al., 2009*).

A pesar de sus limitaciones, el modelo “bottom-up” ha sido ampliamente usado para estimar la incertidumbre (*Anglov et al. 1999; Barwick et al., 1998; Liandi, 2001; Hlavay et al., 2001*). Además, se aplica de forma habitual a la estimación de la incertidumbre de disoluciones y de métodos primarios (*King, 2000; Richter, 1997*), o de las medidas proporcionadas por los equipos empleados durante la aplicación de los métodos de ensayo.

En un intento de simplificar el cálculo de incertidumbre para métodos de ensayo que se aplican de forma rutinaria, se han desarrollado otros modelos de estimación de la incertidumbre que consideran efectos agrupados. Estos modelos se describen a continuación.

### Modelos basados en la información de ejercicios interlaboratorio

Estos modelos estiman la incertidumbre a partir de la información obtenida en los estudios de intercomparación de laboratorios. La norma UNE-EN ISO/IEC 17043 define

estos como *la organización, realización y evaluación de mediciones o ensayos sobre un mismo ítem o ítems similares por dos o más laboratorios de acuerdo con condiciones predeterminadas (UNE-EN ISO/IEC 17043, 2010)*. Según el objetivo del estudio, estos se pueden clasificar en estudios colaborativos, ensayos de aptitud y estudios de certificación (*Horwitz 1995; Hund et al., 2000; Valcárcel et al, 1992*).

- ▲ El objetivo de los estudios colaborativos (*method performance studies*) es que una serie de laboratorios seleccionados validen un determinado método de análisis valorando los parámetros de calidad al aplicar escrupulosamente el protocolo de dicho método (*UNE 82009-2, 1999*).
- ▲ Los ensayos de aptitud (*proficiency tests*) son estudios conducidos por un laboratorio de reconocido prestigio para llevar a cabo ensayos o mediciones específicos entre un grupo de laboratorios en el que uno o más materiales son analizados mediante los métodos empleados por cada laboratorio, con el propósito de comparar el resultado de cada uno de ellos y demostrar el desempeño de los laboratorios para llevar a cabo ensayos o mediciones específicos (*Horwitz, 1988; UNE EN ISO/IEC 17025, 2010*). Otro de los objetivos es validar las estimaciones de la incertidumbre declaradas por cada laboratorio, comprobando que el valor consensuado está incluido en el intervalo de valores del laboratorio (*EA-4/16, 2003*).
- ▲ Los estudios de certificación están encaminados a determinar el contenido de uno o varios analitos en un material y certificarlo, mediante la participación de laboratorios de alto nivel. La determinación del parámetro a certificar se lleva cabo empleando diversas técnicas, métodos y procedimientos, y la información requerida por el organismo organizador es más detallada que la solicitada en los otros ejercicios de intercomparación (*UNE EN ISO/IEC 17043, 2010; Compañó Beltrán et al., 2002; Heydorn, 2006*).

La estimación de la incertidumbre a partir de ensayos interlaboratorio se puede dividir en dos modelos distintos dependiendo del tipo de ejercicio interlaboratorio del que obtengamos la información: (i) modelo “top-down”, propuesto por el *Analytical Methods Committee* de la *Royal Society of Chemistry*, el cual estima la incertidumbre a partir de la información obtenida en los estudios colaborativos (*UNE 82009-1, 1998; UNE 82009-3, 1999*); y (ii) modelo que estima la incertidumbre a partir de los resultados de los ensayos de aptitud.

#### **“Top-down”**

Este modelo es una alternativa a la cuantificación de la incertidumbre donde el laboratorio es visto, desde un “nivel superior”, como miembro de una población de  $p$  laboratorios siendo  $p_{min}=8-15$  (*UNE 82009-1, 1998*). En la Fig. 2.15 se muestra como, en este modelo, el error sistemático debido a los laboratorios,  $\delta_{lab}$ , y el error debido a la realización de series de medidas en cada laboratorio,  $\delta_{serie}$ , se convierten en errores aleatorios, al igual que el error cometido durante la realización de medidas replicadas,  $\epsilon$ , de modo que se simplifica la estimación de la incertidumbre. El sesgo del método,  $\delta_{met}$  sería por tanto el único error sistemático.

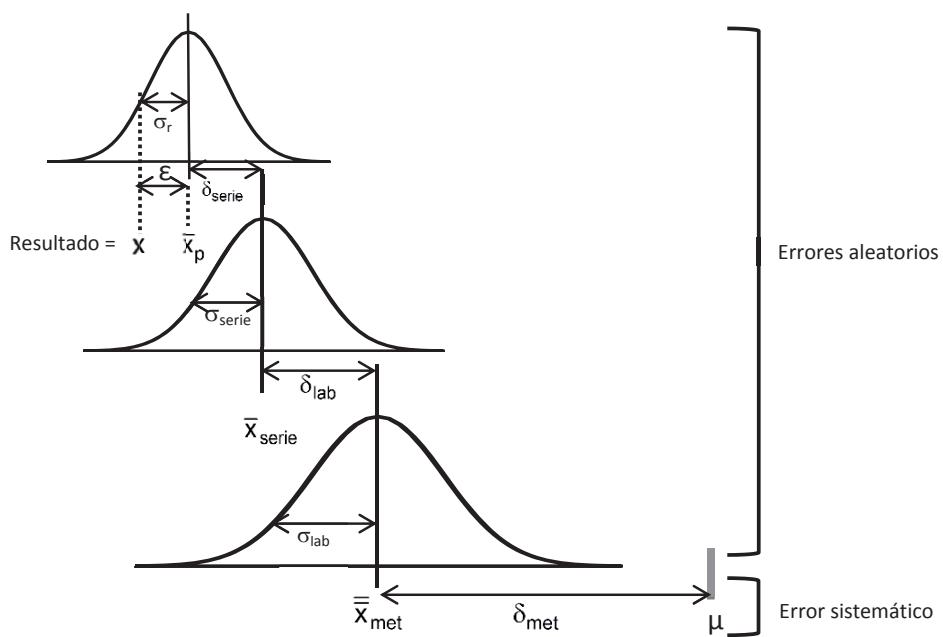


Fig. 2.15: Tipos de errores asociados a un resultado según la aproximación “top down” (Maroto, 2002)

Por tanto, la medida analítica se desglosa como sigue (AMC, 1995):

$$x = \mu + \delta_{\text{met}} + \delta_{\text{lab}} + \delta_{\text{serie}} + \varepsilon \quad \text{ec. 2.50}$$

donde  $\mu$  es el valor verdadero y  $\varepsilon$  es el error aleatorio del laboratorio. Cada uno de estos errores lleva asociada una varianza: varianza de los laboratorios,  $\sigma_{\text{lab}}^2$ , varianza de la serie,  $\sigma_{\text{serie}}^2$  y varianza asociada al error aleatorio de cada laboratorio,  $\sigma_\varepsilon^2$ , las cuales son estimadas mediante el ejercicio interlaboratorio. Las varianzas debidas a los laboratorios y serie de medidas representan la varianza interlaboratorio,  $\sigma_L^2$ , ec. 2.51 y  $\sigma_\varepsilon^2$ , la varianza intralaboratorio bajo condiciones de repetibilidad (ISO/TS 21748, 2004; UNE 82009-2, 1999).

$$\sigma_L^2 = \sigma_{\text{serie}}^2 + \sigma_{\text{lab}}^2 \quad \text{ec. 2.51}$$

Es de esperar que  $\sigma_\varepsilon^2$  tenga diferentes valores en diferentes laboratorios debido a diferencias tales como las habilidades de los operadores, pero se asume que para un método de análisis adecuadamente estandarizado tales diferencias entre laboratorios serían pequeñas. De este modo se establecería un valor común de la varianza intralaboratorio para todos los laboratorios a través de la media aritmética de las varianzas intralaboratorio. Este valor común se llama varianza de repetibilidad y se designa como  $\sigma_\varepsilon^2 = \sigma_r^2$ .

Si  $u(\delta)$  es la incertidumbre del método, la varianza de los valores obtenidos por los participantes se expresaría como:

$$u^2(x) = u_c^2 = u^2(\delta) + \sigma_{\text{serie}}^2 + \sigma_{\text{lab}}^2 + \sigma_r^2 = u^2(\delta) + \sigma_L^2 + \sigma_r^2 \quad ec. 2.52$$

De este modo la varianza de reproducibilidad,  $\sigma_R^2$  sería la suma de la varianza de repetibilidad y de la varianza interlaboratorio:

$$\sigma_R^2 = \sigma_L^2 + \sigma_r^2 \quad ec. 2.53$$

En estas ecuaciones  $\sigma$  representa el valor verdadero de la desviación típica poblacional. En la práctica, estas desviaciones no se conocen con exactitud debido a que se utilizan poblaciones limitadas por lo que deben hacerse estimaciones a partir de desviaciones muestrales,  $s$ :

$$u_c^2 = u^2(\delta) + s_{\text{lab}}^2 + s_{\text{series}}^2 + s_r^2 \quad ec. 2.54$$

Haciendo uso del error estándar de la media, la incertidumbre estándar de la media de  $p \times q \times n$  mediciones realizadas como  $n$  repeticiones, realizadas en  $q$  series de medidas por cada uno de los  $p$  laboratorios se puede entonces estimar como (*Dehouck et al., 2003a; Dehouck et al., 2003b; Hund et al., 2001; Marini et al., 2005b*):

$$u^2(\bar{x}) = u_c^2 = u^2(\delta) + \frac{s_{\text{lab}}^2}{p} + \frac{s_{\text{series}}^2}{pq} + \frac{s_r^2}{pqn} \quad ec. 2.55$$

Las fórmulas para la estimación de las desviaciones,  $s$ , en los ensayos de intercomparación están recogidas en el *Apartado 2.3.2*.

Por último la estimación de la componente debida al sesgo,  $u(\delta)$ , se estima a partir de los datos del mismo ejercicio de intercomparación teniendo en cuenta que los participantes deben analizar un material de referencia al que se le asigna un valor  $\mu$ , con una incertidumbre asociada  $u_\mu$ . De este modo, el error del método o sesgo,  $\delta$ , será la diferencia entre la media de los promedios de los participantes,  $\bar{x}$ , y el valor verdadero,  $\mu$ .

$$\delta = \bar{x} - \mu \quad ec. 2.56$$

La incertidumbre de método,  $u_{\text{met}}$ , se estima a partir de la siguiente expresión (*Ellison, 1998; Hund et al., 2001*):

$$u_{\text{met}} = u(\delta) = \sqrt{s_\delta^2 + u_\mu^2} \quad ec. 2.57$$

siendo  $s_\delta$  la desviación estándar del sesgo obtenido a partir de los resultados del ensayo de aptitud (*Ellison, 1998; ISO/TS 21748, 2004; UNE 82009-4, 1999*):

$$s_{\delta} = \sqrt{\frac{s_R^2 - \left(\frac{n-1}{n}\right) \cdot s_r^2}{p}} \quad ec. 2.58$$

El sesgo del método será significativo y se incluirá en la ecuación ec. 2.52 si se cumple que (*UNE 82009-6, 1999*):

$$|\bar{x} - \mu| > \delta_{crítico} = 2 \cdot \sqrt{s_R^2 - s_r^2 \cdot \left(\frac{n-1}{n}\right)} \quad ec. 2.59$$

Otros autores indican el siguiente criterio para comprobar que el sesgo del método es significativo (*Hund et al., 2001; Maroto, 2002*):

$$|\bar{x} - \mu| > \delta_{crítico} = 2 \cdot \sqrt{u^2(\delta)} \quad ec. 2.60$$

### *Ensayos de aptitud, PT's*

El segundo tipo de ejercicios interlaboratorio empleado para la determinación de la incertidumbre de un método de análisis son los ensayos de aptitud o *Proficiency Test*, PT. Inicialmente se concibieron para la revisión periódica del rendimiento global de un laboratorio (*UNE EN ISO/IEC 17043, 2010; EA-3/04, 2001*) pero, además, los resultados obtenidos se pueden utilizar para comprobar la incertidumbre evaluada ya que la dispersión de las diferencias entre los valores registrados y los valores asignados obtenidos en repetidas rondas, proporciona una base para la evaluación de la incertidumbre del método de ensayo (*Eurolab 1/2002, 2002; EA-4/16, 2003*).

La norma UNE 17043 especifica tanto los requisitos técnicos que deben cumplir los ensayos de aptitud (valor asignado, diseño estadístico, métodos analíticos a emplear...) como las competencias de los proveedores de los mismos (planificación, preparación de muestras, emisión de informes...) (*AMC, 2010; UNE-EN ISO/IEC 17043, 2010; Thompson et al., 2006*). Por su parte, la norma internacional ISO 13528 (*ISO 13528, 2005*) describe los métodos estadísticos aplicables a estos ensayos, cuyas etapas principales son: i) determinación del valor asignado, ii) cálculo de estadísticas de desempeño, iii) evaluación del desempeño y iv) determinación preliminar de la homogeneidad y estabilidad del ítem sometido al ensayo de aptitud.

En primer lugar se necesita un material de referencia a ensayar con una característica perfectamente definida por el mensurando junto con su incertidumbre. En segundo lugar, los resultados obtenidos por los laboratorios participantes en el PT, tras el análisis del material de referencia, se transforman estadísticamente para facilitar su interpretación y evaluar su desempeño. Este tratamiento estadístico da lugar a un valor de referencia,  $\mu$ , el cual viene acompañado de una incertidumbre,  $u_{\mu}$ , y una

desviación estándar, desviación robusta del PT,  $\sigma_{PT}$ , con la que se evalúa las desviaciones de los participantes respecto al valor asignado. El desempeño de los laboratorios se evalúa puntuando los resultados de los estadísticos obtenidos, (ver *Apartado 2.3.4.*) que posteriormente son representados gráficamente. Un punto importante es la determinación preliminar de la homogeneidad y estabilidad de la muestra de ensayo con el fin de asegurar que el o los mensurandos no cambian durante el trámite del estudio.

Los resultados obtenidos por un laboratorio participante en diversos PT's pueden ser una buena base para la estimación de la incertidumbre de medida si cumplen las siguientes condiciones: (i) las muestras de ensayo del PT sean razonablemente representativas de las muestras de rutina en cuanto al tipo de material y rango de valores del mensurando; (ii) los valores asignados tienen una apropiada incertidumbre; (iii) el número de rondas de PT's en las que ha participado el laboratorio es lo suficientemente elevado para obtener una estimación fiable; es recomendable un mínimo de seis ensayos diferentes en un período de tiempo adecuado; (iv) cuando se emplean los valores de consenso, el número de laboratorios participantes debe ser suficiente para la caracterización fiable del material objeto de estudio (*Eurachem/Citac, 2012*).

Para este modelo aún no hay acuerdo de cómo estimar la incertidumbre; sin embargo, el más difundido es el desarrollado por los países nórdicos en la guía NORDTEST (*Eurolab, 2007; Magnusson et al., 2011*). Según esta guía las contribuciones de más peso a la incertidumbre son las debidas a la falta de veracidad y precisión. A partir de las estadísticas de desempeño se obtiene si el sesgo obtenido es significativo y se estima la incertidumbre asociada a ese error según la siguiente ecuación:

$$u_\delta = \sqrt{\frac{\sum \delta^2}{N} + u_\mu^2} \quad \text{ec. 2.61}$$

siendo  $\delta$  la diferencia entre el valor promedio de las medidas replicadas realizadas por el laboratorio participante y el valor de referencia,  $\mu$ ,  $N$  el número de PT's y  $u_\mu$  es:

$$u_\mu = \sqrt{\frac{\sum s_{PT}}{N}} \quad \text{ec. 2.62}$$

donde  $s_{PT}$  es la desviación robusta obtenida en el PT y  $p$  el número de participantes en cada ronda de PT's.

Para el cálculo de la incertidumbre combinada habría que añadirle la contribución debida a la falta de precisión dentro del laboratorio,  $u_r$ , de modo que la incertidumbre de un laboratorio se estimaría de la siguiente forma (*Detaille et al 2006; Eurolab 1/2007; Magnusson et al., 20011; Medina Pastor et al., 2011; Näykki et al., 2012*):

$$u_c = \sqrt{u_\delta^2 + u_r^2} \quad ec. 2.63$$

La desviación estándar obtenida de las medidas replicadas de la muestra a ensayar en un PT por un laboratorio dado no es empleada habitualmente para la estimación de la falta de precisión del laboratorio pues excluye fuentes de incertidumbre importantes. En su lugar se suele emplear datos obtenidos de ensayos intralaboratorio, controles de calidad internos o externos, análisis de MRC... (*Fisicaro et al 2008; Mäkinen, 2009*).

Maroto *et al.* proponen otro modelo para la estimación de la incertidumbre de un laboratorio a partir de los resultados obtenidos en los distintos PT's a los que se presenta. En primer lugar, calcula un coeficiente de proporcionalidad,  $r_i$ , para cada PT como cociente entre el resultado del laboratorio,  $C$ , y el valor de consenso o corregido,  $C_{corr}$ . La expresión para calcular la incertidumbre combinada del laboratorio se obtiene mediante la aplicación de la ley de propagación de errores al resultado analítico corregido entre el coeficiente de proporcionalidad promedio del laboratorio (*Maroto et al., 2005; Companyo et al., 2008*).

$$C_{cor} = \frac{C}{r} \quad ec. 2.64$$

$$u(C_{cor}) = u_{lab} = C_{cor} \cdot \sqrt{\left(\frac{u(C)}{C}\right)^2 + \left(\frac{u(r)}{r}\right)^2} = \frac{C_{cor} \cdot s_{r_i}}{r} \cdot \sqrt{1 + \frac{1}{n}} \quad ec. 2.65$$

Otra forma de estimar la incertidumbre de un laboratorio a partir de los resultados acumulados de PT's es mediante la desviación estándar de los sesgos (*Patriarca et al., 2006*) o recuperaciones, (*Teixeira et al., 2012*).

Algunas de las ventajas más importantes de la aplicación de los modelos basados en la información de los ejercicios interlaboratorio son su aplicación general y no individual o por muestra y su sencillez de aplicación, pues estima la incertidumbre globalmente sin tener que identificar y cuantificar cada una de las fuentes de error de un procedimiento analítico. Además incluye todas las fuentes de error sistemático y aquellos factores individuales desconocidos (*Rodomonte et al., 2006*).

En general, los ensayos interlaboratorio no se realizan con la frecuencia suficiente como para proporcionar una buena estimación de la incertidumbre, ya que no se ofrecen ejercicios para el tipo de muestra y método analítico empleados por el laboratorio. Los resultados de los otros laboratorios participantes, o las diferencias entre medidas pasadas y condiciones actuales del laboratorio pueden implicar que en algunos casos la incertidumbre final estimada para el método no sea representativa de la incertidumbre real de un laboratorio individual (*EA-4/16, 2003; Quintela et al., 2012*).

Usualmente, la naturaleza de las muestras de ensayo analizadas en los sucesivos ejercicios interlaboratorio varía, por lo que es difícil acumular datos representativos para caracterizar bien las muestras de ensayo. Por otra parte, en muchos programas la falta de materiales de referencia trazables similares a materiales de referencia certificados conlleva el empleo de valores consensuados para evaluar el funcionamiento de los laboratorios. Esto supone que los resultados son propensos a sesgos ocasionales originando valores aparentemente anómalos de los laboratorios individuales (*EA-4/16, 2003*).

A pesar de su limitada utilidad en la evaluación de la incertidumbre, los ejercicios interlaboratorio son muy útiles en el caso especial de que: los objetos de ensayo utilizados sean similares a los analizados habitualmente por el laboratorio, los valores asignados en cada ronda sean trazables a valores de referencia adecuados, o en caso de que la incertidumbre asociada al valor asignado sea pequeña comparada con la dispersión observada de los resultados (*Fisicaro et al., 2008; EA-4/16, 2003*).

Estos modelos incluyen las fuentes principales que contribuyen a la incertidumbre sin embargo otras fuentes que deberían considerarse son: la toma de muestras, posibles pre-tratamientos de la muestra, falta de homogeneidad, variaciones en las condiciones de medida, cambios en el tipo de muestra... (*EA 4/16, 2003; Ellison et al., 1998; ISO/TS 21748, 2004*).

### **Modelo basado en la información obtenida durante la validación**

En la práctica, la idoneidad de los métodos de ensayo utilizados para realizar ensayos rutinarios suele comprobarse por medio de estudios de validación y verificación del método. Los datos obtenidos de estos estudios sirven para evaluar la incertidumbre de los métodos de ensayo mediante la identificación de las fuentes de incertidumbre generales tales como precisión, veracidad... Este modelo, propuesto por la Unión Europea en el documento EUR 18405 EN (*Comisión Europea, 1998b*), se basa en la identificación y cuantificación de las fuentes de incertidumbre generales a partir de la información obtenida durante los procesos de validación de los métodos de análisis (*Dias et al, 2008; Maroto et al., 2001a; Maroto et al., 2001c; Maroto et al., 1999b; Pau et al., 2001*).

En este modelo, las contribuciones a tener en cuenta o incertidumbres típicas son las siguientes:

- ▲ Incertidumbre originada por el proceso analítico debido a la falta de precisión del método analítico,  $u_{precisión}$ .

Una de las características técnicas fundamental evaluada durante la validación es la precisión del método de ensayo. Se estima como incertidumbre típica tipo “A” a partir de la varianza de reproducibilidad,  $s^2_{reproducibilidad}$ . Esta se puede obtener de acuerdo a las ecuaciones descritas en el *Apartado 2.3.2*.

▲ Incertidumbre debida al sesgo del método,  $u_{veracidad}$ .

Para expresar como incertidumbre la falta de veracidad estimada durante la validación del método se emplean diferentes expresiones matemáticas dependiendo de la forma en que se haya expresado el sesgo.

Si la información disponible de la veracidad del método de análisis se ha obtenido a partir de un reducido número de medidas, la incertidumbre de veracidad,  $u_{veracidad}$ , se estimará aplicando la ley de propagación de errores a la ecuación empleada para calcular el sesgo (*Eurachem/Citac, 2012; Guevara-Riba et al., 2006; Linsinger, 2008*).

Si el sesgo se expresa como error absoluto,  $\delta$ , la incertidumbre se estimará como:

$$\delta = \bar{x}_i - \mu \quad \Rightarrow \quad u_{veracidad} = u(\delta) = \sqrt{\left( \frac{s_{\bar{x}_i}^2}{n} \right) + u_{\mu}^2} \quad ec. 2.66$$

Si el valor de referencia se ha obtenido aplicando un método de referencia se estima como (*Hund et al., 2001*):

$$\delta = \bar{x}_i - \bar{x}_{ref} \quad \Rightarrow \quad u_{veracidad} = u(\delta) = \sqrt{\left( \frac{s_{\bar{x}_i}^2}{n} \right) + \left( \frac{s_{\bar{x}_{ref}}^2}{n_{ref}} \right)} \quad ec. 2.67$$

Si el sesgo se calcula como factor de recuperación,  $R$ , la expresión para obtener la incertidumbre de  $R$  dependerá de cómo se haya calculado dicha recuperación, (*Barwick et al., 1998; Barwick et al., 2000a; Barwick et al., 2000b; Bocca et al., 2010; Gluschke et al., 2004; Drolc et al., 2011*).

$$R = \frac{\bar{x}_i}{\mu} \quad \Rightarrow \quad u_{veracidad} = u(R) = R \cdot \sqrt{\left( \frac{s_{\bar{x}_i}^2}{n \cdot \bar{x}_i^2} \right) + \left( \frac{u_{\mu}}{\mu} \right)^2} \quad ec. 2.68$$

$$R = \frac{\bar{x}_i - \bar{x}_{matriz}}{\mu_{dopado}} \quad \Rightarrow \quad u_{veracidad} = u(R) = R \cdot \sqrt{\left( \frac{s_{\bar{x}_i}^2}{n} + s_{\bar{x}_{matriz}}^2 \right) + \left( \frac{u_{\mu_{dopado}}}{\mu_{dopado}} \right)^2} \quad ec. 2.69$$

En estas expresiones,  $s_x^2$  simboliza la desviación estándar de las  $n$  medidas realizadas y  $u_{\mu}$  representa la incertidumbre asociada al valor de la variable medida en el material de referencia analizado.

Si la veracidad obtenida es una contribución de tipo “B” se puede transformar el sesgo estimado por el laboratorio, asumiendo que sigue una distribución rectangular, para expresarlo en unidades de incertidumbre de acuerdo con las ecuaciones siguientes:

$$u(\delta) = \frac{\delta}{\sqrt{3}} \quad ec. 2.70$$

Si se ha expresado el sesgo como error relativo, la expresión se transformaría en:

$$u(\delta) = \frac{Er}{\sqrt{3}} \cdot \mu \quad ec. 2.71$$

▲ Incertidumbre asociada a las etapas de pretratamiento,  $u_{pretratamiento}$ .

Incluye fuentes de incertidumbre no evaluadas durante la validación de método y relacionadas habitualmente con etapas de pretratamiento de la muestra como filtración “in situ” secado de muestras sólidas, submuestreo y homogeneización... Deben evaluarse de forma independiente.

▲ Incertidumbre asociada a otras contribuciones,  $u_{otros}$ .

En este término estarían incluidas contribuciones no contempladas anteriormente, por ejemplo, la debida al muestreo si se desea incluirlo dentro del procedimiento analítico. En el caso de estimar la incertidumbre de veracidad mediante las ec. 2.70 y ec. 2.71 la contribución debida a la incertidumbre del patrón o muestra de control no está contemplada por lo que habría que incluir un nuevo término que podríamos llamar  $u_{trazabilidad}$ . En el caso de patrones químicos preparados en el propio laboratorio, esta contribución se estimaría según el modelo “bottom-up”.

La varianza combinada del método de ensayo se estimaría entonces como la suma de las cuatro contribuciones anteriores (*Valcárcel et al, 1999*).

$$u_c^2 = u_{precisión}^2 + u_{veracidad}^2 + u_{pretratamiento}^2 + u_{otros}^2 \quad ec. 2.72$$

Finalmente, la incertidumbre expandida se calcula según la ec. 2.39.

Esta estrategia es menos costosa y más fácilmente aplicable que el método “bottom-up” pues supone poco esfuerzo adicional ya que la validación del método debe realizarse en todo caso y, en el caso de validar el método para un rango de concentraciones, se obtiene una función que relaciona la incertidumbre con la concentración, de modo que la incertidumbre de una muestra dada se obtiene fácilmente por interpolación. Una ventaja respecto al modelo basado en la participación en ejercicios interlaboratorio es que la incertidumbre calculada tiene que ver con la del laboratorio individual, pues se ha obtenido utilizando la información generada por ese laboratorio.

Un inconveniente de estimar la incertidumbre por bloques es que no es tan inmediato identificar las etapas críticas del método analítico y, por tanto, es más complicado disminuir la incertidumbre de los resultados. Por último, la falta de disponibilidad en algunos casos de materiales de referencia trazables dificulta la estimación de algunas

componentes de la incertidumbre por lo que es necesaria la participación en ejercicios de aptitud.

### Modelo de simulación numérica Monte Carlo

Los modelos anteriores evalúan la incertidumbre de medida aplicando la ley de propagación de la incertidumbre. El método Monte Carlo, en cambio, es un modelo de simulación numérica que propaga las distribuciones de las diferentes variables de entrada a partir de un muestreo aleatorio de distribuciones de probabilidad, evitando la necesidad de realizar cálculos de derivadas parciales.

Aunque su aplicación a la evaluación de la incertidumbre en el campo de la química analítica es relativamente reciente el número de autores que lo han utilizado es ya muy amplio (*Damasceno et al., 2006; Delgado et al., 2009; Herrador et al., 2004; Theodorou et al., 2011*). El suplemento de la guía *GUM* describe la aplicación del método Monte Carlo a la estimación de la incertidumbre de medida y establece los casos en los que puede ser aplicable (*JCGM 101, 2008*).

En la Fig. 2.16 se ilustra la estimación de la incertidumbre de un resultado que depende de tres variables de entrada, mediante la ley de la propagación de la incertidumbre utilizada por los modelos anteriores. Cada variable de entrada  $x_i$  tiene una función de densidad de probabilidad que se caracterizada por su media y su desviación estándar o incertidumbre asociada  $u_{x_i}$ .

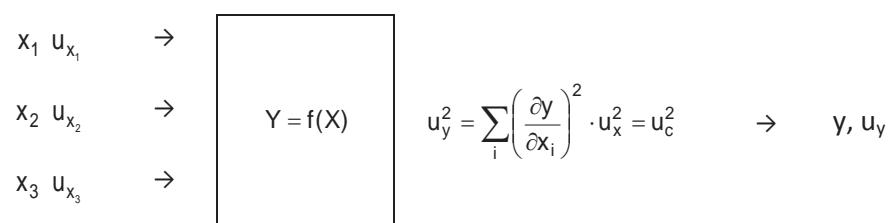


Fig. 2.16: Diagrama de la ley de propagación de la incertidumbre de tres variables independientes

La estimación de la incertidumbre de acuerdo al modelo Monte Carlo se ilustra en la Fig. 2.17, que esquematiza la propagación de las distribuciones de tres variables independientes que afectan a un resultado  $y$ . Cada variable de entrada está caracterizada por una función de densidad de probabilidad, FDP,  $g_{xi}(\xi_i)$ , pudiendo ser esta gaussiana, rectangular, t... Las tres FDP's  $g_{xi}(\xi_i)$ ,  $i=1,2,3$ , se propagan a través de la simulación de Monte Carlo para obtener un mensurando  $y$  con FDP  $g_y(\eta)$  que puede tener forma asimétrica. La incertidumbre del resultado  $y$  se estima como la desviación estándar de la distribución de salida.

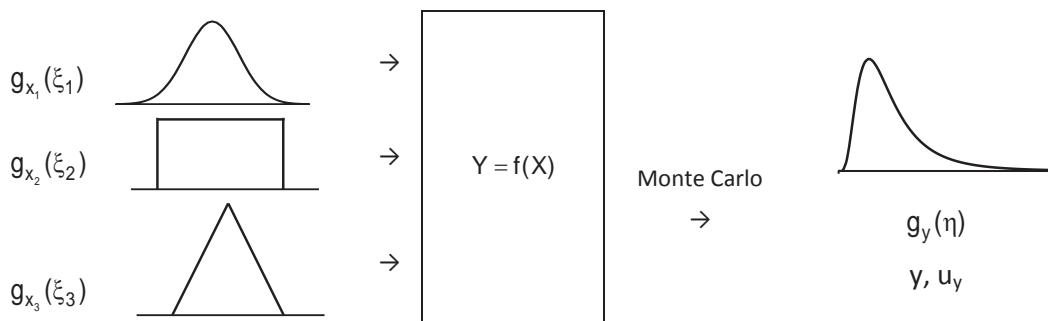


Fig. 2.17: Diagrama de la ley de propagación de las distribuciones de tres variables independientes con distintas funciones de densidad de probabilidad

El proceso de la estimación de la incertidumbre utilizando la simulación Monte Carlo, se representa esquemáticamente en la Fig. 2.18:

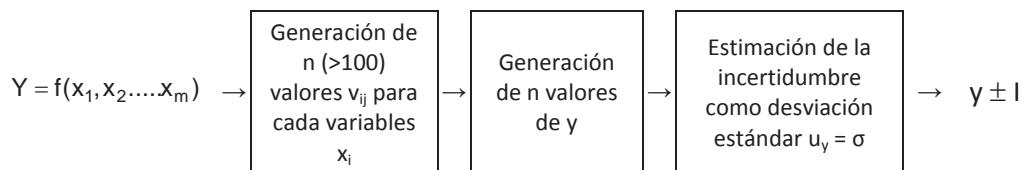


Fig. 2.18: Proceso de estimación de la incertidumbre por el método Monte Carlo

En primer lugar se define el mensurando  $y$  o variable de salida, y se determinan las variables de entrada  $x_1, x_2, \dots, x_m$  que influyen en dicho mensurando. A continuación, se deduce el modelo que relaciona  $y$  con  $x_i$ ,  $y=f(x_i)$ .

Para cada variable  $x_i$  experimental que sigue una determinada distribución, conocida a priori, con una desviación estándar o incertidumbre  $u_i$ , se genera una variable aleatoria,  $v_i$ , de acuerdo al tipo de distribución de  $x_i$  (normal, rectangular, ....) (JCGM 101, 2008). Así, si  $x_i$  pertenece a una distribución normal la variable generada se calcularía como  $v_{ij}=x_i+z_{ij} u_i$ . Se genera un número muy elevado ( $n>100$ ) de valores aleatorios de  $z$  a partir de los que se obtienen otros tantos valores de la variable  $v_i$ , con los que se calculan los nuevos valores del mensurando  $y=f(v_i)$  siguiendo el mismo modelo matemático que con las variables originales. Se obtiene la desviación estándar de los  $n$  valores de  $y$  que será la incertidumbre de la magnitud de salida,  $u_y$ . Por último, se obtiene la incertidumbre expandida,  $I$ , multiplicando  $u_y$  por el factor de cobertura  $K=2$  al 95.45%.

Diversos trabajos han comparado el modelo Monte Carlo con modelos más tradicionales de estimación de la incertidumbre (Damasceno et al., 2006; Delgado et al., 2009; Theodorou et al., 2011). En general se ha observado un alto grado de concordancia entre los resultados obtenidos por los dos tipos de modelos.

El resultado del método Monte Carlo puede ser considerado como más realista porque no involucra aproximaciones ni suposiciones como, por ejemplo: ignorar la incertidumbre de las concentraciones de los patrones en la curva de calibración obtenida mediante el regresión lineal, la asignación de distribuciones normales a las variables de entrada cuando no lo son, o la ausencia de correlación entre las variables de entrada.

El modelo Monte Carlo de evaluación de la incertidumbre puede resultar recomendable en las siguientes circunstancias (*JCGM 101, 2008*): (i) es difícil obtener las derivadas parciales del modelo matemático, tal como requiere la ley de propagación de la incertidumbre; (ii) la FDP de la magnitud de salida no es una distribución normal y (iii) las FDP de las magnitudes de entrada son asimétricas.

Los inconvenientes más notorios de este modelo son que las incertidumbres estimadas varían de una réplica a otra por la naturaleza aleatoria de la simulación, y la dificultad de identificar las contribuciones más importantes a la incertidumbre total si no se repite la simulación (*Eurachem/Citac, 2012*).

Aunque las estimaciones pueden realizarse con una hoja de cálculo, para métodos de análisis con muchas etapas los cálculos se complican extraordinariamente, requiriéndose software específico (*Chew et al., 2012; Eurachem/Citac, 2012; Solaguren-Beascoa et al., 2009*).

### Otros modelos de estimación de la incertidumbre

Modelo basado en la verificación de la trazabilidad utilizando materiales de referencia certificados (MRC) (*Eurolab, 2007*). Consiste en estimar la incertidumbre de medida empleando los resultados de los análisis de MRC's obtenidos durante la verificación de la trazabilidad del método de análisis, es decir, durante la comprobación de ausencia de un sesgo significativo. Este modelo es únicamente válido para muestras con valores de concentración y matriz similares a la de los MRC's y con el procedimiento analítico bajo control estadístico. La estimación de la incertidumbre de los resultados de los análisis suele llevarse a cabo en condiciones de precisión intermedia (*López-Moreno et al., 2010; Maroto et al., 1999a*).

A partir de los gráficos de control de calidad (*Eurolab, 2002*). Los laboratorios emplean necesariamente gráficos de control como herramienta de calidad para asegurar que los objetivos de los parámetros de calidad establecidos durante las validaciones se mantienen con el tiempo. Cuando se utilizan MRC's en las comprobaciones de control de calidad, la desviación estándar,  $s$ , estimada a partir de los gráficos puede ser empleada directamente para la evaluación de la incertidumbre. Si se emplea cualquier otro material estable o no se dispone de muestras de control estables, pero el control de calidad se realiza mediante determinaciones por duplicado o métodos similares, los datos obtenidos proporcionan una estimación de la precisión intermedia y la desviación estándar formaría parte de la incertidumbre combinada (*Bonet-Domingo et al., 2006; Bonet-Domingo et al., 2007*).

### Relación entre incertidumbre y magnitud medida

Habitualmente, durante la validación del método analítico se estima la incertidumbre de medida que posteriormente se transfiere a los resultados de los análisis de rutina (*Eppe et al., 2008; Gao et al., 1999; Jimenez-Chacon et al., 2009; UNE 82009-2, 1999*).

Cuando la incertidumbre estimada es independiente del nivel de concentración, por ejemplo en niveles bajos de concentración, o cuando está implicado un rango de trabajo relativamente estrecho, generalmente se indica un valor absoluto constante para la incertidumbre, que se asigna a las muestras de rutina con ese intervalo de concentración. Sin embargo, para métodos de análisis que se aplican a amplios intervalos de concentración de analito, cuya incertidumbre de medida varía de forma proporcional al nivel de analito, es más sensato indicar la incertidumbre relativa. En este segundo caso se recomienda representar gráficamente la incertidumbre de medida estimada durante la validación frente a la concentración de analito, de modo que la estimación de la incertidumbre de las muestras medidas posteriormente se realiza interpolando en esa relación. La guía Eurachem propone para relacionar ambas variables la siguiente expresión:

$$u_c = \sqrt{s_0^2 + (x \cdot s_1)^2} \quad ec. 2.73$$

donde  $s_0$  representa una contribución constante a la incertidumbre y  $s_1$  es una constante de proporcionalidad.

Esta expresión se basa en el método normal de la combinación de dos contribuciones a la incertidumbre general, suponiendo que  $s_0$  es una contribución constante y  $(x \cdot s_1)$  es proporcional al resultado. La Fig. 2.19 muestra gráficamente la forma de esta expresión. En ella se pueden distinguir tres tramos: (i) un primer tramo donde la incertidumbre apenas depende de la concentración siendo igual a  $s_0$ ; (ii) un segundo tramo donde ninguno de los coeficientes es el dominante y; (iii) un tercer tramo donde la incertidumbre depende por completo del nivel de concentración siendo igual a  $(x \cdot s_1)$ .

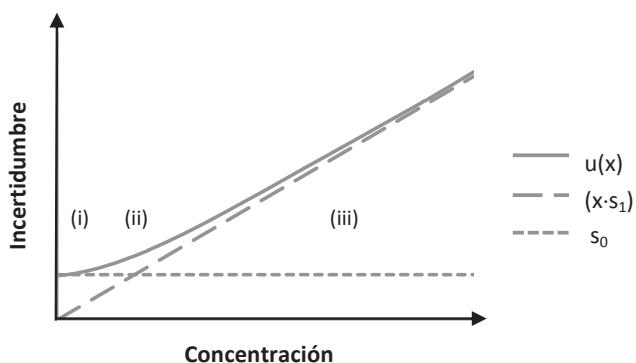


Fig. 2.19: Variación de la incertidumbre con el resultado observado (Eurachem/Citac, 2012)

Pero este enfoque es práctico sólo cuando es posible calcular un gran número de valores. En caso de disponer de un número limitado de pares de valores incertidumbre-concentración ( $n=4-6$ ) no será posible establecer la relación parabólica pertinente. En tales circunstancias, una aproximación adecuada se puede conseguir por regresión lineal simple de los valores incertidumbre-concentración. Este nuevo ajuste es una extrapolación de las funciones empleadas para relacionar precisión y concentración en los estudios de reproducibilidad y repetibilidad indicadas en la norma UNE 82009-2. Además, en la mayoría de los casos, la contribución mayoritaria es la debida a la imprecisión del método.

La Tabla 2.12 muestra las tres formas de expresar la relación entre la incertidumbre y la concentración indicadas en la norma UNE 82009-2.

Tabla 2.12: Tipos de relaciones incertidumbre vs magnitud medida

Tipo I: línea recta que pasa por el origen	$I = k_2 \cdot x$
Tipo II: línea recta con ordenada positiva en el origen	$I = k_1 + k_2 \cdot x$
Tipo III: relación exponencial	$\log I = \log k_3 + k_4 \cdot \log x = k_5 + k_4 \cdot \log x$ (equivalente a $I = k_3 \cdot x^{k_4}$ ) con $0 \leq k_4 \leq 1$

En estas expresiones  $k_1$ ,  $k_2$ ,  $k_3$ ,  $k_4$  y  $k_5$  son términos constantes

En la mayoría de los casos es esperable que al menos una de estas fórmulas proporcione un ajuste satisfactorio. Si no es así, se debe presentar una solución alternativa como dividir el intervalo en tramos de concentración en los cuales se consiga un ajuste a una de estas funciones.

Para  $k_1=0$  y  $k_4=1$  las tres relaciones son idénticas; cuando  $k_1$  es próximo a cero y/o  $k_4$  es próximo a la unidad, dos de ellas, o las tres, conducirán a ajustes prácticamente equivalentes y, en tal caso, se preferirá la relación Tipo I porque permite afirmar que la relación entre la incertidumbre y la concentración es constante (UNE 82009-2, 1999).

Para  $k_4>0$  las relaciones Tipo I y Tipo III conducen a  $I=0$  para  $x=0$  lo cual es inaceptable desde el punto de vista experimental. No obstante, a la hora de informar sobre la incertidumbre de una concentración, debe quedar bien claro que únicamente son aplicables dentro de los niveles de la magnitud medida cubiertos por el experimento, es decir, entre el límite de cuantificación y el límite superior del rango de ensayo (UNE 82009-2, 1999).

### 2.3.4. ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS DE LOS ENSAYOS

Una vez realizada la validación del método de análisis éste se debe de evaluar a lo largo del tiempo para comprobar que el método es estable y mantiene su validez con el tiempo. El control de la estabilidad del método analítico se realizará mediante el

análisis de muestras controladas internas y externas, también llamadas controles de calidad internos, *CCI*, y controles de calidad externos, *CCE* (*UNE-ENV ISO 13530, 2000*).

### **Controles de calidad internos, CCI**

Los controles de calidad internos consisten en el análisis periódico de muestras, adquiridas o preparadas por el propio laboratorio, que deben ser homogéneas y estables para que la variación detectada se deba al método y no a la composición de la muestra (*Funk et al., 2007; Simonet, 2005*). Pueden usarse diferentes tipos de materiales:

- ▲ Blancos: identifican cambios en los reactivos, desviaciones en los equipos... Se representa la señal del blanco (*Egea-González et al., 2004; Masson, 2007*).
- ▲ Disolución patrón: permite comprobar la validez del calibrado o determinar la frecuencia necesaria de calibración; deberá ser distinta a los patrones de calibración (*Masson, 2007; Stover et al., 1998*).
- ▲ Muestra dopadas: se controla el factor de recuperación y permite identificar errores sistemáticos proporcionales y los debidos a las interferencias de la matriz, por lo que es necesario tener un gráfico de control por matriz. Si se dopa un materiales de referencia se pueden detectar errores sistemáticos constantes.
- ▲ Muestras reales, hay que asegurar que se dispone de muestra homogénea para todo el periodo de estudio.
- ▲ Materiales de referencia, *MR*, y materiales de referencia certificados, *MRC*: la matriz analítica y el nivel de concentración deben ser similares a los de las muestras.
- ▲ Patrón de magnitud instrumental para comprobar el estado de calibración del equipo con el tiempo (*Venable et al., 1983*).

El método de análisis está bajo control si tanto la veracidad como la reproducibilidad están dentro de los intervalos permitidos. La forma de monitorizar estos dos parámetros es mediante el empleo gráficos de control, que representan la variación de los parámetros de calidad en función del tiempo.

De entre los numerosos gráficos de control disponibles los más frecuentemente usados son los gráficos de control de Shewhart (*Mitra, 1998; Montgomery, 2005*). Estas gráficas de control tienen varias líneas horizontales Fig. 2.20.

- ▲ Una línea central, *LC*: representa el valor medio de la características de calidad en un proceso bajo control
- ▲ Límite superior de control, *LCS*: valores por encima de este límite indican que el método de análisis esta fuera de control
- ▲ Límite inferior de control, *LCI*: valores por debajo de este límite indican que el método de análisis esta fuera de control
- ▲ Límites de aviso superior e inferior, *LAS* y *LAI*: cuando un valor se sitúa entre el límite de aviso y el de control, el proceso se considera que está bajo control, pero nos advierte que puede estar a punto de salir de control.

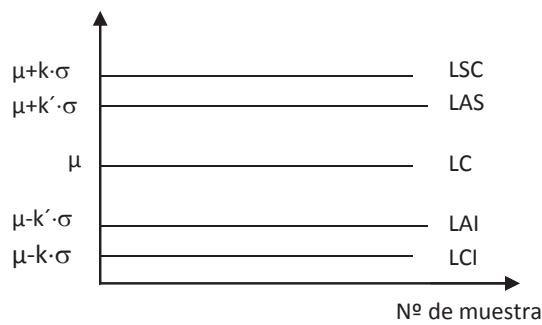


Fig. 2.20: Gráficos de control de Shewhart

Estas líneas se calculan a partir de datos tomados durante un periodo previo llamado de aprendizaje en el cual el método está bajo control, siendo  $\mu$  el valor esperado. Los gráficos de control más habituales son los llamados *3-sigma* donde  $k'$  suele ser 2 y  $k$  igual a 3. Como se desconoce el valor de  $\sigma$  este se sustituye por su estimación  $s$ . Este es un procedimiento sencillo de utilizar por los analistas, ya que las bases estadísticas sobre las que se soporta son fáciles de entender. Resultan útiles para detectar pequeños cambios en la media y desviación estándar del método analítico y para tener una visión histórica del comportamiento del método analítico en cuanto veracidad y precisión (Dincel et al., 2007; Ermer et al., 2005).

Los gráficos de control de medias y de valores individuales se emplean para el control de la veracidad aunque también aportan información sobre la precisión del método. Los gráficos de control de rangos, de desviaciones estándar y de rangos móviles se utilizan para controlar la precisión de los métodos analíticos. La Tabla 2.13 recoge las ecuaciones para estimar los límites de control para este tipo de gráficos (Committee E-11 on Quality and Statistics, 2002; UNE 82009-6, 1999; Huertas et al., 2007).

Tabla 2.13: Cálculo de las líneas de los gráficos de Shewhart

		LC	LCS	LCI
Gráficos de medias y rangos $(\bar{X}/R)$ ( $n > 1$ )	$\bar{X}$	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{X}} + A_2 \bar{R}$	$\bar{\bar{X}} - A_2 \bar{R}$
	R	$\bar{R}$	$D_4 \bar{R}$	$D_3 \bar{R}$
Gráfico de media-desviación estándar $(\bar{X}/s)$ ( $n > 1$ )	$\bar{X}$	$\bar{\bar{X}}$	$\bar{\bar{X}} + A_3 \bar{s}$	$\bar{\bar{X}} - A_3 \bar{s}$
	s	$\bar{s}$	$B_4 \bar{s}$	$B_3 \bar{s}$
Gráfico de valor individual-rango móvil $X/RM$ $n = 1$	X	$\bar{X}$	$\bar{X} + \frac{3}{d_2} RM$	$\bar{X} - \frac{3}{d_2} RM$
	RM	$\bar{RM}$	$D_4 \bar{RM}$	$D_3 \bar{RM}$

Los parámetros estadísticos  $A_2$   $D_4$   $D_3$ ... se pueden encontrar tabulados en función del tamaño muestral  $n$ .

Si el resultado obtenido para la muestra de control cae fuera de los límites de control del gráfico, o si los puntos representados muestran variaciones no aleatorias, se dice que el método analítico está fuera de control, esto es, que la característica a controlar ha cambiado debido a una causa de variación no aleatoria. Los parámetros de validación estimados para este método dejan de ser válidos y se debe corregir la causa de la variación o revalidar el método. Existe una amplia bibliografía en la que podemos encontrar las reglas para identificar si el resultado del análisis está fuera de control (*Mitra, 1998; Montgomery, 2005*).

Otros gráficos de control más sensibles que los gráficos Shewhart para detectar pequeños desplazamientos de la media son los de sumas acumuladas (CUSUM), medias móviles ponderadas exponenciales (EWMA)... (*Mitra, 1998; Montgomery, 2005*).

La frecuencia de análisis de las muestras de control, el tamaño muestral,  $n$ , y el tipo de grafico elegido deben ser cuidadosamente seleccionados dependiendo del error tipo  $\alpha$  y  $\beta$  que deseemos cometer y de la magnitud del sesgo que queramos ser capaces de detectar.

Las técnicas de análisis modernas hoy en día son capaces de realizar análisis multicomponente como por ejemplo pesticidas, disolventes, etc. La realización de gráficos de control de Shewhart por componente y su interpretación resulta muy complicada. En algunos casos pueden expresarse todas las magnitudes medidas como una concentración equivalente y ese valor se representa en un único gráfico de control. Pero en la práctica es preferible emplear gráficos de control multivariante como el grafico  $T^2$  de Hotelling o EWMA multivariado (*Bodecchi et al., 2005; Eppe et al., 2009; Marengo et al., 2004; Marengo et al., 2005*).

### **Controles de calidad externos**

Los controles de calidad externos se basan en la participación periódica en ensayos de aptitud. Un organizador envía a distintos laboratorios alícuotas de una misma muestra, homogénea y estable. La verdadera concentración de la muestra distribuida es conocida o se asigna posteriormente a partir de los resultados del ensayo. Cada laboratorio analiza el material con su método analítico y los resultados se comparan con el resto de participantes para evaluar al laboratorio y, en último término, mejorar sus aptitudes. Estos ensayos son recomendados en la norma UNE EN ISO/IEC 17025 y la entidad acreditadora los exige como requisito para la acreditación.

El laboratorio obtiene diversos beneficios de su participación en los ensayos de aptitud: (i) se obtiene una puntuación de su competencia relativa respecto del grupo de laboratorios participantes; (ii) si la puntuación es favorable, proporciona seguridad y confianza y refuerza el interés por las actividades de aseguramiento de la calidad; (iii) si, por el contrario, es desfavorable, permite promover acciones correctoras; (iv)

permite detectar y cuantificar el error o sesgo del laboratorio, que puede pasar inadvertido en la validación interna... (G-ENAC-14, 2008).

Para la evaluación de la eficacia de los participantes se emplean distintos métodos:

- ▲ Método de la incertidumbre: el valor verdadero acordado por los organizadores debe estar incluido dentro de la incertidumbre asignada al método validado por el laboratorio.
- ▲ Método de rangos: aplicable cuando los laboratorios participantes analizan varias muestras. Los resultados de cada muestra se ordenan de forma decreciente de forma que al valor más grande se le asigna el rango 1, al siguiente el 2, y así sucesivamente; si hay empates se resuelven por medio de la media. La puntuación de cada laboratorio se obtiene sumando los rangos obtenidos con las muestras analizadas. Puntuaciones extremas (muy grandes o muy pequeñas) son indicación de errores sistemáticos o sesgos. Las puntuaciones se comparan con valores críticos tabulados (*Massart et al., 1997; Wernimont, 1993*).
- ▲ Método de puntuación Z-score: se estandarizan los resultados experimentales de todos los participantes,  $x_i$ , restando el valor medio asignado,  $\mu$ , y dividiendo entre la desviación estándar asignada,  $\sigma$ . Si el valor  $|Z|$  obtenido por un laboratorio es inferior a 2 se considera que el resultado de ese laboratorio es satisfactorio. Si el valor  $|Z|$  está comprendido entre 2 y 3 se califica de cuestionable. Por el contrario, si el valor  $|Z|$  es superior a 3 el resultado es insatisfactorio dado que difiere mucho de la media (*ISO 13528, 2005; UNE-EN ISO/IEC 17043, 2010*).
- Es habitual construir gráficos de control para estos valores  $Z$ , cuya línea central es cero, los límites de aviso se sitúan en  $Z = \pm 2$ , y los límites de control  $Z = \pm 3$  (*Al-Masri et al., 2004; Al-Masri et al., 2005*).
- ▲ Método de puntuación Z-score II: cuando un laboratorio dispone de resultados obtenidos en diversos ensayos interlaboratorio, puede emplear una puntuación compuesta que considere todas las muestras analizadas. La Tabla 2.14 resume las distintas puntuaciones que se han propuesto (*Agbenin et al., 2011; Medina Pastor et al., 2011; Simonet, 2005*).

Tabla 2.14: Interpretación de Z-score II

$SZ = \sum Z$	Es sensible a las desviaciones sistemáticas
$SRZ = \frac{\sum Z}{\sqrt{m}}$	Similar al anterior pero normalizado respecto al número de materiales analizados, $m$ ; se interpreta según la escala de $Z$
$SSZ = \sum Z^2$	Sigue una distribución $\chi^2$ con $m$ grados de libertad, siendo $m$ el número de puntuaciones o scores que se combinan en $SSZ$ . Su interpretación requiere el uso de valores críticos tabulados A y B en función de $m$ ( <i>AMC, 1992</i> ) $SSZ \leq A$ resultado aceptable $A < SSZ < B$ resultado discutible $SSZ \geq B$ resultado insatisfactorio
$SAZ = \sum  Z $	Es sensible a comportamientos erráticos

▲ Método de Youden: Existe otro tipo de estudio de aptitud en el cual cada laboratorio analiza una pareja de muestras de similar concentración, o pares de Youden. Para el tratamiento de datos se utiliza como herramienta de diagnóstico el esquema del gráfico de Youden (*Youden et al., 1987*), el cual permite evaluar los errores sistemáticos y aleatorios de cada uno de los laboratorios.

En los estudios de aptitud con pares de muestras se valora el resultado frente a un valor asignado, que se puede obtener por dos estrategias: (i) a partir de los valores propios del estudio (media o mediana de todos los resultados) o (ii) utilizando valores previamente establecidos (*Koch et al., 2011*).

Los gráficos de Youden se construyen en torno a un punto central,  $O$ , que es el punto de corte de los valores asignados a las dos muestras; se traza un círculo límite centrado en  $O$  cuyo radio es la desviación estándar combinada multiplicada por un factor de confianza. La línea de  $45^\circ$  que pasa por el origen sirve como referencia para la medida del error sistemático y aleatorio. El punto  $R$  viene definido por el par de resultados obtenidos por un laboratorio, de este modo la línea  $OR$  indica el error total,  $\varepsilon_{Total}$ , asignado a ese laboratorio que se puede desglosar en la línea  $OP$  o error sistemático,  $\varepsilon_S$ , y la línea  $PR$  o error aleatorio,  $\varepsilon_A$ .

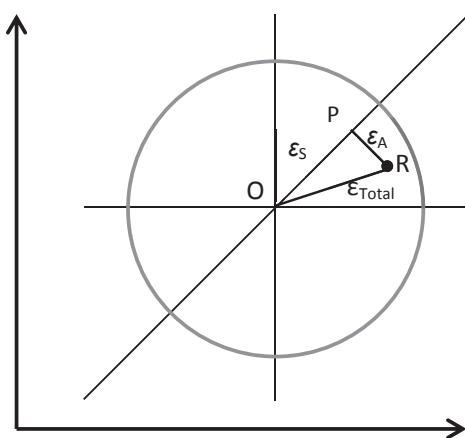


Fig. 2.21: Descripción de un gráfico de Youden

La interpretación cualitativa de los gráficos es la siguiente: los puntos que se encuentran dentro del círculo, distribuidos alrededor del valor medio y situados en los cuatro cuadrantes del gráfico son los que están dentro del rango de errores aleatorios asignados o característicos del ejercicio. Si solo hubiera errores sistemáticos los laboratorios estarían próximos a la recta de  $45^\circ$  pues cometieran el mismo error en las dos muestras. Los puntos localizados lejos de la línea de  $45^\circ$  indican un error aleatorio grande; sin embargo un punto que se encuentre fuera del círculo indica un error total grande (*de la Mata Espinosa et al., 2007; Wernimont, 1993*).

En la práctica, suele representarse en el gráfico de Youden la pareja Z-scores obtenida por cada laboratorio (*ISO 13528, 2005; Schilling et al., 2006; Svegl et al., 2006*).

- ▲ Otros métodos para evaluar los resultados de los ensayos de aptitud son los estadísticos  $h$  y  $k$  de Mandel, descritos en el *Apartado 2.3.2.* (*Svegl et al., 2006; UNE 82009-2, 1999*), y los gráficos box-plot (*Massart et al, 1997; Steinhoff et al., 1999*).

## 2.4. VALIDACIONES DE EQUIPOS DE MEDIDA Y ENSAYO

La generación de datos analíticos fiables y consistentes implica cuatro actividades de calidad a realizar en el laboratorio. En la Fig. 2.22 se muestran estas cuatro acciones como capas dentro de una pirámide de calidad, situándose la calibración de los instrumentos de medida en la base, y el resto de las actividades para la generación de datos de calidad en estratos superiores: validación del método analítico, verificación de los instrumentos de medida (descrito en el *Apartado 2.4.2.*) y, por último, controles de calidad de los resultados (*Apartado 2.3.4.*).



Fig. 2.22: Estructura jerarquizada de las actividades de la calidad de un laboratorio

Una vez seleccionados y descritos los métodos de ensayo en los Procedimientos Normalizados de Trabajo, *PNTs*, el primer paso es validar los equipos de medida y ensayo implicados en el desarrollo de los métodos analíticos. Esta validación consiste en la confirmación metrológica de los equipos que asegure su calibración, verificación, mantenimiento y revisión periódicas (*UNE-EN ISO 10012, 2003; UNE EN ISO/IEC 17025, 2005*) y así asegurar que cumplen en todo momento las características técnicas requeridas por el método de ensayo.

Es habitual que los laboratorios clasifiquen sus equipos de medida y ensayo para así determinar la documentación y la tipología y profundidad de las pruebas de validación que hay que aplicar a cada uno de ellos. Esta clasificación pueden realizarse en función de su importancia, que a su vez determina la frecuencia de chequeo (*Eurachem/Citac, 2002*), dependiendo de la criticidad o riesgo asociado al equipo, lo que suele estar en relación directa con la complejidad del mismo, o de acuerdo a su funcionalidad (*USP*

1058, 2009). Desde el punto de vista funcional, los equipos de los laboratorios químicos se pueden clasificar en (*Eurachem/Citac, 2002*):

- ▲ Instrumentos de medida como espectrofotómetros, cromatógrafos, balanzas, medidores electroquímicos... Además del uso correcto, mantenimiento, limpieza y calibrado periódico, es necesaria la verificación periódica de sus características técnicas como respuesta, estabilidad o linealidad.
- ▲ Equipos auxiliares, los cuales no se utilizan para mediciones directas y cuya influencia es mínima. Dentro de este grupo cabe incluir equipos calefactores, agitadores... Únicamente requieren ser mantenidos y verificados, pero se suelen calibrar si sus características técnicas afectan de forma significativa al resultado del ensayo.
- ▲ Material fungible, con especial énfasis en el material volumétrico (matraces aforados, buretas, pipetas...). Se verifican las especificaciones de calidad a su recepción, desechariendo el que no las cumpla. Se requiere un mantenimiento adecuado ya que los errores asociados al uso de estos materiales suelen ser debidos a suciedad o contaminación, por tanto en muchos métodos de análisis se incluyen protocolos específicos para la limpieza de este material. Dependiendo del uso, algunos de estos equipos pueden requerir verificaciones más frecuentes (*UNE 400301/1M, 1999; UNE-EN ISO 4787, 2010*).
- ▲ Patrones físicos que se corresponden con unidades básicas del Sistema Internacional. Son imprescindibles para la calibración y verificación de los equipos. Suelen ser masas patrón, termómetros patrón, filtros de absorbancia... Se denominan patrones primarios cuando están calibrados por organismos acreditados externos, y patrones secundarios cuando el propio laboratorio los calibra a partir de los primarios (*UNE 82133/IN, 2004*).

También puede incluirse dentro del equipamiento del laboratorio los ordenadores y el software empleado para captar, procesar y gestionar los datos recibidos de los instrumentos. El sistema informático de los laboratorios debe cumplir igualmente los requisitos de calidad y seguridad que permitan su correcto funcionamiento de forma ininterrumpida y aseguren la confidencialidad e inalterabilidad necesarias de los datos contenidos en sus archivos.

Una vez clasificados los equipos de medida y ensayo e incluidos en el sistema de gestión de la calidad, los laboratorios redactarán los procedimientos normalizados de equipo, PNE's, que asegurarán su calibración, verificación y mantenimiento necesarios.

#### **2.4.1. CALIBRACIÓN DE EQUIPOS DE MEDIDA**

El objetivo de la calibración es evaluar la capacidad de medida de los instrumentos con objeto de asegurar la trazabilidad de las medidas, es decir, garantizar la comparabilidad de los resultados con los obtenidos por otros laboratorios y que las respuestas se mantengan con el paso del tiempo (*Riu et al., 2001b*). Se considera que la calibración es un paso previo a la validación pues un calibrado incorrecto de los equipos del laboratorio normalmente da lugar a errores sistemáticos, los cuales son difíciles de detectar y corregir. Los equipos de medida empleados en el desarrollo de

los métodos de ensayo y que realizan medidas directas deben calibrarse antes de su puesta en servicio y posteriormente de forma periódica de acuerdo a su uso (*ILAC G24, 2007; UNE EN ISO/IEC 17025, 2010; UNE EN ISO 10012, 2003*).

Se pueden distinguir dos contextos distintos a la hora de calibrar un equipo de medida (*Cuadros Rodríguez et al., 2001a*). Por un lado, cuando el equipo de medida proporciona valores absolutos del parámetro medido (temperatura, masa, longitud de onda...) y la magnitud medida por el equipo se expresa en las mismas unidades dadas por el patrón. Este tipo de calibración suele denominarse calibración directa y es el objeto de este apartado. Sin embargo, la mayoría de instrumentos analíticos no se calibran de esta manera sino que el equipo mide una magnitud que se relaciona con alguna propiedad del patrón. Es conocida también como calibración analítica o instrumental. Se refiere al establecimiento de la función que relaciona la señal instrumental con la magnitud medida (normalmente concentración de analito en la muestra) y se ha descrito ampliamente en el *Apartado 2.3.2.* (*Bedson et al., 1996*).

Se pueden emplear diferentes métodos de calibración directa (*Riu et al., 2001b; Riu et al., 2002; Trujillo Juárez et al., 2007*): (i) comparación directa con un patrón (ej. espectrofotómetro con filtros patrón de absorbancia); (ii) método de punto cero (ej. balanza de brazos); (iii) método de sustitución (ej. juego de pesas); (iv) método de reproducción de la definición de la magnitud, (ej. la calibración de material volumétrico); (v) método de reproducción del sistema de medida.

El objetivo de la calibración directa es demostrar la coincidencia entre el valor de la magnitud en el patrón y la magnitud medida por el instrumento. Por tanto, se debe disponer de patrones con elevado nivel metrológico (es decir, reducida incertidumbre y elevada trazabilidad) que sirvan de referencia (*UNE EN ISO 10012, 2003*). Siempre deben llevar un informe adjunto, emitido por un laboratorio de calibración acreditado, que asegure su trazabilidad a patrones nacionales o internacionales reconocidos y contenga la información sobre las medidas realizadas, los valores nominales que se han calibrado, sus valores reales, sus correcciones y la incertidumbre asociadas a los mismos.

La calibración de un equipo debe hacerse en las mismas condiciones ambientales en que trabaja habitualmente, y se debe abarcar todo su rango de medida a intervalos discretos (*ILAC G24, 2007*). Esto implica que deberemos disponer de patrones para cada uno de estos intervalos.

La discrepancia entre el valor medido por el equipo y el valor real de la magnitud en el patrón se debe a desviaciones sistemáticas y a la variabilidad intrínseca del proceso de medida. Las desviaciones sistemáticas tienen gran influencia sobre la veracidad de la medida y se evalúan mediante la corrección o sesgo. Esta se puede expresar en forma absoluta o relativa. En el primer caso se trata de una corrección constante en todo el intervalo de valores de la magnitud a medir, mientras que en el segundo caso es una corrección proporcional. En cualquier caso, es imprescindible que el intervalo de aplicación de la corrección quede perfectamente definido (*Eurachem/Citac, 2012*). La

contribución debida a la variabilidad se estima mediante la incertidumbre, tomando como referencia la *GUM (JCGM 100, 2008)*, que establece los principios y requisitos para la evaluación de la incertidumbre de medida, como ya se describió en el *Apartado 2.3.3. (EA-4/02, 1999; JCGM 100, 2008)*:

Previamente a la calibración “in-house” de los equipos de medida, implicados en las validaciones de los métodos de análisis, se deben realizar una serie de operaciones relacionadas con el acondicionamiento del equipo y patrones: estabilización (limpieza, nivelación, aclimatación), ajuste interno del equipo... Además, se debe especificar el rango de calibración del instrumento de medida, los puntos de calibración (al menos cinco) y los patrones a emplear.

Se realizan varias lecturas de cada punto de calibración y se calcula la corrección del equipo,  $cor_i$  en cada punto de calibración  $i$ , como diferencia entre el valor medio de las lecturas dadas por el instrumento,  $V_{\text{medio}}$  y el valor real del patrón,  $V_{\text{real}}$ .

$$cor_i = V_{\text{medio}} - V_{\text{real}} \quad \text{ec. 2.74}$$

siendo el valor real del patrón,  $V_{\text{real}}$ , el valor nominal,  $V_{\text{nominal}}$ , más su corrección  $cor_{\text{pat}}$  indicada en su certificado de calibración.

$$V_{\text{real}} = V_{\text{nominal}} + cor_{\text{pat}} \quad \text{ec. 2.75}$$

El siguiente paso es estimar la incertidumbre de la medida identificando las fuentes que contribuyen a la incertidumbre total, y evaluándolas como incertidumbres típicas,  $u_x$ . En la Fig. 2.23 se pueden observar las fuentes de incertidumbre más comunes.

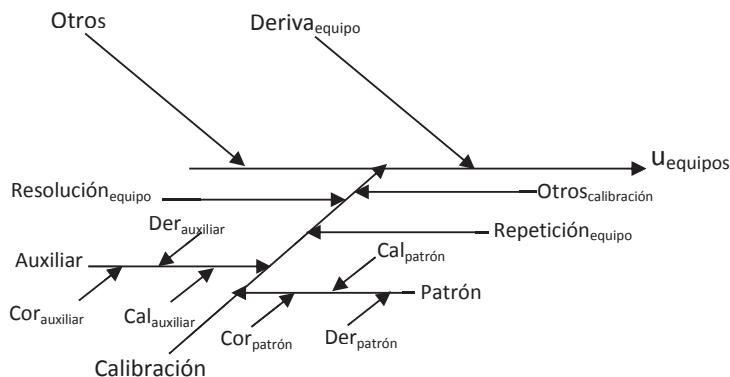


Fig. 2.23: Contribuciones habituales a la incertidumbre de un equipo de medida

En la Tabla 2.15 se describe cada una de las contribuciones y la fórmula para su estimación.

Tabla 2.15: Cuantificación de las fuentes que contribuyen a la incertidumbres de un equipo de medida en cada punto de calibración  $i$  (EA-4/02, 1999)

	Fuente de incertidumbre	Estimación
Deriva del equipo		
Causada por el paso del tiempo, el uso, envejecimiento, deterioro, limpieza inadecuada, reacciones químicas... que provocan un aumento de la variabilidad de las medidas con el tiempo. Esta incertidumbre típica se evalúa como la diferencia máxima entre incertidumbres de calibraciones anteriores de ese equipo.	$U_{der} = \frac{dmc}{2 \cdot \sqrt{3}}$ $dmc = (u_{equipo})_{max} - (u_{equipo})_{min}$	
Calibración		
Debida a la propia variabilidad de las medidas dadas por el equipo en un momento dado. Se obtiene en cada punto de calibración como combinación de las siguientes contribuciones:	$U_{cal} = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{res}^2 + u_{pat}^2 + u_{aux}^2}$	
Repetibilidad	Tiene gran influencia sobre la precisión de las medidas realizadas. Se evalúa a partir de la desviación típica de $N$ medidas repetidas del patrón.	$U_{rep} = \frac{s}{\sqrt{N}}$
Resolución del equipo	Se obtiene a partir de las especificaciones técnicas del equipo ( <i>resolución</i> ).	$U_{res} = \frac{resolución}{2 \cdot \sqrt{3}}$
Variabilidad patrón	<p>Cuando la calibración es mediante el método de reproducción de la definición de la magnitud del patrón (ej. material volumétrico), la incertidumbre típica debida al patrón se obtiene de la función que relaciona la magnitud medida con las variables de que depende.</p> <p>Cuando la calibración se realiza mediante el método de sustitución, el patrón es otro equipo previamente calibrado con un patrón.</p> <p>Cuando la calibración es directa con un patrón, la variabilidad del patrón se obtiene a partir de la combinación de las siguientes contribuciones.</p> <p>Calibración del patrón</p> <p>Se estima dividiendo la incertidumbre del patrón, <math>I_{patrón}</math>, por el coeficiente de cobertura <math>K</math> ambos indicados en el certificado de calibración.</p> <p>Deriva del patrón</p> <p>Se evalúa a través de la máxima diferencia entre la incertidumbre de los certificados de calibración del patrón.</p> <p>Corrección del patrón</p> <p>Debida a la diferencia entre el valor certificado y valor nominal del patrón.</p>	$U_{pat} = \sqrt{\sum_i \left( \frac{\partial f}{\partial x_i} \right)^2 \cdot u_{x_i}^2 + \sum u_x^2}$ $U_{cal-pat} = \frac{I_{patrón}}{K}$ $U_{der-pat} = \frac{dmc_{pat}}{2 \cdot \sqrt{3}}$ $dmc_{pat} = (u_{pat})_{max} - (u_{pat})_{min}$ $U_{cor-pat} = \frac{cor_{pat}}{\sqrt{3}}$

Tabla 2.15 (cont.): Quantificación de las fuentes que contribuyen a la incertidumbres de un equipo de medida en cada punto de calibración  $i$  (EA-4/02, 1999)

	Fuente de incertidumbre	Estimación
	Debida a la dependencia de la medida realizada por el equipo de las medidas proporcionadas por un equipo auxiliar, $u_{aux}$ . Por ejemplo, las medidas realizadas con pH-metros, conductivímetros, material volumétrico, dependen de la temperatura y por tanto de la sondas de temperatura. Se evalúa combinando las siguientes contribuciones:	$u_{aux} = \sqrt{u_{der-aux}^2 + u_{cal-aux}^2 + u_{cor-aux}^2}$
Deriva del equipo auxiliar	Se evalúa a través de la máxima diferencia entre la incertidumbre de los certificados de calibración del patrón	$dmC_{aux} = \frac{dmC_{aux}}{2 \cdot \sqrt{3}}$
Calibración del equipo auxiliar	Debida a la calibración del equipo auxiliar, $u_{cal-aux}$	$u_{cal-aux} = \frac{l_{aux}}{K_{certificado}}$
Corrección del equipo auxiliar	Debida a la corrección de las medidas del equipo auxiliar, $u_{cor-aux}$ .	$u_{cor-aux} = \frac{co_{aux}}{\sqrt{3}}$
	Otra forma de estimar esta contribución consiste en aplicar la ecuación de propagación del error aleatorio a la función que relaciona la magnitud a calibrar, $y$ , con la medida del equipo auxiliar, $x$ . (Cowles et al., 2001).	$u_{aux} = \frac{\partial y}{\partial x} \cdot u(x)$
	También se puede estimar a partir de la diferencia entre los valores de la magnitud a calibrar, $y$ , correspondientes a los valores máximo y mínimo de la incertidumbre de la variable del equipo auxiliar, $x$ .	$u_{aux} = \frac{y_{x-\max} - y_{x-\min}}{2 \cdot \sqrt{3}}$
	Otras	$y_{x-\max} = f(x_{aux-\max}) \quad y_{x-\min} = f(x_{aux-\min})$ $u_{otros}$
	En algunos casos la medida depende de otros factores no incluidos en las contribuciones anteriores. Por ejemplo, la medida de absorbancia en un espectrofotómetro depende de la variabilidad en la anchura de la ceida de medida. Se estima a partir de la información suministrada por el fabricante, datos bibliográficos...	

Finalmente, la incertidumbre típica del equipo en cada punto de calibración,  $i$ , se estima como combinación de las contribuciones descritas en la tabla anterior.

$$u_{\text{equipo-}i} = \sqrt{u_{\text{der}}^2 + u_{\text{rep}}^2 + u_{\text{res}}^2 + u_{\text{pat}}^2 + u_{\text{aux}}^2 + u_{\text{others}}^2} \quad \text{ec. 2.76}$$

Si el rango de calibración es estrecho y se desea asignar un único valor a la incertidumbre del equipo se tomará el valor más alto de todos los puntos de calibración.

$$l_{\text{equipo}} = K \cdot \max(u_{\text{equipo-}i}) \quad \text{ec. 2.77}$$

Pero si el rango de medida es muy amplio, como es el caso de termómetros, conductivímetros... la incertidumbre del equipo será normalmente función de la magnitud medida (*Vaughn et al., 2003*).

$$l_{\text{equipo}} = K \cdot f(u_{\text{equipo-}i}) \quad \text{ec. 2.78}$$

En algunos casos hay incertidumbres típicas que se pueden excluir si se demuestra que su contribución a la incertidumbre total es despreciable frente al resto de contribuciones.

Una vez calculadas las correcciones del equipo en cada punto de calibración y estimada la incertidumbre total, la suma de ambos términos se compara con la tolerancia asignada al equipo,  $Tol$ , que representa el máximo error permitido. El criterio para fijar el valor de esta tolerancia suele estar indicado en el método de análisis; por ejemplo, la temperatura de una cabina de incubación para el análisis de la demanda biológica de oxígeno,  $BDO$ , debe ser  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  (*UNE-EN 1899-1, 1998*). Además, el valor de la tolerancia debe estar entre tres y diez veces el intervalo de la incertidumbre. Esta proporción, denominada *TUR*, *Tolerance Uncertainty Ratio*, se fija al comienzo de la vida útil del equipo (*ANSI/NCSL, 2006; Bennett, 2005; Macii et al., 2003; Maroto et al., 2001b*):

$$3 \leq \frac{Tol}{l_{\text{equipo}}} = TUR \leq 10 \quad \text{ec. 2.79}$$

- ▲ Si la relación tolerancia-incertidumbre es mayor que el *TUR* inicial y la corrección en cada punto más la incertidumbre es menor que la tolerancia asociada al equipo, este se considera apto para el uso que se pretende (situación d, Fig. 2.24).
- ▲ Si la relación tolerancia-incertidumbre es mayor que el *TUR* inicial pero la corrección más la incertidumbre es mayor que la tolerancia, el equipo puede ser utilizado, (situaciones a, b y c, Fig. 2.24). Si el equipo no tiene posibilidad de ajustar las medidas se le asocia una tabla con los valores leídos por el equipo y los

valores reales corregidos. En caso contrario se ajusta el equipo y se inicia de nuevo el proceso de calibración.

- ▲ Si la relación tolerancia-incertidumbre es menor que el *TUR* inicial, se considera que el equipo es no apto para el uso que se pretende, (situaciones e, f, g y h, Fig. 2.24). Sin embargo, puede ser empleado para otras metodologías menos restrictivas fijando un *TUR* inicial mayor; siguiendo con el ejemplo de la incubadora esta podría emplearse en ensayos que precisen tolerancias más amplias como los microbiológicos,  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  (*UNE EN ISO 9308-1; 2001*). En caso de enviar a reparar se iniciaría de nuevo el proceso de calibración.

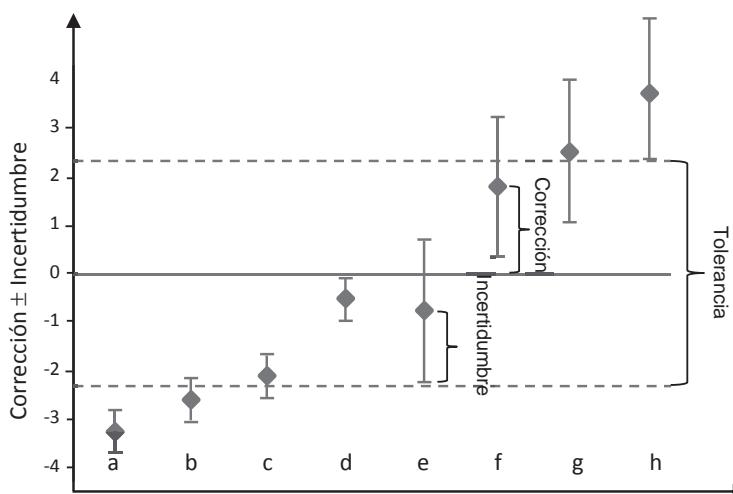


Fig. 2.24: Situaciones para declarar APTO o No APTO un equipo de medida para un *TUR* inicial = 4 (*Bell, 2001; La Guía Metas, 2003*)

Si el equipo demuestra ser apto en parte del rango de calibración podrá ser utilizado, pero solo en ese intervalo (*Riu et al., 2001b*).

La Fig. 2.25 tal resume el proceso de calibración de un equipo.

También se suele comprobar que la veracidad y la reproducibilidad sean menores que los valores nominales indicados en las especificaciones del equipo, fijados de acuerdo a la normativa o por la experiencia. La falta de veracidad se puede corregir en aquellos equipos con posibilidad de ajuste mientras que la falta de reproducibilidad normalmente no se puede corregir, siendo necesaria la intervención del servicio técnico.

La frecuencia de calibración depende de la naturaleza del equipo, su robustez, la frecuencia de uso, su entorno, si ha sufrido sobrecarga... (*ILAC G24, 2007*).

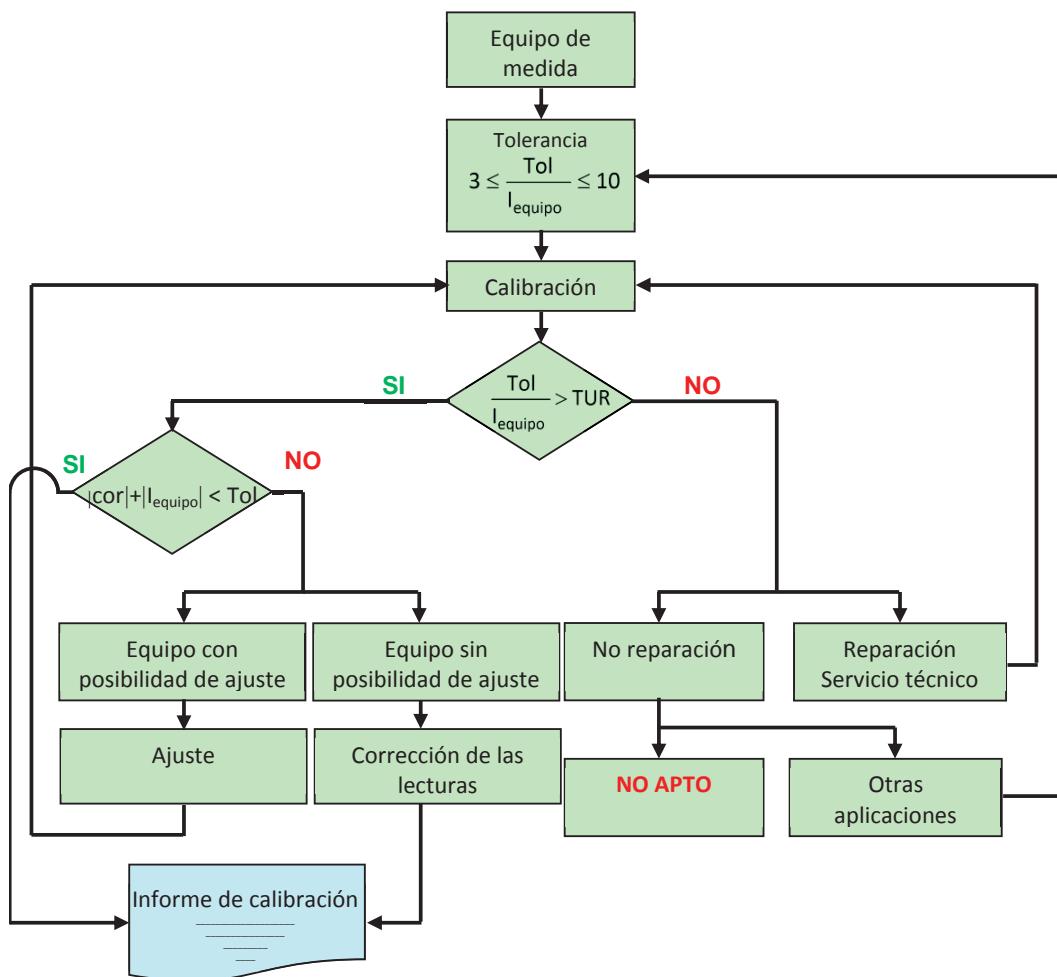


Fig. 2.25: Diagrama del proceso de calibración (MAGRAMA, 2008; UNE EN ISO 10012, 2003)

## 2.4.2. VERIFICACIÓN DE EQUIPOS DE MEDIDA Y ENSAYO

El objetivo de la verificación es comprobar si el equipo cumple con unas determinadas especificaciones, es decir, proporcionar un criterio que evalúe si las desviaciones de los equipos de medida y ensayo son menores que el error máximo admisible establecido por el laboratorio o por el fabricante del equipo.

El usuario del equipo o el servicio técnico serán los encargados de la verificación de todos aquellos equipos de medida directa e indirecta, los auxiliares cuyas características técnicas afecten de forma significativa al resultado del ensayo, el material volumétrico y los patrones primarios, siendo la verificación más rigurosa para los equipos de medida y menos rigurosa para los equipos auxiliares.

Debido a la gran variedad de equipos de medida y ensayo presentes en los laboratorios en cuanto a su funcionamiento (equipos de medida, auxiliares, patrones...), calibración (directa o indirecta), diseño (bloque, modular o sistema de medida)... hay diferentes metodologías aplicables a la verificación de equipos.

Cuando se trata de verificar un equipo de medida directa previamente calibrado, el objetivo de la verificación es comprobar que el equipo sigue estando conforme entre calibraciones. Se eligen dentro del rango de medida del equipo el/los puntos donde se quiere verificar el equipo. Una vez elegidos, se mide el correspondiente patrón varias veces y se calcula en cada punto una nueva corrección del equipo,  $cor_{ver}$ , como diferencia entre el valor medio de las lecturas dadas por el equipo durante la verificación,  $V_{medio}$  y el valor real del patrón,  $V_{real}$ .

$$cor_{ver} = V_{medio} - V_{real} \quad ec. 2.80$$

siendo el valor real del patrón,  $V_{real}$ , su valor nominal,  $V_{nominal}$ , más la corrección  $cor_{pat}$  indicada en su certificado de calibración, ec. 2.75.

Una vez calculadas las correcciones del equipo, si sumada a la incertidumbre calculada durante la calibración es menor que la tolerancia, el equipo sigue siendo apto. Por el contrario, si es mayor, el equipo se considera no apto y se debe calibrar de nuevo.

Cuando no hay una calibración previa, por ejemplo, en el caso de características técnicas de equipos de medida directa no calibradas, equipos de medida indirecta o equipos auxiliares, se comprueba que las especificaciones estimadas son menores que las nominales (indicadas por el fabricante) o que la corrección de la magnitud medida, % cor, es menor una corrección nominal, %  $cor_{nominal}$ , fijada normalmente de acuerdo a la experiencia.

Cuando un equipo está formado por distintos componentes o módulos, la verificación se puede realizar comprobando las condiciones anteriores de forma independiente a cada componente por separado. Este tipo de verificación llamada modular sería el caso de un cromatógrafo en el que se verifican por separado las especificaciones de bombas, horno, inyector, detector... (Báguena et al., 2006).

La verificación de equipos de medida indirecta consiste en realizar un test de idoneidad, también llamado *System Suitability Test*. Consiste en tratar al equipo a verificar como una “caja negra” y realizar el análisis de un analito, que no tiene porqué formar parte del alcance método, cuyos resultados deben cumplir una serie de requisitos preestablecidos. Estos test suelen estar incluidos en los procedimientos de análisis de modo que se intercala el análisis de la muestra conocida en cada lote de muestras al inicio, cada cierto número de medidas y al final del lote de muestras. De esta forma se garantiza el buen funcionamiento del equipo (Kaminski et al., 2010; Kulikov et al., 2005; Mutton et al., 2011).

#### 2.4.3. MANTENIMIENTO DE EQUIPOS DE MEDIDA Y ENSAYO

El mantenimiento de los equipos de medida y ensayo incluye instrumentos de medida, equipos auxiliares, material fungible, ordenadores y patrones.

Deberemos distinguir dos tipos de mantenimiento a realizar: por un lado el mantenimiento preventivo, consistente en realizar aquellas operaciones de mantenimiento periódico y programado encaminadas a prevenir fallos, deterioro, averías o mal funcionamiento de los equipos, por ejemplo, limpiezas periódicas, comprobación de baterías...; y por otro lado el mantenimiento correctivo encaminado a corregir los fallos, deterioro, averías o mal funcionamiento de los equipos (*CGA-ENAC-LEC, 2009; CI-ENAC-BLP, 2008*).

Tanto el mantenimiento preventivo de los equipos como el correctivo se podrán realizar mediante subcontratación o bien será realizado por el usuario del equipo.

## **2.5. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES**

La preparación de disoluciones es una etapa fundamental del método analítico que contribuye de forma importante a la incertidumbre total del resultado (*Nogueira et al., 2003; Sarembaud et al., 2007*). Los equipos de medida y ensayo empleados en la preparación de disoluciones deben tener unos requerimientos técnicos mínimos acordes con la exactitud deseada en la preparación de las disoluciones; de la misma manera, los reactivos empleados como patrones químicos, *PQ*, o para la preparación de materiales de control deben tener una pureza elevada y la composición de sus impurezas debe ser conocida.

La preparación trazable de disoluciones exige registrar el/los soluto/s y disolvente/s empleado/s junto con su pureza, cantidad empleada, número de lote y fechas de preparación y caducidad; también se deberá anotar el equipo con el que se ha medido, junto con su incertidumbre, para poder estimar la incertidumbre de la concentración de la disolución preparada (*Prichard et al., 2007*).

La incertidumbre de la concentración de una disolución se estima aplicando el modelo “bottom-up” (*Eurachem/Citac, 2012*). Las contribuciones más comunes a la incertidumbre total de la concentración de una disolución y las expresiones empleadas para cuantificarlas se resumen en la Tabla 2.16.

La Tabla 2.17 resume las formas más habituales de expresar la concentración de una disolución preparada por disolución directa de un soluto y las expresiones para estimar su incertidumbre.

Tabla 2.16: Cuantificación de las fuentes que contribuyen a la incertidumbre final de la concentración de una disolución (Eurachem/Citac, 2012)

Fuente de incertidumbre	Estimación
Pureza del soluto	$u(r_{q-s}) = \frac{(1 - r_{q-s})}{\sqrt{3}}$
Se estima a partir de la pureza del reactivo indicada en su certificado de análisis, expresado en tanto por uno, $r_{q-s}$ . En el caso más frecuente de que solo se disponga de la pureza mínima se asume una distribución rectangular. Para otros casos ver Apartado 2.3.3.	
Masa del soluto o disolución	$u(M_s) = u(M_{ds}) = u_{bal}$
Debida a la masa del soluto, $M_s$ , y/o a la masa de la disolución, $M_{ds}$ . Se estiman a partir de la incertidumbre de calibración de la balanza empleada para la medida de la masa, $u_{bal}$ .	
Volumen de soluto o disolución	$u(V_s) = u(V_{ds}) = \sqrt{u_{cal-v}^2 + u_{rep-v}^2 + u_f^2}$
Debida al volumen del soluto, $V_s$ , y/o al volumen de disolución, $V_{ds}$ . La incertidumbre asociada a este volumen está formada por tres contribuciones:	
Calibración del material volumétrico	Se puede estimar de dos formas: a partir de la incertidumbre indicada en el certificado de calibración del material volumétrico, $l_{vol}$ o de forma aproximada a partir de sus especificaciones que indican la tolerancia del material a 20 °C.
Repetibilidad del ensayo	Está originada por la variación en el llenado y enrase del material volumétrico. Se estima a partir de la desviación típica de $n$ medidas ( $n \geq 10$ ) del volumen contenido.
Efecto de la Temperatura	Se estima a partir de la variación del volumen, $\Delta V$ , calculado a partir de las especificaciones del material que indican su volumen nominal $V_N$ a la temperatura a la que fue calibrado, la variación de la temperatura del laboratorio y el coeficiente de expansión del disolvente (agua $2.1 \cdot 10^{-4} \text{ }^\circ\text{C}^{-1}$ ).
Masa molecular	$u_{m-at} = \frac{l_{m-at}}{\sqrt{3}}$
	$u(Pm) = u(Pm_{parcial}) = \sqrt{\left(a \cdot \frac{u_{m-at} A}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(b \cdot \frac{u_{m-at} B}{\sqrt{3}}\right)^2 + \left(c \cdot \frac{u_{m-at} C}{\sqrt{3}}\right)^2}$
	La incertidumbre debida a la masa molecular, $Pm$ , de un compuesto $A_aB_bC_c$ se obtiene mediante la combinación de las incertidumbres de los masas atómicas, $l_{m-at}$ , de sus elementos constituyentes (de Laeter et al., 2003; Coplen, 2001). Cuando solo interesa la concentración respecto a una parte del compuesto se utiliza la masa molecular parcial del soluto, $Pm_{parcial}$ por ejemplo la concentración de un anión a partir de su sal.

Tabla 2.17: Resumen de las expresiones para el cálculo de la concentración de disoluciones y su incertidumbre

Unidades	Símbolo	Fórmula	Incertidumbre combinada, $u$
Porcentaje %	%( $M/M$ )	$\frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot 100}{M_{ds}}$	$u_{\%(\text{M}/\text{M})} = \%(\text{M}/\text{M}) \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2}$
	%( $V/V$ )	$\frac{V_s \cdot r_{q-s} \cdot 100}{V_{ds}}$	$u_{\%(\text{V}/\text{V})} = \%(\text{V}/\text{V}) \cdot \sqrt{\left(\frac{u(V_s)}{V_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2}$
	%( $M/V$ )	$\frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot 100}{V_{ds}}$	$u_{\%(\text{M}/\text{V})} = \%(\text{M}/\text{V}) \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2}$
Molaridad	$M$	$M = \frac{M_s \cdot r_{q-s}}{Pm_s \cdot V_{ds}} \cdot 10^3$	$u_M = M \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
Molaridad	$m$	$m = \frac{M_s \cdot r_{q-s}}{Pm_s \cdot M_{ds}} \cdot 10^3$	$u_m = m \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
Normalidad	$N$	$N = \frac{M_s \cdot r_{q-s}}{V_{ds} \cdot Peq} \cdot 10^3 = \frac{M_s \cdot r_{q-s}}{V_{ds} \cdot Pm_s} \cdot v \cdot 10^3$	$u_N = N \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
Partes por millón	ppm	$ppm = \frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot 10^6}{V_{ds}}$	$u_{ppm} = ppm \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
	mg·L <sup>-1</sup>	$ppm = \frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot Pm_{s(\text{parcial})} \cdot 10^6}{V_{ds} \cdot Pm_s}$	$u_{ppm} = ppm \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_{s(\text{parcial})})}{Pm_{s(\text{parcial})}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
Partes por millón	ppm	$ppm = \frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot 10^6}{M_{ds}}$	$u_{ppm} = ppm \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_{s(\text{parcial})})}{Pm_{s(\text{parcial})}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$
	mg·kg <sup>-1</sup>	$ppm = \frac{M_s \cdot r_{q-s} \cdot Pm_{s(\text{parcial})} \cdot 10^6}{M_{ds} \cdot Pm_s}$	$u_{ppm} = ppm \cdot \sqrt{\left(\frac{u(M_s)}{M_s}\right)^2 + \left(\frac{u(r_{q-s})}{r_{q-s}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_{s(\text{parcial})})}{Pm_{s(\text{parcial})}}\right)^2 + \left(\frac{u(Pm_s)}{Pm_s}\right)^2}$

El significado de los términos que aparecen en las ecuaciones de la Tabla 2.17 es el siguiente:

$M_s$ : masa de soluto, g.	$u(M_s)$ : Incertidumbre típica correspondiente a la masa del soluto, g.
$M_{ds}$ : masa de disolución, g.	$u(M_{ds})$ : Incertidumbre típica correspondiente a la masa de la disolución, g.
$r_{q-s}$ : riqueza del soluto, en tanto por uno.	$u(r_{q-s})$ : Incertidumbre típica correspondiente a la riqueza, adimensional.
$V_s$ : volumen de soluto, mL.	$u(V_s)$ : Incertidumbre típica correspondiente al volumen del soluto, mL.
$V_{ds}$ : volumen de disolución, mL.	$u(V_{ds})$ : Incertidumbre típica correspondiente al volumen de la disolución, mL.
$Pm_s$ : masa molecular del soluto, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .	$u(Pm_s)$ : Incertidumbre típica correspondiente a la masa molecular del soluto, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
$Pm_{s(\text{parcial})}$ : masa molecular parcial o masa atómica del soluto, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .	$u(Pm_{s(\text{parcial})})$ : Incertidumbre típica correspondiente a la masa molecular parcial o masa atómica del soluto, $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .
$P_{eq}$ : masa equivalente del reactivo, eq-L.	$v$ : número de partículas elementales (electrones, protones,...) que se intercambian en la reacción en la que va a intervenir el reactivo.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

---



Para ilustrar el proceso de validación de un método analítico y la estimación de la incertidumbre basada en los resultados de la validación, se han elegido tres métodos de análisis de parámetros químicos en aguas residuales y continentales: aniones disueltos, fenoles totales y aceites y grasas. Los métodos analíticos empleados son adaptaciones de métodos oficiales internacionalmente reconocidos (aniones y fenoles) o métodos alternativos propuestos por los organismos normalizadores (aceites y grasas).

En este capítulo se describe el protocolo de validación seguido en cada caso, incluyendo los procedimientos analíticos adaptados a nuestro laboratorio, equipamiento y recursos humanos disponibles; el diseño experimental aplicado para estimar las principales contribuciones a la incertidumbre de la medida y toda aquella información necesaria para la validación.

Los equipos de medida deben ser validados previamente, por lo que se ha incluido un apartado específico para esta cuestión que incluye una breve descripción de los equipos de medida, procedimiento de calibración y estimación de la incertidumbre, verificación y mantenimiento.

Los reactivos y disoluciones se describen detalladamente en cada procedimiento analítico así como el equipamiento auxiliar empleado.

## 3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS

### 3.1.1. DETERMINACIÓN DE ANIONES POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA

Cada anión suele ser indicativo de un tipo de contaminación y las consecuencias en el ser humano y el medioambiente son distintas:

Los fluoruros presentes en las aguas residuales se originan fundamentalmente en procesos industriales (derivados del aluminio, fabricación de semiconductores, vidrio, farmacéuticos y de herbicidas). Concentraciones elevadas de fluoruros dañan los dientes y provocan enfermedades óseas. Debido a que ocasionan un riesgo potencial para el medioambiente, la fauna acuática y la salud humana, se limita su concentración en las aguas residuales.

En cuanto a los cloruros, no se conocen efectos tóxicos para el hombre por altas concentraciones de cloruros. A altas concentraciones y en presencia de sodio imparten sabor salado al agua mientras que, si el cloruro está presente como una sal de calcio o de magnesio, el típico sabor salado de los cloruros puede estar ausente aún a concentraciones de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Altas concentraciones son también un indicador de intrusión salina en los acuíferos costeros.

El origen de los nitratos y nitritos en las aguas es diverso. El más importante es el debido a las prácticas agrícolas por la utilización de fertilizantes inorgánicos, biocidas... Un segundo origen es el empleo de residuos ganaderos (purines, estiércol...) como fertilizantes, que además, pueden venir acompañados de microorganismos patógenos. Otras fuentes de nitrógeno son los vertidos urbanos que contienen sustancias procedentes de la actividad humana (alimentos, deyecciones, basuras, productos de limpieza...) y los vertidos industriales provenientes de refinerías de petróleo, conserveras.... Se ha podido comprobar que existe una correlación directa entre el consumo de alimentos o aguas con exceso de nitratos y los cánceres gástricos.

En general, la contaminación fosfatada es considerada una consecuencia directa del uso de fertilizantes y estiércoles en la agricultura. También se encuentran en la materia orgánica proveniente de desechos urbanos e industriales y en los detergentes de uso industrial y doméstico. Los fosfatos son sustancias solubles que las plantas necesitan para su desarrollo y que, si se encuentran en el agua en cantidades excesivas, inducen el crecimiento desmesurado de algas y otros organismos provocando procesos de polución y eutrofización y constituyendo un grave problema ambiental.

La presencia de bromuros en los efluentes suele provenir de compuestos de bromuro orgánicos empleados como agentes desinfectantes debido a sus efectos perjudiciales para los microorganismos. Se aplican en invernaderos y en los campos de cultivo para eliminar insectos y plagas, posteriormente son arrastrados fácilmente hasta las aguas superficiales donde también son venenosos para los animales más grandes como peces, langostas y algas. Los bromuros orgánicos se degradan dando bromuro inorgánico, nocivo para el sistema nervioso y la glándula tiroides si es absorbido en grandes dosis.

A pesar de no ser muy tóxico, el vertido excesivo de sulfatos puede causar problemas ecológicos. La contaminación por sulfatos se debe mayoritariamente al aporte de la lluvia (lluvia ácida) y origina una acidificación del medio acuático provocando graves alteraciones sobre la vida del mismo. Los niveles normales de sulfatos en el agua pueden incrementarse por actividades mineras, basureros y otras fuentes antropogénicas.

Bien por el hecho de ser contaminantes medioambientales o por ser tóxicos para la salud, la legislación vigente actualmente tiene reglamentadas para cada uno de ellos las concentraciones máximas permitidas en los vertidos.

Las técnicas de análisis para la determinación de cada uno de ellos por separado son muy variadas, incluyendo potenciometría con electrodos selectivos para fluoruros, cloruros o nitratos, métodos espectrofotométricos para los fosfatos o nitritos, o turbidimetría para sulfatos.... Sin embargo, se ha preferido la determinación de aniones en aguas residuales por cromatografía iónica, muy empleada hoy en día, ya que es una técnica multianalito con el consiguiente ahorro de tiempo y costes. El procedimiento analítico validado en este trabajo es una adaptación de métodos

normalizados internacionales (*APHA, 1998; ASTM D4327, 2011; UNE EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997*).

### Fundamentos del método

En la cromatografía aniónica, la fase estacionaria es un intercambiador aniónico de baja capacidad, mientras que como fase móvil suelen utilizarse disoluciones acuosas de sales de ácidos débiles mono o dibásicos. La detección de los iones se realiza mediante conductimetría. El detector de conductividad se combina habitualmente con un sistema supresor postcolumna, consistente en un intercambiador catiónico protonado que disminuye la conductividad de la fase móvil, transformando los aniones de dicha fase móvil en sus correspondientes formas ácidas neutras, y reteniendo los cationes. Los iones se identifican a partir de sus tiempos de retención, mediante comparación con los patrones de calibración. La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura o área del pico (*Eith et al., 2007; Schäfer et al., 2003; UNE EN ISO 10304-1, 2009*).

### Instrumentación, reactivos y materiales

La determinación de aniones fue realizada con un cromatógrafo iónico *Methrom 792 IC BASIC* equipado con un detector de conductividad, bomba peristáltica, módulo de supresión química e interfaz. Se empleó una columna de separación anionica *Metrosep A Supp 4*, de 250 mm de longitud y 4.0 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de alcohol polivinílico de 9 µm de diámetro recubiertas de grupos amonio cuaternario. Para proteger la columna se empleó la precolumna *Metrosep A Supp 4/5 Guard* de 5 mm de longitud, 4.0 mm de diámetro interno y partículas de 5 µm de diámetro (*Metrohm Ltd., 2011*). La determinación cromatográfica se realizó a temperatura ambiente.

Otros equipos empleados fueron: balanza analítica *Sartorius 1601 AMP8-1*, con 0.1 mg de resolución; estufa de secado *Memmert modelo UN160* con un error de ± 5°C; ultrasonidos *Selecta modelo 3000514*; equipo de filtración de policarbonato para filtros de 47mm y pH-metro *Crison modelo micropH2000*.

También se emplearon: jeringuillas de 5-10 mL con salida Luer; filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y 25 mm de diámetro y membranas de 0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.

Para el lavado del material volumétrico y para la preparación de disoluciones se utilizó agua ultrapura obtenida de un equipo compacto *Milli-Q Academic* que produce agua desionizada con una conductividad inferior de 18 µS·cm<sup>-1</sup>.

Como fase móvil se empleó una disolución 1.8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/1.7 mM NaHCO<sub>3</sub> preparada diariamente por dilución de una fase móvil concentrada de concentración 180 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/170 mM NaHCO<sub>3</sub>, preparada esta última semanalmente y almacenada refrigerada (*Metrohm Ltd., 2011*). La fase móvil se filtraba a través de membranas de

nylon de 0.45 µm de diámetro de poro y se sometía a ultrasonidos durante 15 minutos para eliminar los gases disueltos.

Para la regeneración del sistema de supresión química postcolumna se empleó una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 50 mM y posteriormente agua ultrapura para eliminar el exceso de ácido.

Se prepararon disoluciones multipatrón concentrada de aniones conteniendo 500 mg·L<sup>-1</sup> de F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup>, y 1000 mg·L<sup>-1</sup> de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Para ello se disolvieron en agua ultrapura las cantidades apropiadas de la correspondiente sal sódica o potásica anhidra, previamente secadas a 105 ± 5 °C. También pueden ser empleados patrones comerciales de concentraciones similares.

Tabla 3.1: Reactivos para la preparación de patrones

Anión (A <sup>-</sup> )	Reactivos	Molecular (g·mol <sup>-1</sup> )	Molecular A <sup>-</sup> (g·mol <sup>-1</sup> )	Tiempo desec. (h)	Temp. desec. (°C)	Masa (g)	C <sub>A-</sub> mg·L <sup>-1</sup>
Fluoruro	NaF	41.99	19.00	1	105	1.1050	500
Cloruro	NaCl	58.44	35.45	2	105	0.8242	500
Nitrito	NaNO <sub>2</sub>	69.00	46.01	1	105	1.4998	1000
Bromuro	NaBr	102.90	79.90	6	105	0.6439	500
Nitrito	NaNO <sub>3</sub>	84.99	62.01	24	105	1.3707	1000
Ortofósfato	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136.09	95.00	1	105	1.4330	1000
Sulfato	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	96.06	1	105	1.4790	1000

Se prepararon diariamente, por dilución, siete multipatrones de calibración de concentraciones comprendidas entre 0.5 y 30 mg·L<sup>-1</sup> de anión.

En algunos casos se emplearon cartuchos de extracción en fase sólida (*Grace Davison Discovery*) de 0.5 mL de volumen para acondicionar las muestras: cartucho de adsorción IC-Ag para retener el exceso de Cl<sup>-</sup>, I<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup>, cartucho de adsorción IC-Ba para retener el exceso de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, cartucho de intercambio iónico IC-H para retener el exceso de cationes y reducir el pH, cartucho IC-RP para eliminar componentes hidrofóbicos.

### Procedimiento analítico

Los multipatrones de calibración y las muestras se almacenan refrigeradas a 4°C hasta su análisis.

Una vez atemperadas las disoluciones, se comprueba que el pH de las muestras está dentro del rango admitido por la columna y precolumna; en caso de tener un pH ácido se ajusta eluyendo la muestra por un cartucho de extracción IC-H. Si en las muestras están presentes altas concentración de haluros, sulfatos o iones inorgánicos que enmascaran la señal de alguno de los aniones a cuantificar se eluye la muestra por el/los cartucho/s de extracción adecuado/s, IC-H, IC-Ag, IC-Ba o IC-RP, para reducir la concentración de anión interferente.

Para obtener la línea de calibrado se toma con una jeringuilla de 5-10 mL una porción homogénea de multipatrón de calibración y se pasa a través de un filtro de nylon de 0.45 µm acoplado a la salida de la jeringuilla para eliminar partículas suspendidas. El filtrado es directamente introducido en el inyector del equipo. La cuantificación se realiza midiendo las áreas de los picos.

Para proceder a la cuantificación de los aniones en las muestras, se diluyen con agua desionizada, si es necesario, a concentraciones dentro del rango de calibración de cada anión y se inyectan en las mismas condiciones que los patrones.

La concentración de anión de la muestra se calcula interpolando en la ecuación de la recta de calibrado de la siguiente forma:

$$C_{A^-} \left[ \text{mg A}^- \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{Y - a}{b} \quad \text{ec. 3.1}$$

donde  $C_{A^-}$  es la concentración de anión en la muestra,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $Y$  es el área del pico medido en  $\mu\text{s} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  (se simplificará como cuentas),  $a$  la ordenada en el origen de la línea de calibrado medida en cuentas y  $b$  la pendiente de la línea de calibrado medida en cuentas  $\text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

El diagrama de flujo representado en la Fig. 3.1 resume el procedimiento analítico seguido:

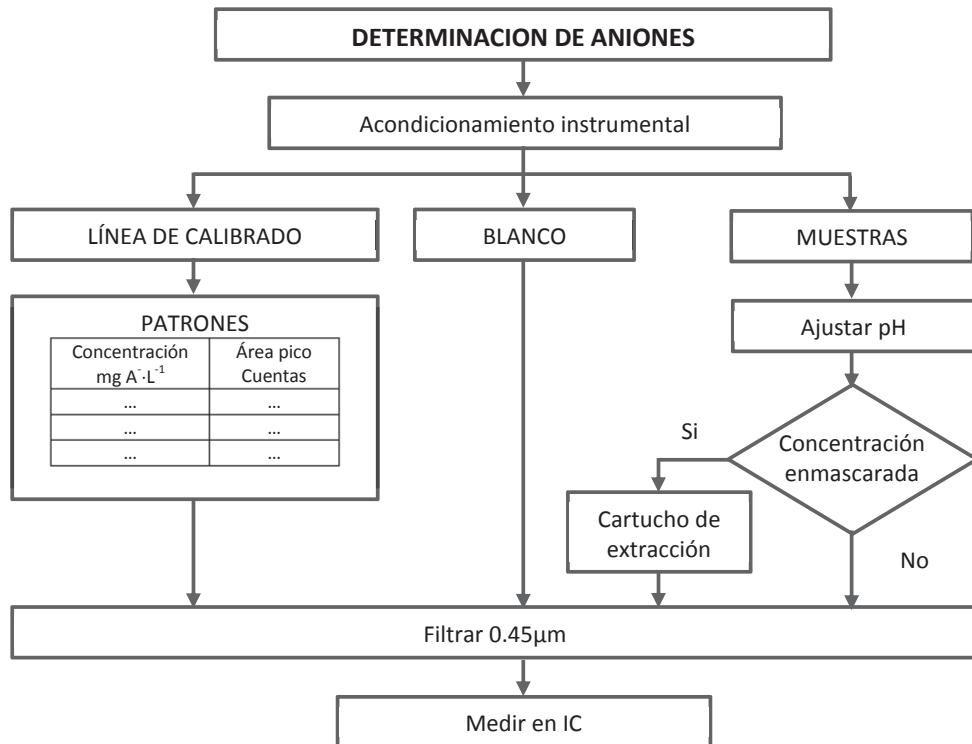


Fig. 3.1 Diagrama de flujo del procedimiento analítico de medida de aniones por IC

Los distintos parámetros cromatográficos se eligieron atendiendo a las recomendaciones del fabricante del equipo, de la columna y precolumna, (*Metrohom Ltd., 2011*):

Tabla 3.2: Condiciones instrumentales para la determinación de aniones

Parámetros instrumentales	Caudal: 1 mL·min <sup>-1</sup> Tiempo de cromatograma 16 min Presión máxima: 12 MPa Presión mínima: 0 MPa Conductividad: 0 µS·cm <sup>-1</sup>
Propiedades de integración	Delay: 3.2 min Anchura: 5 seg Pendiente: 3 Altura mínima: 0.1 µS·cm <sup>-1</sup> Tipo de integración: valle-valle Tiempos de retención (según certificado de fabricante de la columna, Tabla 3.3 )
Condiciones de calibración	Método de calibración: patrón externo Base: Área Formula: Y = K1X+K0 Peso estadístico 1

Tabla 3.3: Tiempos de retención indicados por el fabricante

Anión	t <sub>R</sub> (min)
F <sup>-</sup>	3.6
Cl <sup>-</sup>	5.07
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.0
Br <sup>-</sup>	7.35
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8.3
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	11.9
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	14

### 3.1.2. DETERMINACIÓN DE FENOL POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS

Los fenoles suelen estar presentes en el medio ambiente como consecuencia, en gran parte, de los vertidos de procesos industriales y agrícolas (desinfectantes, fungicidas, germicidas...). Según la Directiva 67/548/CEE (*Comisión Europea, 1967*), los fenoles y sus derivados (clorofenoles, nitrofenoles, alquilfenoles, etc) se consideran sustancias tóxicas y nocivas para la salud y el medioambiente. Por tanto, es muy importante conocer cuantitativamente la presencia de éstos para poder realizar de manera adecuada su eliminación en los vertidos y prevenir daños a los ecosistemas o a la salud humana. En la actualidad, las técnicas más empleadas para la determinación de fenol son la espectrofotometría UV-vis (*APHA, 1998; ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002*;

*USEPA Method 420.1, 1983)* y la cromatografía, tanto de líquidos, HPLC, como de gases, GC/MS, (*UNE-EN ISO 18857-1:2007; UNE-EN 12673:1999; UNE-EN ISO 17495:2003*). Los métodos espectrofotométricos se aplican a la muestra de forma directa o tras extracción con cloroformo, y determinan la cantidad total de compuestos fenólicos presentes en la muestra, pero sin hacer distinción entre los tipos de fenoles. Los métodos cromatográficos permiten la determinación individual de cada fenol y en general son más sensibles y selectivos que la espectrofotometría UV-vis. Para la determinación de fenol en aguas residuales y continentales se ha preferido validar el método espectrofotométrico directo de la 4-aminoantipirina (4-AAP) ya que es más barato y posee suficiente sensibilidad para los niveles de concentración de fenol a detectar en aguas residuales (límite de vertido próximo al  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , dependiendo del reglamento de vertido local (*Ayuntamiento de Valladolid, 2006*)), mientras que las técnicas cromatográficas son más recomendables para el análisis de aguas potables donde la máxima concentración admisible es  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Este método analítico es una adaptación de normas internacionales (*APHA, 1998; ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; USEPA Method 420.1, 1983*).

### Fundamentos del método

Este método es sensible a los fenoles –ortho- y –meta- sustituidos y, en condiciones adecuadas de pH, a los sustituidos en posición –para- por grupos carboxilo, halógeno, metoxilo o ácido sulfónico.

Los compuestos fenólicos destilados reaccionan con la 4-AAP a pH 7.9 en presencia de ferricianuro potásico para formar un compuesto coloreado de antipirina, como se esquematiza en la Fig. 3.2. Este colorante es estable en solución acuosa y susceptible de medida fotométrica a una longitud de onda de 506 nm (*APHA, 1998; UNE 77053, 2002*).

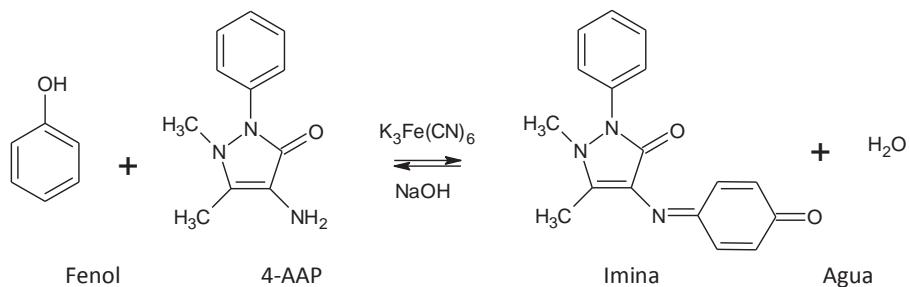


Fig. 3.2: Reacción de los compuestos fenólicos con 4-AAP (*Sousa et al., 2009*)

### Instrumentación, reactivos y materiales

Los derivados fenólicos fueron determinados con un espectrofotómetro UV-vis, *Shimadzu UV-1603* equipado con un sistema fotométrico de doble haz, una red de difracción holográfica cóncava y un detector fotodiodo de silicio.

Además se empleó diverso material de laboratorio: balanza analítica *Sartorius BP210S* con una resolución de 0.1 mg; agitador magnético *Heindolf MR3001*; pH-metro *Radiometer Copenhagen TIM 900*, con electrodo de vidrio combinado; manta calefactora eléctrica *Selecta Cod6003294* de cuatro plazas para matraces de 500 mL y temperatura regulable hasta 450°C, y varios equipos completos de destilación compuestos por matraz de 500 mL, pieza acodada 75° para destilación, refrigerante Dimroth encamisado de 300 mm y colector de 105°.

Para el lavado del material volumétrico y para la preparación de todas las disoluciones se empleó agua desionizada con una conductividad menor de 18  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ , obtenida tras pasar el agua de red sucesivamente por un equipo compacto de ósmosis inversa *Barnstead Easy Pure RO*, y un equipo compacto de agua ultrapura *Barnstead Easy Pure LF*.

Los reactivos empleados en la determinación de fenol fueron: ácido fosfórico 1:10, amoníaco 0.5 M, disolución tampón fosfato 0.60 M  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ /0.53 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , disolución de 4-AAP al 2% y disolución de hexacianoferrato (III) de potasio al 8%, conservado refrigerado y en frasco topacio.

Se prepara una disolución patrón de fenol de 1000 mg fenol·L<sup>-1</sup> disolviendo aproximadamente 500 mg de fenol cristalizado y diluyendo a 500 mL con agua ultrapura recién hervida y fría. A partir de esta disolución madre, se prepararán diariamente, por dilución, siete patrones de calibración de concentraciones comprendidas entre 0.25 y 5 mg fenol·L<sup>-1</sup>.

### **Procedimiento analítico**

Las interferencias se eliminan, o al menos se reducen, destilando la muestra. Para ello, se toman volúmenes de muestra ligeramente superiores a 500 mL y se ajusta el pH a 4.0 con la disolución de ácido fosfórico. A continuación, se vierten en el matraz de destilación 500 mL de la muestra y, cuando han destilado aproximadamente 450 mL, se detiene la destilación. Cuando la muestra deja de hervir, se añade 50 mL de agua desionizada caliente al matraz de destilación y se continua destilando hasta recoger un volumen total de 500 mL. Los destilados se almacenan refrigerados a 4°C hasta su análisis.

Para proceder a la cuantificación de fenol en las muestras destiladas una vez atemperadas éstas, se toman 100 mL de destilado o una porción que no contenga más de 5 mg de fenol, y se diluyen hasta 100 mL. Se prepara un blanco paralelamente.

Se tratan los patrones de la línea de calibrado, las muestras y el blanco como sigue: se añaden 2.5 mL de la solución de amoníaco y se ajusta inmediatamente a pH 7.9 con unos 2 mL de tampón fosfato. Se añade a continuación 1.0 mL de solución 4-AAP, 1.0 mL de solución  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  y se mezcla bien. Despues de 15 minutos, se transfiere la disolución coloreada a las cubetas de vidrio de 1 cm y se lee la absorbancia de patrones y muestras a 506 nm introduciendo en la cubeta de referencia el blanco.

La concentración de fenol en las muestras se calcula interpolando en la ecuación de la recta de calibrado de la siguiente forma:

$$C_{\text{fenol}} \left[ \text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{UA - a}{b} \quad \text{ec. 3.2}$$

donde  $C_{\text{fenol}}$  es la concentración de fenol en la muestra,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $UA$  es la absorbancia de la muestra proporcionada por el espectrofotómetro, en unidades de absorbancia,  $a$  es la ordenada en el origen medida también en unidades de absorbancia y  $b$  es la pendiente de la línea de calibrado medida en  $\text{UA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg}^{-1}$ .

La Fig. 3.3 muestra el diagrama de flujo del procedimiento.

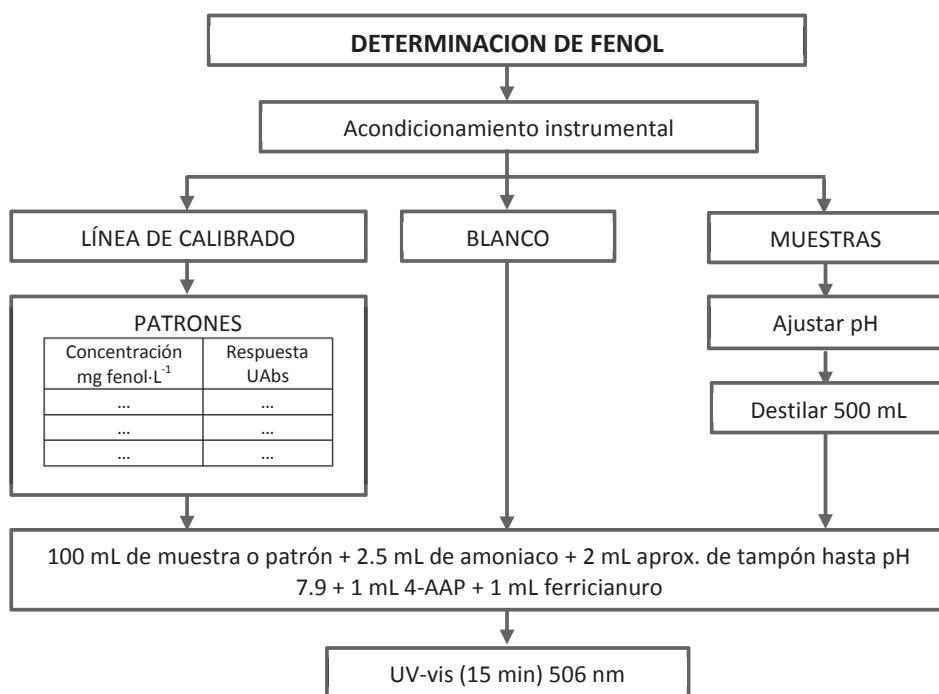


Fig. 3.3: Diagrama de flujo para la determinación de fenol

### 3.1.3. DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS (A&G) MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (SPE) Y GRAVIMETRÍA

Las principales fuentes de aceites y grasas en los efluentes son los vertidos domésticos, talleres automotrices, industria del petróleo, procesadoras de carnes y embutidos e industria cosmética. Cuando se vierten aceites y grasas crean una película superficial impidiendo el intercambio de gases entre el agua y la atmósfera, al dificultar el libre paso del oxígeno hacia el agua y la salida del CO<sub>2</sub> hacia la atmósfera. En casos extremos pueden llegar a producir la acidificación del agua junto con bajos niveles de oxígeno disuelto, además de interferir en la penetración de la luz solar llevando a la degradación del medioambiente acuático. Por otro lado, la presencia excesiva de

aceites y grasas puede influir en el funcionamiento normal de las plantas de tratamiento de aguas residuales, por lo que es indispensable conocer la cantidad de aceites y grasas presentes para diseñar adecuadamente el sistema de tratamiento adecuado para su eliminación.

Casi todos los métodos de análisis de aceites y grasas se basan en su extracción líquido-líquido de la fase acuosa a una fase orgánica con un disolvente, mediante embudo de decantación en frío o con extractor Soxhlet en caliente, y posterior cuantificación mediante espectrometría de IR si el disolvente escogido es transparente en esta técnica, la cual cuantifica los A&G midiendo los enlaces carbono-hidrógeno de los compuestos orgánicos, o por gravimetría después de evaporar el disolvente. Esta metodología tiene una serie de inconvenientes: se emplea una gran cantidad de disolventes nocivos y contaminantes, cuando la extracción se hace en caliente aumenta el riesgo de contaminación atmosférica por volatilización del disolvente, y los tiempos de extracción son largos. Una opción recientemente desarrollada es la extracción en fase sólida, SPE, en la cual los aceites y grasas, retenidos en un adsorbente adecuado, son eluidos con pequeños volúmenes de disolvente, minimizando el coste del análisis y el impacto ambiental del método (*APHA, 1998; UNE 77037, 1983; USEPA Method 1664 revB, 2010; USEPA Method 1664A Implementation, 2000*).

La elección del disolvente para la extracción de los A&G es clave a la hora de decidir qué metodología emplear. Normativas como UNE-77037 (*UNE 77037, 1983*), ASTM 3921 (*ASTM D3921-96, 2011*), USEPA Method 413.1 y 413.2 (*USEPA, 1983*) o el SM 5520 (*APHA, 1998*) emplean el 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano (freón 113), tanto para la cuantificación gravimétrica como por espectrometría de IR. Además, el freón 113 puede ser reutilizado en posteriores análisis en ambos casos debido a su bajo punto de ebullición (47.6°C). Sin embargo, éste se clasificó en el Grupo I según el “Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la capa de ozono” (*PNUMA, 2006*), en el cual se acordó reducir su uso industrial y limitar su fabricación. Como consecuencia, aquellas normas que determinaban los A&G por gravimetría fueron anuladas o revisadas sustituyendo este disolvente por otro menos nocivo como hexano, solo o mezclado con metil terc-butil éter, ambos con puntos de ebullición ligeramente superiores (69°C y 55.2°C respectivamente) pero reutilizables. Parte de la normativa que emplea la espectrofotometría de IR para la cuantificación de A&G se ha mantenido a pesar las recomendaciones y del encarecimiento de los precios; en otros casos se han desarrollado nuevas normas como la ASTM D7066 (*ASTM D7066-04, 2011*) que sustituye el freón 113 por el eteno, 1-cloro-1,2,2-trifluoro-, homopolímero (S-316), disolvente con un elevado coste pero recuperable por filtración con carbón activo.

Se ha optado por validar un método gravimétrico basado en la separación de los compuestos de interés mediante SPE, seguido de la elución con n-hexano y posterior destilación del disolvente para obtener un residuo graso que se pesa. Las ventajas de este método son el empleo de un 30% menos de disolvente que con las técnicas

habituales de extracción líquido-líquido, la realización de la extracción en solo unos minutos y la posibilidad de reutilizar el n-hexano destilado en posteriores determinaciones.

### Fundamento del método

La definición de aceites y grasas depende del método de análisis empleado para su determinación. Para el método seleccionado en este trabajo, aceites y grasas incluye grupos de sustancias con la característica común de su solubilidad en n-hexano.

El proceso de medida consiste en extraer los aceites y grasas del medio acuoso a un medio orgánico de la forma siguiente: la muestra, una vez acidificada a  $\text{pH} < 2$  para evitar la saponificación y la formación de emulsiones inestables, se filtra a través de un filtro especial en el cual quedan retenidos los aceites y grasas para posteriormente eluirlos con n-hexano. El extracto final se filtra a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para secarlo. Por último, se evapora el disolvente, se deja enfriar en un desecador y se pesa el residuo (*Daghbouche et al., 1997; Lau et al., 1997; Xenosep Technologies, 2005*).

### Instrumentación, reactivos y materiales

El material de laboratorio empleado en la determinación de aceites y grasas y sus características técnicas fue el siguiente:

El sistema de filtración empleado se esquematiza en la Fig. 3.4 y consta de un equipo de filtración a vacío *Scharlab* para filtros de 47 mm de diámetro, tubos Nessler de 100 mL de capacidad y 28 mm de diámetro y filtros SPE *Pacific™ O&G Disk 1664-47-HT* de *Horizon Technologies* de 47 mm de diámetro específicamente diseñados para este método.

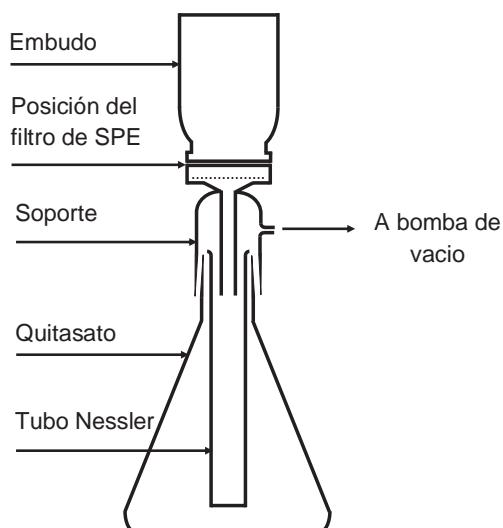


Fig. 3.4: Esquema del equipo de filtración a vacío para la determinación de A&G

Otros equipos empleados fueron: balanza analítica *Sartorius 1601 AMP8-1*, con 0.1 g de resolución y 110 g de fondo de escala; estufa de secado *Memmert modelo UN160*, con un error de  $\pm 5^{\circ}\text{C}$ ; rotavapor *Buchi modelo R-215*; bomba de vacío de membrana *KNF Neuberger N811 KN.18* capaz de suministrar un caudal de  $11.5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$  y una presión de vacío de 2 bar.

Otro material empleado fue: desecador con llave de vacío; papel de filtro de 15 cm de diámetro *Whatman nº 40* o equivalente; papel indicador de pH; matraces redondos de cuello corto de 250 mL de capacidad y peso inferior a 110 g; embudos de vidrio de 70 mm de diámetro; probetas graduadas con volúmenes comprendidos entre 100 mL y 2000 mL.

Para el lavado del material volumétrico y para la preparación de disoluciones se empleó agua bidestilada.

Los reactivos empleados para la realización de los análisis fueron: ácido clorhídrico 1:1 para acidificar las muestras, metanol, sulfato sódico anhidro secado a  $200\text{-}250^{\circ}\text{C}$  durante 24 h y almacenado en desecador hasta su uso y n-hexano con una pureza mínima de 85% y residuo seco  $< 0.0001\%$  (*USEPA Method 1664 revB, 2010*).

### **Procedimiento analítico**

A continuación se describen detalladamente las etapas del procedimiento analítico empleado para la determinación de aceites y grasas en aguas residuales:

#### ▲ Preparación de la muestra

A la llegada de la muestra al laboratorio, se marca el menisco en el recipiente que la contiene. Se mide el pH de la muestra, se acidifica a  $\text{pH} < 2$  con HCl 1:1 y se refrigerá. El volumen de muestra analizado se determina después de su análisis rellenando la botella que contenía la muestra con agua hasta la línea marcada y midiendo el volumen de agua empleado con una probeta.

#### ▲ Preparación del matraz

Se secan los matraces redondos de 250 mL en una estufa a  $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas y se almacenan en un desecador. Antes de iniciar el análisis se pesan en la balanza analítica. Los matraces deben ser manipulados en todo momento con guantes o pinzas.

#### ▲ Preparación del equipo de filtración

Se introduce un tubo Nessler dentro del quitasato y se coloca el filtro SPE con la cara rugosa hacia arriba. A continuación se lavan las paredes del embudo del equipo de filtración con una alícuota de 10 mL de n-hexano hasta que el filtro esté totalmente sumergido en el disolvente, se esperan 5 segundos y se aplica vacío recogiendo el disolvente en el tubo Nessler. Se hace un segundo lavado con otros 10 mL de n-hexano aplicando vacío durante 1 minuto hasta que el filtro esté seco. Se recupera el n-hexano por destilación.

Si la muestra contiene elevada cantidad de sólidos en suspensión puede ser recomendable colocar sobre el filtro de aceites y grasas un prefiltro de fibra de vidrio para evitar la colmatación del filtro SPE y reducir el tiempo de filtración.

▲ Acondicionamiento del filtro

Se humedece el filtro SPE con 10 mL de metanol hasta que el filtro esté totalmente sumergido, evitando que el filtro se seque. Se espera 5 segundos y se aplica vacío nuevamente recogiendo el metanol en el tubo Nessler, y descartándolo a continuación. Seguidamente se lava el filtro con 20 mL de agua para eliminar el residuo de metanol evitando que el filtro se seque. Se retira el tubo Nessler del quitasato.

▲ Extracción de las muestras

Una vez acondicionado el filtro se filtra la muestra lentamente a vacío, minimizando el contacto de la muestra con el embudo para evitar la adsorción de los aceites y grasas a las paredes, no llenando para ello más de 2/3 del volumen del embudo. Para muestras con muchos sólidos en suspensión se deja decantar, se filtra el sobrenadante primero y se vierte el sólido al final antes de que se seque el filtro. Si quedan sólidos adheridos a las paredes de la botella y del embudo se pueden arrastrar con agua, también se puede emplear una espátula dejando el residuo encima del filtro.

Una vez que la muestra se ha filtrado totalmente, se continúa secando el filtro haciendo vacío no más de 8 minutos para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Si queda una capa de sedimento húmedo en el filtro, se mezclan 5 g de sulfato de sodio con una espátula, hasta que el sedimento aparezca seco, granulado y suelto.

▲ Elución del analito

Se desecha el líquido del quitasato, se introduce dentro un tubo Nessler y se acopla al resto del equipo de filtración. Se lavan las paredes de la botella que contenía la muestra con 3 porciones de 10 mL de n-hexano agitando durante un minuto, añadiéndolo a continuación al embudo y haciendo vacío para que filtre lentamente. Se lavan las paredes del embudo con otras tres porciones de 15 mL de n-hexano y, por último se vierten otras dos porciones de 15 mL de n-hexano haciendo nuevamente vacío hasta que se haya transferido todo al tubo Nessler.

▲ Secado del extracto

Se filtra el extracto de n-hexano a través de un embudo cónico en el que se ha colocado un filtro *Whatman* nº 40, o similar, de 15 cm de diámetro y 10 g de sulfato de sodio. El filtrado seco se recoge en un matraz redondo de 250 mL almacenado en desecador y previamente pesado. Una vez filtrado el extracto se lava el tubo Nessler con 15 mL de n-hexano y se junta con la porción anterior. Se lava el filtro con n-hexano limpio juntándolo con las porciones anteriores.

▲ Eliminación del disolvente

Se destila el n-hexano en un rotavapor a  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ . Cuando la destilación esté finalizada se aplica vacío unos segundos para destilar el n-hexano final. Por último se

introduce el matraz en un desecador, se hace vacío hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa en la balanza analítica.

▲ Blanco

Se realiza un blanco por cada tanda de muestras repitiendo todo el procedimiento sin muestra, y con el mismo volumen de disolvente. La concentración de aceites y grasas en las muestras se calcula según la ec. 3.3

$$C_{A&G} \left[ \text{mg A & G} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{P_f - P_i - (P_{f-B} - P_{i-B})}{V_M} \cdot 10^6 \quad \text{ec. 3.3}$$

donde  $C_{A&G}$  es la concentración de A&G en la muestra, en  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P_i$  y  $P_f$  son las masas del matraz antes y después de la determinación de A&G, medidas en g,  $P_{i-B}$  y  $P_{f-B}$ , son las masas del matraz antes y después de la determinación del blanco, medidas en g y  $V_M$  el volumen de muestra, en mL.

En la Fig. 3.5 podemos ver un esquema del procedimiento de medida.

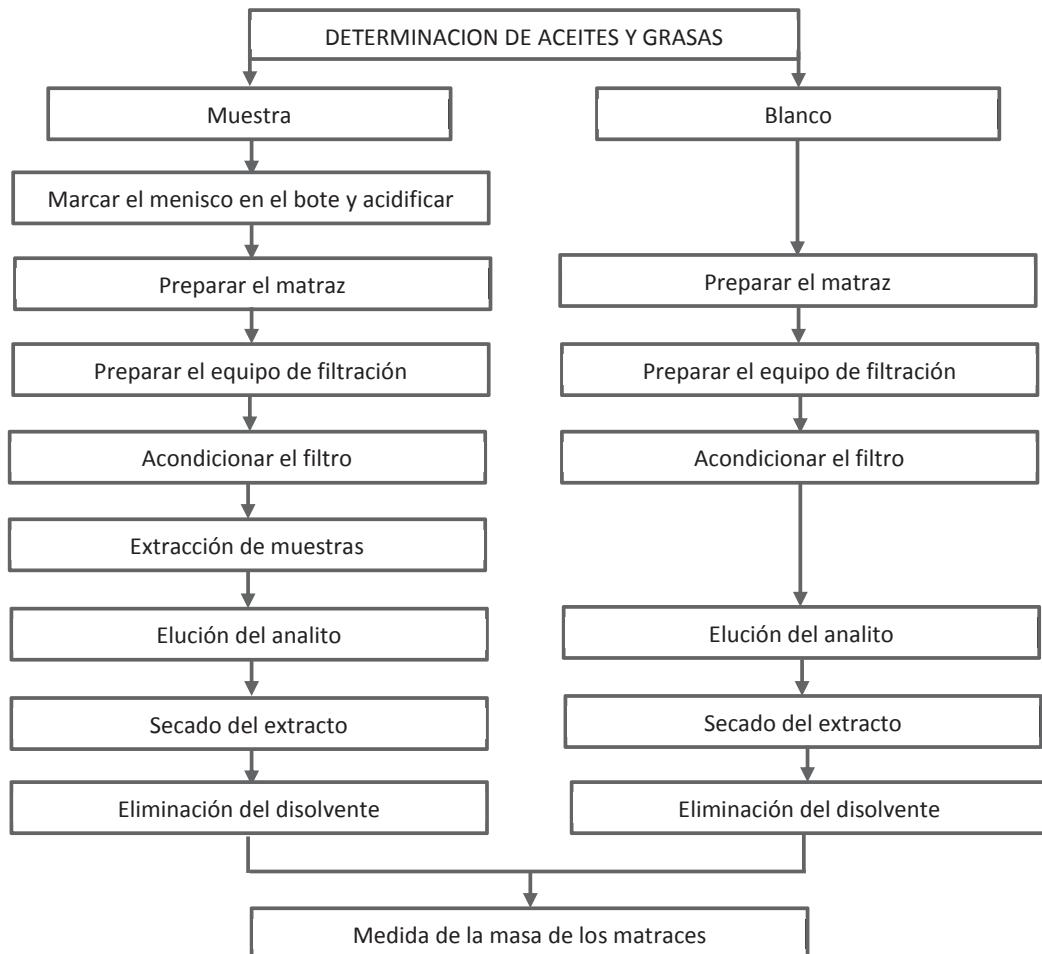


Fig. 3.5: Diagrama de flujo para la determinación de aceites y grasas en aguas residuales

### 3.2. MATRIZ COMPUESTA

El efecto matriz afecta notablemente a la precisión y veracidad de los resultados analíticos, por lo que debe ser considerado cuidadosamente durante la validación de los métodos de análisis. Sin embargo, dada la variabilidad de la composición de las muestras medioambientales resultaría imposible analizar la totalidad de los efectos matriz.

Por este motivo, para la realización de este trabajo se optó por preparar una matriz sintética compuesta que imitase las principales características de las aguas residuales. Para ello se tomaron varias muestras simples representativas de los alcances de los procedimiento de análisis a validar (aguas residuales industriales y urbanas, y aguas continentales) y se mezclaron en proporciones iguales para obtener una muestra compuesta que simulase el efecto matriz de las posibles muestras reales a las que se aplican normalmente estos procedimientos.

Dichas muestras simples fueron tomadas de forma aleatoria en los siguientes lugares:

- ▲ Agua residual urbana: estas se tomaron en la entrada de una estación depuradora de aguas residuales (EDAR) que proporciona a la muestra sintética componentes orgánicos e inorgánicos.
- ▲ Agua residual procedente de un proceso biológico de depuración de una EDAR que proporciona un alto contenido en sustancias orgánicas.
- ▲ Agua residual industrial: estas se tomaron en una empresa de la zona dedicada al tratamiento de superficies metálicas, de forma que aporta altas concentraciones de metales en disolución y otros componentes inorgánicos.
- ▲ Agua continental tomada en el río Duero que nos proporciona sustancias orgánicas e inorgánicas.

Las muestras simples se mezclaron hasta obtener una muestra homogénea y se almacenó en un recipiente de plástico en una cámara refrigerada.

Se realizó un análisis exhaustivo de la matriz compuesta para caracterizarla determinando los siguientes parámetros: Sólidos totales, ST; Sólidos suspendidos totales, SST; Sólidos sedimentables, SS; Turbidez; Aniones (cloruro, fluoruro, nitrato, bromuro, nitrato y sulfato); pH; Demanda Química de Oxígeno, DQO; Demanda Biológica de Oxígeno, DBO<sub>5</sub>; Fósforo total; Detergentes, SAAM (sustancias activas al azul de metileno); Nitrógeno Kjeldhal Total, NKT; Nitrógeno amoniacoal, N-NH<sub>4</sub>; Aceites y grasas, A&G; Alcalinidad Total, AT. Los valores obtenidos de cada uno de estos parámetros junto con la norma y técnica analítica empleada se presentan en la Tabla 3.4.

Antes de tomar la porción necesaria para preparar las muestras de control necesarias para los experimentos se procedió a su homogeneización mediante agitación. Posteriormente, dependiendo del método a validar, la matriz sintética se sometió a diferentes tratamientos previos que se detallarán oportunamente.

Tabla 3.4: Caracterización de la matriz compuesta

Parámetro	Método	Técnica analítica	Resultados	Uds.
ST	UNE 77030:2002	Gravimetría	3440	mg ST·L <sup>-1</sup>
SS	UNE 77032:2002	Volumetría	150	mL SS·L <sup>-1</sup>
SST	UNE-EN 872:2006	Gravimetría	1200	mg SST·L <sup>-1</sup>
Turbidez	UNE EN-ISO 7027:2001	Turbidimetría	8	UNT
F <sup>-</sup>	UNE-EN ISO 10304-1:2009	Cromatografía iónica	0	mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>
Cl <sup>-</sup>			47	mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>			34	mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>
Br <sup>-</sup>			0	mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>			8.7	mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			140	mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup>
pH	-	Potenciometría	6.8	-
DQO	UNE 77004:2002	Volumetría redox	740	mg O <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup>
DBO <sub>5</sub>	UNE-EN 1899-1:1989	Manométrica	190	mg O <sub>2</sub> ·L <sup>-1</sup>
P total	UNE-EN ISO 6878: 2005	Espectrofotometría UV-Vis	215	mg P·L <sup>-1</sup>
SAAM	UNE-EN 903:1994		0.02	mg SAAM·L <sup>-1</sup>
NKT	UNE-EN 25663:1994	Mineralización + Volumetría ácido-base	61.35	mg N·L <sup>-1</sup>
N-NH <sub>4</sub>	UNE 77028:2002	Volumetría	28.2	mg N·L <sup>-1</sup>
A&G	UNE 77037:1983	Extracción L-L + Gravimetría	19	mg A&G ·L <sup>-1</sup>
AT	UNE-EN ISO 9963-1:1996	Volumetría ácido-base	214	mg CaCO <sub>3</sub> ·L <sup>-1</sup>

### 3.3. PROTOCOLO DE VALIDACIÓN

A continuación se describe la información técnica que se incluyó en los protocolos de validación disponibles por los analistas para cada uno de los métodos de ensayo validados en este trabajo.

Antes de empezar la validación de cualquier método de análisis es necesario establecer determinadas condiciones experimentales del método de ensayo a validar, a veces no suficientemente detalladas en el método analítico de partida, lo que requiere en la mayoría de los casos la realización de una serie de ensayos y operaciones previas a la validación. La Tabla 3.5 resume los ensayos previos programados para cada uno de los métodos posteriormente validados en este trabajo, junto con las metodologías para su evaluación y algunas consideraciones tenidas en cuenta, que se describirán más detalladamente en el Capítulo 4.

Los parámetros técnicos a determinar y los objetivos de calidad perseguidos para cada método de análisis se encuentran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.5: Ensayos y consideraciones previos a la validación

Ensayos y operaciones previas	Metodología
Conservación de reactivos y patrones.	Análisis y representación tiempo/señal ( <i>OECD</i> , 1997). Comparación referencias bibliográficas ( <i>APHA</i> , 1998; <i>ASTM D4327, 2011; UNE-EN ISO 5667-3, 2004; UNE-EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997</i> ). Análisis y representación tiempo/concentración de una muestra real. Estudio del intervalo lineal de la curva de calibrado.
Establecimiento de la linealidad.	Resolución, asimetría, línea base, blanco, $t_{\text{R}}$ . Eficiencia de los cartuchos SPE: IC-Ag, IC-Ba, IC-H, IC-RP. Preparación de cuatro matrices sintéticas: agua ultrapura, disolución de glucosa, disolución de ftalato y matriz compuesta (eliminación de los analitos de interés).
Requerimientos del sistema cromatográfico.	Comparación referencias bibliográficas ( <i>APHA</i> , 1998; <i>ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; UNE-EN ISO 5667-3, 2004; USEPA Method 420.1, 1983</i> ).
Eliminación de interferentes por SPE.	Comparación referencias bibliográficas ( <i>OECD</i> , 1997).
Elección y preparación de muestras sintéticas.	Comparación referencias bibliográficas ( <i>APHA</i> , 1998; <i>ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; UNE-EN ISO 5667-3, 2004; USEPA Method 420.1, 1983</i> ).
Conservación de reactivos y patrones.	Comparación referencias bibliográficas ( <i>OECD</i> , 1997).
Conservación de la muestra.	Búsqueda de $\lambda_{\text{max}}$ del espectro de absorción.
Normalización del patrón concentrado de fenol.	Estudio del intervalo lineal de la curva de calibrado.
Elección de la longitud de onda óptima.	Eliminación de A&G inicialmente presentes en la matriz compuesta ( <i>UNE 77037, 1983</i> ). Volumen extractante ensayado: 50-500 mL. Aplicación a muestras con concentraciones comprendidas entre 10 y 5000 mg A&G·L <sup>-1</sup> y distintos tipos de A&G: aceites mineral, vegetal y patrón AE/H.
Establecimiento de la linealidad.	Ensayos con: aceite mineral, vegetal y patrón AE/H a concentraciones comprendidas entre 10 y 5000 mg A&G·L <sup>-1</sup> . Ensayos con muestras dopadas con SST a concentraciones comprendidas entre 50 y 2000 mg SST·L <sup>-1</sup> ( <i>UNE-EN 872, 2006</i> ). Confirmación de valores mínimos de blancos ensayados.
Aceites y grasas	Comparación referencias bibliográficas ( <i>APHA</i> , 1998; <i>ASTM 4281:95, 2005; UNE 77037, 1983; UNE 77038, 1983; UNE-EN ISO 5667-3, 2004; USEPA Method 1664, revA, 2010</i> ). Análisis y prueba estadística de los resultados tiempo/concentración de una muestra compuesta dopada con A&G.
Conservación de las muestras.	

Tabla 3.6: Características técnicas, objetivos de calidad perseguidos y su estimación durante la validación de la determinación de aniones, fenoles y aceites y grasas

Parámetros de validación	Método de análisis			Estimación
	Aniones $\text{F}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$	$\text{NO}_3^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$	Fenol	
<b>Selectividad</b>				
Rango de ensayo	$2.5\text{-}15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5\text{-}30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5\text{-}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{-}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Linealidad/ Sensibilidad	$r^2 > 0.99$ $\%DER < 10\%$	$0 \notin b \pm t s_b$ $0 \in a \pm t s_a$	No Aplica	$\bar{a}, \bar{b}, \bar{s}_a, \bar{s}_b, \bar{s}_e, r^2$ $Sensibilidad = S = \bar{b}$
Veracidad	$\%Er \leq 15 \text{ \%}$			$\%Er = \frac{\bar{x}_1 - \mu}{\mu} \cdot 100$
Precisión	$\%DER \leq 15 \text{ \%}$			ANOVA $\Rightarrow$ $S_{\text{reprod}} = \sqrt{\frac{s_{\text{dia}}^2 + s_{\text{anal}}^2 + s_{\text{dest}}^2 + s_{\text{r}}^2}{n}}$ $S_{\text{reprod}} = \sqrt{\frac{s_{\text{dia}}^2 + s_{\text{anal}}^2 + s_{\text{r}}^2}{n}}$ $\Rightarrow \%DER = \frac{S_{\text{reprod}}}{\bar{x}} \cdot 100$
Límite de cuantificación LoQ	$2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Límite superior LS	$6250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$12500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Rango de medida	$2.5\text{-}6250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5\text{-}12500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5\text{-}500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{-}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Dilución máxima	0.1:100	1:200	No Aplica	Tiene que cumplir los objetivos de precisión veracidad e incertidumbre impuestas como objetivos
Incertidumbre	$I \leq 25\%$			$U_{\text{veracidad}}^2 = U_{\text{precisión}}^2 + U_{\text{veracidad}}^2 + U_{\text{pretratamiento}}^2 + U_{\text{others}}^2$ $U_{\text{veracidad}} = U(\%) = \frac{\%Er_{\text{MAX}}}{\sqrt{3}} \cdot \frac{\mu}{100} \quad U_{\text{precisión}} = S_{\text{reproductibilidad}} (\text{ec. 3.4 y ec. 3.5})$ $U_{\text{pretratamiento}} = \text{No aplica}$ $U_{\text{others}} = U_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\sum_i \left( \frac{\partial y}{\partial x_i} \right)^2 \cdot U_x^2}$

Las estimaciones de los parámetros de validación, indicados para cada método en la Tabla 3.6, se obtuvieron a partir del análisis de muestras de control (muestras trazables) conjuntamente con un diseño de experimentos anidado donde los factores de variación controlados son fuentes potenciales de error que contribuyen a la incertidumbre total.

Las muestras de control analizadas durante la validación fueron disoluciones de concentración conocida del analito de interés, preparadas a partir de la disolución de los patrones químicos en una o varias matrices.

Las muestras de control necesarias para la validación de aniones se prepararon en cuatro matrices diferentes de aguas residuales incrementando su complejidad: agua ultrapura para evitar el efecto matriz, disolución de ftalato ácido de potasio (recomendado como patrón de materia orgánica expresada como DQO (*UNE 77004, 2002*)) y disolución de glucosa (recomendado como patrón de materia orgánica expresado como DBO<sub>5</sub> (*UNE-EN 1899-1, 1998*)), ambas para simular la materia orgánica y, por último, la matriz sintética compuesta descrita anteriormente. Para eliminar los aniones inicialmente presentes en la matriz sintética se empleó una resina intercambiadora de aniones. Una vez preparadas las cuatro matrices se elaboraron las muestras de control disolviendo las sales de los aniones a determinar.

Las muestras de control necesarias para la validación de fenol se prepararon a partir de fenol cristalizado disuelto en la matriz sintética, comprobando previamente la ausencia de fenol en esta última.

Tanto en las muestras de control preparadas para la validación de aniones como en las de la validación de fenol se ha optado por emplear como patrón químico los mismos reactivos usados en la realización de las rectas de calibrado. Por el contrario, para la preparación de las muestras de control necesarias en la validación del método de análisis de aceites y grasas, en el cual no se requiere recta de calibrado, se optó por emplear la mezcla compuesta por ácido esteárico y hexadecano, recomendada por la norma USEPA Method 1664 revB. Esta mezcla se añadió a la matriz sintética una vez eliminados por filtración los aceites y grasas iniciales, de acuerdo a la norma UNE 77037, 1983.

Las muestras de control de aniones y fenoles se prepararon a cinco niveles de concentración repartidos en el rango de medida, de modo que dos estaban incluidas en el rango de ensayo: la más diluida se correspondía con el límite de cuantificación, *LoQ*, y la segunda próxima al límite de rango instrumental. Las tres restantes estaban fuera del rango de ensayo pero en el rango de medida, siendo una de ellas el límite superior, *LS*. Las muestras de control de aceites y grasas estaban todas dentro del rango de ensayo. Las concentraciones de los diferentes analitos en las muestras de control se han recopilado en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Concentraciones de las muestras de control para cada método de ensayo, mg·L<sup>-1</sup>

Método		N <sub>1</sub> = LoQ	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub> = LS
Aniones	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup>	2.5	12	125	1250	6250
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5	25	250	2500	12500
Fenol	0.5	5	50	250	250	500
Aceites y grasas	10	50	250	1000	5000	

El material necesario, equipos de medida y equipos auxiliares para la aplicación del método de análisis, se han especificado en cada método de ensayo.

A continuación, se incluyen los esquemas de los diseños experimentales totalmente anidados de tres y cuatro factores empleados en la validación de los tres métodos de ensayo, las tablas de toma de datos experimentales y los cálculos estadísticos necesarios para el análisis de varianza.

Diseño de experimentos anidado de 3 factores: En la Fig. 3.6 aparece el esquema de un diseño de experimentos totalmente anidado de tres factores para un nivel de concentración. El primer factor, *i=tiempo*, se ha ensayado a cuatro niveles *q=4*; el segundo y tercer factores, *j=analista* y *k=réplica*, se han ensayado a dos niveles *p=n=2*. Este diseño experimental fue aplicado para la validación de la determinación de aniones y de aceites y grasas en aguas residuales y continentales. Para obtener los resultados experimentales del diseño, cada analista realizó dos réplicas de cada muestra de control un día a la semana durante cuatro semanas consecutivas.

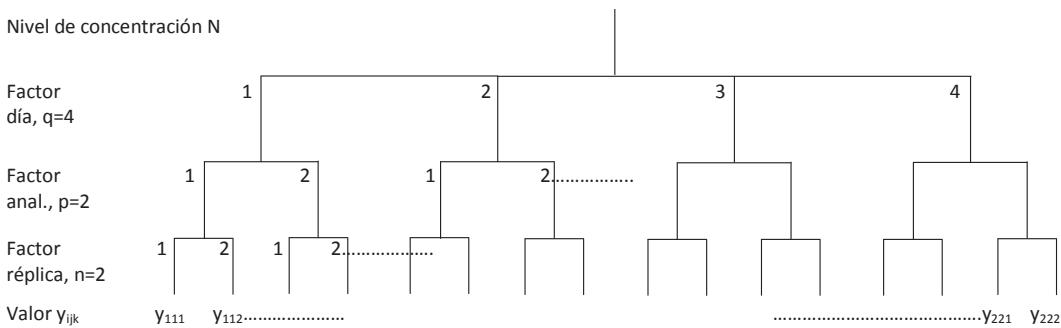


Fig. 3.6: Esquema del diseño experimental completamente anidado de tres factores para un nivel de concentración N<sub>i</sub>

En el caso de la determinación de aniones las muestras de control se prepararon en cantidad suficiente para realizar todos los ensayos programados para el diseño de experimentos, tomándose porciones de cada una de ellas cada día del análisis. Para el caso de la determinación de aceites y grasas, dada la imposibilidad de dividir las muestras, se prepararon tantas muestras de control, por duplicado, como experimentos tiene el diseño anidado aplicado. De este modo se abarcaba el periodo

de caducidad recomendado en el procedimiento y se incluía como factor de ruido al diseño de experimentos.

Dado que la determinación de aniones precisa de calibración del instrumento de medida, cada analista realizó una línea de calibrado cada día de experimentación, incluyéndose también como factor de ruido.

Diseño de experimentos anidado de 4 factores: En la Fig. 3.7 aparece el esquema de un diseño de experimentos totalmente anidado de cuatro factores para un nivel de concentración. El primer factor  $i=tiempo$  se ha ensayado a cuatro niveles,  $m=4$ . Los otros tres factores,  $j=analista$ ,  $k=destilación$  y  $l=réplica$ , se han ensayado a dos niveles  $q=p=n=2$ . Este diseño experimental fue aplicado para la validación de la determinación de fenol en aguas residuales y continentales mediante espectrofotometría UV-vis.

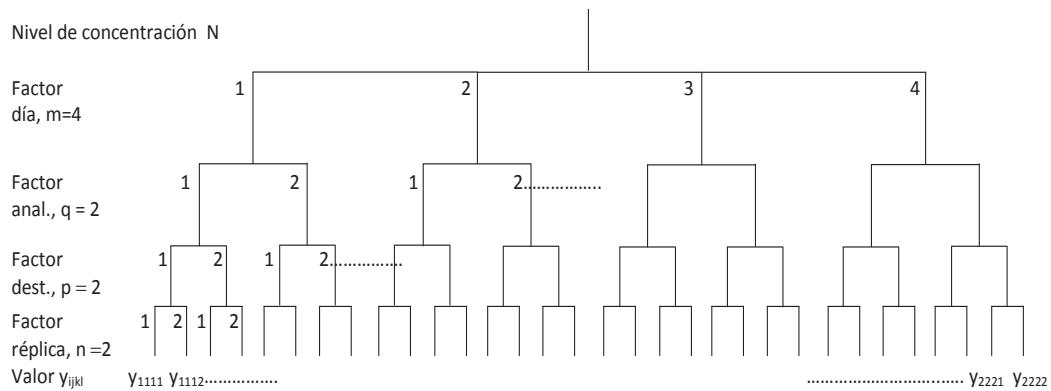


Fig. 3.7: Esquema del diseño experimental completamente anidado de cuatro factores para un nivel de concentración  $N_i$

Para obtener los resultados experimentales del diseño, cada analista realizó dos destilaciones de cada muestra de control un día a la semana durante cuatro semanas consecutivas, midiendo por duplicado el fenol en cada destilado. La caducidad de las muestras de control no fue en este caso un factor de ruido, puesto que las muestras de control se prepararon el mismo día de su análisis en la cantidad suficiente para la realización de todas las réplicas dado que la mayoría de fuentes consultadas recomendaban la realización de los ensayos antes de 24 horas a partir de la recepción de las muestras en el laboratorio. Se añadió como factor de ruido al diseño de experimentos la preparación de líneas de calibrado distintas por cada destilado.

La Tabla 3.8 y la Tabla 3.10 presentan los formularios para la recopilación y tratamiento de datos de los diseños experimentales. En la Tabla 3.9 y en la Tabla 3.11 quedan reflejadas las ecuaciones para el ANOVA, incluyendo las varianzas intermedias o varianzas asociadas a cada uno de los factores ensayados.

La precisión del método de análisis, expresada como reproducibilidad, se obtendrá a partir de las estimaciones de las varianzas obtenidas de los respectivos ANOVA's según

la ec. 3.4 para la determinación de aniones y aceites y grasas y la ec. 3.5 para la determinación de fenoles:

Tabla 3.8: Formulario y cálculos estadísticos intermedios para un diseño de experimentos anidado de 3 factores para un nivel de concentración N;

	Factor i, día 1		Factor i, día 2		Factor i, día 3		Factor i, día 4	
	Factor j analista 1	Factor j analista 2	Factor j anal. 1	Factor j anal. 2	...	...	...	...
Factor k réplica=1	$y_{ij1}$							
Factor k réplica=2	$y_{ij2}$							
$y_{ij}$	$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{2} \cdot (y_{ij1} + y_{ij2})$							
$w_{ij}$	$w_{ij} =  y_{ij1} - y_{ij2} $							
$y_i$		$\bar{y}_i = \frac{1}{2} \cdot (\bar{y}_{i1} + \bar{y}_{i2})$						
$w_i$		$w_i =  \bar{y}_{i1} - \bar{y}_{i2} $						
$y$			$\bar{y} = \frac{1}{q} \cdot \sum_i \bar{y}_i$					

Tabla 3.9: ANOVA para un diseño completamente anidado de 3 factores para un nivel de concentración N<sub>i</sub>

Fuente	Suma de cuadrados	gdL	Media cuadrática	Estimaciones de las varianzas
Factor i día	$SS_{día} = 4 \sum_i (\bar{y}_i)^2 - 4q(\bar{y})^2$	q-1	$MS_{día} = SS_{día}/(q-1)$	$s_{día}^2 = \frac{1}{4}(MS_{día} - MS_{anal})$
Factor j analista	$SS_{anal} = 2 \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2 = \sum_i w_i^2$	q	$MS_{anal} = SS_{anal}/q$	$s_{anal}^2 = \frac{1}{2}(MS_{anal} - MS_{réplica})$
Factor k réplica	$SS_{réplica} = \frac{1}{2} \sum_i \sum_j w_{ij}^2$	2q	$MS_{réplica} = s_{réplica}^2/(2q)$	$s_r^2 = MS_{réplica}$
Total	$SST = SS_{día} + SS_{anal} + SS_{réplica}$	4q-1		

$$\text{Reproducibilidad} = s_{reproducibilidad} = \sqrt{s_{día}^2 + s_{anal}^2 + s_r^2} \quad \text{ec. 3.4}$$

Tabla 3.10: Formulario y cálculos intermedios para un diseño de experimentos anidado de 4 factores para un nivel de concentración  $N_i$ 

Factor i, día 1				.....	Factor i, día 4
Factor j, analista 1		Factor j, analista 2		.....	.....
Factor k destilación 1	Factor k destilación 2	Factor k destilación 1	Factor K destilación 2	.....	.....
Factor I réplica 1	$y_{ijkl}$				
Factor I réplica 2	$y_{ijk2}$				
$y_{ijk}$	$\bar{y}_{ijk} = \frac{1}{2} \cdot (y_{ijkl} + y_{ijk2})$				
$w_{ijk}$	$w_{ijk} =  y_{ijkl} - y_{ijk2} $				
$y_{ij}$	$\bar{y}_{ij} = \frac{1}{2} \cdot (\bar{y}_{ij1} + \bar{y}_{ij2})$				
$w_{ij}$	$w_{ij} =  \bar{y}_{ij1} - \bar{y}_{ij2} $				
$y_i$		$\bar{y}_i = \frac{1}{2} \cdot (\bar{y}_{i1} + \bar{y}_{i2})$			
$w_i$		$w_i =  \bar{y}_{i1} - \bar{y}_{i2} $			
$y$		$\bar{y} = \frac{1}{m} \cdot \sum_i \bar{y}_i$			

 Tabla 3.11: ANOVA para un diseño completamente anidado de 4 factores para un nivel de concentración  $N_i$ 

Fuente	Suma de cuadrados	gdl	Media cuadrática	Estimaciones de las varianzas
Factor i día	$SS_{dia} = 8 \sum_i (\bar{y}_i)^2 - 8m(\bar{y})^2$	m-1	$MS_{dia} = SS_{dia}/(m-1)$	$s_{dia}^2 = \frac{1}{8}(MS_{dia} - MS_{anal})$
Factor j analista	$SS_{anal} = 2 \cdot \sum_i w_i^2$	m	$MS_{anal} = SS_{anal}/m$	$s_{anal}^2 = \frac{1}{4}(MS_{anal} - MS_{dest})$
Factor k destilación	$SS_{destilación} = \sum_i \sum_j w_{ij}^2$	2m	$MS_{dest} = SS_{dest}/(2m)$	$s_{dest}^2 = \frac{1}{2}(MS_{dest} - MS_{réplica})$
Factor I Residuo ó réplica	$SS_{réplica} = \frac{1}{2} \sum_i \sum_j \sum_k w_{ijk}^2$	4m	$MS_{réplica} = SS_{réplica}/(4m)$	$s_r^2 = MS_{réplica}$
Total	$SST = SS_{dia} + SS_{anal} + SS_{dest} + SS_{réplica}$	8m-1		

$$\text{Reproducibilidad} = s_{reprod} = \sqrt{s_{dia}^2 + s_{anal}^2 + s_{dest}^2 + s_r^2}$$

ec. 3.5

Como podemos ver, la varianza de reproducibilidad,  $s_{reproducibilidad}^2$ , se obtiene como sumatorio de las estimaciones de las varianzas de cada factor, pero si el proceso matemático genera algún término negativo, éste se anula y se considera que el factor no contribuye a la falta de precisión del método de ensayo.

Algunos factores controlables que podrían influir en la reproducibilidad de los resultados como la renovación de disoluciones, el uso de distintos equipos auxiliares (pH-metros, estufas...) o la variabilidad en el tratamiento de las muestras de control (dilución) fueron incluidos como factor de ruido durante la realización de los análisis del diseño de experimentos.

La Tabla 3.6 resume el tratamiento estadístico aplicado a los resultados para evaluar el resto de parámetro de validación.

Una vez validado el método de análisis los valores obtenidos se deben comparar con los objetivos propuestos para comprobar la consecución de los mismos. En caso contrario se propondrán nuevos objetivos y se evaluarán de nuevo, siempre y cuando los nuevos objetivos no afecten a la finalidad para la que se pretendía el método.

El método una vez validado se someterá a controles de calidad internos periódicos para verificar la calidad de los resultados analíticos obtenidos por el laboratorio. Para ello se ensayarán, con una frecuencia establecida, una o varias muestras control por duplicado, a fin de tener un seguimiento de la variación de la veracidad y precisión del método. La herramienta más adecuada para este fin es el uso de gráficos de control (*Montgomery, 2005*).

De los gráficos de control disponibles se han elegido los siguientes: para la determinación de aniones y aceites y grasas el de medias y rangos ( $\bar{X}/R$ ) y para la determinación de fenol el de valores individuales y rangos móviles, ( $X/RM$ ). Las líneas de los gráficos se estimarán a partir de los valores obtenidos, durante la validación del método correspondiente, de dos de las muestras de control elegidas de entre los cinco niveles de concentración ensayados durante el diseño de experimentos: el nivel inferior, coincidente con el LoQ, se elige por ser más complicada su determinación exacta dado que presenta una incertidumbre relativa más elevada; como segundo nivel se selecciona una concentración intermedia.

## **3.4. EQUIPOS DE MEDIDA EMPLEADOS**

### **3.4.1. BALANZAS**

Están presentes en el desarrollo de casi todos los métodos analíticos durante la pesada de las sustancias necesarias para preparar disoluciones, patrones y controles de calidad. Para asegurar la trazabilidad de las medidas, que afecta a la calidad de los resultados, se hizo necesario un control exhaustivo de su funcionamiento mediante calibraciones y verificaciones periódicas frente a juegos de masas patrón primario y secundario, respectivamente.

Las balanzas analíticas empleadas durante la realización de esta Tesis fueron las siguientes: balanza analítica marca Sartorius modelo 1601 AMP8-1, con un rango de trabajo de 0.0001 a 110 g; balanza analítica marca Sartorius modelo BP210S, con un rango de trabajo de 0.0001 a 210 g. Estas dos balanzas se emplearon para preparar las disoluciones necesarias para la realización de los ensayos de validación. Otras balanzas y granatarios empleadas para la calibración y verificación del material volumétrico fueron: balanza de precisión marca Precisa modelo 610C, con un rango de trabajo de 0.5 a 610 g; balanza granatario marca Mettler-Toledo modelo BP3001, con un rango de trabajo de 5 a 3100 g. Todas ellas se calibraron y verificaron como se describe a continuación.

### **Calibración**

Como cualquier otro instrumento, las medidas proporcionadas por las balanzas están sujetas a un error que depende del proceso de medida y de las condiciones de trabajo, y que normalmente se estima como incertidumbre durante su calibración. El método empleado para su calibración es el de medida directa, comparando las lecturas proporcionadas por la balanza con el valor nominal de un juego de masas patrón, clase F1 (*OILM, 2004*). Se debe calibrar la balanza en todo el rango de medida.

Las balanzas deben estar limpias, niveladas y ubicadas en un sitio libre de vibraciones y fuentes de calor. Se deposita el juego de masas patrón, clase F1, junto a la balanza al menos 24 horas antes del inicio de la calibración, asegurándose que las condiciones ambientales en la sala de balanzas durante el periodo que dure la calibración son estables y están dentro de los siguientes intervalos:  $50 \pm 20\%$  de humedad relativa y  $25 \pm 10^\circ\text{C}$  de temperatura, con una variación máxima de temperatura de  $3^\circ\text{C}$ .

Se realizan 10 series de pesadas, inicialmente en orden ascendente de masa y posteriormente descendente, variando la posición de la masa en la balanza. De esta forma, la variabilidad de los resultados recoge más fuentes de variación que si cada masa se midiese de forma seguida.

Para la medida de la histéresis se comprueba que la balanza recupera el valor de una masa,  $M$ , después de retirar otra de mayor masa,  $M^*$ .

Para estimar la incertidumbre debida al tarado se tara la balanza a mitad de rango y se van depositando masas patrón en orden creciente hasta superar el valor de la tara.

### **Cálculo de la corrección**

Se calcula la corrección para cada uno de los puntos de calibración  $i$ , del siguiente modo:

$$\text{cor}_i = M_{\text{media}} - M_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.6}$$

$$M_{\text{real}} = M_{\text{nominal}} + \text{cor}_{\text{pat}} \quad \text{ec. 3.7}$$

El valor medio de masa,  $M_{media}$ , debe ser corregido por el empuje del aire. Este efecto es consecuencia directa del principio de Arquímedes (González et al., 2005; Riu et al., 2001a) y hace que los valores de masa proporcionados por la balanza sean inferiores a su valor verdadero. Por tanto, la ecuación anterior pasa a ser la siguiente:

$$cor_i = M_{real} - M_{media} \cdot \left( 1 - \frac{\rho_{aire}}{\rho_{pesa}} \right) \quad ec. 3.8$$

siendo  $\rho_{aire}$  la densidad del aire en el momento de la calibración y  $\rho_{pesa}$  la densidad de la masa patrón. Este efecto se puede considerar despreciable frente al valor nominal de cada masa y en la práctica se ha despreciado (Reichmuth et al., 2004).

### Estimación de la incertidumbre

Para estimar la incertidumbre se aplicó el método de propagación de errores descrito en el *Apartado 2.4.1. (JCGM 100, 2008)*.

En primer lugar se identifican las fuentes que contribuyen a la incertidumbre final de los resultados proporcionados por las balanzas. En la Fig. 3.8 podemos ver que, dentro del grupo de otras contribuciones esquematizadas en la Fig. 2.23, se ha incluido una nueva contribución debida a la deriva de la linealidad.

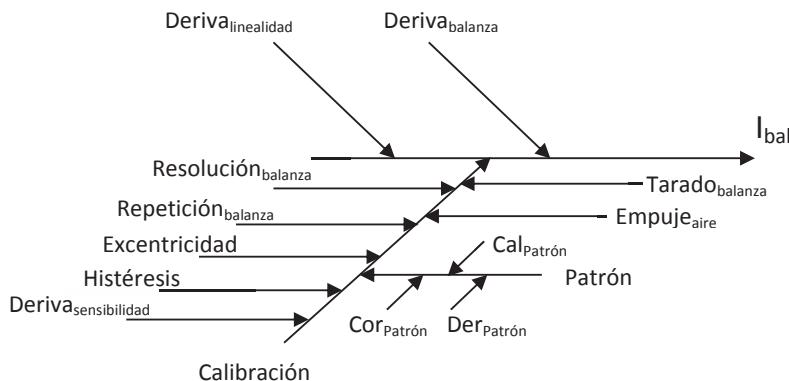


Fig. 3.8: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de la balanza

En cuanto a las contribuciones estimadas durante la calibración, podemos incluir contribuciones debidas a la deriva de sensibilidad, excentricidad, histéresis, empuje del aire y tara de la balanza.

Una vez identificadas las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final, la siguiente etapa es estimarlas en cada punto de calibración. La Tabla 3.12 muestra las ecuaciones empleadas para cuantificar estas fuentes de incertidumbre. Se han omitido en esta tabla los coeficientes de sensibilidad al ser, para todas las contribuciones, la unidad.

Tabla 3.12: Quantificación de las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de una balanza en cada punto de calibración,  $i$ 

Fuente de incertidumbre	Estimación
Deriva de la balanza  Se evalúa a través de la máxima diferencia entre la incertidumbre de los certificados de calibración de la balanza (CEM ME-005).	$U_{der} = \frac{dmc}{\sqrt{3}}$  $dmc = (U_{bal})_{max} - (U_{bal})_{min}$
Deriva de linealidad  La no linealidad define la anchura de la banda, dentro de la cual puede producirse una desviación positiva o negativa del valor medido a partir de la línea característica ideal. Se obtiene a partir de desviación de la linealidad, <i>desv.linealidad</i> , indicada en las especificaciones de cada balanza (González et al., 2005; Mettler-Toledo, 2000; Reichmuth, 2001; Reichmuth et al., 2004).	$U_{der-lineal} = \frac{desv.linealidad}{\sqrt{3}}$
Calibración  Debida a la propia variabilidad de las medidas dadas por el equipo en un momento dado. Se obtiene en cada punto de calibración como combinación de diversas fuentes de error.	$U_{cal-i} = \sqrt{\frac{U_{rep}^2 + U_{res}^2 + U_{der-sen}^2 + U_{histo}^2}{1 + U_{excen}^2 + U_{tara}^2 + U_{emp}^2 + U_{pat}^2}}$
Repetibilidad de las medidas  Se evalúa a partir de la desviación típica de $N$ medidas repetidas del patrón (González et al., 2005; González et al., 2007b).	$U_{rep} = \frac{s_{masa}}{\sqrt{N}}$
Resolución del equipo  Se obtiene a partir de las especificaciones técnicas del equipo, <i>resolución</i> (CEM ME-005; Reichmuth, 2001).	$U_{res} = \frac{resolución}{2 \cdot \sqrt{3}}$
Deriva de la sensibilidad  Se trabaja habitualmente, $\Delta t$ . Se obtiene en cada punto de calibración a partir de sensibilidad, <i>sen</i> , indicada en las especificaciones de cada balanza (Gläser, 1999; González et al., 2007b; 2005; Maroto et al., 2002b; Reichmuth, 2001; Reichmuth et al., 2004).	$U_{der-sen} = \frac{sen \cdot \Delta t \cdot M_{pat}}{\sqrt{3}}$
Histeresis  Debida al rozamiento o fricciones entre las piezas móviles de la balanza. Se evalúa como la diferencia entre las lecturas inicial, $M_{inicial}$ y final $M_{final}$ , después de una medida, $M^*$ (Clarck, s.f.; Croarkin, 2010).	$U_{histe} = \frac{ M_{inicial} - M_{final} }{\sqrt{3}}$
Excentricidad  Debida a la variación por pesar en distintos puntos del platillo de la balanza. Se estima como la diferencia entre el valor medio en el punto central, $\bar{M}_{i-1'}$ y el máximo valor obtenido de los puntos más alejados del centro del platillo, $M_{mas-alejado}$ , a $\frac{1}{2}$ de la máxima capacidad de la balanza (CEM ME-005; González et al., 2007b; Reichmuth, 2001; Reichmuth et al., 2004).	$U_{excen} = \frac{\bar{M}_{i-1'} - M_{mas-alejado}}{\sqrt{3}}$

Tabla 3.12 (cont.): Cuantificación de las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de una balanza en cada punto de calibración,  $i$ 

Fuente de incertidumbre		Estimación
Tara	Consiste en comprobar que la balanza recupera el valor de la tara después de una medida. Para ello se tara la balanza a un $\frac{1}{2}$ de su capacidad máxima, $M_{tara}$ , y se realizan pesadas de masas crecientes, $M_{real}$ . Se evalúa a partir de la diferencia entre el valor leído, $M_{leída}$ , y el valor nominal tarado, $M_{nominal\ tarado}$ , siendo este último la diferencia entre el valor real, $M_{real}$ menos el valor de la tara $M_{tara}$ .	$U_{tara} = \frac{ M_{leída} - M_{nominal\ tarado} }{\sqrt{3}}$ $M_{nominal\ tarado} = M_{real} - M_{tara}$
Empuje de aire	Es la debida al empuje del aire sobre la pesa, se evalúa mediante la siguiente aproximación (CEM ME-005; González et al., 2007b).	$U_{emp} = \frac{Tol}{4 \cdot M_{pat} \cdot \sqrt{3}}$
Variabilidad patrón (EURAMET/cg-18/v.02,2009)	<p>Es una calibración directa; se obtiene a partir de la combinación de las siguientes contribuciones:</p> <p>Calibración Se estima dividiendo la incertidumbre del patrón, <math>I_{patrón}</math>, por el coeficiente de cobertura <math>K</math> del patrón ambos indicados en el certificado de calibración (CEM ME-005).</p> <p>Corrección Se evalúa a partir de la diferencia entre el valor certificado y el valor nominal del patrón del patrón (CEM ME-005).</p> <p>Deriva del Se evalúa a través de la máxima diferencia entre la incertidumbre de los certificados de calibración del patrón (CEM ME-005).</p>	$U_{pat} = \sqrt{U_{cal-pat}^2 + U_{cor-pat}^2 + U_{der-pat}^2}$ $U_{cal-pat} = \frac{I_{patrón}}{K}$ $U_{cor-pat} = \frac{COI_{patrón}}{\sqrt{3}}$ $U_{der-pat} = \frac{dmC_{patrón}}{\sqrt{3}}$ $dmC_{patrón} = (U_{patrón})_{max} - (U_{patrón})_{min}$

$$U_{bal-i} = \sqrt{U_{der}^2 + U_{der-lineal}^2 + U_{cal-i}^2}$$

ec. 3.9

Por último, se obtiene la incertidumbre combinada en cada punto de calibración,  $u_{bal-i}$ , aplicando la ley de propagación de errores, ec. 3.9. La incertidumbre total expandida de la balanza,  $I_{bal-i}$ , se obtiene multiplicado el valor de la incertidumbre combinada por el factor de cobertura,  $K$ .

La balanza se considera apta para su uso si se cumple, para cada punto de calibración  $i$ , las condiciones que se muestran en la Tabla 3.13, y se le asignará como incertidumbre de equipo,  $I_{bal}$ , la incertidumbre máxima de las obtenidas en cada punto de calibración.

Tabla 3.13: Condiciones de validez para la calibración de las balanzas

$\frac{Tol}{I_{bal}} > 3$
$ cor_i  +  I_{bal-i}  < Tol$
$Verac_i = cor_i < Verac_{nominal}$
$Rep_i = s_{masa-i} < Rep_{nominal}$

En la Tabla 3.14 quedan recogidas las tolerancias, y veracidad y reproducibilidad nominales asignadas a cada balanza según el rango de trabajo.

Tabla 3.14: Tolerancia y condiciones nominales asignada a las distintas balanzas

Rango de trabajo (g)	Tol (g)	Verac <sub>nominal</sub>	Rep <sub>nominal</sub>
0.0001 a 110	0.0025	2 × resolución	2 × resolución
0.0001 a 210	0.0015		
0.01 a 610	0.15		
0.1 a 3100	0.35		

En Tabla A.I.1 del Anexo I se muestra la hoja de cálculo empleada para recoger los datos y realizar los cálculos en la calibración de las balanzas utilizadas en este trabajo.

## Verificación

La verificación de las balanzas se realiza para comprobar que estas siguen siendo aptas entre calibraciones. Se comparan las lecturas, en varios puntos de verificación  $i$ , con el valor nominal de las masas patrón secundario, clase M1 (*OILM, 2004*) depositadas al lado de la balanza al menos 2 horas antes de verificar las balanzas. Al igual que la calibración, se realiza en todo el rango de medida. Para decidir si las balanzas siguen siendo aptas para el uso, se realizan cinco medidas y se calcula la corrección para cada valor nominal de las masas patrón utilizadas, de la siguiente manera:

$$\text{cor}_{\text{ver}-i} = M_{\text{media}} - M_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.10}$$

Las balanzas siguen siendo aptas para el uso si se cumple, para cada punto de verificación,  $i$ , que la corrección,  $\text{cor}_{\text{ver}}$ , más la incertidumbre de la balanza,  $I_{\text{bal}}$  estimada durante su calibración, es menor que la tolerancia,  $Tol$ , asignada a la balanza:

$$|\text{cor}_{\text{ver}-i}| + |I_{\text{bal}}| < \text{Tol} \quad \text{ec. 3.11}$$

En el Anexo I se encuentra la tabla empleada en la verificación de las balanzas utilizadas en esta Tesis, Tabla A.I.2.

### Mantenimiento

El mantenimiento consta únicamente de operaciones de limpieza que se realizan siguiendo las instrucciones del fabricante de la balanza.

### 3.4.2. MATERIAL VOLUMÉTRICO

Al igual que las balanzas, el material volumétrico se utiliza en todos los métodos analíticos durante la realización de disoluciones y diluciones. Por tanto, se hizo necesario un control exhaustivo de su estado mediante calibraciones y verificaciones periódicas.

#### Calibración

Para la calibración se emplea el método gravimétrico que consiste en determinar el valor de masa de un líquido de densidad conocida, normalmente agua destilada, que puede contener el material volumétrico (UNE-EN ISO 3696, 1996; UNE-EN-ISO 8655-6, 2003). En el caso de pipetas y buretas se hace por vertido, esto es, se tara la balanza con el recipiente colector y se pesa el volumen vertido. En el caso de matraces y probetas se tara la balanza con el recipiente vacío y a continuación se pesa lleno de agua hasta la marca. La masa de agua pesada se relaciona con el volumen real teniendo en cuenta la incertidumbre de la balanza, el empuje del aire, la dilatación térmica de los materiales (vidrio, plástico, acero) y la diferencia de temperatura respecto a la temperatura de referencia (20°C) y la temperatura del recipiente durante las mediciones (ASTM E542-01, 2007; Blaubrand, 2004; UNE-EN ISO 4787, 2010). En caso de ser material volumétrico de volumen fijo el volumen de ensayo será el volumen nominal. Para el caso de material volumétrico de volumen variable se ensayarán al menos en tres volúmenes: el volumen nominal, aproximadamente al 50% del volumen nominal y el límite inferior del intervalo de volumen útil (UNE-EN-ISO 8655-6, 2003).

Antes de calibrar el material volumétrico se debe mantener el agua destilada en la sala donde se realice la calibración al menos durante 24 h, y debe asegurarse que el material volumétrico está limpio y seco (*Riu et al., 2002*).

Durante la calibración se deberán registrar la temperatura ambiental, la temperatura del agua, la presión barométrica y la humedad, las cuales deberán estar dentro de unos intervalos y su variación no debe superar un valor dado. En la Tabla 3.15 aparecen los intervalos y variaciones permitidas (*UNE-EN ISO 4787, 2010; UNE-EN-ISO 8655-6, 2003*).

Tabla 3.15: Condiciones ambientales necesarias durante la calibración del material volumétrico

Parámetro	Intervalo calibración	Variación permitido	Resolución equipos de medida
T <sup>a</sup> agua (°C), t <sub>w</sub>	15-25	± 0.5	≤ 0.2
T <sup>a</sup> aire(°C), t <sub>a</sub>	18-28 ±0.5	± 2.5	≤ 0.2
Humedad, %H	30-90	± 10	≤ 10
Presión (mbar), p	930-1040	± 8	≤ 5

Cuando se utiliza un segundo equipo para realizar calibraciones como es este caso, es fundamental que este tenga la resolución adecuada. En primer lugar para que esté en concordancia con el rango a medir y en segundo lugar, ya que si ésta es demasiado alta repercute en el valor de la incertidumbre. En este caso el equipo secundario empleado es una balanza la cual debe estar calibrada, con resolución 10 veces mejor que la tolerancia del material a calibrar. Para microvolúmenes, las características técnicas de la balanza deberán estar de acuerdo a los siguientes requerimientos indicados en la Tabla 3.16 (*CENAM EMA., 2009; UNE-EN ISO 4787, 2010; UNE-EN-ISO 8655-6, 2003*):

Tabla 3.16: Requisitos de las balanzas empleadas durante la calibración del material volumétrico

Volumen seleccionado V	Resolución (mg)	Repetibilidad y linealidad (mg)	Incertidumbre típica de medición (mg)
1 µL ≤ V ≤ 10 µL	0.001	0.002	0.002
10 µL ≤ V ≤ 100 µL	0.01	0.02	0.02
100 µL ≤ V ≤ 1000 µL	0.1	0.2	0.2
1 mL ≤ V ≤ 10 mL	0.1	0.2	0.2
10 mL ≤ V ≤ 200 mL	1	2	2

El volumen a 20°C,  $V_{20}$ , se calcula multiplicando la masa media, obtenida al pesar el contenido del material volumétrico al menos 10 veces, por un factor de corrección volumétrico Z (*Trujillo et al., 2002; UNE-EN ISO 4787, 2010; UNE-EN-ISO 8655-6, 2003*):

$$V_{20} = M_{\text{media}} \cdot Z \quad \text{ec. 3.12}$$

donde  $Z$  es

$$Z = \left( \frac{1}{\rho_w - \rho_{\text{aire}}} \right) \cdot \left( 1 - \frac{\rho_{\text{aire}}}{\rho_{\text{pesa}}} \right) \cdot (1 - \gamma \cdot (t_w - 20)) \quad \text{ec. 3.13}$$

En esta expresión,  $M_{\text{media}}$  simboliza la masa media pesada de 10 determinaciones;  $t_w$  es la temperatura del agua en °C (entre 5 y 40°C);  $\rho_{\text{pesa}}$  es la densidad de la masa específica del peso de ajuste de la balanza ( $\approx 7.8 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ );  $\rho_w$  es la densidad del agua saturada de aire, y su dependencia con la temperatura viene regida por la fórmula de Kell modificada (Jones et al., 1992):

$$\rho_w = (999.85308 + 6.32693 \cdot 10^{-2} \cdot t_w - 8.523829 \cdot 10^{-3} \cdot t_w^2 + 6.943248 \cdot 10^{-5} \cdot t_w^3 - 3.821216 \cdot 10^{-7} \cdot t_w^7) / 1000 \quad \text{ec. 3.14}$$

$\gamma$  es el coeficiente de expansión del material con el que está fabricado el material volumétrico (ASTM E542-01, 2007; Blaubrand, 2004; UNE-EN ISO 4787, 2010)

Tabla 3.17: Coeficientes de expansión de distintos materiales

Material	$\gamma$ (°C <sup>-1</sup> )
Vidrio borosilicatado, VBS	$9.9 \cdot 10^{-6}$
Vidrio de soda, VS	$27 \cdot 10^{-6}$
Poliestireno	$210 \cdot 10^{-6}$
Policarbonato	$450 \cdot 10^{-6}$
Polipropileno	$240 \cdot 10^{-6}$

$\rho_{\text{aire}}$  es la densidad del aire, que es función de la presión, humedad relativa y temperatura. Se calcula como se indica a continuación (Becerra et al., 2001; Davis, 1992).

$$\rho_{\text{aire}} = \frac{p \cdot M_a}{z \cdot R \cdot T} \cdot \left[ 1 - x_v \cdot \left( 1 - \frac{M_v}{M_a} \right) \right] \quad \text{ec. 3.15}$$

donde  $p$  es la presión atmosférica en Pa,  $M_a$  es la masa molar del aire seco igual a  $0.0289635 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $R$  es la constante molar de los gases,  $8.31451 \text{ J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $T$  es la temperatura expresada en K,  $M_v$  es la masa molar del vapor de agua,  $0.0180154 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$  y  $x_v$  es la fracción molar de vapor de agua; la fórmula para su cálculo es la siguiente (Davis, 1992):

$$x_V = \frac{\frac{\%HR}{100} \cdot (1.0062 + 3.14 \cdot 10^{-8} \cdot p + 5.6 \cdot 10^{-7} \cdot t_a^2)}{e^{\left( \frac{1.2378847 \cdot 10^{-5} \cdot T^2 - 1.912131610^{-2} \cdot T + 33.93711047 + \frac{-6.343164510^2}{T}}{p} \right)}} \quad ec. 3.16$$

Siendo,  $t_a$ , la temperatura ambiente en °C,  $T$  la temperatura ambiente en K y %HR la humedad relativa.

$z$  es el factor de compresibilidad adimensional (Davis, 1992).

$$z = 1 - \frac{p}{T} [a_0 + a_1 \cdot t_a + a_2 \cdot t_a^2 + (b_0 + b_1 \cdot t_a) \cdot x_V + (c_0 + c_1 \cdot t_a) \cdot x_V^2] + \frac{p^2}{T^2} (d + E \cdot x_V^2) \quad ec. 3.17$$

siendo:

$$\begin{aligned} a_0 &= 1.58123 \cdot 10^{-6} \text{ K Pa}^{-1} & a_1 &= -2.9331 \cdot 10^{-8} \text{ Pa}^{-1} & a_2 &= 1.1043 \cdot 10^{-10} \text{ K}^{-1} \text{ Pa}^{-1} \\ b_0 &= 5.7070 \cdot 10^{-6} \text{ K Pa}^{-1} & b_1 &= -2.05 \cdot 10^{-8} \text{ Pa}^{-1} & c_0 &= 1.9898 \cdot 10^{-8} \text{ K Pa}^{-1} \\ c_1 &= -2.3760 \cdot 10^{-6} \text{ Pa}^{-1} & d &= 1.83 \cdot 10^{-11} \text{ K}^2 \text{ Pa}^{-2} & E &= 7.65 \cdot 10^{-9} \text{ K}^2 \text{ Pa}^{-2} \end{aligned}$$

Una forma más simplificada de calcular la densidad del aire, no empleada en este trabajo, es la siguiente (EURAMET/cg-18/v.02, 2009):

$$\rho_{\text{aire}} = \frac{3.48444 \cdot 10^{-6} \cdot p - \%HR \cdot [2.52 \cdot 10^{-6} \cdot t_a - 2.0582 \cdot 10^{-5}]}{T} \quad ec. 3.18$$

También pueden emplearse las tablas incluidas en la norma UNE-EN ISO 4787, que reúnen los valores del factor de corrección volumétrico, Z, así como densidades del agua y del aire a distintas temperaturas y presión atmosférica (UNE-EN ISO 4787, 2010).

La pérdida por evaporación puede ser un factor relevante cuando se trabaja con volúmenes reducidos. Para determinar la pérdida de masa, se llena de agua el recipiente a pesar, se observa la lectura obtenida y se pone en marcha un cronómetro. Se comprueba como disminuyen los valores al cabo de 30 segundos comparando con la lectura a tiempo cero. En caso de tapar el recipiente no es preciso, por lo general, que se corrija la evaporación (Batista et al., 2007; UNE-EN-ISO 8655-6, 2003).

### Cálculo de la corrección

Se calcula, para cada uno de los volúmenes a calibrar, la corrección,  $cor_i$ , del siguiente modo:

$$\text{cor}_i = V_{20} - V_{\text{nominal}}$$

ec. 3.19

### **Estimación de la incertidumbre del material volumétrico**

La incertidumbre se ha estimado aplicando el método de propagación de errores, descrito en el *Apartado 2.4.1.* (*Batista et al., 2007; Blues et al., 2004; JCGM 100, 2008; UNE-EN ISO 4787, 2010; UNE 400331 IN, 2003*).

Las contribuciones tenidas en cuenta para la estimación de la incertidumbre del cálculo del volumen quedan resumidas en la siguiente figura (*Bailón Pérez et al., 2005*):

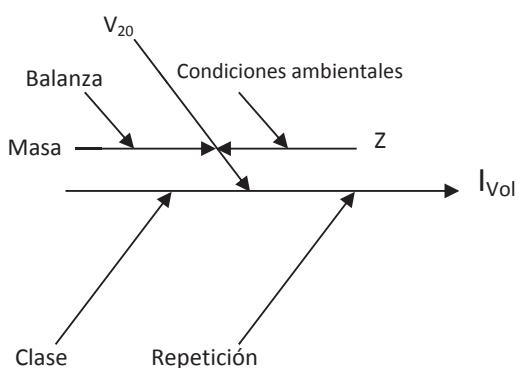


Fig. 3.9: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre total del material volumétrico

Una vez identificadas las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final, la siguiente etapa es estimarlas para cada uno de los volúmenes a calibrar. La Tabla 3.18 muestra las ecuaciones empleadas para cuantificar cada una de estas fuentes de incertidumbre. Se han incluido en esta tabla los coeficientes de sensibilidad por ser distintos de la unidad para algunas contribuciones.

Por último, se obtiene la incertidumbre combinada,  $u_{\text{vol},i}$ , aplicando la ley de propagación de errores descrita en la ec. 3.20, y se multiplica por el factor de cobertura,  $K$ , para obtener la incertidumbre total expandida,  $I_{\text{vol},i}$ .

Tabla 3.18: Cuantificación de las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbres del material volumétrico en cada punto de calibración,  $i$ 

Fuente de incertidumbre	Coefficiente de sensibilidad	Estimación
Volumen del material a calibrar	1	$u_{V-20}$
Se determina aplicando la ley de propagación de errores sobre la expresión general $V_{20} = M_{\text{media}} \cdot Z$ .	$\frac{V_{20}}{M_{\text{media}}} = Z$	$u_{M_{\text{media}}} = u_{\text{bal}} = \frac{l_{\text{bal}}}{K}$
Variación de la masa (UNE-EN ISO 4787, 2010).	$\left( \frac{V_{20}}{Z} \right)$	$u_Z = \frac{Z_{\max} - Z_{\min}}{2 \cdot \sqrt{3}}$
Se obtiene considerando los valores máximos y mínimos que el parámetro $Z$ puede tomar durante la calibración de acuerdo a la variación de las variables $t_w$ , $t_a$ , $\%HR$ y $\rho$ (Bailón Pérez et al., 2005; Muñoz et al. 2003). $Z_{\max}$ = cuando $t_w$ , $t_a$ y $\%HR$ son máximas y $\rho$ es mínima $Z_{\min}$ = cuando $t_w$ , $t_a$ y $\%HR$ son mínimas y $\rho$ es máxima	$\frac{V_{20}}{M_{\text{media}}} = Z$	$u_{\text{rep}} = \frac{s_{\text{masa}}}{\sqrt{N}}$
Repetibilidad de las medidas Se obtiene a partir de $N$ medidas repetidas de la masa del agua contenida o dosificada por el material volumétrico durante la calibración.	$\frac{V_{20}}{M_{\text{media}}} = Z$	$u_{\text{clase}} = \frac{tol}{\sqrt{3}}$
Variación asociada a la clase del equipo Se estima de forma diferente dependiendo del tipo de material volumétrico (Bailón Pérez et al., 2005; Muñoz et al. 2003).	1	$u_{\text{clase}}$
Equipos de volumen fijo Se evalúa a partir de la tolerancia, $tol$ , indicada por el fabricante.	1	$u_{\text{clase}} = \frac{tol}{\sqrt{3}}$
Equipos de volumen variable Se evalúa a partir de la resolución o mínima división de la escala del material volumétrico.	1	$u_{\text{clase}} = \frac{\text{resolución}}{2 \cdot \sqrt{3}}$

$$u_{\text{vol-i}} = \sqrt{\left( \frac{V_{20}}{M_{\text{media}}} \right)^2 \cdot u_{\text{bal}}^2 + \left( \frac{V_{20}}{Z} \right)^2 \cdot u_Z^2 + \left( \frac{V_{20}}{M_{\text{media}}} \right)^2 \cdot u_{\text{rep}}^2 + u_{\text{clase}}^2}$$

ec. 3.20

Se considera que el material volumétrico es apto para el uso si se cumple, para cada volumen calibrado, las condiciones reflejadas en la Tabla 3.19, y se le asignará la incertidumbre máxima de las obtenidas para cada volumen como incertidumbre de equipo,  $I_{vol}$ :

Tabla 3.19: Condiciones de validez para la calibración del material volumétrico

$\frac{Tol}{3} > 3$
$ cor_i  +  vol_i  < Tol$
$Verac_i = cor_i < Verac_{nominal}$
$Rep_i = s_{masa} \cdot Z < Rep_{nominal}$

En la Tabla 3.20 se indican los valores de la tolerancia, y veracidad y reproducibilidad nominales que hemos impuesto a cada tipo de material volumétrico.

Tabla 3.20: Tolerancias y condiciones nominales asignadas al material volumétrico

Material volumétrico		Tolerancia	Verac <sub>nominal</sub>	Rep <sub>nominal</sub>
Matraces		0.5% V <sub>nominal</sub>	tol	tol/2
Probetas		0.5% V <sub>nominal</sub>	tol	tol/2
Pipetas	Aforadas	0.5% V <sub>nominal</sub>	tol	tol/2
	Graduadas	resolución	tol	tol/2
Micropipetas		Verac +2×rep	UNE-EN-ISO 8655, 2003	

En caso de superarse estos valores, el material se considera no apto y será desestimado para sus funciones.

En el Anexo I se encuentran las tablas empleadas para la toma de datos y realización de los cálculos durante la calibración del material volumétrico empleado en este trabajo, Tabla A.I.3 a Tabla A.I.5.

## Verificación

De todo el material volumétrico solo es necesario verificar periódicamente aquel que tenga partes móviles como las micropipetas, dosificadores...

Para ello se realizan cinco medidas de la misma forma que la calibración y se calcula el volumen,  $V_{20}$  según la ec. 3.12. Para verificar la validez de los datos se calcula la veracidad y repetibilidad y se comprueba que los resultados son menores que los nominales especificados por la normas UNE-EN-ISO 8655 (*UNE-EN-ISO 8655, 2003*).

En el Anexo I se encuentra la tabla de toma de datos y cálculos usada en la verificación del material volumétrico empleado en esta Tesis, Tabla A.I.6.

### 3.4.3. ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA VISIBLE

Se empleó un espectrómetro de UV-vis *Shimadzu UV-1603* para la determinación de fenol. Al igual que el resto de equipos de medida, se aseguró la trazabilidad de las medidas que afectan a la calidad de los resultados, en este caso absorbancia y longitud de onda. Por tanto, se hizo necesario un control exhaustivo de su funcionamiento mediante calibraciones y verificaciones periódicas frente a juegos de filtros patrón de absorbancia y longitud de onda (*Holcombe et al., 2001*).

#### Calibración

Las medidas proporcionadas por el espectrofotómetro están sujetas a un error que depende del proceso de medida y de las condiciones de trabajo, error que estimamos anualmente como incertidumbre durante su calibración. El método empleado para su calibración es el de medida directa, comparando las lecturas proporcionadas por el equipo con el valor nominal de un juego de filtros patrón.

Un espectrofotómetro de ultravioleta-visible, en función de su forma de trabajo, puede realizar a determinadas longitudes de onda medidas directas de absorbancia (por ejemplo, determinación del color en aguas residuales (*UNE-EN ISO 7887, 2012*) o indirectas, por lo que requerirá una calibración con disoluciones patrón. En ambos casos, los valores de absorbancia se registran a una longitud de onda determinada de modo que el equipo debe estar calibrado en longitud de onda antes de ser calibrado en absorbancia (*Burke et al., 1983*).

Para la realización de la calibración, el espectrofotómetro deberá estar estabilizado durante 30 minutos. Las condiciones ambientales en la sala no son parámetros críticos para la calibración, pero durante el periodo que dure la calibración deben ser estables y estar dentro de los siguientes intervalos:  $50 \pm 20\%$  Hr y  $25 \pm 10^\circ\text{C}$ .

En este caso los patrones empleados en la comprobación de la longitud de onda fueron filtros de holmio y didimio trazables al patrón SRM 930e de NIST (National Institute of Standards and Technology) (*Allen, 2007*). Los filtros empleados en la confirmación de la absorbancia fueron de aproximadamente 0.25, 0.5 y 1 unidades de absorbancia a distintas longitudes de onda (*Clare, 2005*).

Se realizan inicialmente 5 series de medida con los filtros de didimio y holmio y posteriormente con los filtros de absorbancia alternando orden ascendente y descendente con las siguientes condiciones instrumentales:

Tabla 3.21: Condiciones instrumentales de medida del espectrofotómetro UV-vis durante la calibración

Longitud de onda	Absorbancia
Modo barrido espectral Rango de barrido: 190 nm – 1100 nm. Rango de registro: 0 – 3 Abs. Velocidad de barrido: media-lenta. Intervalo de longitud de onda: 0.2 – 0.1 nm	Modo fotométrico Hacer un autocero al aire. Seleccionar las siguientes longitud de onda: $\lambda_1 = 440, \lambda_2 = 465, \lambda_3 = 546, \lambda_4 = 590$ y $\lambda_5 = 635$ nm

### Cálculo de la corrección

Se calcula la corrección,  $cor_i$ , para cada uno de los puntos de calibración, tanto en longitud de onda como en absorbancia, empleando las siguientes ecuaciones:

$$cor_{UA-i} = UA_{\text{media}} - UA_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.21}$$

$$cor_{\lambda-i} = \lambda_{\text{media}} - \lambda_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.22}$$

En el caso de los filtros patrón de absorbancia y longitud de onda el certificado indica únicamente valores reales y no nominales.

### Estimación de la incertidumbre

Para estimar la incertidumbre se aplica la ley de propagación de errores detallada en el *Apartado 2.4.1. (JCGM 100, 2008)*.

En primer lugar se identifican las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de los resultados proporcionados por el equipo y que se esquematizan en el siguiente diagrama.

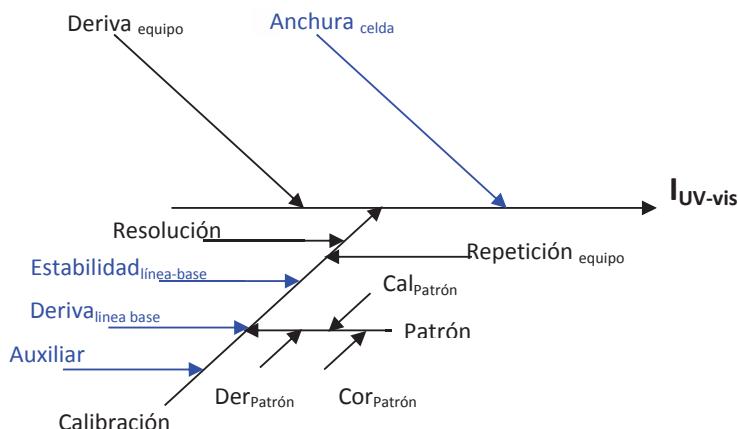


Fig. 3.10: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de un espectrofotómetro UV-vis: en negro las que contribuyen a la incertidumbre en longitud de onda y absorbancia, en azul cuatro contribuciones más a la incertidumbre total de la absorbancia.

Una vez identificadas las fuentes de error la siguiente etapa es cuantificarlas en cada punto de calibración. En la Tabla 3.22 están recogidas las contribuciones a la incertidumbre en la longitud de onda y en la absorbancia. Se han omitido en esta tabla los coeficientes de sensibilidad al ser para todas las contribuciones la unidad.

Tabla 3.22: Cuantificación de fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de un espectrofotómetro UV-vis en cada punto de calibración,  $i$

	Fuente de incertidumbre	Cuantificación	
		Longitud de onda	Absorbancia
Deriva del equipo		$u_{der} = \frac{dmc}{\sqrt{3}}$	$dmc = (U_{equipo})_{max} - (U_{equipo})_{min}$
Se evalúa a través de la máxima diferencia entre incertidumbres de certificados de calibración anteriores (Soovali <i>et al.</i> , 2006).	Ancho celda	No aplica	$u_{celda} = \frac{tol_{celda} \cdot UA}{anchocelada \cdot \sqrt{3}}$
Se evalúa a partir de la tolerancia del ancho de celda, $tol_{celda}$ indicada por el fabricante, expresada en UA (Hellma, 2010).	Calibración	$u_{cal-i} = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{res}^2 + u_{pat}^2}$	$u_{cal-i} = \sqrt{u_{rep}^2 + u_{res}^2 + u_{der-LB}^2 + u_{est-LB}^2 + u_{lambda}^2 + u_{pat}^2}$
Se obtiene en cada punto de calibración como combinación de las siguientes contribuciones.	Repetibilidad	$u_{rep} = \frac{s_{lambda}}{\sqrt{N}}$	$u_{rep} = \frac{S_{UA}}{\sqrt{N}}$
Se evalúa a partir de la desviación típica de $N$ medidas repetidas del patrón.	Resolución		resolución
Se obtiene a partir de las especificaciones técnicas del equipo, <i>resolución</i> .		$u_{res} = \sqrt{\frac{u_{cal-pat}^2 + u_{cor-pat}^2 + u_{cdcr-pat}^2}{2 \cdot \sqrt{3}}}$	
Se obtiene a partir de la combinación de las siguientes contribuciones:	Calibración del patrón	$u_{pat} = \sqrt{u_{cal-pat}^2 + u_{cor-pat}^2 + u_{cdcr-pat}^2}$	
Se estima a partir de la incertidumbre de los filtros de holmio y didímio indicadas en sus certificados de calibración.	Variabilidad patrón	$u_{cal-pat} = \frac{l_{patron}}{K}$	
$u_{cor-pat}$ se evalúa mediante la diferencia entre el valor certificado y el valor nominal, $u_{der-pat}$ se estima como la máxima diferencia de incertidumbre indicada en el certificado de calibración.	Corrección y deriva del patrón	$u_{cor-der-pat} = \frac{\lambda_{max} - \lambda_{min}}{\sqrt{3}}$	$u_{cor-der-pat} = \frac{UA_{max} - UA_{min}}{\sqrt{3}}$
Debido a que los certificados no indican un valor nominal y la incertidumbre es constante, $u_{cor-pat}$ y $u_{der-pat}$ se evalúan de forma conjunta $u_{cor-der-pat}$ a partir de la máxima diferencia de valores encontrados en los certificados.			

Tabla 3.22 (cont.): Cuantificación de fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre final de un espectrofotómetro UV-vis en cada punto de calibración,  $i$ 

Fuente de incertidumbre		Cuantificación	
		Longitud de onda	Absorbancia
Deriva de la línea base	Se evalúa a partir de la diferencia de absorbancias al inicio y al final de las medidas, $UA_{t=0}$ y $UA_t$ (Soovali <i>et al.</i> , 2006)	No aplica	$u_{der-LB} = \frac{ UA_{t=0} - UA_t }{\sqrt{3}}$
Estabilidad de la línea base	Se evalúa a partir de la variación máxima de absorbancia durante el tiempo que dure las medidas (Soovali <i>et al.</i> , 2006)	No aplica	$u_{est-LB} = \frac{ UA_{max} - UA_{min} }{2 \cdot \sqrt{3}}$
Incertidumbre en $\lambda$	Debida a la incertidumbre en la longitud de onda seleccionada	No aplica	$u_{\lambda} = \frac{ UA_{-\lambda} - UA_{+\lambda} }{2 \cdot \sqrt{3}}$

$$u_{\lambda-i} = \sqrt{u_{der}^2 + u_{cal-i}^2} \quad ec. 3.23$$

$$u_{UA-i} = \sqrt{u_{der}^2 + u_{celida}^2 + u_{cal-i}^2} \quad ec. 3.24$$

Se obtienen las incertidumbres combinadas para la longitud de onda y absorbancia en cada punto de calibración,  $u_{\lambda-i}$  y  $u_{UA-i}$ , aplicando la ley de propagación de errores como se indica en las ecuaciones ec. 3.23 y ec. 3.24 y se multiplican por el factor de cobertura,  $K$ , para obtener la incertidumbres totales expandidas,  $I_{\lambda-i}$  y  $I_{UA-i}$ .

El equipo se considera apto para su uso si se cumplen, tanto en absorbancia como en longitud de onda, las condiciones indicadas en la Tabla 3.23 para cada punto de calibración; se le asignará como incertidumbres de equipo,  $I_{\lambda}$  y  $I_{UA}$ , las incertidumbres máximas obtenidas:

Tabla 3.23: Condiciones de validez para la calibración espectrofotómetro de UV-vis

$\frac{Tol}{I_{UA}} > 3$ $ cor_{UA-i}  +  I_{UA}  < Tol$ $Verac_{UA-i} = cor_{UA-i} < Verac_{nominal}$ $Rep_{UA-i} < Rep_{nominal}$	$\frac{Tol}{I_{\lambda}} > 3$ $ cor_{\lambda-i}  +  I_{\lambda}  < Tol$ $Verac_{\lambda-i} = cor_{\lambda-i} < Verac_{nominal}$ $Rep_{\lambda-i} < Rep_{nominal}$
--	--

En la Tabla 3.24 se indican los valores de tolerancia, y veracidad y reproducibilidad nominales permitidas para cada rango de medida según las especificaciones del equipo.

Tabla 3.24: Tolerancia y condiciones nominales asignados al espectrofotómetro UV-vis

Rango de calibración	Tolerancia	Verac <sub>nominal</sub>	Rep <sub>nominal</sub>
De 0 a 0.25 UA	0.003	0.002	0.001
De 0.25 a 0.5 UA	0.005	0.002	0.001
De 0.5 a 1 UA	0.008	0.004	0.002
Filtro de holmio	1.5	0.5	0.1
Filtro de didimio	1.5	0.5	0.1

En el Anexo I se encuentran las tablas utilizadas para la toma de datos y cálculos durante la calibración del espectrofotómetro empleado en este trabajo, Tabla A.I.7 y Tabla A.I.8.

### Verificación

La verificación del espectrofotómetro se realiza de forma alterna a la calibración y después de alguna incidencia, verificándose las mismas especificaciones que en la calibración y, además, el paso de bandapectral y la luz difusa, determinada con una disolución de NaNO<sub>2</sub> al 5%.

La verificación de la absorbancia y longitud de onda se realiza de la misma forma que la calibración.

La verificación del paso de banda espectral se realiza registrando un espectro de energía entre 650 nm–660 nm a velocidad lenta, con un intervalo de longitud de onda: 0.2–0.1 nm; la anchura del pico a mitad de altura debe ser 2 nm.

Para comprobar la luz difusa se escoge el modo de medida fotométrico en transmisión, a 220 nm de longitud de onda; se hace un autocero con agua ultrapura y se hacen 10 medidas de la disolución filtro de NaNO<sub>2</sub>; posteriormente se retira el filtro y se comprueba que se restablece el valor inicial.

Para decidir si el equipo sigue siendo apto para el uso, se realizan cinco medidas y se calcula la corrección para cada valor nominal del filtro empleado del siguiente modo:

$$\text{cor}_{\text{ver-UA}} = \text{UA}_{\text{media}} - \text{UA}_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.25}$$

$$\text{cor}_{\text{ver-}\lambda} = \lambda_{\text{media}} - \lambda_{\text{real}} \quad \text{ec. 3.26}$$

El espectrofotómetro sigue siendo apto para el uso si se cumple, para cada punto de verificación, tanto en absorbancia como en longitud de onda, las siguientes condiciones:

Tabla 3.25: Condiciones de validez para la verificación del espectrofotómetro de UV-vis

$ \text{cor}_{\text{ver-UA-i}}  +  \text{UA}_{\text{i}}  < \text{Tol}$ $\text{Verac}_{\text{UA-i}} = \text{cor}_{\text{UA-i}} < \text{Verac}_{\text{nominal}}$ $\text{Rep}_{\text{UA-i}} = \text{s}_{\text{UA-i}} < \text{Rep}_{\text{nominal}}$	$ \text{cor}_{\text{ver-}\lambda\text{-i}}  +  \lambda_{\text{i}}  < \text{Tol}$ $\text{Verac}_{\lambda\text{-i}} = \text{cor}_{\lambda\text{-i}} < \text{Verac}_{\text{nominal}}$ $\text{Rep}_{\lambda\text{-i}} = \text{s}_{\lambda\text{-i}} < \text{Rep}_{\text{nominal}}$
--	--

La Tabla A.I.9 y Tabla A.I.10 del *Anexo I* muestran un ejemplo de las tablas empleadas para la toma de datos y realización de cálculos durante la verificación del espectrofotómetro empleado en esta Tesis.

### Mantenimiento

Periódicamente se realizan las siguientes operaciones de mantenimiento: limpieza del compartimento de muestras y chequeo del desecante de gel de sílice.

### 3.4.4. CROMATÓGRAFO IÓNICO

Para asegurar la trazabilidad de las medidas, que afectan a la calidad de los resultados, se hace necesario un control exhaustivo de su funcionamiento mediante verificaciones periódicas de determinados componentes del equipo (*AMC, 1997*).

### Calibración

En el cromatógrafo iónico empleado las calibraciones realizadas fueron analíticas, relacionando la concentración de una especie química en disolución con la magnitud

física que mide el equipo, conductividad en este caso. Una vez registradas las respuestas al medir una serie de disoluciones de concentración conocida se obtiene la relación entre respuesta y concentración (*CEM QU-004, 2000*).

### Verificación

Dado que no se realizó calibración del equipo, se optó por realizar operaciones exhaustivas de verificación de sus especificaciones consistentes en comprobaciones periódicas del estado de la bomba, del detector y del inyector, comparando los resultados obtenidos con las especificaciones indicadas por el fabricante. La verificación de los componentes del cromatógrafo se realiza en los rangos de operación empleados durante la aplicación del método de análisis de determinación de aniones.

Todos los equipos auxiliares empleados durante la verificación, en este caso balanza, cronómetro y termómetro, estaban igualmente validados.

La verificación del estado de las bombas consiste en realizar comprobaciones periódicas de la estabilidad, veracidad y reproducibilidad del caudal que proporcionan. Para la verificación de la estabilidad de las bombas se comprobará que el flujo que aportan es constante con el tiempo. Para ello se cambia la fase móvil por agua destilada, se desconectan las bombas del sistema para que funcionen autónomamente, se ajusta su caudal a un valor fijo, se recoge el líquido a la salida durante un tiempo determinado,  $t$ , en un recipiente previamente tarado,  $M_i$ , y se pesa,  $M_f$ . Se calcula el flujo real de las bombas,  $F$ , mediante la fórmula ec. 3.27, teniendo en cuenta la densidad del agua a la temperatura de realización del ensayo,  $\rho_w$  (*Marinero et al., 2003*).

$$F = \frac{M_f - M_i}{\rho_w \cdot t} \cdot 60 \quad \text{ec. 3.27}$$

donde  $t$  se expresa en s,  $M_i$  y  $M_f$  en g,  $\rho_w$  en  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $F$  en  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

La verificación de la veracidad y precisión de las bombas se puede realizar a partir de los datos obtenidos durante la comprobación de la estabilidad del flujo como  $\%Er$  y  $\%DER$ :

$$\%Er = \frac{|F_{medido} - F_{nominal}|}{F_{nominal}} \cdot 100 \quad \text{ec. 3.28}$$

$$\%DER = \frac{s_F}{F_{nominal}} \cdot 100 \quad \text{ec. 3.29}$$

donde  $s_F$  es la variación del flujo como desviación típica en  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .

Un componente muy importante del cromatógrafo iónico es la célula de conductividad del detector, la cual debe someterse a diferentes operaciones de verificación. En primer lugar se comprueba su veracidad midiendo diversos patrones de conductividad a una temperatura controlada y comparando el valor medido por el equipo con el valor real. Para ello se bombea directamente cada patrón de conductividad al detector. También se deberá verificar el ruido y la deriva de la línea base registrada por el cromatógrafo pasando fase móvil durante largo tiempo; la diferencia entre el valor inicial menos el final debe estar bajo especificaciones.

El cromatógrafo iónico es apto para el uso si cumple las especificaciones del equipo indicadas a continuación:

Tabla 3.26: Condiciones de validez para la verificación de las bombas del cromatógrafo iónico

$$\text{Verac} = \%Er < \%Er_{\text{nominal}}$$
$$\text{Rep} = \%DER < \%DER_{\text{nominal}}$$

Tabla 3.27: Condiciones de validez para la verificación del detector del cromatógrafo iónico

$$\text{Verac} = \%Er < \%Er_{\text{nominal}}$$
$$\text{Ruidodelalíneabase} < \text{Especificaciones}$$
$$\text{Derivadelalíneabase} < \text{Especificaciones}$$

En el *Anexo I* se encuentra la Tabla A.I.11 empleada para la toma de datos y cálculos durante la verificación del cromatógrafo iónico empleado en esta Tesis.

## Mantenimiento

Otro de los elementos de un cromatógrafo a verificar es el inyector, pero al ser un bucle de volumen fijo no es necesario ningún tipo de comprobación, simplemente mantenerlo limpio pasando agua ultrapura una vez terminada las medidas.

### 3.4.5. ORDENADORES Y PROGRAMAS INFORMATICOS

La realización de todos los cálculos involucrados en este trabajo se ha llevado a cabo empleando hojas de cálculo y plantillas previamente validadas en Microsoft EXCEL<sup>®</sup> (*Chan et al., 2004*).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

---



En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en las validaciones de los tres métodos analíticos estudiados, incluyendo previamente las validaciones de los equipos de medida empleados.

## 4.1. VALIDACIÓN DE EQUIPOS DE MEDIDA

Todos los equipos empleados en la realización de esta Tesis se incluyeron en un plan de calibración/verificación/mantenimiento según los requerimientos del método de ensayo, tal como se describe en el *Apartado 3.4*.

### 4.1.1. BALANZAS

Todas las balanzas empleadas se calibraron periódicamente con juegos de pesas calibrados y trazables Clase F1. En la Tabla 4.1 se detallan los valores certificados de las masas patrón empleadas en la calibración de una de las balanzas analíticas (Sartorius 1601 AMP8-1).

Tabla 4.1: Masas patrón empleadas en la calibración de la balanza analítica Sartorius 1601 AMP8-1, en g

$M_{nominal}$	0.01	0.1	1	10	100
$M_{real}$	0.009998	0.099977	1.000000	10.00007	99.99992
Tolerancia	0.000025	0.00005	0.0001	0.0002	0.0005
$I_{pat}$	0.000008	0.000016	0.00003	0.00006	0.00016
$cor_{pat}$	0.000002	-0.000023	0.000000	0.000070	-0.000080

La incertidumbre de las balanzas se estimó de acuerdo a las ecuaciones recogidas en la Tabla 3.12. Los valores de incertidumbre obtenidos para la balanza Sartorius 1601 AMP8-1 se muestran a continuación:

Tabla 4.2: Incertidumbre de la balanza analítica 1601 AMP8-1

$M_{nominal}$ (g)	$cor$ (g)	$I_{bal}$ (g)	$\%I_{bal}$
0.010	0.00005	0.0008	7.7
0.100	0.00003	0.0003	0.30
1.000	0.00002	0.0003	0.026
10.000	-0.00003	0.0003	0.0029
100.000	0.00018	0.0005	0.0005

Se observa que, en valor absoluto, la incertidumbre es del mismo orden de magnitud en todo el rango de medida de la balanza; sin embargo, si lo expresamos en valor relativo, la incertidumbre es inversamente proporcional al valor de la masa. Se obtuvieron resultados análogos al calibrar el resto de balanzas.

En la Fig. 4.1 podemos ver la incertidumbre de la balanza Sartorius 1601 AMP8-1 desglosada en contribuciones. Podemos observar que las contribuciones  $u_{der-sen}$ ,  $u_{der-equ}$  o  $u_{cal-pat}$  aumentan con la masa, mientras que  $u_{emp}$  disminuye rápidamente al aumentar la masa; otras contribuciones como  $u_{tara}$ ,  $u_{cor-pat}$ ,  $u_{rep}$  o  $u_{excen}$  tienen una tendencia aleatoria y  $u_{res}$  y  $u_{der-lineal}$  se mantienen constantes dentro del rango de medida. La contribución debida a la histéresis,  $u_{histe}$ , resultó ser nula y la debida a la deriva de los patrones,  $u_{der-pat}$ , no se consideró al no disponer de un historial de calibraciones por ser los patrones nuevos. Las contribuciones que más influyen en la incertidumbre total de esta balanza son las debidas a la deriva de sensibilidad, la falta de linealidad de la balanza y la excentricidad. Sobre las dos primeras no se puede actuar, pero la última es debida al envejecimiento del equipo, y la única forma de actuar sobre ella es pesar en el centro de la balanza y esperar hasta que el peso marcado sea estable. En cualquier caso, el error cometido en todo el rango de medida de la balanza estudiado es menor del 10% (Tabla 4.2); para valores de masa superiores a 0.1 g el error es inferior al 0.5%.

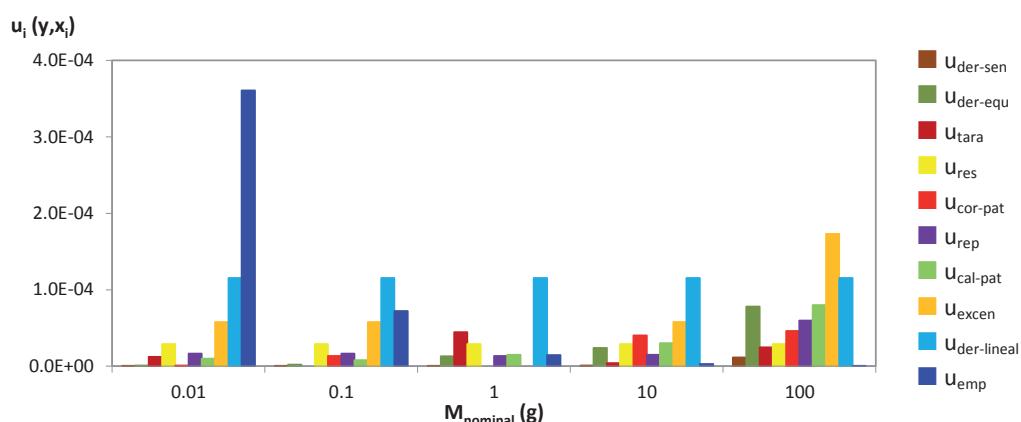


Fig. 4.1 Contribuciones a la incertidumbre total de la balanza para cada punto de calibración

Las masas patrón secundarias empleadas durante la verificación de la balanza se indican en la Tabla 4.3

Tabla 4.3: Masas patrón empleadas en la verificación de la balanza analítica Sartorius 1601 AMP8-1, en g

$M_{nominal}$	0.02	0.1	1	10	100
cor	-0.000167	-0.000067	0.000181	0.000106	0.000865
$M_{real}$	0.019833	0.099933	1.000181	10.000106	100.000865
$I_{pat}$	0.00010	0.00017	0.00033	0.00067	0.0017

Todas las balanzas empleadas han cumplido las condiciones de validez para la calibración y verificación indicadas en las Tablas 3.13 y 3.14 y en la ec. 3.11.

#### 4.1.2. MATERIAL VOLUMÉTRICO

El material volumétrico empleado durante la realización de esta Tesis fue el siguiente:

- ▲ Material volumétrico aforado de vidrio de Clase A:
  - ◆ Matraces aforados de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL
  - ◆ Pipetas aforadas de 5, 10 y 25 mL
- ▲ Material volumétrico graduado de vidrio de Clase A:
  - ◆ Pipetas graduadas de 5, 10 y 25 mL
  - ◆ Probetas de 100, 250, 500, 1000 y 2000 mL
- ▲ Material volumétrico accionado por pistón:
  - ◆ Micropipetas de volumen variable de 0.1, 0.2, 1 y 5 mL

Se estimó la incertidumbre aplicando las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.18. En la Tabla 4.4 se muestra la incertidumbre obtenida para el material volumétrico de vidrio.

Tabla 4.4: Incertidumbre del material volumétrico de vidrio

Material volumétrico aforado						Material volumétrico graduado							
Pipetas aforadas			Matraces			Pipetas graduadas			Probetas				
V <sub>nominal</sub> (mL)	I <sub>vol</sub> (mL)	%I <sub>vol</sub>	V <sub>nominal</sub> (mL)	I <sub>vol</sub> (mL)	%I	V <sub>nominal</sub> (mL)	I <sub>vol</sub> (mL)	%I <sub>vol</sub>	V <sub>nominal</sub> (mL)	I <sub>vol</sub> (mL)	%I <sub>vol</sub>		
5	0.018	0.35	25	0.048	0.19	5	1	0.029	2.9	100	20	0.58	2.9
10	0.023	0.23	50	0.071	0.14		5	0.029	0.58		100	0.59	0.59
25	0.047	0.19	100	0.12	0.12		10	0.058	2.9	250	50	1.2	2.3
			250	0.18	0.071		10	0.058	0.58		250	1.2	0.47
			500	0.30	0.060		25	0.059	1.2	500	100	2.9	2.9
			1000	0.47	0.047		25	0.063	0.25		500	2.9	0.58
			2000	0.71	0.036					1000	200	5.8	2.9
									1000		5.8	0.58	
									400		12	2.9	
									2000		12	0.6	

De acuerdo a los datos de la Tabla 4.4, podemos ver que al aumentar el volumen nominal del material volumétrico la incertidumbre final aumenta en valor absoluto, pero disminuye en valor relativo. También se observa que, para el material graduado, la incertidumbre en valor absoluto es constante independientemente del volumen medido.

En las siguientes gráficas vemos cómo influyen las distintas fuentes de error según el tipo de material volumétrico. Para el material volumétrico aforado como pipetas, Fig. 4.2 y matraces, Fig. 4.3, la fuente de error que más contribuye a la incertidumbre total es la clase y en menor medida la contribución debida a la repetibilidad, mientras que las contribuciones debidas a la balanza y las condiciones ambientales son mínimas por regla general.

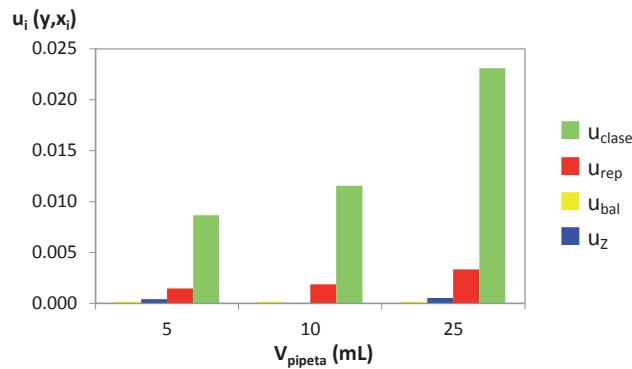


Fig. 4.2: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del volumen de las pipetas aforadas

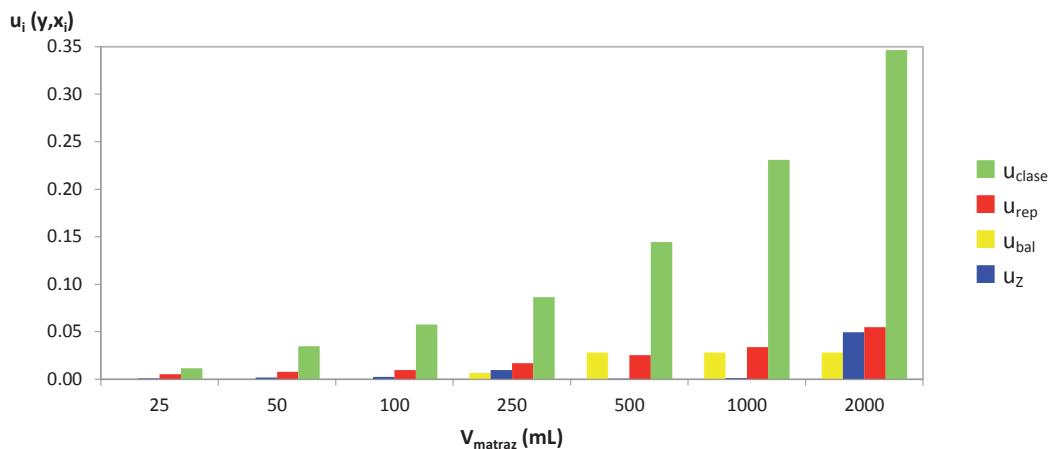


Fig. 4.3: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del volumen de los matraces

Para ilustrar el efecto de la incertidumbre de la balanza sobre la incertidumbre del material volumétrico, se calibró un matraz de 100 mL utilizando tres balanzas de fondo de escala creciente y por tanto incertidumbre creciente. En la Fig. 4.4 se muestran los resultados obtenidos. Se observa que la contribución debida a la balanza es mínima cuando la masa del volumen a calibrar está próxima al fondo de escala de la balanza, pero aumenta progresivamente cuando dicha masa es menor que el fondo de escala.

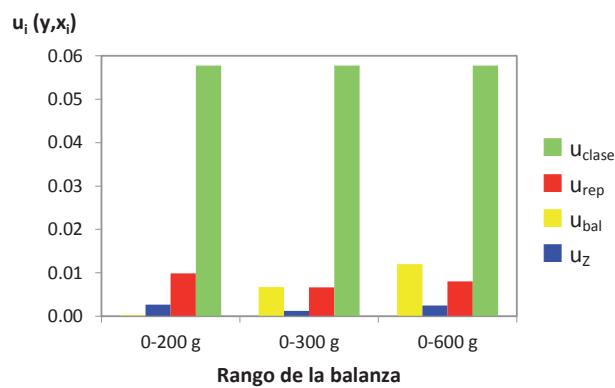


Fig. 4.4: Efecto de la sensibilidad de la balanza sobre la incertidumbre de un matraz de 100 mL

Las contribuciones individuales a la incertidumbre total del material volumétrico graduado se muestran en la Fig. 4.5 (pipetas graduadas) y en la Fig. 4.6 (probetas).

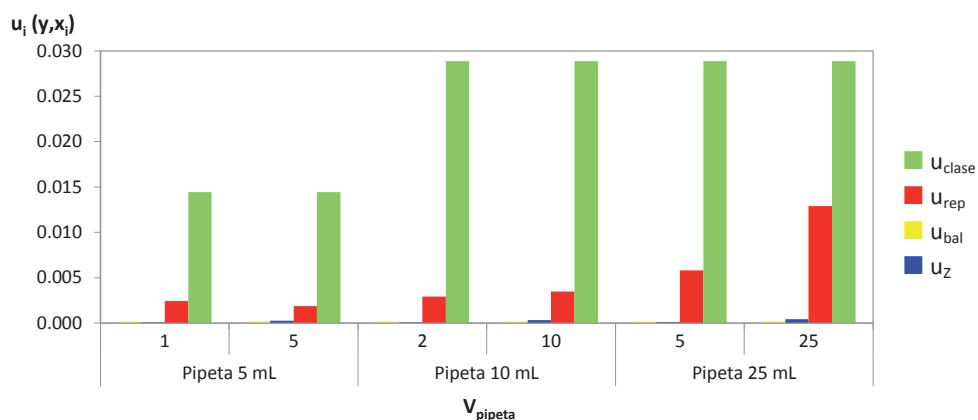


Fig. 4.5: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del volumen de las pipetas graduadas

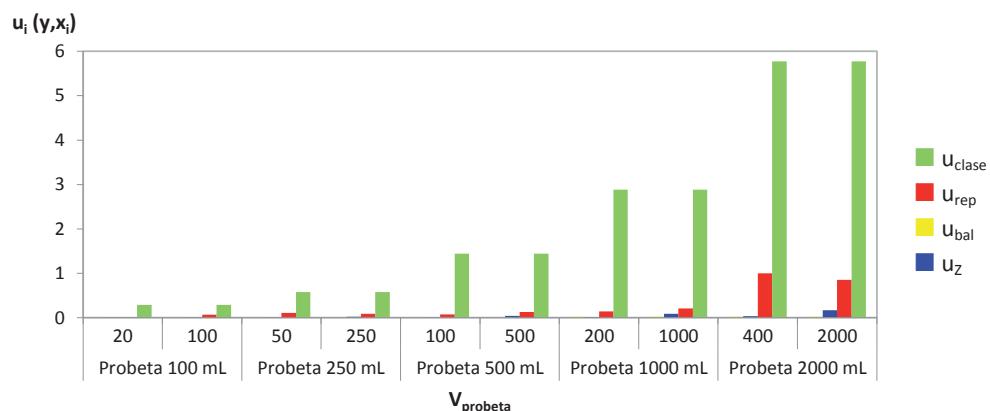


Fig. 4.6: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del volumen de las probetas

La fuente de error que más contribuye es la debida a la clase del material y, en menor medida, la repetibilidad; las contribuciones debidas a las condiciones ambientales y a balanza son en comparación mínimas. En las mismas gráficas se han representado las fuentes de error para el volumen mínimo verificado y para el fondo de escala, no observándose ninguna diferencia significativa en el rango del material.

En la Tabla 4.5 se muestran las incertidumbres obtenidas para los volúmenes máximo y mínimo medidos con las distintas micropipetas empleadas, de acuerdo a su volumen nominal y resolución.

Tabla 4.5: Incertidumbre del material volumétrico de pistón

$V_{\text{nominal}}$ (mL)	Resolución (mL)	$V_i$ (mL)	$I_{\text{vol}}$ (mL)	$\%I_{\text{vol}}$
0.1	0.001	0.01	0.00080	8.0
		0.1	0.00080	0.80
	0.0001	0.01	0.00037	3.7
		0.1	0.00040	0.40
0.2	0.001	0.020	0.00069	3.5
		0.2	0.00076	0.38
1	0.001	0.1	0.00074	0.74
		1	0.0012	0.12
	0.0025	0.1	0.0015	1.5
		1	0.0021	0.21
5	0.005	0.1	0.0029	2.9
		1	0.0035	0.35
	0.005	0.5	0.0030	0.60
		5	0.0047	0.094

Como ocurría con el material volumétrico de vidrio, al aumentar el volumen vertido por la micropipeta la incertidumbre final aumenta en valor absoluto, pero disminuye en valor relativo.

En la Fig. 4.7 se puede ver que las contribuciones mayores vuelven a ser las debidas a la clase y a la repetibilidad de las medidas, excepto para las micropipetas de menor volumen nominal donde la contribución de la balanza es la más importante. En cuanto a la contribución debida a las condiciones ambientales,  $u_z$ , ha resultado ser más significativa que en el caso del material volumétrico de vidrio.

En la Fig. 4.8 se han representado las contribuciones a la incertidumbre de tres micropipetas de  $V_{\text{nominal}} = 1 \text{ mL}$  con diferente resolución. Puede observarse de nuevo la mayor influencia de la contribución debida a la clase en la incertidumbre total.

Las Fig. A.II.1 y Fig. A.II.2 del Anexo II muestran las contribuciones porcentuales a la incertidumbre para las micropipetas empleadas para varios volúmenes y la

comparación de las contribuciones en el valor límite inferior y valor nominal de cada micropipeta.

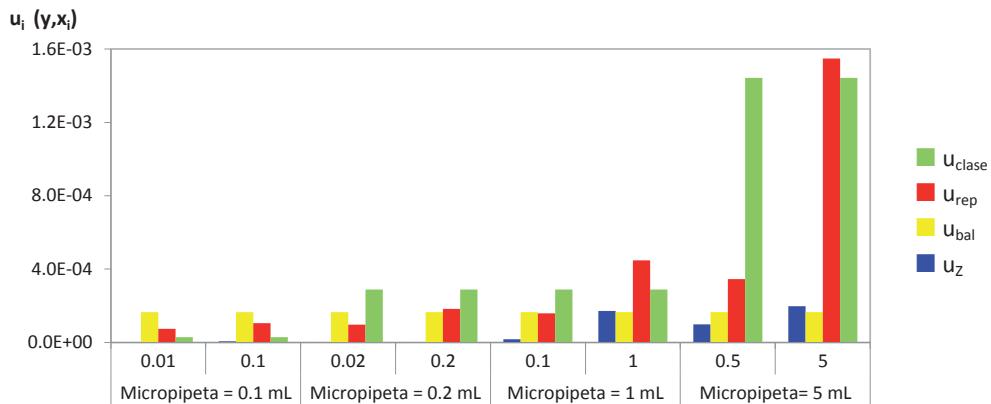


Fig. 4.7: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre del volumen de las micropipetas

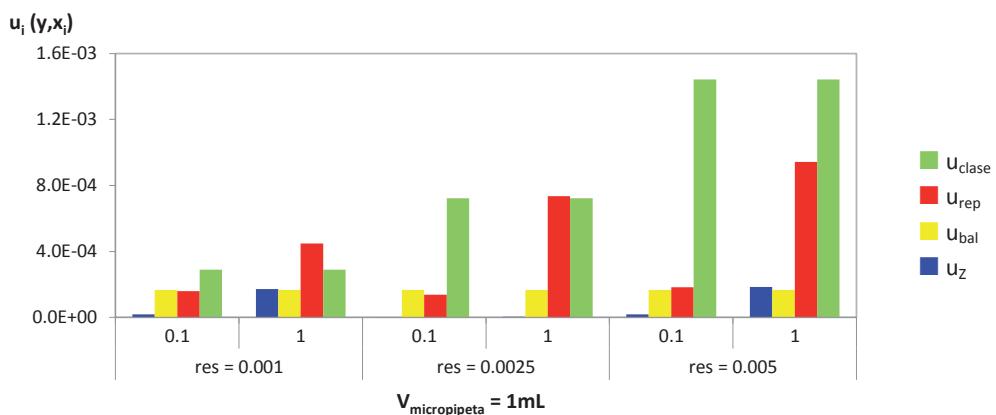


Fig. 4.8: Influencia de la resolución en la incertidumbre del volumen de miropipetas

Podemos concluir que, en general, en el material volumétrico de volumen variable (probetas, pipetas graduadas y micropipetas de volumen variable) la contribución de la clase a la incertidumbre total es más significativa que en el material de volumen fijo ya que la resolución suele ser mayor que la tolerancia (Tabla 3.18).

El material volumétrico de vidrio que no cumplía las condiciones de validez indicadas en la Tabla 3.19 y Tabla 3.20 se desechará.

Las micropipetas, por ser material volumétrico de volumen variable, se sometieron a verificaciones periódicas.

#### 4.1.3. ESPECTROFOTÓMETRO ULTRAVIOLETA VISIBLE

El espectrofotómetro UV-vis empleado para la determinación de fenol fue de la marca, *Shimadzu*, modelo UV-1603. En la Tabla 4.6 se indican las longitudes de onda de los

filtros de holmio y didimio empleados para la calibración y verificación de la longitud de onda; mientras que los filtros empleados para la calibración y verificación de la absorbancia están indicados en la Tabla 4.7. Todos ellos pertenecían a un juego de filtros de la marca Hellma verificados periódicamente frente a patrones internacionales y trazables.

Tabla 4.6: Filtros de longitud de onda empleados durante la calibración/verificación del espectrofotómetro UV-vis

Holmio (nm)	279.28	360.88	453.46	536.32	637.54
Didimio (nm)	327.98	471.98	525.42	680.98	875.56

Tabla 4.7: Filtros de absorbancia empleados durante la calibración/verificación del espectrofotómetro UV-vis

$\lambda$ (nm)	Filtro 1		Filtro 2		Filtro 3	
	$V_{\text{nominal}}$ (UA)	$\pm$ $I_{\text{filtro}}$ (UA)	$V_{\text{nominal}}$ (UA)	$\pm$ $I_{\text{filtro}}$ (UA)	$V_{\text{nominal}}$ (UA)	$\pm$ $I_{\text{filtro}}$ (UA)
440	0.270	$\pm$ 0.002	0.494	$\pm$ 0.004	0.972	$\pm$ 0.007
465	0.237	$\pm$ 0.002	0.455	$\pm$ 0.004	0.895	$\pm$ 0.007
546	0.241	$\pm$ 0.002	0.464	$\pm$ 0.004	0.903	$\pm$ 0.007
590	0.259	$\pm$ 0.002	0.513	$\pm$ 0.004	0.969	$\pm$ 0.007
635	0.260	$\pm$ 0.002	0.514	$\pm$ 0.004	0.939	$\pm$ 0.007

Con los resultados obtenidos de las cinco medidas replicadas realizadas se estimó la incertidumbre de la longitud de onda y absorbancia aplicando las expresiones recogidas en la Tabla 3.22.

La Tabla 4.8 y la Tabla 4.9 muestran los resultados de incertidumbre absoluta y relativa para longitud de onda y absorbancia, respectivamente. Se observa que la incertidumbre absoluta permanece prácticamente invariable con la longitud de onda, siendo ligeramente superior para el filtro de didimio. En el caso de la absorbancia la incertidumbre aumenta con ésta, permaneciendo la incertidumbre relativa aproximadamente constante. En ningún caso la incertidumbre superó el 1%.

Tabla 4.8: Incertidumbre de la longitud de onda del espectrofotómetro UV-vis

Filtro	$\lambda$	$I_{\text{UV-vis}-\lambda}$	% $I_{\text{UV-vis}-\lambda}$	Filtro	$\lambda$	$I_{\text{UV-vis}-\lambda}$	% $I_{\text{UV-vis}-\lambda}$
	(nm)	(nm)			(nm)	(nm)	
Holmio	279.35	0.30	0.11	Didimio	328.15	0.54	0.16
	360.90	0.30	0.08		472.10	0.53	0.11
	453.55	0.42	0.09		525.50	0.52	0.10
	536.40	0.33	0.06		681.20	0.57	0.08
	637.70	0.56	0.09		875.20	0.81	0.09

Tabla 4.9: Incertidumbre de la absorbancia del espectrofotómetro UV-vis

Absorbancia (UA)	$I_{UV-vis-UA}$ (UA)	$\%I_{UV-vis-UA}$
0.25	0.0024	0.96
0.50	0.0047	0.94
1.00	0.0074	0.74

En la Fig. 4.9 y Fig. 4.10 se han representado las fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre total de la longitud de onda y de la absorbancia.

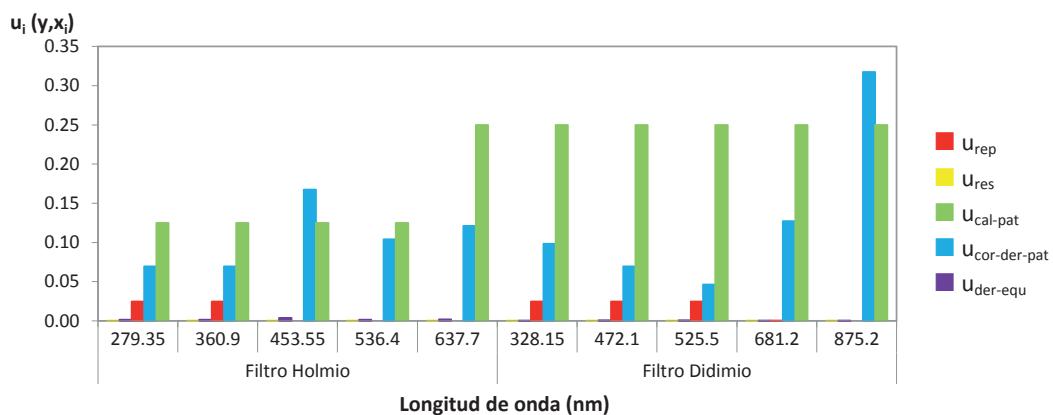


Fig. 4.9: Contribuciones a la incertidumbre de la longitud de onda del espectrofotómetro UV-vis

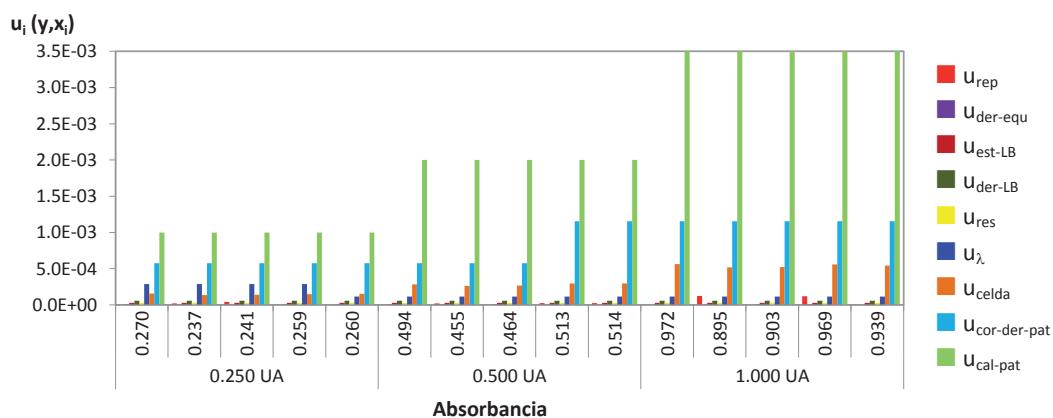


Fig. 4.10: Contribuciones a la incertidumbre de la absorbancia del espectrofotómetro UV-vis

Se observa que las contribuciones a la incertidumbre total que más afectan en ambos parámetros son las debidas a la incertidumbre de los patrones,  $u_{cor-der-pat}$  y  $u_{cal-pat}$ .

Los valores de incertidumbre total asignados al equipo en longitud de onda y en absorbancia se corresponden con los valores máximos obtenidos en el rango de calibración y se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10: Incertidumbre del espectrofotómetro UV-vis

Parámetro	$I_{UV-vis}$
$\lambda$	0.9 nm
Absorbancia	0.007 UA

El equipo cumple, en ambos parámetros, con las condiciones de validez exigidas que se indicaron en la Tabla 3.23 y Tabla 3.24. El espectrofotómetro UV-vis también ha satisfecho las condiciones de validez para la verificación indicadas en la Tabla 3.25.

#### 4.1.4. CROMATÓGRAFO IÓNICO

El equipo empleado para la validación del método cromatográfico para la determinación de aniones en aguas residuales fue un cromatógrafo iónico *Metrohm* 792 Basic IC con supresión química.

Los resultados obtenidos durante la verificación de la estabilidad de las bombas a tres velocidades de flujo aparecen reflejados en la Fig. 4.11, en la que se observa que el flujo permanece estable a las tres velocidades ensayadas y dentro de las especificaciones indicadas por el fabricante (variabilidad del flujo nominal <  $\pm 0.5\%$ ).

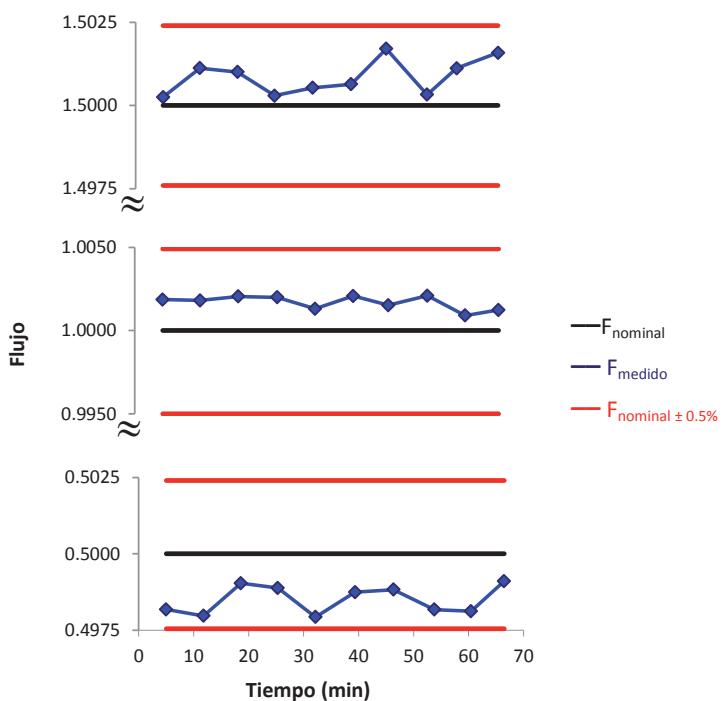


Fig. 4.11: Estabilidad de la bomba del cromatógrafo a distintas velocidades de flujos

En la Fig. 4.12 se han representado el sesgo relativo medio y la desviación estándar relativa para cada valor de flujo ensayado. En los tres casos, los resultados obtenidos, tanto para veracidad como precisión de la bomba, cumplen las especificaciones (sesgo máximo  $< \pm 2\%$  y %DER  $< \pm 0.1\%$ ).

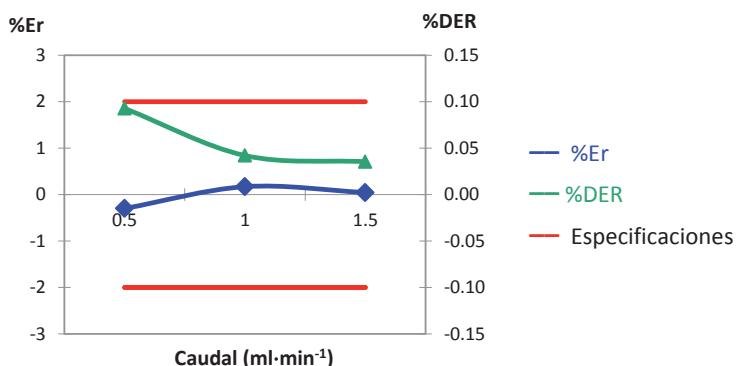


Fig. 4.12: Veracidad y precisión de la bomba del cromatógrafo a distintos flujos

Para verificar la respuesta del detector se emplearon tres patrones de conductividad trazables a NIST (National Institute of Standards and Technology) con valores nominales dentro del rango de medida del método:  $147 \pm 5 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , marca *Crison*;  $84 \pm 1\% \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , marca *Eutech Instr*; y  $15 \pm 1\% \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ , marca *Hamilton*.

Los resultados obtenidos aparecen recogidos en la Tabla 4.11. Se puede apreciar que el error cometido en el rango ensayado es menor del 1% como indican las especificaciones.

Tabla 4.11 Conductividades obtenidas por el cromatógrafo para cada patrón de conductividad

T <sub>a</sub> (°C)	Λ <sub>nominal</sub> ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Λ <sub>real</sub> ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	Λ <sub>medida</sub> ( $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ )	%Er
15.3	15	11.92	12.03	-0.92
19.6	84	74.43	73.69	0.99
24.3	147	145	146.25	-0.86

La estabilidad del detector se comprobó registrando, durante una hora, la línea base de la fase móvil. En la ampliación del cromatograma mostrado en la Fig. 4.13 vemos que tanto el ruido como la deriva de la señal están dentro de las especificaciones del fabricante (ruido  $\approx 2.4 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-1}$  y deriva  $\approx 1 \text{ nS}\cdot\text{cm}^{-1}$  en 20 min).

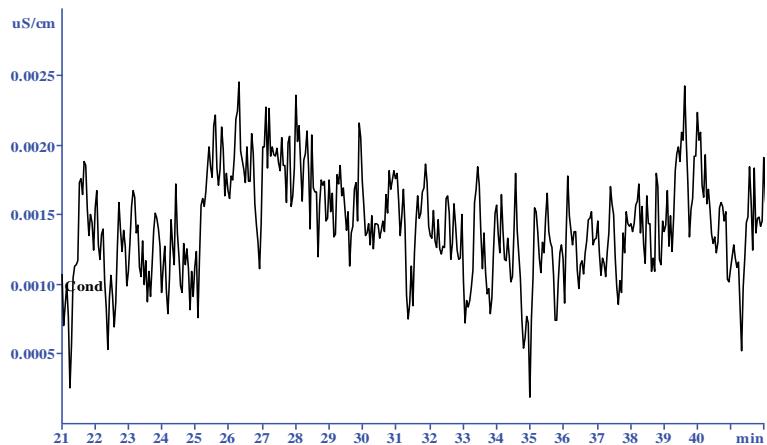


Fig. 4.13: Cromatograma ampliado registrado durante 20 minutos

## 4.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANIONES DISUELtos EN AGUAS

A continuación se describen los ensayos realizados y los resultados obtenidos en la validación del método de análisis para la determinación de aniones disueltos en aguas residuales y continentales mediante cromatografía iónica.

El fundamento del método y las etapas básicas del procedimiento analítico fueron descritos en el *Capítulo 3*. Las características técnicas a determinar, así como los objetivos perseguidos para este método de análisis, se han presentado en la Tabla 3.6.

### 4.2.1. ENSAYOS PREVIOS A LA VALIDACIÓN

Antes de llevar a cabo el proceso de la validación se realizaron una serie ensayos previos para establecer las condiciones generales de experimentación y llevar a cabo el método de análisis preliminar descrito en el *Capítulo 3*. La finalidad de estos ensayos era concretar la estabilidad de reactivos, patrones y muestras; establecer los rangos lineales; establecer los requerimientos instrumentales... Se ha incluido un apartado dedicado a la elección y preparación de las matrices sintéticas empleadas para validar el método.

#### Conservación de reactivos y patrones

El uso de disoluciones caducadas o estropeadas puede afectar a la validez del método y por tanto a la incertidumbre de las medidas. La determinación de la caducidad de reactivos y patrones está asociada a su estabilidad y debe ser comprobada para asignarle a cada disolución empleada su tiempo de vida útil. También es fundamental para evitar la reposición innecesaria de reactivos aún útiles y reducir tiempos de análisis, aumentando por tanto la competitividad de los laboratorios.

Para evaluar la estabilidad de las disoluciones patrón de los aniones se representó el área de pico cromatográfico en función de tiempo. La estabilidad de la fase móvil se evaluó a partir de la deriva de los tiempos de retención de los picos de los aniones. Como criterio de aceptación se estableció en ambos casos que la desviación en los resultados fuera menor al 5% respecto del valor inicial.

Se preparó un multipatrón de aniones y una fase móvil concentrados que se conservaron refrigeradas a 4°C durante un periodo de tres meses. A partir de estas disoluciones concentradas se prepararon semanalmente, por dilución, la fase móvil de trabajo y un multipatrón de concentraciones  $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y  $15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  con los que se midió área y tiempo de retención de los picos. La Fig. 4.14 muestra la variación temporal del área de pico y del tiempo de retención para cada anión.

Puede observarse que la variación de los tiempos de retención de los aniones es, en todos los casos, menor del 5% durante el periodo de tres meses ensayado; por tanto, en el procedimiento de trabajo se puede indicar que la fase móvil concentrada puede emplearse durante los tres meses posteriores a su preparación.

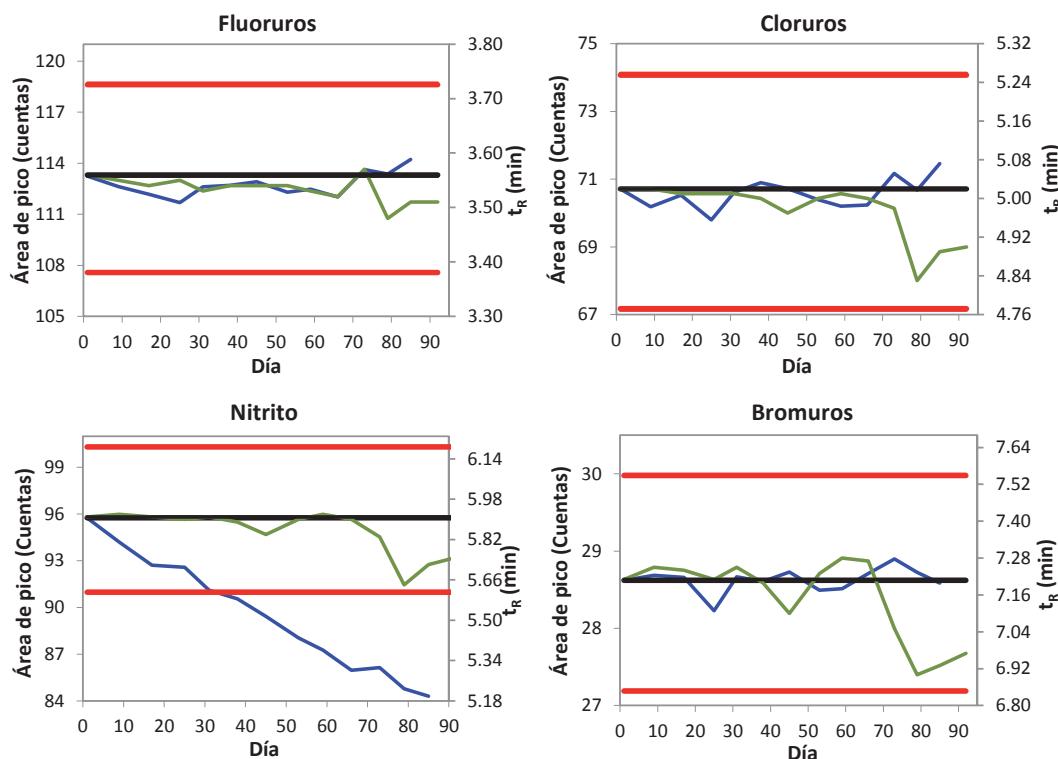


Fig. 4.14: Estudios de estabilidad de patrones de aniones y fase móvil

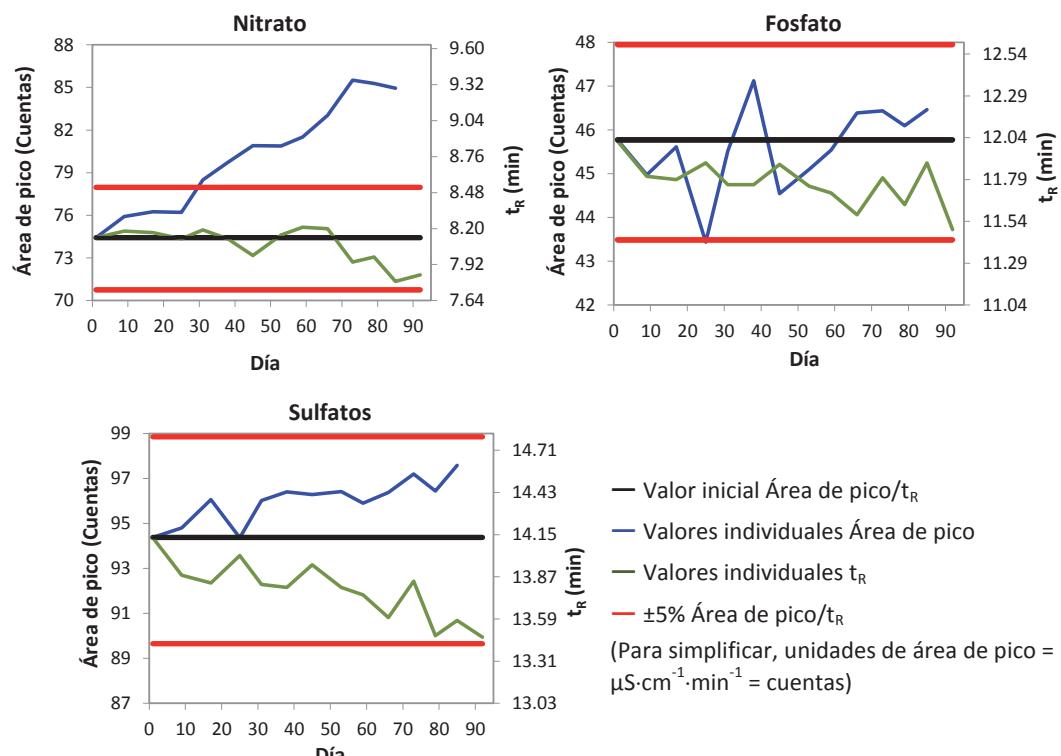


Fig. 4.14 (cont.):Estudios de estabilidad de patrones de aniones y fase móvil

Por su parte, las áreas de pico de los aniones muestran variaciones inferiores al 5% respecto del valor inicial durante el primer mes. Pasado ese tiempo siguen siendo todos estables excepto el nitrato, que disminuye, y el nitrato, que aumenta, probablemente debido a la oxidación de nitrito a nitrato.

A la vista de los resultados se decidió establecer un tiempo máximo de conservación de tres meses para la fase móvil concentrada y de un mes para los multipatrones de aniones. Estos tiempos de conservación fueron incluidos en el procedimiento de análisis definitivo, PNT-aniones, descrito en el Anexo III.

### Conservación de la muestra

Debe conocerse la metodología a seguir para la toma y conservación de las muestras y así evitar resultados erróneos en la medida de la concentración del analito de interés debido a la reacción de éste con otros compuestos presentes en las muestras o con el propio recipiente. Para establecer las condiciones de conservación de las muestras de agua residual para la determinación de aniones, se recopilaron datos de los períodos de conservación, el tipo de envase permitido, técnica de llenado y temperatura de conservación, recomendados en distintas normas consultadas. Esta información se resume en la Tabla 4.12 (APHA, 1998; ASTM D4327, 2011; UNE-EN ISO 5667-3, 2004; UNE-EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997).

Tabla 4.12: Condiciones para la conservación de aguas en las que se van a determinar aniones

Normativa	A <sup>-</sup>	Envase	Tamaño de la muestra	Conservación	Tiempo
EPA 300.1, 1997	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup>	V, P	--	filtrar 0.45 µm	28 días
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>			filtrar 0.45 µm; 4°C	48 horas
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>				28 días
ASTM D 4327, 2011	Todos	--	--	filtrar 0.22 µm; 4°C	Lo antes posible
UNE EN ISO 5667-3, 2004	Todos	P, V	500	filtrar "in situ"; 1-5°C	24 horas
		P	500	filtrar "in situ"; -20°C	1 mes
	F <sup>-</sup>	P, no PTFE	200	--	1 mes
	Cl <sup>-</sup>	P, V	100	--	1 mes
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	P, V	200	1-5°C	24 horas
	Br <sup>-</sup>	P, V	100	1-5°C	1 mes
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	P, V	250	1-5°C	24 horas
		P, V		pH 1-2 con HCl	7 días
		P		-20°C	1 mes
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	V, VB, P	250	1-5°C	1 mes
		P	250	-20°C	1 mes
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	P, V	200	1-5°C	1 mes
UNE-EN ISO 10304-1, 2009	Todos	P	Sin cámara de aire para NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	2-8°C; oscuridad; filtrar 0.45 µm	--
Standard Methods APHA, 1998	Todos	--	--	filtrar 0.2 µm	--
	F <sup>-</sup>	V, P	300	--	28 días
	Cl <sup>-</sup>	V, P	50	--	28 días
	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	V, P	100	Tan pronto como sea posible	--
				Refrigerar, 4°C	48 horas
	Br <sup>-</sup>	V, P	100	--	28 días
	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	V, P	100	Lo antes posible; refrigerar, 4°C	48 horas
				Muestras cloradas	28 días
	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	V	100	Refrigerar, 4°C	48 horas
	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	V, P	100	Refrigerar, 4°C	28 días

Para confirmar los períodos de conservación encontrados bibliográficamente, se analizaron durante un mes dos muestras reales provenientes de ejercicios de intercomparación suministradas por *Quimiometrías S.L.* (muestras A y B). En la Fig. 4.15 podemos ver los resultados obtenidos en la determinación de los aniones objetivo de los ejercicios. Al representar los valores experimentales junto con el intervalo

delimitado por la desviación robusta respecto del valor asignado para cada analito podemos observar que los resultados permanecen dentro de dicho intervalo durante el periodo investigado.

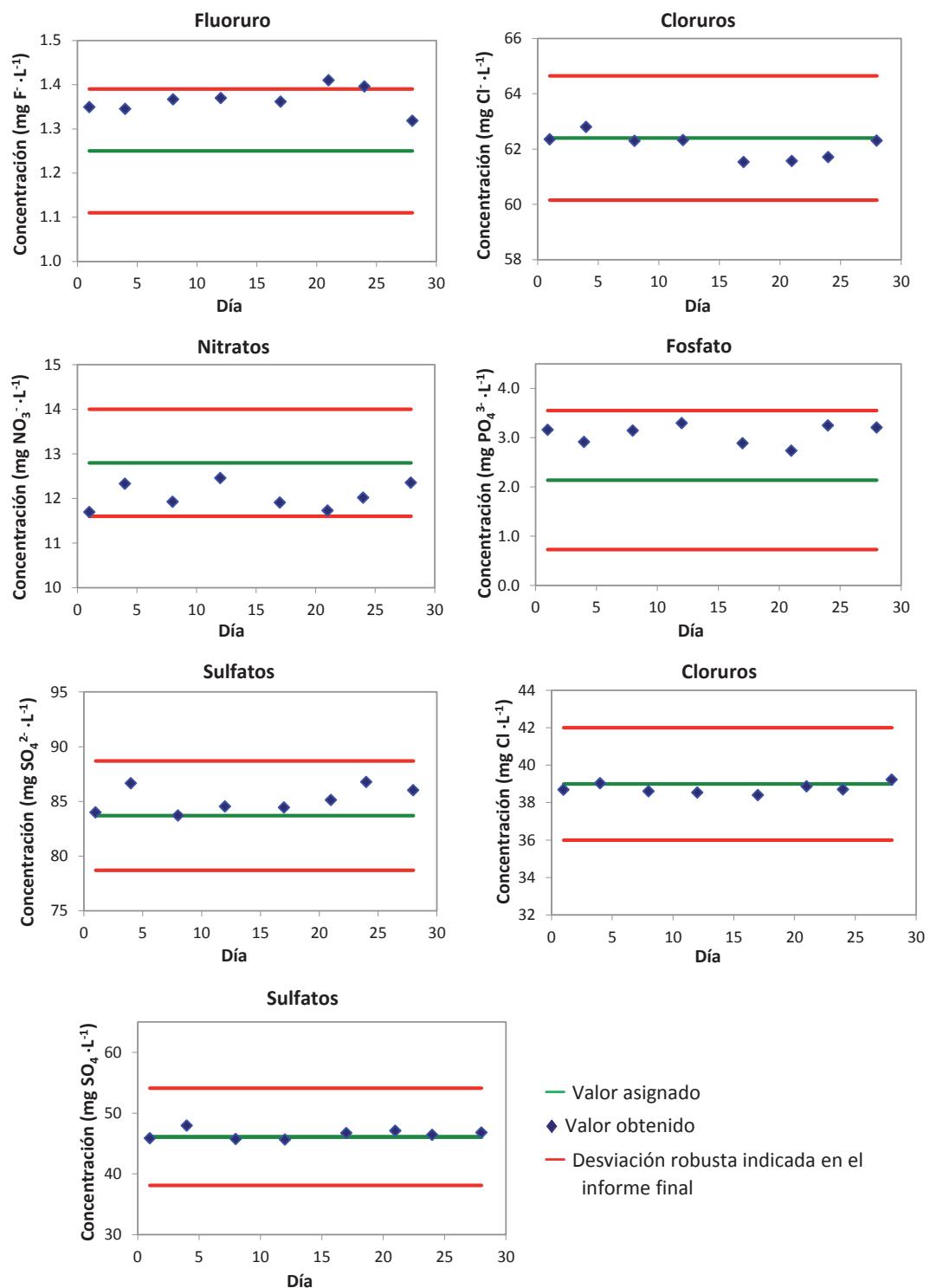


Fig. 4.15: Variación temporal de las concentraciones de distintos aniones en muestras reales

Por otro lado, la diferencia máxima entre medidas es menor del 10% para todos los casos excepto para el fosfato, no observándose ninguna tendencia temporal en los valores representados, por lo que esas desviaciones se pueden asignar a errores experimentales y no a inestabilidad de las muestras.

A la vista de los resultados obtenidos con las muestras reales ensayadas, se decidió establecer un periodo máximo de conservación de las muestras de 28 días para el análisis de aniones por cromatografía ionica, siempre y cuando los recipientes estén completamente llenos y se conserven refrigeradas. No obstante, dado que no se ha comprobado experimentalmente la estabilidad de nitrito y bromuro en una muestra real y solo se ha ensayado una única matriz real, y a la vista de las recomendaciones de las distintas normativas recogidas en la Tabla 4.12, para garantizar la integridad de las muestras estas se analizarán lo antes posible. Estas condiciones de conservación de las muestras fueron incluidas en el procedimiento de análisis (PNT-aniones, Anexo III).

También se deben tener en cuenta las recomendaciones bibliográficas encontradas referentes a los envases para el almacenamiento. De este modo, las muestras se deben almacenar en recipientes de politetrafluoretileno, PTFE, (excepto para el caso del fluoruro), polietileno o vidrio, lavados y aclarados repetidamente con agua ultrapura con objeto de minimizar los riesgos de contaminación de las muestras; se debe evitar utilizar soluciones de detergentes fuertemente alcalinas o ácidos fuertes minerales en las operaciones de limpieza de los recipientes (PNT-aniones, Anexo III).

### Establecimiento de la linealidad del método

Para el establecimiento del rango lineal del método de análisis se tomaron como referencia los valores bibliográficos (*APHA, 1998; UNE-EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997*), ampliéndolos tanto a concentraciones menores como mayores. Se preparó una disolución multipatrón concentrada de aniones de aproximadamente  $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y  $1000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$  por pesada directa de las correspondientes sales sódicas o potásicas, y se diluyó a las concentraciones indicadas en la Tabla 4.13 para obtener los patrones de calibración.

Tabla 4.13: Multipatrones ensayados para el establecimiento de la linealidad de la determinación de aniones

Patrón	1	2	3	4	5	6	7	8	9
$C_{\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.05	0.1	0.15	0.3	0.4	0.5	1	1.5	2
$C_{\text{NO}_2, \text{NO}_3, \text{PO}_4, \text{SO}_4} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	0.1	0.2	0.3	0.6	0.8	1	2	3	4

V (mL)	10	11	12	13	14	15	16	17	18
$C_{\text{F}, \text{Cl}, \text{Br}} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	2.5	5	7.5	10	15	20	30	50	75
$C_{\text{NO}_2, \text{NO}_3, \text{PO}_4, \text{SO}_4} (\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	5	10	15	20	30	40	60	100	150

El establecimiento del rango lineal para cada anión se basó en el análisis de los residuales y el factor de respuesta,  $f_i$ , calculado como la relación entre área de pico/concentración, para cada uno de los puntos de las líneas de calibrado.

La Fig. 4.16 muestra las líneas de calibrado obtenidas. En la gráfica insertada se ha ampliado el primer tramo de las líneas de calibrado para una mejor visualización de la falta de linealidad provocada por la desviación de la respuesta a altas concentraciones, causada por el sistema de supresión química.

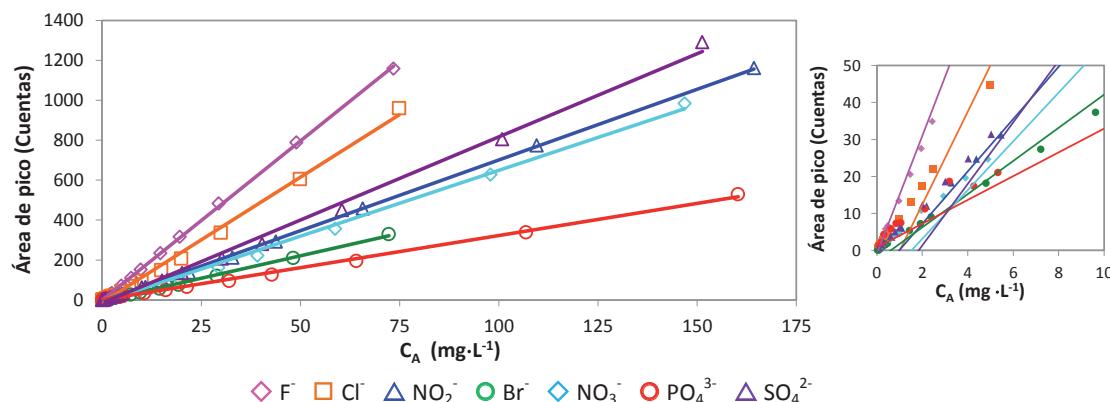


Fig. 4.16: Líneas de calibrado para la determinación de aniones

El gráfico de los residuales representado en la Fig. 4.17 muestra una tendencia no aleatoria, adquiriendo valores excesivamente elevados a concentraciones altas ( $C_A > 30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). El tipo de gráfico obtenido para casi todos los aniones indica que los residuales son heterocedásticos y el calibrado no es lineal en el rango ensayado.

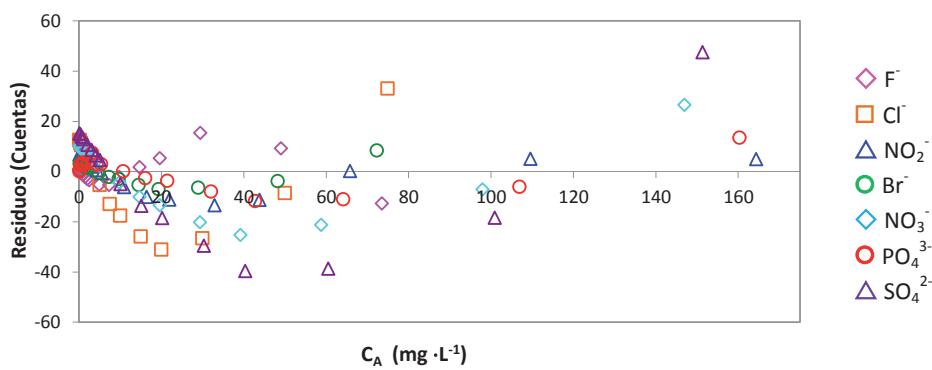


Fig. 4.17: Representación gráfica de los residuales

La Fig. 4.18 representa los factores de respuesta frente a la concentración, observándose una variabilidad menor a concentraciones intermedias, indicando que la sensibilidad es aproximadamente constante en el intervalo central de la recta ensayada.

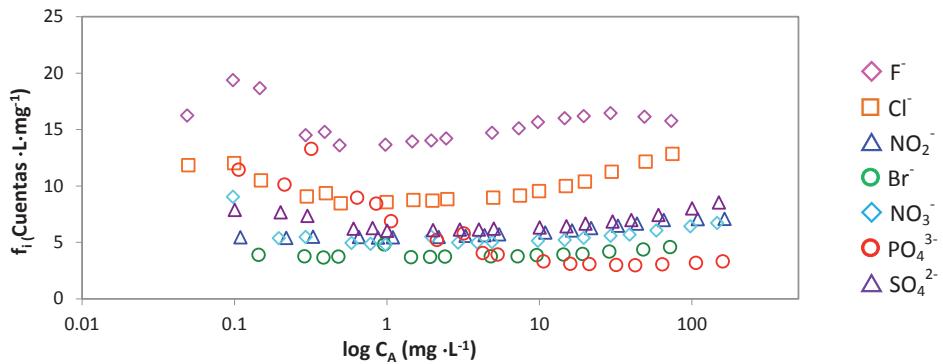


Fig. 4.18: Representación gráfica de los factores de respuesta

A la vista de estos resultados se decidió incluir en el procedimiento analítico, como rango de calibración, el intervalo donde los factores son aproximadamente constantes y los residuales pequeños y aleatorios. Los límites superiores se fijaron por tanto en 15  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y 30  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .

Se ha preferido mantener patrones a bajas concentraciones para conseguir los objetivos en los límites de cuantificación. Dado que los límites de cuantificación objetivo son 2.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  para  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , los límites inferiores de la línea de calibrado se fijaron en 0.5 y 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  respectivamente, para asegurar que los límites de cuantificación quedasen dentro del rango de calibración. Con toda esta información se establecieron los rangos lineales indicados en la Tabla 4.14 y representados en la Fig. 4.19.

Tabla 4.14: Concentración de los patrones de calibración seleccionados

Anión	Concentración, ( $\text{mg A}^- \cdot \text{L}^{-1}$ )
$\text{F}^-$ , $\text{Cl}^-$ , $\text{Br}^-$	0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15
$\text{NO}_2^-$ , $\text{NO}_3^-$ , $\text{PO}_4^{3-}$ , $\text{SO}_4^{2-}$	1, 5, 10, 15, 20, 25, 30

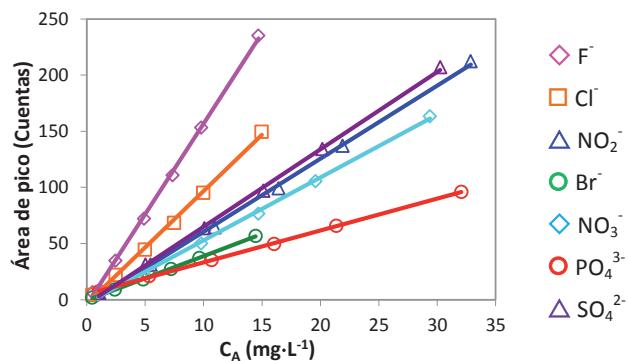


Fig. 4.19: Líneas de calibrado propuestas para la determinación de aniones

En la Fig. 4.20 podemos ver cómo, en el rango de calibración propuesto, los residuales son mucho más pequeños y los factores de respuesta son más homogéneos.

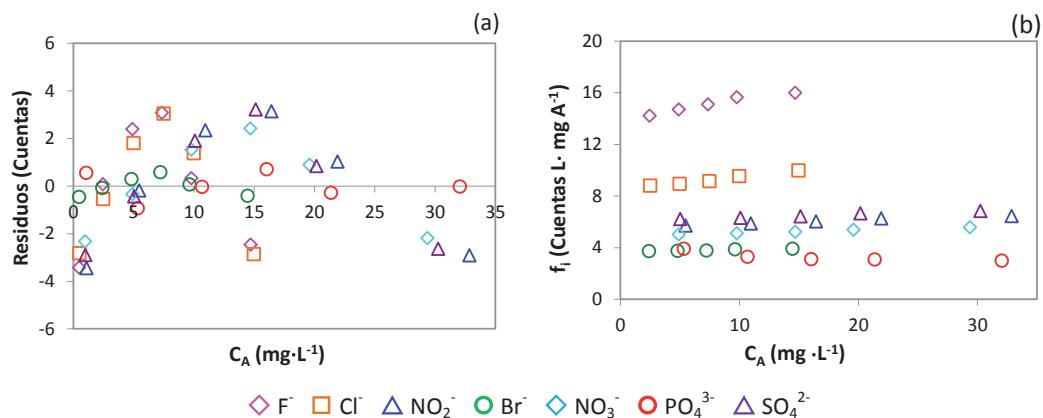


Fig. 4.20: (a) Representación gráfica de los residuales y (b) Representación gráfica de los factores de respuesta para la línea de calibrado propuesta en la determinación de aniones

Los factores de respuesta medios de cada anión,  $\bar{f}$ , y su variación, expresada como  $\%DER_f$ , se resumen en la Tabla 4.15. Se puede apreciar que, excepto para el fosfato, cumplen el valor objetivo impuesto de  $\%DER_f < 10\%$  (Tabla 3.6), lo que nos confirma la linealidad del calibrado.

Tabla 4.15: Factores de respuesta para las líneas de calibrado empleadas en la determinación de aniones

	$F^-$	$Cl^-$	$NO_2^-$	$Br^-$	$NO_3^-$	$PO_4^{3-}$	$SO_4^{2-}$
$\bar{f}$	15.2	9.3	6.3	3.8	4.9	3.2	6.2
$\%DER_f$	4.9	5.9	5.0	2.1	4.3	11.0	3.9

### Requerimientos del sistema cromatográfico

La precolumna/columna cromatográfica constituye el elemento de separación del sistema cromatográfico, siendo su eficacia de separación función de distintos parámetros operacionales como el relleno de la columna o el tipo de eluyente empleado. A medida que se usa la columna se van ocluyendo los puntos activos, el relleno se va compactando... dejando de ser eficaz. La norma UNE-EN ISO 10304-1 indica que la columna es eficiente si la separación de los picos llega a la línea base y los picos son simétricos y establece los valores límite de resolución y asimetría en  $R > 1.3$  y  $A_s < 2$ , respectivamente. Por tanto, para evaluar cuando una columna deja de ser válida se debe calcular para cada chromatograma la resolución y asimetría del pico para comprobar si el valor de estos parámetros cumple los valores límites establecidos (Schäfer et al., 2003; UNE-EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997).

En la Fig. 4.21 podemos ver dos cromatogramas superpuestos de dos patrones de idéntica concentración medidos con la precolumna/columna en estado óptimo y con la precolumna/columna envejecidas. La Tabla 4.16 resume los valores de resolución y asimetría de ambos cromatogramas comprobándose que para bromuro, nitrato y sulfato no se cumplen los requisitos de validez de la precolumna/columna, siendo esta no eficaz. Cuando estos requisitos no se satisfagan para los aniones de interés, se deberá actuar sobre la columna y/o precolumna, regenerándolas o sustituyéndolas.

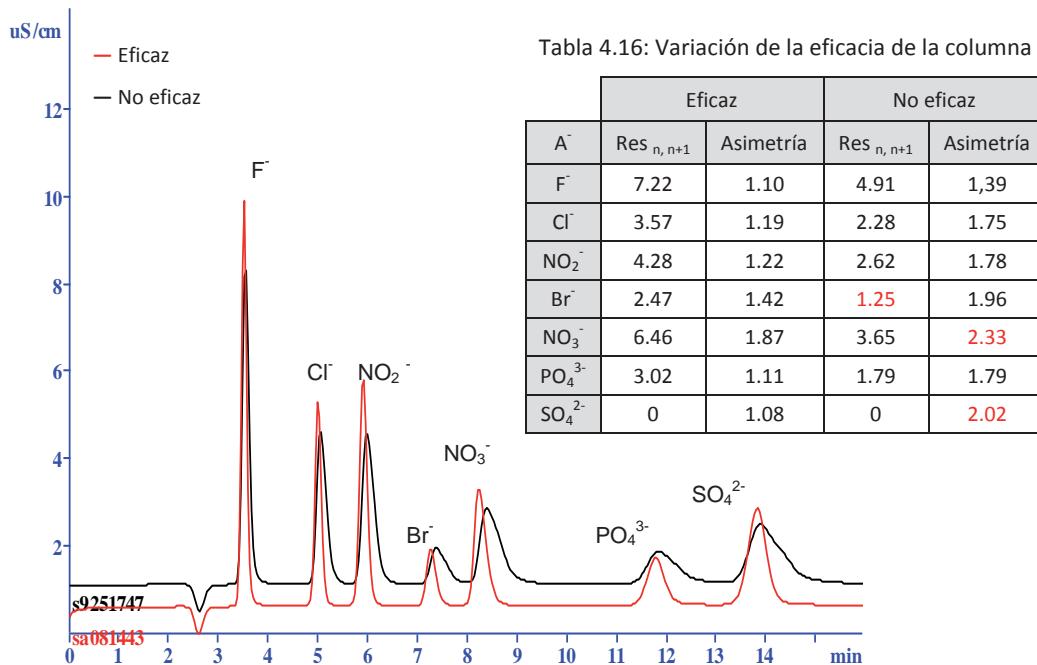


Fig. 4.21: Efecto del estado de la precolumna/columna sobre la forma de los picos cromatográficos

Al inicio de cada sesión se debe comprobar que la señal de la línea base no supera un determinado valor preestablecido; valores superiores serían indicadores de alteraciones de la fase móvil, del sistema supresor de conductividad, del detector o incluso de la columna. Se estableció un valor máximo tolerable de conductividad para la línea base de  $20 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

Aquellos procedimientos de ensayo que requieren la preparación de blancos deben tener establecido el valor máximo de señal permisible que no afecte al resultado. En este caso el blanco se evaluó inyectando, antes de los patrones de calibración, agua desionizada filtrada, verificándose la ausencia de picos.

A partir de los cromatogramas registrados para un patrón de concentración  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ , se fijaron los intervalos permitidos para los tiempos de retención, considerando una variación máxima del 5%. Los intervalos resultantes se muestran en la Tabla 4.17.

Tabla 4.17: Tiempo de retención

A <sup>-</sup>	t <sub>R</sub> ± 5% (min)
F <sup>-</sup>	3.55 ± 0.20
Cl <sup>-</sup>	5.01 ± 0.25
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5.89 ± 0.30
Br <sup>-</sup>	7.19 ± 0.35
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	8.14 ± 0.40
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	11.97 ± 0.60
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	14.03 ± 0.70

Los requisitos impuestos a los valores límite de resolución y asimetría de los picos, la señal máxima admisible de la línea base, la condición de obtener un blanco con ausencia de picos antes de empezar una nueva línea de calibrado, y la variación máxima de los tiempos de retención, fueron incluidos en el procedimiento analítico (PNT-aniones, *Anexo III*).

#### Eliminación de interferentes por extracción en fase sólida

La etapa más complicada de la determinación de aniones por cromatografía iónica (IC) es la eliminación de componentes de la matriz de la muestra que interfieren en la determinación de los aniones de interés. Estos interferentes pueden enmascarar o co-eluir con picos de interés, sobrecargar la columna o causar perturbaciones de la línea base, o pueden ser retenidos irreversiblemente por la fase estacionaria, haciendo imposible el análisis. En muchas muestras puede ocurrir que un anión determinado esté presente en concentración muy superior al resto de analitos de interés, provocando una interferencia por solapamiento de los picos vecinos. Si la concentración de este anión interferente es varios órdenes de magnitud superior a la del analito vecino, la dilución de la muestra no es efectiva.

En estos casos suele ser conveniente un pretratamiento de la muestra mediante un proceso de extracción en fase sólida, SPE, que retenga específicamente el compuesto interferente, empleando cartuchos SPE llenos del material adecuado. En la Tabla 4.18 se resumen las características de los cartuchos SPE más comúnmente empleados para la determinación de aniones por IC.

Estudios realizados con estos cartuchos han demostrado que son selectivos al anión correspondiente consiguiéndose recuperaciones del 85-115% (*Henderson et al., 1991*).

El cartucho IC-H se recomienda para la reducción del pH de las muestras alcalinas antes del análisis. El ión hidronio de la resina cambiadora es desplazado por los cationes de la muestra y neutraliza los iones hidróxido, reduciendo su pH. El resultado neto es la eliminación de hidróxido y de la cantidad equivalente de cationes de la matriz analítica.

Tabla 4.18: Características técnicas de los cartuchos SPE empleados en cromatografía aniónica

Tipo	Relleno	Contraíon	Grupo funcional	Capacidad (mequiv)	Aplicaciones
IC-H	Estireno divinil-beceno	Hidronio	Ácido sulfónico	2.0	Intercambia cationes por H <sup>+</sup> . Puede ser usado para la eliminación de cationes de la muestra y para reducir el pH
IC-Ag	Estireno divinil-beceno	Plata	Ácido sulfónico	1.7	Elimina exceso de haluros (Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> ) formando sales de plata
IC-Ba	Estireno divinil-beceno	Bario	Ácido sulfónico	1.6	Elimina exceso de sulfato precipitándolo como sulfato de bario
IC-RP	Poliestireno	--		--	Eliminan componentes hidrofóbicos, detergentes, ácidos orgánicos... Los iones inorgánicos no son retenidos

Es frecuente que el exceso de cloruro en una muestra impida la correcta cuantificación de los picos próximos. Según las especificaciones, los cartuchos SPE IC-Ag empleados para muestras con exceso de cloruro son selectivos a los haluros en general, reteniendo también yoduro y bromuro (*Henderson et al., 1991*). Una vez eluida la muestra con exceso de cloruro por un cartucho IC-Ag, y con el fin de evitar la contaminación de la columna y precolumna con iones plata lixiviados del primer cartucho, es necesario eluirlo por un segundo cartucho IC-H que intercambia los catiónes Ag<sup>+</sup> por protones (*Slingsby et al, 2001*).

En la Fig. 4.22 podemos ver los cromatogramas correspondientes a disoluciones eluidas a través de estos cartuchos: un blanco y tres alícuotas de un multipatrón, original con una concentración próxima al LoQ, dopado con 500 mg·L<sup>-1</sup> de cloruro, y esta última tratada con los dos cartuchos en serie. En los cromatogramas se observa el solapamiento del pico de cloruro con el pico vecino del nitrito en el multipatrón sin tratar, y como el tratamiento con los cartuchos SPE disminuye el pico del cloruro y bromuro sin afectar a los picos restantes.

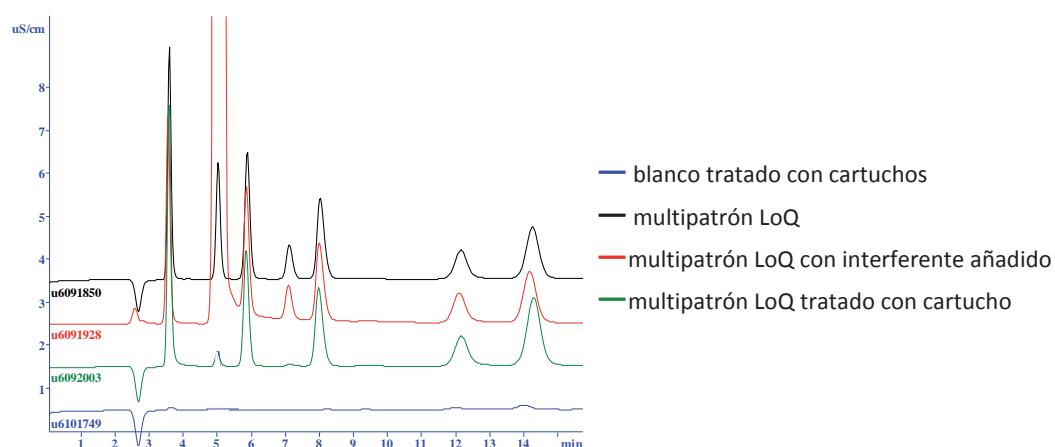


Fig. 4.22: Efecto del empleo de cartuchos SPE IC-Ag+IC-H

En aguas residuales y continentales, el sulfato suele estar presente en elevadas concentraciones, habitualmente muy superiores a la concentración del resto de aniones inorgánicos, por lo que puede causar solapamiento de picos. El exceso de sulfato puede eliminarse con un cartucho IC-Ba que lo precipita como sulfato de bario. Para ello es preciso liberar  $\text{Ba}^{2+}$  del cartucho intercambiándolo con otro catión divalente, como  $\text{Ca}^{2+}$  o  $\text{Mg}^{2+}$ , o monovalente, como  $\text{Na}^+$ . En caso de que la muestra no contenga la cantidad de estos cationes equivalente a la concentración de sulfato presente, su eliminación no sería cuantitativa. En la Fig. 4.23 se muestran los cromatogramas correspondientes a un blanco eluido a través del correspondiente cartucho, y para tres alícuotas del multipatrón: original con una concentración próxima al LoQ, dopado con 500 mg·L<sup>-1</sup> de sulfato y esta misma disolución tras ser tratada con el cartucho. Se observa que la presencia de una concentración muy elevada de sulfato modifica levemente el chromatograma sin llegar a solapar el pico del fosfato. Debido a que en este ensayo no se añadió  $\text{Ca}^{2+}$  a la muestra para provocar su intercambio con  $\text{Ba}^{2+}$ , el pico de sulfato en la muestra tratada con el cartucho IC-Ba disminuyó solo levemente. No obstante, la resolución del pico del fosfato fue completa y la línea de base mejoró ligeramente.

En la práctica, para que la eliminación de sulfato sea efectiva, se deberá dopar la muestra con la cantidad suficiente de  $\text{CaCl}_2$ , que a su vez incrementaría la concentración de cloruro; por tanto, el pretratamiento de las muestras reales consistiría en tres cartuchos en serie IC-Ba, IC-Ag e IC-H (*Slingsby et al., 1996; Slingsby et al., 2001*).

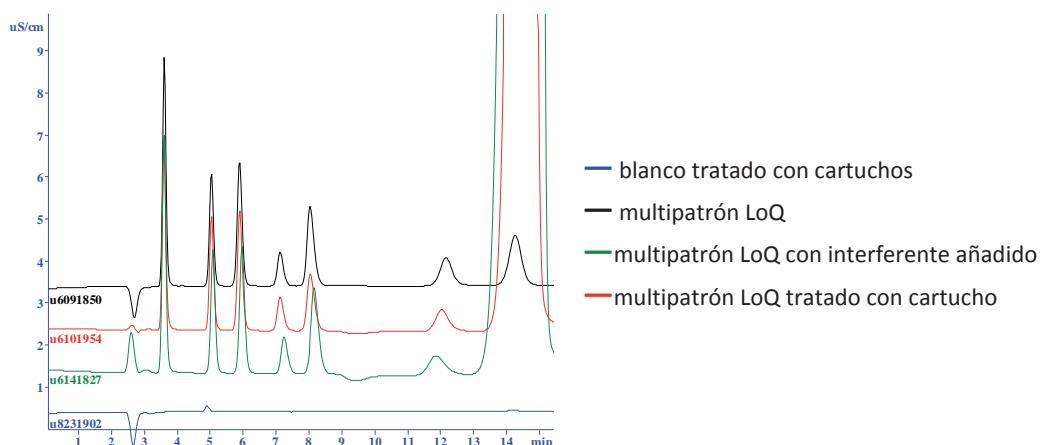


Fig. 4.23: Efecto del empleo de cartuchos SPE IC-Ba

También se deben eliminar aniones de ácidos carboxílicos de cadena corta que pudieran interferir en el análisis por su carácter aniónico, o ser retenidos por la columna cromatográfica perdiendo su eficacia de separación. La forma más habitual de eliminar estos aniones orgánicos consiste en eluir la muestra a través de un cartucho IC-H para acidificar la muestra y protonar el anión, antes del empleo de

cartuchos de extracción que contienen resinas poliméricas en fase inversa, IC-RP, donde son retenidos los ácidos orgánicos (Henderson *et al.*, 1991; Ingrand *et al.*, 2002; Slingsby *et al.*, 2001). En la Fig. 4.24 se muestran los cromatogramas correspondientes a un blanco eluido a través de un cartucho IC-RP, y a tres alícuotas del multipatrón: original, dopado con  $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  de acetato, y la misma tratada con el cartucho.

En los cromatogramas se observa como el pico del ion acetato coeluye a tiempos de retención próximos al fluoruro dificultando su correcta resolución y cuantificación.

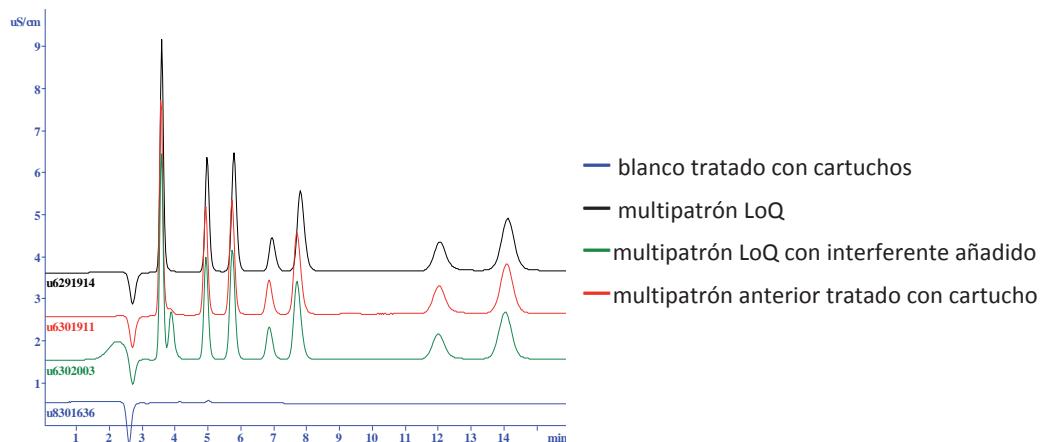


Fig. 4.24: Efecto del empleo de cartuchos SPE IC-RP

Como puede verse, la complejidad de las muestras es muy variada al igual que su pretratamiento; en cualquier caso, se recomienda la realización de blancos con los cartuchos a emplear en el pretratamiento de las muestras, especialmente cuando el anión a cuantificar está en concentraciones próximas al LoQ.

### Elección y preparación de las matrices sintéticas

En un intento de evaluar los efectos de la matriz en la exactitud del método y por tanto en la incertidumbre, y en orden a validar el método en todo el rango de matrices de aguas incluido en el alcance del método, se emplearon muestras de control preparadas a partir de cuatro matrices sintéticas de complejidad creciente: agua ultrapura para evitar el efecto matriz; disolución de ftalato ácido de potasio, recomendado como patrón de materia orgánica (UNE 77004, 2002) y con carácter aniónico; disolución de glucosa, recomendado como patrón de materia orgánica (UNE-EN 1899-1, 1998) y carácter neutro; por último, la matriz sintética preparada como muestra compuesta de aguas residuales y continentales, descrita en el *Apartado 3.2*.

Las disoluciones de ftalato y glucosa simulan la materia orgánica de un agua residual. Se investigó el efecto de la concentración de materia orgánica en la respuesta cromatográfica preparando disoluciones de ftalato y glucosa a diferentes concentraciones, equivalentes a materia orgánica expresada como DQO: 100, 500,

1000, 2500, 5000 y 10000 mg O<sub>2</sub> L<sup>-1</sup>. La Fig. 4.25 muestra los cromatogramas obtenidos para las diferentes disoluciones de ftalato y glucosa.

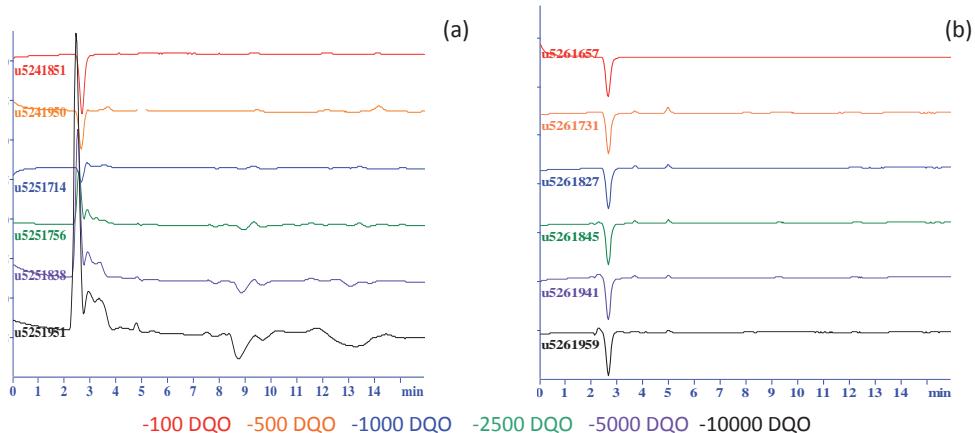


Fig. 4.25: Cromatogramas de las matrices sintéticas de concentraciones crecientes de materia orgánica simulada con (a) ftalato y (b) glucosa

Las disoluciones anteriores se doparon con los aniones a estudiar a un nivel de concentración intermedio (aproximadamente 8 mg·L<sup>-1</sup> para F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup> y 16 mg·L<sup>-1</sup> para el NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). La Fig. 4.26 muestra los cromatogramas obtenidos.

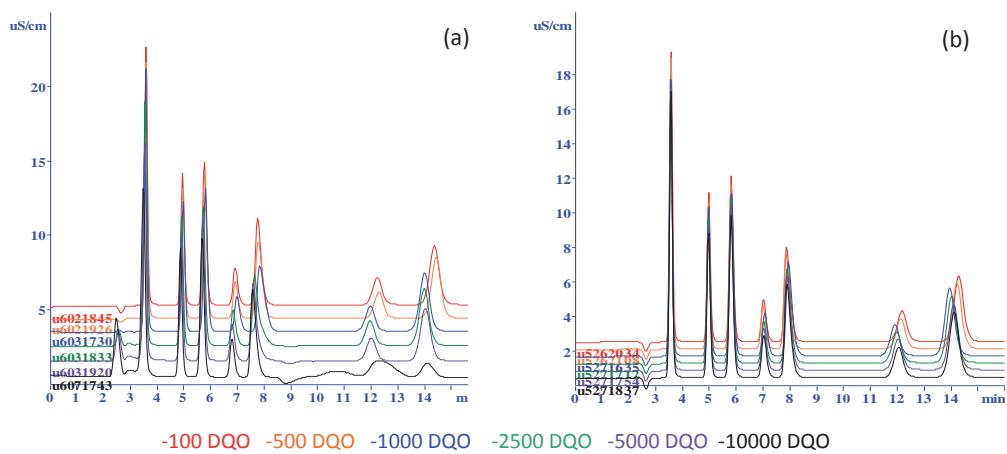


Fig. 4.26: Cromatogramas de las matrices sintéticas de concentraciones crecientes de materia orgánica simulada con ftalato (a) y glucosa (b) dopadas con aniones

Se observa que la concentración de materia orgánica simulada con glucosa no afecta ni a la línea base ni a los picos cromatográficos de los aniones; sin embargo, la matriz sintética de ftalato distorsiona tanto la línea base como las señales de fosfato y sulfato a concentraciones elevadas de ftalato. Esta diferencia de comportamiento se debe probablemente al carácter aniónico del ftalato.

El efecto de la concentración de ftalato y glucosa sobre los picos cromatográficos de los aniones se puede ver cuantitativamente en la Fig. 4.27, que confirma la imposibilidad de cuantificar correctamente fosfato en matriz ftalato a partir de 500 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup> y sulfato a partir de 10000 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>.

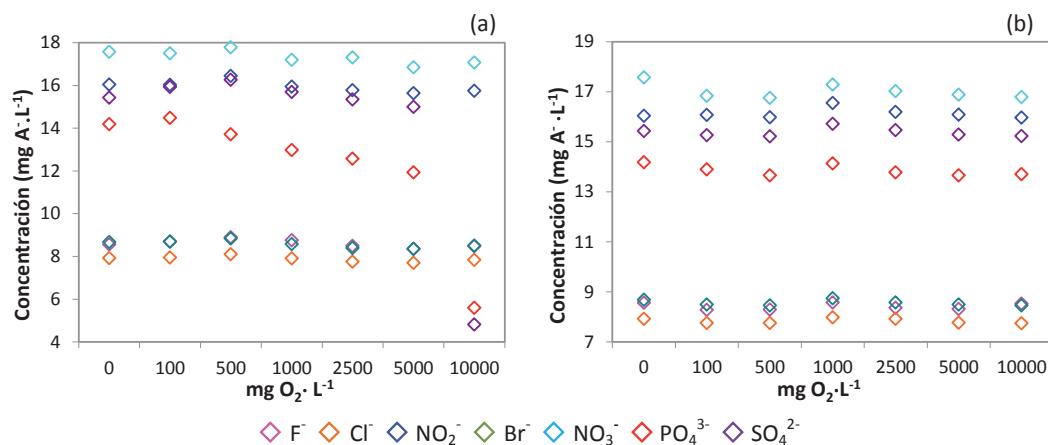


Fig. 4.27: Influencia de la concentración de (a) ftalato y (b) glucosa en la determinación de aniones

Teniendo en cuenta que la concentración de DQO límite de vertido de aguas residuales en la mayoría de los reglamentos es de 500 mg O<sub>2</sub>·L<sup>-1</sup>, se seleccionó ese valor de concentración de materia orgánica para la preparación de las matrices sintéticas, equivalente a 425 mg ftalato·L<sup>-1</sup> y 469 mg glucosa·L<sup>-1</sup>. Esta concentración de materia orgánica no interfiere en el desarrollo del cromatograma en el caso de la matriz glucosa, pero sí parece afectar ligeramente en el caso de la matriz ftalato.

La matriz sintética de mayor complejidad preparada fue la muestra compuesta. Antes de preparar las muestras de control en esta matriz se procedió a eliminar los aniones inicialmente presentes. Para ello, se llenó una columna de vidrio de 30x500 mm con llave de vidrio y placa porosa nº0 con esmerilado 29/32, con resina intercambiadora de aniones Amberlite IRN 78 estireno-divinilbenzeno (gel) en forma hidróxido con una capacidad de intercambio de 1,1 meq·mL<sup>-1</sup> (húmeda) o 4.0 meq·g<sup>-1</sup> (seca), de la marca *Supelco* (Sigma-Aldrich). En la parte superior se colocó un embudo de decantación macho-hembra 29/32-29/32 de 500 mL de capacidad desde donde se dosificaba poco a poco la matriz compuesta, previamente filtrada a través de un filtro de fibra de vidrio de 45 µm de tamaño de poro. Por último se recogió la matriz exenta de aniones en un vaso de precipitados. La Fig. 4.28 muestra el montaje experimental empleado.

Para comprobar la eficacia del intercambio de aniones por grupos hidroxilo se midieron las respuestas cromatográficas de diferentes alícuotas para comprobar la ausencia de aniones. En la Fig. 4.29 se muestra un cromatograma de la muestra tratada en el que se observa pequeños picos debidos a algunos aniones, indicando que no se eliminan en su totalidad, pero la concentración residual es, para todos los aniones, inferior al LoQ. Cuando la señal de aniones aumentaba, se procedía a

regenerar la resina pasando una disolución concentrada de hidróxido sódico, lavando posteriormente el exceso de hidróxido con agua ultrapura.



Fig. 4.28: Montaje experimental para la eliminación de aniones en la muestra compuesta

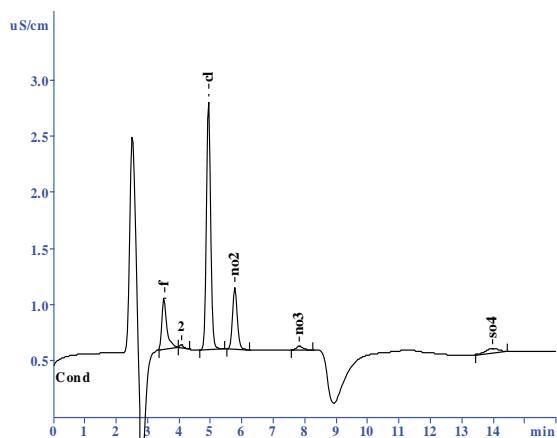


Fig. 4.29: Cromatograma ampliado de la matriz compuesta tratada con resina cambiadora de iones

#### 4.2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el protocolo de validación descrito en el *Apartado 3.3* se describió el diseño experimental seleccionado para la validación del método de determinación de aniones.

Las muestras de control se prepararon a los niveles de concentración a ensayar,  $N_i$  ( $2.5, 12.5, 125, 1250$  y  $6250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para  $\text{F}^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{Br}^-$  y  $5, 25, 250, 2500$  y  $12500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  para el  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ ) disolviendo la cantidad necesaria de la sal sódica o potásica de los respectivos aniones en las distintas matrices sintéticas. Se prepararon cantidades suficientes para realizar todos los ensayos de validación.

Con las matrices sintéticas agua ultrapura y matriz compuesta se prepararon muestras de control únicamente a los dos primeros niveles de concentración para reducir el trabajo experimental. No se consideró necesaria la preparación de muestras de control a los tres niveles de concentración superiores puesto que, en el caso de la matriz agua ultrapura, al diluir los niveles superiores para poder cuantificarlos quedan concentraciones similares a los dos primeros niveles y sin presencia de interferentes, con lo cual no aporta información adicional. En el caso de la matriz compuesta, al provenir de una mezcla de aguas residuales, debería estar constituida por una amplia gama de compuestos potencialmente interferentes en la determinación de los aniones; sin embargo, el proceso de eliminación de los aniones inicialmente presentes supuso la eliminación de muchos de esos interferentes de modo que el efecto matriz a niveles superiores, tras la dilución, cabe esperar que sea poco significativo.

Para simular el efecto de la materia orgánica, ausente en la matriz agua ultrapura y a muy baja concentración en la matriz compuesta, se prepararon cinco muestras de control a cinco niveles de concentración en la matriz sintética glucosa y otros tantos en la matriz ftalato. Cabe esperar que las muestras de control con concentraciones bajas de aniones estén afectadas por el efecto matriz y las muestras de control a altas concentraciones estén afectadas por el efecto de la dilución y por el efecto matriz, que disminuye a medida que aumenta la dilución de la muestra de control. De este modo, las muestras de control preparadas en estas dos matrices cubrirán todo el rango de medida propuesto en los objetivos. Las diferencias entre la matriz glucosa y ftalato estarán previsiblemente causadas por el hecho de que la glucosa es un compuesto neutro que no afecta al desarrollo del cromatograma, mientras que el ftalato es una especie aniónica que causa de la distorsión de los cromatogramas a elevada concentración, como se ha mostrado en la Fig. 4.26.

Las concentraciones de los aniones en las diferentes muestras de control preparadas se encuentran recogidas en la Tabla 4.19. También se muestra la incertidumbre de cada concentración estimada mediante el modelo “bottom-up”.

Antes de inyectarlas en el cromatógrafo, las muestras de control con niveles de concentración superiores al rango de ensayo fueron diluidas empleando diferentes factores de dilución cada día, de modo que se abarcasen todas las posibilidades reales y evitando sesgos por dilución. La Tabla 4.20 muestra detalladamente las diluciones realizadas cada día.

Las Tablas A.II.1 a A.II.7 del Anexo II muestran todos los resultados experimentales obtenidos.

Tabla 4.19: Concentraciones e incertidumbre de las muestras de control, en  $\text{mg A}^{-}\cdot\text{L}^{-1}$ 

Matriz	Nivel	F	Cl	$\text{NO}_2$	Br	$\text{NO}_3$	$\text{PO}_4$	$\text{SO}_4$
Glucosa	N <sub>1</sub>	2.563 ± 0.030	2.587 ± 0.033	5.283 ± 0.066	2.648 ± 0.034	5.273 ± 0.080	5.127 ± 0.063	5.419 ± 0.066
	N <sub>2</sub>	13.594 ± 0.084	13.739 ± 0.091	25.32 ± 0.16	13.645 ± 0.098	28.01 ± 0.30	27.50 ± 0.16	25.58 ± 0.15
	N <sub>3</sub>	125.25 ± 0.27	128.45 ± 0.32	251.69 ± 0.75	125.08 ± 0.31	248.0 ± 2.3	249.54 ± 0.53	251.19 ± 0.40
	N <sub>4</sub>	1256.1 ± 2.6	1282.1 ± 2.9	2480.3 ± 7.6	1251.9 ± 2.3	2515 ± 23	2490.1 ± 5.4	2492.3 ± 4.2
	N <sub>5</sub>	6363 ± 13	6330 ± 14	12468 ± 38	6915 ± 12	12490 ± 110	12653 ± 27	12532 ± 21
Ftalato	N <sub>1</sub>	2.527 ± 0.031	2.624 ± 0.033	5.106 ± 0.064	2.543 ± 0.033	5.092 ± 0.078	5.061 ± 0.062	5.031 ± 0.062
	N <sub>2</sub>	12.702 ± 0.078	13.36 ± 0.10	25.42 ± 0.13	12.97 ± 0.13	25.12 ± 0.26	25.41 ± 0.13	25.15 ± 0.12
	N <sub>3</sub>	126.75 ± 0.27	123.66 ± 0.31	251.16 ± 0.75	128.34 ± 0.31	250.2 ± 2.3	252.82 ± 0.54	248.83 ± 0.40
	N <sub>4</sub>	1250.3 ± 2.6	1250.6 ± 2.8	2605.7 ± 7.9	1261.5 ± 2.3	2494 ± 23	2498.5 ± 5.5	2504.2 ± 4.3
	N <sub>5</sub>	6248 ± 13	6238 ± 13	12520 ± 38	6766 ± 11	12510 ± 110	12979 ± 28	12119 ± 20
Agua	N <sub>1</sub>	2.563 ± 0.030	2.587 ± 0.033	5.283 ± 0.066	2.648 ± 0.034	5.273 ± 0.080	5.061 ± 0.062	5.031 ± 0.062
	N <sub>2</sub>	13.594 ± 0.084	13.739 ± 0.091	25.32 ± 0.16	13.645 ± 0.098	28.01 ± 0.30	25.41 ± 0.13	25.15 ± 0.12
Compuesta	N <sub>1</sub>	2.563 ± 0.030	2.587 ± 0.033	5.283 ± 0.066	2.648 ± 0.034	5.273 ± 0.080	5.061 ± 0.062	5.031 ± 0.062
	N <sub>2</sub>	13.594 ± 0.084	13.739 ± 0.091	25.32 ± 0.16	13.645 ± 0.098	28.01 ± 0.30	25.41 ± 0.13	25.15 ± 0.12

Tabla 4.20: Diluciones realizadas durante el diseño experimental

N <sub>i</sub>	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4		
	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> ( $\text{mg L}^{-1}$ )
LoQ = N <sub>1</sub>	1	1	2.5	5	1	1	2.5	5	1	1	1	2.5
N <sub>2</sub>	1	1	12.5	25	50	6.25	12.5	1	1	12.5	25	50
N <sub>3</sub>	11	100	13.75	27.5	4	50	10	20	3	50	7.5	15
N <sub>4</sub>	1.1	100	13.75	27.5	0.4	50	10	20	0.3	50	7.5	15
L <sub>S</sub> = N <sub>5</sub>	0.2	100	12.5	25	0.1	100	6.25	12.5	0.1	100	6.25	12.5

### 4.2.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Una vez realizados todos los ensayos programados en el diseño de experimentos se procedió al análisis estadístico de los mismos para evaluar cada una de las características técnicas del método de análisis indicadas en la Tabla 3.6 y comparar los resultados con los objetivos.

#### Selectividad

Se hizo una revisión bibliográfica de todas las normas y publicaciones disponibles para justificar la selectividad y eliminar posibles interferencias (*APHA, 1998; ASTM D 4327, 2011; UNE-EN ISO 10304-1, 2009; USEPA Method 300.1, 1997*). Estas interferencias pueden deberse a diferentes causas:

- ▲ Coelución cromatográfica. Por ejemplo, la determinación de fluoruro y cloruro está sujeta a la interferencia causada por la presencia de aniones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el fórmico o el acético, que aparecen a tiempos de retención muy próximos, y que interfieren incluso en concentraciones bajas. Los aniones de otros ácidos orgánicos como, por ejemplo, malónico, maleico y málico, pueden interferir en la determinación de los aniones inorgánicos si se encuentran presentes en concentraciones elevadas. Los aniones inorgánicos fluoroborato y clorito también pueden interferir en la determinación.
- ▲ El pico de un analito vecino solapa al pico de interés. La existencia de diferencias importantes en las concentraciones de los distintos aniones a analizar puede originar fenómenos de sensibilidad cruzada (perdida de resolución).
- ▲ Los tiempos de retención cambian debido al cambio de la fuerza iónica y pH de la fase móvil por lo que esta debe ser cuidadosamente controlada.
- ▲ La contaminación de los reactivos y/o del material de laboratorio empleados en la preparación de las muestras puede conducir a falsos positivos de los analitos de interés o incrementar los límites de detección debido a elevadas líneas base.
- ▲ El sulfito puede causar un sesgo positivo para el sulfato, como consecuencia de su oxidación por el oxígeno disuelto, que es catalizada por cationes como  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos cationes pueden ser enmascarados ajustando el pH de la muestra a 10. También puede añadirse una solución de formaldehído con objeto de estabilizar el sulfito.
- ▲ Se debe investigar la presencia de metales de transición o pesados que puedan formar complejos solubles con los aniones estudiados y eliminarlos con ayuda de intercambiadoras de cationes, por ejemplo cartuchos acondicionados en forma  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$ .

#### Linealidad/Rango de ensayo

Para la estimación de los parámetros de linealidad se utilizaron los datos de las 16 líneas de calibrado realizadas durante el desarrollo del diseño experimental. Los

resultados medios obtenidos para los parámetros estadísticos de las líneas de calibrado para cada anión están recogidos en la Tabla 4.21.

Tabla 4.21: Valores medios de los parámetros de calibración

$A^-$	$\bar{b}$ (cuentas·L·mg <sup>-1</sup> )	$\bar{s}_b$ (cuentas·L <sup>-1</sup> ·mg <sup>-1</sup> )	$\bar{a}$ (cuentas)	$\bar{s}_a$ (cuentas)	$\bar{s}_e$ (--)	$r^2$ (--)
F <sup>-</sup>	16.07	0.2190	-4.874	2.012	2.889	0.9991
Cl <sup>-</sup>	10.10	0.2304	-4.349	2.140	3.074	0.9974
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.783	0.1160	-4.846	2.108	3.028	0.9985
Br <sup>-</sup>	3.911	0.04344	-0.8365	0.4089	0.5874	0.9994
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.267	0.08558	-3.576	1.612	2.316	0.9986
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2.786	0.02902	4.673	0.5357	0.7695	0.9994
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6.823	0.1089	-4.142	2.018	2.899	0.9987

A partir de estos datos y teniendo en cuenta que el estadístico *t de Student*,  $t_{critico}$ , para  $\alpha=0.05$  y para  $n-2=5$  grados de libertad ( $n$  = puntos de la línea de calibrado = 7) es 2.571, se establecieron los límites de confianza de la pendiente y ordenada en el origen, resultando los valores mostrados en la Tabla 4.22.

Tabla 4.22: Intervalos de confianza de los parámetros de calibración para la determinación de aniones

$A^-$	b (cuentas·L·mg <sup>-1</sup> )	a (cuentas)
F <sup>-</sup>	15.50 < b < 16.63	-10.05 < a < 0.30
Cl <sup>-</sup>	9.51 < b < 10.69	-9.85 < a < 1.15
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.48 < b < 7.08	-10.27 < a < 0.57
Br <sup>-</sup>	3.80 < b < 4.02	-1.89 < a < 0.21
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.05 < b < 5.49	-7.72 < a < 0.57
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	2.71 < b < 2.86	3.29 < a < 6.05
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6.54 < b < 7.10	-9.33 < a < 1.05

Para todos los aniones la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero, excepto para el fosfato, en el que la ordenada en el origen es positiva apuntando a la presencia de un error sistemático. Los coeficientes de determinación medios fueron para todos los aniones mayores que el valor objetivo ( $r^2 > 0.99$ ). Los resultados obtenidos confirmaron la linealidad en los rangos de calibración propuestos y el cumplimiento de los objetivos indicados en la Tabla 3.6 para todos los aniones excepto para el fosfato.

Se incluyeron en el procedimiento analítico, como criterios de aceptación de las próximas líneas de calibrado, que la ordenada en el origen y la pendiente estén

incluidas en los intervalos mostrados en la Tabla 4.22, y que el coeficiente de correlación sea mayor que el mínimo de todos los obtenidos durante las calibraciones realizadas para la validación; dicho valor fue 0.996.

Para comprobar la validez de las líneas de calibrado realizadas durante los experimentos, se alternaron entre las muestras tres multipatrones distintos a los empleados durante la realización del calibrado y a tres niveles de concentración: límite de cuantificación, concentración intermedia y límite superior instrumental. La diferencia entre las concentraciones real y obtenida, medida como porcentaje de error relativo,  $\%Er$ , fue inferior al 5% en todos los casos, excepto para la concentración inferior del anión fosfato (*Bettencourt et al., 1999*).

Teniendo en cuenta la duración de cada cromatograma, la no disponibilidad de inyector automático, la estabilidad de la respuesta cromatográfica y las especificaciones del fabricante del equipo, se decidió establecer en el procedimiento analítico una frecuencia de calibración mínima: mensual, cada 500 inyecciones o después de una incidencia (mantenimiento del equipo, cambio de precolumna/columna, muestra muy contaminada, avería técnica...) (*Mosello et al., 2004*). Para asegurar la validez de las líneas de calibrado se deberá medir un multipatrón al inicio de la sesión de trabajo y cada diez muestras, permitiendo un error respecto al valor esperado  $\leq 5\%$ . En caso contrario, no se dará por buena la línea de calibrado almacenada y se recalibrará de nuevo.

### Sensibilidad

La sensibilidad del método de análisis para los aniones investigados, expresada como la pendiente de las respectivas líneas de calibrado, queda recogida en la tabla siguiente:

Tabla 4.23: Sensibilidades obtenidas para cada anión, expresada en cuentas·L·mg<sup>-1</sup>

A <sup>-</sup>	F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Sensibilidad	16.07	10.10	6.783	3.911	5.267	2.786	6.823

Se observa que el método es más sensible al anión fluoruro y menos al fosfato, siendo el orden de sensibilidad: F<sup>-</sup> > Cl<sup>-</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> ≈ NO<sub>2</sub><sup>-</sup> ≈ NO<sub>3</sub><sup>-</sup> > Br<sup>-</sup> > PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>

### Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ)

Estos dos parámetros se estimaron, de acuerdo a las ecuaciones indicadas en la Tabla 3.6, a partir de los parámetros de calibración de las 16 líneas de calibrado realizadas durante el desarrollo experimental, recogidos en la Tabla 4.21. Los valores obtenidos aparecen en la Tabla 4.24.

Se puede apreciar que los valores estimados para los límites de cuantificación son inferiores a los valores objetivos propuestos en la Tabla 3.6 excepto para el anión cloruro.

Tabla 4.24: LoD y LoQ obtenidos para cada anión

A <sup>-</sup>	LoD <sub>estimado</sub> (mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	LoQ <sub>estimado</sub> (mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	LoQ <sub>objetivo</sub> (mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )
F <sup>-</sup>	0.59	1.80	2.5
Cl <sup>-</sup>	1.00	3.04	2.5
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1.47	4.46	5.0
Br <sup>-</sup>	0.49	1.50	2.5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.45	4.40	5.0
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.91	2.76	5.0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1.40	4.25	5.0

Estos valores se han estimado a partir de los parámetros de líneas de calibrado realizadas con patrones de aniones en agua pura. En el caso de muestras reales, los interferentes propios de la matriz y la manipulación de la muestra introducen un aumento inevitable de los LoD y LoQ con respecto a los presentados en la Tabla 4.24. Para demostrar la consecución del LoQ objetivo al analizar muestras reales, se compararon los resultados analíticos de las muestras de control preparadas al primer nivel de concentración, N<sub>1</sub>, correspondiente al LoQ objetivo, con los valores esperados. La Tabla 4.25 muestra los valores esperados y obtenidos, y la diferencia entre ambos expresada como porcentaje de error relativo, %Er. Se ha resaltado en color rojo los errores superiores al sesgo máximo admitido (15%).

Para cada anión se aplicó una prueba estadística *t* entre la media experimental obtenida y el valor conocido, *C<sub>preparada</sub>*, para decidir si la diferencia era significativa (Miller *et al.*, 2002). Esta prueba concluyó que había diferencias significativas entre ambos valores; sin embargo, los porcentajes de error relativo fueron inferiores al sesgo máximo admisible, 15%, exceptuando el fosfato en las matrices sintéticas más complejas; por tanto, se mantuvieron los valores objetivo de LoQ de 2.5 mg·L<sup>-1</sup> para F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup> y 5 mg·L<sup>-1</sup> para el NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Para el anión fosfato de deberían analizar las causas que llevan a errores tan altos en matrices complejas antes de fijar un valor de LoQ.

### Veracidad

Se calcularon los errores relativos, %E<sub>r-i</sub>, de los valores obtenidos para cada analista y día, respecto a los valores esperados. En el caso de las muestras de control preparadas con matriz sintética compuesta, se calcularon las concentraciones una vez restada a cada anión el área del blanco.

Tabla 4.25: Concentraciones de aniones en las muestras de control N<sub>1</sub>

F <sup>-</sup>				Cl <sup>-</sup>				NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>				Br <sup>-</sup>				NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>				PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>				SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>			
C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er	C <sub>preparada</sub>	C <sub>medida</sub>	%Er				
2.563	2.594	1.2	2.742	6.0		5.421	2.6		2.743	3.6		5.442	3.2		5.136	0.18		5.586	3.1								
	2.463	-3.9	2.678	3.5		5.352	1.3		2.725	2.9		5.451	3.4		5.080	-0.92		5.495	1.4								
	2.548	-0.58	2.669	3.2		5.456	3.3		2.725	2.9		5.449	3.3		4.978	-2.9		5.557	2.5								
	2.508	-2.2	2.587	1.0		5.271	-0.22		2.660	0.47		5.273	2.6		5.366	1.8		4.766	-7.0		5.419	-0.38					
	2.532	-1.2	2.702	4.4		5.283	5.355	1.4	2.716	2.6		5.420	2.8		5.046	-1.6		5.481	1.1								
	2.514	-1.9	2.662	2.9		5.387	2.0		2.718	2.6		5.429	2.9		4.852	-5.4		5.415	-0.10								
	2.530	-1.3	2.639	2.0		5.409	2.4		2.843	7.4		5.456	3.5		4.897	-4.5		5.537	2.2								
	2.529	-1.3	2.658	2.7		5.475	3.6		2.712	2.4		5.296	0.43		4.998	-2.5		5.500	1.5								
	2.675	5.9	2.742	4.5		5.221	2.2		2.607	2.5		5.174	1.6		3.924	-23		5.472	8.8								
	2.768	9.6	2.651	1.0		5.196	1.7		2.615	2.8		5.201	2.1		3.872	-24		5.499	9.3								
2.527	2.855	13	2.665	1.6		5.145	0.76		2.544	0.0		5.456	7.1		3.677	-27		5.754	14								
	2.749	8.8	2.624	1.8		5.154	0.92		2.675	5.2		5.092	7.8		5.492	7.8		3.888	-23		5.483	9.0					
	2.888	14	2.837	8.1		5.360	5.0		2.750	8.2		5.061	9.2		3.971	-22		5.031	5.701	13							
	2.750	8.8	2.719	3.6		5.134	0.53		2.593	2.0		5.307	4.2		3.732	-26		5.399	7.3								
	2.859	13	2.714	3.4		5.120	0.27		2.632	3.5		5.356	5.2		3.881	-23		5.472	8.8								
	2.724	7.8	2.685	2.3		4.987	-2.3		2.582	1.5		5.233	2.8		3.035	-40		5.452	8.4								
	2.511	-2.0	2.884	11		5.506	4.2		2.747	3.7		5.448	3.3		3.051	-41		5.597	3.3								
	2.432	-5.1	2.700	4.4		5.380	1.8		2.701	2.0		5.459	3.5		3.339	-35		5.497	1.4								
	2.491	-2.8	2.852	10		5.550	5.1		2.730	3.1		5.353	1.5		3.020	-41		5.661	4.4								
	2.477	-3.4	2.587	6.7		5.283	2.8		2.648	2.695	1.8	5.273	4.3		5.127	3.4		2.856	-44		5.547	2.3					
	2.480	-3.3	2.844	9.9		5.470	3.5		2.732	3.2		5.455	3.4		3.051	-41		5.419	5.611	3.5							
Compuesta	2.451	-4.4	2.913	13		5.483	3.8		2.696	1.8		5.424	2.9		3.399	-34		5.485	1.2								
	2.453	-4.3	2.771	7.1		5.512	4.3		2.851	7.7		5.467	3.7		3.427	-33		5.600	3.3								
	2.463	-3.9	2.764	6.8		5.538	4.8		2.705	2.2		5.430	3.0		3.048	-41		5.550	2.4								

Se calculó el porcentaje de error relativo medio,  $\%E_{r\text{ MEDIO}}$ , y los porcentajes de error relativo máximo y mínimo,  $\%E_{r\text{ MAX}}$  y  $\%E_{r\text{ MIN}}$ , para cada nivel de concentración de cada anión en las muestras de control. Para no alargar la presentación de resultados, estos se muestran de forma gráfica en la Fig. 4.30, en la que se aprecia que, a niveles bajos de concentración, los errores son en general mayores. Para la mayoría de aniones ensayados, el rango de valores de error relativo para el nivel más bajo de concentración no incluye al cero evidenciando la presencia de error sistemático positivo para este nivel de concentración.

En el resto de niveles de concentración se observa cierto grado de homogeneidad en los valores obtenidos y se cumple el valor objetivo  $\%E_r < 15\%$  para todos los aniones, excepto en el caso del fosfato, para el que los errores son desmesurados a niveles bajos de concentración, no alcanzándose el valor objetivo.

La veracidad del método, expresada como sesgo, se estimó como el error relativo máximo de cada nivel de concentración, en valor absoluto,  $|\%E_{r\text{ MAX}}|$ . Se tomó el valor de error máximo en lugar del valor promedio para reflejar los valores más desfavorables del sesgo y garantizar así el cumplimiento del objetivo de veracidad en todos los casos (*Eurolab, 2006*). La Tabla 4.26 muestra dichos valores.

En general se observa que el sesgo aumenta a medida que disminuye la concentración de analito en la muestra y aumenta la complejidad de la matriz. La influencia de la matriz en el sesgo es más notable, además, a concentraciones próximas al límite de cuantificación. Una de las posibles causas es que, a altas concentraciones, la muestra debe ser diluida previamente al análisis, provocando una disminución del efecto matriz que redundaría en una disminución del error.

### Precisión

La precisión se evaluó por medio de la varianza de reproducibilidad,  $s^2_{\text{reproducibilidad}}$  obtenida del análisis de varianza de los resultados del diseño de experimentos totalmente anidado de tres factores, empleando la ec. 3.4. En la Tabla 4.27 están recogidos los valores de la precisión para cada nivel de concentración, expresados como porcentaje de desviación estándar relativa,  $\%DER$ . Estos valores se han representado gráficamente en la Fig. 4.31, en la que se observa que el valor obtenido es menor que el valor objetivo propuesto,  $\%DER < 15\%$ , en todos los niveles de concentración y para todas las matrices ensayadas. En la misma figura se puede apreciar que, aunque la determinación de fosfato es menos precisa, los valores obtenidos están por debajo del valor objetivo. También se aprecia como la falta de precisión aumenta con la complejidad de la muestra, siendo mayor a bajos niveles de concentración mientras que a altas concentraciones el efecto de la matriz analítica en la precisión es menos evidente. Por último, cabe destacar que el efecto matriz en las muestras preparadas con la matriz sintética compuesta no es muy significativo debido a que la eliminación de los aniones inicialmente presentes va previsiblemente acompañada de la eliminación de otros muchos interferentes.

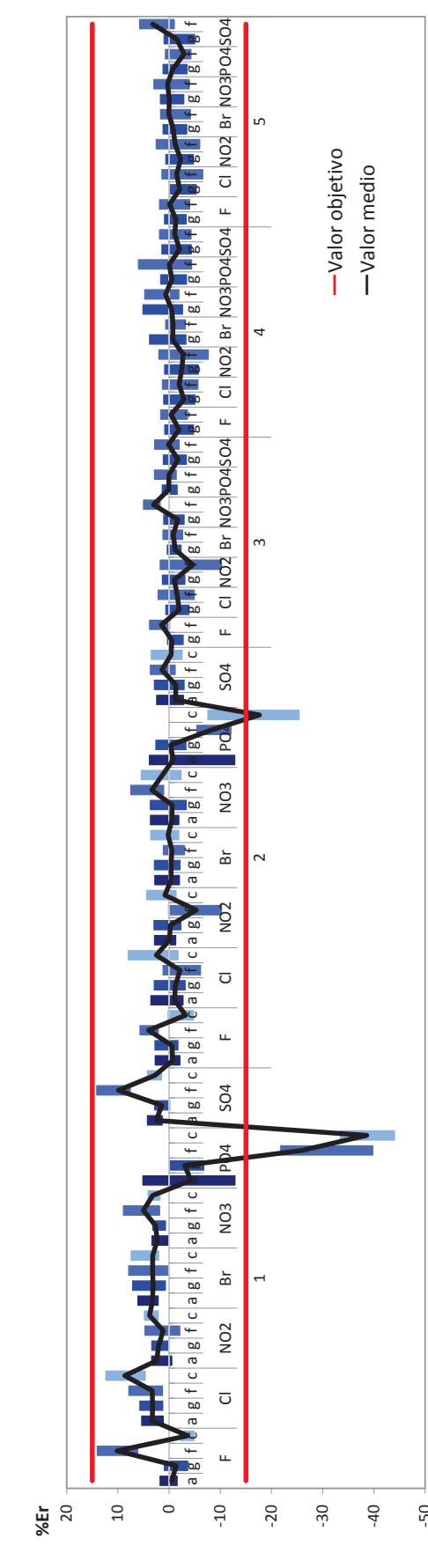


Fig. 4.30: Representación gráfica de la estimación de la veracidad para la determinación de aniones en las distintas matrices: ■ agua ■ glucosa ■ ftalato ■ compuesta

Tabla 4.26: Estimación de la veracidad para la determinación de aniones, expresada como sesgo relativo máximo,  $| \%E_r /_{\text{MAX}} |$ 

Anión	Aguas					Glucosa					Ftalato					Comuesta	
	$N_1$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5$	$N_1$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5$	$N_1$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5$	$N_1$	$N_2$
$\text{F}^-$	2.0	3.0	3.9	3.0	5.1	3.6	14	5.9	4.1	3.8	4.3	5.1	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
$\text{Cl}^-$	5.6	3.8	6.0	3.4	4.1	5.3	5.6	8.1	6.4	5.2	5.9	6.8	13	13	13	13	8.2
$\text{NO}_3^-$	3.7	3.1	3.6	3.2	3.4	6.0	5.0	5.0	11	11	7.9	6.3	5.1	4.6	4.6	4.6	4.6
$\text{Br}^-$	6.4	3.0	7.4	3.1	2.6	4.1	3.7	8.2	3.3	2.9	3.4	4.4	7.7	3.9	3.9	3.9	3.9
$\text{NO}_3^-$	3.6	3.9	3.5	3.9	3.2	5.4	3.1	9.2	7.7	5.3	5.3	5.0	4.3	5.7	5.7	5.7	5.7
$\text{PO}_4^{3-}$	13	13	5.4	3.6	1.9	3.7	3.8	40	12	3.1	6.2	4.5	4.4	26	26	26	26
$\text{PO}_4^{2-}$	4.5	3.1	3.1	3.2	3.6	4.6	5.3	14	3.9	3.1	3.8	6.0	4.5	3.8	3.8	3.8	3.8
$\text{SO}_4^{2-}$	4.5	3.1	3.1	3.2	3.6	4.6	5.3	14	3.9	3.1	3.8	6.0	4.5	3.8	3.8	3.8	3.8

Tabla 4.27: Estimación de la precisión para la determinación de aniones, expresada como %DER

Anión	Agua					Glucosa					Ftalato					Compuesta				
	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	
F	1.4	1.9	2.2	2.2	1.3	2.0	2.8	3.2	2.2	1.9	2.2	2.2	1.3	1.3	1.9					
Cl	1.6	2.5	1.8	2.4	2.6	2.3	2.1	2.3	2.7	3.0	2.5	2.8	3.5	3.8						
NO <sub>2</sub>	2.7	1.7	1.7	1.9	1.8	2.5	2.0	2.1	3.9	4.7	3.5	2.8	1.2	2.2						
Br	1.8	2.3	2.1	2.2	1.3	3.1	2.0	2.9	2.3	2.0	2.4	2.4	2.1	2.3						
NO <sub>3</sub>	1.6	2.4	1.5	2.7	1.7	3.2	2.2	2.8	2.5	1.9	2.7	2.4	1.1	3.0						
PO <sub>4</sub>	7.5	6.5	3.2	2.9	1.3	3.0	2.5	9.5	2.7	2.2	4.1	2.1	8.3	9.3						
SO <sub>4</sub>	1.1	2.6	1.6	2.7	1.6	2.3	2.4	2.6	2.3	2.0	2.5	2.5	1.5	2.3						

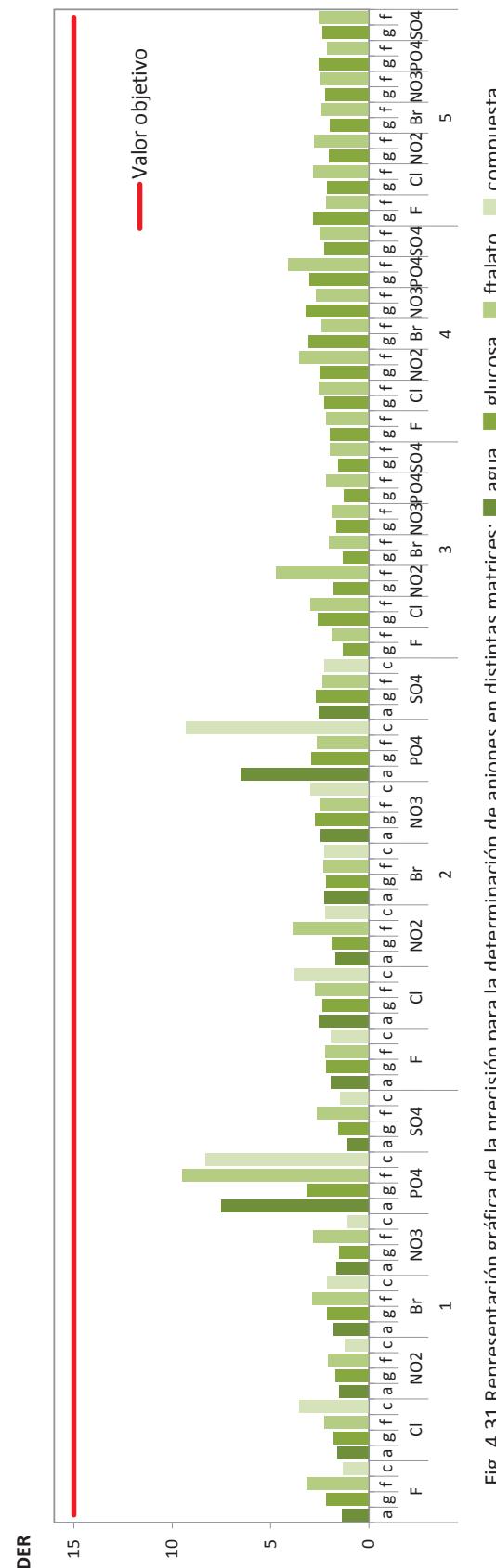


Fig. 4.31 Representación gráfica de la precisión para la determinación de aniones en distintas matrices: ■ agua ■ glucosa ■ ftalato ■ compuesta

El tratamiento de los resultados del diseño experimental mediante ANOVA nos proporciona información adicional sobre la repetibilidad y las precisiones intermedias debidas a la realización de los ensayos en distintos días y por distintos analistas. En las Tablas A.II.8 a A.II.14 del Anexo II se muestran los valores numéricos de las varianzas intermedias calculadas para cada nivel de concentración.

Si representamos los datos de las varianzas intermedias,  $s_{\text{factor}}$ , Fig. 4.32, se puede apreciar que la contribución mayoritaria es la debida al cambio de analista, seguida de la variación por réplica. La contribución debida a la realización de los ensayos en días diferentes es en general menos significativa. Al estar desglosada la precisión en sus contribuciones, el efecto matriz se aprecia en menor medida.

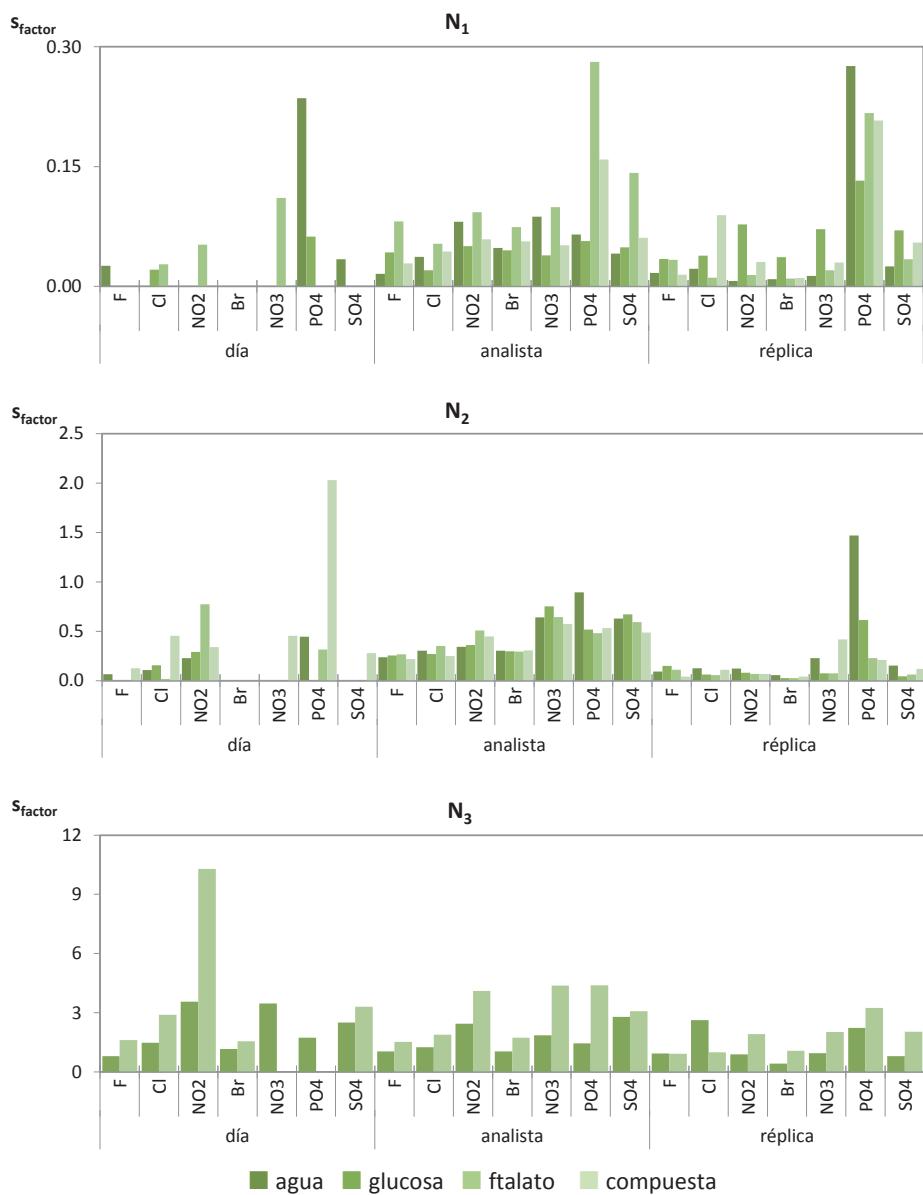


Fig. 4.32: Precisiones intermedias por contribución, anión y matriz para la determinación de aniones, expresadas como desviación estándar

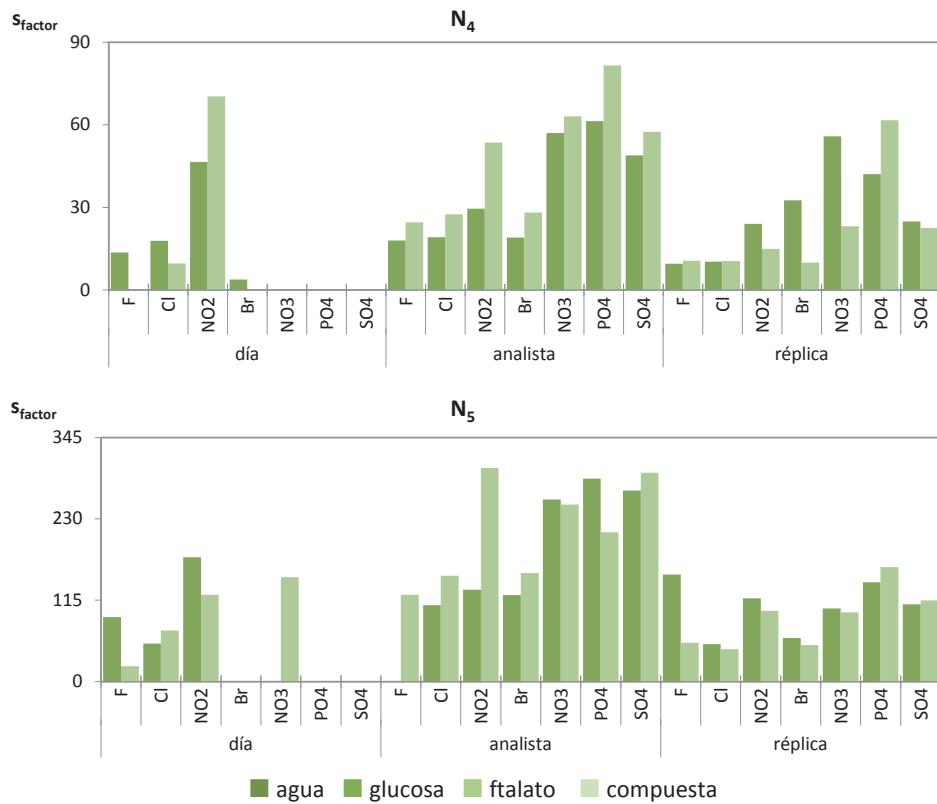


Fig. 4.32 (cont.): Precisiones intermedias por contribución, anión y matriz para la determinación de aniones, expresadas como desviación estándar.

## Incertidumbre

Se estimó la incertidumbre para cada nivel de concentración aplicando las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.6 y descritas en el *Apartado 2.3.3*. Se tuvieron en cuenta tres contribuciones principales: la falta de veracidad, la falta de precisión y la falta de trazabilidad durante la preparación de las muestras de control. Como contribución a la falta de veracidad se tomó el porcentaje de error relativo máximo, en valor absoluto, para evitar subestimar la incertidumbre total en las muestras reales.

Los resultados de incertidumbre de cada una de las contribuciones, expresadas como varianza, la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida se resumen las Tablas A.II.15 a A.II.21 del *Anexo II*.

En la Fig. 4.33 se representan las incertidumbres individuales para cada nivel de concentración; en ella se puede comprobar que las contribuciones que más afectan a la incertidumbre total son las debidas a la veracidad y a la precisión, mientras que la debida a la trazabilidad contribuye de forma casi inapreciable. También se observa que las contribuciones aumentan a medida que aumenta la complejidad de la muestra.

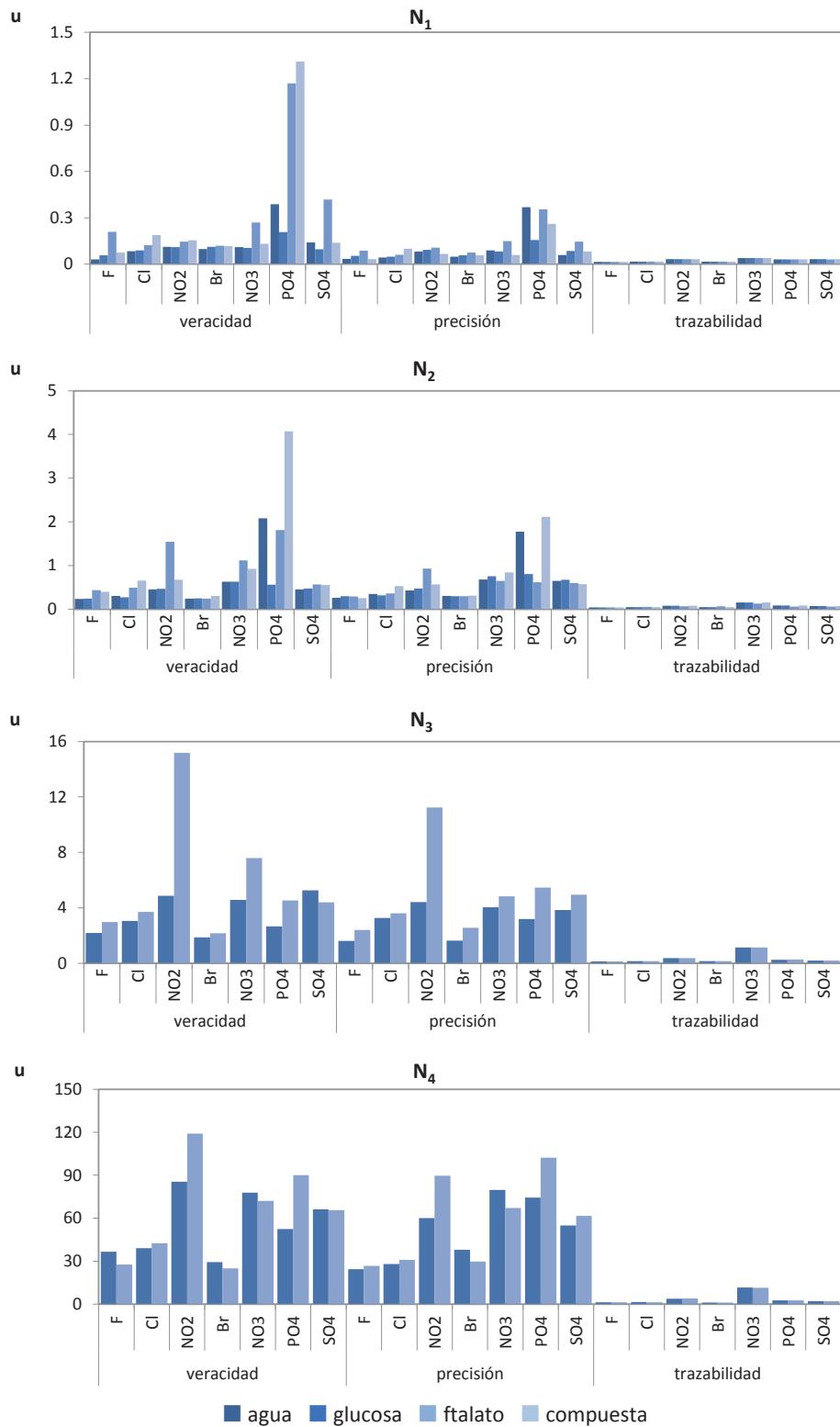


Fig. 4.33: Incertidumbres intermedias por nivel de concentración-anión-matriz

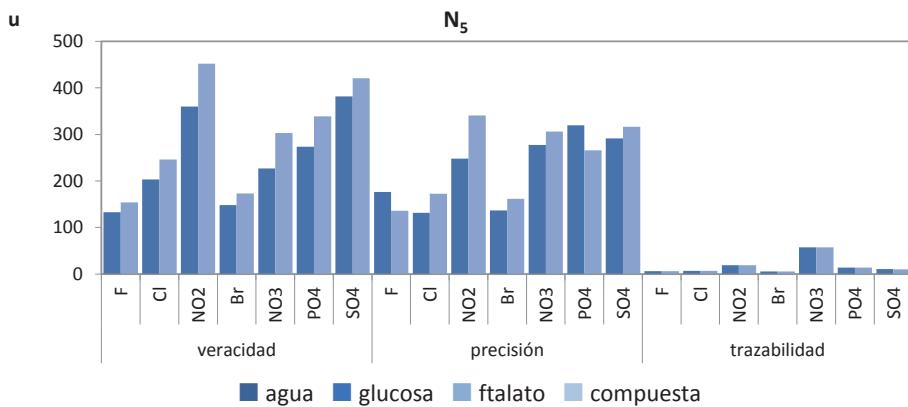


Fig. 4.33 (cont.): Incertidumbres intermedias por nivel de concentración-anión-matriz

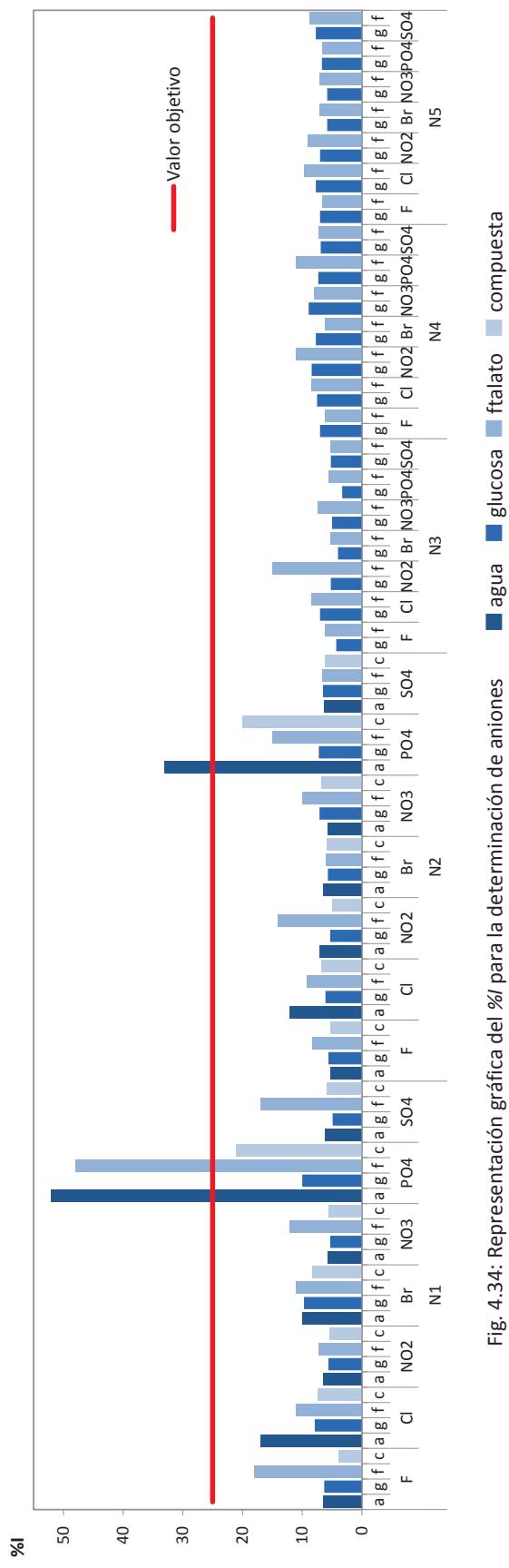
En la Tabla 4.28 podemos ver los resultados finales de incertidumbre expresados como porcentaje de incertidumbre expandida,  $\%I$ . Los valores obtenidos de la incertidumbre total son homogéneos y menores al propuesto en la Tabla 3.6 ( $\%I < 25\%$ ) para todos los niveles de concentración de cada anión excepto para los dos primeros niveles del fosfato, al igual que ocurría con la veracidad. La representación gráfica de estos valores presentada en la Fig. 4.34 permite observar que la incertidumbre aumenta con la complejidad de la muestra y que el efecto matriz en las muestras preparadas con la matriz sintética compuesta, al igual que ocurría en el caso de la veracidad, no es muy significativo, probablemente debido a la eliminación de interferentes durante la preparación de las muestras de control.

En la Fig. 4.35 se han representado los resultados de incertidumbre obtenidos para las distintas muestras de control, diferenciando los resultados por matrices. Debido al rango de medida tan amplio, para facilitar la visualización de la relación incertidumbre-concentración, se representaron gráficamente en escala logarítmica, pudiéndose observar que a bajas concentraciones los valores estimados de incertidumbre están más dispersos que a altas concentraciones. Esto es debido fundamentalmente al efecto matriz que a altas concentraciones se minimiza debido al efecto de la dilución. Se ha incluido a título informativo la representación de los resultados para el anión fosfato a pesar de no cumplir los objetivos para dos de las matrices sintéticas ensayadas a los dos primeros niveles de concentración.

Una vez obtenida la incertidumbre para cada nivel de concentración, se estableció la relación funcional entre ambas obteniéndose para todos los aniones relaciones potenciales del tipo  $I=k_3 \cdot x^k$ , que aparecen recogidas en la Fig. 4.35. Estas relaciones funcionales se corresponden aparentemente con el Tipo III propuesto en la norma UNE 82009-2.

Tabla 4.28: Incertidumbre expandida relativa (%) para la determinación de aniones

Anión	Agua		Glucosa			Ftalato			Compuosta					
	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>	N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>
F <sup>-</sup>	6.5	5.2	6.3	5.6	4.3	7.0	7.0	18	8.3	6.1	6.2	6.6	3.8	5.2
Cl <sup>-</sup>	17	12	7.9	6.1	7.0	7.5	7.7	11	9.2	8.4	8.4	9.6	7.4	6.7
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	6.5	7.0	5.6	5.3	5.2	8.4	7.0	7.2	14	15	11	9.1	5.4	5.0
Br <sup>-</sup>	9.9	6.4	9.7	5.7	4.0	7.7	5.8	11	6.0	5.2	6.2	7.0	8.3	5.8
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5.7	5.7	5.3	7.1	5.0	8.9	5.8	12	10	7.3	8.0	7.0	5.6	6.7
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	52	33	10	7.2	3.3	7.3	6.7	48	15	5.6	11	6.6	21	20
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	6.1	6.3	4.9	6.5	5.2	6.9	7.7	17	6.6	5.3	7.2	8.7	5.8	6.2



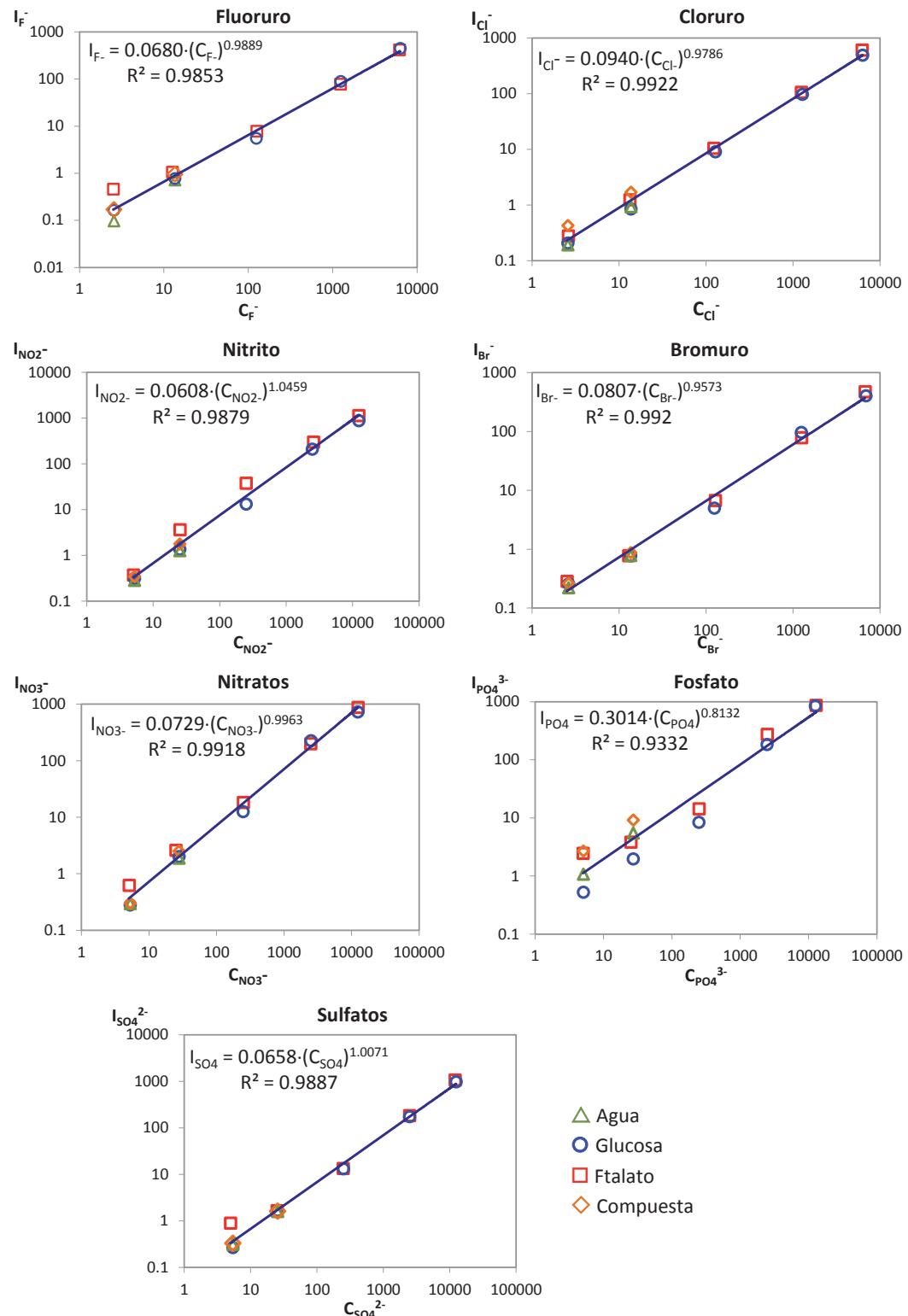


Fig. 4.35: Representaciones de la incertidumbre para cada anión y matriz en función de la concentración de anión

Las ecuaciones que relacionan la incertidumbre con la concentración de acuerdo al Tipo III, deben cumplir que  $0 < k_4 \leq 1$ . Como se observa en las ecuaciones mostradas en la Fig. 4.35, para la mayoría de los aniones  $k_4$  tiende a la unidad. En el caso del nitrito y del sulfato, se excede muy ligeramente el valor superior del intervalo permitido, lo que significaría que en ambos casos la incertidumbre relativa aumenta con la concentración. No obstante, se ha comprobado que el valor experimental  $k_4$  obtenido para todos los aniones, excepto el fosfato, no difiere significativamente de 1, lo que nos lleva a pensar que, a medida que se realicen revalidaciones del método analítico con nuevos niveles de concentración, mejorará la estimación de la función que liga la incertidumbre con la concentración, cumpliéndose finalmente la condición de  $k_4 = 1$ . Por lo tanto, se ha concluido que la relación funcional que relaciona la incertidumbre con la concentración puede llegar a ser, en el caso de los aniones, del Tipo I descrito la norma UNE 82009-2,  $I=k_2 \cdot x$ . Esta relación funcional lineal entre la incertidumbre y la concentración está en concordancia con los resultados mostrados en la Tabla 4.28 en la que puede observarse que la incertidumbre relativa se mantiene aproximadamente constante en todo el rango de concentración estudiado.

En el caso del fosfato esta relación lineal Tipo I no se ha llegado a cumplir debido probablemente a que no se han alcanzado algunos objetivos de validación

#### Rango de medida/límite superior/ Dilución máxima

Se comprobó la capacidad de medir aniones en los límites de cuantificación, LoQ, y en los límites superiores de concentración, LS, aplicando en este último caso la dilución máxima permitida. Se considerará que el método es capaz si se consiguen los objetivos de calidad en veracidad, precisión e incertidumbre. A la vista de los resultados mostrados en la Tabla 4.29 puede concluirse que se cumple para todos los aniones en los dos niveles extremos del rango de medida, excepto para el fosfato en el límite de cuantificación. Para el caso del nitrito se observa que los valores de los parámetros de calidad son mayores para el límite superior que para el límite de cuantificación, lo cual está de acuerdo con la relación incertidumbre-concentración obtenida para este analito. En el caso del sulfato, y a pesar de haber obtenido un coeficiente  $k_4$  ligeramente superior a 1, los parámetros de calidad son mayores para el límite de cuantificación que para el límite superior.

En el caso del fosfato no se han alcanzado algunos de los objetivos de validación perseguidos: parámetros de linealidad como la ordenada en el origen y el factor de respuesta, y veracidad e incertidumbre (marcados estos dos últimos en rojo en la Tabla 4.29) para niveles de concentración bajos y matrices complejas. En consecuencia, se ha decidido excluir la determinación de fosfato del alcance de este método. No obstante, la determinación de fosfato en matrices menos complejas sí es factible.

Tabla 4.29: Consecución de los objetivos para el LoQ y el LS en la determinación de aniones

		$C_{\text{objetivo}}$ (mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$  \%Er  _{\max}$	%DER	%I_A <sup>-</sup>
$F^-$	LoQ	2.5	14	3.2	18
	LS	6250	4.3	2.8	7
$Cl^-$	LoQ	2.5	13	3.5	17
	LS	6250	6.8	2.8	9.6
$NO_2^-$	LoQ	5	5.1	2.7	7.2
	LS	12500	6.3	2.8	9.1
$Br^-$	LoQ	2.5	8.2	2.9	11
	LS	6250	4.4	2.4	7.0
$NO_3^-$	LoQ	5	9.2	3.0	12
	LS	12500	5.0	2.4	7.0
$PO_4^{3-}$	LoQ	5	44	9.5	52
	LS	12500	4.5	3.2	6.7
$SO_4^{2-}$	LoQ	5	14	2.6	17
	LS	12500	6	2.5	8.7

### Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos (control de calidad interno y externo)

Para el control de calidad interno se emplearon gráficos de control para verificar los resultados de la determinación de aniones. Se construyeron gráficos para dos niveles de concentración; el primero se eligió próximo al LoQ por ser más difícil su determinación ya que la incertidumbre relativa a bajos niveles de concentración es más elevada; para el segundo nivel se tomó una concentración intermedia, próxima a los valores habituales de concentración de la mayoría de aniones en muestras reales. Por tanto, los niveles elegidos se corresponden con las muestras de control N<sub>1</sub> (2.5 mg·L<sup>-1</sup> para F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup> y 5 mg·L<sup>-1</sup> para NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) y N<sub>3</sub> (125 mg·L<sup>-1</sup> para F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup> y 250 mg·L<sup>-1</sup> para NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Debido a la rapidez del ensayo se realizarán medidas replicadas (n=2), por lo que se han elegido gráficos de control para medias y rangos, ( $\bar{X}/R$ ).

Se establecieron las líneas de los gráficos de control tomando como valores de aprendizaje los resultados obtenidos durante la validación de las muestras de control para los niveles N<sub>1</sub> y N<sub>3</sub> y empleando las ecuaciones recogidas en la Tabla 2.13. En la Tabla 4.30 se muestran los parámetros estadísticos empleados para construir los gráficos de control y en la Tabla 4.31 los valores de las líneas de los gráficos de control. Estas líneas se han obtenido de los resultados analíticos de dos únicas muestras de control, ambas con concentraciones ligeramente superiores al valor nominal indicado en la tabla. En este caso, podría ser preferible controlar la veracidad mediante un gráfico de control para valores nominales de sesgo relativo, %Er, donde la línea central se situaría en 0% y los límites de control en el sesgo relativo máximo admisible.

Tabla 4.30: Parámetros usados para construir los gráficos de control

A2	D4	D3	n
1.88	3.267	0	2

Tabla 4.31: Valores de las líneas de los gráficos de control para los dos niveles de concentración de aniones

Fluoruros	2.5 mg·L <sup>-1</sup>			125 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
LC	2.518	0.031		LC	126.0	1.790
LCS	2.577	0.101		LCS	129.4	5.849
LCI	2.460	0		LCI	122.7	0
Cloruros	2.5 mg·L <sup>-1</sup>			125 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
	LC	2.716	0.055	LC	123.8	2.469
	LCS	2.820	0.181	LCS	128.5	8.065
	LCI	2.612	0	LCI	119.2	0
Nitritos	5 mg·L <sup>-1</sup>			250 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
	LC	5.362	0.029	LC	244.3	1.567
	LCS	5.417	0.095	LCS	247.2	5.120
	LCI	5.308	0	LCI	241.3	0
bromuros	2.5 mg·L <sup>-1</sup>			125 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
	LC	2.705	0.067	LC	125.4	1.774
	LCS	2.832	0.220	LCS	128.8	5.797
	LCI	2.578	0	LCI	122.1	0
Nitratos	5 mg·L <sup>-1</sup>			250 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
	LC	5.400	0.029	LC	250.7	1.6445
	LCS	5.453	0.094	LCS	253.8	5.373
	LCI	5.346	0	LCI	247.7	0
Sulfatos	5 mg·L <sup>-1</sup>			250 mg·L <sup>-1</sup>		
	Línea	X-media	R	Línea	X-media	R
	LC	5.537	0.044	LC	248.0	1.674
	LCS	5.620	0.144	LCS	251.1	5.470
	LCI	5.454	0	LCI	244.8	0

Una vez construidos los gráficos, se analizarán de forma replicada, con una periodicidad preestablecida, muestras de control con uno de estos dos niveles de concentración. Se comprobará la validez del método según la tendencia de los valores representados.

Para el control de calidad externo se analizarán muestras provenientes de ejercicios de intercomparación al menos una vez al año. En este caso se participó en dos rondas de ejercicios de intercomparación obteniéndose los siguientes resultados.

Tabla 4.32: Resultados obtenidos de ejercicios de intercomparación

Anión	$\mu$ (mg A·L <sup>-1</sup> )	$x_{lab}$ (mg A·L <sup>-1</sup> )	z
F <sup>-</sup>	1.25	1.35	0.71
Cl <sup>-</sup>	62.4	62.3	-0.02
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	12.8	11.7	-0.92
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	2.14	3.16	0.73
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	83.7	84.0	0.06
Cl <sup>-</sup>	39	38.7	-0.10
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	46.1	45.8	-0.03

## 4.3. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS

A continuación se recoge la información necesaria para la validación del método de análisis para la determinación de fenol mediante el método espectrofotométrico directo de la 4-aminoantipirina, así como los resultados obtenidos.

El fundamento del método y las etapas básicas del procedimiento analítico fueron descritos en el *Capítulo 3*. Las características técnicas a determinar, así como los objetivos perseguidos para este método de análisis, se han presentado en la Tabla 3.6.

### 4.3.1. ENSAYOS PREVIOS A LA VALIDACIÓN

Antes de empezar con la validación se tuvieron en cuenta una serie de consideraciones relativas a la estabilidad de reactivos y muestras, y se realizaron unos ensayos previos para establecer las condiciones generales de experimentación y llevar a cabo el método de análisis preliminar descrito en el *Capítulo 3*.

#### Conservación de reactivos y patrones

Debe conocerse el periodo de estabilidad de las disoluciones para evitar tanto la reposición innecesaria de reactivos aún útiles como el empleo de disoluciones caducadas que puedan invalidar los resultados.

Algunas disoluciones empleadas en la aplicación de este método de ensayo como la de ferricianuro potásico o 4-AAP tienen un periodo de estabilidad muy corto (*UNE 77053, 2002*) y un coste elevado, por lo que se optó por preparar diariamente el volumen de disolución necesario para el análisis, sin atender a consideraciones especiales de conservación. Otras disoluciones necesarias como amoniaco y tampón fosfato se

prepararon en mayor cantidad y se renovaron cada dos meses, de acuerdo a los períodos de caducidad indicados en la bibliografía consultada (*Nogueira et al., 2003*).

La solución patrón madre de fenol es estable hasta 30 días mientras esté refrigerada (*ASTM D1783, 2001*).

Una vez establecidos los tiempos de conservación de reactivos y patrones estos fueron incluidos en el procedimiento de análisis análisis definitivo, PNT-fenol, descrito en el *Anexo III*.

### Conservación de la muestra

Para establecer las condiciones de conservación de las muestras de agua residual para la determinación de fenol, se recopilaron los períodos de conservación, el tipo de envase permitido y temperatura de conservación, recomendados en distintas normas consultadas (*APHA, 1998; ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; UNE EN ISO 5667-3, 2004; USEPA Method 420.1, 1983*).

Tabla 4.33: Condiciones para la conservación de aguas en las que se va a determinar fenol

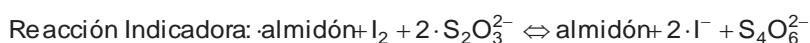
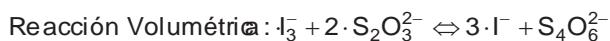
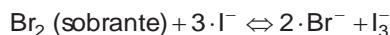
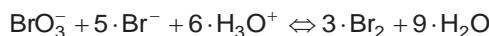
Normativa	Envase	Tamaño y técnica de llenado	Conservación	Tiempo
UNE 77053, 2002	--	--	< 4°C	4 h
			pH < 4 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (1:10); < 4°C	24 h
UNE EN ISO 5667-3, 2004	VB ámbar tapón PTFE; No preclarar con muestra	1000 mL; dejar cámara de aire	pH < 4 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> o H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ;	3 sema.
Standard Methods 5530 D APHA, 1998	Plástico, vidrio	500 mL	< 4°C	4 h
			pH < 2 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> < 4°C	28 d
USEPA Method 420.1, 1983	--	--	pH < 4 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; < 4°C	24 h
ASTM D1783, 2001	Plástico	--	--	4 h
	Vidrio		pH 0.5-2 con H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , HCl, NaHSO <sub>4</sub> ; T <sup>o</sup> 2-4°C	28 d

En las concentraciones a las que habitualmente se encuentran en las aguas residuales, los fenoles pueden sufrir una oxidación biológica y química. Si no van a analizarse dentro de las 4 h posteriores a su recogida, las muestras deben conservarse acidificadas a pH = 4 con ácido fosfórico y refrigeradas a temperaturas inferiores a 4°C. Las muestras acidificadas pueden almacenarse en botes de vidrio borosilicatado y analizarse dentro de las 24 horas después de su recogida (PNT-fenol, *Anexo III*).

### Normalización del patrón concentrado de fenol

Generalmente, pesando directamente el fenol sólido obtenemos la solución patrón estándar necesaria para preparar la línea de calibrado; sin embargo, la norma UNE 77053:2002 indica que, si se requiere una veracidad extrema, se ha de normalizar mediante una yodometría.

Para ello se prepararon cinco disoluciones patrón de fenol de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  (por pesada directa y disolución en agua ultrapura de fenol cristalizado), y se valoraron yodométricamente en condiciones de reproducibilidad, de la siguiente forma: en un erlenmeyer de 500 mL se vertieron 100 mL de agua, 50 mL de la solución de fenol de  $1000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  y 10 mL de una solución patrón  $0.01667 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de bromato potásico conteniendo  $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  bromuro potásico. Se añadieron inmediatamente 5 mL de HCl concentrado y se agitó suavemente. Se añadieron otros 30 mL de la solución bromato-bromuro, apreciándose la persistencia de un color parduzco debido al bromo libre, y se mantuvo tapado el erlenmeyer herméticamente durante 10 minutos para, a continuación, añadir 1 g de KI. La disolución resultante se valoró con una disolución patrón normalizada de tiosulfato sódico de concentración  $0.025 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , en continua agitación para romper el precipitado gelatinoso de 2,4,6-tribromofenol, utilizando una solución de almidón como indicador. Se preparó un blanco en condiciones iguales, utilizando agua desionizada y 10 mL de la solución de bromato-bromuro. Las reacciones que tienen lugar son:



La concentración de la solución de fenol se calculó según la ec. 4.1:

$$C_{\text{fenol}} [\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}] = \frac{M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 94111.24}{V_M \cdot 6} \cdot (4 \cdot V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{Bl})} - V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{M})}) \quad \text{ec. 4.1}$$

donde  $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{Bl})}$  y  $V_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3(\text{M})}$  son los volúmenes, en mL, de tiosulfato empleados en la valoración del blanco y muestra respectivamente,  $M_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  es la concentración molar de la disolución de tiosulfato en  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $V_M$  el volumen de muestra empleado, en mL.

Los resultados obtenidos en la normalización aparecen tabulados a continuación, Tabla 4.34. Para decidir si la diferencia entre las concentraciones teóricas calculadas a partir

de la masa de fenol empleada y las concentraciones reales determinadas por yodometría es significativa se aplicó una prueba estadística  $t$  de pares de valores (*Miller et al., 2002*).

Tabla 4.34: Concentraciones de fenol esperadas y obtenidas después de su normalización

$C_{\text{real}}$ (pesada) (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	$C_{\text{Obtenida}}$ (normalización) (mg fenol·L <sup>-1</sup> )
1041	1011
1001	1010
1000	971
1002	1001
1030	994

Se obtuvo un valor del parámetro  $t$  de *Student* de 1.942 que, comparado con el valor  $t_{\text{crítico}}$  (2.776 para  $\alpha=0.05$ ;  $g.d.l.=n-1=4$ ), nos permite concluir, con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre ambas series de valores. Se demuestra pues que la concentración obtenida en la normalización no es significativamente diferente de la calculada a través del peso, la riqueza y el volumen de enrase por lo que en lo sucesivo no se normalizará el patrón de fenol.

### Elección de la longitud de onda óptima

La Fig. 4.36 muestra el espectro de absorbancia de una disolución de fenol de concentración de 0.2 mg·L<sup>-1</sup> derivatizada con los reactivos indicados en el método de ensayo. En él podemos observar un máximo absoluto de absorbancia a un valor de longitud de onda de 506 nm, valor que no coincide exactamente con el propuesto por la norma (500 nm), pero que fue el seleccionado para realizar la determinación e incluido en el procedimiento de análisis definitivo (PNT-fenol, Anexo III). Se puede observar también que existe un segundo máximo de absorbancia a 320 nm, que no se utilizará con fines analíticos.

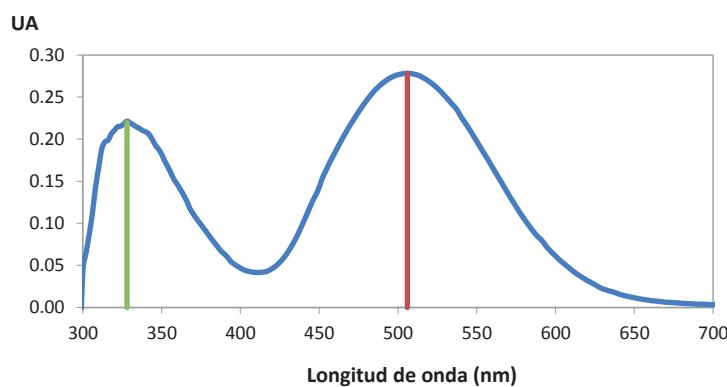


Fig. 4.36: Espectro de absorbancia del fenol

### Establecimiento de la linealidad

Para el establecimiento del rango lineal del método de análisis se tomó de referencia los valores bibliográficos (*APHA, 1998; ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; USEPA Method 420.1, 1983*), ampliéndolo tanto a concentraciones menores como mayores. A partir de un patrón de fenol de concentración aproximadamente 1000 mg fenol·L<sup>-1</sup> se prepararon por dilución los patrones cuyas concentraciones se muestran en la Tabla 4.35.

Tabla 4.35: Patrones ensayados para el establecimiento de la linealidad de la determinación de fenol

Patrón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
C <sub>fenol</sub> (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	0.15	0.2	0.3	0.4	0.5	1	2	3	4	5	6	8	10

El establecimiento del rango lineal se basó en el análisis de los residuales y el factor de respuesta,  $f_i$ , calculado como la relación entre absorbancia-concentración de cada uno de los puntos de las líneas de calibrado.

La representación gráfica de los resultados obtenidos puede verse en la Fig. 4.37. En ella se puede apreciar que se mantiene la linealidad tanto a altas concentraciones como a bajas concentraciones.

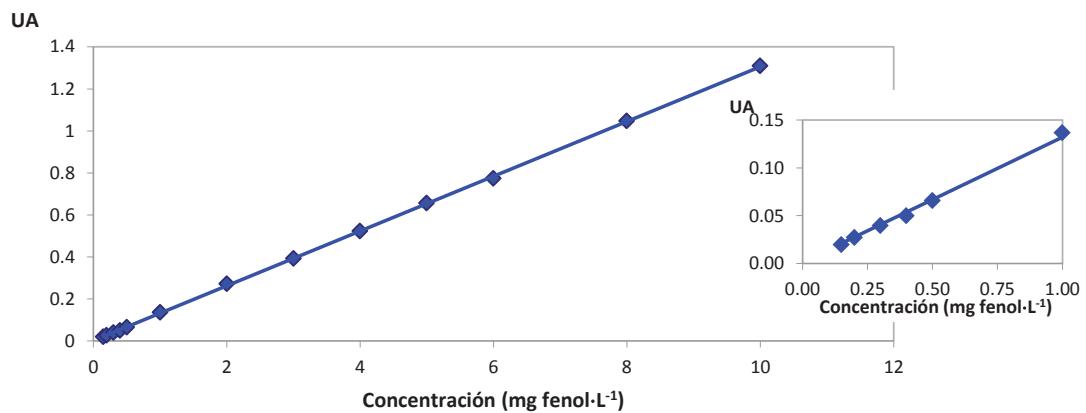


Fig. 4.37: Línea de calibrado para la determinación de fenol

La Fig. 4.38 (a) representa el gráfico de residuales; se observa que estos se distribuyen de forma aleatoria en torno a cero. La Fig. 4.38 (b) representa los factores de respuesta frente a la concentración, observándose una variabilidad mínima. Ambas representaciones nos indican que la sensibilidad es aproximadamente constante pudiendo interpretarse también como una expresión de linealidad.

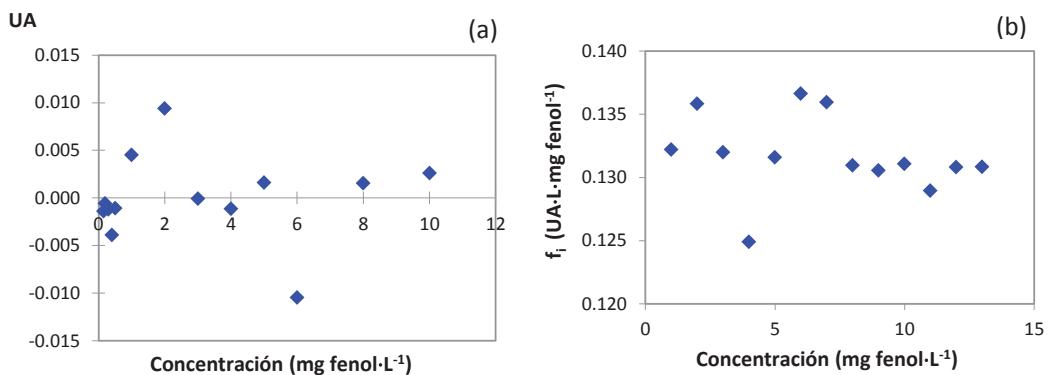


Fig. 4.38: (a) Representación gráfica de los residuales y (b) Representación gráfica de los factores de respuesta de la línea de calibrado para la determinación de fenol

Dado que el límite de cuantificación objetivo era  $0.5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$ , el límite inferior de la línea de calibrado se fijó en  $0.25 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$  para asegurar que el límite de cuantificación quedase dentro del rango de calibración. El extremo opuesto se acotó en la concentración que originaba una señal aproximadamente de  $0.7 \text{ UA}$  para minimizar el error fotométrico (*Skoog et al., 2005*). Con toda esta información se estableció el rango lineal en el intervalo  $0.25$  a  $5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$  empleándose patrones de fenol de concentración  $0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$

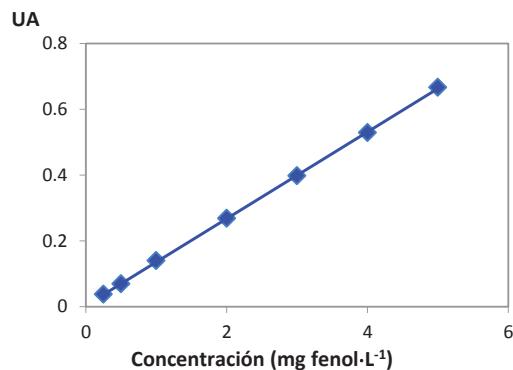


Fig. 4.39: Representación gráfica de la línea de calibrado propuesta para la determinación de fenol

En las Fig. 4.40 (a) y Fig. 4.40 (b) podemos ver como la distribución de los residuales y factores de respuesta en el rango propuesto son más homogéneos.

El factor de respuesta medio de los patrones de calibración y su desviación estándar relativa fueron respectivamente  $\bar{f} = 0.1373 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $\%DER_f = 4.6\%$  por tanto se cumple el valor objetivo impuesto de  $\%DER_f < 10\%$  (Tabla 3.6), lo que nos confirma la linealidad del calibrado.

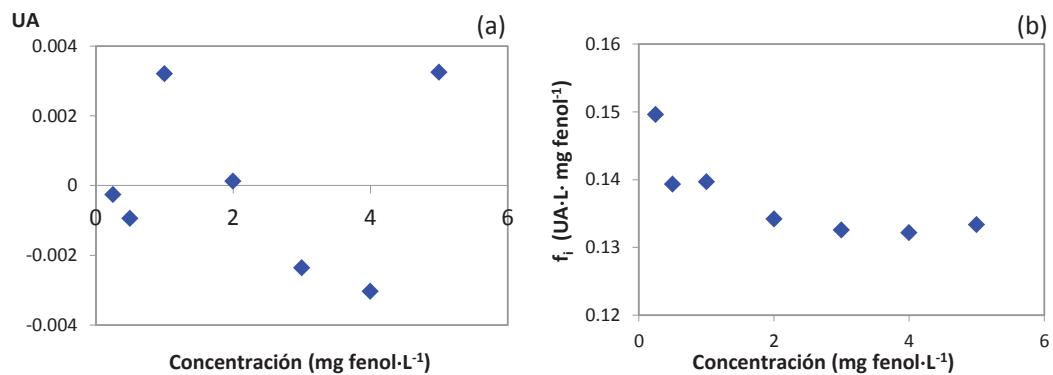


Fig. 4.40: (a) Representación gráfica de los residuales y (b) Representación gráfica de los factores de respuesta para la línea de calibrado propuesta en la determinación de fenol

### 4.3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el protocolo de validación descrito en el *Apartado 3.3.* se describió el diseño experimental aplicable a la validación del método de fenol.

Para cada nivel de concentración a ensayar,  $N_i$  ( $0.5, 5, 50, 250, 500 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) se prepararon semanalmente 2000 mL de muestra de control disolviendo la cantidad necesaria de fenol cristalizado en la matriz sintética compuesta descrita en el *Apartado 3.2*. No se consideró necesario la preparación de muestras de control en otras matrices sintéticas ya que, al no estar presente en esta matriz el analito objeto de estudio, no fue necesario ningún pretratamiento de la misma que alterara su composición química inicial. De este modo, la matriz compuesta se podía considerar representativa de las posibles matrices de aguas residuales. La Tabla 4.36 muestra las concentraciones reales de cada muestra de control y su incertidumbre, estimada por el método “bottom-up”.

Tabla 4.36: Concentraciones de las muestras de control, en  $\text{mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Nivel de concentración $N_i$	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4	
	$C_{\text{fenol}}$	$\pm I_{\text{fenol}}$						
$N_1 = \text{LoQ}$	$0.5065 \pm 0.0023$		$0.4995 \pm 0.0023$		$0.4989 \pm 0.0023$		$0.4995 \pm 0.0023$	
$N_2$	$5.065 \pm 0.073$		$4.992 \pm 0.072$		$5.027 \pm 0.072$		$4.995 \pm 0.072$	
$N_3$	$51.26 \pm 0.38$		$49.82 \pm 0.38$		$51.91 \pm 0.39$		$50.21 \pm 0.38$	
$N_4$	$249.1 \pm 1.4$		$250.2 \pm 1.4$		$249.6 \pm 1.4$		$249.4 \pm 1.4$	
$N_5 = \text{LS}$	$499.1 \pm 2.7$		$498.6 \pm 2.7$		$500.3 \pm 2.8$		$501.5 \pm 2.8$	

Para evitar un sesgo debido a la dilución de las muestras de control, estas se diluyeron de forma controlada abarcando todo el rango de ensayo. La Tabla 4.37 muestra las diluciones realizadas para los diferentes niveles y días de ensayo.

Tabla 4.37: Diluciones realizadas durante el desarrollo experimental

Nivel de concentración		Semana 1			Semana 2			Semana 3			Semana 4		
N <sub>i</sub>	C <sub>initial</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )	V <sub>i</sub> (mL)	V <sub>f</sub> (mL)	C <sub>final</sub> (mg·L <sup>-1</sup> )
N <sub>1</sub> = LoQ	0.5	50	50	0.5	50	50	0.5	50	50	0.5	50	50	0.5
N <sub>2</sub>	5	25	50	2.5	25	50	2.5	50	50	5	50	50	5
N <sub>3</sub>	50	5	50	5	2.5	50	2.5	4	50	4	1	50	1
N <sub>4</sub>	250	0.5	50	2.5	0.5	50	2.5	0.8	50	4	1	50	5
N <sub>5</sub> = LS	500	0.25	50	2.5	0.25	50	2.5	0.3	50	3	0.5	50	5

La Tabla A.II.22 del Anexo II muestra todos los resultados experimentales obtenidos.

### 4.3.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Una vez realizados todos los ensayos programados en el diseño de experimentos se procedió al análisis estadístico de los mismos para evaluar cada una de las características técnicas del método de análisis indicadas en la Tabla 3.6 y comparar los resultados con los objetivos.

#### Selectividad

Se hizo una revisión bibliográfica de todas las normas y publicaciones disponibles para verificar la selectividad y eliminar las posibles interferencias (APHA, 1998; ASTM D1783, 2001; UNE 77053, 2002; USEPA Method 420.1, 1983). Según esta normativa, las principales interferencias a la hora de la determinación de fenol en aguas residuales se eliminan en las etapas de acidificación y destilación de la muestra. Otras interferencias potenciales y su forma de eliminación son las siguientes:

- ▲ Sustancias oxidantes tales como cloro y aquellas capaces de oxidar el yoduro a yodo al acidificar. Se deben eliminar inmediatamente después de la toma de muestra añadiendo un exceso de sulfato ferroso,  $FeSO_4$ . Si no se eliminan las sustancias oxidantes, los compuestos fenólicos se oxidarán parcialmente.
- ▲ Especies reducidas de azufre. Se eliminan por acidificación a pH = 4 con ácido fosfórico, añadiendo sulfato de cobre y aireando la muestra brevemente por agitación. De esta manera, se eliminan las interferencias debidas al sulfuro y al sulfito.
- ▲ Aceites y alquitranes: El aceite o alquitrán se extraen con 50 mL de cloroformo de la solución acuosa, alcalinizada a pH = 12 con hidróxido sódico. Se desecha la fase orgánica que contiene el aceite o alquitrán y se elimina el exceso de cloroformo de la fase acuosa calentando al baño María antes de proceder a la destilación.
- ▲ También pueden interferir concentraciones anormalmente altas de aminas aromáticas y formaldehído, pero son eliminadas añadiendo sulfato de amonio e

hidróxido de sodio. En ambos casos posteriormente se acidifica y se procede a destilar.

### Linealidad/Rango de ensayo

Para la estimación de los parámetros de linealidad se emplearon las 80 líneas de calibrado necesarias para el desarrollo del diseño experimental y obtenidas en condiciones de reproducibilidad. Los resultados medios de los parámetros de calibración están recogidos en la Tabla 4.38.

Tabla 4.38: Valores medios de los parámetros de calibración

$\bar{b}$ (UA·L·mg fenol $^{-1}$ )	$\bar{s}_b$ (UA·L·mg fenol $^{-1}$ )	$\bar{a}$ (UA)	$\bar{s}_a$ (UA)	$\bar{s}_e$ (--)	$\bar{r}^2$ (--)
0.1353	0.0015	0.0028	0.0044	0.0057	0.9994

A partir de estos datos de caracterización de las líneas de calibrado, y teniendo en cuenta que el estadístico *t de Student*,  $t_{crítico}$ , para  $\alpha=0.05$  y para  $n-2=5$  grados de libertad ( $n$  = patrones de calibración = 7) es 2.571, se establecieron los límites de confianza de la pendiente y ordenada en el origen resultando los siguientes intervalos: pendiente:  $0.1316 < b < 0.1391$  UA mg fenol $^{-1}$  y ordenada en el origen:  $-0.0086 < a < 0.0141$  UA. El valor de la pendiente es distinto de cero y la ordenada en el origen no difiere significativamente de cero. El coeficiente de determinación medio fue superior al valor objetivo ( $r^2 > 0.99$ ). Los resultados obtenidos confirman la linealidad en el rango de calibración propuesto y el cumplimiento de los objetivos indicados en la Tabla 3.6.

Se incluyeron en el procedimiento analítico como criterios de aceptación de las líneas de calibrado que la ordenada y la pendiente estuvieran incluidas en los intervalos indicados anteriormente, y que el coeficiente de determinación fuese mayor que el mínimo de todos los obtenidos durante las calibraciones realizadas para la validación, que fue 0.996.

Para comprobar la validez de las líneas de calibrado realizadas durante los experimentos, se alternaron entre las muestras tres patrones distintos a los empleados durante la realización del calibrado y a tres niveles de concentración: límite de cuantificación, concentración intermedia y límite superior instrumental. Las diferencias entre la concentración real y la obtenida, medida como porcentaje de error relativo, %Er, fueron inferiores al 5% para los niveles de concentración más altos, y menores del 10% para la concentración próxima al límite de cuantificación (Bettencourt et al., 1999).

Teniendo en cuenta la corta duración de la etapa de medida, se decidió establecer en el procedimiento analítico una frecuencia de calibración diaria. Para asegurar la validez de la línea de calibrado se deberá medir un patrón de calibración cada diez muestras, permitiendo una desviación respecto al valor real inferior al 5% para concentraciones

medias o altas, e inferior al 10% para concentraciones próximas al límite de cuantificación. En caso contrario, se recalibrará.

### Sensibilidad

La sensibilidad del método de análisis, expresada como la pendiente media de las líneas de calibrado para el fenol, fue de  $0.1353 \pm 0.0038 \text{ UA} \cdot \text{L} \cdot \text{mg fenol}^{-1}$ .

### Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ)

Se estimaron a partir de los datos de las 80 líneas de calibrado realizadas durante el desarrollo experimental como:

$$\text{LoD} = \frac{3.29 \cdot \bar{s}_e}{b} \quad \text{ec. 4.2}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10 \cdot \bar{s}_e}{b} \quad \text{ec. 4.3}$$

Los valores obtenidos para LoD y LoQ fueron  $0.14 \text{ mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$  y  $0.42 \text{ mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$  respectivamente. El valor del LoQ ha resultado ser sensiblemente inferior al valor de  $0.5 \text{ mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$  propuesto como objetivo (Tabla 3.6).

El valor del LoQ se ha estimado a partir de la media de los parámetros de líneas de calibrado realizadas con patrones de fenol, es decir, sin haberlos sometido a una destilación, tal y como se hace con las muestras. En el caso de muestras reales, los interferentes propios de la matriz y el proceso de destilación introducen un aumento inevitable de este parámetro con respecto al estimado. Para demostrar la consecución del LoQ objetivo al analizar muestras reales, se compararon los resultados analíticos de las muestras de control preparadas con el primer nivel de concentración, correspondiente al LoQ objetivo, con los valores esperados (Tabla 4.39).

Tabla 4.39: Concentraciones de fenol en las muestras de control N<sub>1</sub>

C <sub>esperada</sub> (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	C <sub>obtenida</sub> (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	%Er
0.5065	0.5073	0.16
0.5065	0.5464	7.9
0.4995	0.5056	1.2
0.4995	0.5063	1.4
0.4989	0.5034	0.90
0.4989	0.4391	-12
0.4995	0.5018	0.46
0.4995	0.4866	-2.6

Para decidir si la diferencia entre las concentraciones teóricas calculadas a partir de la masa de fenol empleada y las concentraciones obtenidas después de la medida es significativa se aplicó una prueba estadística *t* de pares de valores (*Miller et al.*, 2002). Se obtuvo un valor del parámetro *t de Student* de 0.155 que, comparado con el valor  $t_{crítico}$  ( $\alpha=0.05$ ;  $g.d.l.=n-1=7$ ) = 2.365, nos permite concluir, con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre ambas series de valores. Se demuestra, pues, que se puede cuantificar fenol sin error significativo a la concentración del LoQ objetivo; por tanto, se mantuvo el valor objetivo de 0.5 mg fenol L<sup>-1</sup> como LoQ.

### Veracidad

Se calcularon los errores relativos,  $\%E_{r-i}$ , de los valores reales respecto a los valores obtenidos para cada destilación, analista y día. La Tabla 4.40 muestra el porcentaje de error relativo medio y los porcentajes de error relativo máximo y mínimo para cada nivel de concentración de las muestras de control.

Tabla 4.40: Estimación de la veracidad para la determinación de fenol

Nivel de concentración N <sub>i</sub>	C <sub>esperada</sub> (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	C <sub>obtenida</sub> (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	% E <sub>r MEDIO</sub>	%E <sub>r-MAX</sub>	%E <sub>r-MIN</sub>	Sesgo  %E <sub>r</sub>   <sub>MAX</sub>
LoQ = 1	0.5011	0.5021	0.18	9.2	-11	11
2	5.018	5.017	-0.016	8.8	-9.0	9.0
3	50.66	49.92	-1.3	3.0	-8.2	8.2
4	249.6	249.0	-0.23	5.9	-3.7	5.9
LS = 5	499.6	496.5	-0.62	3.8	-4.5	4.5

Se puede ver que a niveles bajos de concentración los valores máximos de error relativo aumentan, siendo en todos los casos inferiores al valor objetivo propuesto (%E<sub>r</sub> < 15%). A la vista de los resultados cabe añadir que el intervalo de valores de error relativo obtenidos para cada nivel de concentración incluye el cero.

La veracidad del método, expresada como sesgo, se cuantificó como el error relativo máximo de cada nivel de concentración, en valor absoluto, |%E<sub>r</sub>|<sub>MAX</sub>. Se tomó el valor de error máximo en lugar del valor promedio para reflejar los valores más desfavorables del sesgo y garantizar así el cumplimiento del objetivo de veracidad en todos los casos (*Eurolab*, 2006).

### Precisión

La precisión se evaluó por medio de la varianza de reproducibilidad,  $s^2_{reproducibilidad}$ , obtenida del análisis de varianza de los resultados del diseño de experimentos totalmente anidado de cuatro factores según la ec. 3.5.

En la Tabla 4.41 están recogidos los valores de la precisión obtenidos para cada nivel de concentración, expresados como porcentaje de desviación estándar relativa, %DER. Puede apreciarse que la precisión disminuye al disminuir la concentración. En todos los niveles de las muestras de control el valor obtenido es menor al propuesto, %DER < 15% (ver Tabla 3.6)

Tabla 4.41: Estimación de la precisión para la determinación de fenol

Nivel de concentración $N_i$	%DER
$N_1 = \text{LoQ}$	7.1
$N_2$	5.8
$N_3$	3.3
$N_4$	2.4
$N_5 = \text{LS}$	2.8

El tratamiento de los resultados del diseño experimental mediante ANOVA nos proporciona información adicional de las precisiones intermedias para cada nivel de concentración debidas a la realización de los ensayos en distintos días, por distintos analistas, quienes someten las muestras a distintas destilaciones, que se miden por duplicado. En la Tabla A.II.23 del Anexo II se muestran los valores numéricos de las varianzas intermedias calculadas. La representación gráfica de la raíz cuadrada de estos valores,  $s_{\text{factor}}$ , se muestra en la Fig. 4.41. Se puede apreciar que, en general, las contribuciones mayoritarias a la desviación estándar total son las debidas a la etapa de destilación y al analista aunque el comportamiento varía con el nivel de concentración; por ejemplo, para el nivel más bajo de concentración todos los factores contribuyen de forma apreciable a la imprecisión final.

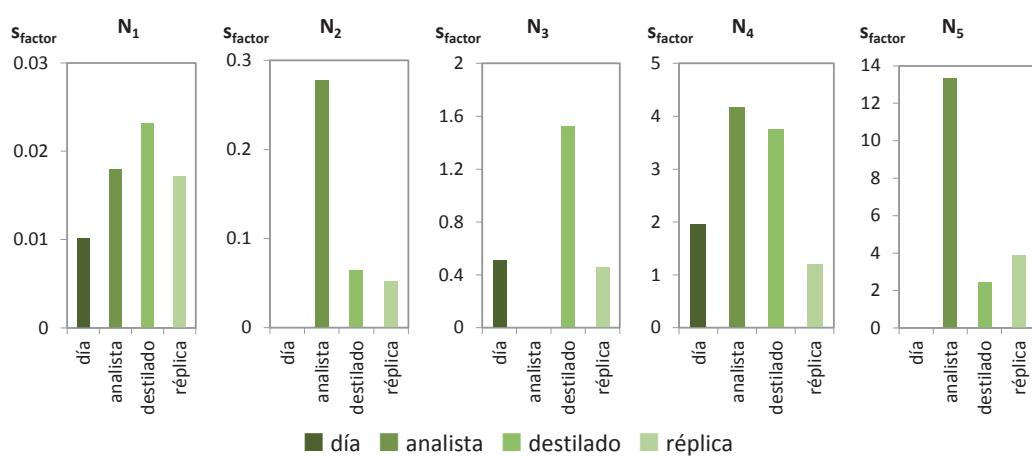


Fig. 4.41 Precisiones intermedias para la determinación de fenol, expresadas como desviación estándar

### Incertidumbre

Se estimó la incertidumbre para cada nivel de concentración, según las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.6 y descritas en el *Apartado 2.3.3*. Se tuvieron en cuenta tres contribuciones principales: la falta de veracidad, la falta de precisión y la falta de trazabilidad en la preparación de las muestras de control. Como contribución a la falta de veracidad se tomó el porcentaje de error relativo máximo, en valor absoluto, para evitar subestimar la incertidumbre total en las muestras reales.

Los resultados de incertidumbre de cada una de las contribuciones, expresadas como varianza, la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida se resumen en la Tabla A.II.24 del *Anexo II*. En la Fig. 4.42 se han representado las incertidumbres individuales para cada nivel de concentración, pudiéndose apreciar que la contribución que menos afecta a la incertidumbre total es la debida a la trazabilidad mientras que las debidas a la veracidad y precisión contribuyen en mayor medida y son aproximadamente del mismo orden de magnitud.

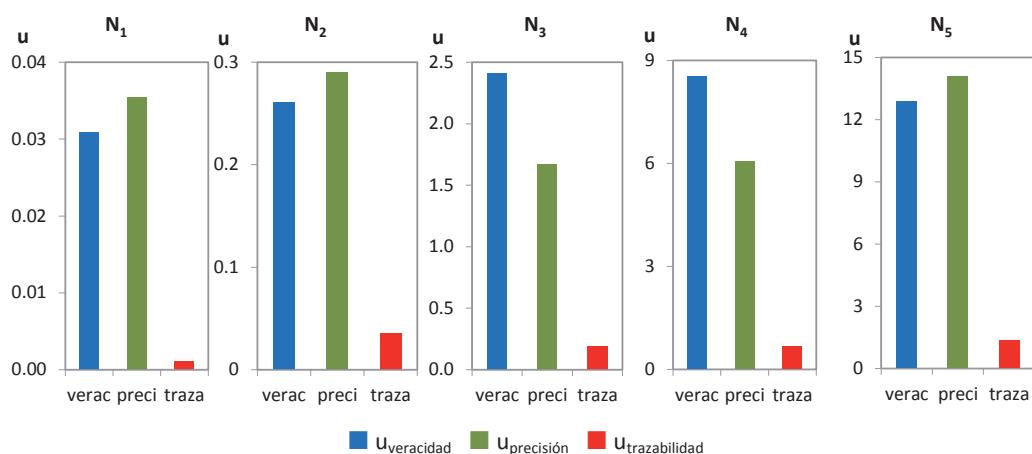


Fig. 4.42: Contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de fenol expresadas como incertidumbres típicas

En la Tabla 4.42 podemos ver los resultados finales de la incertidumbre expresados como porcentaje de incertidumbre expandida,  $\%l$ . Puede observarse que la incertidumbre relativa aumenta al disminuir la concentración; no obstante, el valor obtenido es menor al propuesto en la Tabla 3.6 para todos los niveles de concentración de fenol ensayados ( $\%l < 25\%$ ).

Una vez obtenida la incertidumbre para cada nivel de concentración, se estableció la relación funcional entre ambas variables. Debido al amplio rango de medida, y para facilitar la visualización de la relación incertidumbre-concentración, se representó gráficamente en escala logarítmica obteniéndose la relación potencial que se muestra en la Fig. 4.43.

Tabla 4.42: Incertidumbre de medida para la determinación de fenol

Nivel de concentración $N_i$	% $I_{fenol}$
$N_1 = LoQ$	19
$N_2$	16
$N_3$	12
$N_4$	8.4
$N_5 = LS$	7.7

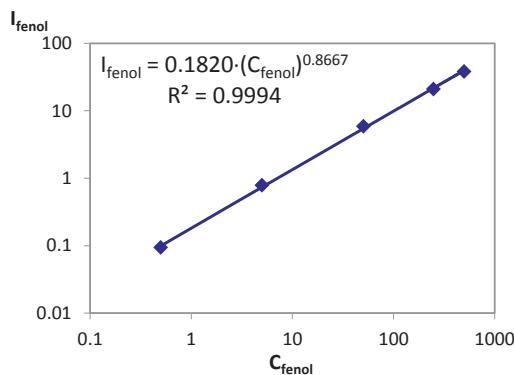


Fig. 4.43: Representación gráfica de la incertidumbre en función de la concentración para la determinación de fenol

A diferencia de la función obtenida en el caso de los aniones, el exponente  $k_4$  es significativamente menor que 1, por lo que la relación incertidumbre-concentración obtenida se corresponde con el modelo Tipo III propuesto en la norma UNE 82009-2 ( $I=k_3 \cdot x^{k_4}$ ). Esta conclusión es concordante con los resultados mostrados en la Tabla 4.42, donde se observa que el % $I$  disminuye al aumentar la concentración.

#### Rango de medida/límite superior/dilución máxima

Se comprobó la capacidad de medir fenol en el límite de cuantificación, LoQ, y en el límite superior de concentración, LS (0.5 y 500 mg fenol·L<sup>-1</sup>, respectivamente), aplicando en este último caso la dilución máxima permitida (1:200). Los resultados obtenidos de veracidad, precisión e incertidumbre se muestran a continuación:

Tabla 4.43: Resultados obtenidos para el LoQ y el LS en la determinación de fenol

	$C_{objetivo}$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	$ %Er _{max}$	%DER	% $I_{fenol}$
LoQ	0.5000	11	7.1	19
LS	500.0	4.5	2.8	7.7

Se puede comprobar que para ambos límites de concentración se cumplen los objetivos de sesgo, precisión e incertidumbre.

#### **Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos (control de calidad interno)**

Se emplearon gráficos de control para verificar la calidad de los resultados de la determinación de fenol en aguas residuales. Se establecieron las líneas de los gráficos de control tomando como valores de aprendizaje los resultados obtenidos durante la validación para las muestras de control de concentración  $0.5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$  (niveles de concentración  $N_1$  y  $N_2$ , respectivamente). Debido al tiempo requerido para el ensayo de fenol, se ha optado por analizar las muestras de control sin replicar. El gráfico a utilizar ha sido por tanto el de valores individuales y rangos móviles, X/RM.

Las ecuaciones para calcular las líneas de los gráficos X/RM se encuentran en la Tabla 2.13. La Tabla 4.44 muestra los valores de los parámetros estadísticos de esas ecuaciones para tamaño muestral  $n=1$ .

Tabla 4.44: Parámetros empleados para construir los gráficos de control

$d_2$	$D_4$	$D_3$	$n$
1.128	3.267	0	1

En la Tabla 4.45 se recogen los valores de las líneas de control obtenidas, entre los que deben estar los resultados de las muestras de control a analizar periódicamente.

Tabla 4.45: Valores de las líneas de los gráficos de control para los dos niveles de concentración de fenol

0.5 mg fenol·L <sup>-1</sup>			5 mg fenol·L <sup>-1</sup>		
Línea	X	RM	Línea	X	RM
LC	0.4996	0.0434	LC	5.015	0.1561
LCS	0.6150	0.1418	LCS	5.431	0.5101
LCI	0.3841	0.0000	LCI	4.600	0.0000

## **4.4. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS (A&G) EN AGUAS**

A continuación se describen los ensayos realizados y los resultados obtenidos en la validación del método de análisis para la determinación de aceites y grasas, A&G, en aguas residuales y continentales mediante extracción en fase sólida con n-hexano.

El fundamento del método y las etapas básicas del procedimiento analítico fueron descritos en el *Capítulo 3*. Las características técnicas a determinar, así como los objetivos perseguidos para este método de análisis, se han presentado en la Tabla 3.6.

#### **4.4.1. ENSAYOS PREVIOS A LA VALIDACIÓN**

La reciente comercialización de filtros de extracción para aceites y grasas ha posibilitado el desarrollo de un método gravimétrico basado en la extracción en fase sólida de estos contaminantes. Esta metodología ha sido sugerida como una alternativa a la extracción en fase líquida con n-hexano (*USEPA Method 1664 revB, 2010*). Debido a que en el momento de iniciar la validación el método propuesto no estaba publicado como norma oficial detallada, se hizo necesario un estudio exhaustivo de los factores que afectan al método a fin de establecer las condiciones generales de experimentación. Con ese propósito se han investigado: la cantidad de extractante necesaria, el efecto del tipo de aceites y grasas en la eficiencia de la extracción y la influencia de la presencia de sólidos en suspensión. Se ha incluido un apartado dedicado a la preparación de la matriz sintética empleada para validar el método y a la estabilidad de las muestras.

##### **Preparación de la matriz sintética compuesta**

Una vez preparado el volumen suficiente de matriz compuesta necesario para la preparación de todas las muestras de control, se trató para eliminar los A&G inicialmente presentes. En primer lugar se acidificó a pH<2 para evitar la saponificación y formación de emulsiones con los A&G. A continuación, se prepararon filtros consistentes en discos de muselina de 11 cm de diámetro cubiertos con papel de filtro Whatman 40 o equivalente, que se colocaban en un embudo Buchner de 12 cm de diámetro. Cada filtro se humedeció con agua ultrapura y se aplicó vacío. Seguidamente, se añadieron 100 mL de suspensión de sílice de diatomeas, 10 g·L<sup>-1</sup>, lavándolos tres veces con 100 mL de agua ultrapura. Se proseguía haciendo vacío hasta que no fluía más agua a través del filtro. La matriz compuesta se filtró a través de estos filtros donde quedaron retenidos los A&G. Se comprobó que la eliminación de A&G de la matriz compuesta era eficaz comprobando que la concentración no difería de la de un blanco. El filtrado así obtenido se empleó en la preparación de las muestras de control empleadas durante los ensayos previos a la validación y los del diseño de experimentos.

No se consideró necesaria la preparación de muestras de control en otras matrices sintéticas ya que la eliminación los aceites y grasas de la matriz compuesta únicamente estuvo acompañada de la eliminación de los sólidos suspendidos totales, los cuales se simularon posteriormente con celulosa microcristalina para preparar las muestras de control. Se supuso que, al ser mínima la alteración de la composición química de la matriz compuesta, ésta es representativa de las posibles matrices reales.

### Optimización del volumen de extractante

La cantidad de n-hexano necesaria para la extracción de los A&G retenidos en los filtros SPE condiciona el volumen del matraz empleado. Tras destilar el n-hexano, el residuo graso se pesa, siendo esta una de las etapas críticas del método analítico ya que, dependiendo del volumen del matraz, se pesará en la balanza con el adecuado fondo de escala y con una resolución determinada.

Se optimizaron simultáneamente el volumen necesario de n-hexano y la capacidad del matraz, que va a estar relacionada con la resolución de la balanza empleada para pesar el residuo. Se utilizaron matraces de 50, 100, 250 y 500 mL para recoger los extractos, empleado en cada caso un volumen de n-hexano equivalente a la mitad de la capacidad del matraz. Se hicieron ensayos con tres tipos diferentes de A&G: (i) aceite vegetal representado por aceite de maíz (AV), (ii) aceite mineral representado por parafina (AM) y (iii) mezcla de ácido esteárico y hexadecano (AE/H), que es el patrón de A&G recomendado por la EPA para métodos gravimétricos (*USEPA Method 1664, revB, 2010*). Todos ellos se ensayaron a dos niveles de concentración. En la Fig. 4.44 se han representado los valores de los porcentajes de recuperación, %R, obtenidos en estas determinaciones.

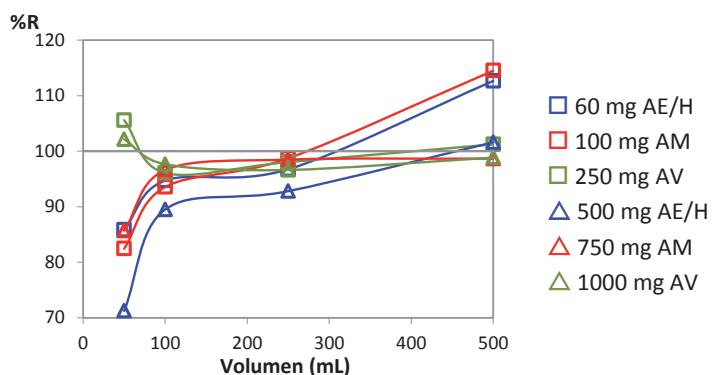


Fig. 4.44: Recuperación de A&G al emplear distintas cantidades de n-hexano

Se observa que se cometan errores muy altos, y generalmente negativos, al emplear matraces de 50 mL pues el volumen de n-hexano empleado es insuficiente para la recuperación de los A&G. Cabe destacar que los resultados obtenidos para la extracción de aceite vegetal presentan en general errores inferiores sugiriendo una extracción más eficiente. También puede observarse que los mayores errores se cometan a concentraciones bajas cuando se emplean matraces de 500 mL, pues su peso hace necesario el empleo de una balanza granatario, con mayor rango de trabajo pero menor resolución ( $\pm 10$  mg). Se optó por emplear una balanza analítica de fondo de escala 110 g y por tanto los matraces a emplear durante el análisis fueron de 250 mL con un peso ligeramente inferior a 100 g, empleando un volumen de n-hexano de 100 mL.

En consecuencia, se incluyeron dentro del procedimiento de análisis los requisitos de emplear matraces de 250 mL, balanza analítica con fondo de escala de 110g y un volumen total de n-hexano de 100 mL (PNT-A&G, Anexo III).

### Influencia del tipo de aceites y grasas

Para comprobar la validez del método para distintos tipos de aceites y grasas se realizaron ensayos con A&G de diferente naturaleza: (i) aceite vegetal representado por aceite de maíz (AV), (ii) aceite mineral representado por parafina (AM) y (iii) mezcla de ácido esteárico y hexadecano (AE/H) (*USEPA Method 1664, revB, 2010*). Se prepararon por triplicado muestras de control de los tres tipos de A&G a tres niveles de concentración: 40, 200 y 1000 mg A&G·L<sup>-1</sup>.

Estas muestras se sometieron al procedimiento analítico y se determinó el porcentaje de recuperación de A&G. La Fig. 4.45 muestra los valores obtenidos de recuperación, %R, en función del nivel de concentración de A&G.

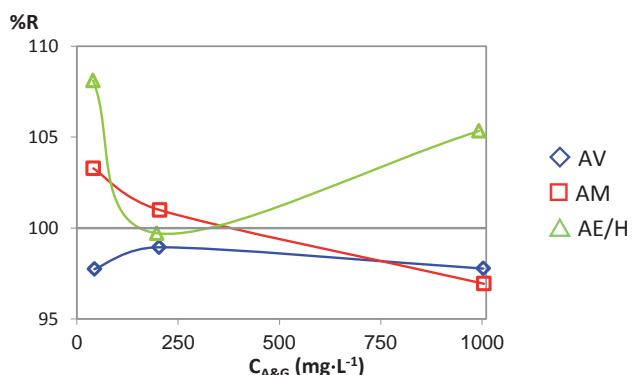


Fig. 4.45: Recuperación de diferentes tipos de A&G en función de la concentración

A la vista de la Fig. 4.45 puede concluirse que el porcentaje de recuperación de estos compuestos está dentro del intervalo de  $100 \pm 10\%$ . Los mejores resultados de recuperación se han obtenido con los A&G vegetales y minerales, mientras que las mayores variaciones en los porcentajes de recuperación se observan para el patrón AE/H por lo que cuando se use este patrón deben extremarse las precauciones.

### Influencia de los sólidos suspendidos

Para preparar muestras de control con concentraciones de A&G exactamente conocidas es necesario eliminar los A&G originalmente presentes en la muestra compuesta. El pretratamiento consistió en una filtración realizada de acuerdo a la norma UNE 77037 (UNE 77037, 1983), descrita anteriormente. En esta etapa se eliminan simultáneamente partículas sólidas suspendidas. Dado que la presencia de sólidos suspendidos puede dificultar la filtración y/o retener los A&G, su efecto debe ser evaluado. Para comprobar la recuperación de A&G en presencia de sólidos

suspendidos totales,  $SST$ , se prepararon muestras de A&G a tres niveles de concentración, 80, 200 y 1000 mg A&G·L<sup>-1</sup>, obtenidos mezclando masas iguales de aceite de maíz, parafina, ácido esteárico y hexadecano. Se doparon tres porciones de cada muestra con  $SST$  a tres niveles diferentes, 50, 1000 y 2000 mg SST·L<sup>-1</sup>, simulados con celulosa microcristalina, que es el patrón de  $SST$  recomendado por distintas normas (APHA, 1998; UNE EN 872, 2006).

Estas muestras se sometieron al procedimiento analítico y se determinó el porcentaje de recuperación de A&G. La Fig. 4.46 recoge los valores de recuperación, %R, obtenidos en cada caso.

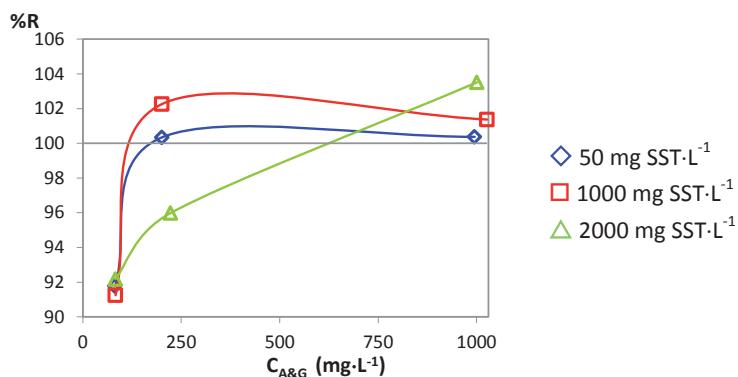


Fig. 4.46: Efecto de la concentración de SST en la recuperación de aceites y grasas

En las gráficas se observa que las mayores diferencias respecto del valor real se cometan a bajas concentraciones de A&G para los tres niveles de  $SST$ , mientras que para los dos niveles restantes se comete aproximadamente un error de  $\pm 5\%$ . Las variaciones de recuperación observadas parecen estar más relacionadas con el nivel de concentración de A&G que con la concentración de  $SST$ . En consecuencia, no es necesario incluir en el procedimiento de ensayo ninguna restricción referente a la concentración de  $SST$  presentes en la muestra, pero se deben extremar las precauciones durante la determinación de A&G a niveles bajos de concentración.

### Requerimientos de los blancos

Dado que el disolvente empleado durante la determinación de A&G se reutiliza, se hace necesario comprobar su pureza, antes de cada análisis, mediante la realización de un blanco. Se decidió imponer un límite máximo al blanco de  $\pm 5$  mg. El valor medio de los blancos realizados durante diez series de medidas fue de -0.31 mg, con una desviación estándar de 3.1 mg, comprobándose que todos los valores del blanco obtenidos fueron inferiores al límite impuesto.

Para decidir si la media del blanco difiere significativamente de cero, se aplicó una prueba estadística  $t$  (Miller *et al.*, 2002). Se obtuvo un valor del parámetro  $t$  de Student igual a 0.32 que, comparado con el valor  $t_{crítico}$  (2.26 para  $\alpha=0.05$ ;  $g.d.l.=n-1=9$ ) nos

permite concluir, con un nivel de confianza del 95%, que la concentración del blanco no difiere significativamente de cero.

Se detalló en el procedimiento de análisis la condición de realizar un blanco antes de cada serie de medidas cuyo valor debe ser menor de  $\pm 5$  mg (PNT-A&G, Anexo III).

### Conservación de la muestras

Para establecer las condiciones de conservación de las muestras de agua residual para la determinación de A&G, se han recopilado los períodos de conservación, el tipo de envase permitido y la temperatura de conservación, recomendados en distintas normas consultadas (APHA, 1998; ASTM 4281:95, 2005; UNE 77038, 1983; UNE 77037, 1983; UNE EN ISO 5667-3, 2004; USEPA Method 1664, revA, 1999). Estos datos se muestran en la Tabla 4.46:

Tabla 4.46: Condiciones para la conservación de muestras en las que se van a determinar A&G

Normativa	Envase	Tamaño y técnica de llenado	Conservación	Tiempo
UNE 77037, 1983	-	-	pH<2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl	-
UNE 77038, 1983	-	1000 mL	pH<2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl	-
ASTM D 4281-95, 2001	Vidrio tapón PTFE Cada réplica en un envase	1000 mL; menos según residuo A&G; dejar cámara de aire	pH<2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl; refrigerar a 4°C	28 días
UNE EN ISO 5667-3, 2004	vidrio enjuagado con disolvente	1000 mL	pH 1-2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl	1 mes
Standard Method 5520 APHA ,1998	vidrio de boca ancha enjuagado con disolvente	1000	-- pH <2 con HCl o H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; refrigerar	2 h 28 días
USEPA Method 1664, revB, 2010	Vidrio enjuagado con disolvente	1000 mL; menos si residuo > 500 mg A&G L <sup>-1</sup>	refrigerar 0-6°C pH < 2 con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> o HCl; refrigerar 0-6°C	4 h 28 días

Para confirmar los períodos de conservación encontrados bibliográficamente, se prepararon cuatro muestras de control contenido A&G de la siguiente forma: a cuatro alícuotas de un litro de matriz sintética se le añadieron unos 25 mg de distintos tipos de aceites y grasas (vegetal, mineral, ácido esteárico y hexadecano) obteniéndose una concentración total de aproximadamente 100 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Estas muestras se analizaron durante cuatro semanas consecutivas, teniendo en cuenta el máximo periodo de conservación recomendado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.47

Para decidir si la diferencia entre las concentraciones esperadas y las concentraciones obtenidas era significativa se aplicó una prueba estadística *t* de pares de valores (Miller et al., 2002). Se obtuvo un valor del parámetro *t* de Student igual a 2.5 que, comparado

con el valor  $t_{crítico}$  (3.18 para  $\alpha=0.05$ ;  $g.d.l.=n-1=3$ ) nos permite concluir, con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre ambas series de valores, por lo que se deduce que las muestras son estables al menos durante un mes.

Tabla 4.47: Variación temporal de la concentración de A&G en una muestra real

	$\mu_i$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	$x_i$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	%R <sub>i</sub>
Semana 1	94.3	92.2	-2.2
Semana 2	122.0	109.6	-10
Semana 3	122.0	106.4	-13
Semana 4	90.2	93.3	3.4

Se decidió establecer en el procedimiento de análisis que las muestras recogidas no deben subdividirse, por lo que se deben recoger de forma separada, en envases de vidrio de boca ancha, para la realización de réplicas. El volumen de muestra que debe recogerse es aquél que proporcione una cantidad de A&G comprendida entre 10 y 1000 mg A&G·L<sup>-1</sup>. También se indicó un periodo máximo de conservación de muestras de aguas residuales para el análisis de A&G de 28 días, acidificadas con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o HCl y refrigeradas a una temperatura de 4°C (PNT-A&G, Anexo III).

#### 4.4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

En el protocolo de validación descrito en el *Apartado 3.3.* se describió el diseño experimental seleccionado para la validación del método de aniones.

De todos los aceites y grasas empleados en los ensayos previos, se ha elegido la mezcla de AE/H, en proporción 1:1, para preparar las muestras de control necesarias para los experimentos de validación por ser el patrón de A&G recomendado por la EPA para métodos gravimétricos (*USEPA Method 1664, revB, 2010*). Las muestras de control se prepararon a los niveles de concentración a ensayar, N<sub>i</sub> (10, 50, 250, 1000 y 5000 mg A&G·L<sup>-1</sup>) añadiendo cantidades iguales de ácido esteárico y hexadecano en porciones de matriz sintética compuesta.

Debido a la imposibilidad de dividir las muestras, se prepararon cuatro muestras para cada nivel y día, siendo dos para cada analista. A cada muestra de control se añadió la cantidad de celulosa microcristalina suficiente para tener una concentración de SST similar a la reglamentada como límite de vertido local, establecida en 200 mg SST·L<sup>-1</sup> (*Ayuntamiento de Valladolid, 2006*). Se introdujeron deliberadamente variaciones en el volumen de muestra de control preparada para abarcar un amplio rango de volúmenes de muestra y de masa de residuo de A&G pesado con el objeto de introducir un factor de ruido controlado en el diseño de experimentos. En la Tabla 4.48 se recogen las cantidades de ácido esteárico, hexadecano y celulosa microcristalina previstas para la preparación de las muestras de control.

Tabla 4.48: Reactivos necesarios para la preparación de las muestras de control

$N_i$	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4		
	V (L)	$M_{AE+H}$ (mg)	$M_{\mu\text{celulosa}}$ (mg)									
10	2	20	200	1.75	17.5	175	1.5	15	150	1.25	12.5	125
50	1.1	55	110	0.8	40	80	0.6	30	60	0.35	17.5	35
250	0.95	237.5	95	0.64	160	64	0.48	120	48	0.25	62.5	25
1000	0.4	400	40	0.3	300	30	0.2	200	20	0.1	100	10
5000	0.2	1000	20	0.175	875	17.5	0.14	700	14	0.11	550	11

Tabla 4.49: Concentración e incertidumbre de las muestras de control, expresadas en mg A&G.L<sup>-1</sup>

$N_i$	Réplica	Día 1			Día 2			Día 3			Día 4		
		Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2
$N_1$	1	11.44 ± 0.76	11.92 ± 0.76	12.95 ± 0.51	11.75 ± 0.59	11.26 ± 0.58	11.71 ± 0.51	10.79 ± 0.45	9.75 ± 0.45	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_1$	2	13.51 ± 0.75	13.51 ± 0.75	10.92 ± 0.51	13.40 ± 0.61	10.92 ± 0.58	11.99 ± 0.51	12.38 ± 0.47	9.95 ± 0.44	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_2$	1	53.3 ± 2.7	49.8 ± 2.9	49.4 ± 1.3	51.1 ± 1.4	55.1 ± 1.6	53.1 ± 1.8	50.8 ± 1.2	51.3 ± 1.2	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_2$	2	55.8 ± 2.7	50.7 ± 2.7	56.3 ± 1.4	56.7 ± 1.5	50.2 ± 1.6	58.7 ± 1.8	49.6 ± 1.2	49.5 ± 1.4	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_3$	1	248.2 ± 4.5	264.6 ± 4.6	246.4 ± 4.8	251.5 ± 5.0	250.9 ± 3.3	251.9 ± 3.2	254.1 ± 5.6	259.7 ± 5.8	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_3$	2	253.0 ± 4.5	254.2 ± 4.5	254.3 ± 5.3	251.1 ± 5.2	249.5 ± 3.2	249.7 ± 3.2	253.7 ± 5.5	255.1 ± 5.4	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_4$	1	1000 ± 14	1009 ± 14	1003 ± 19	997 ± 21	1006 ± 12	1021 ± 12	1073 ± 23	1002 ± 22	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_4$	2	1020 ± 14	1006 ± 14	1031 ± 22	991 ± 22	1001 ± 12	1026 ± 12	1070 ± 22	990 ± 21	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_5$	1	4972 ± 70	5038 ± 70	5013 ± 98	4982 ± 97	4978 ± 61	5022 ± 62	4982 ± 96	5012 ± 10	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			
$N_5$	2	4970 ± 70	5078 ± 71	4978 ± 97	4975 ± 98	5006 ± 62	5040 ± 110	5010 ± 110	5010 ± 100	C <sub>A&amp;G</sub> ± I <sub>A&amp;G</sub>			

Una vez preparadas las muestras de control se señaló en el envase de cada una de ellas el nivel del menisco, se acidificaron a pH<2 con ácido clorhídrico 1:1 y se conservaron refrigeradas a 4°C. En la Tabla 4.49 se recogen las concentraciones reales de cada una de las muestras de control preparadas junto con su incertidumbre estimada mediante el método “bottom-up”.

La Tabla A.II.25 del Anexo II muestra todos los resultados experimentales obtenidos del análisis de estas muestras.

#### **4.4.3. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

Una vez realizados todos los ensayos programados en el diseño de experimentos se procedió al análisis estadístico de los mismos para evaluar cada una de las características técnicas del método de análisis indicadas en la Tabla 3.6 y comparar los resultados con los objetivos.

##### **Selectividad**

Se hizo una revisión bibliográfica de normas y publicaciones relacionadas con la determinación gravimétrica de A&G para verificar la selectividad y eliminar las posibles interferencias (APHA, 1998; ASTM D 4281-95, 2005; UNE 77037, 1983; USEPA Method 1664, revB, 2010). De acuerdo a estas normas, el método se aplica a la determinación de compuestos extraíbles con n-hexano. Este método es apropiado para la mayoría de las aguas residuales urbanas e industriales o los efluentes tratados que contengan A&G.

En la determinación de aceites y grasas no se mide una cantidad absoluta de una sustancia específica sino que más bien se determinan cuantitativamente grupos de sustancias con características físicas similares sobre la base de su solubilidad común. Los A&G que pueden ser determinados son hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, sebos animales, ceras, jabones, grasas.... El n-hexano, además, tiene la capacidad de disolver otras sustancias orgánicas tales como compuestos orgánicos de azufre, ciertos tintes orgánicos, detergentes... Por otro lado, los residuos más pesados del petróleo pueden contener una porción significativa de materiales que no son extraíbles con n-hexano.

El método no es aplicable para medir fracciones de bajo punto de ebullición que se volatilizan a temperaturas por debajo de 70°C. Durante la eliminación del disolvente se tiene como resultado la pérdida de los hidrocarburos de cadena corta y aromáticos sencillos, por volatilización.

Es importante que esta limitación se entienda con toda claridad pues, a diferencia de otros métodos, el método analítico para la determinación de A&G es operativo, es decir, el resultado depende fuertemente de las condiciones experimentales empleadas para su determinación.

## Veracidad

Se calcularon los errores relativos de los valores obtenidos para cada analista y día,  $\%E_{r-i}$  respecto de los valores esperados. La Tabla 4.50 muestra el porcentaje de error relativo medio,  $\%E_r \text{ MEDIO}$ , y los porcentajes de error relativo máximo y mínimo,  $\%E_r \text{ MAX}$  y  $\%E_r \text{ MIN}$ , para cada nivel de concentración de las muestras de control.

Tabla 4.50: Estimación de la veracidad para la determinación de A&G

Nivel de concentración $N_i$	$C_{\text{esperada}}$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	$C_{\text{obtenida}}$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	$\%E_r \text{ MEDIO}$	$\%E_r \text{ MAX}$	$\%E_r \text{ MIN}$	Sesgo $  \%E_r  _{\text{MAX}}$
LoQ=N <sub>1</sub>	11.8	11.8	0.84	24	-11	24
N <sub>2</sub>	52.6	50.6	-3.7	1.8	-7.7	7.7
N <sub>3</sub>	252.7	243.4	-3.8	5.0	-13	13
N <sub>4</sub>	1014	991	-2.4	1.1	-9.5	9.5
LS=N <sub>5</sub>	4995	4854	-3.0	1.8	-5.9	5.9

Se puede ver que se cumple el valor objetivo propuesto ( $\%E_r < 15\%$ ) excepto al nivel de concentración N<sub>1</sub>, próximo al límite de cuantificación. También se puede concluir que el intervalo de valores de error relativo obtenidos para cada nivel de concentración incluye el cero.

La veracidad del método, expresada como sesgo, se cuantificó como el error relativo máximo de cada nivel de concentración en valor absoluto,  $| \%E_r |_{\text{MAX}}$ . Se tomó el valor de error máximo en lugar del valor promedio para reflejar los valores más desfavorables del sesgo.

## Precisión

La precisión se evaluó por medio de la varianza de reproducibilidad,  $s^2_{\text{reproducibilidad}}$ , obtenida del análisis de varianza de los resultados del diseño de experimentos totalmente anidado de tres factores según la ec. 3.4.

Debido a la limitación del procedimiento de ensayo que impide la división de las muestras para la realización de réplicas, éstas se realizaron analizando pares de muestras de control con concentraciones muy similares de cada uno de los niveles de ensayados. Para evitar que las diferencias de concentración debidas a la preparación de las réplicas supusiera un aumento en la estimación de la precisión, el análisis de varianza, ANOVA, se realizó a partir de los resultados obtenidos, medidos como recuperaciones. Una vez obtenidas las estimaciones de la precisión global y las precisiones intermedias estas se transformaron en las unidades habituales de concentración.

En la Tabla 4.51 están recogidos los valores de la precisión, expresada como  $\%DER$ , para cada nivel de concentración. Puede observarse como la falta de precisión

aumenta al disminuir la concentración. En todos los niveles el valor obtenido es menor al propuesto, %DER < 15% (ver Tabla 3.6).

Tabla 4.51: Estimación de la precisión para la determinación de A&G

Nivel de concentración $N_i$	%DER
$LoQ = N_1$	13
$N_2$	5.2
$N_3$	7.1
$N_4$	4.3
$LS = N_5$	3.8

El tratamiento de los resultados del diseño experimental mediante ANOVA nos proporciona información adicional de las precisiones intermedias para cada nivel de concentración, debida a la realización de los ensayos en distintos días, por distintos analistas, que se miden por duplicado. En la Tabla A.II.26 del Anexo II se muestran los valores numéricos de las varianzas intermedias estimadas. La representación gráfica de la raíz cuadrada de las diferentes contribuciones a la varianza total,  $s_{factor}$ , se muestra en la Fig. 4.47. Se puede apreciar que, en general, la contribución mayoritaria a la desviación estándar total es la varianza de repetibilidad.

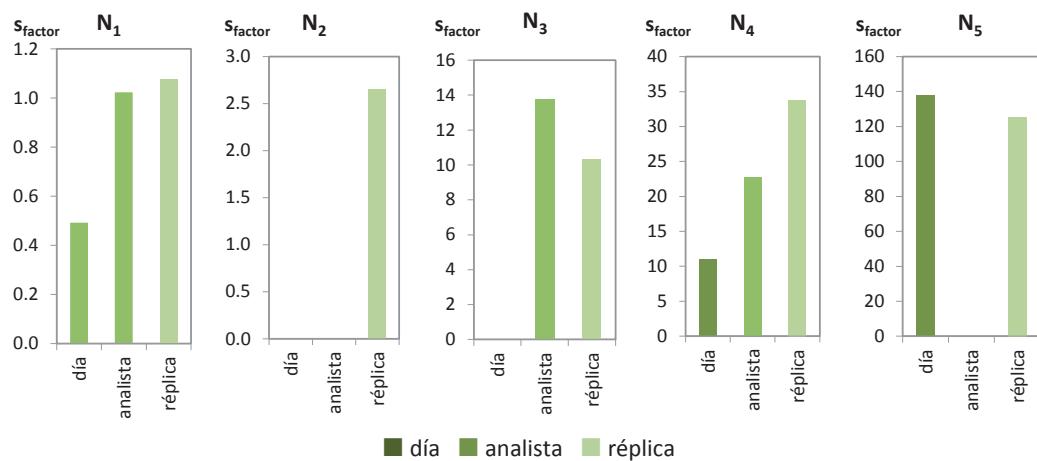


Fig. 4.47: Valores de precisión intermedia para la determinación de A&G, expresadas como desviación estándar

### Límite de detección (LoD) y límite de cuantificación (LoQ)

Los límites de detección y cuantificación se estimaron de acuerdo a las ecuaciones indicadas en la Tabla 3.6 correspondientes a un método que no requiere línea de calibrado y cuyo blanco es muy próximo a cero.

Como el valor del blanco obtenido es cero, el valor  $s_B$  se estimó como la desviación estándar de los resultados obtenidos del análisis del primer nivel de concentración del diseño de experimentos, que se recogen en la Tabla 4.52, obteniéndose un valor de  $0.65 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$ . Los valores de LoD y LoQ resultantes fueron, respectivamente,  $2.1 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$  y  $6.5 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$ , valor este último más bajo que el valor objetivo propuesto,  $10 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$ .

Tabla 4.52: Concentraciones reales y obtenidas del nivel N<sub>1</sub> de aceites y grasas, mg A&G·L<sup>-1</sup>

C <sub>real</sub>	11.4	13.5	13.0	10.9	11.3	10.9	10.8	12.4	11.9	13.5	11.7	13.4	11.7	11.9	9.8	9.9
C <sub>Obtenida</sub>	12.5	12.3	11.0	11.2	12.5	12.1	10.0	13.9	11.4	12.6	10.1	13.3	10.7	10.3	12.6	11.8

Para decidir si la diferencia entre las concentraciones teóricas y las concentraciones determinadas es significativa se aplicó una prueba estadística *t* de pares de valores (*Miller et al.*, 2002). Se obtuvo un valor del parámetro *t* de Student de 0.019 que, comparado con el valor *t<sub>crítico</sub>* (2.131 para  $\alpha=0.05$ ; *g.d.l.=n-1=15*), nos permite concluir, con un nivel de confianza del 95%, que no existen diferencias significativas entre ambas series de valores. Se demuestra, pues, que se puede cuantificar A&G sin error significativo a la concentración del LoQ objetivo; por tanto, se mantuvo el valor objetivo de  $10 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$ .

### Incertidumbre

Se estimó la incertidumbre para cada nivel de concentración, según las ecuaciones mostradas en la Tabla 3.6 y descritas en el *Apartado 2.3.3*. Se tuvieron en cuenta tres contribuciones principales: la falta de veracidad, la falta de precisión y la falta de trazabilidad durante la preparación de los patrones. Como contribución a la falta de veracidad se tomó el porcentaje de error relativo máximo, en valor absoluto, para evitar subestimar la incertidumbre total en las muestras reales.

Los resultados de incertidumbre de cada una de las contribuciones, expresadas como varianza, la incertidumbre combinada y la incertidumbre expandida se resumen en la Tabla A.II.27 del *Anexo II*. Como cabe esperar, la incertidumbre total absoluta aumenta con la concentración. En la Fig. 4.48 se han representado las incertidumbres individuales para cada nivel de concentración, pudiéndose apreciar que la contribución que menos afecta a la incertidumbre total es la debida a la trazabilidad mientras que las debidas a la veracidad y precisión contribuyen en mayor medida, siendo aproximadamente del mismo orden de magnitud.

En la Tabla 4.53 podemos ver los resultados finales de la incertidumbre expresados como porcentaje de incertidumbre expandida, %. Los valores obtenidos son menores que el valor objetivo, propuesto en la Tabla 3.6 (%I < 25%), excepto para el primer nivel de concentración, coincidente con el LoQ. Esto significa que no se ha cumplido el objetivo de validación para ese nivel y, en consecuencia, se debería buscar un nivel

próximo superior al cual se cumpla. A la espera de obtener el nuevo límite inferior validado, el rango de medida del método de ensayo estaría comprendido entre  $N_2$  y  $N_5$ .

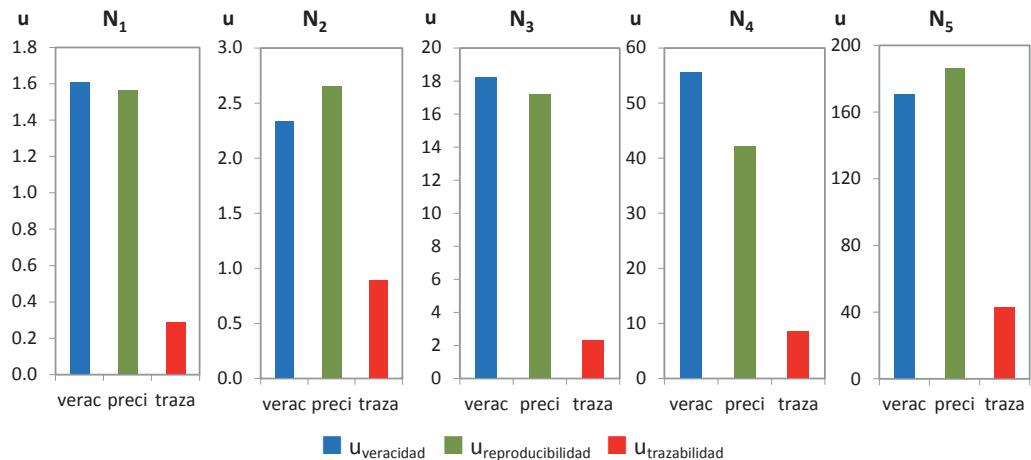


Fig. 4.48 Contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de A&G expresadas como incertidumbres típicas

Tabla 4.53: Incertidumbre de medida para la determinación de A&G

Nivel de concentración $N_i$	$\%I_{A&G}$
$LoQ = N_1$	39
$N_2$	14
$N_3$	20
$N_4$	14
$LS = N_5$	10

Una vez obtenidos los valores de incertidumbre para cada nivel de concentración, se estableció la relación funcional entre ambas variables, excluyendo el nivel  $N_1$ . Debido al rango de medida tan amplio, y para facilitar la visualización de la relación incertidumbre-concentración, se representó gráficamente en escala logarítmica obteniéndose una función potencial,  $I=k_3 \cdot x^{k_4}$ . La Fig. 4.49 muestra dicha relación. En la misma figura se ha incluido a modo informativo la incertidumbre expandida del nivel  $N_1$ .

La relación incertidumbre-concentración obtenida se corresponde con el modelo Tipo III propuesto en la norma UNE 82009-2 (Tabla 2.12).

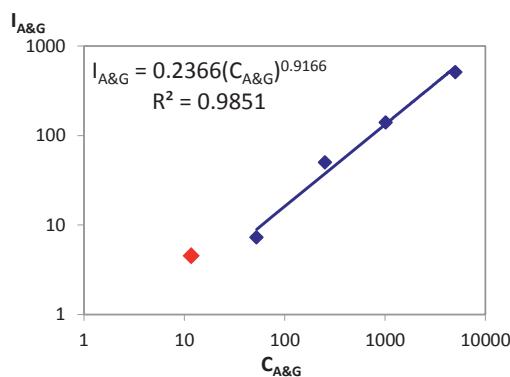


Fig. 4.49: Representación gráfica de la incertidumbre en función de la concentración para la determinación de A&G

### Rango de medida/límite superior/dilución máxima

Se comprobó la capacidad de medir A&G en el límite de cuantificación, LoQ, y en el límite superior de concentración, LS (10 y 5000 mg A&G·L<sup>-1</sup> respectivamente). En este caso no se hizo necesario aplicar ninguna dilución máxima ya que el rango de ensayo coincide con el de medida, pues el método no contempla la posibilidad de diluir las muestras.

Debido a que no se ha cumplido el objetivo impuesto en veracidad e incertidumbre del límite de cuantificación propuesto, a la espera de obtener un nuevo límite inferior validado, el rango de medida validado estaría comprendido entre las concentraciones N<sub>2</sub>=50 mg A&G·L<sup>-1</sup> y N<sub>5</sub>=LS=5000 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Los resultados de veracidad, precisión e incertidumbre obtenidos para estos niveles se muestran a continuación:

Tabla 4.54: Resultados obtenidos para el LoQ y el LS en la determinación de A&G

	C <sub>objetivo</sub> (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	%Er  <sub>max</sub>	%DER	%I <sub>A&amp;G</sub>
LoQ	10	24	11	39
N <sub>2</sub>	50	7.7	5.7	14
N <sub>5</sub> =LS	5000	5.9	3.4	10

### Aseguramiento de la calidad de los resultados de los ensayos (control de calidad interno)

Se establecieron gráficos de control para verificar la calidad de los resultados de la determinación de A&G en aguas residuales. Debido a que el nivel N<sub>1</sub> no ha sido validado, los niveles elegidos para el aseguramiento de la calidad de los resultados se corresponde con las muestras de control N<sub>2</sub>, 50 mg A&G·L<sup>-1</sup> y N<sub>3</sub>, 250 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Dada la imposibilidad de tener concentraciones exactamente iguales al preparar las réplicas

mediante distintas pesadas, se han elegido gráficos de control de valores individuales y rangos móviles, X/RM.

Se establecieron las líneas de los gráficos de control tomando como valores de aprendizaje los resultados obtenidos durante la validación para las muestras de control de concentración N<sub>2</sub> y N<sub>3</sub> empleando las ecuaciones recogidas en la Tabla 2.13. En la Tabla 4.55 se muestran los parámetros estadísticos empleados para construir los gráficos de control y en la Tabla 4.56 los valores de las líneas de los gráficos de control.

Tabla 4.55: Parámetros empleados para construir los gráficos de control

d <sub>2</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>3</sub>	n
1.128	3.267	0	1

Tabla 4.56: Valores de las líneas de los gráficos de control para los dos niveles de concentración de A&G

50 mg A&G·L <sup>-1</sup>			250 mg A&G·L <sup>-1</sup>		
Línea	X	RM	Línea	X	RM
LC	50.6	2.88	LC	243.4	12.0
LCS	58.2	9.41	LCS	275.3	39.2
LCI	42.9	0.0	LCI	211.5	0.0

Una vez construidos los gráficos, se analizarán de forma replicada, con una periodicidad preestablecida, muestras de control con uno de estos dos niveles de concentraciones. Se comprobará la validez del método según la tendencia de los valores representados.

## 4.5. ANÁLISIS DEL MODELO DE ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE PROUESTO

El modelo de estimación de la incertidumbre propuesto en este trabajo tiene en cuenta las contribuciones mayoritarias al error de medida, precisión y veracidad, estimadas durante la validación del método analítico, y una contribución, habitualmente mínima, debida al error en la preparación de las muestras de control empleadas para llevar a cabo los diseños de experimentos anidados. El modelo permite añadir contribuciones adicionales debidas a algún proceso no incluido durante la validación.

La contribución debida a la precisión se ha obtenido del ANOVA de los resultados analíticos obtenidos en los ensayos programados para el diseño de experimentos de tres y cuatro factores. Se consideraron para los tres métodos de ensayo que los factores que más podían afectar a la incertidumbre final, eran la realización de los ensayos en días distintos, el cambio de analista y la realización de medidas replicadas.

Para la determinación de fenol se intercaló además un nuevo factor, la destilación del analito de la muestra. Se tomaron estos factores, ya que se considera que son los que más contribuyen a la incertidumbre de medida (*UNE 82009-3, 1999*).

Otros factores que pueden influir y no se han tenido en cuenta por diversos motivos fueron: (i) cambio de equipo de medida, debido a la falta duplicidad en el equipamiento; (ii) calibración instrumental de los equipos de medida, por asumir que la respuesta de los equipos fue estable durante la corta duración del diseño experimental; (iii) cambio de algún componente crítico de equipo como la columna cromatográfica, por falta de medios económicos.

Fuentes de error debidas al cambio de reactivos, material volumétrico empleado... fueron incluidas en el diseño de experimentos como ruido controlado, de modo que su posible contribución al error final estuviese incluida en el factor residual debido a la realización de las réplicas.

El análisis de varianza nos permitió separar las contribuciones a la varianza total debidas a cada uno de los factores ensayados. Los resultados obtenidos para cada método se representan en la Fig. 4.50 y fueron los siguientes:

- ▲ Para la determinación de aniones el factor que más contribuye a la incertidumbre final es el cambio de analista y, en menor medida, la varianza residual. La realización de los análisis en distintos días supuso para la mayoría de los niveles que ese factor no influye en el error final.
- ▲ Para la determinación de fenol no hay un patrón fijo en cuanto a la contribución a la varianza total de cada uno de los factores, afectando todos en mayor o menor medida. El factor día es una contribución minoritaria o despreciable para todos los niveles de concentración ensayados mientras que el factor analista ha contribuido de manera muy desigual dependiendo del nivel de concentración.
- ▲ Para la determinación de aceites y grasas el factor réplica contribuye de forma homogénea y significativa a la varianza total en todo el rango de concentración ensayado. Por el contrario, los factores tiempo y analista contribuyen de forma irregular, llegando a ser despreciable a ciertos niveles de concentración.

A la vista de estos resultados podemos concluir los siguientes aspectos relacionados con cada uno de los factores ensayados: en contra de lo que cabría esperar, el factor tiempo no contribuye de forma notable a la incertidumbre de medida, por lo tanto quedan justificados nuevamente los tiempos máximos de conservación de la muestra definidos en los ensayos previos; por su parte, el factor analista ha contribuido de forma desigual dependiendo del método de ensayo; una posible razón puede ser que el segundo analista ha sido distinto en cada método.

Una vez identificadas las principales fuentes de variación de cada método podemos plantear minimizar su contribución a la incertidumbre final. Por ejemplo, la formación encaminada a la cualificación del personal técnico reduciría las diferencias entre los resultados obtenidos por distintos analistas; la repetibilidad de los resultados puede mejorarse reoptimizando el método para hacerlo más robusto;...

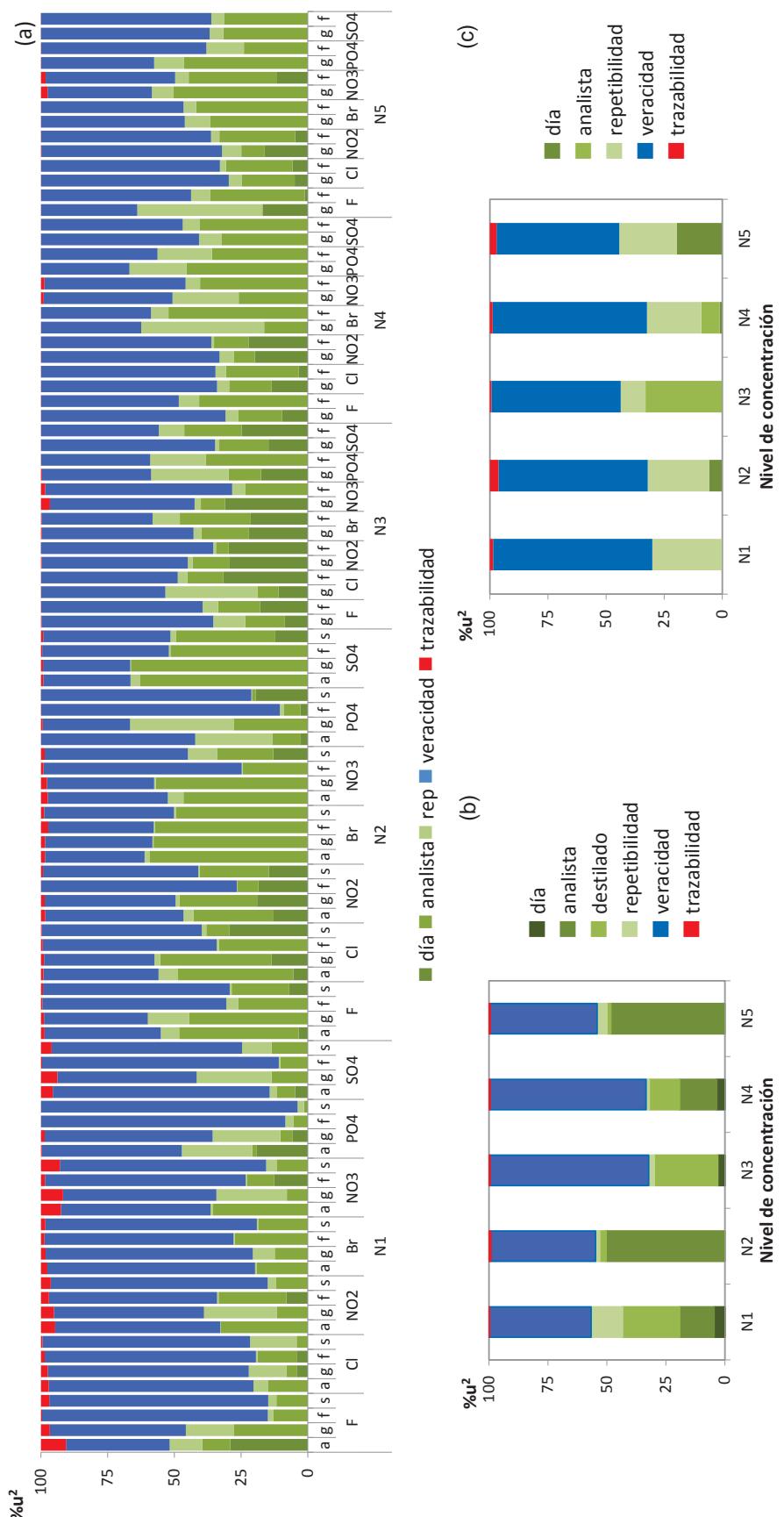


Fig. 4.50: Porcentaje de cada contribución a la incertidumbre total para la determinación de: (a) aniones, (b) aceites y grasas

La veracidad se evaluó a partir de las diferencias relativas entre las concentraciones reales de las muestras de control empleadas durante los análisis del diseño de experimentos y los resultados obtenidos. Para cada nivel de concentración, se optó por tomar el sesgo relativo máximo en valor absoluto,  $| \%E_r |_{MAX}$ , como estimador de la contribución a la incertidumbre debida a la falta de veracidad para evitar subestimarla, garantizando así que el valor verdadero esté incluido dentro del intervalo de incertidumbre del valor medido experimentalmente. Todos los analitos estudiados han cumplido los objetivos de validación propuestos, con la excepción del fosfato para los dos primeros niveles de concentración y de los aceites y grasas para el primer nivel de concentración.

La contribución que hemos llamado falta de trazabilidad es la debida a los errores cometidos en la preparación de las muestras de control. A pesar de ser minoritaria se observa que es ligeramente mayor en los niveles de concentración bajos debido a que la contribución de la balanza aumenta a medida que la masa pesada es más pequeña. Estos errores se minimizan partiendo de disoluciones concentradas en lugar del analito puro. En el caso de la determinación de aceites y grasas, en cambio, es debido a dos causas: el analito a estudiar es una mezcla de reactivos con lo cual se duplican los errores debidos a la masa y pureza; y el volumen final se ha medido con probeta cuya tolerancia de medida es mayor que la del material volumétrico aforado; esta contribución se evita preparando las muestras de control por pesada.

Por último, la contribución debida a otros procesos englobaría aquellas etapas no incluidas en la validación del método analítico como etapas de muestreo o pre-tratamiento que en ninguno de los ejemplos planteados en este trabajo han tenido lugar.

Las funciones matemáticas incertidumbre-concentración obtenidas nos permiten predecir, mediante interpolación, las incertidumbres de medida asociadas a las concentraciones de analito determinadas en las muestras recibidas por el laboratorio sin necesidad de cálculos adicionales.



## **5. OTROS MODELOS DE ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE**

---



En este capítulo se describe la estimación de la incertidumbre aplicando otros modelos, que fueron descritos en el *Capítulo 2*. Para ello se han empleado los datos obtenidos durante la realización de los diseños de experimentos utilizados en los procesos de validación desarrollados en el *Capítulo 4*:

- ▲ Modelo “bottom-up”, que estima la incertidumbre de medida de cada uno de los resultados siguiendo las siguientes etapas: (i) especificar el mesurando mediante la ecuación que lo relaciona con las magnitudes de las que depende, (ii) identificar las fuentes de incertidumbre, tanto las explícitas, es decir, las fuentes de incertidumbre asociadas a las magnitudes de las que depende el mesurando y que aparecen en la fórmula, como las implícitas, que son aquellas que no aparecen en dicha fórmula, (iii) cuantificar los componentes de la incertidumbre y (iv) estimar la incertidumbre combinada.
- ▲ Modelo “top-down”, habitualmente empleado para ensayos interlaboratorio; se ha empleado aquí para un ensayo intralaboratorio donde el factor laboratorio se ha cambiado por cada medida replicada obtenida durante la validación. La incertidumbre se estimó mediante este modelo teniendo en cuenta las contribuciones listadas en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1: Fuentes de incertidumbre según el modelo “top-down” y su cuantificación, en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Fuente de incertidumbre	Símbolo	Coeficiente de sensibilidad, $\partial X/\partial x_i$	Incertidumbre típica $u(x) = u_x$
Repetibilidad	$s_r$	$\frac{1}{n}$	$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p s_i^2}{p}}$ Tabla 2.7 para $n_i=n=2$
Laboratorio	$s_L$	1	$s_L = \sqrt{\frac{1}{p-1} \cdot \left[ \sum_{i=1}^p (\bar{y}_i - \bar{y})^2 \right] - \frac{s_r^2}{2}}$ Tabla 2.7 para $n_i=n=2$
Método	$u_{\text{met}}$	1	$u_{\text{met}} = u(\delta) = \sqrt{s_\delta^2 + u_\mu^2}$ ec. 2.57
Sesgo	$s_\delta$	1	$s_\delta = \sqrt{\frac{s_R^2 - \left( \frac{s_r^2}{2} \right)}{p}}$ ec. 2.58 para $n_i=n=2$ siendo $s_R^2 = s_L^2 + s_r^2$
Material de referencia	$u_\mu$	1	Modelo “bottom-up” Apartado 2.5
Otros	$u_{\text{others}}$	$\partial X/\partial x_i$	$u(x_i)$ Apartado 2.3.3 Modelo “bottom-up”

p=días en que se realizan las medidas

Una vez estimadas las contribuciones, se combinaron de acuerdo con las reglas de propagación de errores obteniéndose así la incertidumbre combinada:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{método}}^2 + s_L^2 + \frac{s_r^2}{n}}$$
 ec. 5.1

Se ha desestimado el término  $u_{\text{others}}$  ya que no se han realizado experimentos adicionales para incluir fuentes de incertidumbre no contempladas durante los ensayos de validación.

Para poder comparar los resultados de estimación de la incertidumbre de acuerdo a este modelo “top-down” con los obtenidos en el capítulo anterior, las fuentes de incertidumbre indicadas en la Tabla 5.1 debidas a la repetibilidad y reproducibilidad intra-laboratorio,  $s_r$  y  $s_L$ , se han agrupado en una única contribución a la incertidumbre debida a la precisión,  $u_{\text{precisión}}$ , y las debidas al sesgo y material de referencia,  $s_\delta$  y  $u_\mu$ , se han renombrado como  $u_{\text{veracidad}}$  y  $u_{\text{trazabilidad}}$ . Esta última contribución tiene el mismo valor absoluto que en el modelo basado en los resultados obtenidos de la validación ya que en ambos casos se estima la incertidumbre de las mismas muestras de control. De este modo, la incertidumbre combinada estimada de acuerdo al modelo “top-down” se expresaría según la ecuación siguiente:

$$u_c = \sqrt{u_{\text{veracidad}}^2 + u_{\text{trazabilidad}}^2 + u_{\text{precisión}}^2}$$
 ec. 5.2

Con carácter informativo, se han aplicado test de consistencia de datos a los resultados obtenidos durante los análisis realizados, de acuerdo a las normas ASTM E691 y UNE 82009-2; se han utilizado test de consistencia gráficos (estadísticos  $k$  y  $h$  de Mandel) y numéricos (test  $C$  de Cochran y  $G$  de Grubbs).

En la aplicación de estos test se tomó la decisión de no eliminar ninguno de los valores por variar motivos: (i) partir de los mismos datos empleados en el modelo de estimación de la incertidumbre aplicado en el capítulo anterior, (ii) evitar minimizar la estimación de la incertidumbre al eliminar los datos alejados de la media, y (iii) mantener el número mínimo de datos exigidos, establecido en 8 (AOAC, 2002a).

Se estudió si la contribución debida al sesgo era significativa aplicando el criterio de aceptación descrito en la ec. 2.59; sin embargo, finalmente se añadió como contribución a la incertidumbre total para evitar subestimarla.

Finalmente, se han comparado los resultados obtenidos de los tres modelos de estimación de la incertidumbre aplicados para cada método de análisis y se ha hecho un análisis de las características de cada uno de ellos.

## 5.1. MODELO “BOTTOM-UP”

### 5.1.1. APPLICACIÓN A LA DETERMINACION DE ANIONES

Para no alargar excesivamente la discusión, en este apartado solo se describen los resultados obtenidos para el anión nitrato. En la Tabla A.II.28 del Anexo II se resumen los valores estimados de la incertidumbre de medida según el modelo “bottom-up”

para las concentraciones del resto de aniones obtenidas por uno de los analistas en cada una de las muestras de control.

En primer lugar se especificó la ecuación que liga la concentración de aniones con las magnitudes de las que depende. A esta ecuación se le añadió un factor de dilución,  $f_{\text{dil}}$ , cuando la concentración de analito en las muestras estaba fuera del rango de ensayo.

$$C_{A^-} = \frac{Y-a}{b} \cdot f_{\text{dil}} = C_{A^-0} \cdot f_{\text{dil}} \quad \text{ec. 5.3}$$

Posteriormente se identificaron las posibles fuentes de incertidumbre basándose en el conocimiento del método analítico. Para facilitar su visualización se empleó un diagrama de Ishikawa o de espina de pescado.

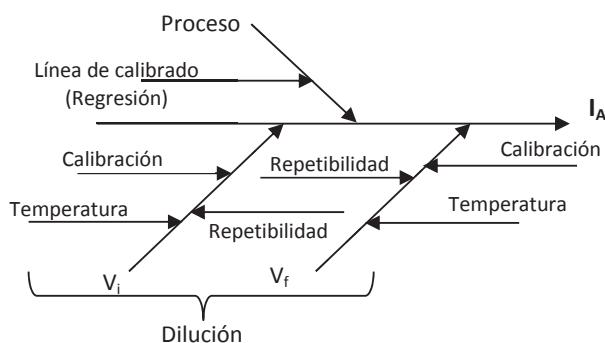


Fig. 5.1: Contribuciones a la incertidumbre de la concentración de aniones

A continuación se estimó el valor de las componentes identificadas, expresadas como desviaciones estándar mediante las expresiones que se muestran en la Tabla 5.2:

Tabla 5.2: Fuentes de error que contribuyen a la incertidumbre en la determinación de aniones según el modelo “bottom-up”

Fuente de incertidumbre	Símbolo	Uds	Coeficiente de sensibilidad, $\partial X / \partial x_i$	Incertidumbre típica $u(x) = u_x$
Volumen: $V_i, V_f$	$u(V_i), u(V_f)$	mL	$\frac{C_{A^-}}{V_{i,f}}$	$u(V_{i,f}) = \sqrt{u_{\text{cal}}^2 + u_{\text{rep}}^2 + u_T^2}$
Calibración	$u_{\text{cal}}$	mL	1	$u_{\text{cal}} = \frac{I_{\text{Vol}}}{K}$
Repetibilidad	$u_{\text{rep}}$	mL	1	$u_{\text{rep}} = s$
Temperatura	$u_T$	mL	1	$u_T = \frac{V_N \cdot \Delta T \cdot 2.1 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3}}$
Proceso	$u_{\text{regresión}}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1	$u(x_0, y) = \frac{s_e}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$

Se ha denominado proceso a la etapa de medida instrumental, que en este método de análisis consta de las siguientes etapas: preparación de patrones de calibración, medida instrumental de los mismos y realización de la línea de calibrado, a partir de la cual se obtendrá la concentración de analito en las muestras por interpolación. La técnica propuesta para calcular la ecuación de la línea de calibrado es el *Modelo I*, que supone que la incertidumbre típica de la concentración debida al error en la preparación de los patrones,  $u(x_0, x_i)$ , es despreciable frente al error en la respuesta del instrumento,  $u(x_0, y)$  (*Eurachem/Citac, 2012*). En la Tabla 5.3 se han recogido ambas contribuciones para distintas concentraciones de nitrito a lo largo de la línea de calibrado. Se puede observar que la contribución del error debido a la preparación de los patrones es más de 10 veces inferior a la contribución debida a la imprecisión de las lecturas del instrumento, esto es, el 0.5% del error total y por tanto despreciable (*Eurolab, 2006*).

Tabla 5.3: Verificación de la aproximación  $u(x_0, x_i) \ll u(x_0, y)$

$x_0 = C_{NO_2^- - 0}$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$x_i \pm l$ (k=2) (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$u(x_0, x_i) \approx u(x_i)/n$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$u(x_0, y)$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )
5.193	$5.029 \pm 0.066$	0.0047	0.63
9.228	$9.827 \pm 0.091$	0.0065	0.57
11.40	$14.74 \pm 0.57$	0.041	0.53
14.13	$16.04 \pm 0.62$	0.045	0.45
20.33	$20.33 \pm 0.60$	0.043	0.54
24.83	$25.14 \pm 0.60$	0.043	0.62
28.55	$30.17 \pm 0.60$	0.043	0.74

Por último, se combinaron las contribuciones cuantificadas en el paso anterior de acuerdo con las reglas de propagación de errores, obteniéndose así la incertidumbre combinada:

$$u(C_{A^-}) = \sqrt{\left(\frac{C_{A^-}}{C_{A^- - 0}}\right)^2 \cdot u_{\text{regresión}}^2 + \left(\frac{C_{A^-}}{V_i}\right)^2 \cdot u^2(V_i) + \left(\frac{C_{A^-}}{V_f}\right)^2 \cdot u^2(V_f)} \quad \text{ec. 5.4}$$

La incertidumbre expandida se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura  $K = 2$ .

En la Fig. 5.2 se han representado las contribuciones a la incertidumbre, en valor absoluto, para una medida de cada nivel de concentración de nitrito. Se observa que todas las contribuciones aumentan con la concentración, siendo la contribución más importante la debida a la línea de calibrado. Las contribuciones debidas a la dilución de la muestra son menos significativas.

Para el resto de aniones analizados en las distintas muestras de control, preparadas en las diferentes matrices sintéticas, se obtuvieron gráficas con hábitos similares para las

tres fuentes de error cuantificadas, que no se han incluido por brevedad. Sin embargo pueden ser consultadas en la Fig. A.II.3 del Anexo II.

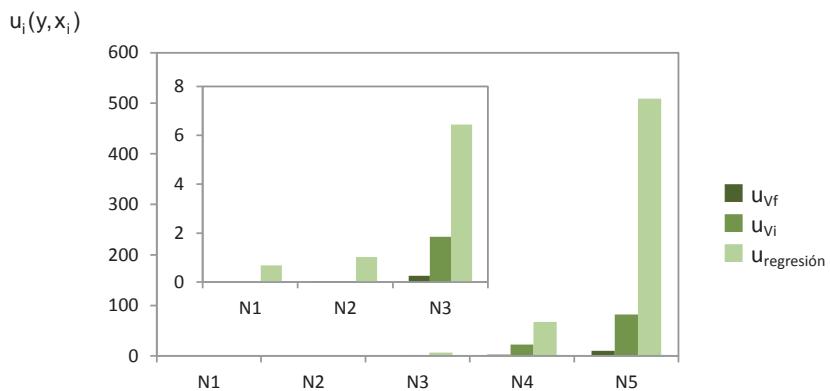


Fig. 5.2: Contribuciones a la incertidumbre en la concentración de nitrito según el modelo “bottom-up”

En la Tabla 5.4 se han recogido los intervalos de incertidumbre en valor relativo,  $\%l_A^-$ , para los valores promedio de concentración obtenidos de cada nivel.

Tabla 5.4: Intervalos de incertidumbre según el modelo “bottom-up” para cada anión

	$C_F^-$ (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_F^-$	$C_{Cl^-}$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{Cl^-}$	$C_{NO_2^-}$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{NO_2^-}$
N <sub>1</sub>	2.57	18 – 24	2.70	27 – 42	5.3	24 – 28
N <sub>2</sub>	13.2	3.5 – 6.9	13.4	6.2 – 13	24.7	4.3 – 9.0
N <sub>3</sub>	125.8	4.4 – 9.0	123.4	7.0 – 19	242	5.5 – 12
N <sub>4</sub>	1226	4.2 – 9.8	1224	7.2 – 20	2454	5.6 – 12
N <sub>5</sub>	6224	4.2 - 7.5	6121	6.3 - 12	12140	4.7 – 9.4

Tabla 5.4 (cont.): Intervalos de incertidumbre según el modelo “bottom-up” para cada anión

	$C_{Br^-}$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{Br^-}$	$C_{NO_3^-}$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{NO_3^-}$	$C_{PO_4^{3-}}$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{PO_4^{3-}}$	$C_{SO_4^{2-}}$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{SO_4^{2-}}$
N <sub>1</sub>	2.67	10 – 25	5.4	17- 36	4.07	9.2 – 32	5.5	16 – 28
N <sub>2</sub>	13.23	2.9 – 7.7	27.0	4.3 – 11	24.53	1.3 – 7.4	25.1	4.1 – 9.2
N <sub>3</sub>	124.8	3.8 – 8.5	249	5.4 - 12	250.9	2.3 – 10	246	5.2 – 13
N <sub>4</sub>	1229	3.3 – 9.1	2472	4.8 – 13	2452	1.8 – 10	2432	4.8 – 13
N <sub>5</sub>	6737	2.8 – 7.6	12379	4.1 - 12	12486	2.6 – 5.6	12297	3.9 – 8.9

La Fig. 5.3 muestra gráficamente la dependencia de la incertidumbre final estimada mediante este modelo con la concentración. Se han representado en escala logarítmica para facilitar la visualización de la relación incertidumbre-concentración.

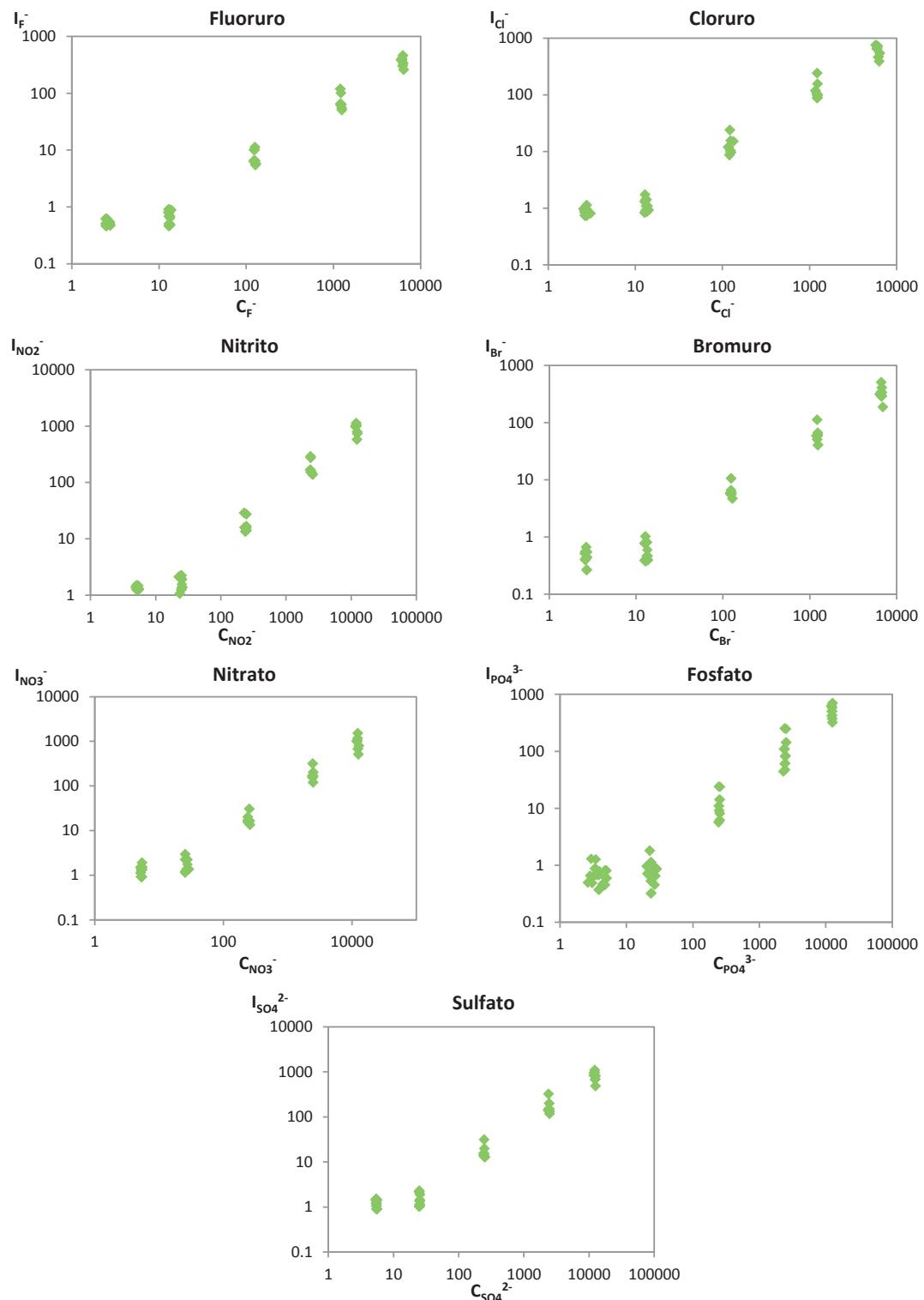


Fig. 5.3: Relaciones incertidumbre-concentración según el modelo “bottom-up” para las distintas determinaciones de aniones en cada muestra de control

Se puede observar que: (i) para los dos primeros niveles de concentración la incertidumbre, en valor absoluto, es muy similar, mientras que para los niveles de

concentración restantes aumenta proporcionalmente; (ii) la incertidumbre estimada, en valor relativo, es bastante más elevada para las muestras de control con la concentración más baja que para el resto de muestras de control, para las cuales se mantiene prácticamente constante; (iii) las variaciones obtenidas en la estimación de la incertidumbre, según este modelo, son debidas mayoritariamente al ajuste lineal y en menor medida a los volúmenes tomados durante el análisis; (iv) el efecto matriz no puede ser cuantificado con este modelo sin experimentos adicionales.

### 5.1.2. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

En primer lugar se especificó la función matemática que relaciona la concentración de fenoles con las magnitudes de las que depende. A esta ecuación se le añadió un factor de dilución,  $f_{dil}$ , cuando la concentración de analito en las muestras estaba fuera del rango de ensayo.

$$C_{\text{fenol}} = \frac{UA - a}{b} \cdot f_{\text{dil}} \quad \text{ec. 5.5}$$

Posteriormente se identificaron las posibles fuentes de error individuales que contribuyen a la incertidumbre total de la concentración de fenol, de acuerdo al conocimiento del método analítico. Para facilitar su visualización se recurrió a un diagrama de Ishikawa, mostrado en la Fig. 5.4. Se incluyeron como fuentes de error implícitas, a pesar de no aparecer en la expresión para el cálculo de la concentración, los volúmenes inicial y final empleados en la destilación y los volúmenes de los reactivos empleados.

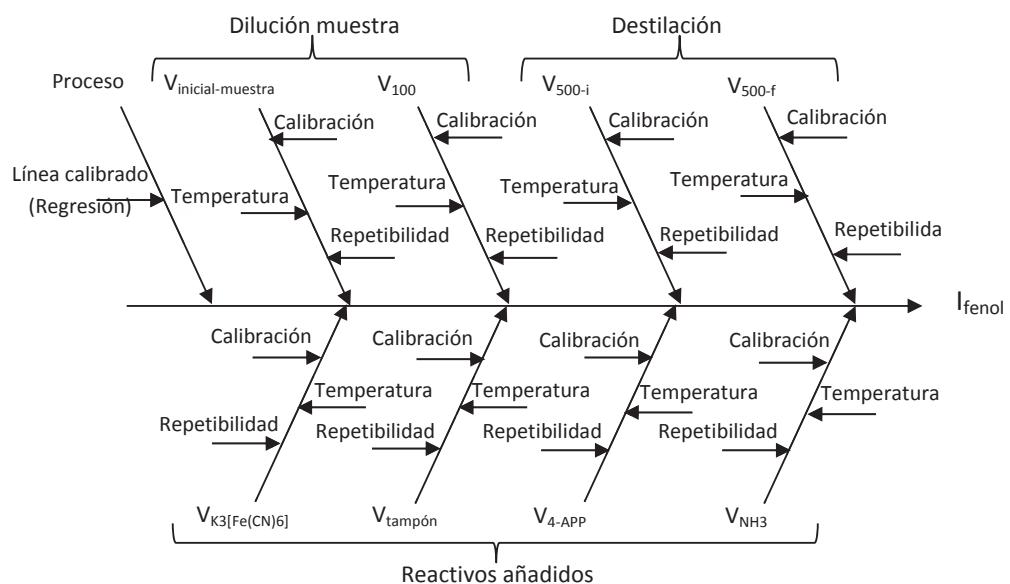


Fig. 5.4: Contribuciones a la incertidumbre de la concentración de fenol

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

---

A continuación se estimaron los valores de las componentes identificadas, expresadas como desviaciones estándar, mediante las expresiones recogidas en la Tabla 5.5

Tabla 5.5: Fuentes que contribuyen a la incertidumbre en la determinación de fenol y su cuantificación

Fuente de incertidumbre	Símbolo	Uds	Coeficiente de sensibilidad, $\partial X/\partial x_i$	Incertidumbre típica $u(x) = u_x$
Volúmenes $V_{\text{NH}_3}$ $V_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]}$ $V_{\text{Tampón}}$ $V_{\text{4-AAP}}$ $V_{500-i}$ $V_{500-f}$ $V_{100}$ $V_{\text{inicial-muestra}}$	$u(V_{\text{NH}_3})$ $u(V_{\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]})$ $u(V_{\text{Tampón}})$ $u(V_{\text{4-AAP}})$ $u(V_{500-i})$ $u(V_{500-f})$ $u(V_{100})$ $u(V_{\text{inicial-muestra}})$		$mL$	$\frac{C_{\text{fenol}}}{V_x}$
				$u(V) = \sqrt{u_{\text{cal}}^2 + u_{\text{rep}}^2 + u_{T^{\circ}}^2}$
Calibración	$u_{\text{cal}}$	$mL$	1	$u_{\text{cal}} = \frac{l_{\text{vol}}}{K}$
Repetibilidad	$u_{\text{rep}}$	$mL$	1	$u_{\text{rep}} = s$
Temperatura	$u_{T^{\circ}}$	$mL$	1	$u_T = \frac{V_N \cdot \Delta T \cdot 2.1 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3}}$
Proceso	$u_{\text{regresión}}$	$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1	$u(x_0, y) = \frac{s_e}{b} \cdot \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \cdot \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$

Como en el caso de la determinación de aniones se ha comprobado que  $u(x_0, x_i)$  es despreciable frente a  $u(x_0, y)$ . Los resultados numéricos obtenidos se resumen en la Tabla 5.6.

Tabla 5.6: Verificación de la aproximación  $u(x_0, x_i) \ll u(x_0, y)$

$x_0 = C_{\text{fenol-0}}$ ( $\text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$x_i \pm l$ ( $k=2$ ) ( $\text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$u(x_0, x_i) \approx u(x_i)/n$ ( $\text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	$u(x_0, y)$ ( $\text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$ )
0.5853	$0.498 \pm 0.055$	0.0046	0.043
0.9266	$0.996 \pm 0.056$	0.0046	0.035
2.560	$2.993 \pm 0.058$	0.0048	0.033
3.926	$3.986 \pm 0.060$	0.0050	0.033
4.837	$4.981 \pm 0.062$	0.0052	0.057

Una vez estimadas las contribuciones se combinaron de acuerdo con las reglas de propagación de errores obteniéndose así la incertidumbre combinada:

$$u(C_{\text{fenol}}) = \sqrt{\left( \frac{C_{\text{fenol}}}{C_{\text{fenol}-0}} \right)^2 \cdot u^2_{\text{regresión}} + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{\text{inicial-muestra}}} \right)^2 \cdot u^2(V_{\text{inicial-muestra}}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{100}} \right)^2 \cdot u^2(V_{100}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{500-f}} \right)^2 \cdot u^2(V_{500-f}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{500-i}} \right)^2 \cdot u^2(V_{500-i}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{\text{NH}_3}} \right)^2 \cdot u^2(V_{\text{NH}_3}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{\text{tampón}}} \right)^2 \cdot u^2(V_{\text{tampón}}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]}} \right)^2 \cdot u^2(V_{K_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]}) + \left( \frac{C_{\text{fenol}}}{V_{4\text{AAP}}} \right)^2 \cdot u^2(V_{4\text{AAP}})} \quad \text{ec. 5.6}$$

Por último, la incertidumbre combinada se multiplicó por el factor de cobertura K=2 para obtener la incertidumbre expandida.

En la Fig. 5.5 se han representado las contribuciones a la incertidumbre, en valor absoluto, para una medida de cada nivel de concentración, comprobándose que todas ellas aumentan con la concentración. De todas las contribuciones la que más afecta a la incertidumbre total es la debida a la línea de calibrado, mientras que la debida a la toma de volumen de muestra afecta mínimamente cuando apenas hay que diluir el destilado, y en mayor medida cuando la dilución necesaria es mayor. El error cometido para el resto de volúmenes es significativamente menor pero no despreciable.

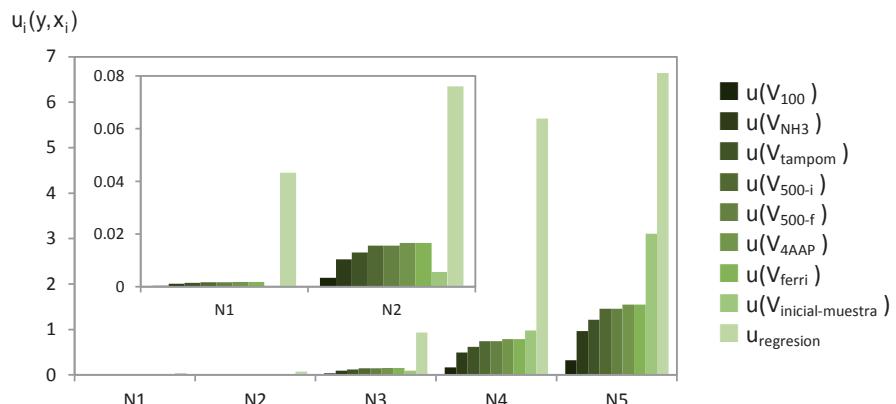


Fig. 5.5: Contribuciones a la incertidumbre final de las concentraciones de fenol

En la Tabla A.II.29 del Anexo II se muestran las incertidumbres estimadas para cada una de las determinaciones de las muestras de control realizadas por uno de los analistas durante los experimentos de validación, según el modelo “bottom-up”. Los resultados obtenidos se han representado gráficamente en la Fig. 5.6 empleando escala logarítmica para facilitar su visualización. En la Tabla 5.7 se han recogido los intervalos de incertidumbre en valor relativo,  $\%l_{\text{fenol}}$ , para los valores promedio de concentración obtenidos de cada nivel.

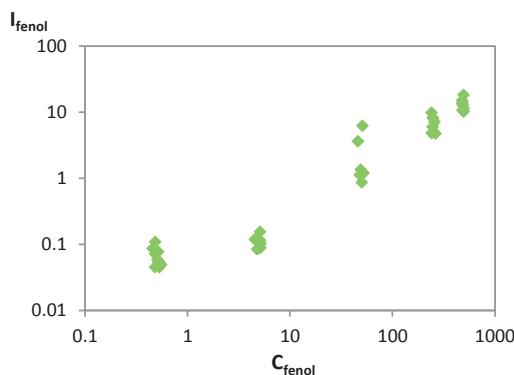


Fig. 5.6: Relación incertidumbre-concentración según el modelo “bottom-up” para la determinación de fenol

Tabla 5.7: Intervalos de incertidumbre según el modelo “bottom-up” para fenoles

$C_{\text{fenol}}$ ( $\text{mg fenol-L}^{-1}$ )	$\%l_{\text{fenol}}$
0.505	8.4 - 22
4.97	1.7 - 3.1
49.5	1.7 - 12
250	1.8 - 4.1
488	2.1 - 3.7

Se observa que: (i) para los dos primeros niveles de concentración la incertidumbre, en valor absoluto, es similar, mientras que para los niveles de concentración restantes aumenta proporcionalmente; (ii) la incertidumbre estimada, en valor relativo, es bastante más elevada para las muestras de control con la concentración más baja, que para el resto de muestras de control para las cuales se mantiene prácticamente constante; (iii) las variaciones obtenidas en la incertidumbre, estimadas según el modelo “bottom-up”, son debidas mayoritariamente al ajuste lineal y en menor medida a los volúmenes empleados durante el análisis.

### 5.1.3. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS

En primer lugar se especificó la ecuación que relaciona la concentración de aceites y grasas con las magnitudes de las que depende:

$$C_{A&G} = \frac{P_f - P_i - (P_{f-B} - P_{i-B})}{V_M} \cdot 10^6 \quad \text{ec. 5.7}$$

Posteriormente se identificaron las posibles fuentes de error del método analítico que contribuyen a la incertidumbre total de la concentración de aceites y grasas. Dichas

contribuciones se pueden visualizar más fácilmente en el diagrama de Ishikawa que se muestra a continuación:

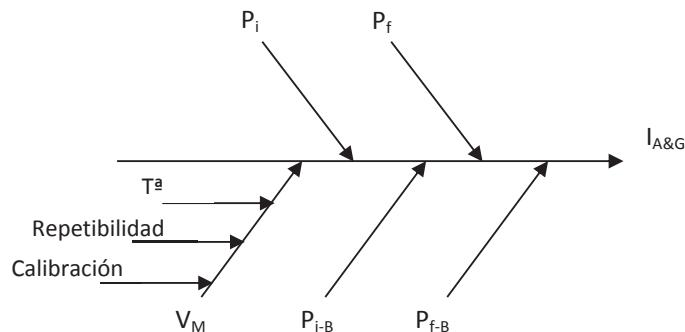


Fig. 5.7: Contribuciones a la incertidumbre de la concentración de A&G

Las contribuciones debidas a las medidas de masa están reflejadas en la Fig. 3.8, que muestra el diagrama de Ishikawa de contribuciones a la incertidumbre de la balanza.

A continuación se estimaron los valores de las componentes identificadas, expresadas como desviaciones estándar, mediante las expresiones recogidas en la Tabla 5.8:

Tabla 5.8: Listado de fuentes de incertidumbre en la determinación de A&G y su cuantificación

Fuente de incertidumbre	Símbolo	Uds	Coeficiente de sensibilidad, $\partial X / \partial x_i$	Incertidumbre típica $u(x) = u_x$
Volumen: $V_M$	$u(V_M)$	mL	$\frac{C_{AG}}{V_M}$	$u(V_M) = \sqrt{u_{cal}^2 + u_{rep}^2 + u_{T^a}^2}$
Calibración	$u_{cal}$	mL	1	$u_{cal} = \frac{I_{vol}}{K}$
Repetibilidad	$u_{rep}$	mL	1	$u_{rep} = s$
Temperatura	$u_{T^a}$	mL	1	$u_T = \frac{V_N \cdot \Delta T \cdot 2.1 \cdot 10^{-4}}{\sqrt{3}}$
Masa: $P_f$ , $P_i$ , $P_{f-B}$ , $P_{i-B}$	$u_p = u_{bal}$	mg	$\frac{1}{V_M}$	$u_{bal} = \frac{I_{bal}}{K}$

Finalmente, se combinaron las contribuciones estimadas en el paso anterior de acuerdo con las reglas de propagación de errores, obteniéndose así la siguiente incertidumbre combinada:

$$u(C_{A\&G}) = \sqrt{4 \cdot \left( \frac{u_{bal} \cdot 10^6}{V_M} \right)^2 + \left( \frac{C_{A\&G} \cdot u(V_M)}{V_M} \right)^2} \quad ec. 5.8$$

La incertidumbre expandida se obtuvo multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura K=2.

En la Fig. 5.8 se ha representado para un análisis de cada nivel de concentración de aceites y grasas las dos únicas contribuciones a la incertidumbre, en valor absoluto: la debida al volumen de muestra tomado,  $V_M$ , y la debida a las medidas de masa realizadas durante el análisis,  $u_{bal}$ , (se ha multiplicado por cuatro, por las cuatro medidas que se realizan durante el análisis:  $P_f$ ,  $P_i$ ,  $P_{f-B}$ ,  $P_{i-B}$ ). Se ha comprobado que todas ellas siguen una tendencia de crecimiento frente al aumento de la concentración. Por otro lado, a bajas concentraciones la contribución que más afecta a la incertidumbre total es la debida a la medida de la masa y la que menos afecta es la debida al volumen de la muestra. Esta tendencia se invierte a concentraciones altas.

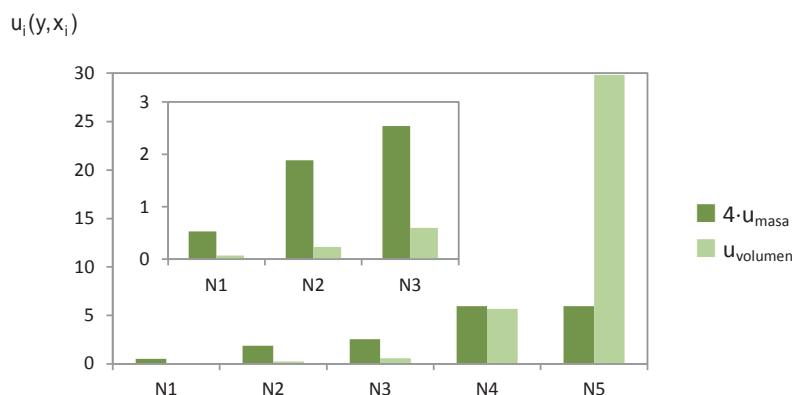


Fig. 5.8: Contribuciones a la incertidumbre en la concentración de aceites y grasas según el modelo “bottom-up”

Las incertidumbres estimadas según el modelo “bottom-up”, para cada una de las muestras de control analizadas durante la validación, se han recogido en la Tabla A.II.30 del Anexo II y se han representado gráficamente en la Fig. 5.9.

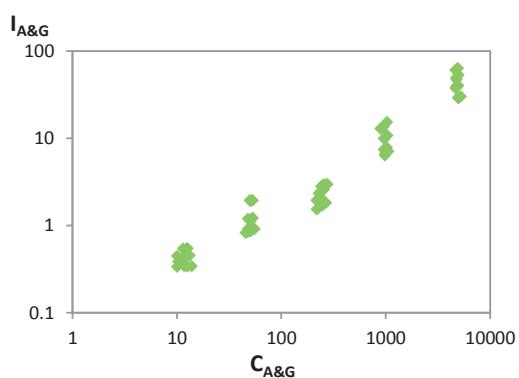


Fig. 5.9: Relación incertidumbre-concentración según el modelo “bottom-up” para la determinación de A&G

En la Tabla 5.9 se resumen los intervalos de incertidumbre en valor relativo,  $\%l_{A&G}$ , para los valores promedio de concentración obtenidos de cada nivel.

Tabla 5.9 Intervalos de incertidumbre según el modelo “bottom-up” para A&G

$C_{A&G}$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	$\%l_{A&G}$
11.8	2.9-4.6
50.3	1.6-3.8
243	0.63-1.2
991	0.64-1.6
4854	0.60-1.3

Se puede observar que: (i) la incertidumbre, en valor absoluto, aumenta proporcionalmente a medida que aumenta la concentración; (ii) la incertidumbre estimada, en valor relativo, es ligeramente más elevada para las muestras de control con la concentración más baja que para el resto de niveles de concentración, para los cuales se mantiene prácticamente constante; (iii) el volumen de muestra tomado y la medida de la masa de los matraces son las únicas contribuciones a la incertidumbre según este modelo.

#### 5.1.4. ANÁLISIS DEL MODELO “BOTTOM-UP”

La incertidumbre de medida estimada según el modelo “bottom-up” es única para cada resultado; esto supone la realización de los cálculos descritos anteriormente para cada análisis realizado. La complejidad de estos cálculos se incrementa con el número de operaciones involucradas en el análisis.

Además, de las ecuaciones empleadas para estimar la incertidumbre combinada se desprende que contribuciones como el sesgo, la reproducibilidad, el efecto matriz... no están contempladas en este modelo. Algunas de estas contribuciones pueden llegar a ser significativas; por ejemplo, el sesgo y la falta de reproducibilidad son mayores en aquellos métodos que incluyen etapas laboriosas de preparación de muestra, como la determinación de fenoles o de aceites y grasas. Estas circunstancias pueden conducir a una subestimación de la incertidumbre final. En el caso de considerar significativas estas fuentes de incertidumbre se requeriría la realización de experimentos adicionales para su cuantificación.

En la Fig. 5.10 se han representado las componentes de incertidumbre para los métodos de aniones, fenoles y A&G como porcentajes de incertidumbre relativa. Se puede observar que para determinaciones que necesiten calibrado instrumental, (a) y (b), la mayor contribución es la debida a la calibración instrumental; no obstante, cuando el método exige mayor preparación de muestra, como en el caso de la determinación de fenol, (b), el valor de las otras contribuciones se incrementa. Para

determinaciones sin calibrado instrumental como es la determinación de A&G, (c), el error debido a la determinación de masa es tanto mayor cuanto menor es la cantidad de analito en la muestra debido a que, a bajas concentraciones, la cantidad de masa medida es próxima a la mínima cantidad que puede pesar la balanza; por el contrario, para niveles altos de concentración, la contribución debida a la incertidumbre del volumen es mayoritaria.

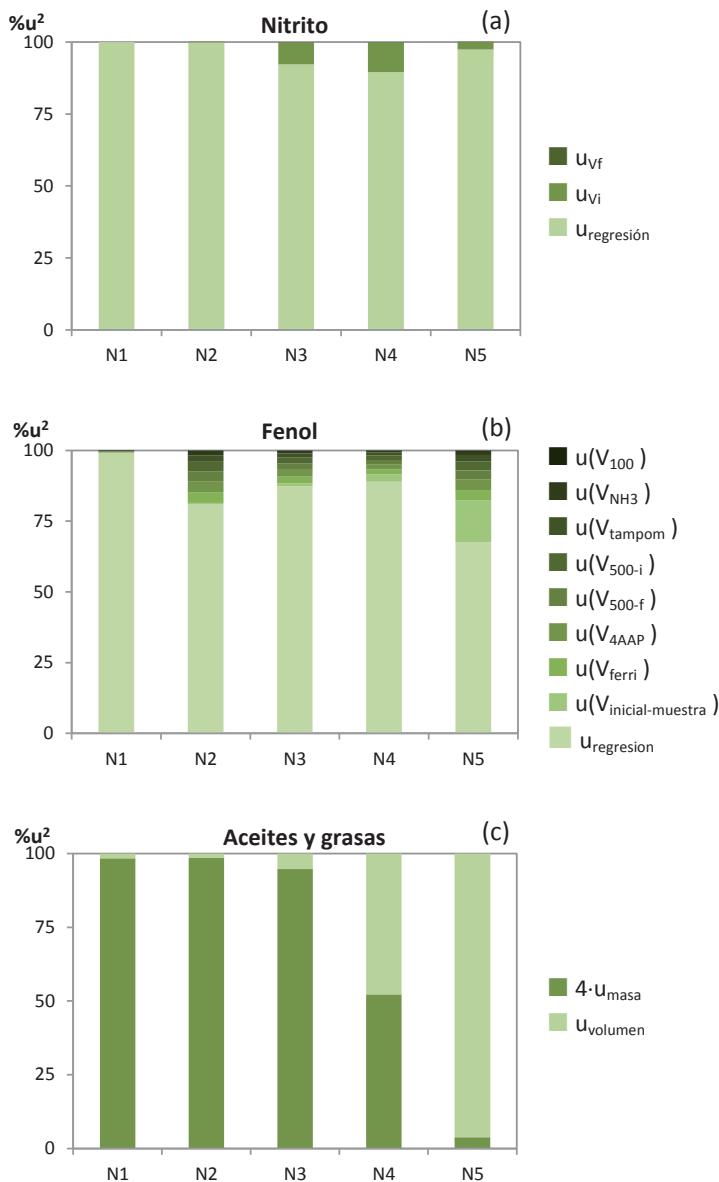


Fig. 5.10: Contribuciones a la incertidumbre en valor relativo para la determinación de (a) aniones, (b) fenoles y (c) A&G estimadas siguiendo el modelo “bottom-up”

Por otra parte, este modelo obliga al analista a comprender los detalles del procedimiento de ensayo en cuestión y resulta, por tanto, una herramienta muy útil

para identificar aquellos parámetros o etapas del método de ensayo que contribuyen mayoritariamente a la incertidumbre total, ofreciendo así la posibilidad de mejorarlos. En los tres métodos propuestos se puede actuar de la siguiente manera para minimizar las contribuciones:

- ▲ Para el caso de metodologías que incluyan calibración instrumental, la contribución debida a la regresión se puede disminuir de varias formas: reducir la varianza de los residuales, aumentar el número de puntos de la línea de calibrado o analizar las muestras en el centro de la línea de calibrado donde el error es menor. En el caso de la determinación de aniones, dado que las líneas de calibrado siguen una tendencia ligeramente curva, como se vio en el estudio de la linealidad en el capítulo anterior, otras opciones serían acortar el rango de calibración o bien emplear un método de regresión no lineal.
- ▲ Para métodos de ensayo que incluyan la medida de volúmenes, emplear material volumétrico con incertidumbre menor.
- ▲ En el caso de la medida de masas, emplear balanzas cuyo rango de trabajo se ajuste a la magnitud de la masa que se va a medir, evitando medir masas próximas a la resolución de la balanza.

## 5.2. MODELO “TOP-DOWN”

### 5.2.1. APPLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE ANIONES

Al igual que en modelo anterior, en este apartado solo se describen los resultados obtenidos para el anión nitrito. En el Anexo II están recogidos todos los resultados numéricos obtenidos al aplicar el modelo “top-down” a los datos analíticos obtenidos durante la validación del método, por ambos analistas, para las concentraciones del resto de los aniones en cada una de las muestras de control.

Se aplicaron, en primer lugar, pruebas de consistencia gráficas ( $h$  y  $k$  de Mandel) y numéricas (Grubbs y Cochran) a los ocho resultados analíticos (4 días  $\times$  2 analistas) de las cinco muestras de control de nitrito medidas por duplicado. Los valores de alarma para un nivel del 5% de confianza y de aviso para un nivel de confianza del 1% para los estadísticos de ambos test quedan recogidos en la Tabla 5.10:

Tabla 5.10: Valores críticos de los estadísticos para 8 muestras y 2 réplicas

	$h$	$k$	G	C
Alarma ( $\alpha=0.01$ )	$\pm 2.06$	2.25	2.274	0.794
Aviso ( $\alpha=0.05$ )	$\pm 1.75$	1.88	2.126	0.727

En la Fig. 5.11 se han representado los valores de los estadísticos  $h$  y  $k$  de Mandel calculados para los resultados obtenidos para cada nivel de concentración. Los resultados obtenidos al aplicar el test de Grubbs y Cochran están recogidos en la Tabla 5.11.

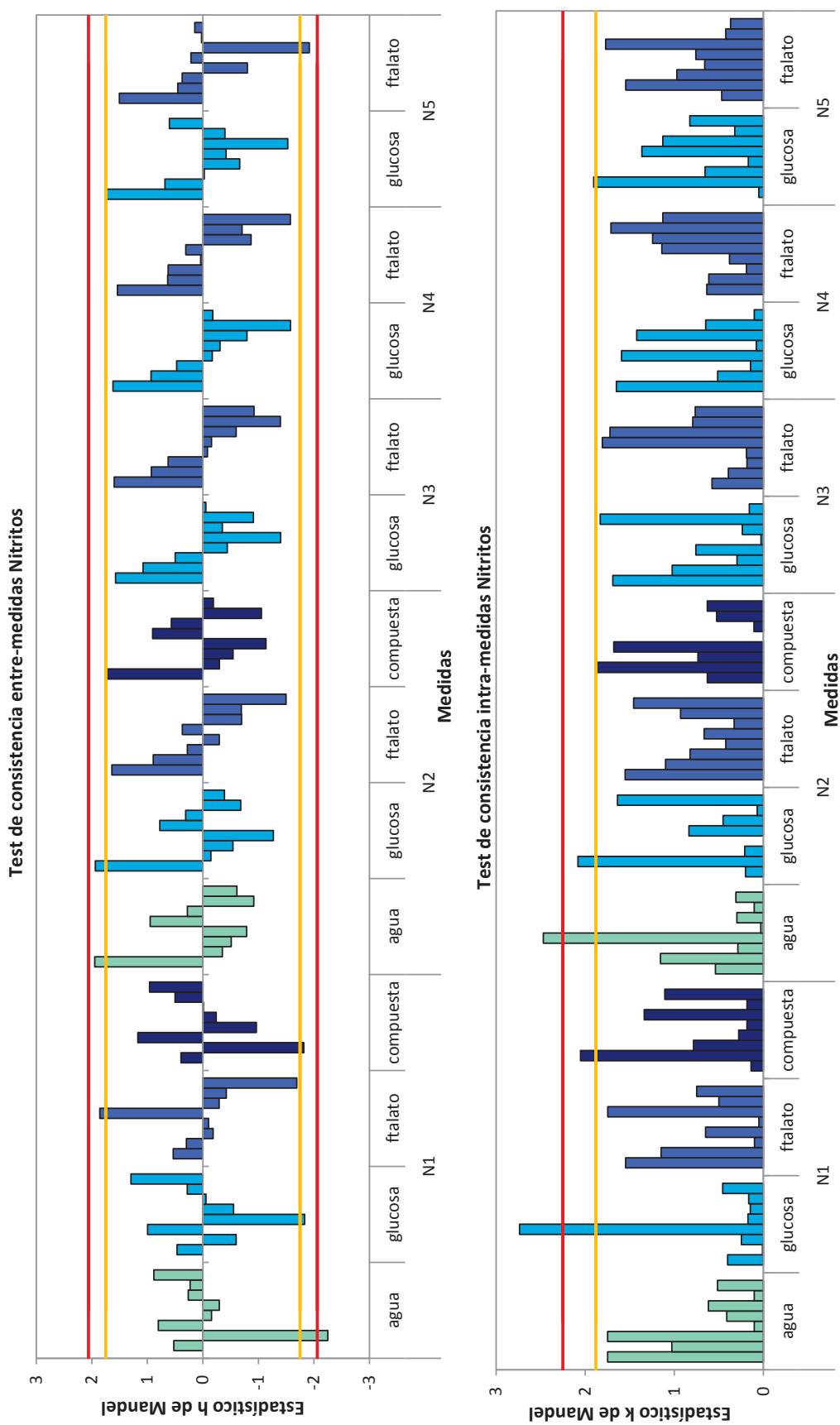


Fig. 5.11: Aplicación de los test de consistencia h y k de Mandel a los resultados de nitrito

Tabla 5.11: Resultados de los test de consistencia de Grubbs y Cochran aplicados a las medidas de nitrato

	$N_1$ agua	$N_{1\text{glucosa}}$	$N_{1\text{ftalato}}$	$N_{1\text{compues.}}$	$N_{2\text{agua}}$	$N_{2\text{glucosa}}$	$N_{2\text{ftalato}}$	$N_{2\text{compues.}}$	$N_{3\text{glucosa}}$	$N_{3\text{ftalato}}$	$N_{4\text{glucosa}}$	$N_{4\text{ftalato}}$	$N_{5\text{glucosa}}$	$N_{5\text{ftalato}}$
$G_p$ cal	0.882	1.295	1.859	1.172	1.949	1.938	1.640	1.748	1.574	1.598	1.621	1.541	1.747	1.506
Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
$G_1$ cal	2.252	1.834	1.692	1.821	0.917	1.271	1.498	1.131	1.400	1.396	1.578	1.575	1.53	1.918
Resultado	Extraño (2)	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
$C_{\text{cal}}$	0.382	0.936	0.381	0.529	0.763	0.541	0.301	0.466	0.419	0.408	0.340	0.365	0.453	0.392
Resultado	Correcto	Anómalo (4)	Correcto	Correcto	Extraño (4)	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto

Tabla 5.12: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{\text{NO}_2}$  según el modelo “top-down”

	$N_1$ agua	$N_{1\text{glucosa}}$	$N_{1\text{ftalato}}$	$N_{1\text{compuesta}}$	$N_{2\text{agua}}$	$N_{2\text{glucosa}}$	$N_{2\text{ftalato}}$	$N_{2\text{compuesta}}$	$N_{3\text{glucosa}}$	$N_{3\text{ftalato}}$	$N_{4\text{glucosa}}$	$N_{4\text{ftalato}}$	$N_{5\text{glucosa}}$	$N_{5\text{ftalato}}$
$\mu$	5.28	5.28	5.11	5.28	25.32	25.32	25.4	25.3	251.7	251	2480	2610	12470	12520
$\bar{x}$	5.41	5.39	5.16	5.48	25.30	25.25	24.1	25.5	249.1	240	2420	2530	12190	12370
$\delta$	0.1275	0.1079	0.05788	0.2009	0.06925	1.351	0.2075	2.621	11.68	61.35	72.48	280.9	149.3	
$\delta_{\text{crítico}}$	0.1503	0.1304	0.2101	0.1133	0.8254	0.9103	1.758	1.098	8.316	20.91	109.9	169.9	448.4	660.5
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	FALSO	SESGO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$S_r$	0.006878	0.07750	0.01417	0.03067	0.1237	0.08122	0.06700	0.06741	0.8978	1.917	24.04	14.89	117.8	99.84
$S_L$	0.07499	0.03530	0.1046	0.05234	0.4034	0.4515	0.8779	0.5467	4.109	10.37	52.26	84.30	208.2	322.6
$I_\mu$	0.06579	0.06566	0.06579	0.1606	0.1315	0.1606	0.7543	0.753	7.572	7.950	37.82	37.97		
$S_\delta$	0.02657	0.02305	0.03714	0.02003	0.1459	0.1609	0.3108	0.1940	1.470	3.697	19.43	30.04	79.27	116.8
$U_{\text{met}}$	0.04228	0.04017	0.04891	0.03851	0.1666	0.1798	0.3177	0.2100	1.518	3.716	19.80	30.30	81.50	118.3
$I_{\text{NO}_2}$	0.17	0.15	0.23	0.14	0.89	0.98	1.9	1.2	8.9	22	120	180	480	700
$\% I_{\text{NO}_2}$	3.3	2.9	4.5	2.6	3.5	3.9	7.4	4.6	3.5	8.8	4.7	6.9	3.8	5.6

Se observa un número muy escaso de medidas que no satisfacen los test de consistencia. Los resultados de las pruebas de Grubbs y  $h$  de Mandel coinciden en que apenas hay valores medios anómalos, con la sola excepción de la segunda media del nivel  $N_1$  en la matriz agua, identificada con el test  $h$  de Mandel. El test de Grubbs, en cambio, detecta esta misma media como extraña. El test  $k$  de Mandel, por su parte, solo ha identificado variaciones significativas entre las réplicas en dos ocasiones, la cuarta medida del nivel  $N_2$  en la matriz agua y la cuarta medida del nivel  $N_1$  en la matriz glucosa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por el test de Cochran que identifica la primera medida como extraña y la segunda medida como anómala.

Una vez detectados los valores anómalos con los test numéricos de Cochran y Grubbs, el proceso se debería repetir de forma iterativa hasta que no resulten valores anómalos; este proceso es más rápido y fácil de visualizar con las pruebas gráficas  $h$  y  $k$  de Mandel.

Los resultados de la aplicación de los test de consistencia de valores para el resto de aniones están recogidos en el *Anexo II*: los gráficos de la aplicación de los test  $h$  y  $k$  de Mandel en la Fig. A.II.4 y los resultados de la aplicación de los test de Grubbs y Cochran en las Tablas A.II.31 a A.II.36.

Si se evalúan los resultados de los test de Mandel de forma conjunta para los siete aniones, solo el 1.5% de las medidas presentan resultados medios anómalos al superar su valor  $h$  el valor crítico, mientras que el 3.3% de las medidas replicadas fueron anómalas por tener un valor  $k$  superior al crítico, indicando una variabilidad anormalmente alta. No obstante, se mantuvieron todos los valores para calcular la incertidumbre según el método “top-down” a fin de evitar subestimarla.

A partir de todos los resultados experimentales, y aplicando las ecuaciones para el cálculo de la incertidumbre según el modelo “top-down” indicadas en la Tabla 5.1, se cuantificaron cada una de las componentes de error intermedias y la incertidumbre total. Los resultados obtenidos para el anión nitrito están reflejados en la Tabla 5.12. Se tuvo en cuenta la componente del sesgo para todos los niveles de concentración, a pesar de ser únicamente significativa para el nivel  $N_{1\text{compuesta}}$ , para evitar subestimar la incertidumbre final. De acuerdo a los resultados obtenidos, el valor relativo de la incertidumbre estimada es prácticamente constante para todos los niveles.

Para el resto de aniones los resultados de incertidumbre obtenidos están recogidos en las Tablas A.II.37 a A.II.42 del *Anexo II*.

En la Fig. 5.12 se ha representado la incertidumbre estimada mediante el modelo “top-down” frente a la concentración real, para cada uno de los aniones estudiados y en cada matriz ensayada. Al igual que en el capítulo anterior, se han representado gráficamente en escala logarítmica para facilitar su visualización. Se aprecia una dependencia aproximadamente lineal entre la incertidumbre y la concentración que justifica la incertidumbre relativa constante hallada para todo el rango de concentración.

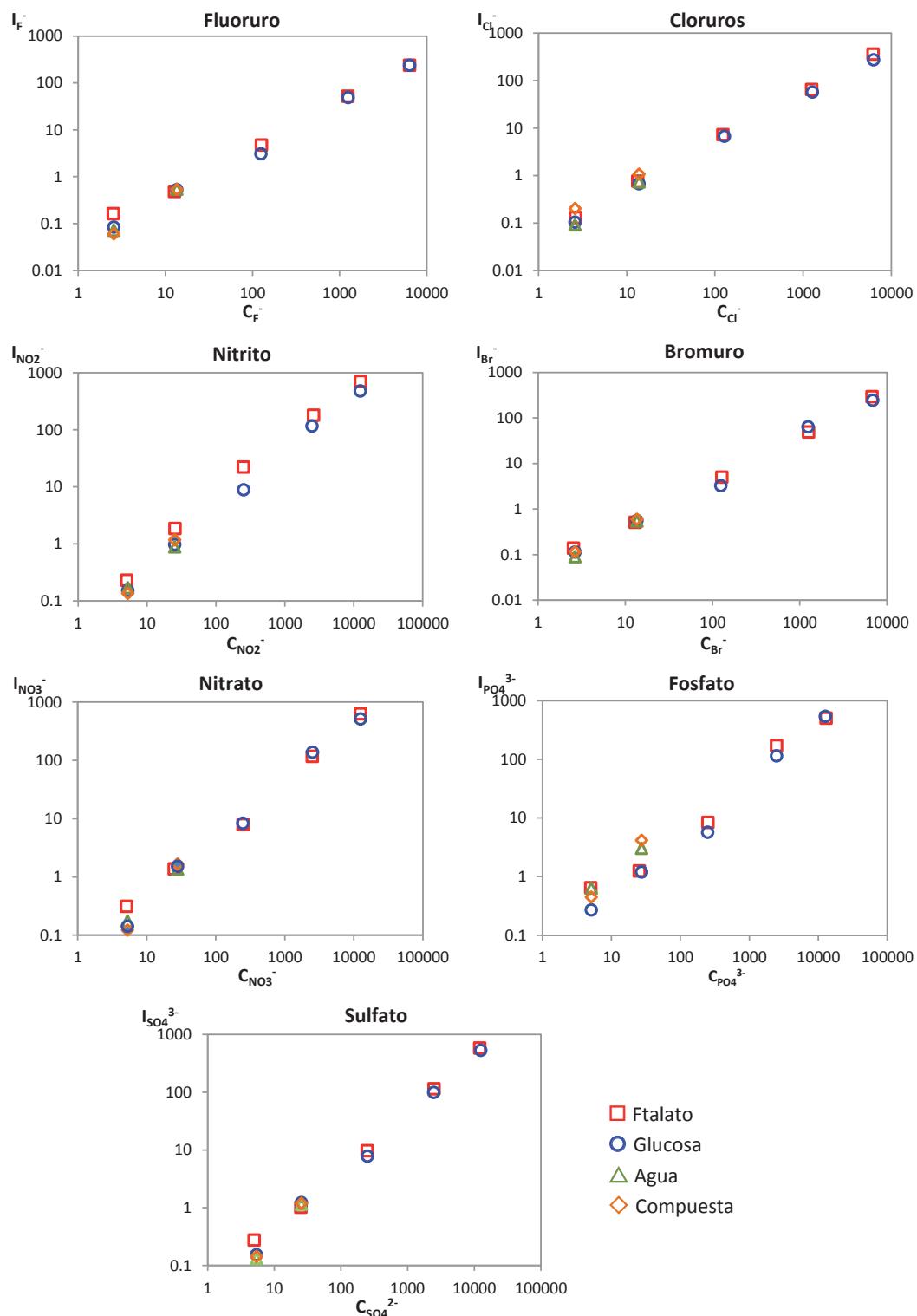


Fig. 5.12: Relación incertidumbre-concentración según el modelo “top-down” para cada anión

A bajos niveles de concentración se observa mayor variabilidad en la incertidumbre estimada para las diferentes matrices analíticas estudiadas; la principal causa es

probablemente la mayor contribución debida a la imprecisión que aumenta con la complejidad de las matrices de las muestras. Este efecto es particularmente notable en el caso de la matriz sintética ftalato y para ciertos analitos como nitrito o fluoruro.

Se han representado en la Fig. 5.13 las distintas contribuciones a la incertidumbre de acuerdo al modelo “top-down”. En ellas se puede apreciar que la contribución que más afecta a la incertidumbre total es la debida a la reproducibilidad intralaboratorio, mientras que las debidas a la repetibilidad y al sesgo contribuyen en menor medida pero son del mismo orden de magnitud. La falta de trazabilidad contribuye de forma importante a concentraciones bajas pero se hace mínima a altas concentraciones. También se observa que, para la mayoría de los niveles, las contribuciones debidas a la reproducibilidad intralaboratorio y sesgo aumentan a medida que aumenta la complejidad de la matriz. El efecto de la matriz analítica sobre la incertidumbre no pudo ser evaluado mediante el modelo “bottom-up”.

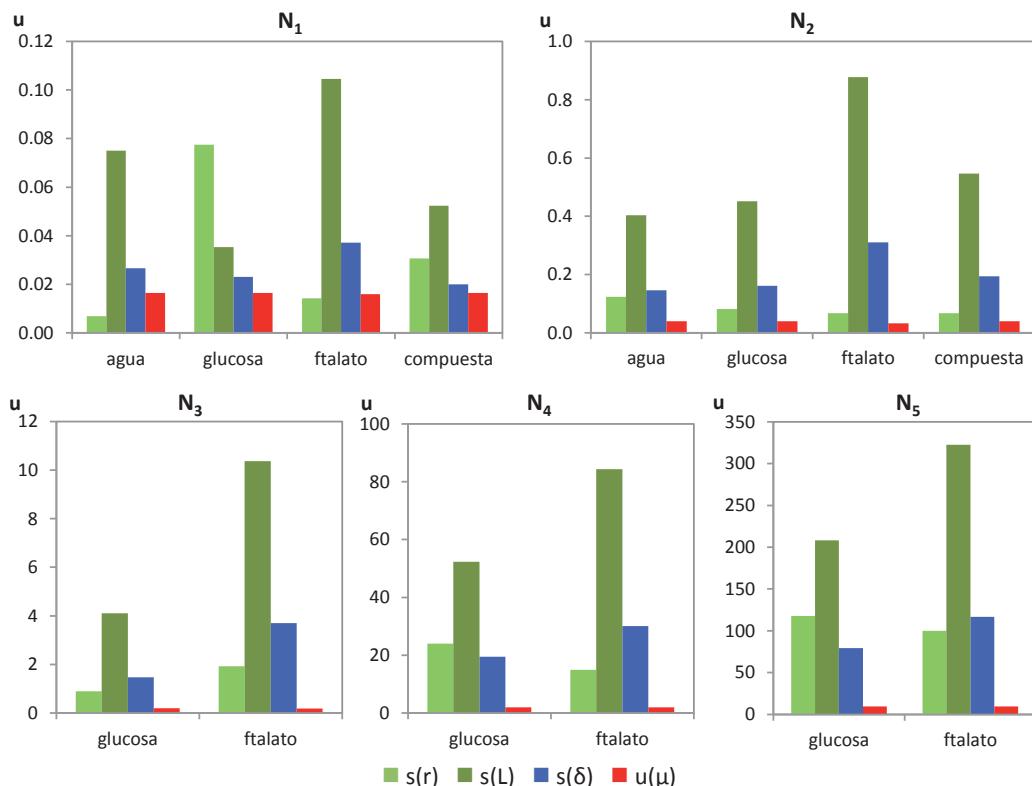


Fig. 5.13: Contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de nitrito expresadas como incertidumbres típicas, según el modelo “top-down”

### 5.2.2. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

Se aplicaron pruebas de consistencia, tanto gráficas,  $h$  y  $k$  de Mandel, como numéricas, Grubbs y Cochran a los dieciséis resultados analíticos ( $4$  días  $\times$   $2$  analistas  $\times$   $2$  destilaciones) duplicados de las muestras de control. En la Tabla 5.13 quedan recogidos los valores para los estadísticos de aviso y de alarma:

Tabla 5.13: Valores críticos de los estadísticos para 16 muestras y 2 réplicas

	<i>h</i>	<i>k</i>	G	C
Alarma ( $\alpha=0.01$ )	$\pm 2.33$	2.42	2.852	0.553
Aviso ( $\alpha=0.05$ )	$\pm 1.86$	1.93	2.585	0.452

En la Fig. 5.14 se han representado los valores de los estadísticos *h* y *k* de Mandel calculados para los dieciséis resultados analíticos obtenidos para cada nivel de concentración. Los resultados obtenidos de la aplicación de los test de Grubbs y Cochran se han recogido en la Tabla 5.14.

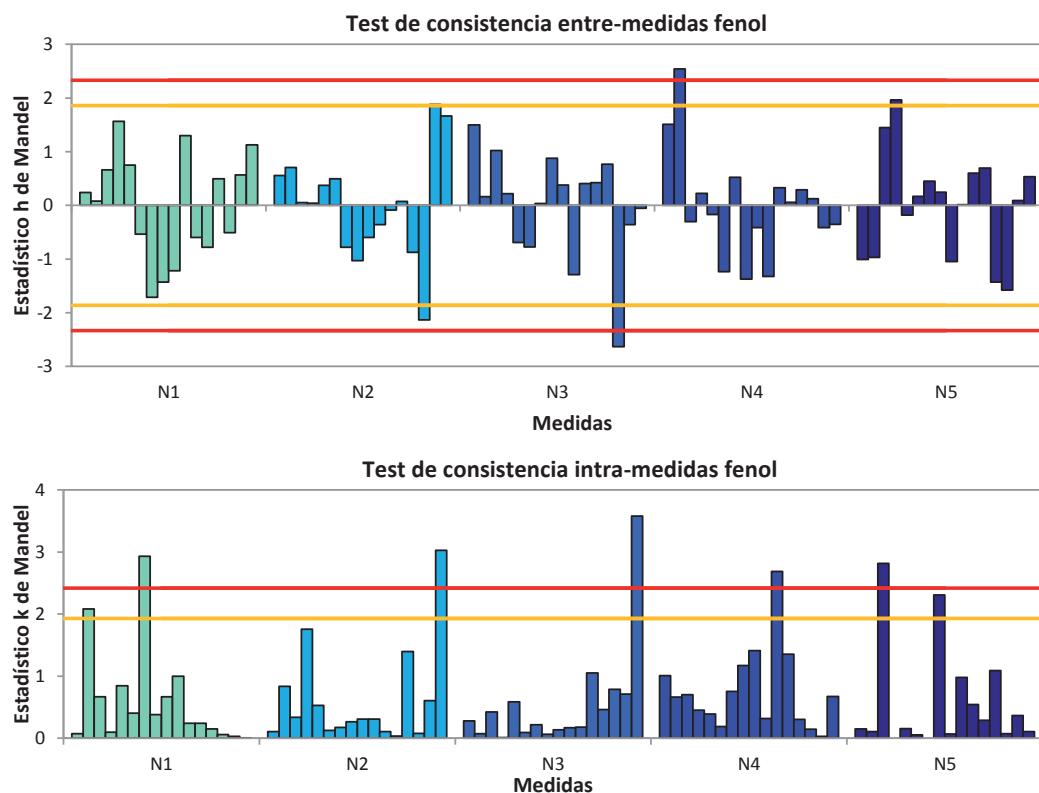
Fig. 5.14. Aplicación de los test de consistencia *h* y *k* de Mandel a los resultados de fenoles

Tabla 5.14: Resultados de los tests de consistencia de Grubbs y Cochran aplicados a las medidas de fenoles

$N_i$	Test de Grubbs (entre-medidas)				Test de Cochran (intra-medidas)	
	$G_p$	Resultado	$G_1$	Resultado	$C_{\text{calc}}$	Resultado
$N_1$	1.565	Correcto	1.713	Correcto	0.537	Extraño (7)
$N_2$	1.882	Correcto	2.133	Correcto	0.572	Anómalo (16)
$N_3$	1.308	Correcto	2.183	Correcto	0.800	Anómalo (16)
$N_4$	2.539	Correcto	1.371	Correcto	0.452	Correcto
$N_5$	1.963	Correcto	1.577	Correcto	0.495	Extraño (3)

Los resultados obtenidos al aplicar el test  $h$  de Mandel indican que solo hay diferencias significativas en dos de las medias obtenidas para niveles de concentración  $N_3$  y  $N_4$ , respectivamente. Por el contrario, los resultados del test de Grubbs no detectan ningún valor medio anómalo. Cuando se aplica el test  $k$  de Mandel se encuentran diferencias significativas entre un par de réplicas en cada nivel de concentración. El test de Cochran coincide en los mismos valores anómalos de los niveles del  $N_2$  y  $N_3$ , considera los valores de los niveles  $N_1$  y  $N_5$  extraños y no encuentra diferencias significativas en el nivel  $N_4$ .

Si se evalúan los resultados de los test de Mandel de forma conjunta para todos los datos analíticos de fenol, solo el 2.5% de las medidas presentan resultados medios anómalos al superar su valor  $h$  el valor crítico, mientras que el 6.3% de las medidas replicadas fueron anómalas por tener un valor  $k$  superior al crítico, indicando una variabilidad anormalmente alta. No obstante, se mantuvieron todos los valores para calcular la incertidumbre según el método “top-down” a fin de evitar subestimarla.

A partir de todos los resultados experimentales, y aplicando las ecuaciones para el cálculo de la incertidumbre según el modelo “top-down” indicadas en la Tabla 5.1, se cuantificaron cada una de las componentes de error intermedias y la incertidumbre total. Se tuvo en cuenta la componente del sesgo para todos los niveles de concentración, a pesar de no ser significativa, para evitar subestimar la incertidumbre final. Los resultados de incertidumbre calculados se muestran en la Tabla 5.15, en la que se puede comprobar que la incertidumbre relativa disminuye con el aumento de concentración. Por último, en la Fig. 5.15 se ha representado gráficamente, en escala logarítmica, la incertidumbre obtenida mediante este modelo “top-down” frente a la concentración de fenol verdadera para cada nivel de concentración ensayado.

Tabla 5.15: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{\text{fenoles}}$  según el modelo “top-down”

	$N_1$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5$
$\mu$	0.501	5.02	50.7	250	500
$\bar{x}$	0.502	5.02	50.0	249	497
$\delta$	9.643E-04	7.685E-04	0.6733	0.5774	3.111
$\delta_{\text{crítico}}$	0.06525	0.4421	2.973	11.69	22.12
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r$	0.01717	0.05248	0.4555	1.194	3.900
$s_L$	0.03028	0.2179	1.451	5.786	10.71
$I_\mu$	0.002270	0.07197	0.3815	1.392	2.750
$s_\delta$	0.008156	0.05526	0.3717	1.462	2.765
$u_{\text{met}}$	0.008234	0.06594	0.4178	1.574	3.088
$I_{\text{fenol}}$	0.067	0.46	3.1	12	23
$\%I_{\text{fenol}}$	13	9.2	6.1	4.9	4.6

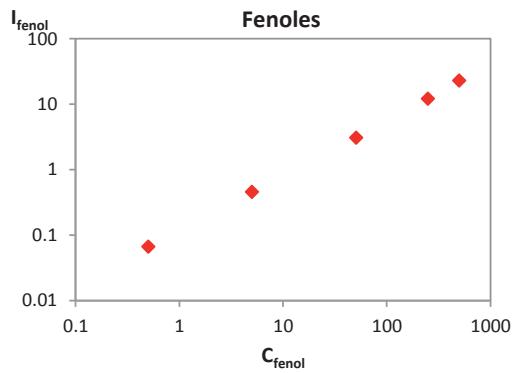


Fig. 5.15: Relación entre la incertidumbre y la concentración de fenol según el modelo “top-down”

En la Fig. 5.16 se han representado las contribuciones a la incertidumbre obtenidas según el modelo “top-down” pudiéndose apreciar que la contribución que más afecta a la incertidumbre total es la debida a la reproducibilidad intralaboratorio, mientras que las debidas a la repetibilidad y sesgo contribuyen en menor medida y son aproximadamente del mismo orden de magnitud. La falta de trazabilidad es ligeramente inferior a estas dos últimas.

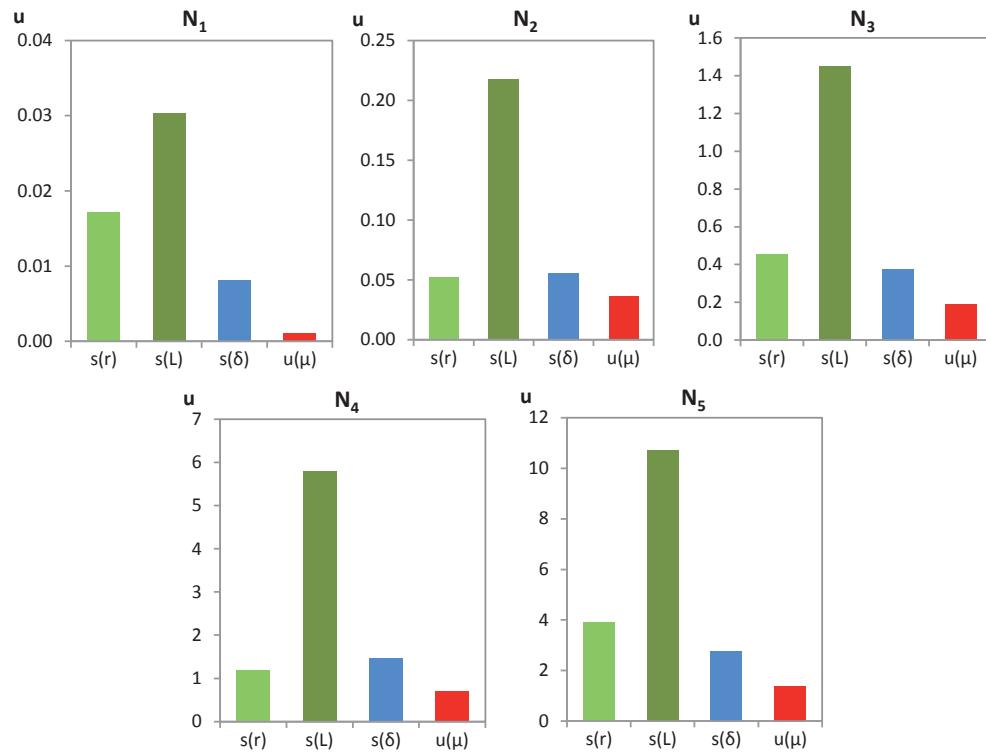


Fig. 5.16: Contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de fenoles expresadas como incertidumbres típicas, según el modelo “top-down”

### 5.2.3. APPLICACIÓN A LA DETERMINACION DE ACEITES Y GRASAS

Como en los dos métodos anteriores, se aplicaron test de consistencia gráficos y numéricos a los ocho resultados analíticos (4 días  $\times$  2 analistas) de las muestras de control de aceites y grasas a cinco niveles de concentración, medidas por duplicado. En la Tabla 5.16 quedan recogidos los valores para los estadísticos de aviso y alarma.

Tabla 5.16: Valores críticos de los estadísticos para 8 muestras y 2 réplicas

	h	k	G	C
Alarma ( $\alpha=0.01$ )	$\pm 2.06$	2.25	2.274	0.794
Aviso ( $\alpha=0.05$ )	$\pm 1.75$	1.88	2.126	0.727

En la Fig. 5.17 se han representado los valores de los test  $h$  y  $k$  de Mandel calculados para los ocho resultados obtenidos para cada nivel de concentración. Los resultados obtenidos de la aplicación de los test de Grubbs y Cochran se han recogido en la Tabla 5.17.

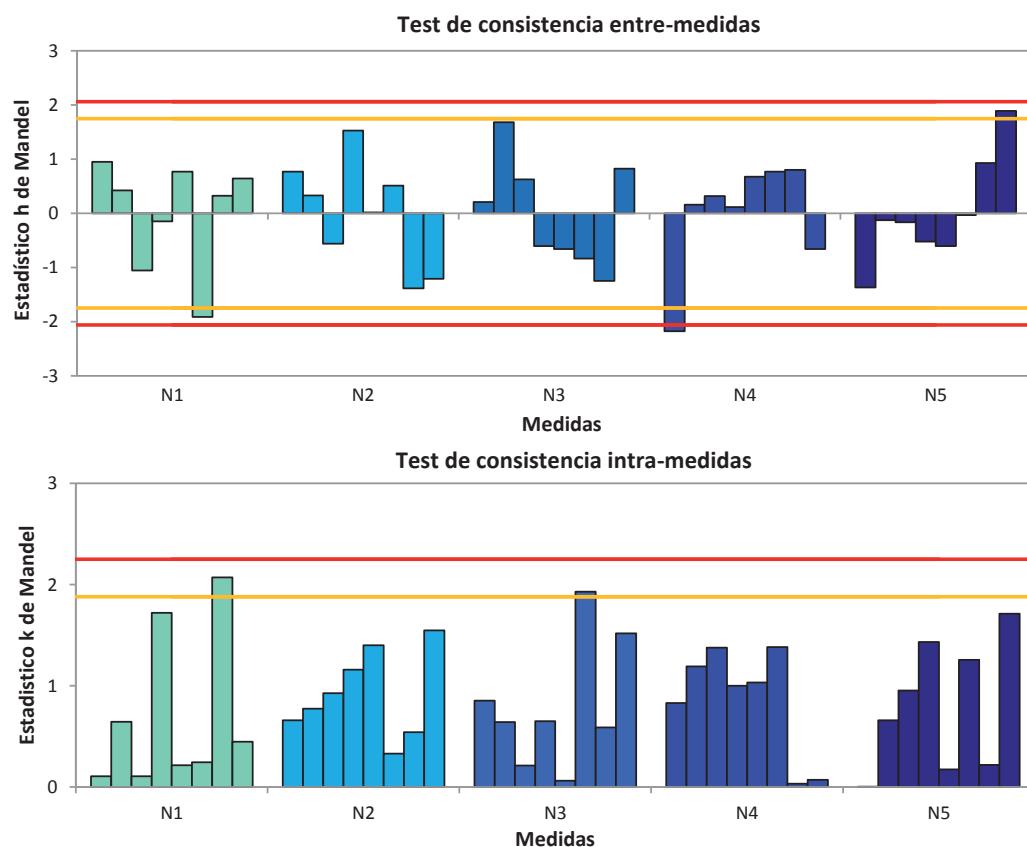


Fig. 5.17. Aplicación de los test de consistencia h y k de Mandel a los resultados de A&G

Los resultados obtenidos al aplicar los test de Grubbs y  $h$  de Mandel indican que apenas hay valores anómalos; únicamente el test  $h$  de Mandel detecta un valor

anómalo para el nivel  $N_4$ , valor que el test de Grubbs considera solo extraño. Ni el test  $k$  de Mandel ni el de Cochran encuentran diferencias significativas entre las desviaciones de los pares de valores obtenidos de cada medida.

Tabla 5.17: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a las medidas de A&amp;G

Ni	Test de Grubbs				Test de Cochran	
	$G_{p\text{-cal}}$	Resultado	$G_{1\text{-cal}}$	Resultado	$C_{\text{calc}}$	Resultado
$N_1$	0.948	Correcto	1.916	Correcto	0.536	Correcto
$N_2$	1.527	Correcto	1.386	Correcto	0.300	Correcto
$N_3$	1.684	Correcto	1.245	Correcto	0.466	Correcto
$N_4$	0.800	Correcto	2.176	Extraño (1)	0.239	Correcto
$N_5$	1.893	Correcto	1.368	Correcto	0.367	Correcto

Si se evalúan los resultados de los test de Mandel de forma conjunta para todas las medidas de aceites y grasas, solo el 2.5% de las medidas presentan resultados medios anómalos al superar su valor  $h$  el valor crítico, mientras que ninguna medida replicada fue anómala. No obstante, y a fin de evitar subestimar la incertidumbre, se mantuvieron todos los valores para calcularla según el método “top-down”.

A partir de todos los resultados experimentales y aplicando las ecuaciones para el cálculo de la incertidumbre según el modelo “top-down” indicadas en la Tabla 5.1, se cuantificaron cada una de las componentes de error intermedias y la incertidumbre total. Se tuvo en cuenta la componente del sesgo para todos los niveles de concentración, a pesar de no ser significativa en ningún caso. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 5.18 donde se observa que la incertidumbre relativa permanece aproximadamente constante con el aumento de concentración.

Tabla 5.18: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{A\&G}$  según el modelo “top-down”

	$N_1$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5$
$\mu$	11.8	52.6	253	1014	4990
$\bar{x}$	11.8	50.6	243	991	4850
$\delta$	0.007022	2.031	9.285	23.41	140.6
$\delta_{\text{crítico}}$	1.305	3.551	34.08	70.51	258.0
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r$	1.314	2.609	9.001	37.61	125.4
$s_L$	0.0000	0.0000	15.81	23.14	93.67
$I_\mu$	0.5776	1.969	4.595	17.18	85.91
$s_\delta$	0.3286	0.6524	6.025	12.46	45.61
$u_{\text{met}}$	0.1914	1.395	41.58	229.2	3925
$I_{A\&G}$	2.1	4.4	36	77	290
$\%I_{A\&G}$	17	8.3	14	7.6	5.7

Para los niveles  $N_1$  y  $N_2$  se obtuvieron valores negativos para la varianza intralaboratorio,  $s_L^2$ , que al carecer de sentido físico han sido sustituidos por cero. Teniendo en cuenta que, ante la imposibilidad de dividir la muestra, se prepararon las réplicas de las muestras de control por distintas pesadas, probablemente se habrían evitado estimaciones negativas de varianza de haber hecho el tratamiento estadístico con los porcentajes de recuperación en lugar de con los resultados de concentración.

Por último, en la Fig. 5.18 se ha representado gráficamente en escala logarítmica la incertidumbre obtenida mediante el modelo “top-down” frente a la concentración de A&G para cada nivel de concentración ensayado.

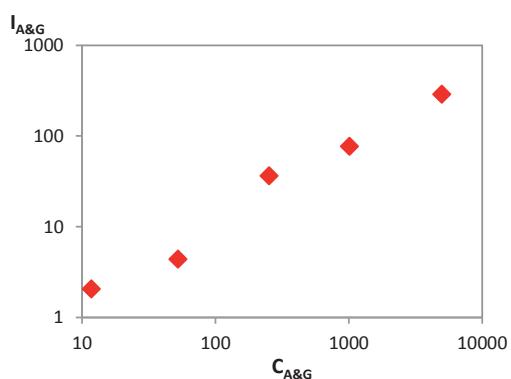


Fig. 5.18: Relación entre la incertidumbre y la concentración de A&G según el modelo “top-down”

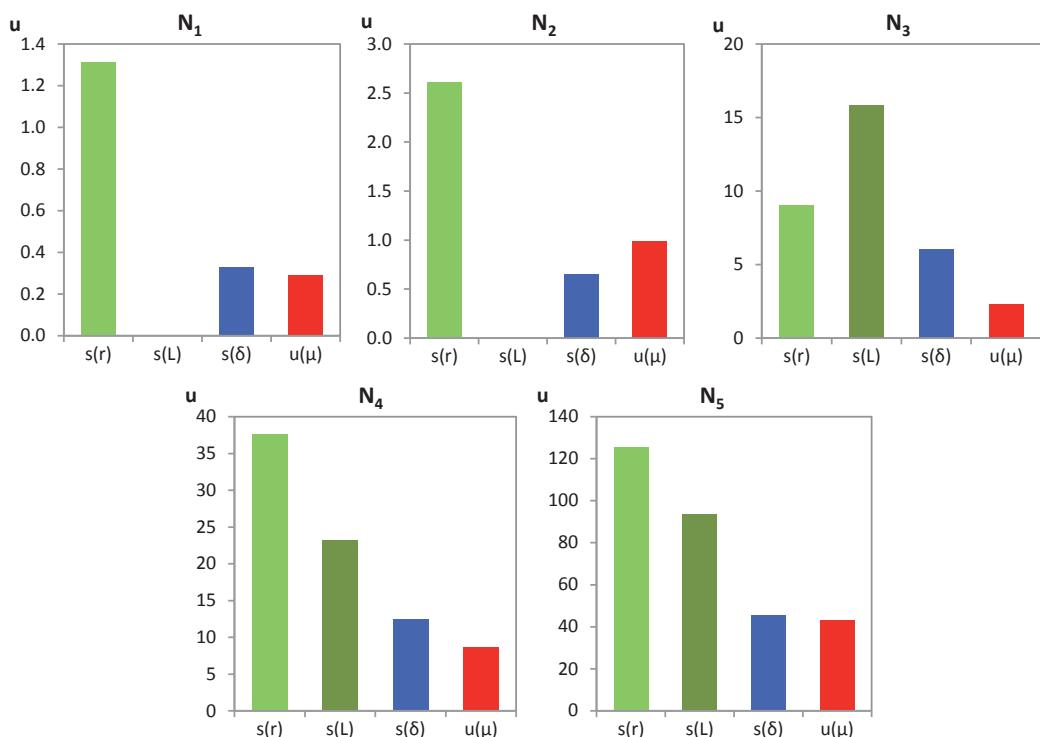


Fig. 5.19: Contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de aceites y grasas expresadas como incertidumbres típicas, según el modelo “top-down”

En la Fig. 5.19 se han representado las contribuciones a la incertidumbre obtenidas según el modelo “top-down”, como puede apreciarse la falta de veracidad y trazabilidad son contribuciones del mismo orden de magnitud que menos afectan a la incertidumbre de medida. La falta de repetibilidad es la contribución a la incertidumbre mayoritaria en todos los niveles de concentración, excepto en uno, sobre pasando incluso a la falta de precisión intralaboratorio, la cual se hace despreciable en los dos primeros niveles. Este hecho es coherente con los resultados obtenidos aplicando el modelo del capítulo anterior donde la contribución principal era la debida a la repetibilidad.

#### 5.2.4. ANÁLISIS DEL MODELO “TOP-DOWN”

Al igual que en el modelo de estimación de la incertidumbre, a partir de los resultados de la validación se observa que se pueden relacionar matemáticamente incertidumbre-concentración, siendo las funciones de tipo potencial las que mejor se ajustan a los resultados obtenidos, coincidiendo con el Tipo III ( $I = k_3 \cdot x^{k_4}$ ) presentado en el Capítulo 4.

Las ecuaciones matemáticas que relacionan incertidumbre y concentración en este modelo se muestran en la Tabla 5.19. Se observa que, en las funciones encontradas para el caso de la determinación de aniones la constante  $k_4$  tiende a la unidad, excepto para el fosfato, por lo que en estos casos sería adecuado asumir una relación incertidumbre-concentración de Tipo I, coincidiendo con los resultados obtenidos en el capítulo anterior.

Tabla 5.19: Ecuaciones que relacionan la incertidumbre-concentración de cada uno de los analitos

Fluoruro	$I_{F^-} = 0.0346 \cdot (C_{F^-})^{1.0152}$
Cloruro	$I_{Cl^-} = 0.0533 \cdot (C_{Cl^-})^{0.9954}$
Nitrito	$I_{NO_2^-} = 0.0346 \cdot (C_{NO_2^-})^{1.0529}$
Bromuro	$I_{Br^-} = 0.0421 \cdot (C_{Br^-})^{0.9910}$
Nitrato	$I_{NO_3^-} = 0.0377 \cdot (C_{NO_3^-})^{1.0254}$
Fosfato	$I_{PO_4^{3-}} = 0.1016 \cdot (C_{PO_4^{3-}})^{0.8915}$
Sulfato	$I_{SO_4^{2-}} = 0.0337 \cdot (C_{SO_4^{2-}})^{1.0309}$
Fenol	$I_{Fenol} = 0.1186 \cdot (C_{Fenol})^{0.8410}$
Aceites y grasas	$I_{A&G} = 0.2271 \cdot (C_{A&G})^{0.8470}$

La Fig. 5.20 representa las contribuciones individuales a la incertidumbre de medida de cada analito expresadas como incertidumbres relativas. Como puede verse, la contribución mayoritaria en todos los casos es la debida a la falta de precisión. Además, el desglose de la precisión en contribuciones intermedias indica que la que más contribuye en los dos primeros métodos de análisis es la debida a la reproducibilidad intralaboratorio y en menor medida la debida a la repetibilidad, mientras que en caso de la determinación de aceites y grasas se invierte la proporción. Esta tendencia en el caso de la determinación de aceites y grasas puede ser debida a que la exigencia del método de no subdividir las muestras condujo a la preparación independiente de las réplicas de las muestras de control, difícilmente igualables en concentraciones. La contribución del sesgo es pequeña pero aproximadamente constante para los tres métodos y a todos los niveles de concentración. La contribución de la trazabilidad es también minoritaria pero no es constante por dos motivos principales: (i) a niveles de concentración bajos la masa de reactivo necesaria para preparar la muestra de control es muy pequeña y por tanto la contribución relativa del error de la balanza a la incertidumbre total es grande; (ii) cuando el método de análisis no es muy laborioso las contribuciones debidas a la precisión y la veracidad son menores, por lo que la contribución relativa de la trazabilidad aumenta.

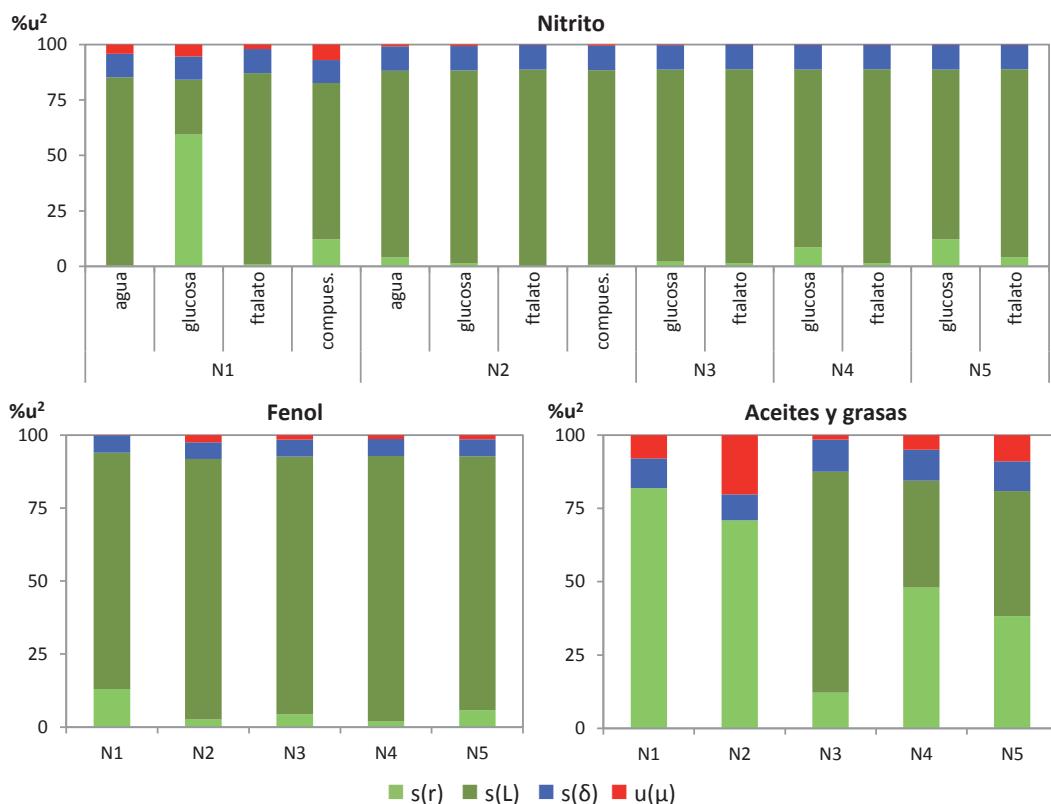


Fig. 5.20: Contribuciones relativas a la incertidumbre para cada nivel de concentración según el modelo “top-down”, para cada una de las determinaciones estudiadas

La aplicación de las pruebas de consistencia de valores ha detectado un porcentaje de valores anómalos generalmente inferior al 3%, tanto los referidos a los promedios como los referidos a las dispersiones. Puesto que el porcentaje de valores anómalos es inferior al 5%, no deben ser excluidos de los cálculos de las estimaciones pues forman parte de la población habitual de resultados si hemos asumido un nivel de significación del 5%. No obstante, puede ser recomendable establecer un criterio de aceptación de los resultados del diseño experimental empleado en la validación que limite el porcentaje de valores discrepantes permitidos, por encima del cual los resultados generados durante la validación deberían ser reconsiderados.

Una característica del modelo “top-down” es que, una vez recopilados todos los resultados analíticos, si el número de estos es suficiente es posible aplicar pruebas de consistencia para eliminar los valores discrepantes que producirían desviaciones en las estimaciones. Por el contrario la eliminación de “outliers” a *posteriori* en el modelo propuesto en el Capítulo 4 no es factible ya que impediría la realización del ANOVA de los resultados del diseño de experimentos anidado.

### 5.3. COMPARACIÓN DE LOS DISTINTOS MODELOS DE ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE APLICADOS

Se han representado en una misma gráfica y en escala logarítmica los intervalos de incertidumbre comprendidos entre el máximo y mínimo valor de incertidumbre obtenidos según el modelo “bottom-up” junto con la relación incertidumbre-concentración para el modelo de estimación de la incertidumbre a partir de la información obtenida de la validación y el modelo “top-down”. Aunque el anión fosfato y el nivel N<sub>1</sub> de aceites y grasas no han satisfecho todos los objetivos de validación, se han incluido en esta comparación los valores de incertidumbre estimados mediante los modelos “bottom-up” y “top-down” pues fueron en todos los casos menores que el valor objetivo propuesto, %I < 25%.

Como se observa en la Fig. 5.21, el modelo de estimación de la incertidumbre a partir de los resultados de la validación y el modelo “top-down” dan lugar a relaciones incertidumbre-concentración aproximadamente paralelas, aunque ligeramente inferior para el modelo “top-down”. Esta diferencia se debe a que las contribuciones debidas al sesgo y a la reproducibilidad son menores, siendo la diferencia más significativa en el caso de la veracidad. Este hecho puede observarse más claramente en la Fig. 5.22, donde las contribuciones a la incertidumbre de acuerdo al modelo “top-down” han sido reordenadas de acuerdo a la ec. 5.2, para poder comparar las contribuciones principales de cada modelo.

De la Fig. 5.22 se extrae también que, para métodos de ensayo que incluyan en su procedimiento la realización de líneas de calibrado, como es el caso de la determinación de aniones y fenoles, la contribución de la precisión estimada por el modelo “bottom-up” da lugar a valores sensiblemente superiores para casi todos los

niveles de concentración. Esto es debido a la contribución mayoritaria de la incertidumbre debida a la regresión ya que un aumento de los residuales de la línea de calibrado incrementa de forma notable la incertidumbre estimada.

De la misma Fig. 5.22 se deduce que, si la contribución debida a la falta de trazabilidad es la misma para todos los modelos en valor absoluto, esta aumentará en valor relativo para en caso del modelo “top-down” en el cual las contribuciones debidas la falta de precisión y veracidad son menores que en el modelo basado en los resultados de la validación.

Para los métodos de análisis investigados y su alcance de aplicación, el modelo de estimación de la incertidumbre de medida a partir de los valores obtenidos durante la validación, propuesto en esta Tesis, parece ser el más conveniente de los tres modelos comparados. Las razones más importantes para su elección son las siguientes:

- ▲ En primer lugar, porque tiene en cuenta fuentes de incertidumbre tanto aleatorias como sistemáticas, incluidas tanto de forma explícita como de forma implícita. Esta condición no la cumple el modelo “bottom-up”, en el que solo se han tenido en cuenta las contribuciones aleatorias.
- ▲ En segundo lugar, se ha comprobado cuantitativamente que la incertidumbre no se ha subestimado o sobreestimado, puesto que, al interpolar los valores de concentración de analito obtenidos en las muestras de control en la ecuación incertidumbre-concentración, los intervalos de incertidumbre de los resultados incluyeron a más del 95% de los valores reales. Esta segunda condición no la ha cumplido el modelo “top-down” que ha dado lugar a intervalos de incertidumbre de medida que en un porcentaje elevado no incluían al valor real, posiblemente debido a la menor contribución de la veracidad en este modelo.
- ▲ Por último, el modelo propuesto aprovecha los resultados obtenidos durante la validación para la estimación de la incertidumbre de medida sin necesidad de la realización de ensayos adicionales, simplificando el proceso de validación con el consiguiente ahorro de tiempo y trabajo.

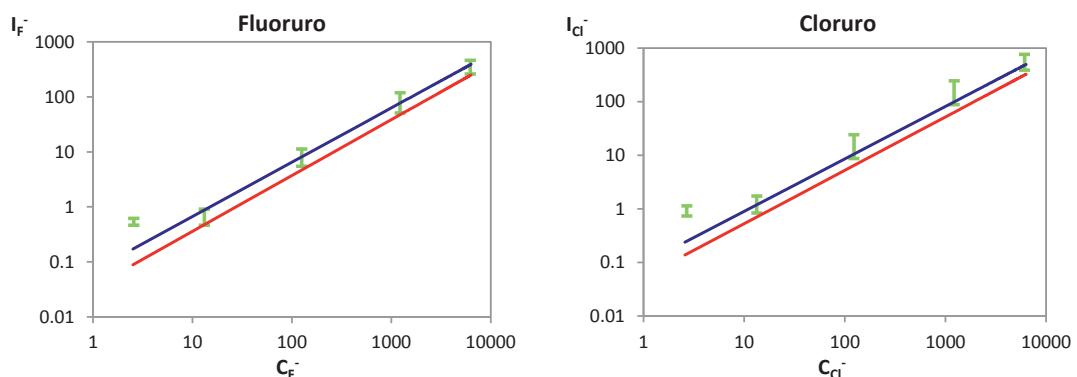


Fig. 5.21: Incertidumbre para cada analito según los modelos estudiados

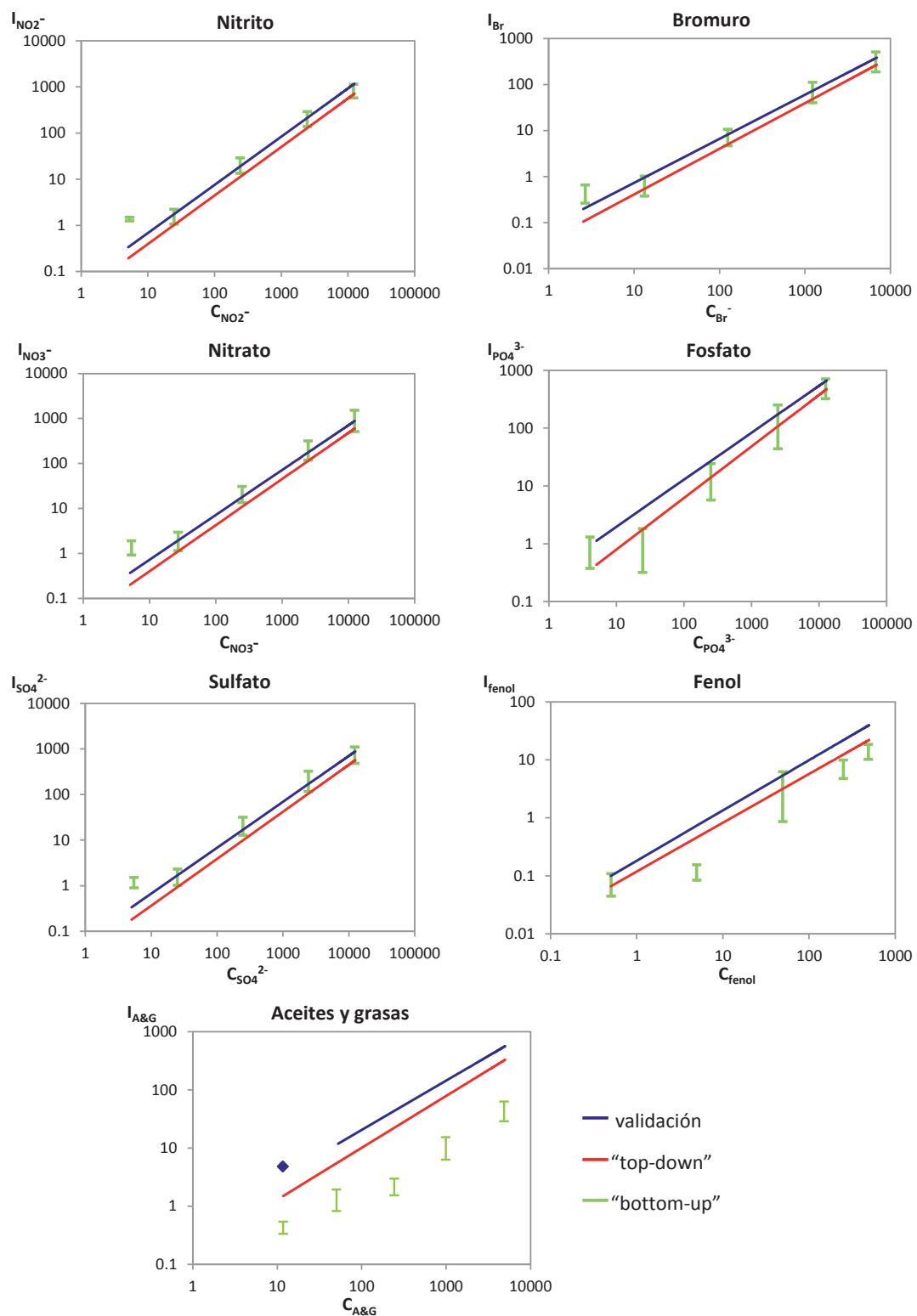


Fig. 5.21 (cont.): Incertidumbre para cada analito según los modelos estudiados

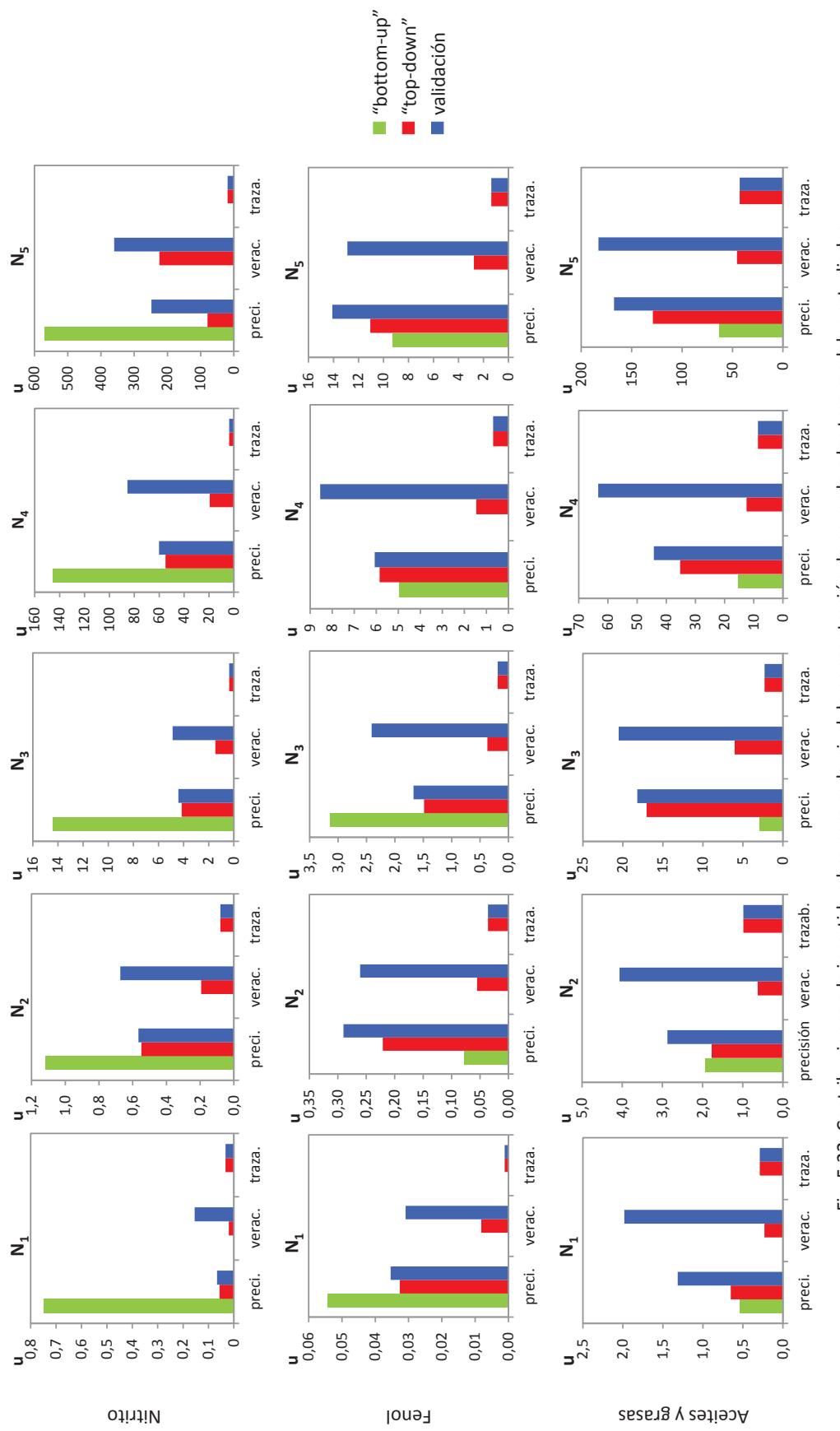


Fig. 5.22: Contribuciones a la incertidumbre para cada nivel de concentración de acuerdo a los tres modelos estudiados

## **6. CONCLUSIONES**

---



Los laboratorios de análisis deben validar los métodos de ensayo antes de ponerlos en práctica para demostrar que cumplen los requisitos particulares para su uso específico previsto. Para llevar a cabo esta tarea, el laboratorio debe realizar una serie de ensayos que confirmen las características técnicas del método tales como veracidad, precisión, incertidumbre... Este requisito es obligatorio para todos los laboratorios que pretenden acreditarse de acuerdo a la norma ISO 17025, pero cualquier laboratorio que aplique las Buenas Prácticas de Laboratorio también está obligado a validar sus métodos de ensayo.

En esta Tesis Doctoral se propone una metodología para validar y estimar la incertidumbre de los métodos de ensayo. Dicha metodología se ha aplicado a tres métodos para el análisis rutinario de diversos contaminantes en aguas residuales y continentales: determinación de aniones disueltos mediante cromatografía iónica, determinación de fenoles totales mediante espectrofotometría UV-vis y determinación de aceites y grasas mediante extracción en fase sólida y gravimetría.

Previamente a la validación se comprobó, mediante su calibración y/o verificación, que los equipos de medida y ensayo estaban en perfecto uso, y que cumplían los requisitos específicos para el desarrollo de los métodos de análisis en los que estaban implicados.

Paralelamente, se realizaron los ensayos previos necesarios para establecer determinadas condiciones experimentales tales como linealidad, requerimientos instrumentales, tiempos máximos de conservación de muestras y patrones...

A continuación, se seleccionaron los parámetros técnicos de validación a evaluar para cada método de análisis, y se establecieron los valores objetivo de cada parámetro de validación en base a la información bibliográfica disponible (normas, manuales de equipos, documentos científicos...), y atendiendo a la matriz analítica y concentraciones habituales de los analíticos de interés. La Tabla 6.1 muestra la recopilación de los valores objetivo fijados para cada uno de los parámetros de validación.

Para estimar los parámetros de validación indicados en la Tabla 6.1 para cada método de ensayo se emplearon muestras de control que, en combinación con un diseño de experimentos, permiten evaluar no solo la repetibilidad de las medidas, sino también varias precisiones intermedias relacionadas con factores que previsiblemente pueden afectar a la veracidad y reproducibilidad de los resultados, tales como el tiempo (realización de los análisis en distintos días) o el cambio de analista. Los diseños de experimentos adecuados para simular de forma controlada la variación de estos factores fueron diseños completamente anidados. Los factores ensayados para los métodos de análisis de aniones y de aceites y grasas fueron: tiempo, a cuatro niveles, analista, a dos niveles, y réplica, a dos niveles. Para la determinación de fenoles se añadió un cuarto factor, la destilación, a dos niveles.

Los diseños de experimentos anidados se aplicaron a muestras de control con concentraciones conocidas de analito. Para evaluar el efecto de la matriz analítica sobre la veracidad y precisión de las medidas, se prepararon dichas muestras de control disolviendo cantidades exactamente conocidas de patrones químicos de cada analito en matrices sintéticas que simulan la compleja composición de las aguas residuales. Como la concentración de los analitos investigados en aguas puede variar en un amplio rango y no se puede asumir que el sesgo y la imprecisión de las medidas (y por ende, la incertidumbre) sean constantes en todo el rango de concentraciones, los diseños de experimentos se aplicaron a muestras de control conteniendo el analito a cinco niveles de concentración,  $N_i$ , repartidos a lo largo del rango de medida. Los niveles escogidos fueron: un nivel inferior con una concentración próxima al límite de cuantificación objetivo (LoQ), un nivel superior con una concentración cercana al límite superior del rango de trabajo (LS) y tres niveles intermedios. En la tabla 6.2 se muestran los niveles de concentración empleados para cada analito.

Tabla 6.1: Parámetros de validación y valores objetivo perseguidos para cada método de análisis

Parámetros de validación	Método de análisis			
	Aniones		Fenoles	Aceites y grasas
	$F^-$ , $Cl^-$ , $Br^-$	$NO_2^-$ , $NO_3^-$ , $PO_4^{3-}$ , $SO_4^{2-}$		
Selectividad	Selectivo (justificación bibliográfica)			
Rango de ensayo	$2.5\text{-}15 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5\text{-}30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5\text{-}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{-}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Linealidad/ Sensibilidad	$r^2 > 0.99$ $\%DER_f < 10\%^*$		$0 \notin b \pm t s_b$ $0 \in a \pm t s_a$	No Aplica
Veracidad	$\%Er \leq 15 \%$			
Precisión	$\%DER \leq 15 \%$			
Límite de cuantificación LoQ	$2.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Límite superior LS	$6250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$12500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Rango de medida	$2.5\text{-}6250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5\text{-}12500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.5\text{-}500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{-}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Dilución máxima	0.1:100		1:200	No Aplica
Incertidumbre	$I \leq 25\%$			

\*  $\%DER_f$  =desviación estándar relativa del factor de respuesta, f

Tabla 6.2: Concentración de analito (en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) en las muestras de control

Método		$N_1 = LoQ$	$N_2$	$N_3$	$N_4$	$N_5 = LS$
Aniones	$F^-$ , $Cl^-$ , $Br^-$	2.5	12	125	1250	6250
	$NO_2^-$ , $NO_3^-$ , $PO_4^{3-}$ , $SO_4^{2-}$	5	25	250	2500	12500
Fenoles		0.5	5	50	250	500
Aceites y grasas		10	50	250	1000	5000

El análisis estadístico de los resultados obtenidos al aplicar el diseño de experimentos anidado a cada muestra de control ha permitido evaluar cada uno de los parámetros de validación:

- ↗ Los parámetros de linealidad, pendiente/sensibilidad, ordenada en el origen y coeficiente de correlación, se evaluaron a partir de las líneas de calibrado realizadas durante los ensayos del diseño de experimentos.
- ↗ La veracidad de las medidas se estimó, para cada nivel de concentración, a partir de los sesgos relativos máximos,  $|%E_r|_{MAX}$ , obtenidos de los resultados analíticos de las muestras de control analizadas durante el diseño de experimentos anidado.
- ↗ El análisis de varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos durante los ensayos programados del diseño de experimentos anidado nos proporcionó la precisión de los resultados analíticos para cada analito y nivel de concentración ensayado,  $N_i$ , expresada como  $s_{reproducibilidad}$ . Además, nos ha permitido separar las contribuciones a la varianza total de los diferentes factores ensayados, estimándolas como precisiones intermedias.
- ↗ Se han estimado límites de cuantificación teóricos para la determinación de aniones y fenoles a partir de las líneas de calibrado y, para la determinación de aceites y grasas, a partir de los resultados obtenidos para la muestra de control con el nivel de concentración inferior. Los valores obtenidos han sido en general inferiores a los límites de cuantificación propuestos como objetivo. Por último, se ha demostrado que los límites de cuantificación propuestos cumplen las condiciones de exactitud e incertidumbre requeridas.
- ↗ El modelo propuesto para la estimación de la incertidumbre de medida emplea los resultados obtenidos durante la evaluación de la falta de veracidad y precisión, junto con el error asociado a la falta de trazabilidad durante la preparación de las muestras de control.

$$u_c^2 = u_{\text{precisión}}^2 + u_{\text{veracidad}}^2 + u_{\text{trazabilidad}}^2 \quad \text{ec. 6.1}$$

donde  $u_{\text{precisión}}$  se corresponde con  $s_{reproducibilidad}$  del ANOVA de los resultados del diseño de experimentos anidado;  $u_{\text{veracidad}}$  se estima a partir del valor de la falta de veracidad transformada en incertidumbre típica de acuerdo a una contribución tipo "B"; y  $u_{\text{trazabilidad}}$  es la componente debida a la incertidumbre de la concentración de muestra de control estimada según el modelo de propagación del error (modelo "bottom-up").

Los valores obtenidos para cada uno de los parámetros de validación de los métodos de ensayo validados se muestran en las Tablas 6.3 (aniones) y 6.4 (fenoles y aceites y grasas). Los valores estimados se han comparado con los valores propuestos en la Tabla 6.1 para comprobar si se han alcanzado los objetivos de validación.

Tabla 6.3: Resultados obtenidos para los parámetros de validación del método de análisis de aniones

Parámetros de validación	$F^-$	$Cl^-$	$Br^-$	$NO_2^-$	$NO_3^-$	$PO_4^{3-}$	$SO_4^{2-}$
<b>Selectividad</b>							
Rango de ensayo							
2.5-15 mg·L <sup>-1</sup>							
0.5-15 mg·L <sup>-1</sup>							
Linealidad/ Sensibilidad							
-10.05 < a < 0.30 15.50 < b < 16.63 $r^2 > 0.9991$ $\%DER_f > 4.9$							
-9.85 < a < 1.15 9.51 < b < 10.69 $r^2 > 0.9974$ $\%DER_f > 5.9$							
-1.89 < a < 0.21 3.80 < b < 4.02 $r^2 > 0.9994$ $\%DER_f > 2.1$							
-10.27 < a < 0.57 5.05 < b < 5.49 $r^2 > 0.9986$ $\%DER_f > 4.3$							
-7.72 < a < 0.57 2.71 < b < 2.86 $r^2 > 0.9994$ $\%DER_f > 11.0$							
-9.33 < a < 1.05 6.54 < b < 7.10 $r^2 > 0.9987$ $\%DER_f > 3.9$							
<b>Selectivo (justificación bibliográfica)</b>							
Rango de medida							
2.5-6250 mg·L <sup>-1</sup>							
0.5-12500 mg·L <sup>-1</sup>							
Dilución máxima							
0.1:100							
Incertidumbre <sup>a</sup>	I = 18%	I = 17%	I = 11%	I = 15%	I = 12%	I = 52%	I = 8.7%

<sup>a</sup> Valor más alto de los obtenidos para los cinco niveles ensayados.<sup>b</sup> LoQ<sub>ensayado</sub> se corresponde con el nivel N<sub>1</sub> o con el nivel de concentración más bajo que cumple las condiciones de veracidad, precisión e incertidumbre objetivo.<sup>c</sup> LS Valor más alto del límite superior ensayado

- ↗ Determinación de aniones mediante cromatografía iónica (Tabla 6.3). Todos los aniones estudiados han cumplido los objetivos de validación propuestos, excepto el ion fosfato, que no ha alcanzado los objetivos establecidos para el factor de respuesta, la ordenada en el origen de las líneas de calibrado, y la veracidad e incertidumbre a bajos niveles de concentración (valores resaltados en la tabla). En consecuencia, se ha decidido excluir la determinación de fosfato del alcance de este método. No obstante, la determinación de fosfato es factible en matrices menos complejas que el agua residual (aguas continentales, aguas potables) y/o con niveles de concentración superiores al límite de cuantificación.
- ↗ Determinación de fenoles totales por espectrofotometría UV-vis (Tabla 6.4). Se cumplieron los objetivos propuestos para todos los parámetros de validación estudiados.
- ↗ Determinación de aceites y grasas mediante extracción en fase sólida y gravimetría (Tabla 6.4). Únicamente el nivel de concentración  $N_1$ , coincidente con el límite de cuantificación inicialmente propuesto, no ha cumplido los objetivos de los parámetros de validación veracidad e incertidumbre. Por tanto, se ha excluido este primer nivel del alcance del método dándose el método por validado en el rango de concentraciones de  $N_2 = 50.6 \text{ mg A&G}\cdot\text{L}^{-1}$  a  $N_5 = \text{LS}$ , reduciéndose la incertidumbre máxima en el nuevo rango de medida al 20% y, por tanto, dentro de los objetivos propuestos.

Tabla 6.4: Resultados obtenidos para los parámetros de validación de los métodos de análisis de fenoles y aceites y grasas

Parámetros de validación	Fenoles	Aceites y grasas
Selectividad	Selectivo (justificación bibliográfica)	
Rango de ensayo	$0.5\text{--}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{--}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Linealidad/ Sensibilidad	$0.25\text{--}5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ $-0.0086 < a < 0.0141$ $0.1316 < b < 0.1391$ $r^2 > 0.99$ $\%DER_f > 4.6$	No aplica
Veracidad <sup>a</sup>	$ \%E_r _{\text{MAX}} = 11\%$	$ \%E_r _{\text{MAX}} = 24\%$
Precisión <sup>a</sup>	$\%DER = 7.1$	$\%DER = 13\%$
Límite de cuantificación $\text{LoQ}^b$	$\text{LoQ}_{\text{estimado}} = 0.42$ $\text{LoQ}_{\text{ensayado}} = 0.50$	$\text{LoQ}_{\text{estimado}} = 6.5$ $\text{LoQ}_{\text{ensayado}} = 11.75$
Límite superior LS <sup>c</sup>	$502 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$5080 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Rango de medida	$0.5\text{--}500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\text{--}5000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$
Dilución máxima	1:200	No Aplica
Incertidumbre <sup>a</sup>	$I = 19\%$	$I = 39\%$

<sup>a,b,c</sup> Igual que en Tabla 6.3

Finalmente, se han establecido funciones matemáticas que relacionan los pares de valores incertidumbre de medida-concentración de analito en las muestras. El

conocimiento de estas relaciones permitirá posteriormente estimar, mediante interpolación, la incertidumbre asociada a la concentración de una determinada muestra medida en el laboratorio. Las ecuaciones matemáticas obtenidas para predecir la incertidumbre a partir de la concentración de analito en las muestras han sido de tipo  $I=k_3 \cdot x^{k_4}$  para todos los analitos investigados.

Tabla 6.5: Ecuaciones que relacionan la incertidumbre-concentración de cada uno de los analitos

Fluoruro	$I_F = 0.0680 \cdot (C_{F^-})^{0.9889}$
Cloruro	$I_{Cl^-} = 0.0940 \cdot (C_{Cl^-})^{0.9786}$
Nitrito	$I_{NO_2^-} = 0.0608 \cdot (C_{NO_2^-})^{1.0459}$
Bromuro	$I_{Br^-} = 0.0807 \cdot (C_{Br^-})^{0.9573}$
Nitrato	$I_{NO_3^-} = 0.0729 \cdot (C_{NO_3^-})^{0.9963}$
Fosfato	$I_{PO_4^{3-}} = 0.3014 \cdot (C_{PO_4^{3-}})^{0.8132}$
Sulfato	$I_{SO_4^{2-}} = 0.0658 \cdot (C_{SO_4^{2-}})^{1.0071}$
Fenol	$I_{Fenol} = 0.1820 \cdot (C_{Fenol})^{0.8667}$
Aceites y grasas	$I_{A&G} = 0.2366 \cdot (C_{A&G})^{0.9166}$

Se ha comprobado que el valor experimental  $k_4$  obtenido para todos los aniones, excepto el fosfato, no difiere significativamente de 1, lo que parece indicar que, a medida que se realicen revalidaciones del método analítico con nuevos niveles de concentración, esta relación puede llegar a simplificarse y convertirse en  $I=k_2 \cdot x$ , indicando una proporcionalidad constante entre la incertidumbre y la concentración.

El modelo propuesto para la estimación de la incertidumbre a partir de los resultados de validación ha tenido en cuenta tres contribuciones: falta de veracidad, falta de precisión y falta de trazabilidad de las muestras de control ensayadas, siendo las dos primeras las de mayor valor. A su vez, la precisión obtenida del ANOVA de los resultados de los ensayos programados para los diseños de experimentos anidados de tres y cuatro factores nos ha proporcionado información de las precisiones intermedias debidas a los factores ensayados. Se puede concluir que, para la determinación de aniones y fenoles, el factor tiempo y réplica han contribuido mínimamente a la variabilidad de los resultados, siendo el factor analista el que más contribuye a la incertidumbre de medida de aniones, y los factores analista y destilación los más significativos en el caso de fenoles. Por último, para la determinación de aceites y grasas, el factor réplica es el que más contribuye a la varianza total, mientras que los factores tiempo y analista lo hacen de forma irregular,

llegando a ser despreciables para ciertos niveles de concentración. Una vez identificadas las fuentes de incertidumbre mayoritarias en cada método de ensayo se puede plantear actuar sobre ellas para minimizar su contribución a la incertidumbre.

Los valores de incertidumbre de medida obtenidos mediante el procedimiento propuesto en este trabajo, a partir de los resultados de los experimentos de validación, se han comparado con la incertidumbre obtenida aplicando otros modelos alternativos de estimación de la incertidumbre: propagación de errores o modelo “bottom-up” y modelo “top-down”, que emplea la información derivada de la participación en ejercicios interlaboratorio, extrapolado en este trabajo a ensayos intralaboratorio. Para poder comparar los resultados de los tres modelos, se han empleado los mismos datos experimentales, esto es, los obtenidos al aplicar los diseños de experimentos a las muestras de control.

↗ El modelo “top-down”, al igual que el modelo propuesto, ha generado tantos pares de valores incertidumbre-concentración como niveles ensayados, que se pueden relacionar matemáticamente mediante ecuaciones igualmente de tipo  $I=k_3x^{k_4}$ , donde  $k_3$  resultó ser ligeramente inferior al obtenido con el modelo propuesto. Por tanto, las incertidumbres estimadas son ligeramente menores, debido principalmente a que el modelo “top-down” subestima la contribución a la incertidumbre debida al sesgo.

↗ El modelo “bottom-up”, en cambio, ha proporcionado tantos valores de incertidumbre como medidas se han realizado. Para la determinación de aniones, los intervalos de incertidumbre para los cuatro niveles de concentración más altos se solapan con las incertidumbres estimadas mediante el modelo propuesto y el modelo “top-down”, mientras que para el nivel más bajo de concentración el modelo “bottom-up” sobreestima la incertidumbre. Para la determinación de fenoles los intervalos de incertidumbre estimados son ligeramente menores que los obtenidos con los dos modelos anteriores para todos los niveles de concentración, acentuándose la diferencia para la determinación de aceites y grasas. Mientras que el modelo basado en la información obtenida durante la validación y el modelo “top-down” tienen en cuenta errores aleatorios y sistemáticos, la estimación de la incertidumbre según el modelo “bottom-up” solo ha tenido en cuenta componentes aleatorias. Por este motivo, los resultados obtenidos por el modelo “bottom-up” en determinaciones más laboriosas como fenoles y aceites y grasas han sido menores, mientras que los resultados obtenidos para la determinación de aniones, menos laboriosa, se asemejan más a los obtenidos por los otros dos modelos.

De los tres modelos estudiados, el modelo de estimación de la incertidumbre de medida propuesto en esta Tesis, a partir de los valores obtenidos durante la validación, es el que mejores resultados ha proporcionado para los métodos de análisis estudiados y su alcance de aplicación. Las razones son las siguientes: (i) porque tiene en cuenta fuentes de incertidumbre tanto aleatorias como sistemáticas, incluidas de forma tanto explícita como implícita; (ii) porque se ha comprobado que los intervalos de incertidumbre, estimados al interpolar en la ecuación incertidumbre-concentración la concentración de analito medida en las muestras de control, incluyen al valor real;

(iii) porque aprovecha los resultados obtenidos durante la validación para la estimación de la incertidumbre de medida sin necesidad de realizar cálculos complicados o ensayos adicionales, simplificando el proceso de validación.

A partir de la información obtenida durante la validación de los tres métodos de ensayo, se han establecido los valores de las líneas de los gráficos de control a emplear para la verificación periódica de la calidad de los resultados analíticos. También se han elaborado los procedimientos normalizados de ensayo, PNT's, para ser aplicados por el personal de laboratorio siempre de la misma forma e inequívocamente.

## BIBLIOGRAFÍA

---



- Aboul-Enein H. (2000).** Selectivity versus specificity in chromatography analytical methods. *Accred. Qual. Assur.* 5, 180-181.
- AEFI (2001).** Validación de métodos analíticos. Asociación española de farmacéuticos de la industria. Barcelona, España.
- Agbenin J. O., Cantarella H. (2011).** Performance of commercial soil laboratories in a proficiency test program in Brazil. *Accred. Qual. Assur.* 16, 553-559.
- Ahlström L H., Raab J., Mathiasson L. (2005).** Application of standard addition methodology for the determination of banned azo dyes in different leather types *Anal. Chim. Acta* 552, 76-80.
- Albert R. (1997).** A Heuristic Derivation of the Horwitz curve. *Anal. Chem.* 69, 789-790.
- Allen D. (2007).** Holmium Oxide Glass Wavelength Standards. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 112, 303-306.
- Al-Masri M., Amin Y. (2005).** Use of the Eurachem guide on method validation for determination of uranium in environmental samples. *Accred. Qual. Assur.* 10, 98-106.
- Al-Masri M. S., Shakhashiro A., Amin A. Y. (2004).** Method validation procedures for environmental radiochemical measurements at AECS. *Accred. Qual. Assur.* 9, 361-368.
- AMC (Analytical Methods Committee) (1992).** Proficiency testing of analytical laboratories: organization and statistical assessment. *Analyst* 117, 97-117.
- AMC (Analytical Methods Committee) (1997).** Report by the Analytical Methods Committee Evaluation of Analytical Instrumentation. Part IX Instrumentation for High-performance Liquid Chromatography. *Analyst* 122, 387-392.
- AMC (Analytical Methods Committee) (1995).** Uncertainty of measurement: implications of its use in analytical science. *Analyst* 120, 2303-2308.
- AMC (Analytical Method Committee) (2010).** The role of proficiency testing in method validation. *Accred. Qual. Assur.* 15, 73-79.
- Andrade J. M., Prada D., Muniategui S., Gómez B., Pan, M. (1993).** Plackett-Burman factorial designs applied to laboratory quality assurance the flash point test as an example. *Fuel* 72, 251-255.
- Anglov T., Petersen I., Kristiansen, J. (1999).** Uncertainty of nitrogen determination by Kjeldahl method. *Accred. Qual. Assur.* 4, 504-510.
- ANSI/NCSL Z540.3 (2006).** Requirements for the Calibration of Measuring and Test Equipment Sub Clause 5.3 Assessor Training American National Standard/National Conference of Standards Laboratories.

<http://www.a2la.org/conclaves/conclave2009/minutes/Measurement%20Advisory%20Committee%20Summary%20-%20Attachment%203.pdf>

**AOAC (2002a).** Appendix D: Guidelines for Collaborative Study Procedures To Validate Characteristics of a Method of Analysis. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Communities.*

[http://www.aoac.org/Official\\_Methods/Collaborative\\_Study\\_Validation\\_Guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/Collaborative_Study_Validation_Guidelines.pdf)

**AOAC (2002b).** Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Communities.*

[http://www.aoac.org/Official\\_Methods/slV\\_guidelines.pdf](http://www.aoac.org/Official_Methods/slV_guidelines.pdf)

**AOAC (2002c).** Requirements for single laboratory validation of chemical methods. *Official Methods of Analysis of the Association of Analytical Communities.*  
[http://www.aoac.org/Ag\\_Materials/additives/aoac\\_slv.pdf](http://www.aoac.org/Ag_Materials/additives/aoac_slv.pdf)

**APHA, American Public Health Association (1998).** Standard methods for examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed. APHA-AWWA-WPCF, Washington DC, USA.

**Apostol I., Miller K. J., Ratto J., Kelner D. N. (2009).** Comparison of different approaches for evaluation of the detection and quantitation limits of a purity method: A case study using a capillary isoelectrofocusing method for a monoclonal antibody. *Anal. Biochem.* 385, 101-106.

**ASTM E1169 (1996).** Standard Guide for Conducting Ruggedness Tests. American Society for Testing and Materials, ASTM.

**ASTM D1783 (2001).** Standard test methods for phenolic compounds in water. *American Society for Testing and Materials, ASTM.*

**ASTM D3921-96 (2011).** Standard Test Method for Oil and Grease and Petroleum Hydrocarbons in Water. *American Society for Testing and Materials, ASTM.* Anulada en 2013.

**ASTM D4281-95 (2005).** Standard Test Method for Oil and Grease (Fluorocarbon Extractable Substances) by Gravimetric Determination. *American Society for Testing and Materials, ASTM.* Anulada en 2012.

**ASTM D4327 (2011).** Standard Test Method for anions in water by Chemically Suppressed Ion Chromatography. *American Society for Testing and Materials, ASTM.*

**ASTM D7066-04 (2011).** Standard Test Method for dimer/trimer of chlorotrifluoroethylene (S-316) Recoverable Oil and Grease and Nonpolar Material by Infrared Determination. *American Society for Testing and Materials, ASTM.*

**ASTM E542-01 (2007).** Standard practice for calibration of laboratory volumetric apparatus. *American Society for Testing and Materials, ASTM.*

- ASTM E691 (2009).** Standard Practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method. *American Society for Testing and Materials, ASTM.*
- Ayuntamiento de Valladolid (2006).** Reglamento del servicio municipal de abastecimiento de agua potable y saneamiento. *B.O.P. de Valladolid* 95, 2926.  
<http://www.diputaciondevalladolid.es/bop/>
- Báguena J., Blanco M. J. (2006).** Gestión de equipos en los laboratorios de análisis químico. *Afinidad* 63, 7-12.
- Bagur G., Sánchez-Viñas M., Gazquez D., Ortega M., Romero R. (2005).** Estimation of the uncertainty associated with the standard addition methodology when a matrix effect is detected. *Talanta* 66, 1168-1174.
- Bailón Pérez M., Cuadros Rodríguez L., Gómez Sáez, A. (2005).** Bases para un procedimiento para la calibración y verificación de material volumétrico en laboratorios agroalimentarios. *Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. IBEROLAB III.*  
<http://www.iberolab.org/>
- Barroso M., Gallardo E., Margalho C., Monsanto P., Vieira D.N. (2006).** Analytical approach to determine ticlopidine in post-mortem blood. *Forensic Sci. Int.* 162, 121-125.
- Barwick V. J., Ellison, L. R. (1998).** Project 3.2.1 Development of measurement uncertainty principles. Part (d) Protocol for uncertainty evaluation from validation data. LGC/VAM/1998/088.
- Barwick V. J., Ellison S. L. R. (2000a).** The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part 1: Description of a laboratory protocol. *Accred. Qual. Assur.* 5, 47-53.
- Barwick V. J., Ellison S L R., Rafferty M. J. Q., Gill R. S. (2000b).** The evaluation of measurement uncertainty from method validation studies Part 2: The practical application of a laboratory protocol. *Accred. Qual. Assur.* 5, 104-113.
- Basilicata P., Miraglia N., Pieri M., Acampora A., Soleo L., Sannolo N. (2005).** Application of the standard addition approach for the quantification of urinary benzene *Journal of Chromatography B* 818, 293–299.
- Batista E., Pinto L., Filipe E., Van der Veen A. M. (2007).** Calibration of micropipettes: test method and uncertainty analysis. *Measurement* 40, 338-342.
- Becerra Santiago, L. O., Guardado González M. E. (2001).** Estimación de la incertidumbre en la determinación de la densidad del aire. CENAM.  
<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/>
- Bedson P., Sargent M. (1996).** The development and application of guidance on equipment qualification of analytical instruments. *Accred. Qual. Assur.* 1, 265-274.

**Bell S. (2001).** A beginner's guide to uncertainty in measurement. Measurement good practice guide Nº 11, *National Physics Laboratory, NPL*.

[http://publications.npl.co.uk/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?&QB0=AND&QF0=ID&QI0=%202284%20&TN=NPLPUBS&RF=WFullRecordDetails&DL=0&RL=0&NP=4&AC=QBE\\_QUERY](http://publications.npl.co.uk/dbtw-wpd/exec/dbtwpub.dll?&QB0=AND&QF0=ID&QI0=%202284%20&TN=NPLPUBS&RF=WFullRecordDetails&DL=0&RL=0&NP=4&AC=QBE_QUERY)

**Bennett K. (2005).** Metrology Concepts: Understanding Test Uncertainty Ratio (TUR).

<http://www.transcat.com/PDF/TUR.pdf>

**Bettencourt da Silva R. J., Camoes M. F., Seabra e Barros J. (1999).** Validation and quality control schemes based on the expression of results with uncertainty. *Anal. Chim. Acta*, 393, 167-175.

**BIMP (2008).** International vocabulary of metrology — Basic and general concepts and associated terms. 3<sup>rd</sup> ed. JCGM 200:08. *Bureau International des Poids et mesures, BIMP*.

<http://www.bipm.org/en/publications/guides/vim.html>

**Birch W. (2003).** Measurement Good Practice Guide Nº 36. Estimating Uncertainties in Testing. *British Measurement and Testing Association, BMTA*.

<http://www.demarcheiso17025.com/documents/BMTA%20-%20Guide%20N%20B036%20-%20Estimating%20Uncertainties%20in%20Testing.pdf>

**Blaubrand (2004).** Aparatos volumétricos y picnómetros, con certificado de conformidad. Instrucciones de calibrado (SOP).

[http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP\\_BLAUBRAND\\_ES.pdf](http://www.brand.de/fileadmin/user/pdf/SOPs/SOP_BLAUBRAND_ES.pdf)

**Blues J., Bayliss D., Buckley M. (2004).** The use and calibration of piston-operated volumetric pipettes. National Physical Laboratory, *NPL*.

[http://resource.npl.co.uk/docs/science\\_technology/mass\\_force\\_pressure/clubs\\_groups/instmco\\_weighing\\_panel/pistpipettes.pdf](http://resource.npl.co.uk/docs/science_technology/mass_force_pressure/clubs_groups/instmco_weighing_panel/pistpipettes.pdf)

**Bocca B., Mattei D., Pino A., Alimonti A. (2010).** Uncertainty evaluation in the analysis of biological samples by sector field inductively coupled plasma mass spectrometry. Part B: measurements of Be, Cd, Hg, Ir, Pb, Pd, Pt, Rh, Sb, U, Tl and W in human serum. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2363-2369.

**Bodecchi L. M., Cocchi M., Malagoli M., Manfredini M., Marchetti A. (2005).** Application of infrared spectroscopy and multivariate quality-control methods in PVC manufacturing. *Anal. Chim. Acta*. 554, 207-217.

**Bonet-Domingo E., Escuder-Gilabert L., Medina-Hernández J. M., Sagrado S. (2006).** Uncertainty-Based internal quality control. Harmonization consideration. *Anal. Chem.* 78, 8113-8120.

**Bonet-Domingo E., Grau-González E., Martín-Biosca Y., Medina-Hernández M. J., Sagrado S. (2007).** Harmonized internal quality aspects of a multi-residue method for determination of forty-six semivolatile compound in water by stir-bar-sorptive

- extraction-thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bianal. Chem.* 387, 2537-2545.
- Bonilla Campos J., Quintanilla Mata J., Balandrón Rodríguez, B., Diez Ranera J. (2001).** Validación de una metodología para la determinación de nitratos en aguas continentales superficiales por cromatografía iónica. *Primer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. IBEROLAB I.*
- <http://www.iberolab.org/>
- Boqué R. (2005).** La selectividad en análisis químico. *Técnicas de Laboratorio*, 299, 114-117.
- <http://www.quimica.urv.es/quimio/general/selectividad.pdf>
- Boqué R., Maroto A., Rius X. (2002).** Validation of analytical methods. *Grasas y aceites*, 53, 128-143.
- Boti V.I., Sakkas V.A., Albanis T.A. (2007).** Measurement uncertainty arising from trueness of the analysis of two endocrine disruptors and their metabolites in environmental samples Part I: Ultrasonic extraction from diverse sediment matrices. *Journal of Chromatography A* 1146, 139-147.
- Boyer K., Horwitz W., Albert R. (1985).** Interlaboratory variability in trace element analysis. *Anal. Chem.* 57, 454-459.
- Brüggemann L., Morgenstern P., Wennrich R. (2010).** Comparison of international standards concerning the capability of detection for analytical methods. *Accred. Qual. Assur.* 15, 99-104.
- Brüggemann L., Quapp W., Wennrich R. (2006).** Test for non-linearity concerning linear calibrated chemical measurements. *Accred. Qual. Assur.* 11, 625-631.
- Burke R. W., Mavrodineanu R. (1983).** Accuracy in Analytical Spectrophotometry. NBS special publication. *National Bureau of Standards, Special publication 260-81. National Institute of Standards and Technology, NIST.*
- <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-81.PDF>
- Burns D. T., Danzer K., Townshend A. (2002).** Use of the terms “Recovery” and “Apparent recovery” in analytical procedures. *Pure & Appl. Chem.* 74, 2201-2205.
- Cámara C., Fernández P., Martín-Estebar A., Pérez-Conde C., Vidal C. (2002).** Toma y tratamiento de muestras. Síntesis, Madrid, España.
- Carril M. P., Corbillón M. S., Madariaga J. (1997).** Validation of an analytical method to determine trace metal impurities in fluoride compounds by flame atomic absorption spectroscopy. *Accred. Qual. Assur.* 2, 301-308.
- CEM ME-005 (s.f.).** Procedimiento de calibración para la calibración de balanzas monoplato. *Centro Español de Metrología, CEM.*
- <http://www.cem.es/sites/default/files/me-005e.pdf>

**CEM QU-004 (s.f.).** Procedimiento de calibración de cromatógrafos de alta resolución (HPLC). *Centro Español de Metrología, CEM.*

[http://www.cem.es/sites/default/files/qu-004\\_digital.pdf](http://www.cem.es/sites/default/files/qu-004_digital.pdf)

**CENAM-EMA (2009).** Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en los servicios de calibración de recipientes volumétricos por el método gravimétrico.

<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/>

**CGA-ENAC-LEC (2009).** Criterios generales para la acreditación de laboratorios de ensayo y calibración según norma UNE-EN ISO/IEC 17025, rev 5. *Entidad Nacional de Acreditación, ENAC.*

<http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga>

**Chan C. C., Lam H., Lee Y. C., Zhang Z. M. (Eds.) (2004).** Analytical method validation and instrument performance verification. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA.

**Chew G., Walczyk T. (2012).** A Monte Carlo approach for estimating measurement uncertainty using standard spreadsheet software. *Anal. Bioanal. Chem.* 402, 2463-2469.

**CI-ENAC-BLP (2008).** La aplicación de los principios de buenas prácticas de laboratorio a los estudios de campo, rev 2. *Entidad Nacional de Acreditación, ENAC.*

<http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga>

**Clare J. F. (2005).** Calibration of UV-vis spectrophotometers for chemical analysis. *Accred. Qual. Assur.* 10, 283-288.

**Clark, J. (s.f.).** Evaluation of methods for estimating the uncertainty of electronic balance measurements. (W. S. Company, Ed.).

<http://sti.srs.gov/fulltext/ms9900958/ms9900958.html>

**Comisión Europea (1967).** Directiva del consejo 67/548/CEE de 27 de junio de 1967 relativa a la aproximación de las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas en materia de clasificación, embalaje y etiquetado de las sustancias peligrosas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE*, 13 vol. 01 50-149.

**Comisión Europea (1998a).** Directiva 98/53/CE de la comisión de 16 de julio de 1998 por la que se fijan métodos de toma de muestras y de análisis para el control oficial del contenido máximo de algunos contaminantes en los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE*, L201/93.

**Comisión Europea (1998b).** BCR information. Report EUR 18405 EN Metrology in chemistry and biology: a practical approach. Comisión Europea, Bélgica.

**Comisión Europea (1999).** Recomendación de la comisión 1999/333/EC relativa a un programa comunitario de control para 1999 destinado a garantizar el respeto de los contenidos máximos de residuos de plaguicidas en determinados productos de

- origen vegetal, incluidas frutas y hortalizas. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE*, L128/25.
- Comisión Europea (2002).** Decisión de la Comisión (EC) no 657/2002 del 12 Agosto por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas, DOCE*, L221/8.
- Comisión Europea (2009).** JRC Scientific and Technical Report. EUR 24105 EN Guidelines for performance criteria and validation procedures of analytical methods used in controls of food contact materials. European Commission, Joint Research Centre, Institute for Health and Consumer Protection.
- Committee E-11 on Quality and Statistics (2002).** Manual on presentation of data and control chart analysis. 7<sup>th</sup> ed. ASTM International, West Conshohocken, Pensilvania.
- Companyó R., Rubio R., Sahuquillo A., Boqué R., Maroto A., Riu J. (2008).** Uncertainty estimation in organic elemental analysis using information from proficiency tests. *Anal. Bioanal. Chem.* 392, 1497-1505.
- Compañó Beltrán R., Ríos Castro A. (2002).** Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos. Síntesis, Madrid, España.
- Coplen T. B. (2001).** Atomic weights of elements 1999. *Pure & Appl. Chem.* 73, 667-683.
- Cowles J., Daily, S., Ellison S., Hardcastle W., Williams C. (2001).** Experimental sensitivity analysis applied to sampled preparation uncertainties: are ruggedness test enough for measurement uncertainty estimates?. *Accred. Qual. Assur.* 6, 368-371.
- Croarkin C. (2010).** Engineering statistics handbook. Quantifying uncertainties from a gauge study. *National Institute of Standards and Technology, NIST*.  
<http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/mpc/section4/mpc46.htm>
- Cuadros Rodríguez L., Almansa López E.M., García Campaña A.M., González Casado A., Egea González F.J., Garrido Frenich A., Martínez Vidal J.L. (2005).** Setting up of recovery profiles: A tool to perform the compliance with recovery requirements for residue analysis. *Talanta* 66, 1063-1072.
- Cuadros Rodriguez L., Gámiz Gracia L., Almansa López E. (2001a).** Calibration in chemical measurement processes: I. A metrological approach. *TrAC*. 20, 195-206.
- Cuadros Rodríguez L., Gámiz Gracia L., Almansa-López E. M., Bosque Sendra J. M. (2001b).** Calibration in chemical measurement processes. II. A methodological approach. *TrAC* 20, 620-636.
- Currie L. (1995).** Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. *Pure & Appl. Chem.* 67, 1699-1723.

- Daghbouche Y., Garrigues S., Morales-Rubio A., de la Guardia M. (1997).** Evaluation of extraction alternatives for Fourier transform infrared spectrometric determination of oil and greases in water. *Anal. Chim. Acta.* 345, 161-171.
- Damasceno J. C. , Borges R. M. H., P R G Couto P. R. G., Ordine A. P., Getrouw M. A., Borges P. P., Fraga I. C. S. (2006).** Estimation of primary pH measurement uncertainty using Monte Carlo simulation. *Metrologia* 43, 306-310.
- Damen C. W. N., de Groot E. R., Heij M., Boss D. S., Schellens J. H. M., Rosing H, Beijnen J. H., Aarden L. A. (2009).** Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of trastuzumab in human serum and plasma. *Analyt. Biochem.* 391, 114-120.
- Danzer K., Currie L. A. (1998).** Guidelines for calibration in analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.* 70, 993-1014.
- Davis R. S. (1992).** Equation for the Determination of the Density of Moist Air (1981/91). *Metrologia* 29, 67-70.
- De Beer J. O., De Beer T. R., Goeyens L. (2007a).** Assessment of quality performance parameters for straight line calibration curves related to the spread of the abscissa values around their mean. *Anal. Chim. Acta* 584, 57-65.
- De Beer T. R. M., Baeyens W. R. G., Vermeire A., Broes D., Remon J. P., Vervaet C. (2007b).** Raman spectroscopic method for the determination of medroxyprogesterone acetate in a pharmaceutical suspension: validation of quantifying abilities, uncertainty assessment and comparison with the high performance liquid chromatography reference method. *Anal. Chim. Acta* 589, 192-199.
- de la Mata Espinosa P., Cuadros Rodríguez L., Bosque Sendra J. M., Rodríguez García F. P., (2007).** Potencialidad del esquema de Youden para la evaluación del desempeño de laboratorios mediante estudios de aptitud. *Tercer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. IBEROLAB IV.*
- <http://www.iberolab.org/>
- de Laeter J. R., Bohlke J. K., de Bievre P., Hidake H., Peiser H. S., Rosman, K. J., Taylor P.D.P. (2003).** Atomic weights of elements: review 2000. *Pure & Appl. Chem.* 75, 683-800.
- Dehouck P., Vander Heyden Y., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., Crommen J., Hubert Ph., Marini R.D., Smeets O.S.N.M., Decristoforo G., Van de Wauw W., De Beer J., Quaglia M.G., Stella C., Veuthey J.-L., Estevenon O., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J. (2003a).** Determination of uncertainty in analytical measurements from collaborative study results on the analysis of a phenoxymethylpenicillin sample. *Anal. Chim. Acta* 481, 261-272.
- Dehouck P., Vander Heyden Y., Smeyers-Verbeke J., Massart D. L., Marini R.D., Chiap P., Hubert Ph., Crommen J., Van de Wauw W., De Beer J., Cox R., Mathieu G.,**

- Reepmeyer J.C., Voigt B., Estevenon O., Nicolas A., Van Schepdael A., Adams E., Hoogmartens J. (2003b).** Interlaboratory study of a liquid chromatography method for erythromycin: determination of uncertainty. *Journal of Chromatography A* 1010, 63-74.
- Dejaegher B., Vander Heyden Y. (2007).** Ruggedness and robustness testing. *Journal of Chromatography A* 1158, 138-157.
- Delgado G., Hernández N. (2009).** Cálculo de la incertidumbre por simulación de Monte Carlo en la determinación de aflatoxina B1 en maní de exportación por HPLC-FD. Aplicación a la evaluación de la conformidad. Parte II. *Universitas* 3, 16-26.
- Den Boef G., A. Hulanicki A. (1983).** Recommendations for the usage of selective, selectivity and related terms in analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.* 55, 553-556.
- Desenfant M., Priel M. (2006).** Road map for measurement uncertainty evaluation. *Measurement* 39, 841-848.
- Detaille R., Maetz P. (2006).** Practical uses of proficiency testing as valuable tools for validation and performance assessment in environmental analysis *Accred. Qual. Assur.* 11, 408-413.
- Dias M. G., Camões M. F., Oliveira L. (2008).** Uncertainty estimation and in-house method validation of HPLC analysis of carotenoids for food composition data production. *Food Chem.* 109, 815-824.
- Díaz-Guerra González J. P., Quejido Cabezas A. J., Simón Arauzo M. A., Rucandio Saez M. I., Pérez Pastor R., Sánchez Ledesma D. M., Santamaría Martín J. (2000).** Calidad Total y acreditación en química analítica. CIEMAT, Madrid, España.
- Dincel A., Basci N. E., Atilla H., Bozkurt A. (2007).** Development and validation of an HPLC-UV-Vis method for determination of proparacaine in human aqueous humour. *Chromatographia* 66, S51-S56.
- Drolc A., Pintar A. (2011).** Measurement uncertainty evaluation and in-house method validation of the herbicide iodosulfuron-methyl-sodium in water samples by using HPLC analysis. *Accred. Qual. Assur.* 16, 21-29.
- EA-3/04 (2001).** Use of Proficiency Testing as a Tool for Accreditation in Testing. EA, European co-operation for accreditation.  
<http://www.european-accreditation.org/publication/ea-3-04-g>
- EA-4/02 (1999).** Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration. EA, European co-operation for accreditation.  
<http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-02-m>
- EA-4/16 (2003).** EA Guidelines on the expression of uncertainty in quantitative testing. EA, European co-operation for accreditation.

<http://www.european-accreditation.org/publication/ea-4-16-g>

- Egea-González F., Hernández Torres M., Garrido French A., Martínez Vidal J., García Campaña A. (2004).** Internal quality-control and laboratory-management tools for enhancing the stability of results in pesticide multi-residue analytical methods. *TrAC*. 23, 361-369.
- Eith C., Kolb M., Rumi A., Seubert A., Viehweger K. H. (2007).** Monograph. Practical Ion Chromatography: an introduction, 2<sup>nd</sup> ed. Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland.  
<http://www.metrohm.com/com/Applications/literature/monographs.html?identifier=87925013&language=en&name=87925013>
- Ellison S. L. R. (1998).** ISO uncertainty and collaborative trial data. *Accred. Qual. Assur.* 3, 95-100.
- Ellison S. L. R., Barwick V. J. (1998).** Estimating measurement uncertainty: reconciliation using a cause and effect approach. *Accred. Qual. Assur.* 3, 101-105.
- Ellison S. L. R., Grimes N., Fardus F., Ellison M. P. L. (2012).** Use of a replicated Latin square design in a homogeneity test for high purity organic melting point standards. *Accred. Qual. Assur.* 17, 283-290.
- Ellison S. L. R., Williams A. (1998).** Measurement uncertainty and its implications for collaborative study method validation and method performance parameters. *Accred. Qual. Assur.* 3, 6-10.
- EMA (2011).** Guideline on validation of bioanalytical methods. Committee for medicinal products for human use (CHMP). European medicines agency.  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2011/08/WC500109686.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf)
- Eppe G., De Pauw E. (2009).** Advances in quality control for dioxins monitoring and evaluation of measurement uncertainty from quality control. *Journal of Chromatography B* 877, 2380-2387.
- Eppe G., Van Cleuvenbergen R., Smastuen L., Boulager H. B., Becher G., de Paw E. (2008).** Empirical relationship between precision and ultra-trace concentrations of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs in biological matrices. *Chemosphere* 71, 379-387.
- Ermer J., Ploss H. J. (2005).** Validation in pharmaceutical analysis. Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 859-870.
- Esters V., Angenot L., Brandt V., Frédéric M., Tits M., Van Neruma C., Wauters J. N., Hubert P. (2006).** Validation of a high-performance thin-layer chromatography/densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement. *Journal of Chromatography A* 1112 156-164.

**Eurachem/Citac (1998).** The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics.

<http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>

**Eurachem/Citac (2002).** Guide to Quality in Analytical Chemistry. An Aid to Accreditation.

<http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>

**Eurachem/Citac (2011).** Terminology in analytical measurement introduction to VIM 3.

<http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>

**Eurachem/Citac (2012).** Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement 3<sup>rd</sup> ed. QUAM:2012.P1.

<http://www.eurachem.org/index.php/publications/guides>

**EURAMET/cg-18/v.02 (2009)** Guidelines on the calibration of nonautomatic weighing instruments. *EURAMET, European Association of National Metrology Institutes.*

[http://www.euramet.org/fileadmin/docs/Publications/calguides/previous\\_versions/EURAMET-cg-18-02\\_Non-Automatic\\_Weighing\\_Instruments.pdf](http://www.euramet.org/fileadmin/docs/Publications/calguides/previous_versions/EURAMET-cg-18-02_Non-Automatic_Weighing_Instruments.pdf)

**Eurolab (2002).** Eurolab technical report No1/2002. Measurement uncertainty in testing. A short introduction on how to characterize accuracy a list of useful references.

<http://www.eurolab.org/publications.aspx?FileTypeID=7>

**Eurolab (2006).** Eurolab Technical report No 1/2006. Guide to the evaluation of measurement uncertainty for quantitative test results.

<http://www.eurolab.org/publications.aspx?FileTypeID=7>

**Eurolab (2007).** Eurolab Technical report No 1/2007. Measurement uncertainty revisited: alternative approaches to uncertainty evaluation.

<http://www.eurolab.org/publications.aspx?FileTypeID=7>

**Fajgeli A., Ambrus A. (Eds.) (2000).** Principles and practices of Method Validation. Royal Society of Chemistry. MPG Books Ltd, Cornwall, UK.

**FDA (2000).** Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.

<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

**FDA (2001).** Guidance for industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration.

<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/default.htm>

**Feinberg M., Boulanger B., Dewé W., Hubert P. (2004).** New advances in method validation and measurement uncertainty aimed at improving the quality of chemical data. *Anal. Bioanal. Chem.* 380, 502-514.

- Findlay J. W. A., Smith W. C., Lee J. W., Nordblom G. D., Das I., DeSilva B. S., Khan M. N., Bowsher R. R. (2000).** Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, 1249-1273.
- Fisicaro P., Amarouche S., Lalere B., Labarraque G., Priel M. (2008).** Approaches to uncertainty evaluation based on proficiency testing schemes in chemical measurements. *Accred. Qual. Assur.* 13, 361-366.
- Funk W., Dammann V., Donnevert G., (2007).** Quality Assurance in Analytical Chemistry, 2<sup>nd</sup> ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Fustinonia S., Campo L., Mercadante R., Manini P. (2010).** Methodological issues in the biological monitoring of urinary benzene and S-phenylmercapturic acid at low exposure levels. *Journal of Chromatography B* 878, 2534-2540.
- Gao Z., He X., Zhang G., Li Y., Wu, X. (1999).** Investigation on relationship between analytical precision and concentration with iteratively reweighted least-square linear regression method. *Talanta* 49, 331-337.
- García Campaña A. M., Cuadros Rodríguez L., Alés Barrero F., Román Ceba M., Sierra Fernandez J. L. (1997).** ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology. *TrAC.* 16, 381-385.
- G-ENAC-14 (2008).** Guía sobre la participación en programas de intercomparaciones, rev 1. *Entidad Nacional de Acreditación, ENAC.*
- <http://www.enac.es/web/enac/documentos-descarga>
- Gläser M. (1999).** Change of the apparent mass of weights arising from temperature differences. *Metrologia* 36, 183-197.
- Gluschke M., Wellmitz J., Lepom P. (2004).** A case Study in the practical estimation of measurement uncertainty. *Accred. Qual. Assur.* 10, 107-111.
- González A. G., Herrador M.A. (2007a).** A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC.* 26, 227-238.
- González A. G., Herrador M. A. (2007b).** The assessment of electronic balances for accuracy of mass measurement in analytical laboratories. *Accred. Qual. Assur.* 12, 21-29.
- González A. G., Herrador M. A., Asuero A. G. (2005).** Estimation of the uncertainty of mass measurement from in-house calibrated analytical balances. *Accred. Qual. Assur.* 10, 386-391.
- González A. G., Herrador M. A., Asuero A. G., Sayago A. (2006).** The correlation coefficient attacks again. *Accred. Qual. Assur.* 11, 256-258.
- Grize Y.L. (1995).** A review of robust process design approaches. *J. Chemon.* 9, 239-262.

- Guevara-Riba A., Sahuquillo. A., López-Sánchez J. F., Rubio R. (2006).** Comparison of three strategies to evaluate uncertainty from in-house validation data. A case study: mercury determination in sediments. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1298-1303.
- Gutierrez Pulido H., de la Vara Salazar R. (2012).** Análisis y diseño de experimentos, 3<sup>a</sup> ed. McGraw-Hill. Mexico D.F.
- Hatambeygi N., Abedi G., Talebi M. (2011).** Method development and validation for optimised separation of salicylic, acetyl salicylic and ascorbic acid in pharmaceutical formulations by hydrophilic interaction chromatography and response surface methodology. *Journal of Chromatography A* 1218, 5995-6003.
- Haouet M. N., Altissimi S. M., Galarini R. (2006).** Validation of the volhard for chloride determination in food. *Accred. Qual. Assur.* 11, 23-28.
- Hartmann C., Smeyers-Verbeke J., Penninckx W., Vander Heyden Y., Vankeerberghen P., and Massart D. L. (1995).** Reappraisal of Hypothesis Testing for Method Validation: Detection of Systematic Error by Comparing the Means of Two Methods or of Two Laboratories. *Anal. Chem.* 67, 4491-4499.
- Hellma (2010).** Product catalogue. Bestellers.  
[http://www.hellmahispania.com/frontend/hellmahispania/noticia.php?id\\_noticia=143&id\\_seccion=72](http://www.hellmahispania.com/frontend/hellmahispania/noticia.php?id_noticia=143&id_seccion=72)
- Henderson A.R. (2006).** Information for authors: is the advice regarding the reporting of residuals in regression analysis complete? Should Cook's distance be included? *Clin. Chem.* 52, 1848-1850.
- Henderson I. K., Saari-Nordhaus R., Anderson J. M. (1991).** Sample preparation for ion chromatography by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 546, 61-71.
- Herrador M. A, González A. G. (2004).** Evaluation of measurement uncertainty in analytical assays by means of Monte-Carlo simulation. *Talanta* 64, 415-422
- Heydorn K. (2006).** The determination of an accepted reference value from proficiency data with stated uncertainties. *Accred. Qual. Assur.* 10, 479-484.
- Hibbert D. B. (2007).** Systematic errors in analytical measurement results. *Journal of Chromatography A* 1158, 25-32.
- Hlavay J., Polyak K. (2001).** Evaluation of combined measurement uncertainty of the determination of Mn content in sediment samples. *Accred. Qual. Asur.* 6, 310-316.
- Holcombe, D.G., Boardman, M.C. (2001).** Guidance on equipment qualification of analytical instruments: UV-visible spectro (photo)meters (UV-Vis). *Accred. Qual. Assur.* 6, 468-478.
- Horwitz W. (1982).** Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs. *Anal. Chem.* 54, 67A-77A.

- Horwitz W. (1988).** Protocol for the design, conduct and interpretation of collaborative studies. *Pure & Appl. Chem.*, 60, 855-864.
- Horwitz W. (1995).** Protocol for design, conduct and interpretation of method-performance studies. *Pure & Appl. Chem.* 67, 331-343.
- Houng J-Y., Hsu H-F., Liu Y-H, Wu J-Y. (2003).** Applying the Taguchi robust design to the optimization of the asymmetric reduction of ethyl 4-chloro acetoacetate by bakers' yeast. *J. Biotechnol* 100, 239-250.
- Hubert L. (2007).** Validation And Qualification in Analytical Laboratories. 2<sup>nd</sup> ed. Informa Healthcare USA, Inc. New York.
- Hubert P., Nguyen-Huu J. J., Boulanger, B., Chapuzet E., Chiap P., Cohen N., Compagnon P. A., Dewé W., Feinberg M., Lallier M., Laurentie M., Mercier N., Muzard G., Nivet C., Valat L. (2004).** Harmonization of strategies for the validation of quantitative analytical procedures A SFSTP proposal—Part I. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36, 579-586.
- Huertas C., Morillo J., Usero J., García-Manarillo I. (2007).** Validation of stir bar sorptive extraction for the determination of 24 priority substances from the European Water Framework Directive in estuarine and sea water. *Talanta*, 72, 1149-1156.
- Hund E., Massart D. L., Smeysters-Verbeke J. (2000).** Inter-laboratory studies in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 423, 145-165.
- Hund E., Massart D. L., Smeysters-Verbeke J. (2001).** Operational definitions of uncertainty. *TrAC*. 20, 394-406.
- Hund E., Massart D. L., Smeysters-Verbeke J. (2003).** Comparison of different approaches to estimate the uncertainty of a liquid chromatographic assay. *Anal. Chim. Acta* 480, 39-52.
- ICH (2005).** ICH Topic Q 2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- ILAC-G17 (2002).** Introducing the concept of Uncertainty of Measurement in Testing in Association with the application of the Standard ISO/IEC 17025.  
[http://www.ilac.org/documents/ILAC\\_G17-2002\\_intro\\_the\\_concept\\_of\\_uncert\\_meas\\_with\\_17025.pdf](http://www.ilac.org/documents/ILAC_G17-2002_intro_the_concept_of_uncert_meas_with_17025.pdf)
- ILAC-G24 (2007).** Guidelines for the determination of calibration intervals of measuring instruments.  
[http://www.ilac.org/documents/ILAC\\_G24\\_2007.pdf.](http://www.ilac.org/documents/ILAC_G24_2007.pdf)

- Inczyd J., Lengyel T., and Ure A.M, (1997).** Compendium of Analytical Nomenclature, (definitive rules 1997) - The Orange Book, 3<sup>rd</sup> ed. *International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC.* Blackwell Science, Oxford, UK.  
<http://old.iupac.org/publications/books/author/inczyd.html>
- Ingrand V., Guinamant, J. L., Bruchet, A., Brosse, C., Noij T. H. M., Brandt A., Sacher F., McLeod C., Elwaer A. R., Croué J. P., Quevauviller P. (2002).** Determination of bromate in drinking water: development of laboratory and field methods. *TrAC.* 21, 1-12.
- Ishikawa K. (1991).** Introducción al control de calidad. Díaz de Santos, Madrid, España.
- ISO 8466-1 (1990).** Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO 8466-2 (2001).** Water quality -- Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics -- Part 2: Calibration strategy for non-linear second-order calibration functions. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO 11843-1 (1997).** Capability of detection. Part 1: Terms and definitions. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO 11095 (1996).** Linear calibration using reference materials. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO 13528 (2005).** Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO 16269-4 (2010).** Statistical interpretation of data- Part 4: Detection and treatment of outliers. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO/TS 21748 (2004).** Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty estimation. *International Organization for Standardization, ISO.*
- ISO/TS 21749 (2005).** Measurement and uncertainty for metrological applications- Repeated measurement and nested experiments. *International Organization for Standardization, ISO.*
- JCGM 100 (2008). (1995).** Evaluation of measurement data. Guide to the expression of uncertainty in measurement. *Joint Committee for Guides in Metrology.*  
[http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_100\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_100_2008_E.pdf)
- JCGM 101 (2008).** Evaluation of measurement data – Supplement 1 to the “Guide to the expression of uncertainty in measurement” – Propagation of distributions using a Monte Carlo method. *Joint Committee for Guides in Metrology.*  
[http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM\\_101\\_2008\\_E.pdf](http://www.bipm.org/utils/common/documents/jcgm/JCGM_101_2008_E.pdf)

- Jiménez-Chacón J., Álvarez-Prieto M. (2009).** Modeling uncertainty in a concentration range. *Accred. Qual. Assur.* 14, 15-27.
- Jones F. E., Harris Georgia L. (1992).** Density of water formulation for volumetric standard calibration. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Tech.* 97, 335-340.
- Kaminski L., Degenhardt M., Ermer J., Feußner C., Höwer-Fritzen H., Link P., Renger B., Tegtmeieri M., Wätzig H. (2010).** Efficient and economic HPLC performance qualification. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51, 557-564.
- Karami H., Mousavi M.F., Shamsipur M. (2003).** New flow injection potentiometric graphite coated ion-selective electrode for the determination of VO<sub>2+</sub> ions. *Anal. Chim. Acta* 481, 213-219.
- Karnes H. T., March C. (1991).** Calibration and validation of linearity in chromatographic biopharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9, 911-918.
- Khan S., Ahmad A., Guo W., Wang Y. F., Abu-Qare A., Ahmad I. (2005).** A simple and sensitive LC/MS/MS assay for 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin (SN-38) in mouse plasma and tissues: application to pharmacokinetic study of liposome entrapped SN-38 (LE-SN38). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 135-142.
- King B. (2000).** The practical realization of the traceability of chemical measurements standards. *Accred. Qual. Assur.* 5, 429-436.
- Kirkup L., Mulholland M. (2004).** Comparison of linear and non-linear equations for univariate calibration. *Journal of Chromatography A* 1029, 1-11.
- Koch M., Bremser W., Köppen R., Krüger R., Rasenko T., Siegel D., Nehls I., (2011).** Certification of reference materials for ochratoxin A analysis in coffee and wine. *Accred. Qual. Assur.* 16, 429-437.
- Köhler A., Hellweg S., Escher B., Hungerbühler K. (2006).** Organic Pollutant Removal versus Toxicity Reduction in Industrial Wastewater Treatment: The Example of Wastewater from Fluorescent Whitening Agent Production. *Environ. Sci. Technol.* 40, 3395-3401.
- Kulikov A. U., Verushkin A. G., Loginova L. P. (2005).** Comparison of Micellar and Reversed-Phase Liquid Chromatography for Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim. *Chromatographia* 61, 455-463.
- Kuttatharmmakul S., Massart D. L., Smeyers-Verbeke J. (1999).** Comparison of alternative measurement methods. *Anal. Chim. Acta* 391, 203-225.
- La Guía Metas (2003).** Criterios para la declaración de conformidad.  
<http://www.metas.com.mx/guiametas/La-Guia-MetAs-03-06-Conf.pdf>
- Lau S., Stenstrom M. (1997).** Solid-phase extraction for oil and grease analysis. *Water Environ. Res.* 69, 368-373.

- Li X., Xu F., Wang J., Zhang C., Chen Y., Zhu S., Shen S. (2010).** Preparation of Fe-Cu catalysts and treatment of a wastewater mixture by microwave-assisted UV catalytic oxidation processes. *Environmental Technology* 31, 433-443.
- Liandi M. (2001).** Determination of the purity of potassium iodate by constant-current coulometry. *Accred. Qual. Assur.* 7, 163-167.
- Linsinger T. (2008).** Use of recovery and bias information in analytical chemistry and estimation of its uncertainty contribution. *TrAC.* 27, 916-923.
- López-Cacho J. M., González-Rodríguez P. L., Talero B., Rabasco A. M., González-Rodríguez M. L. (2012).** Robust Optimization of Alginate-Carbopol 940 Bead Formulations. *The Scientific World Journal*, Article ID 605610, 15 pages.
- López-Moreno C., Viera I., Urbano A. (2010).** Validation of an ion chromatographic method for the quantification of anions in water. *Desalination* 261, 111-116.
- Macii D. Carbone P., Petri D. (2003).** Management of Measurement Uncertainty for Effective Statistical Process Control. *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 52, 1611-1617.
- Magnusson B., Ellison S. L. R. (2008).** Treatment of uncorrected measurement bias in uncertainty estimation for chemical measurements. *Anal. Bioanal. Chem.* 390, 201-213.
- Magnusson B., Näykki T., Hovind H., Krysell M. (2011).** NT Tech report 537: Handbook for calculation of measurement uncertainty in environmental laboratories, rev 3.1. *Nordisk Innovations Center, NORDTEST.*
- [http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt\\_tr\\_537\\_ed3\\_1\\_English\\_Handbook%20for%20Calculation%20of%20Measurement%20uncertainty%20in%20environmental%20laboratories.pdf](http://www.nordtest.info/images/documents/nt-technical-reports/nt_tr_537_ed3_1_English_Handbook%20for%20Calculation%20of%20Measurement%20uncertainty%20in%20environmental%20laboratories.pdf)
- MAGRAMA (2008).** Guía práctica para el control de los dispositivos de seguimiento y medición en la industria conservera. Ministerio de agricultura alimentación y medioambiente, Gobierno de España.
- [http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/comercializacion-y-mercados-de-los-productos-de-la-pesca/gu09\\_tcm7-7046.pdf](http://www.magrama.gob.es/es/pesca/temas/comercializacion-y-mercados-de-los-productos-de-la-pesca/gu09_tcm7-7046.pdf)
- Mäkinen I. (2009).** Use of uncertainty estimates as reported by participants in proficiency testing for the evaluation of their results: pros and cons. *Accred. Qual. Assur.* 14, 35-41.
- MAPA (1993).** Métodos oficiales de análisis. 3. Dirección General de Política Alimentaria. *Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, MAPA.*
- Marengo, E., Liparota, M. C., Robotti, E., Bobba, M., Gennaro, M. C. (2005).** Monitoring of pigmented surfaces in accelerated ageing process by ATR-FT-IR spectroscopy and multivariate control chart. *Talanta*, 66, 1158-1167.

- Marengo E., Robotti E., Liparota M., Gennaro M. (2004).** Monitoring of pigmented and wooden surfaces in accelerated ageing process by FT-Raman spectroscopy and multivariate control chart. *Talanta* 63, 987-1002.
- Marinero P., Atienza J., Calvo C. (2003).** Implantación de un cromatógrafo de líquidos en un sistema de calidad. *Segundo Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios. IBEROLAB II.*
- <http://www.iberolab.org/>
- Marini R., Boulanger B., Vander Heyden Y., Chiap P., Crommen J., Hubert P. (2005a).** Uncertainty assessment from robustness testing applied on an LC assay for R-Timol and other related substances in S-Timolol maleate. *Anal. Chim. Acta* 531, 131-140.
- Marini R. D., Matthijs N, Vander Heyden Y., Smeysters-Verbeke J., Dehouck P., Hoogmartens J., Silvestre P., Ceccato A., Goedert P., Saevels J., Herbots C., Caliaro G., Herraez Hernández R., Verdu Andres J., Campins Falco P., Van de Wauw W., De Beer J., Boulanger B., Chiap P., Crommen J., Hubert P. (2005b).** Collaborative study of an liquid chromatographic method for the determination of R-timolol and other related substances in S-timolol maleate. *Anal. Chim. Acta* 546, 182-192.
- Maroto, A. (2002).** Tesis Doctoral: Incertidumbre en métodos analíticos de rutina. *Universidad Rovira y Virgili.*
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (1999a).** Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal. Chim. Acta* 391, 173-185
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (1999b).** Evaluating uncertainty in routine analysis. *TrAC* 18, 577-584.
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (2001a).** Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Anal. Chim. Acta* 440, 171-184.
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (2001b).** Incertidumbre y precisión. *Técnicas de Laboratorio* 266, 834-837.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/incert.pdf>
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (2001c).** Estimation of measurement uncertainty by using regression techniques and spiked samples. *Anal. Chim. Acta* 446, 133-145.
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (2002a).** Estrategias para el cálculo de la incertidumbre. *Técnicas de Laboratorio*, 270, 223-227.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/estinc.pdf>
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F. X. (2002b).** Cálculo de incertidumbre en medidas físicas: medida de una masa. *Técnicas de Laboratorio*, 275, 730-734.

<http://argo.urv.es/quimio/general/incmas.pdf>

- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F.X. (2002c).** Should non-significant bias be included in the uncertainty budget? *Accred. Qual. Assur.* 7, 90-94.
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Rius F.X. (2003).** Effect of non-significant proportional bias in the final measurement uncertainty. *Analyst* 128, 373-378.
- Maroto A., Boqué R., Riu J., Ruisánchez I., Ódena A. (2005).** Uncertainty in aflatoxin B1 analysis using information from proficiency tests. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 1562-1566.
- Maroto A., Riu J., Boqué R., Rius F. X. (1999).** Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal. Chim. Acta*, 391, 173-185.
- Massart D. L., Vandeginste B. G. M., Buydens L. M. C., de Jong S., Lewi P. J., Smeyers-Verbeke J. (1997).** Handbook of chemometrics and qualimetrics: Part A. Elsevier, Amsterdam, Holland.
- Masson P. (2007).** Quality control techniques for routine analysis with liquid chromatography in laboratories. *Journal of Chromatography A*, 1158, 168-173.
- Medina Pastor P., Mezcua M., Rodríguez Torreblanca C., Fernández Alba A. R. (2010).** Laboratory assessment by combined z score values in proficiency tests: experience gained through the European Union proficiency tests for pesticide residues in fruits and vegetables. *Anal. Bioanal. Chem.* 397, 3061-3070.
- Medina Pastor P., Valverde A., Pihlström T., Masselter S., Gamon M., Mezcua M., Rodríguez Torreblanca C., Fernández Alba A. R. (2011).** Comparative Study of the Main Top-down Approaches for the Estimation of Measurement Uncertainty in Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7609-7619.
- Meeravali N., Kumar S. (2000).** Comparison of open microwave digestion and digestion by conventional heating for the determination of Cd, Cr, Cu and Pb in algae using transverse heated electrothermal atomic absorption spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 313-315.
- Metrohm Ltd. (2011).** The column program. The world of ion chromatography. Our range of columns.  
<http://www.metrohm.com/com/Support/Literature/catalogs.html?prdName=80005055EN&prdLang=en-US&prdType=Dokware>.
- Mettler-Toledo (2000).** Balanzas en la gestión de calidad. Como elegir su balanza.  
<http://todometrologia.ucoz.com/balanza/BalanzasCalidad.pdf>
- Meyer V. R. (2003).** The uncertainty of atomic mass fractions in a molecule. *Anal. Bioanal. Chem.* 377, 775-778.

**Meyer V. R. (2007).** Measurement uncertainty. *Journal of Chromatography A* 1158, 15-24.

**Miller J. C., Miller J. N. (2002).** Estadística para química analítica, 4<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, Madrid, España.

**Mitra A. (1998).** Fundamentals of quality control and improvement, 2<sup>nd</sup> ed. Prentice Hall, New Jersey. USA.

**Montgomery D. C. (2005).** Introduction to Statistical Quality Control, 5<sup>a</sup> ed. Wiley, Hoboken, New Jersey, USA.

**Mosello R., Tartari G., Marcheto A., Polesello S., Bianchi M., Muntau H. (2004).** Ion chromatography performances evaluated from the third AQUACON freshwater analysis interlaboratory exercise. *Accred. Qual. Assur.* 9, 242-246.

**Muñoz M., Burón C. (2003).** Procedimiento para la calibración de material volumétrico. *Segundo Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad en Laboratorios, IBEROLAB II.*

<http://www.iberolab.org/>

**Muñoz Benito M. (2001).** Procedimiento para la validación de métodos de ensayo físico-químicos. *Primer Congreso Virtual Iberoamericano sobre Gestión de Calidad de Laboratorios, IBEROLAB I.*

<http://www.iberolab.org/>

**Mutton I., Boughtflower B., Taylor N., Brooke D. (2011).** The design and use of a simple System Suitability Test Mix for generic reverse phase high performance liquid chromatography-mass spectrometry systems and the implications for automated system monitoring using global software tracking. *Journal of Chromatography A* 1218, 3711-3717.

**Näykki T., Virtanen A., Leito I. (2012).** Software support for the Nordtest method of measurement uncertainty evaluation. *Accred. Qual. Assur.* 17, 603-612.

**Nguyen Minh Nguyet A., van Nederkassel A.M., Tallieu L., Kuttatharmmakul S., Hund E., Hu Y., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. (2004).** Statistical method comparison: short- and long-column liquid chromatography assays of ketoconazole and formaldehyde in shampoo. *Anal. Chim. Acta* 516, 87-106.

**Nogueira J. M., Serodio P. (2003).** Determination of the expiration date of chemical solution. *Accred. Qual. Assur.* 8, 231-234.

**OECD (1997).** ENV/MC/CHEM(98)17 Series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring. Nº1: Principles on Good Laboratory Practice. Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD.

<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/oecdseriesonprinciplesofgoodlaboratorypracticeandcompliancemonitoring.htm>

- Ohlsson K. E. A. (2012).** Uncertainty budget for multi-elemental analysis of plant nutrients in conifer foliar material using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). *Accred. Qual. Assur.* 17, 301-313.
- OILM (2004).** Weights of classes E1, E2, F1, F2, M1, M1-2, M2, M2-3 and M3. Part 1: Metrological and technical requirements. *Organisation Internationale Métrologie Légale, OILM.*
- <http://www.oiml.org/publications/R/R111-1-e04.pdf>
- Oles P.J. (1993).** Fractional factorial design approach for optimizing analytical methods. *J. AOAC international* 76, 615-620.
- Patel B. N., Sharma N., Sanyal M., Prasad A., Shrivastav P. S. (2008).** High-throughput LC-MS/MS assay for 6-methoxy-2-naphthylacetic acid, an active metabolite of nabumetone in human plasma and its application to bioequivalence study. *Biomed. Chromatogr.* 22, 1213-1224.
- Patriarca M., Chiodo F., Castelli M., Menditto A. (2006).** Estimates of uncertainty of measurement from proficiency testing data: a case study. *Accred. Qual. Assur.* 11, 474-480.
- Pau J. L., Boqué R., Rius F. X. (2001).** Calculo de la incertidumbre en las etapas preliminares de los métodos analíticos. *Primer Congreso Virtual Iberoamericano de Gestión de Calidad en los Laboratorios, IBEROLAB I.*
- <http://www.iberolab.org/>.
- Peace G.S. (1993).** Taguchi methods. A hands-on approach to quality engineering. Addison-Wesley, Reading, Massachusetts.
- Pérez M., Torrades F., Doménech X., Peral J. (2002).** Treatment of bleaching Kraft mill effluents and polychlorinated phenolic compounds with ozonation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 891-897.
- Phillips S. D., Eberhardt K. R., Parry B. (1997).** Guidelines for Expressing the Uncertainty of Measurement Results Containing Uncorrected Bias. *J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol.* 102, 577-585.
- PNUMA (2006).** Manual del Protocolo de Montreal relativo a las sustancias que agotan la Capa de Ozono, 7<sup>a</sup> edición. *Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, Secretaría del Ozono.*
- <http://ozone.unep.org/spanish/Publications/MP-Handbook-07-es.pdf>
- Prado M., Fumiére O., Boix A., Marien A., Berben G., von Holst C. (2009).** Novel approach for interlaboratory transfer of real-time PCR methods: detecting bovine meat and bone meal in feed. *Anal. Bioanal. Chem.* 394, 1423-1431.
- Prichard E., Barwick V. (2007).** Quality Assurance in Analytical Chemistry. Wiley, Cornwall, UK.

- Quintela M., Bágueña J., Gotor G., Blanco M.J. Broto F. (2012).** Estimation of the uncertainty associated with the results based on the validation of chromatographic analysis procedures: Application to the determination of chlorides by high performance liquid chromatography and of fatty acids by high resolution gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1223 107-117.
- Ramis Ramos G., García Alvarez-Coque M. C. (2001).** Quimiometría. Ed. Síntesis. Madrid, España.
- Reichmuth A. (2001).** Weighing accuracy. Estimating measurement bias & uncertainty of a weighing. *Mettler Toledo*.
- [http://ca.mt.com/dam/mt\\_ext\\_files/Editorial/Generic/7/Weigh\\_Uncertain\\_Number3\\_0x003d6750003db6700091740\\_files/weighing\\_accuracy.pdf](http://ca.mt.com/dam/mt_ext_files/Editorial/Generic/7/Weigh_Uncertain_Number3_0x003d6750003db6700091740_files/weighing_accuracy.pdf)
- Reichmuth A., Wunderli, S., Weber, M., Meyer V. R. (2004).** The uncertainty of weighing data obtained with electronic analytical balances. *Microchimi. Acta* 148, 133-141.
- Ribani M., Collins C. H., Bottoli C. B. G. (2007).** Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. *Journal of Chromatography A*, 1156, 201-205.
- Richter W. (1997).** Primary methods of measurement in chemical analysis. *Accred. Qual. Assur.* 2, 354-359.
- Riu J., Boqué R., Maroto A., Rius F. X. (2001a).** Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de una balanza. *Técnicas de Laboratorio*, 265, 732-734.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/calbal.pdf>
- Riu J., Boqué R., Maroto A., Riux F.X. Laso, J. (2001b).** Calibración de equipos de medida. *Técnicas de Laboratorio*, 260, 226-228.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/calibra.pdf>
- Riu J., Boqué R., Maroto A., Rius F. X. (2002).** Trazabilidad en medidas físicas mediante calibración directa: calibración de material volumétrico. *Técnicas de Laboratorio*, 269, 112-114.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/calvol.pdf>
- Rius F. X., Maroto A., Boqué R., Riu J. (2000).** La validación de métodos analíticos. *Técnicas de laboratorio*, 252, 382-385.
- <http://argo.urv.es/quimio/general/valida.pdf>
- Rodomonte A., L., Montinaro A., Bartolomei M. (2006).** Uncertainty evaluation in the chloroquine phosphate potentiometric titration: Application of three different approaches. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42, 56-63.
- Sacré P. Y., Deconinck E., Chiap P., Crommen J., Mansion F., Rozet E., Courselle P., De Beer J. O. (2011).** Development and validation of a ultra-high-performance liquid

- chromatography-UV method for the detection and quantification of erectile dysfunction drugs and some of their analogues found in counterfeit medicines *Journal of chromatography A* 1218, 6439-6447.
- Santosa S. R., Siswanta D., Sudiono S., Utarianingrum R. (2008).** Chitin-humic acid hybrid as adsorbent for Cr(III) in effluent of tannery wastewater treatment. *Applied Surface Science* 254, 7846-7850.
- Sarembaum J., Feinberg M. (2007).** Comparison of shelf-life appraisal techniques for the estimation of the limiting date of stability for agrifood reference materials. *Accred. Qual. Assur.* 12, 75-83.
- Satterthwaite F. E. (1941).** Synthesis of variance. *Psychometrika*, 6, 309-316.
- Schäfer H., Läubli M., Döring, R. (2003).** Monograph. Ion Chromatography: theory columns and eluents. Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland.  
<http://www.metrohm.com/com/Applications/literature/monographs.html?identifier=80145003&language=en&name=80145003>
- SEQC (2007).** Estudios interlaboratorio. *Sociedad española de bioquímica clínica y patología molecular.*  
[http://www.seqc.es/es/Varios/7/37/Modulo\\_3:\\_Estudios\\_interlaboratorio/](http://www.seqc.es/es/Varios/7/37/Modulo_3:_Estudios_interlaboratorio/)
- Schilling P., Powilleit M., Uhlig S. (2006).** Chlorophyll-a determination: results of an interlaboratory comparison. *Accred. Qual. Assur.* 11, 462-469.
- Shewiyo D.H., Kaale E., Risha P.G., Dejaegher B., Smeyers-Verbeke J., Vander Heyden Y. (2012).** HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 66, 11-23.
- Simonet B. (2005).** Quality control in qualitative analysis. *Trends Anal. Chem.* 24, 525-531.
- Skoog D. A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R., (2005).** Fundamentos de química analítica. 8<sup>a</sup> ed. Thompson, Madrid, España.
- Slingsby R., Kiser R. (2001).** Sample treatment techniques and methodologies for ion chromatography. *Trends Anal. Chem.* 20, 288-295.
- Slingsby R. W., Pohl C. A. (1996).** Approaches to sample preparation for ion chromatography Sulfate precipitation on barium-form ion exchangers. *Journal of Chromatography A* 739, 49-55.
- Solaguren-Beascoa M., Alegre J. M., Bravo P. M. (2009).** Implementation in MATLAB of the adaptive Monte Carlo method for the evaluation of measurement uncertainties. *Accred. Qual. Assur.* 14, 95-106.
- Sonnergaard J. M. (2006).** On the misinterpretation of the correlation coefficient in pharmaceutical sciences. *International Journal of Pharmaceutics* 321, 12-17.

- Soovali L., Room E. I., Kutt A., Kaljurand I., Leito I. (2006).** Uncertainty sources in UV-vis spectrophotometric measurement. *Accred. Qual. Assur.* 11, 246-255.
- Sousa A., Trancoso M. (2009).** Validation of an environmental friendly segmented flow method for the determination of phenol index in waters as alternative to the conventional one. *Talanta* 79, 796-803.
- Srinivas N., Narasu L., Shankar B. P., Mullangi R. (2008).** Development and validation of a HPLC method for simultaneous quantitation of gatifloxacin, sparfloxacin and moxifloxacin using levofloxacin as internal standard in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomed. Chromatogr.* 22, 1288-1295.
- Steinhoff P. J., Smith B. W., Warner D. W., Möller G. (1999).** Analysis of Interlaboratory Performance in the Determination of Total Selenium in Water. *Journal of AOAC International* 82, 1466-1473.
- Stover F. S., Brill R. V. (1998).** Statistical quality control applied to ion chromatography calibrations. *Journal of Chromatography A*, 804, 37-43.
- Suárez R., Horstkotte B., Duarte C. M., Cerdà V., (2012).** Fully-Automated Fluorimetric Determination of Aluminum in Seawater by In-Syringe Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Using Lumogallion. *Anal. Chem.* 84, 9462-9469.
- Svegl F., Suput Strupi J., Grabec Svegl I. (2006).** Proficiency testing of chloride content in different types of Portland cement. *Accred. Qual. Assur.* 11, 414-421.
- Synek V. (2005).** Attempts to include uncorrected bias in the measurement uncertainty. *Talanta* 65, 829-837.
- Taguchi G., Chowdhury S., Wu Y. (2005).** Taguchi's quality engineering handbook. Wiley, Hoboken, New Jersey.
- Taverniers I., Van Bockstaele E., De Loose M. (2004).** Trends in quality in the analytical laboratory. I. Traceability and measurement uncertainty of analytical results. *Trends Anal. Chem.* 23, 480-490.
- Taylor B. N, Kuyatt C. E. (1994).** Technical Note 1297: Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results. *National Institute of Standards and Technology, NIST*.
- <http://physics.nist.gov/Pubs/guidelines/TN1297/tn1297s.pdf>
- Teixeira P., Lopes H., Gulyurtlu I., Lapa N. (2012).** Uncertainty estimation to evaluate mass balances on a combustion system. *Accred. Qual. Assur.* 17, 159-166.
- Theodorou D., Meligotsidou L., Karavoltsos S., Burnetas A., Dassenakis M., Scoullos M. (2011).** Comparison of ISO-GUM and Monte Carlo methods for the evaluation of measurement uncertainty: Application to direct cadmium measurement in water by GFAAS. *Talanta* 83, 1568-1574.

- Thompson M. (2000).** Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentration in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst*, 125, 385-386.
- Thompson M. (2004).** The amazing Horwitz function. Analytical Methods Committee Technical Brief, AMCTB 17. *Royal Society of Chemistry*.  
[http://www.rsc.org/images/horwitz-function-technical-brief-17\\_tcm18-214859.pdf](http://www.rsc.org/images/horwitz-function-technical-brief-17_tcm18-214859.pdf)
- Thompson M. (2007).** Limitations of the applications of the Horwitz equation: a rebuttal. *TrAC*. 26, 659-661.
- Thompson M. (2008).** The estimation and use of recovery factors. Analytical Methods Committee Technical Briefs Recommendation, AMCTB 21A. *Royal Society of Chemistry*.  
[http://www.rsc.org/images/recovery-factors-technical-brief-21A\\_tcm18-214880.pdf](http://www.rsc.org/images/recovery-factors-technical-brief-21A_tcm18-214880.pdf)
- Thompson M., Ellison S. L. R. (2005).** A review of interference effects and their correction in chemical analysis with special reference to uncertainty. *Accred. Qual. Assur.* 10, 82-97.
- Thompson M., Ellison S. R. L., Fajgelj A., Willetts P., Wood R. (1999).** Harmonized guidelines for the use of recovery information in analytical measurement. *Pure & Appl. Chem.* 71, 337-348.
- Thompson M., Ellison S. R. L., Wood R. (2002).** Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. *Pure & Appl. Chem.* 74, 835-855.
- Thompson M, Ellison S. L. R., Wood R. (2006).** The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories. *Pure & Appl. Chem.* 78, 145-196.
- Trujillo Juárez S., Arias Romero R. (2007).** Incertidumbre en la calibración de un matraz volumétrico. *Centro Nacional de Metroología de México, CENAM*.  
<http://www.cenam.mx/publicaciones/gratuitas/>
- Tullols E., Ruisánchez I., Riux F., Huget J. (2005).** Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. *TrAC*. 24, 516-524.
- UNE 77004 (2002).** Calidad del agua. Determinación de la demanda química de oxígeno (DQO). Método del dicromato. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*.
- UNE 77037 (1983).** Método de análisis de agua en vertidos industriales. Determinación de aceite y grasa total recuperable. Método de extracción de Soxhlet. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*. Anulada el 25/01/01.
- UNE 77038 (1983).** Método de análisis de agua en vertidos industriales. Determinación de aceite y grasa total recuperable. Método de extracción con embudo de separación. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*. Anulada el 25/01/01.

**UNE 77053 (2002).** Calidad del agua. Determinación de fenoles. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-1 (1998).** Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 1: principios generales y definiciones. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-2 (1999).** Exactitud (Veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 2: Método básico para la determinación de la repetibilidad y la reproducibilidad de un método de medición normalizado. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-3 (1999).** Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 3: Medidas intermedias de la precisión de un método de medición normalizado. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-4 (1999).** Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 4: Métodos básicos para la determinación de la veracidad de un método de medición normalizado. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-5 (1999).** Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 5: Métodos alternativos para la determinación de la precisión de un método de medición normalizado. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82009-6 (1999).** Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición. Parte 6: Utilización en la práctica de los valores de exactitud. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 82133IN (2004).** Usos de los materiales de referencia certificados *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE 400301/1M (1999).** Vidrio para laboratorio. Vidrio volumétrico. Métodos de utilización y verificación de la capacidad. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.* Anulada el 15/09/10.

**UNE 400331 IN (2003).** Determinación de la incertidumbre para las mediciones de volumen realizadas utilizando el método gravimétrico. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN 872 (2006).** "Calidad del agua" Determinación de sólidos en suspensión. Método de filtración de fibra de vidrio. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN 12673 (1999).** Calidad del agua. Determinación de ciertos clorofenooles en agua por cromatografía de gases. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN 1899-1 (1998).** Calidad del agua. Determinación de la demanda bioquímica de oxígeno después de n días (DBOn). Parte 1: Método de dilución y siembra con

- adicción de alil tiourea. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 3696 (1996).** Agua para uso en análisis de laboratorio. Especificación y métodos de ensayo. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 4787 (2010).** Vidrio para laboratorio. Instrumentos volumétricos. Métodos para el ensayo de la capacidad y uso. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 5667-3 (2004).** Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Guía para la conservación y manipulación de las muestras de agua. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 7887 (2012).** Calidad del agua. Examen y determinación del color. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-1:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones de uso. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-1:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 1: Terminología, requisitos generales y recomendaciones de uso. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-2:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 2: Pipetas tipo pistón. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-2:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 2: Pipetas tipo pistón. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-3:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 3: Buretas tipo pistón. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-3:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 3: Buretas tipo pistón. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-4:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 4: Dilutores. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-4:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 4: Dilutores. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*
- UNE-EN ISO 8655-5:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 5: Dispensadores. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 8655-5:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 5: Dispensadores. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 8655-6:03 (2003).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 6: Métodos gravimétricos para la determinación del error de medición. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 8655-6:03/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 6: Métodos gravimétricos para la determinación del error de medición. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 8655-7:06 (2006).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 7: Métodos no gravimétricos para la evaluación de la aptitud al uso de los equipos .*Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 8655-7:06/AC:09 (2009).** Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 7: Métodos no gravimétricos para la evaluación de la aptitud al uso de los equipos. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 9308-1 (2001).** Calidad del agua. Detección y recuento de Escherichia coli y de bacterias coliformes. Parte 1: Método de filtración en membrana. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 10012 (2003).** Sistemas de gestión de las mediciones. Requisitos para los procesos de medición y los equipos de medición. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 10304-1 (2009).** Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía de iones en fase líquida. Parte 1. Determinación de bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 17495 (2003).** Calidad del agua. Determinación de nitrofenoles seleccionados. Método por extracción en fase sólida y cromatografía de gases con detección de espectrometría de masas. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO 18857-1 (2007).** Calidad del agua. Determinación de alquilfenoles seleccionados. Parte 1: Método para muestras no filtradas por extracción en fase líquido-líquido y cromatografía de gases con detección selectiva de masa. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO/IEC 17025 (2010).** Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-EN ISO/IEC 17043 (2010).** Evaluación de la conformidad. Requisitos generales para los ensayos de aptitud. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE ENV ISO 13530 (2000).** Calidad del agua. Guía para el control de la calidad analítica en el análisis del agua. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.* Anulada el 01/12/11.

**UNE-ISO 3534-1 (2008).** Estadística. Vocabulario y símbolos. Parte 1: Términos estadísticos generales y términos empleados en el cálculo de probabilidades. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**UNE-ISO 3534-2 (2008).** Estadística. Vocabulario y símbolos. Parte 2: Estadística aplicada. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR.*

**USEPA (1983).** Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes. *United States Environmental Protection Agency, EPA.*

<http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30000Q10.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1976+Thru+1980&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A\zyfiles\Index%20Data\76thru80\Txt\00000001\30000Q10.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h1-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=p|f&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>

**USEPA Method 300.1 (1997).** Anions in Water by IC: Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, rev 1.0. *United States Environmental Protection Agency, EPA.*

<http://www.epa.gov/sam/pdfs/EPA-300.1.pdf>

**USEPA Method 420.1 (1983).** Phenolics (Spectrophotometric, Manual 4-AAP With Distillation). *United States Environmental Protection Agency, EPA.*

[http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_method\\_420\\_1.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/bioindicators/upload/2007_07_10_methods_method_420_1.pdf)

**USEPA Method 1664, revision B (2010).** N-hexane extractable material (HEM; oil and grease) and silica gel treated n-hexane extractable material (SGT-HEM; non-polar material) by extraction and gravimetry. *United States Environmental Protection Agency, EPA.*

[http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/methods\\_index.cfm.](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/methods_index.cfm)

**USEPA (2000).** Analytical method guidance for EPA Method 1664A Implementation and use (40 CFR part 136). *United States Environmental Protection Agency, EPA.*

[http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/oil/upload/2007\\_07\\_10\\_methods\\_method\\_oil\\_1664guide.pdf](http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/oil/upload/2007_07_10_methods_method_oil_1664guide.pdf)

**USP (2009).** Chapter <1058> Analytical Instrument Qualification. United States Pharmacopeia. Rockville, USA.

**USP (2010).** Chapter <1225> Validation of compendial procedures. United States Pharmacopeia. Rockville, USA.

- Valcárcel M., Ríos A. (Eds.) (1992).** La calidad en los laboratorios analíticos. Reverté, Barcelona, España.
- Valcárcel M., Ríos A., Maier E. (1999).** A practical approach to metrology in chemistry and biology. *Accred. Qual. Assur.* 4, 143-152.
- Van Loco J., Elskens M., Croux C., Beernaert H. (2002).** Linearity of calibration curves: use and misuse of the correlation coefficient. *Accred. Qual. Assur.* 7, 281-285.
- van Look G., Meyer V. R. (2002).** The purity of laboratory chemicals with regard to measurement uncertainty. *Analyst* 127, 825-829.
- Vander Heyden Y., De Braekeleer K., Zhu Y., Roets E., Hoogmartens J., De Beer J., Massart D. L. (1999).** Nested designs in ruggedness testing. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20, 875-887.
- Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeysters-Verbeke J., Vandeginste B. G., Massart D. L. (2001).** Guidance for robustness/ruggedness test in method validation. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 24, 723-753.
- Vander Heyden Y., Nijhuis A., Smeysters-Verbeke J., Vandeginste B., Massart D. L., Hoogmaetensn J., De Beer J. (1995).** Ruggedness test on the high-performance liquid chromatography assay of the United Statres Pharcacopeia XXII for tetracycline hydrochlorhidre. A comparison of experimental designs and statistical interpretations. *Anal. Chim. Acta*, 312, 245-262.
- Vander Heyden Y., Questier F., Massart D.L. (1998).** Ruggedness testing of chromatographic methods: selection of factors and levels. *J. pharm. biomed. anal.* 18, 43-56.
- Vander Heyden Y., Smeysters-Verbeke J. (2007).** Set-up and evaluation of interlaboratory studies. *Journal of Chromtography A* 1158, 158-167.
- Vaughn C. D., Strouse G. F. (2003).** NIST Calibration Uncertainties of Liquid-in-Glass Thermometers over the Range from -20 °C to 400 °C. *National Institute of Standards and Technology, AIP CONFERENCE PROCEEDINGS* 684, 447-452.
- Venable W., Eckerie K. (1979).** Standard Reference Materials: Didymium glass filters for calibration the wavelength scale of spectrometers SRM 2009, 2010, 2013, 2014. *National Bureau of Standards, Special publication 260-66. National Institute of Standards and Technology, NIST.*
- <http://www.nist.gov/srm/upload/SP260-66.PDF>
- Verdon E., Hurtaud-Pessel D., Sanders P. (2006).** Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC. *Accred. Qual. Assur.* 11, 58-62.

- Vessman J., Raluca I., Jacobus S. (2001).** Selectivity in analytical chemistry. *Pure & Appl. Chem.* 73, 1381-1381.
- Vial J., Jardy A. (1999).** Experimental Comparison of the Different Approaches To Estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. *Anal. Chem.* 71, 2672-2677.
- Vial J., Le Mapihan K Jardy A (2003).** What is the Best Means of Estimating the detection and Quantification Limits of a Chromatographic Method?. *Chromatographia Suppl* 57, S303-S306.
- Vidigal S., Tóth I. V., Rangel A. (2012).** Determination of total protein content in white wines by solid phase spectrometry in a SI-LOV system. *Talanta* 96, 102-106.
- Visser R.G. (2002).** Measurement uncertainty: Opinions of the Government, the Accreditation Council and the Candidate accredited laboratory. *Accred. Qual. Assur.* 7, 124-125.
- Visser R.G. (2004).** Measurement uncertainty: practical problems encountered by accredited testing laboratories. *Accred. Qual. Assur.* 9, 717-723.
- Wampfler B., Rösslein M. (2009).** Uncertainty due to volumetric operations is often underestimated. *Talanta* 78, 113-119.
- Wang J., He R. (1994).** Stopped-flow injection kinetic determination of multicomponent samples-simultaneous determination of mercury (II) and silver (I). *Anal. Chim. Acta* 294, 195-199.
- Wells R. J. (1998).** Validation requirements for chemical methods in quantitative analysis – horses for courses?. *Accred. Qual. Assur.* 3, 189-193.
- Wernimont G. T. (1993).** Use of statistics to develop and evaluate analytical methods. 4th ed. William Spendley. Arlington, Virginia (USA): Association of Official Analytical Chemists, AOAC.
- Wieser M. E., Berglund M. (2009).** Atomic weights of the elements 2007 (IUPAC Technical Report). *Pure & Appl. Chem.* 81, 2131-2156.
- Wieser M. E., Coplen T. B. (2011).** Atomic weights of elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure & Appl. Chem.* 83, 359-396.
- Wille S. M. R., Peters F. T., Di Fazio V., Samyn N. (2011).** Practical aspects concerning validation and quality control for forensic and clinical bioanalytical quantitative methods. *Accred. Qual. Assur.* 16, 279-292.
- Williams A. (1996).** Measurement uncertainty in analytical chemistry. *Accred. Qual. Assur.* 1, 14-17.
- Xenosep Technologies (2005).** EPA Method 1664A Oil and Grease. SPE Method Summary and video demonstration.  
[http://www.xenosep.com/tech\\_oil\\_grease.html](http://www.xenosep.com/tech_oil_grease.html).

- Xu J., Zhu L. Y., Shen H., Zhang H-M., Jia X. B., Yan R. Li S. L., Xu H. X. (2012).** A critical view on spike recovery for accuracy evaluation of analytical method for medicinal herbs. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 62, 210-215.
- Youden W. J., Steiner E. H. (1987).** Statistical Manual of the AOAC, 5<sup>th</sup> ed. The Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA.
- Zamengo L., Frison G., Gregio M., Orrú G., Sciarrone R. (2011).** Determination of illicit drugs in seized materials: Role of sampling and analysis in estimation of measurement uncertainty. *Forensic Sci. Int.* 208, 108-123.
- Zeleny R., Harbeck S., Schimmel H. (2009).** Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the identification and quantification of 5-nitroimidazole drugs and their corresponding hydroxy metabolites in lyophilised pork meat. *Journal of chromatography A* 1216, 249-256.

## **ANEXOS**

---



## A.I. TABLAS DE DATOS



### A.I.1. BALANZA

#### Calibración

Equipo	Balanza	Modelo	Resolución	0.0001 g
Linealidad	0.0002 g	sen	2.5 ppm	Tol 0.0025 g
Fecha		T <sup>a</sup>		%Hr
<b>Masas patrón</b>				
M <sub>Nominal</sub>	0.01	0.1	1	10
M <sub>real</sub>	0.009998	0.099977	1.00000	10.00007
Tolerancia	0.000025	0.00005	0.0001	0.0002
I <sub>pat</sub>	0.00002	0.000016	0.00003	0.00006
cor <sub>pat</sub>	-0.000002	-0.000023	0	0.000070
<b>Lecturas</b>				
1	0.0099	0.0999	1.0000	10.0001
2	0.0100	0.0999	1.0000	10.0001
3	0.0099	0.0999	0.9999	10.0001
4	0.0099	0.1000	1.0000	10.0001
5	0.0100	0.1000	1.0000	10.0001
1'	0.0099	0.0999	1.0000	10.0001
2'	0.0100	0.1000	1.0000	10.0001
3'	0.0099	0.0999	0.9999	10.0000
4'	0.0100	0.1000	1.0000	10.0002
5'	0.0100	0.1000	1.0000	10.0001
Cargas plato	M <sub>inicial</sub>	M*	M+M*	M <sub>final</sub>
Medidas	10.0001	50.0003	60.0006	10.0001
M <sub>tara</sub>				
			50.000277	
M <sub>real</sub>	0.009998	0.099977	1.00000	10.00007
M <sub>leida</sub>	-49.9903	-49.9003	-49.0002	-40.0002
cor <sub>tara</sub>	-0.00002	0.00000	0.00008	0.00001
<b>Calculos</b>				
M <sub>media</sub>	0.0100	0.1000	1.0000	10.0001
N	10	10	10	10
S	5.27E-05	5.27E-05	4.22E-05	4.71E-05
U <sub>rep</sub>	1.67E-05	1.67E-05	1.33E-05	1.49E-05
U <sub>res</sub>	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05
U <sub>linea</sub>	1.15E-04	1.15E-04	1.15E-04	1.15E-04
U <sub>der sen</sub>	1.15E-09	1.15E-08	1.15E-07	1.15E-06
U <sub>empuje</sub>	3.61E-04	7.22E-05	1.44E-05	2.89E-06
U <sub>histeresis</sub>	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00	0.00E+00
U <sub>excentri</sub>	5.77E-05	5.77E-05	0.00E+00	5.77E-05
U <sub>tarado</sub>	1.21E-05	0.00E+00	4.45E-05	4.04E-06
U <sub>cal-pat</sub>	1.00E-05	8.00E-06	1.50E-05	3.00E-05
U <sub>cor-pat</sub>	-1.15E-06	1.33E-05	0.00E+00	4.04E-05
U <sub>der-pat</sub>				
U <sub>der-equí</sub>	8.50E-07	2.03E-06	1.31E-05	2.39E-05
U <sub>bal</sub>	0.00039	0.00015	0.00013	0.00014
cor	0.00005	0.00003	0.00002	-0.00003
I <sub>bal</sub>	0.00077	0.00030	0.00026	0.00029
<b>Resultados validacion de la calibracion</b>				
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO
	<b>Estado del equipo</b>	<b>APTO</b>		

Tabla A.I.1: Tabla de toma de datos empleada en la calibración de las balanzas

### Verificación

Datos de las masas patrón					
M <sub>Nominal</sub>	0.02	0.1	1	10	100
corr	-0.000167	-0.000067	0.000181	0.000106	0.000865
M <sub>real</sub>	0.019833	0.099933	1.000181	10.000106	100.000865
I <sub>pat</sub>	0.0001	0.00017	0.00033	0.00067	0.0017

Datos de la balanza					
I <sub>bal</sub>	0.000800	0.000800	0.000800	0.000800	0.000800
Tol	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025	0.0025

V <sub>real</sub>	V <sub>leido</sub>	I <sub>bal</sub>	Fecha	V <sub>real</sub> - V <sub>leido</sub>   + I <sub>bal</sub> < Tol		Observaciones
				Si	NO	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
				<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Tabla A.I.2: Tabla de toma de datos empleada en la verificación de la balanza

## A.I.2. MATERIAL VOLUMÉTRICO

### Calibración

▲ Material volumétrico aforado

Equipo					
Material	matraz 25	V <sub>N</sub> (mL)	25	Resol (mL)	-
<b>Datos de partida</b>					
Fecha 08/04/2008	Con. ambiente.	T <sub>w</sub> (°C) 18	T <sub>a</sub> (°C) 19	Humedad 45	Presión 918
Lugar uva	Valor mínimo Promedio	18.3 18	19.5 19	48 47	923 920
Operador	n <sub>Lote</sub> 5	d <sub>w</sub> (g/mL) 0.998564	d <sub>a</sub> (g/mL) 0.001092	Balanza 16	I <sub>bal</sub> 0.00033
Tol (mL)	0.125	Verac <sub>Nominal</sub> (mL)	0.04	Rep <sub>Nominal</sub> (mL)	0.02
<b>Lecturas</b>					
Réplica	g 24.953	g 24.9657	g 24.9404	g 24.9238	g 24.9525
1	24.9476	24.9502	24.9589	24.9413	24.9532
2	24.9473	24.9553	24.9884	24.9425	24.9516
3	24.9400	24.9702	24.9904	24.9594	24.9464
4	24.9255	24.9472	24.9827	24.9404	24.9547
5	24.9540	24.9857	24.9948	24.9384	24.9466
6	24.9790	24.9766	24.9758	24.9301	24.9499
7	24.9267	24.9779	24.9854	24.9242	24.9353
8	24.9394	24.9862	24.9839	24.9243	24.9568
9	24.9201	24.9483	24.9841	24.9293	24.9316
<b>Cálculos</b>					
m (g)	24.9433	24.9663	24.9785	24.9354	24.9479
Z	1.002412	1.002412	1.002412	1.002412	1.002412
N	10	10	10	10	10
S	0.0172	0.0153	0.0166	0.0113	0.0083
V <sub>20°C</sub>	25.0034	25.0265	25.0387	24.9955	25.0080
u <sup>2</sup> <sub>bal</sub>	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08
u <sup>2</sup> <sub>rep</sub>	2.97E-05	2.33E-05	2.75E-05	1.27E-05	6.90E-06
u <sup>2</sup> <sub>m</sub>	2.97E-05	2.33E-05	2.75E-05	1.27E-05	6.92E-06
u <sup>2</sup> <sub>z</sub>	1.48E-09	1.48E-09	1.48E-09	1.48E-09	1.48E-09
u <sup>2</sup> <sub>V20°C</sub>	3.08E-05	2.44E-05	2.86E-05	1.37E-05	7.88E-06
u <sup>2</sup> <sub>clase</sub>	1.33E-04	1.33E-04	1.33E-04	1.33E-04	1.33E-04
u <sub>equi</sub>	0.013	0.013	0.013	0.012	0.012
cor	-0.003	-0.027	-0.039	0.004	-0.008
I <sub>equi</sub>	0.026	0.025	0.025	0.024	0.024
<b>Resultados calibración</b>					
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
	ESTADO DEL EQUIPO				
	APTO				

Tabla A.I.3: Tabla de toma de datos empleada en la calibración del material volumétrico aforado

▲ Material volumétrico graduado

Equipo							
Cód.:	pipeta 5	V <sub>N</sub> (mL)	5	Resol (mL)	0.05	tol (mL)	0.03
Datos de partida							
Fecha 08/04/2008	Con. ambien.	T <sub>w</sub> (°C)	16.5	T <sub>a</sub> (°C)	17.5	Humedad	52
Lugar uva	Valor mínimo		16		17	Presion	936
	Valor máximo		16		17		935
Promedio			16		17		936
Operador	n <sub>Lote</sub>	dw (g/mL)		da (g/mL)	Balanza	Ibal	
	5	0.998899		0.001118	13	0.00033	
V <sub>nominal</sub>	5	4	3	2	1		
Verac <sub>nominal</sub>	0.03	0.03	0.03	0.03	0.03		
Rep <sub>nominal</sub>	0.015	0.015	0.015	0.015	0.015		
Tol	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05		
Lecturas							
Réplica	g	g	g	g	g	g	
1	5.0059	4.0103	3.0254	2.0053	1.0102		
2	5.0017	4.0043	3.0068	2.0136	1.0106		
3	4.9914	3.9977	3.0147	1.9933	0.999		
4	4.9938	4.0116	2.999	2.0043	1.004		
5	4.9944	4.0201	3.0103	2.0039	1.0271		
6	5.0019	4.0074	3.009	2.0166	1.0176		
7	4.9879	4.013	3.0176	2.0178	1.0116		
8	4.9967	3.9955	2.9984	2.0194	1.0116		
9	4.9999	4.0199	3.0134	2.0144	1.0156		
10	4.990	4.0002	3.0103	2.0189	1.0152		
Cálculos							
m (g)	4.9963	4.0080	3.0105	2.0108	1.0123		
Z	1.002118	1.002118	1.002118	1.002118	1.002118		
N	10	10	10	10	10		
S	0.0059	0.0086	0.0081	0.0086	0.0076		
V <sub>20°C</sub>	5.0069	4.0165	3.0169	2.0150	1.0144		
U <sup>2</sup> <sub>bal</sub>	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08		
U <sup>2</sup> <sub>rep</sub>	3.50E-06	7.43E-06	6.59E-06	7.44E-06	5.78E-06		
U <sup>2</sup> <sub>m</sub>	3.53E-06	7.46E-06	6.62E-06	7.46E-06	5.81E-06		
U <sup>2</sup> <sub>z</sub>	2.77E-09	2.77E-09	2.77E-09	2.77E-09	2.77E-09		
U <sup>2</sup> <sub>V20°C</sub>	3.61E-06	7.53E-06	6.67E-06	7.51E-06	5.84E-06		
U <sup>2</sup> <sub>clase</sub>	7.50E-05	7.50E-05	7.50E-05	7.50E-05	7.50E-05		
U <sub>cal</sub>	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009		
cor	-0.007	-0.016	-0.017	-0.015	-0.014		
I <sub>cal</sub>	0.018	0.018	0.018	0.018	0.018		
Resultados calibración							
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO		
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO		
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO		
	ESTADO DEL EQUIPO					APTO	

Tabla A.I.4: Tabla de toma de datos empleada en la estimación de la incertidumbre del material volumétrico aforado

## ▲ Material volumétrico accionado mediante pistón

Equipo						
Cód.:	micro 1	V <sub>N</sub> (mL)	1	Resol (mL)	0.001	
Datos de partida						
Fecha 08/04/2008	Con. ambien.	Tw (°C) 14	Ta (°C) 15	Humedad 50	Presion 933	
Lugar uva	Valor mínimo Valor máximo Promedio	14.5 14	15.5 15	50 50	936 935	
Operador	n <sub>Lote</sub> 5	dw (g/mL) 0.999206	da (g/mL) 0.001125	Balanza 13.5	Ibal 0.00033	
V <sub>nominal</sub> Verac <sub>nominal</sub> Rep <sub>nominal</sub> Tol	1 0.008 0.003 0.014	0.75 0.008 0.003 0.014	0.5 0.008 0.003 0.014	0.25 0.008 0.003 0.014	0.1 0.008 0.003 0.014	
Lecturas						
Réplica	g 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	g 0.9958 0.9949 0.9936 0.9929 0.9945 0.9948 0.9928 0.9972 0.9943 0.9929	g 0.7459 0.7448 0.7438 0.7469 0.7429 0.7459 0.7462 0.7468 0.7448 0.7445	g 0.4977 0.4986 0.4957 0.4906 0.4966 0.4996 0.4978 0.4991 0.4969 0.4974	g 0.2499 0.25 0.2482 0.249 0.2507 0.25 0.2513 0.2494 0.2504 0.249	g 0.1009 0.1008 0.1007 0.0993 0.1003 0.1009 0.1004 0.1008 0.1007 0.101
Cálculos						
m (g)	0.9944	0.7453	0.4970	0.2498	0.1006	
Z	1.004319	1.004319	1.004319	1.004319	1.004319	
N	10	10	10	10	10	
S	0.0014	0.0013	0.0025	0.0009	0.0005	
V <sub>20°C</sub>	0.9987	0.7485	0.4991	0.2509	0.1010	
U <sup>2</sup> <sub>bal</sub>	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	2.72E-08	
U <sup>2</sup> <sub>rep</sub>	1.99E-07	1.72E-07	6.43E-07	8.34E-08	2.51E-08	
U <sup>2</sup> <sub>m</sub>	2.26E-07	1.99E-07	6.70E-07	1.11E-07	5.23E-08	
U <sup>2</sup> <sub>z</sub>	2.96E-08	2.96E-08	2.96E-08	2.96E-08	2.96E-08	
U <sup>2</sup> <sub>V20°C</sub>	2.58E-07	2.17E-07	6.83E-07	1.13E-07	5.30E-08	
U <sup>2</sup> <sub>clase</sub>	8.33E-08	8.33E-08	8.33E-08	8.33E-08	8.33E-08	
U <sub>equi</sub>	0.0006	0.0005	0.0009	0.0004	0.0004	
cor	0.0013	0.0015	0.0009	-0.0009	-0.0010	
I <sub>equi</sub>	0.0012	0.0011	0.0018	0.0009	0.0007	
Resultados calibración						
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	
	ESTADO DEL EQUIPO				APTO	

Tabla A.I.5: Tabla de toma de datos empleada en la calibración del material volumétrico accionado mediante pistón

### Verificación

Datos de partida					
Codigo micro1	Con. ambien.	Tw (°C)	Ta (°C)	Humedad	Presion
Vn 1	Valor mínimo	20	21	48	937
	Valor máximo	20.5	21.5	50	940
	Promedio	20	21	49	939
Fecha 18/02/2008	Lugar uva	dw (g/mL) 0.998149	da (g/mL) 0.001106	Balanza 15	Ibal 0.00033
V <sub>nominal</sub> Verac <sub>nominal</sub> Rep <sub>nominal</sub>	0.1 0.0008 0.0003	0.075 0.0008 0.0003	0.05 0.0008 0.0003	0.025 0.0008 0.0003	0.01 0.0008 0.0003
Lecturas					
Réplica	g	g	g	g	g
1	0.0998	0.0755	0.0497	0.0249	0.0102
2	0.0995	0.0757	0.0491	0.0247	0.0101
3	0.0995	0.0753	0.0492	0.0249	0.0098
4	0.0995	0.0752	0.0495	0.0251	0.0098
5	0.0999	0.0759	0.0495	0.0253	0.0102
Cálculos					
m (g)	0.0996	0.0755	0.0494	0.0250	0.0100
Z	1.002713	1.002713	1.002713	1.002713	1.002713
S	0.0002	0.0003	0.0002	0.0002	0.0002
V <sub>20°C</sub>	0.0999	0.0757	0.0495	0.0250	0.0100
cor	0.0001	-0.0007	0.0005	0.0000	0.0000
Resultados calibración					
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
	ESTADO DEL EQUIPO				APTO

Tabla A.I.6: Tabla de toma de datos empleada en la verificación del material volumétrico accionado mediante pistón

### A.I.3. ESPECTROFOTÓMETRO UV-VIS

#### Calibración

<b>Equipo</b>	Espectrofotómetro UV-vis			<b>Modelo</b>	UV-1603		
<b>Fecha</b>	6-6-02			<b>T<sup>a</sup></b>	%Hr		
<b>Tol</b>	1.5	<b>Verac<sub>nomina</sub></b>	0.5	<b>Rep<sub>nominal</sub></b>	0.1	<b>Verac<sub>nomina</sub></b>	0.5
<b>λ<sub>real</sub></b>	279.35	360.9	453.55	536.4	637.7	328.15	472.1
<b>I<sub>pat</sub></b>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5
<b>Lecturas</b>							
<b>1</b>	279.10	361.40	453.10	536.60	637.50	328.10	471.90
<b>2</b>	279.00	361.30	453.10	536.60	637.50	328.20	471.90
<b>3</b>	279.00	361.30	453.10	536.60	637.50	328.20	471.90
<b>4</b>	279.10	361.30	453.10	536.60	637.50	328.20	472.00
<b>5</b>	279.00	361.40	453.10	536.60	637.50	328.10	472.00
<b>Calculos</b>							
<b>λ<sub>media</sub></b>	279.04	361.34	453.1	536.6	637.5	328.16	471.94
<b>s</b>	0.0548	0.0548	0.0000	0.0000	0.0000	0.0548	0.0548
<b>u<sub>rep</sub></b>	0.0245	0.0245	0.0000	0.0000	0.0000	0.0245	0.0245
<b>u<sub>res</sub></b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
<b>u<sub>cal-pat</sub></b>	0.1250	0.1250	0.1250	0.1250	0.2500	0.2500	0.2500
<b>u<sub>cor-der-pat</sub></b>	0.0693	0.0693	0.1674	0.1039	0.1212	0.0981	0.0693
<b>u<sub>der-equ</sub></b>	0.0014	0.0014	0.0036	0.0014	0.0018	0.0002	0.0007
<b>cor</b>	0.31	-0.44	0.45	-0.20	0.20	-0.01	0.16
<b>I<sub>UV-VIS-λ</sub></b>	0.29	0.29	0.42	0.33	0.56	0.54	0.52
<b>Validación de la calibración</b>							
<b>Tol</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>Verac</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>Rep</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO

Tabla A.I.7: Tabla de toma de datos empleada en la calibración de la longitud de onda de un espectrofotómetro UV-vis

Equipo Espectrofotómetro UV-vis		Modelo UV-1603		Tol <sub>deltadis</sub>	0,01mm
Fecha	6-6-02	T <sub>a</sub>	%HR	Operador	
Tol	0.01	Verac <sub>nominativa</sub>	0.002	Rep <sub>nominativa</sub>	0.001
<b>Filtro de absorancia 0.25 UA</b>					
					<b>Filtro de absorancia 0.5 UA</b>
<b>Lecturas</b>					
1	0.2693	0.2371	0.2410	0.2590	0.2600
2	0.2693	0.2371	0.2405	0.2588	0.2601
3	0.2693	0.2371	0.2405	0.2588	0.2601
4	0.2693	0.2371	0.2405	0.2588	0.2601
5	0.2693	0.2372	0.2407	0.2588	0.2601
<b>Calculos</b>					
U <sub>A media</sub>	0.2693	0.2371	0.2405	0.2588	0.2601
S	0.00E+00	4.47E-05	8.94E-05	0.00E+00	0.00E+00
U <sub>solda</sub>	1.56E-04	1.37E-04	1.38E-04	1.50E-04	1.50E-04
U <sub>rep</sub>	0.00E+00	2.00E-05	4.00E-05	0.00E+00	0.00E+00
U <sub>res</sub>	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05
U <sub>drift</sub>	5.77E-05	5.77E-05	5.77E-05	5.77E-05	5.77E-05
U <sub>onda</sub>	2.89E-04	2.89E-04	2.89E-04	1.15E-04	1.15E-04
U <sub>estab</sub>	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05	2.89E-05
U <sub>cal-pant</sub>	1.00E-03	1.00E-03	1.00E-03	2.00E-03	2.00E-03
U <sub>cor-deltap</sub>	5.77E-04	5.77E-04	5.77E-04	5.77E-04	5.77E-04
U <sub>der-equ</sub>	8.58E-07	1.73E-07	6.92E-07	4.62E-07	5.77E-08
cor	0.0007	-0.0001	0.0006	0.0002	-0.0001
I <sub>UV-vis-U</sub>	0.0024	0.0024	0.0024	0.0023	0.0024
<b>Validación de la calibración</b>					
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>ESTADO DEL EQUIPO</b>					
				APTO	APTO

Tabla A.I.8: Tabla de toma de datos empleada en la calibración de absorbancia de un espectrófotómetro UV-vis

**Verificación**

<b>Equipo</b>	<b>Espectrofotometro UV-vis</b>				<b>Modelo</b>	UV-1603				
<b>Fecha</b>	<b>T<sup>a</sup></b>		<b>%Hr</b>		<b>Operador</b>					
<b>Tol</b>	1.5	<b>Verac<sub>nomina</sub></b>	0.5	<b>Rep<sub>nominal</sub></b>	0.1		<b>Verac<sub>nomina</sub></b>	0.5	<b>Rep<sub>nominal</sub></b>	0.1
<b>Filtro de holmio</b>					<b>Filtro de didimio</b>					
<b>V<sub>real</sub></b>	279.35	360.9	453.55	536.4	637.7	328.15	472.1	525.5	681.2	875.2
<b>I<sub>pat</sub></b>	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>Lecturas</b>										
<b>1</b>	279.1	361.4	453.1	536.6	637.5	328.1	471.9	525.2	680.7	875.1
<b>2</b>	279.1	361.3	453.1	536.6	637.5	328.2	471.9	525.2	680.7	875.1
<b>3</b>	279.0	361.3	453.1	536.6	637.5	328.2	471.9	525.2	680.7	875.1
<b>4</b>	279.1	361.4	453.1	536.5	637.5	328.2	472.0	525.3	680.8	875.1
<b>5</b>	279.1	361.4	453.1	536.5	637.5	328.1	472.0	525.3	680.7	875.1
<b>Calculos</b>										
<b>l<sub>media</sub></b>	279.08	361.36	453.10	536.56	637.50	328.16	471.94	525.24	680.72	875.10
<b>s</b>	0.045	0.055	0.000	0.055	0.000	0.055	0.055	0.055	0.045	0.000
<b>cor<sub>verif</sub></b>	0.270	-0.460	0.450	-0.160	0.200	-0.010	0.160	0.260	0.480	0.100
<b>I<sub>UV-VIS-λ</sub></b>	0.290	0.290	0.418	0.325	0.556	0.539	0.521	0.511	0.561	0.808
<b>Validacion de la verificación</b>										
<b>Tol</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>Verac</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>Rep</b>	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>ESTADO DEL EQUIPO</b>					APTO					

Tabla A.I.9: Tabla de toma de datos empleada en la verificación de la longitud de onda de un espectrofotómetro UV-vis

Equipo Espectrofotómetro UV-vis

Modelo UV-1603

 Fecha T<sup>a</sup>

%ahr

Operador

Tol	0.01	Verac <sub>nomin</sub>	0.002	Rep <sub>nomin</sub>	0.001	Verac <sub>nomin</sub>	0.002	Rep <sub>nomin</sub>	0.001	Verac <sub>nomin</sub>	0.004	Rep <sub>nomin</sub>	0.002
<b>Filtro de absorbancia 0.25 UA</b>													
<b>Lecturas</b>													
<b>Filtro de absorbancia 0.5 UA</b>													
<b>Calculos</b>													
<b>Validación de la calibración</b>													
Tol	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Verac	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
Rep	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO	APTO
<b>ESTADO DEL EQUIPO</b>													
APTO													

Tabla A.I.10: Tabla de toma de datos empleada en la verificación de la absorbancia de un espectrofotómetro UV-vis

### A.I.4. CROMATOGRAFO IONICO

#### Verificación

Equipo	Cromatografo ionico	Modelo	IC-Basic						
Fecha	T <sup>a</sup>	%Hr	Operador						
%Er <sub>Nominal</sub>	±1	%DER <sub>Nominal</sub>	±0.1						
<b>Verificacion de las bombas</b>									
Lecturas									
T <sup>a</sup> °C	$\rho$ $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	F <sub>nominal</sub> $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	P <sub>n</sub> mg	t <sub>n</sub> seg	P <sub>n+1</sub> mg	t <sub>n+1</sub> seg	F $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	t <sub>n+2</sub> seg	P <sub>n+2</sub> mg
18	0.99859	0.5	68.4	0	70.9	301	0.4982	408	73.4
			80.9	2062	83.3	2363	0.4987	2481	85.8
22	0.99777	1.0	68.4	0	73.4	300	1.0019	405	78.4
			93.4	2060	98.5	2364	1.0021	2445	103.5
22	0.997768	1.5	68.4	0	75.9	300	1.5003	405	83.4
			105.9	2061	113.5	2366	1.5006	2461	120.8
Lecturas									
t <sub>n+3</sub> seg	F $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	t <sub>n+4</sub> seg	P <sub>n+3</sub> mg	t <sub>n+5</sub> seg	F $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	t <sub>n+6</sub> seg	P <sub>n+4</sub> mg	t <sub>n+7</sub> seg	F $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$
709	0.4980	816	75.9	1117	0.4990	1218	78.4	1519	0.4989
2781	0.4988	2928	88.3	3228	0.4982	3328	90.8	3628	0.4981
705	1.0018	818	83.4	1119	1.0020	1242	88.4	1542	1.0020
2746	1.0015	2867	108.5	3168	1.0021	3277	113.5	3578	1.0009
705	1.5011	811	91.1	1118	1.5010	1233	98.3	1525	1.5003
2752	1.5017	2902	128.2	3199	1.5003	3290	134.1	3525	1.5011
Lecturas						Validacion equipo			
t <sub>n+8</sub> seg	P <sub>n+5</sub> mg	t <sub>n+9</sub> seg	F $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	F <sub>m</sub> $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$	%Er	%DER	Verac	Rep	
1629	80.9	1930	0.4979	0.4985	-0.30	0.093	APTO	APTO	
3689	93.3	3989	0.4991				APTO	APTO	
1652	93.4	1953	1.0013	1.0017	0.17	0.042	APTO	APTO	
3639	118.5	3939	1.0012				APTO	APTO	
1642	105.8	1943	1.5005	1.5006	0.04	0.035	APTO	APTO	
3626	142.9	3980	1.5016				APTO	APTO	
<b>Verificacion del detector</b>									
T <sup>a</sup> <sub>real</sub> °C	$\Lambda_{\text{Nominal}}$ $\text{uS}\cdot\text{cm}$	$\Lambda_{\text{real}}$ $\text{uS}\cdot\text{cm}$	%Er	Verac					
15.3	11.92	12.03	-0.92	APTO					
19.6	74.43	73.69	0.99	APTO					
23.4	145	146.25	-0.86	APTO					

Tabla A.I.11: Tabla de toma de datos empleada en la verificación de un cromatógrafo iónico



## **A.II. RESULTADOS**



## A.II.1. EQUIPOS

### Material volumétrico

▲ Material volumétrico accionado mediante pistón

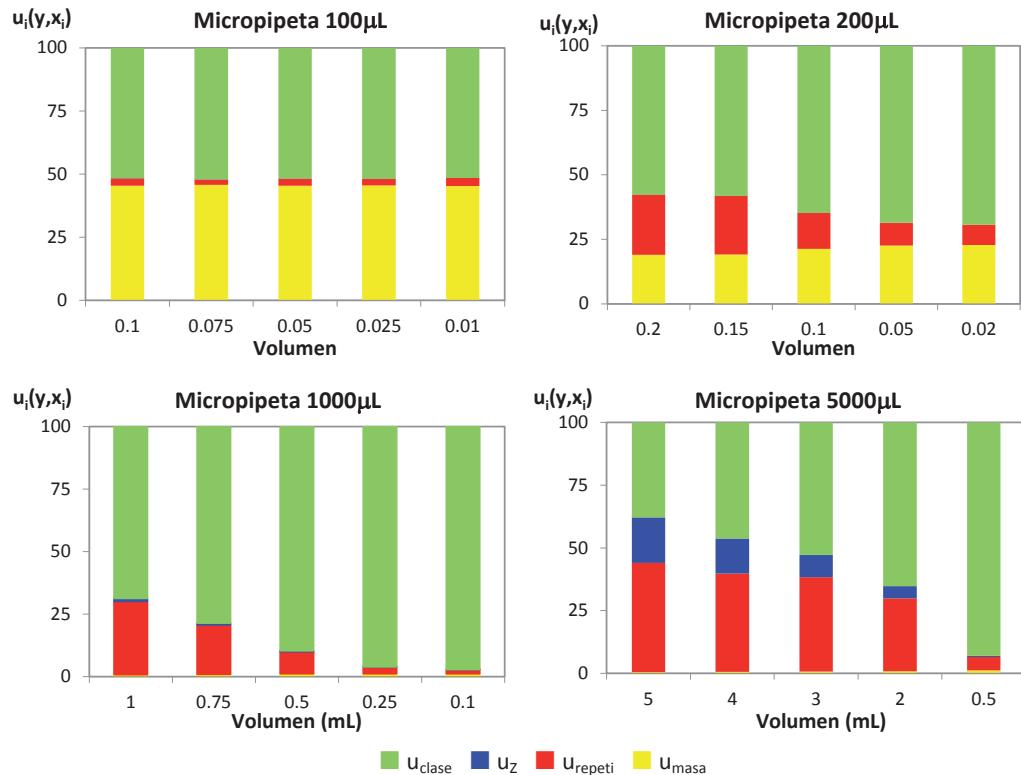


Fig. A.II.1: Contribuciones porcentuales a la incertidumbre para las micropipetas según su volumen nominal

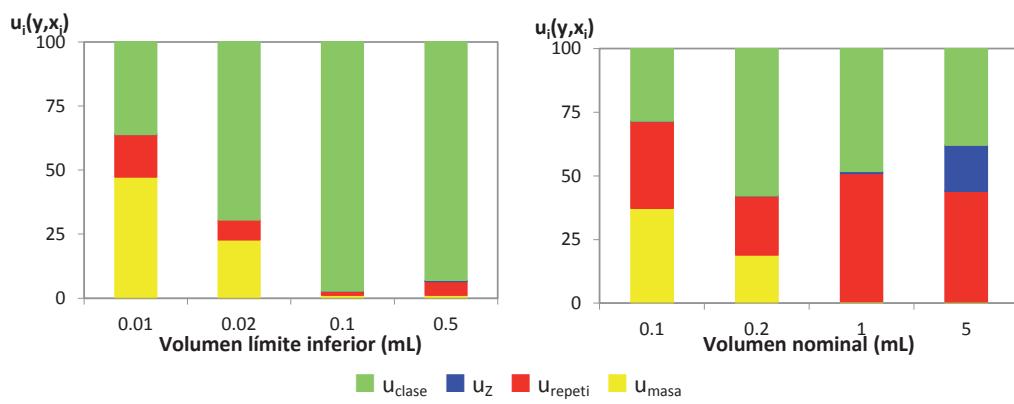


Fig. A.II.2: Comparación de las contribuciones porcentuales a la incertidumbre para las micropipetas en el volumen límite inferior y en el volumen nominal

## A.II.2. ANIONES

### Resultados analíticos

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

Tabla A.II.1: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de fluoruros

N <sub>1</sub> =LC ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.669	2.754	2.860	2.749	2.896	2.757	2.798	2.703
Réplica2	2.681	2.782	2.850	2.749	2.880	2.743	2.919	2.744
N <sub>2</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.426	13.203	13.198	12.822	13.384	12.932	13.400	12.920
Réplica2	13.486	13.222	13.484	13.150	13.376	12.940	13.460	12.962
N <sub>3</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	131.72	129.43	131.48	128.19	129.82	127.90	125.98	126.95
Réplica2	131.45	129.81	132.35	127.90	127.37	125.72	126.58	125.70
N <sub>4</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1281.6	1248.5	1270.6	1243.1	1262.8	1207.5	1233.5	1197.0
Réplica2	1266.5	1249.4	1262.9	1248.4	1258.3	1224.8	1266.0	1207.8
N <sub>5</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	6409	6188	6302	6102	6242	6035	6329	6320
Réplica2	6352	6329	6251	6134	6325	5926	6288	6347
N <sub>1</sub> =LC glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.619	2.434	2.547	2.563	2.543	2.510	2.530	2.535
Réplica2	2.569	2.492	2.549	2.452	2.521	2.517	2.530	2.523
N <sub>2</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.991	13.388	13.306	13.270	13.759	13.404	13.352	13.370
Réplica2	14.023	13.310	13.344	13.858	13.785	13.448	13.412	13.362
N <sub>3</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	125.71	123.34	124.01	123.39	122.35	122.58	120.83	122.60
Réplica2	126.20	124.45	124.33	123.53	121.80	122.10	122.13	125.83
N <sub>4</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1281.5	1239.3	1244.0	1247.1	1235.8	1205.3	1196.3	1222.0
Réplica2	1258.5	1233.1	1240.6	1222.9	1244.7	1218.2	1189.0	1224.0
N <sub>5</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	6206	6469	6327	6289	6278	6088	6341	6413
Réplica2	6065	5898	6383	6325	6350	6178	6360	6462
N <sub>1</sub> =LC agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.619	2.592	2.550	2.544	2.544	2.519	2.548	2.506
Réplica2	2.611	2.540	2.567	2.545	2.523	2.533	2.526	2.526
N <sub>2</sub> agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.974	13.388	13.312	13.436	13.729	13.446	13.304	13.348
Réplica2	14.021	13.398	13.404	13.104	13.801	13.430	13.404	13.378
N <sub>1</sub> =LC compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.525	2.456	2.499	2.477	2.480	2.450	2.452	2.462
Réplica2	2.497	2.408	2.483	2.476	2.480	2.452	2.455	2.464
N <sub>2</sub> compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.661	13.176	12.992	12.910	13.369	13.021	12.979	13.086
Réplica2	13.653	13.176	13.122	12.910	13.405	13.017	12.992	12.997

Tabla A.II.2: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de cloruros

$N_1 = LC$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.737	2.649	2.670	2.675	2.833	2.712	2.700	2.697
Réplica2	2.746	2.652	2.660	2.668	2.840	2.725	2.728	2.672
$N_2$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.47	13.20	13.08	12.77	13.49	12.79	13.05	12.50
Réplica2	13.64	13.23	13.09	12.87	13.50	12.84	13.16	12.51
$N_3$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	126.32	124.76	124.11	120.75	121.60	118.38	119.40	118.83
Réplica2	127.00	125.53	125.20	120.58	119.53	116.13	121.35	118.18
$N_4$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1275.3	1249.3	1239.6	1221.4	1238.2	1170.8	1213.8	1185.0
Réplica2	1264.8	1229.2	1240.8	1229.4	1237.7	1183.2	1244.5	1193.8
$N_5$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	6345	6128	6188	5977	6173	5868	6254	6247
Réplica2	6340	6255	6133	6014	6194	5756	6242	6236
$N_1 = LC$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.770	2.682	2.666	2.683	2.707	2.654	2.634	2.662
Réplica2	2.713	2.674	2.672	2.542	2.696	2.669	2.644	2.653
$N_2$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.17	13.46	13.31	13.31	13.86	13.57	13.60	13.40
Réplica2	14.18	13.45	13.29	13.24	13.88	13.64	13.38	13.36
$N_3$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	129.25	127.54	125.40	124.20	123.57	124.23	122.60	124.48
Réplica2	129.19	128.33	125.60	124.81	122.75	123.43	124.40	134.73
$N_4$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1308.3	1258.9	1256.1	1254.1	1241.0	1205.0	1213.5	1241.8
Réplica2	1289.4	1252.7	1244.3	1227.1	1246.0	1223.7	1219.5	1238.8
$N_5$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	6350	6227	6187	6069	6144	5941	6253	6318
Réplica2	6342	6082	6286	6111	6215	6015	6269	6355
$N_1 = LC$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.735	2.644	2.679	2.653	2.721	2.642	2.619	2.642
Réplica2	2.729	2.651	2.670	2.653	2.702	2.702	2.601	2.700
$N_2$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.20	13.44	13.34	13.70	13.91	13.60	13.33	13.37
Réplica2	14.33	13.42	13.37	13.22	13.90	13.60	13.32	13.37
$N_1 = LC$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.927	2.682	2.878	2.775	2.838	3.082	2.763	2.744
Réplica2	2.841	2.718	2.825	2.745	2.850	2.745	2.780	2.783
$N_2$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.78	14.24	13.62	13.45	14.53	14.27	13.65	13.85
Réplica2	14.95	14.38	13.92	13.49	14.67	14.20	13.67	13.65

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

Tabla A.II.3: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de nitritos

N <sub>1</sub> =LC ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.236	5.207	5.144	5.147	5.359	5.151	5.125	4.994
Réplica2	5.205	5.184	5.146	5.160	5.360	5.116	5.115	4.979
N <sub>2</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	25.58	24.90	24.35	23.82	24.36	23.47	23.41	22.82
Réplica2	25.43	24.80	24.27	23.78	24.42	23.44	23.50	22.68
N <sub>3</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	255.40	248.68	245.78	238.36	240.30	235.55	225.95	230.88
Réplica2	256.96	249.74	246.28	238.88	235.40	230.88	223.80	228.80
N <sub>4</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2657.5	2593.6	2584.4	2532.5	2571.3	2446.3	2455.3	2387.5
Réplica2	2670.8	2580.7	2588.4	2540.5	2547.3	2472.5	2491.3	2411.3
N <sub>5</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12901	12411	12562	12059	12388	11862	12408	12445
Réplica2	12835	12629	12425	12152	12495	11612	12349	12393
N <sub>1</sub> =LC glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.443	5.351	5.469	5.421	5.364	5.379	5.418	5.500
Réplica2	5.399	5.352	5.442	5.121	5.345	5.395	5.400	5.450
N <sub>2</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.12	25.06	25.01	24.67	25.55	25.36	24.94	24.98
Réplica2	26.14	25.30	24.99	24.67	25.65	25.41	24.93	25.16
N <sub>3</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	254.55	252.91	250.96	246.76	243.23	247.77	244.13	248.95
Réplica2	256.69	254.21	251.34	247.73	243.27	247.47	246.45	248.75
N <sub>4</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2536.1	2479.1	2447.4	2436.8	2400.7	2351.2	2343.3	2411.0
Réplica2	2480.0	2461.6	2442.5	2382.6	2403.3	2399.5	2321.3	2407.5
N <sub>5</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12583	12499	12236	12024	11980	11750	12125	12254
Réplica2	12575	12182	12127	12052	12207	11938	12071	12391
N <sub>1</sub> =LC agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.458	5.246	5.479	5.399	5.386	5.427	5.427	5.479
Réplica2	5.441	5.236	5.462	5.398	5.390	5.433	5.428	5.474
N <sub>2</sub> agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.06	25.05	25.11	25.19	25.69	25.39	24.93	25.02
Réplica2	26.15	25.25	25.06	24.76	25.69	25.44	24.91	25.07
N <sub>1</sub> =LC compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.503	5.336	5.533	5.435	5.474	5.512	5.516	5.562
Réplica2	5.509	5.425	5.567	5.423	5.466	5.454	5.508	5.514
N <sub>2</sub> compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.45	25.27	25.19	24.98	26.02	25.83	24.92	25.39
Réplica2	26.51	25.45	25.26	24.82	26.02	25.84	24.97	25.45

Tabla A.II.4: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de bromuros

$N_1 = LC$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.605	2.612	2.532	2.672	2.751	2.591	2.623	2.570
Réplica2	2.609	2.618	2.555	2.678	2.749	2.594	2.640	2.594
$N_2$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	13.04	12.92	13.03	12.81	13.12	12.57	13.05	12.54
Réplica2	13.07	12.91	13.06	12.85	13.17	12.55	13.10	12.54
$N_3$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	129.77	128.89	129.81	126.30	129.33	125.88	125.88	125.50
Réplica2	130.68	129.37	130.48	126.18	126.82	123.28	124.13	124.55
$N_4$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1278	1259	1266	1238	1278	1212	1257	1216
Réplica2	1268	1243	1264	1248	1269	1226	1286	1221
$N_5$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	6891	6712	6869	6665	6833	6534	6808	6792
Réplica2	6901	6833	6818	6705	6894	6398	6826	6823
$N_1 = LC$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.747	2.719	2.722	2.731	2.713	2.726	2.850	2.724
Réplica2	2.738	2.731	2.727	2.589	2.719	2.709	2.836	2.700
$N_2$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.06	13.36	13.46	13.31	13.76	13.37	13.75	13.53
Réplica2	14.09	13.39	13.46	13.32	13.81	13.43	13.79	13.56
$N_3$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	125.76	122.88	122.91	121.91	122.55	122.38	125.00	124.28
Réplica2	125.95	123.85	123.40	121.74	122.08	121.78	126.05	124.30
$N_4$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	1282.8	1230.0	1239.1	1235.5	1240.7	1194.0	1243.0	1241.3
Réplica2	1253.4	1223.6	1229.5	1205.6	1249.0	1220.5	1362.5	1240.5
$N_5$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	7013	6869	6865	6770	6862	6608	6882	6955
Réplica2	7015	6677	6837	6806	6964	6709	6891	6996
$N_1 = LC$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.754	2.697	2.730	2.705	2.749	2.704	2.815	2.696
Réplica2	2.736	2.700	2.754	2.724	2.750	2.710	2.817	2.698
$N_2$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.06	13.32	13.46	13.46	13.82	13.38	13.71	13.64
Réplica2	14.06	13.35	13.51	13.27	13.82	13.39	13.69	13.54
$N_1 = LC$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2.743	2.702	2.726	2.708	2.737	2.710	2.849	2.708
Réplica2	2.750	2.699	2.733	2.681	2.727	2.681	2.852	2.701
$N_2$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	14.13	13.41	13.49	13.35	13.94	13.56	13.73	13.65
Réplica2	14.22	13.44	13.51	13.35	13.93	13.53	13.86	13.66

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

Tabla A.II.5: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de nitratos

N <sub>1</sub> =LC ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.172	5.179	5.456	5.494	5.563	5.315	5.340	5.204
Réplica2	5.175	5.222	5.456	5.489	5.555	5.299	5.371	5.262
N <sub>2</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	25.21	25.45	26.10	25.60	27.05	25.78	26.76	25.63
Réplica2	25.42	25.48	26.06	25.71	27.06	25.80	26.81	25.48
N <sub>3</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	254.8	259.6	263.0	254.7	262.2	256.6	261.5	255.4
Réplica2	256.1	260.9	263.6	254.4	257.3	251.2	259.3	253.4
N <sub>4</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2515	2514	2519	2462	2559	2425	2595	2456
Réplica2	2485	2487	2518	2505	2539	2455	2643	2494
N <sub>5</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12603	12343	12609	12299	12623	12108	12905	12811
Réplica2	12637	12572	12486	12404	12716	11861	12922	12868
N <sub>1</sub> =LC glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.437	5.434	5.449	5.506	5.432	5.416	5.457	5.308
Réplica2	5.447	5.468	5.448	5.225	5.408	5.441	5.455	5.284
N <sub>2</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	29.08	27.54	27.43	27.31	28.54	27.44	28.11	27.05
Réplica2	29.14	27.77	27.43	27.39	28.57	27.56	28.21	26.96
N <sub>3</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	251.1	246.7	243.6	242.1	242.2	240.3	242.1	239.4
Réplica2	251.4	247.6	244.0	242.5	241.1	239.8	244.9	241.3
N <sub>4</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2753	2483	2495	2498	2516	2424	2481	2519
Réplica2	2547	2468	2491	2440	2534	2461	2468	2476
N <sub>5</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12686	12362	12666	12255	12543	12005	12730	12558
Réplica2	12714	12147	12467	12339	12723	12193	12741	12657
N <sub>1</sub> =LC agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.457	5.292	5.435	5.437	5.397	5.398	5.458	5.248
Réplica2	5.440	5.318	5.432	5.446	5.399	5.428	5.468	5.273
N <sub>2</sub> agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	29.08	27.52	27.44	27.82	28.51	27.44	27.70	27.73
Réplica2	29.12	27.74	27.41	27.25	28.62	27.52	27.82	27.08
N <sub>1</sub> =LC compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.461	5.499	5.361	5.503	5.451	5.464	5.469	5.439
Réplica2	5.436	5.418	5.345	5.501	5.458	5.383	5.466	5.421
N <sub>2</sub> compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	29.54	27.98	27.31	27.50	29.00	28.36	28.31	29.15
Réplica2	29.68	28.04	27.25	27.61	29.06	28.13	29.27	27.82

Tabla A.II.6: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de fosfatos

$N_1 = LC$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	3.916	3.911	3.969	3.956	3.952	3.853	4.001	3.294
Réplica2	3.931	3.833	3.384	3.819	3.990	3.610	3.761	2.775
$N_2$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	23.49	23.48	22.44	23.56	24.14	23.39	22.89	22.23
Réplica2	23.86	23.81	22.89	23.45	24.04	23.34	23.47	22.31
$N_3$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	249.64	252.03	250.46	255.50	255.05	251.15	258.38	253.90
Réplica2	250.94	255.68	251.56	255.04	252.67	247.62	263.00	243.30
$N_4$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2508.4	2303.7	2506.5	2461.8	2577.7	2480.7	2599.5	2372.5
Réplica2	2506.1	2460.2	2483.3	2494.1	2530.5	2453.2	2709.3	2512.8
$N_5$ ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12569	12300	12463	12469	12878	12580	12787	12684
Réplica2	12518	12566	12320	12487	13334	12305	12591	12736
$N_1 = LC$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.234	4.899	4.993	4.779	5.153	4.947	4.840	4.938
Réplica2	5.038	5.260	4.962	4.753	4.938	4.756	4.953	5.057
$N_2$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	28.15	27.25	27.58	25.46	27.67	26.98	27.58	27.97
Réplica2	28.41	26.42	27.65	27.59	27.71	27.24	27.77	27.17
$N_3$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	250.98	247.05	246.49	245.43	251.38	246.90	250.45	256.45
Réplica2	252.74	252.20	249.71	244.44	251.43	249.18	250.08	250.60
$N_4$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2555.8	2506.3	2513.5	2472.4	2516.2	2356.7	2453.8	2553.5
Réplica2	2493.9	2442.6	2491.6	2399.5	2528.2	2442.0	2374.8	2521.3
$N_5$ glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12824	12714	12726	12450	12758	12419	12147	12618
Réplica2	12843	12365	12809	12549	12869	12026	12210	12698
$N_1 = LC$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.492	5.191	4.455	4.376	4.748	5.028	4.248	4.930
Réplica2	5.314	5.104	5.212	4.531	5.107	4.969	4.919	4.941
$N_2$ agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	27.61	27.59	27.26	26.80	27.86	27.46	27.54	28.53
Réplica2	28.33	27.45	27.75	21.00	28.09	27.19	27.35	28.72
$N_1 = LC$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	3.204	3.536	3.101	3.069	3.192	3.460	3.457	3.233
Réplica2	2.899	3.142	2.939	2.643	2.910	3.339	3.396	2.863
$N_2$ compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	25.72	24.46	21.41	20.78	24.25	23.65	20.88	20.66
Réplica2	25.25	24.12	21.41	21.07	24.34	23.35	20.76	20.23

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

Tabla A.II.7: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de sulfatos

N <sub>1</sub> =LC ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.444	5.511	5.803	5.495	5.721	5.385	5.459	5.431
Réplica2	5.500	5.486	5.705	5.471	5.681	5.412	5.484	5.472
N <sub>2</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	25.87	25.40	25.71	25.30	26.14	24.90	25.79	24.80
Réplica2	26.00	25.39	25.78	25.48	26.14	24.96	25.71	24.77
N <sub>3</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	255.8	251.4	251.6	247.8	252.7	245.5	246.8	245.9
Réplica2	257.1	253.3	253.6	247.6	248.2	241.1	242.8	244.9
N <sub>4</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2573.1	2492.3	2491.8	2471.9	2516.5	2400.0	2457.3	2382.8
Réplica2	2542.4	2460.8	2484.4	2487.5	2511.7	2417.5	2530.3	2398.3
N <sub>5</sub> ftalato	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12845	12307	12602	12243	12652	12068	12610	12666
Réplica2	12850	12634	12478	12326	12741	11857	12681	12514
N <sub>1</sub> =LC glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.588	5.474	5.562	5.537	5.489	5.403	5.531	5.497
Réplica2	5.583	5.516	5.552	5.261	5.472	5.426	5.542	5.502
N <sub>2</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.33	24.76	25.01	24.81	25.77	24.83	25.27	25.08
Réplica2	26.43	24.76	24.91	24.81	25.82	24.85	25.35	25.08
N <sub>3</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	254.05	246.61	246.64	244.21	245.12	242.15	244.90	247.68
Réplica2	255.26	248.62	247.10	245.20	244.53	242.02	246.75	247.68
N <sub>4</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	2560.5	2431.8	2455.1	2459.3	2455.5	2350.7	2403.5	2449.3
Réplica2	2507.0	2426.2	2439.5	2401.3	2470.3	2404.8	2390.0	2455.8
N <sub>5</sub> glucosa	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	12657	12343	12367	12221	12350	11775	12336	12552
Réplica2	12716	12016	12335	12317	12514	11966	12380	12619
N <sub>1</sub> =LC agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.680	5.609	5.595	5.567	5.561	5.481	5.537	5.512
Réplica2	5.646	5.526	5.588	5.536	5.538	5.474	5.528	5.526
N <sub>2</sub> agua	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.19	24.82	24.96	25.17	25.80	24.85	25.05	25.09
Réplica2	26.33	24.76	25.05	24.65	26.05	24.93	25.09	25.14
N <sub>1</sub> =LC compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	5.596	5.452	5.729	5.596	5.630	5.482	5.649	5.556
Réplica2	5.598	5.542	5.592	5.497	5.593	5.487	5.550	5.545
N <sub>2</sub> compuesta	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2	Analista1	Analista2
Réplica1	26.55	25.60	25.06	24.84	25.98	25.28	25.08	25.58
Réplica2	26.52	25.40	25.24	24.87	26.14	25.17	25.06	25.24

**Precisión**

Tabla A.II.8: Cálculo de la precisión para el fluoruro

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	U <sup>2</sup> <sub>precisión</sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	-0.001738	0.006588	0.001113	0.007701	0.08775	3.2
	N <sub>2</sub>	-0.03188	0.07148	0.01243	0.08391	0.2897	2.2
	N <sub>3</sub>	2.622	2.324	0.8598	5.806	2.410	1.9
	N <sub>4</sub>	-63.77	604.4	113.2	717.6	26.79	2.2
	N <sub>5</sub>	477	15045	3004	18526	136.1	2.2
glucosa	N <sub>1</sub>	-0.001188	0.001804	0.001179	0.002983	0.05461	2.2
	N <sub>2</sub>	-0.01874	0.06499	0.02254	0.0875	0.2958	2.2
	N <sub>3</sub>	0.6362	1.095	0.8883	2.619	1.618	1.3
	N <sub>4</sub>	186.4	321.1	91.62	599.1	24.48	2.0
	N <sub>5</sub>	8287	-5837	22892	31179	176.6	2.8
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.0003434	0.0008184	0.0002146	0.001033	0.03214	1.3
	N <sub>2</sub>	0.01554	0.04810	0.001644	0.06529	0.2555	1.9
agua	N <sub>1</sub>	0.0006746	0.0002437	0.0002862	0.001204	0.03471	1.4
	N <sub>2</sub>	0.004258	0.05573	0.008584	0.06857	0.2619	1.9

Tabla A.II.9: Cálculo de la precisión para el cloruro

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	U <sup>2</sup> <sub>precisión</sub> (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	0.0007587	0.002831	0.0001166	0.003707	0.06088	2.3
	N <sub>2</sub>	0.0002741	0.1242	0.003270	0.1278	0.3574	2.7
	N <sub>3</sub>	8.445	3.593	0.9898	13.03	3.609	3.0
	N <sub>4</sub>	93.04	752.7	109.5	955.3	30.91	2.5
	N <sub>5</sub>	5192	22449	2104	29745	172.5	2.8
glucosa	N <sub>1</sub>	0.0004407	0.0004034	0.001485	0.002329	0.04826	1.8
	N <sub>2</sub>	0.02405	0.07361	0.003770	0.1014	0.3185	2.4
	N <sub>3</sub>	2.207	1.582	6.915	10.70	3.272	2.6
	N <sub>4</sub>	316.9	366.8	105.3	788.9	28.09	2.3
	N <sub>5</sub>	2871	11678	2801	17350	131.7	2.1
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.0007	0.0019	0.008	0.0099	0.09935	3.5
	N <sub>2</sub>	0.2072	0.0615	0.0123	0.281	0.5301	3.8
agua	N <sub>1</sub>	-0.0002172	0.001366	0.0004884	0.001855	0.04307	1.6
	N <sub>2</sub>	0.01161	0.09237	0.01556	0.1195	0.3457	2.5

Tabla A.II.10: Cálculo de la precisión para el nitrito

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	U <sup>2</sup> <sub>precisión</sub> (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	s (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	0.002725	0.008599	0.0002009	0.01153	0.1074	2.1
	N <sub>2</sub>	0.5997	0.2566	0.004489	0.8608	0.9278	3.9
	N <sub>3</sub>	105.7	16.86	3.676	126.3	11.24	4.7
	N <sub>4</sub>	4943	2870	221.6	8035	89.64	3.5
	N <sub>5</sub>	15061	91176	9968	116205	340.9	2.8
glucosa	N <sub>1</sub>	-0.001500	0.002532	0.006007	0.008539	0.09241	1.7
	N <sub>2</sub>	0.08540	0.1307	0.006597	0.2227	0.4719	1.9
	N <sub>3</sub>	12.70	6.005	0.8060	19.51	4.417	1.8
	N <sub>4</sub>	2167	874	577.7	3619	60.16	2.5
	N <sub>5</sub>	30943	16817	13867	61627	248.2	2.0
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.0008248	0.003469	0.0009313	0.004400	0.06633	1.2
	N <sub>2</sub>	0.1143	0.2014	0.004455	0.3201	0.5658	2.2
agua	N <sub>1</sub>	-0.001115	0.006579	0.00004731	0.006626	0.08140	2.7
	N <sub>2</sub>	0.05200	0.1181	0.01530	0.1854	0.4306	1.7

Tabla A.II.11: Cálculo de la precisión para el bromuro

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	U <sup>2</sup> <sub>precisión</sub> (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	s (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	-0.001816	0.005530	0.00009344	0.005623	0.07499	2.9
	N <sub>2</sub>	-0.03701	0.08658	0.0006097	0.08719	0.2953	2.3
	N <sub>3</sub>	2.417	3.002	1.160	6.579	2.565	2.0
	N <sub>4</sub>	-357.8	791.2	98.74	890	29.83	2.4
	N <sub>5</sub>	-6757	23498	2652	26150	161.7	2.4
glucosa	N <sub>1</sub>	-0.0000616	0.002031	0.001344	0.003376	0.05810	2.1
	N <sub>2</sub>	-0.02267	0.08753	0.0006876	0.08822	0.2970	2.2
	N <sub>3</sub>	1.370	1.107	0.1835	2.661	1.631	1.3
	N <sub>4</sub>	14.04	362.1	1059	1435	37.89	3.1
	N <sub>5</sub>	-4021	14938	3832	18770	137.0	2.0
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.0006659	0.003191	0.0001147	0.003306	0.05750	2.1
	N <sub>2</sub>	-0.01875	0.09361	0.001595	0.09521	0.3086	2.3
agua	N <sub>1</sub>	-0.0009397	0.002320	0.00008219	0.002402	0.04901	1.8
	N <sub>2</sub>	-0.03202	0.09104	0.003101	0.09414	0.3068	2.3

Tabla A.II.12: Cálculo de la precisión para el nitrato

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sup>2</sup> precisón (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	s (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	0.01225	0.009858	0.0004080	0.02252	0.1501	2.8
	N <sub>2</sub>	-0.01091	0.4127	0.005286	0.4179	0.6465	2.5
	N <sub>3</sub>	-9.824	19.21	4.086	23.29	4.826	1.9
	N <sub>4</sub>	-1531	3973	534.5	4507	67.14	2.7
	N <sub>5</sub>	21743	62652	9559	93954	306.5	2.4
glucosa	N <sub>1</sub>	-0.001156	0.001518	0.005125	0.006643	0.0815	1.5
	N <sub>2</sub>	-0.08652	0.5675	0.005670	0.5731	0.7571	2.7
	N <sub>3</sub>	12.03	3.477	0.9003	16.40	4.050	1.7
	N <sub>4</sub>	-822.4	3248	3110	6358	79.74	3.2
	N <sub>5</sub>	-18511	66191	10706	76897	277.3	2.2
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.001416	0.002651	0.0008873	0.003538	0.05948	1.1
	N <sub>2</sub>	0.2052	0.3302	0.1747	0.7101	0.8427	3.0
agua	N <sub>1</sub>	-0.002750	0.007652	0.0001677	0.007820	0.08843	1.6
	N <sub>2</sub>	-0.04952	0.4090	0.05186	0.4609	0.6789	2.4

Tabla A.II.13: Cálculo de la precisión para el fosfato

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sup>2</sup> precisón (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	s (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	-0.01182	0.07905	0.04717	0.1262	0.3553	9.5
	N <sub>2</sub>	0.09939	0.2323	0.05151	0.3832	0.619	2.7
	N <sub>3</sub>	-10.51	19.37	10.52	29.89	5.467	2.2
	N <sub>4</sub>	-2379	6653	3798	10451	102.2	4.1
	N <sub>5</sub>	-2080	44471	26164	70634	265.8	2.1
glucosa	N <sub>1</sub>	0.003886	0.003220	0.01750	0.02461	0.1569	3.2
	N <sub>2</sub>	-0.1678	0.2673	0.3775	0.6448	0.803	2.9
	N <sub>3</sub>	3.033	2.109	5.035	10.18	3.190	1.3
	N <sub>4</sub>	-2048	3767	1774	5540	74.43	3.0
	N <sub>5</sub>	-31734	82308	19749	102057	319.5	2.5
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.003323	0.02521	0.04315	0.06835	0.2614	8.3
	N <sub>2</sub>	4.122	0.2825	0.0443	4.449	2.109	9.3
agua	N <sub>1</sub>	0.05547	0.004233	0.07619	0.1359	0.3686	7.5
	N <sub>2</sub>	0.1965	0.7983	2.161	3.156	1.777	6.5

Tabla A.II.14: Cálculo de la precisión para el sulfato

Matriz	N <sub>i</sub>	S <sup>2</sup> <sub>Día</sub> (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Analista</sub> (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S <sup>2</sup> <sub>Replicas</sub> (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sup>2</sup> <sub>precisión</sub> (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	S (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	%DER
ftalato	N <sub>1</sub>	-0.005408	0.02018	0.001161	0.02134	0.1461	2.6
	N <sub>2</sub>	-0.1477	0.3509	0.003994	0.3549	0.5958	2.3
	N <sub>3</sub>	10.92	9.455	4.179	24.55	4.955	2.0
	N <sub>4</sub>	-737.9	3298	508.2	3806	61.69	2.5
	N <sub>5</sub>	-21625	87106	13113	100219	316.6	2.5
glucosa	N <sub>1</sub>	-0.0007239	0.002390	0.004939	0.007330	0.0856	1.6
	N <sub>2</sub>	-0.1452	0.4505	0.001819	0.4523	0.6725	2.7
	N <sub>3</sub>	6.258	7.823	0.6554	14.74	3.839	1.6
	N <sub>4</sub>	-574.9	2394	617.2	3011	54.87	2.3
	N <sub>5</sub>	-18630	72905	11900	84805	291.2	2.4
compuesta	N <sub>1</sub>	-0.001877	0.003688	0.003001	0.006689	0.08178	1.5
	N <sub>2</sub>	0.07828	0.2384	0.01399	0.3306	0.5750	2.3
agua	N <sub>1</sub>	0.001152	0.001701	0.0006194	0.003472	0.0589	1.1
	N <sub>2</sub>	-0.1332	0.3946	0.02304	0.4176	0.6462	2.6

### Incertidumbre

Tabla A.II.15: Estimación de la incertidumbre en la determinación de fluoruro

Matriz	Nivel	u <sub>exa</sub> <sup>2</sup> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sub>precision</sub> <sup>2</sup> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sub>traz</sub> <sup>2</sup> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	u <sub>c</sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	I <sub>F<sup>-</sup></sub> (mg F <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	%I <sub>F<sup>-</sup></sub>
ftalato	1	0.04349	0.007701	0.0002464	0.2268	0.45	18
	2	0.1897	0.08391	0.001510	0.5245	1.0	8.3
	3	8.898	5.806	0.01791	3.837	7.7	6.1
	4	765.0	717.6	1.671	38.53	77.	6.2
	5	23782	18526	39.60	205.8	410	6.6
glucosa	1	0.003329	0.002983	0.0002186	0.08081	0.16	6.3
	2	0.05674	0.08753	0.001752	0.3821	0.76	5.6
	3	4.761	2.619	0.01762	2.720	5.4	4.3
	4	1341	599.1	1.686	44.07	88.	7.0
	5	17600	31179	41.07	221.0	440	6.9
agua	1	0.0009034	0.001204	0.0002186	0.04823	0.096	3.8
	2	0.05415	0.06857	0.001752	0.3528	0.71	5.2
compuesta	1	0.005723	0.001033	0.0002186	0.08351	0.17	6.5
	2	0.1561	0.06529	0.001752	0.4724	0.94	7.0

Tabla A.II.16: Estimación de la incertidumbre en la determinación de cloruro

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{Cl}^-}$ (mg Cl <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{Cl}^-}$
ftalato	1	0.01512	0.003707	0.0002766	0.1382	0.28	11
	2	0.2437	0.1278	0.002657	0.6117	1.2	9.2
	3	13.68	13.03	0.02400	5.170	10	8.4
	4	1805	955.3	1.973	52.55	110	8.4
	5	60520	29745	45.27	300.5	600	9.6
glucosa	1	0.007937	0.002329	0.0002697	0.1026	0.21	7.9
	2	0.07294	0.1014	0.002087	0.4201	0.84	6.1
	3	9.337	10.70	0.02511	4.479	9.0	7.0
	4	1530	788.9	2.065	48.18	96	7.5
	5	41233	17350	46.61	242.1	480	7.7
agua	1	0.006990	0.001855	0.0002697	0.09547	0.19	7.4
	2	0.09213	0.1195	0.002087	0.4623	0.92	6.7
compuesta	1	0.03547	0.009870	0.0002697	0.2136	0.43	17
	2	0.4240	0.2810	0.002087	0.8409	1.7	12

Tabla A.II.17: Estimación de la incertidumbre en la determinación de nitrito

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{NO}_2^-}$ (mg NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{NO}_2^-}$
ftalato	1	0.02136	0.01153	0.001013	0.1841	0.37	7.2
	2	2.373	0.8608	0.004323	1.800	3.6	14
	3	230.3	126.3	0.1417	18.89	38	15
	4	14187	8035	15.80	149.1	300	11
	5	204131	116205	360.5	566.3	1100	9.0
glucosa	1	0.01233	0.008539	0.001082	0.1482	0.30	5.6
	2	0.2203	0.2227	0.006449	0.6704	1.3	5.3
	3	23.76	19.51	0.1422	6.588	13	5.2
	4	7309	3618	14.33	104.6	210	8.4
	5	129761	61626.	357.5	437.9	880	7.0
agua	1	0.01252	0.006626	0.001082	0.1422	0.28	5.4
	2	0.2061	0.1854	0.006449	0.6309	1.3	5.0
compuesta	1	0.02384	0.004400	0.001082	0.1712	0.34	6.5
	2	0.4536	0.3201	0.006449	0.8833	1.8	7.0

*Validación de métodos y estimación de la incertidumbre*

Tabla A.II.18: Estimación de la incertidumbre en la determinación de bromuro

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{Br}^-}$ (mg Br <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{Br}^-}$
ftalato	1	0.01432	0.005623	0.0002744	0.1422	0.28	11
	2	0.05967	0.08719	0.004174	0.3886	0.78	6.0
	3	4.707	6.579	0.02379	3.363	6.7	5.2
	4	624.0	890.0	1.363	38.93	78	6.2
	5	29993	26150	31.92	237.0	470	7.0
glucosa	1	0.01273	0.003376	0.0002940	0.1281	0.26	9.7
	2	0.06093	0.08822	0.002381	0.3893	0.78	5.7
	3	3.532	2.661	0.02342	2.493	5.0	4.0
	4	862.3	1435	1.346	47.95	100	7.7
	5	21937	18769	33.33	201.8	400	5.8
agua	1	0.009457	0.002402	0.0002940	0.1102	0.22	8.3
	2	0.05742	0.09414	0.002381	0.3924	0.78	5.8
compuesta	1	0.01373	0.003306	0.0002940	0.1316	0.26	9.9
	2	0.09224	0.09521	0.002381	0.4357	0.87	6.4

Tabla A.II.19: Estimación de la incertidumbre en la determinación de nitrato

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{NO}_3^-}$ (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{NO}_3^-}$
ftalato	1	0.07266	0.02252	0.001505	0.3109	0.62	12
	2	1.254	0.4179	0.01682	1.300	2.6	10
	3	57.66	23.29	1.331	9.071	18	7.3
	4	5200	4507	132.6	99.20	200	8.0
	5	91851	93954	3329	434.9	870	7.0
glucosa	1	0.01116	0.006643	0.001611	0.1393	0.28	5.3
	2	0.3997	0.5731	0.02276	0.9978	2.0	7.1
	3	20.97	16.40	1.308	6.220	12	5.0
	4	6048	6358	134.9	112.0	220	8.9
	5	51422	76897	3320	362.8	730	5.8
agua	1	0.01203	0.007820	0.001611	0.1465	0.29	5.6
	2	0.3949	0.4609	0.02276	0.9373	1.9	6.7
compuesta	1	0.01750	0.003538	0.001611	0.1505	0.30	5.7
	2	0.8485	0.7101	0.02276	1.258	2.5	9.0

Tabla A.II.20: Estimación de la incertidumbre en la determinación de fosfato

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{PO}_4}^{-3}$ (mg PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{PO}_4}^{-3}$
ftalato	1	1.368	0.1144	0.0009692	1.223	2.4	48
	2	3.272	0.3832	0.003880	1.913	3.8	15
	3	20.65	29.89	0.07179	7.114	14	5.6
	4	8101	10451	7.448	136.2	270	11
	5	115024	70634	195.5	431.1	860	6.6
glucosa	1	0.04338	0.02461	0.0009939	0.2626	0.53	10
	2	0.3171	0.6448	0.006685	0.9842	2.0	7.2
	3	7.084	10.18	0.07026	4.163	8.3	3.3
	4	2747	5540	7.400	91.08	180	7.3
	5	74959	102057	185.8	421.0	840	6.7
agua	1	0.1511	0.1359	0.0009939	0.5366	1.1	21
	2	4.318	3.156	0.006685	2.735	5.5	20
compuesta	1	1.719	0.06835	0.00009939	1.337	2.7	52
	2	16.59	4.449	0.006685	4.587	9.2	33

Tabla A.II.21. Estimación de la incertidumbre en la determinación de sulfato

Matriz	Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precision}}^2$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{SO}_4}^{-2}$ (mg SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{SO}_4}^{-2}$
ftalato	1	0.1744	0.02134	0.0009444	0.4435	0.89	18
	2	0.3239	0.3549	0.003378	0.8260	1.7	6.6
	3	19.41	24.55	0.04019	6.634	13	5.3
	4	4311	3806	4.536	90.12	180	7.2
	5	176805	100219	101.8	526.4	1100	8.7
glucosa	1	0.009193	0.007330	0.001091	0.1327	0.26	4.9
	2	0.2218	0.4523	0.005540	0.8244	1.6	6.4
	3	27.67	14.74	0.04072	6.515	13	5.2
	4	4376	3011	4.494	85.98	170	6.9
	5	145729	84804	108.8	480.3	960	7.7
agua	1	0.01978	0.003472	0.001091	0.1560	0.31	5.8
	2	0.2056	0.4176	0.005540	0.7929	1.6	6.2
compuesta	1	0.01937	0.006689	0.001091	0.1648	0.33	6.1
	2	0.3061	0.3306	0.005540	0.8014	1.6	6.3

### A.II.3. FENOLES

#### Resultados analíticos

Tabla A.II.22: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de fenoles

N <sub>1</sub> = LC	Día 1				Día 2				Día 3				Día 4			
	Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2		Analista 1		Analista 2	
	Desti 1	Desti 2														
Replica 1	0.5090	0.5300	0.5155	0.5543	0.5163	0.4896	0.4818	0.4600	0.4705	0.5565	0.4796	0.4795	0.5200	0.4862	0.5201	0.5388
Replica 2	0.5108	0.4794	0.5318	0.5519	0.5368	0.4797	0.4106	0.4508	0.4543	0.5322	0.4855	0.4736	0.5164	0.4847	0.5209	0.5388
Día 1																
N <sub>2</sub>	Analista 1		Analista 2													
Replica 1	5.137	5.142	5.041	5.092	5.120	5.132	4.851	4.780	4.897	4.949	4.994	5.032	4.876	4.543	5.411	5.273
Replica 2	5.145	5.204	5.016	4.961	5.081	5.122	4.838	4.800	4.874	4.926	5.002	5.035	4.772	4.549	5.456	5.498
Día 2																
N <sub>3</sub>	Analista 1		Analista 2													
Replica 1	52.31	50.20	51.37	50.31	49.15	48.87	49.97	51.27	50.59	48.02	50.65	50.27	50.98	46.33	49.23	48.76
Replica 2	52.13	50.25	51.65	50.32	48.77	48.81	50.11	51.31	50.50	48.13	50.54	50.95	51.27	45.82	49.69	51.06
Día 3																
N <sub>4</sub>	Analista 1		Analista 2													
Replica 1	257.0	264.4	246.6	250.7	248.3	241.9	251.4	242.0	245.4	241.0	248.6	250.5	250.4	249.8	246.6	247.5
Replica 2	258.7	263.3	247.8	249.9	247.7	241.6	252.7	240.0	247.8	241.5	253.2	248.2	250.9	249.6	246.5	246.4
Día 4																
N <sub>5</sub> = LS	Analista 1		Analista 2													
Replica 1	485.0	486.1	520.3	518.2	494.1	498.5	501.5	492.9	485.1	494.0	504.7	505.0	483.7	479.3	496.5	502.1
Replica 2	485.8	485.5	504.8	518.2	495.0	498.2	501.5	505.6	484.8	499.4	501.7	503.4	477.7	478.9	498.5	502.7

## Precisión

Tabla A.II.23: Cálculo de la precisión para la determinación de fenoles

Nivel	$s_{\text{Día}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s_{\text{Analista}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s_{\text{Replicas}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precisión}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	%DER
N <sub>1</sub>	0.0001015	0.0003229	0.0005343	0.0002949	0.001254	7.1
N <sub>2</sub>	0.0000	0.07729	0.004150	0.002754	0.08419	5.8
N <sub>3</sub>	0.2628	0.0000	2.321	0.2075	2.792	3.3
N <sub>4</sub>	3.804	17.41	14.18	1.426	36.83	2.4
N <sub>5</sub>	0.0000	177.3	5.972	15.21	198.5	2.8

## Incertidumbre

Tabla A.II.24: Estimación de la incertidumbre en la determinación de fenoles

Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{rep}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}^2$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$l_{\text{fenol}}$ (mg fenol·L <sup>-1</sup> )	% $l_{\text{rel}}$
N <sub>1</sub>	0.009551	0.001254	1,29E-03	0.04701	0.094	19
N <sub>2</sub>	0.06802	0.08419	0.001295	0.3918	0.78	16
N <sub>3</sub>	5.808	2.792	0.03639	2.939	5.9	12
N <sub>4</sub>	72.96	36.83	0.4846	10.50	21	8.4
N <sub>5</sub>	166.0	198.5	1.891	19.14	38	7.7

## A.II.4. ACEITES Y GRASAS

### Resultados analíticos

Tabla A.II.25: Resultados analíticos del diseño de experimentos para la determinación de aceites y grasas

$N_1 = LC$	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista 1	Analista 2						
Réplica 1	12.5	11.4	11.0	10.1	12.5	10.7	10.0	12.6
Réplica 2	12.3	12.6	11.2	13.3	12.1	10.3	13.9	11.8
$N_2$	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista 1	Analista 2						
Réplica 1	53.1	52.6	47.8	51.1	53.2	52.1	47.1	51.3
Réplica 2	50.7	49.7	51.3	55.4	48.0	50.8	49.1	45.5
$N_3$	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista 1	Analista 2						
Réplica 1	241.5	268.0	255.4	228.9	232.6	241.5	218.4	247.8
Réplica 2	252.4	276.2	252.7	237.2	231.8	216.9	225.9	267.1
$N_4$	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista 1	Analista 2						
Réplica 1	891.9	964.5	965.3	968.1	1042.0	981.0	1019.7	965.4
Réplica 2	936.0	1027.9	1038.7	1021.4	987.0	1054.5	1018.0	969.2
$N_5 = LS$	Día 1		Día 2		Día 3		Día 4	
	Analista 1	Analista 2						
Réplica 1	4677.5	4779.1	4748.6	4914.4	4760.7	4738.4	4954.7	4946.5
Réplica 2	4678.2	4896.4	4917.7	4660.0	4791.4	4961.5	4993.6	5250.5

## Precisión

Tabla A.II.26: Calculo de la precisión para la determinación de A&G

Nivel	$s_{\text{Día}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s_{\text{Analista}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s_{\text{Replicas}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{precisión}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$s$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	%DER
N <sub>1</sub>	0.2424	1.046	10159	2.447	1.564	13
N <sub>2</sub>	0.000	0.000	7.018	7.018	2.649	5.2
N <sub>3</sub>	0.000	189.6	106.8	296.4	17.22	7.1
N <sub>4</sub>	120.6	518.7	1141	1781	42.20	4.3
N <sub>5</sub>	18982	0.00	15723	34705	186.3	3.8

## Incertidumbre

Tabla A.II.27: Estimación de la incertidumbre en la determinación de A&G

Nivel	$u_{\text{exa}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{rep}}^2$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_{\text{traz}}$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> ) <sup>2</sup>	$u_c$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	$I_{\text{A&G}}$ (mg A&G·L <sup>-1</sup> )	% $I_{\text{rel}}$
N <sub>1</sub>	2.597	2.447	0.08340	2.264	4.5	39
N <sub>2</sub>	5.466	7.018	0.7962	3.644	7.3	14
N <sub>3</sub>	333.7	296.4	5.279	25.21	50	20
N <sub>4</sub>	3105	1781	73.82	70.42	140	14
N <sub>5</sub>	29074	34705	1845	256.2	510	10

## A.II.5. OTROS MODELOS DE LA ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE PARA LOS METODOS DE ANALISIS

Modelo “bottom-up” para la estimación de la incertidumbre en la determinación de aniones

Tabla A.II.28: Incertidumbre de las muestras de aplicando el modelo “bottom-up”, en mg·L<sup>-1</sup>

Ftalato	Dia 1		F <sup>-</sup>	Cl <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Br <sup>-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
			N <sub>1</sub>	C I	C I	C I	C I	C I	C I
	N <sub>1</sub>	2.75 0.47	2.64 0.88	5.2 1.3	2.61 0.40	5.2 1.1	3.91 0.37	5.5 1.2	
		2.78 0.47	2.64 0.88	5.2 1.3	2.62 0.40	5.2 1.1	3.83 0.38	5.5 1.2	
		13.21 0.50	13.22 0.92	24.9 1.2	12.93 0.38	25.5 1.2	23.47 0.32	25.5 1.1	
		13.23 0.50	13.25 0.93	24.8 1.2	12.91 0.38	25.5 1.2	23.81 0.33	25.5 1.1	
	N <sub>3</sub>	129.5 5.8	124.9 9.5	249 14	128.9 4.7	260 14	252.0 6.2	253 13	
		129.9 5.8	125.7 9.6	250 14	129.4 4.7	261 14	255.6 6.3	255 13	
	N <sub>4</sub>	1249 51	1251 90	2595 140	1260 41	2514 120	2303 44	2503 120	
		1250 51	1230 88	2582 140	1243 40	2488 120	2460 48	2472 120	

Tabla A.II.28 (cont.): Incertidumbre de las muestras de aplicando el modelo “bottom-up”, en mg·L<sup>-1</sup>

		F <sup>-</sup>		Cl <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		Br <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		
		N <sub>i</sub>	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
Dia 2	N <sub>5</sub>	6190 300	6434 460	12420 730	6710 290	12350 680	12300 420	12630 670								
		6330 310	6260 470	12640 750	6840 290	12580 690	12560 430	12690 690								
	N <sub>1</sub>	2.74 0.52	2.66 0.88	5.1 1.4	2.67 0.66	5.5 1.9	3.95 0.78	5.5 1.3								
		2.74 0.52	2.66 0.88	5.1 1.4	2.67 0.66	5.5 1.9	3.81 0.79	5.5 1.3								
	N <sub>2</sub>	12.82 0.79	12.8 1.3	23.8 2.1	12.8 1.0	25.6 3.0	23.6 1.1	25.3 1.9								
		13.15 0.78	12.9 1.3	23.8 2.1	12.8 1.0	25.7 3.0	23.4 1.1	25.5 1.9								
	N <sub>3</sub>	128.2 5.5	120.8 8.7	238 13	126.3 6.0	255 17	255.5 8.2	248 13								
		127.9 5.5	120.6 8.7	239 13	126.2 6.0	254 17	255.0 8.2	248 13								
	N <sub>4</sub>	1248 55	1230 88	2540 140	1248 61	2500 170	2494 84	2490 130								
		1243 55	1222 88	2530 140	1238 61	2460 170	2461 83	2480 130								
	N <sub>5</sub>	6130 410	6010 680	12100 1100	6700 510	12400 1500	12480 580	12320 970								
		6100 410	5970 680	12100 1100	6660 510	12300 1500	12460 580	12240 970								
Dia 3	N <sub>1</sub>	2.75 0.49	2.70 0.96	5.1 1.3	2.59 0.41	5.3 1.3	3.85 0.67	5.4 1.2								
		2.74 0.49	2.71 0.96	5.1 1.3	2.59 0.41	5.3 1.3	3.60 0.68	5.4 1.2								
	N <sub>2</sub>	12.94 0.50	12.80 0.83	23.5 1.1	12.57 0.39	25.8 1.2	23.39 0.53	24.9 1.1								
		12.94 0.50	12.85 0.84	23.4 1.1	12.55 0.39	25.8 1.2	23.33 0.53	25.0 1.1								
	N <sub>3</sub>	127.9 6.5	118 12	236 16	125.9 5.5	257 16	251.1 9.2	245 16								
		125.7 6.5	116 12	231 16	123.3 5.5	251 16	247.5 9.2	241 16								
	N <sub>4</sub>	1207 62	1170 120	2450 150	1213 51	2420 160	2480 81	2400 150								
		1225 62	1190 120	2470 150	1226 51	2450 160	2452 82	2420 150								
	N <sub>5</sub>	6030 390	5860 750	11860 970	6530 310	12100 990	12580 510	12060 950								
		5920 390	5750 760	16010 980	6400 310	11850 990	12300 510	11850 960								
Dia 4	N <sub>1</sub>	2.70 0.55	2.8 1.1	5.0 1.4	2.57 0.52	5.1 1.5	3.0 1.3	5.4 1.5								
		2.74 0.55	2.8 1.1	5.0 1.4	2.59 0.51	5.2 1.5	3.5 1.3	5.5 1.5								
	N <sub>2</sub>	12.92 0.82	12.9 1.7	22.8 2.1	12.54 0.77	25.6 2.2	22.4 1.8	24.8 2.3								
		12.96 0.82	12.9 1.7	22.7 2.1	12.55 0.77	25.4 2.2	22.5 1.8	24.8 2.3								
	N <sub>3</sub>	127 11	123 24	231 29	125 11	254 31	257 24	246 32								
		126 11	122 24	229 29	125 11	252 31	246 24	245 32								
	N <sub>4</sub>	1200 120	1230 240	2390 290	1220 110	2450 320	2400 250	2380 330								
		1210 120	1230 240	2410 290	1220 110	2490 320	2540 250	2400 320								
	N <sub>5</sub>	6320 340	6460 540	12540 800	6800 340	12820 800	12670 700	12670 820								
		6350 340	6450 540	12400 790	3830 340	12890 800	12720 710	12520 800								
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Tabla A.II.28 (cont.): Incertidumbre de las muestras de aplicando el modelo “bottom-up”, en mg·L<sup>-1</sup>

		F <sup>-</sup>		Cl <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		Br <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		
		N <sub>i</sub>	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
glucosa	Dia1	N <sub>1</sub>	2.56	0.61	2.67	0.96	5.4	1.5	2.73	0.54	5.5	1.5	4.78	0.45	5.5	1.4
			2.45	0.62	2.53	0.97	5.1	1.5	2.58	0.55	5.2	1.5	4.75	0.45	5.2	1.4
		N <sub>2</sub>	13.27	0.90	13.3	1.4	24.7	2.2	13.31	0.81	27.3	2.2	25.45	0.67	24.8	2.2
			13.86	0.89	13.2	1.4	24.7	2.2	13.32	0.81	27.4	2.2	27.58	0.66	24.8	2.2
		N <sub>3</sub>	123.4	6.2	124.3	9.8	247	16	121.9	5.7	242	15	245.4	5.7	244	15
			123.6	6.2	124.9	9.8	248	16	121.8	5.7	243	15	244.4	5.7	245	15
		N <sub>4</sub>	1247	63	1255	99	2440	160	1240	59	2500	160	2472	62	2460	150
			1223	63	1228	98	2390	150	1210	58	2440	160	2399	60	2400	150
		N <sub>5</sub>	6290	460	6070	730	12020	1100	6770	410	12200	1200	12450	380	12200	1100
			6320	460	6110	730	12050	1100	6810	410	12300	1200	12550	380	12300	1100
glucosa	Dia2	N <sub>1</sub>	2.51	0.51	2.64	0.84	5.4	1.3	2.72	0.44	5.4	1.3	4.94	0.81	5.4	1.1
			2.51	0.51	2.66	0.84	5.4	1.3	2.71	0.44	5.4	1.3	4.75	0.82	5.4	1.1
		N <sub>2</sub>	13.41	0.48	13.58	0.87	25.4	1.4	13.37	0.46	27.5	1.4	26.98	0.89	24.8	1.0
			13.45	0.48	13.65	0.88	25.4	1.4	13.43	0.46	27.6	1.4	27.24	0.90	24.9	1.0
		N <sub>3</sub>	122.6	6.5	124	10	248	17	122.4	5.9	240	17	247	11	242	14
			122.1	6.5	123	10	247	17	121.8	5.9	240	17	249	11	242	14
		N <sub>4</sub>	1205	65	1210	100	2350	170	1194	59	2420	170	2360	110	2350	140
			1218	65	1220	100	2400	170	1221	59	2460	170	2440	110	2410	140
		N <sub>5</sub>	6090	390	5940	650	11700	1000	6610	340	12000	1000	12410	630	11770	840
			6180	390	6010	640	11900	1000	6710	340	12200	1000	12020	630	11960	840
glucosa	Dia3	N <sub>1</sub>	2.53	0.47	2.65	0.74	5.5	1.3	2.72	0.26	5.33	0.92	4.93	0.60	5.49	0.90
			2.52	0.47	2.64	0.75	5.4	1.3	2.70	0.27	5.30	0.92	5.05	0.60	5.49	0.90
		N <sub>2</sub>	13.37	0.68	13.4	1.1	25.0	1.9	13.53	0.40	27.1	1.4	27.96	0.87	25.1	1.4
			13.36	0.68	13.4	1.1	25.2	1.9	13.56	0.40	27.0	1.4	27.16	0.87	25.1	1.4
		N <sub>3</sub>	123	10	124	16	249	27	124.3	6.6	240	20	256	14	248	20
			126	10	135	15	249	27	124.3	6.6	242	20	250	14	248	20
		N <sub>4</sub>	1220	100	1240	160	2410	280	1241	66	2530	200	2550	140	2450	200
			1220	100	1240	160	2410	280	1240	66	2480	200	2520	140	2460	200
		N <sub>5</sub>	6410	260	6320	390	12260	580	6960	190	12600	510	12620	320	12560	490
			6460	260	6360	390	12400	580	7000	190	12700	520	12700	330	12620	490
		...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	

Tabla A.II.28 (cont.): Incertidumbre de las muestras de aplicando el modelo “bottom-up”, en mg·L<sup>-1</sup>

		F <sup>-</sup>		Cl <sup>-</sup>		NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>		Br <sup>-</sup>		NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>		SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		
		N <sub>i</sub>	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
agua	Dia1	N <sub>1</sub>	2.54	0.61	2.64	0.96	5.4	1.5	2.70	0.55	5.4	1.5	4.37	0.46	5.6	1.4
			2.54	0.61	2.64	0.96	5.4	1.5	2.72	0.54	5.4	1.5	4.53	0.46	5.5	1.4
		N <sub>2</sub>	13.10	0.90	13.2	1.4	24.7	2.2	13.27	0.81	27.2	2.2	20.99	0.71	24.6	2.2
			13.44	0.64	13.7	1.1	25.2	1.6	13.46	0.59	27.8	1.7	26.79	0.46	25.2	1.5
		N <sub>1</sub>	2.53	0.51	2.69	0.83	5.4	1.3	2.71	0.44	5.4	1.3	4.96	0.81	5.5	1.1
			2.52	0.51	2.63	0.84	5.4	1.3	2.70	0.44	5.4	1.3	5.02	0.81	5.5	1.1
		N <sub>2</sub>	13.45	0.48	13.61	0.87	25.4	1.4	13.38	0.46	27.5	1.4	27.46	0.91	24.9	1.0
			13.43	0.48	13.61	0.87	25.5	1.4	13.40	0.46	27.5	1.4	27.19	0.90	24.9	1.0
	Dia3	N <sub>1</sub>	2.50	0.47	2.63	0.75	5.5	1.3	2.69	0.27	5.27	0.93	4.93	0.60	5.51	0.90
			2.52	0.47	2.69	0.74	5.5	1.3	2.70	0.27	5.29	0.92	4.94	0.60	5.52	0.90
		N <sub>2</sub>	13.35	0.68	13.4	1.1	25.0	1.9	13.64	0.40	27.8	1.4	28.52	0.86	25.1	1.4
			13.38	0.68	13.4	1.1	25.1	1.9	13.54	0.40	27.2	1.4	28.71	0.86	25.1	1.4
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
compuesta	Dia1	N <sub>1</sub>	2.48	0.62	2.78	0.95	5.4	1.5	2.70	0.55	5.5	1.5	3.07	0.49	5.6	1.4
			2.48	0.62	2.74	0.95	5.4	1.5	2.68	0.55	5.5	1.5	2.64	0.50	5.5	1.4
		N <sub>2</sub>	12.91	0.91	13.4	1.4	25.0	2.2	13.35	0.81	27.5	2.2	20.77	0.72	24.8	2.2
			12.91	0.91	13.5	1.4	24.8	2.2	13.35	0.81	27.6	2.2	21.06	0.71	24.9	2.2
		N <sub>1</sub>	2.45	0.51	3.08	0.80	5.5	1.3	2.71	0.44	5.5	1.3	3.46	0.87	5.5	1.1
			2.45	0.51	2.75	0.83	5.5	1.3	2.68	0.44	5.4	1.3	3.34	0.88	5.5	1.1
		N <sub>2</sub>	13.02	0.46	14.27	0.93	25.8	1.4	13.56	0.47	28.4	1.4	23.64	0.76	25.3	1.0
			13.02	0.46	14.21	0.92	25.8	1.4	13.53	0.47	28.1	1.4	23.35	0.75	25.2	1.0
	Dia3	N <sub>1</sub>	2.46	0.47	2.74	0.74	5.6	1.3	2.71	0.27	5.44	0.92	3.23	0.65	5.56	0.90
			2.46	0.47	2.78	0.74	5.5	1.3	2.70	0.27	5.42	0.92	2.86	0.66	5.54	0.90
		N <sub>2</sub>	13.09	0.69	13.9	1.1	25.4	1.9	13.65	0.40	29.1	1.4	20.65	0.96	25.6	1.4
			13.00	0.69	13.7	1.1	25.4	1.9	13.66	0.40	27.8	1.4	20.22	0.96	25.2	1.4
	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	

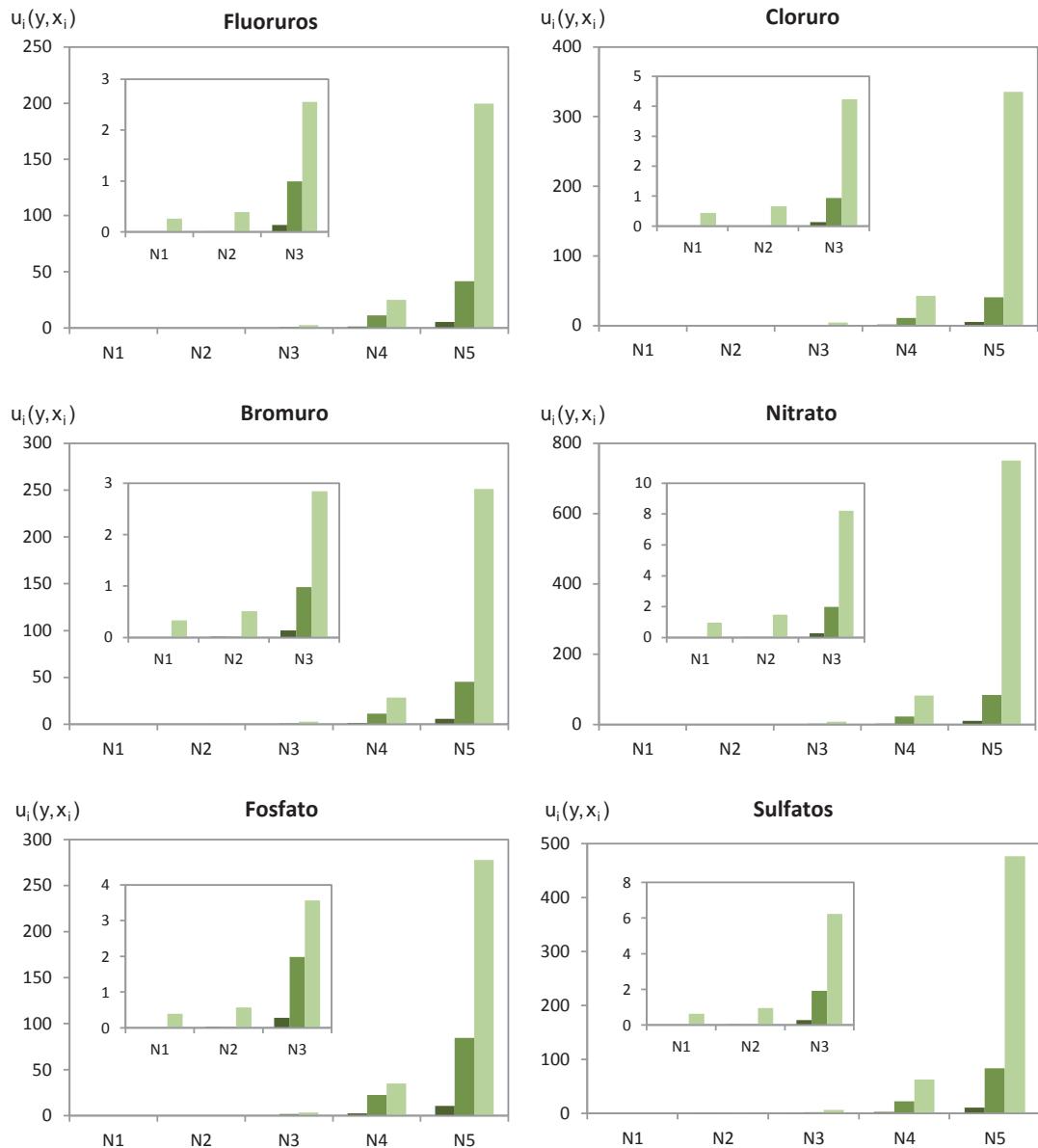


Fig. A.II.3: Contribuciones a la incertidumbre de medida de la concentración de aniones según el modelo “bottom-up”

**Modelo “bottom-up” para la estimación de la incertidumbre en la determinación de fenoles**

Tabla A.II.29: Incertidumbre de las muestras de control aplicando el modelo “bottom-up”, en mg fenol·L<sup>-1</sup>

N <sub>1</sub>		N <sub>2</sub>		N <sub>3</sub>		N <sub>4</sub>		N <sub>5</sub>	
C <sub>fenol</sub>	I <sub>fenol</sub>								
0.509	0.093	5.14	0.21	52.3	1.9	264.4	9.9	485	21
0.511	0.093	5.20	0.21	52.1	1.9	263.3	9.9	486	21
0.53	0.10	5.14	0.20	50.2	1.3	257	13	486	20
0.48	0.10	5.15	0.20	50.3	1.3	258.7	13	486	20
0.516	0.092	5.12	0.27	49.2	2.4	248.3	14	499	18
0.537	0.092	5.08	0.26	48.8	2.4	247.7	14	498	18
0.49	0.10	5.13	0.22	48.9	2.2	241.9	9.9	494	29
0.48	0.10	5.12	0.22	48.8	2.2	241.6	9.9	495	29
0.47	0.11	4.95	0.18	50.6	1.8	245.4	8.9	485	20
0.45	0.11	4.93	0.18	50.5	1.8	247.8	9.0	485	20
0.557	0.096	4.90	0.17	48.0	1.7	241	16	494	17
0.532	0.095	4.87	0.17	48.1	1.7	241.5	16	499	17
0.52	0.12	4.54	0.19	46.3	4.8	249.8	6.8	479	20
0.52	0.12	4.55	0.19	45.8	4.8	249.6	6.8	479	20
0.49	0.11	4.88	0.11	51.0	7.1	250.4	12	484	21
0.48	0.11	4.77	0.11	51.3	7.1	250.9	12	478	21
...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

**Modelo “bottom-up” para la estimación de la incertidumbre en la determinación de Aceites y Grasas**

Tabla A.II.30: Incertidumbre de las muestras de control analizadas durante la validación del metodo de aceites y grasas en el Capítulo 3 (1 analista) aplicando el modelo “bottom-up”, en mg A&G·L<sup>-1</sup>

N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	N <sub>3</sub>	N <sub>4</sub>	N <sub>5</sub>			
C <sub>A&amp;G</sub>	I <sub>A&amp;G</sub>						
12.48	0.55	53.1	1.9	241.5	2.8	892	13
12.28	0.54	50.7	1.9	252.4	2.9	936	13
11.44	0.54	52.6	1.9	268.0	3.0	965	14
12.64	0.55	49.7	1.9	276.2	3.0	1028	15
10.98	0.39	47.85	0.91	255.4	2.6	965	10
11.17	0.38	51.27	0.92	252.7	2.6	1039	11
10.07	0.45	51.12	0.91	228.9	2.3	968.1	9.8
13.27	0.45	55.40	0.92	237.2	2.4	1021	11
12.47	0.45	53.2	1.2	232.6	1.9	1042.1	7.0
12.07	0.45	48.0	1.2	231.8	1.9	987.0	6.7
10.74	0.38	52.1	1.2	241.5	2.0	981.0	6.3
10.29	0.38	50.9	1.1	216.9	1.9	1054.6	7.1
10.05	0.34	47.09	0.84	218.4	1.5	1019.8	7.9
13.90	0.34	49.09	0.85	225.9	1.6	1018.0	7.8
12.60	0.34	51.26	0.87	247.8	1.7	965.4	7.4
11.77	0.34	45.55	0.82	267.1	1.8	969.2	7.5
...	...	...	...	...	...	...	...

**Modelo “top-down” para la estimación de la incertidumbre en la determinación de Aniones**

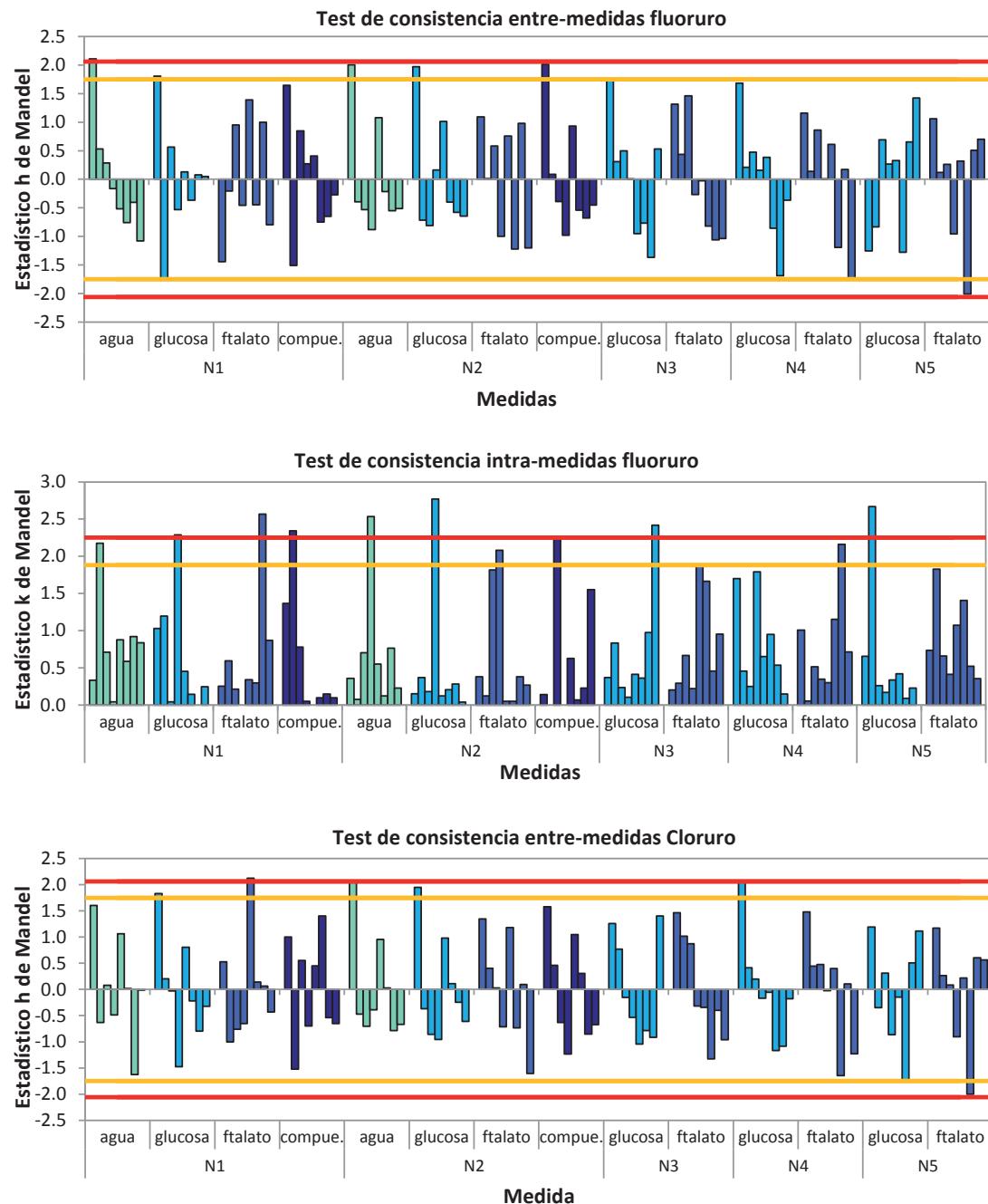


Fig. A.II.4: Test de consistencia h y k de Mandel aplicados a las resultado de los aniones

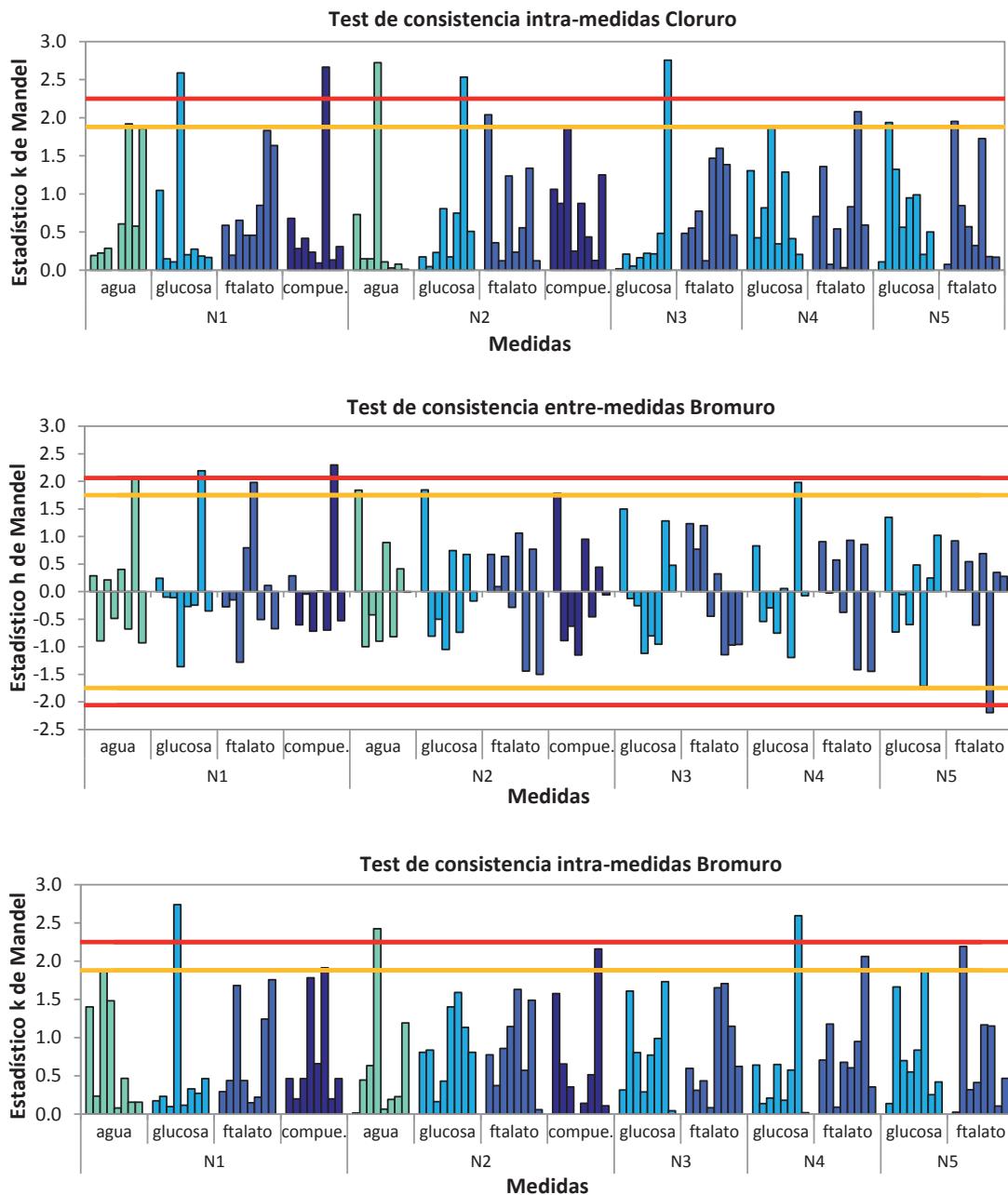


Fig. A.II.4 (cont.): Test de consistencia h y k de Mandel aplicados a las resultado de los aniones

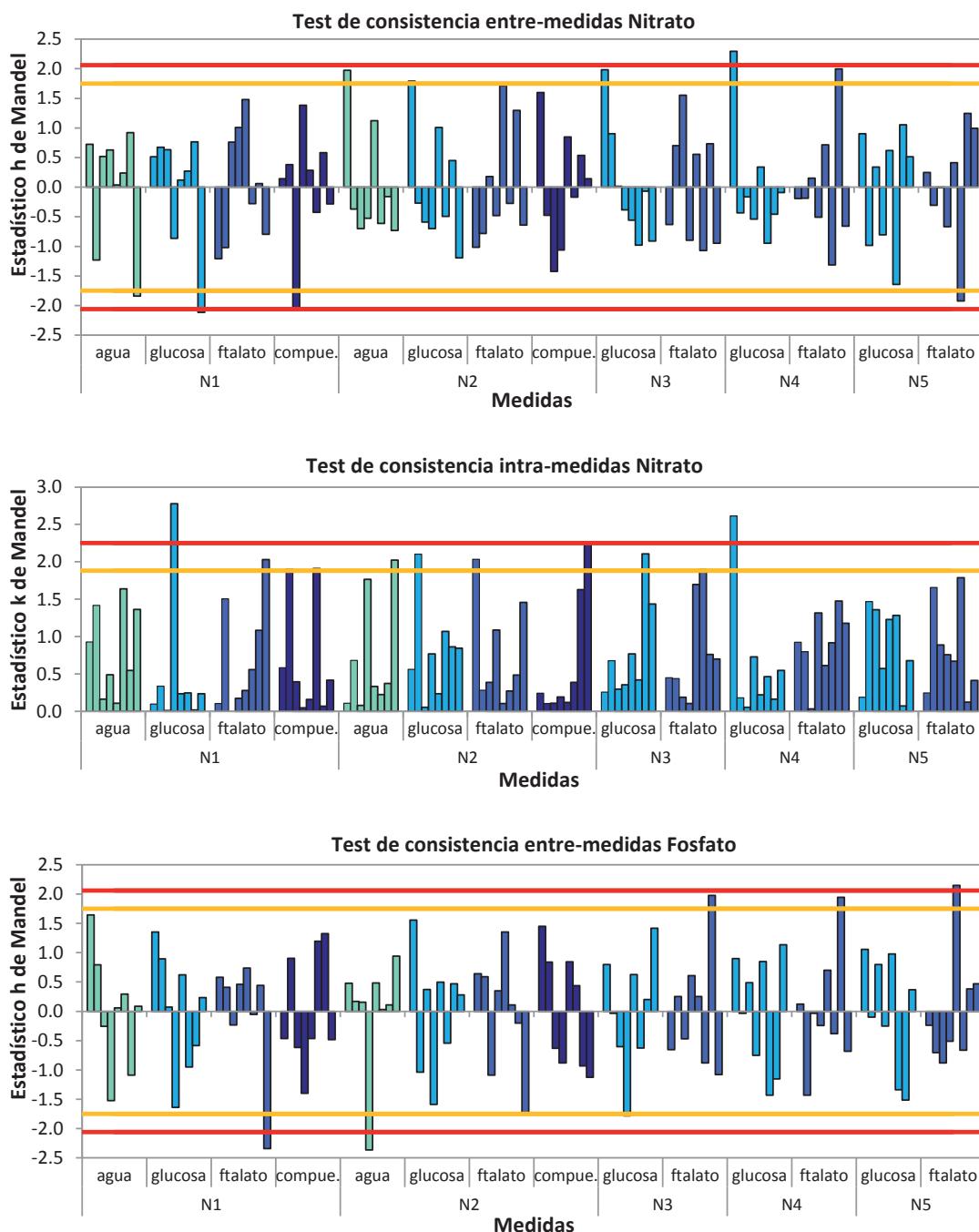


Fig. A.II.4 (cont.): Test de consistencia h y k de Mandel aplicados a los resultado de los aniones

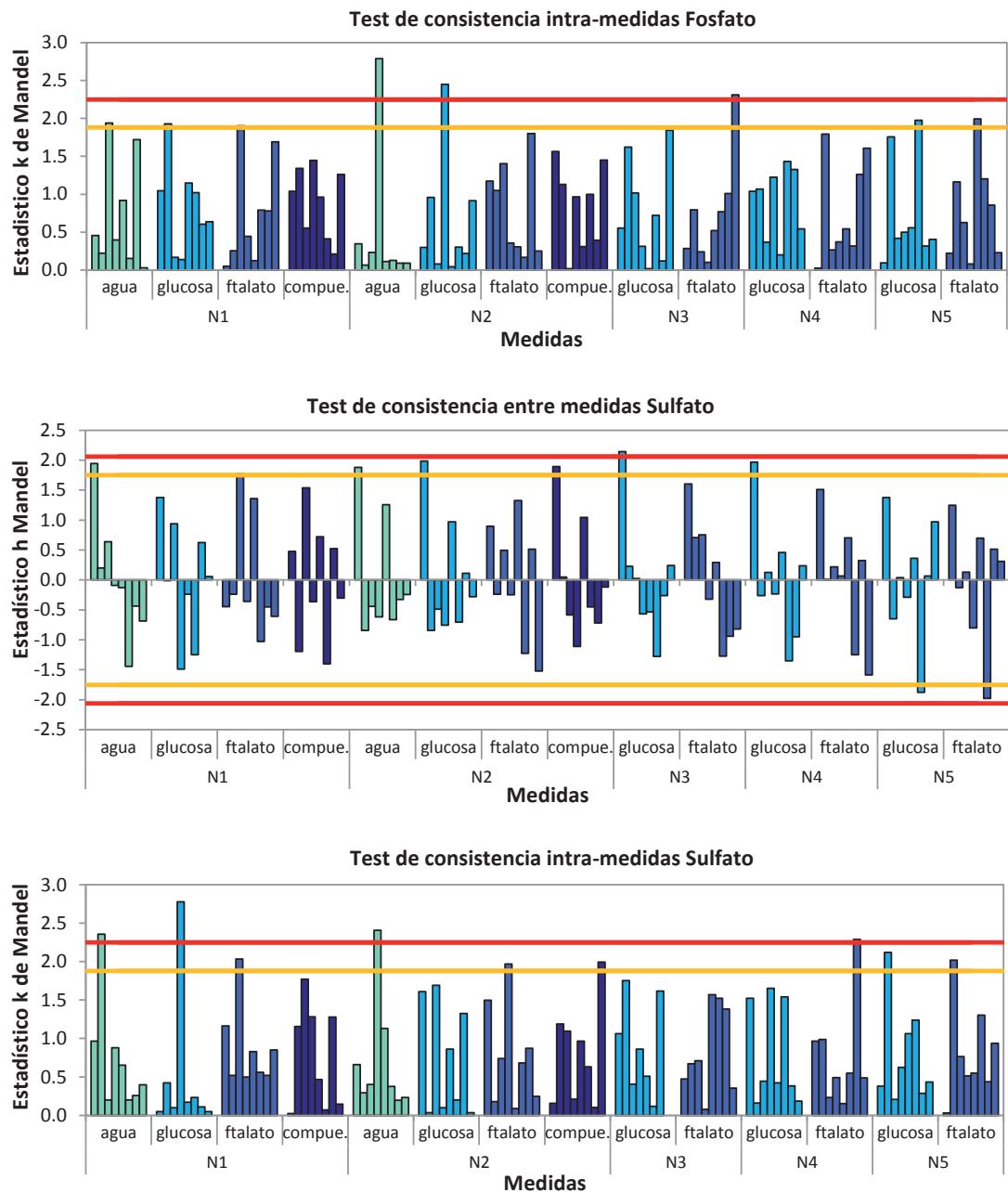


Fig. A.II.4 (cont.): Test de consistencia h y k de Mandel aplicados a las resultado de los aniones

Tabla A.II.31: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de fluoruro

	$G_{P\text{ cal}}$	$N_1\text{ agua}$	$N_1\text{ glucosa}$	$N_1\text{ fitalato}$	$N_{1\text{ compuesta}}$	$N_{2\text{ agua}}$	$N_{2\text{ glucosa}}$	$N_{2\text{ compuesta}}$	$N_2\text{ fitalato}$	$N_3\text{ glucosa}$	$N_3\text{ fitalato}$	$N_4\text{ glucosa}$	$N_4\text{ fitalato}$	$N_5\text{ glucosa}$	$N_5\text{ fitalato}$
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>
$G_{1\text{ cal}}$	1.08	1.500	1.391	1.650	2.002	1.969	2.015	1.095	1.737	1.46	1.684	1.157	1.421	1.058	
$F^-$															
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>
$C_{\text{cal}}$	0.5905	0.9985	0.8224	0.6830	0.8026	0.9589	0.6423	0.5411	0.7318	0.4363	0.4011	0.5831	0.8901	0.4166	
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Extraño</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Extraño</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>

Tabla A.II.32: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de cloruro

	$G_{P\text{ cal}}$	$N_1\text{ agua}$	$N_1\text{ glucosa}$	$N_1\text{ fitalato}$	$N_{1\text{ compuesta}}$	$N_{2\text{ agua}}$	$N_{2\text{ glucosa}}$	$N_2\text{ fitalato}$	$N_{2\text{ compuesta}}$	$N_3\text{ glucosa}$	$N_3\text{ fitalato}$	$N_4\text{ glucosa}$	$N_4\text{ fitalato}$	$N_5\text{ glucosa}$	$N_5\text{ fitalato}$
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>
$G_{1\text{ cal}}$	1.605	1.830	2.122	1.404	2.039	1.950	1.345	1.584	1.403	1.465	2.047	1.478	1.190	1.168	
$Cl^-$															
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>
$C_{\text{cal}}$	0.4607	0.8368	0.4202	0.8870	0.9252	0.8023	0.5204	0.4352	0.9496	0.3197	0.4328	0.5395	0.4691	0.4754	
Resultado	<b>Correcto</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Correcto</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Anómalo</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>	<b>Correcto</b>

Tabla A.II.33: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de bromuro

	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_{1,comuesta}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_{2,comuesta}$	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_{4,glucosa}$	$N_4$ ftalato	$N_{5,glucosa}$	$N_5$ ftalato
$G_{P\ cal}$	2.087	2.193	1.978	2.296	1.839	1.846	1.061	1.786	1.498	1.230	1.981	0.9312	1.349	0.9224
Resultado	Correcto	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
$G_{1\ cal}$	0.9303	1.361	1.279	0.7186	0.9974	1.047	1.501	1.149	1.121	1.144	1.195	1.449	1.716	2.195
Resultado	Correcto	Extraño	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Extraño
$C_{cal}$	0.4380	0.9374	0.3853	0.4583	0.7353	0.3164	0.3331	0.5833	0.3755	0.3641	0.8427	0.5324	0.6012	0.4359
Resultado	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Extraño	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto

Tabla A.II.34: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de nitrato

	$N_1$ agua	$N_{1,glucosa}$	$N_1$ ftalato	$N_{1,comuesta}$	$N_2$ agua	$N_{2,glucosa}$	$N_2$ ftalato	$N_{2,comuesta}$	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_{4,glucosa}$	$N_4$ ftalato	$N_{5,glucosa}$	$N_5$ ftalato
$G_{P\ cal}$	0.9221	0.7657	1.478	1.382	1.976	1.792	1.714	1.599	1.982	1.555	2.294	1.995	1.054	1.245
Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto
$G_{1\ cal}$	1.839	2.113	1.210	2.060	0.7322	1.192	1.015	1.424	0.9803	1.071	0.9479	1.313	1.642	1.920
Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
$C_{cal}$	0.3353	0.9630	0.5153	0.4571	0.5123	0.5531	0.5165	0.6327	0.5540	0.4515	0.8551	0.2722	0.2699	0.3989
Resultado	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto

Tabla A.II.35: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de fosfato

	$G_{p\ cal}$	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_{1\ compuesta}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_{2\ compuesta}$	$N_3$ agua	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_{4\ ftalato}$	$N_5$ glucosa	$N_5$ ftalato
$PO_4^{3-}$	$G_{p\ cal}$	1.643	1.352	0.7359	1.325	0.9391	1.557	1.351	1.448	1.416	1.978	1.133	1.944	1.055	2.147
	Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Extraño
	$G_{1\ cal}$	1.524	1.639	2.343	1.397	2.364	1.589	1.75	1.124	1.781	1.080	1.431	1.432	1.512	0.8788
	Resultado	Correcto	Correcto	Anómalo	Correcto	Anómalo	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
$C_{cal}$	$C_{cal}$	0.4701	0.4654	0.4534	0.2618	0.9721	0.7511	0.4053	0.3059	0.4248	0.6674	0.2566	0.4028	0.4888	0.4967
	Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Anómalo	Extraño	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
	$G_{p\ cal}$	1.945	1.376	1.774	1.540	1.879	1.987	1.324	1.895	2.142	1.603	1.967	1.51	1.375	1.250
	Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto

Tabla A.II.36: Resultados de los test de consistencia de Cochran y Grubbs aplicados a la determinación de sulfato

	$G_{p\ cal}$	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_{1\ compuesta}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_{2\ compuesta}$	$N_3$ agua	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_{4\ ftalato}$	$N_5$ glucosa	$N_5$ ftalato
$SO_4^{2-}$	$G_{1\ cal}$	1.443	1.489	1.026	1.401	0.8428	0.8433	1.522	1.112	1.278	1.272	1.351	1.585	1.878	1.977
	Resultado	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto
	$C_{cal}$	0.6952	0.9639	0.5170	0.3916	0.7250	0.3575	0.4848	0.4972	0.3846	0.3073	0.3406	0.6545	0.5616	0.5097
	Resultado	Extraño	Anómalo	Correcto	Correcto	Extraño	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto	Correcto

Tabla A.II.37: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_F$  según el modelo “top down”

	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_{1\text{compuesta}}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_{2\text{compuesta}}$	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_4$ glucosa	$N_4$ ftalato	$N_5$ glucosa	$N_5$ ftalato
$\mu$	2.563	2.563	2.53	2.563	13.59	12.70	13.59	125.3	126.7	1256	1250	6360	6250	
$\bar{x}$	2.550	2.527	2.78	2.470	13.49	13.52	13.21	13.15	123.4	128.6	1231	1246	6280	6240
$\delta$	0.013338	0.03582	0.2566	0.09319	0.1021	0.07056	0.5086	0.4403	1.807	1.899	24.67	4.735	85.97	5.329
$\delta_{\text{crítico}}$	0.06213	0.07417	0.1504	0.05009	0.5047	0.4907	0.4489	0.4991	2.887	4.473	45.90	49.25	225.5	260.4
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	FALSO	FALSO	sesgo	sesgo	FALSO	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r$	0.01692	0.03434	0.03336	0.01450	0.09265	0.1501	0.11148	0.04059	0.9425	0.9272	9.572	10.64	151.3	54.81
$F$	$s_L$	0.02867	0.02803	0.07140	0.02285	0.2437	0.2212	0.2101	0.2479	1.281	2.138	21.93	23.45	35.58
	$I_u$	0.02957	0.02957	0.03139	0.02957	0.08372	0.08372	0.07772	0.08372	0.2655	0.2677	2.597	2.585	12.82
	$s_G$	0.01098	0.01311	0.02659	0.008854	0.08921	0.08674	0.07935	0.08824	0.5104	0.7907	8.114	8.706	39.86
	$u_{\text{net}}$	0.01842	0.01976	0.03087	0.01723	0.09855	0.09631	0.08835	0.09766	0.5274	0.8019	8.217	8.801	40.37
	$I_F$	0.072	0.084	0.16	0.061	0.54	0.53	0.48	0.54	3.1	4.8	49	52	240
	$\% I_F^-$	2.8	3.3	6.4	2.4	4.0	3.9	3.8	3.9	2.5	3.7	3.9	4.2	3.8
														4.4

Tabla A.II.38: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{Cl}$  según el modelo "top down"

	$N_{1\text{ agua}}$	$N_{1\text{ glucosa}}$	$N_{1\text{ ftalato}}$	$N_{1\text{ compuesta}}$	$N_{2\text{ agua}}$	$N_{2\text{ glucosa}}$	$N_{2\text{ ftalato}}$	$N_{2\text{ compuesta}}$	$N_{3\text{ glucosa}}$	$N_{3\text{ ftalato}}$	$N_{4\text{ glucosa}}$	$N_{4\text{ ftalato}}$	$N_{5\text{ glucosa}}$	$N_{5\text{ ftalato}}$
$\mu$	2.587	2.59	2.62	2.59	13.74	13.74	13.36	13.7	128.5	123.7	1282	1251	6330	6240
$\bar{x}$	2.671	2.67	2.71	2.81	13.59	13.57	13.08	14.1	125.9	121.7	1245	1226	6200	6150
$\delta$	0.08425	0.08287	0.08670	0.2238	0.1507	0.1710	0.2851	0.3437	2.544	1.936	37.08	24.55	132.1	91.41
$\delta_{\text{crítico}}$	0.07548	0.07807	0.1180	0.1460	0.6636	0.6200	0.7101	0.9905	5.265	6.731	52.57	59.57	249.3	334.4
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	sesgo	sesgo	FALSO	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r$	0.02210	0.03853	0.01080	0.08942	0.1247	0.06140	0.05718	0.1132	2.630	0.9949	10.26	10.47	52.9	45.87
$C_l$	0.03774	0.03903	0.05901	0.07300	0.3318	0.3100	0.3551	0.4953	2.633	3.365	26.29	29.79	124.7	167.2
$I_u$	0.03284	0.03284	0.03326	0.03284	0.09137	0.09137	0.1031	0.09137	0.3169	0.3098	2.874	2.809	13.65	13.46
$s_8$	0.01334	0.01380	0.02086	0.02581	0.1173	0.1096	0.1255	0.1751	0.9308	1.190	9.294	10.53	44.07	59.11
$U_{\text{net}}$	0.02116	0.02145	0.02668	0.03059	0.1259	0.1187	0.1357	0.1810	0.9442	1.200	9.404	10.62	44.60	59.49
$I_{NO2}$	0.092	0.10	0.13	0.20	0.73	0.67	0.76	1.1	6.7	7.3	58	65	280	360
$\%I_{Cl}^-$	3.6	4.0	5.0	7.8	5.3	4.9	5.7	7.8	5.2	5.9	4.5	5.2	4.3	5.8

Tabla A.II.39: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{Br}^-$  según el modelo “top down”

	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ fタルato	$N_{1\text{completa}}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ fタルato	$N_{2\text{completa}}$	$N_3$ glucosa	$N_3$ fタルato	$N_4$ glucosa	$N_4$ fタルato	$N_5$ glucosa	$N_5$ fタルato
$\mu$	2.648	2.65	2.54	2.65	13.65	12.97	13.65	125.1	128.3	1252	1262	6920	6770	
$\bar{x}$	2.734	2.73	2.63	2.73	13.59	12.90	13.67	123.6	127.3	1243	1252	6860	6770	
$\delta$	0.08612	0.08250	0.08181	0.08412	0.05439	0.05545	0.07065	0.02624	1.528	1.038	8.701	9.782	57.79	2.780
$\delta_{\text{critico}}$	0.07887	0.1030	0.1268	0.1035	0.5105	0.5232	0.4695	0.5598	3.081	4.756	60.12	46.22	231.6	275.9
$\delta > \delta_{\text{critico}}$	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r^2$	8.219E-05	0.001344	9.344E-05	1.147E-04	0.003101	6.876E-04	6.097E-04	0.001595	0.1835	1.160	1059	98.74	3832	2652
$s_L^2$	0.001514	0.001979	0.003973	0.002621	0.06359	0.06810	0.05480	0.07754	2.282	5.074	374.2	484.6	11491	17706
$I_{\mu}$	0.03429	0.03429	0.03313	0.03429	0.09760	0.09760	0.1292	0.09760	0.3061	0.3085	2.321	2.335	11.55	11.30
$s_6^2$	1.944E-04	3.314E-04	5.025E-04	3.347E-04	8.143E-03	8.555E-03	6.888E-03	9.792E-03	0.2967	0.7067	113.0	66.74	1676	2379
$U_{\text{met}}^2$	4.884E-04	6.254E-04	7.768E-04	6.287E-04	0.01052	0.01094	0.01106	0.01217	0.3201	0.7305	114.3	68.11	1709	2411
$I_{Br}^-$	0.090	0.11	0.14	0.12	0.55	0.56	0.51	0.60	3.3	5.1	64	49	250	290
$\% I_{Br}^-$	3.4	4.3	5.4	4.3	4.0	4.1	4.0	4.4	2.6	3.9	5.1	3.9	3.6	4.3

Tabla A.II.40: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{\text{NO}_3^-}$  según el modelo "top down"

	$N_{1\_agua}$	$N_{1\text{glucosa}}$	$N_{1\text{ftalato}}$	$N_{1\text{completa}}$	$N_{2\text{agua}}$	$N_{2\text{glucosa}}$	$N_{2\text{ftalato}}$	$N_{2\text{completa}}$	$N_3\text{ glucosa}$	$N_3\text{ ftalato}$	$N_4\text{ glucosa}$	$N_4\text{ ftalato}$	$N_5\text{ glucosa}$	$N_5\text{ ftalato}$
$\mu$	5.27	5.27	5.09	5.27	28.0	28.0	25.1	28.0	248.0	250.2	2520	2490	12490	12510
$\bar{x}$	5.40	5.41	5.35	5.44	27.9	27.8	26.0	28.4	243.7	257.7	2500	2510	12490	12550
$\delta$	0.1223	0.1404	0.2549	0.1692	0.1493	0.1672	0.8477	0.3633	4.234	7.584	12.17	16.96	5.208	38.44
$\delta_{\text{critico}}$	0.1467	0.1112	0.2868	0.08675	1.253	1.409	1.274	1.541	7.546	7.164	128.0	108.2	471.9	586.7
$\delta > \delta_{\text{critico}}$	FALSO	sesgo	FALSO	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	sesgo	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r^2$	1.677E-04	0.0051249	4.080E-04	0.0008873	0.05186	0.005670	0.005286	0.1747	0.9003	4.086	3110	534.5	10706	9559
$s_L^2$	0.005295	5.271E-04	0.02036	0.001438	0.3666	0.4933	0.4033	0.5061	13.78	10.79	2543	2660	50325	81289
$I_\mu$	0.08029	0.07759	0.08029	0.3017	0.3017	0.2594	0.3017	2.287	2.307	23.23	23.03	115.2	115.4	
$s_\delta^2$	6.724E-04	3.862E-04	2.570E-03	2.352E-04	0.04906	0.06202	0.05074	0.07418	1.779	1.604	512.3	365.9	6960	10759
$u_{\text{net}}^2$	2.284E-03	1.998E-03	4.076E-03	1.847E-03	0.07182	0.08478	0.06756	0.09693	3.087	2.934	647.1	498.5	10280	14089
$I_{\text{NO}_3^-}$	0.18	0.14	0.31	0.12	1.4	1.5	1.4	1.7	8.3	7.9	140	120	510	630
$\% I_{\text{NO}_3^-}$	3.3	2.7	6.2	2.3	4.9	5.4	5.5	5.9	3.4	3.2	5.5	4.7	4.1	5.1

Tabla A.II.41: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{PO_4}$  según el modelo “top down”

	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_1$ compuesta	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_2$ compuesta	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_4$ glucosa	$N_4$ ftalato	$N_5$ glucosa	$N_5$ ftalato
$\mu$	5.13	5.13	5.06	5.13	27.5	27.5	25.4	27.5	249.5	252.8	2490	2500	12650	12980
$\bar{x}$	4.91	4.97	3.75	3.15	27.3	27.4	23.3	22.7	249.7	252.9	2480	2500	12560	12600
$\delta$	0.2164	0.1580	1.313	1.978	0.2161	0.08732	2.108	4.853	0.1779	0.05210	13.75	0.9796	88.87	379.9
$\delta_{\text{crítico}}$	0.5996	0.2474	0.6083	0.4192	2.862	1.118	1.172	3.918	5.376	7.904	107.7	161.4	509.8	472.3
$\delta > \delta_{\text{crítico}}$	FALSO	FALSO	sesgo	sesgo	FALSO	sesgo	sesgo	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r^2$	0.07619	0.01750	0.04717	0.04315	2.161	0.3775	0.05151	0.04434	5.035	10.52	1774	3798	19749	26164
$PO_4^{3-}$	$s_L^2$	0.05177	0.006551	0.06892	0.02236	0.9667	0.1235	0.3175	3.816	4.708	10.36	2012	4614	55108
	$I_\mu$	0.06305	0.06226	0.06305	0.1635	0.1635	0.1246	0.1635	0.5301	0.5358	5.441	5.458	27.26	27.96
	$s_6^2$	0.01123	1.913E-03	0.01156	5.491E-03	0.2559	0.03904	0.04290	0.4797	0.9032	1.952	362.3	814.2	8123
	$u_{\text{met}}^2$	0.01223	2.906E-03	0.01253	6.485E-03	0.2626	0.04572	0.04678	0.4864	0.9735	2.024	369.7	821.6	8309
	$I_{NO_2}$	0.64	0.27	0.65	0.45	3.0	1.2	1.2	4.2	5.7	8.4	110	170	540
	% $I_{NO_2}$	12	5.3	13	8.8	11.1	4.4	4.9	15.1	2.3	3.3	4.6	6.9	4.3
														3.9

Tabla A.II.42: Cálculos intermedios para la estimación de  $I_{SO_4}$  según el modelo "top down"

	$N_1$ agua	$N_1$ glucosa	$N_1$ ftalato	$N_{1\text{compuesta}}$	$N_2$ agua	$N_2$ glucosa	$N_2$ ftalato	$N_{2\text{compuesta}}$	$N_3$ glucosa	$N_3$ ftalato	$N_4$ glucosa	$N_4$ ftalato	$N_5$ glucosa	$N_5$ ftalato
$\mu$	5.42	5.42	5.03	5.42	25.6	25.6	25.2	25.6	251.2	248.8	2490	2500	12530	12120
$\bar{x}$	5.56	5.50	5.53	5.57	25.3	25.2	25.5	25.5	246.8	249.1	2440	2480	12340	12500
$\delta$	0.1371	0.07651	0.4981	0.1489	0.3299	0.3336	0.3559	0.1012	4.413	0.3045	51.05	28.09	190.4	385.7
$\delta_{\text{critico}}$	0.1095	0.1302	0.2539	0.1197	1.081	1.144	0.9515	1.118	7.352	9.144	94.02	108.1	501.5	548.2
$\delta > \delta_{\text{critico}}$	sesgo	FALSO	sesgo	sesgo	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO	FALSO
$s_r^2$	6.194E-04	0.004939	0.001161	0.003001	0.02304	0.001819	0.003994	0.01399	0.6554	4.179	617.2	508.2	11900	13113
$s_L^2$	0.002688	0.001770	0.01554	0.002079	0.2804	0.3260	0.2243	0.3055	13.19	18.81	1901	2665	56936	68571
$I_\mu$	0.06606	0.06606	0.06146	0.06606	0.1489	0.1489	0.1162	0.1489	0.4036	0.4009	4.240	4.259	20.86	20.17
$s_\delta^2$	3.747E-04	5.299E-04	2.015E-03	4.475E-04	0.03649	0.04086	0.02829	0.03906	1.689	2.613	276.2	364.9	7861	9391
$u_{\text{met}}^2$	1.466E-03	1.621E-03	2.960E-03	1.538E-03	0.04203	0.04640	0.03167	0.04460	1.730	2.653	280.7	369.5	7970	9493
$I_{SO_4}^{2-}$	0.13	0.15	0.28	0.14	1.2	1.2	1.0	1.2	7.8	9.7	100	110	530	580
$\% I_{SO_4}^{2-}$	2.5	2.8	5.5	2.6	4.5	4.8	4.0	4.7	3.1	3.9	4.0	4.6	4.2	4.8



### **A.III. Procedimientos Normalizados de Trabajo**





## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

### PNT-ANIONES

“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO,  
BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR  
CROMATOGRAFÍA IÓNICA”

Rev.: 1

Fecha: dd/mm/aa

Pág.: 1 de 12

<b>Elaborado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Revisado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Aprobado por:</b> Nombre Apellido Apellido
<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 2 de 12
--	--	---

## ÍNDICE

1. OBJETO .....	3
2. ALCANCE .....	3
3. REFERENCIAS .....	3
4. FUNDAMENTO .....	4
5. METODOLOGÍA.....	4
5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD .....	4
5.2. INTERFERENCIAS .....	4
5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA .....	5
5.4. INSTRUMENTAL.....	5
5.5. REACTIVOS.....	6
5.6. OPERACIONES PREVIAS .....	8
5.7. PROCEDIMIENTO.....	8
5.7.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO.....	8
5.7.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS .....	8
6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	9
6.1. CURVA DE CALIBRADO .....	9
6.2. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA.....	10
6.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO .....	10
6.4. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE .....	10
6.5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	11
ANEXOS .....	11
A.I: CONDICIONES INSTRUMENTALES .....	11
A.II: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO.....	12

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: PNT-Aniones Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 3 de 12
--	--	--

## 1. OBJETO

El objeto de este PNT es describir el ensayo para la determinación en agua de iones fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato y sulfato por cromatografía iónica en fase líquida.

## 2. ALCANCE

Este PNT se aplica para la determinación de aniones fluoruro, cloruro, nitrito, nitrato y sulfato disueltos en aguas residuales y continentales no tratadas. Los rangos de aplicación y la dilución máxima permitida para cada anión son los siguientes:

Tabla 1: Alcance del procedimiento

Anión	Rango de ensayo mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>	Rango de medida mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup>	Dilución máxima
F <sup>-</sup>	2.5-15	2.5-6250	0.1:100
Cl <sup>-</sup>	2.5-15	2.5-6250	
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5-30	5-12500	
Br <sup>-</sup>	2.5-15	2.5-6250	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5-30	5-12500	
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	5-30	5-12500	

## 3. REFERENCIAS

- ▲ **American Public Health Association. (1998).** Standard methods for examination of water and wastewater. 20th ed. APHA-AWWA-WPCF, Washington DC.
- ▲ **ASTM D4327 (2003).** Standard Test Method for anions in water by Chemically Suppressed Ion Chromatography. *American Society for Testing and Materials, ASTM*.
- ▲ **UNE-EN ISO 10304-1 (2009).** Calidad del agua. Determinación de aniones disueltos por cromatografía de iones en fase líquida. Parte 1. Determinación de bromuro, cloruro, fluoruro, nitrato, nitrito, fosfato y sulfato. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*.
- ▲ **USEPA Method 300.1 (1997).** Anions in Water by IC: Determination of inorganic anions in drinking water by ion chromatography, rev 1.0. *United States Environmental Protection Agency, EPA*.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 4 de 12
--	--	---

## 4. FUNDAMENTO

La determinación se basa en la separación de los iones por cromatografía en fase líquida. En la cromatografía aniónica, la fase estacionaria es un intercambiador aniónico de baja capacidad, mientras que como fase móvil suelen utilizarse disoluciones acuosas de sales de ácidos débiles mono o dibásicos. La detección de los iones se realiza mediante conductimetría. El detector de conductividad se combina habitualmente con un sistema supresor postcolumna, consistente en un intercambiador catiónico protonado que disminuye la conductividad de la fase móvil, transformando los aniones de dicha fase móvil en sus correspondientes formas ácida y neutra, y reteniendo los cationes. Los iones se identifican a partir de sus tiempos de retención, mediante comparación con los patrones de calibración. La determinación cuantitativa se realiza midiendo la altura o área del pico.

## 5. METODOLOGÍA

A continuación se describen las actividades a desarrollar, así como los medios necesarios para llevar a cabo este PNT.

### 5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Extremar las precauciones durante el manejo de ácidos durante la preparación de sus disoluciones.

### 5.2. INTERFERENCIAS

Las interferencias pueden deberse a diferentes causas:

- ▲ Coelución cromatográfica, es decir, cuando otro analito eluye al mismo tiempo de retención que el analito de interés. Por ejemplo, la determinación de fluoruros y cloruros está sujeta a la interferencia causada por la presencia de aniones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular como el fórmico o el acético, que aparecen a tiempos de retención muy próximos, y que interfieren incluso en concentraciones bajas. Los aniones de otros ácidos orgánicos como, por ejemplo, malónico, maleico y málico, pueden interferir en la determinación de los aniones inorgánicos si se encuentran presentes en concentraciones elevadas. Los aniones inorgánicos fluoroborato y clorito también pueden interferir en la determinación.
- ▲ El pico de un analito vecino es tan alto que solapa al analito de interés. La existencia de diferencias importantes en las concentraciones de los distintos aniones a analizar puede originar fenómenos de sensibilidad cruzada (perdida de resolución).
- ▲ Los tiempos de retención cambian debido al cambio de la fuerza iónica y pH de la fase móvil por lo que esta debe ser cuidadosamente controlada.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 5 de 12
--	--	---

- ▲ La contaminación de los reactivos y/o del material de laboratorio empleados en la preparación de las muestras puede conducir a falsos positivos de los analitos de interés o incrementar los límites de detección debido a elevadas líneas base.
- ▲ El sulfito puede causar un sesgo positivo para el sulfato, como consecuencia de su oxidación por el oxígeno disuelto, que es catalizada por cationes como  $\text{Fe}^{3+}$  o  $\text{Cu}^{2+}$ . Estos cationes pueden ser enmascarados ajustando el pH de la muestra a 10. También puede añadirse una solución de formaldehído con objeto de estabilizar el sulfito.
- ▲ Se debe investigar la presencia de metales de transición o pesados que puedan formar complejos solubles con los aniones estudiados y eliminarlos con ayuda de intercambiadoras de cationes, por ejemplo cartuchos acondicionados en forma  $\text{H}^+$  o  $\text{Na}^+$ .

### 5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Se utilizan recipientes de polietileno para la toma de muestras. Se emplean únicamente recipientes nuevos o aquellos que se hayan aclarado repetidamente con agua ultrapura. Con objeto de minimizar los riesgos de contaminación de las muestras, no se utilizarán soluciones de detergentes fuertemente alcalinas ni ácidos fuertes minerales en las operaciones de limpieza de los recipientes. Si se va a realizar la determinación de nitrito, es conveniente llenar completamente el recipiente de muestra para minimizar la presencia de oxígeno.

Después de la recepción de la muestra en el laboratorio, se filtra a través de un filtro de membrana, de tamaño de poro de  $0.45\mu\text{m}$ , para evitar la adsorción de los aniones sobre la materia particulada y/o la actividad bacteriana. Se toman las medidas adecuadas para evitar la contaminación de la muestra por la membrana, por ejemplo, desechar la primera porción del filtrado obtenido.

Se estabiliza la muestra enfriándola hasta una temperatura comprendida entre  $4^\circ\text{C}$  y  $6^\circ\text{C}$  si se realizan los análisis en las siguientes 24 horas tras la toma de muestras; de lo contrario se conservarán por congelación pero sin sobrepasar los 28 días entre la toma de muestra y el análisis.

### 5.4. INSTRUMENTAL

El instrumental necesario para llevar a cabo este PNT es el siguiente:

- ▲ Material general de laboratorio.
- ▲ Estufa a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$ .
- ▲ Balanza analítica, con 0.1 mg de resolución.
- ▲ pH-metro.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 6 de 12
--	--	---

- ▲ Ultrasonidos.
- ▲ Jeringuillas con salida tipo Luer.
- ▲ Filtros de jeringa de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y 13 mm de diámetro.
- ▲ Membranas de filtración de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y 47 mm de diámetro.
- ▲ Equipo de filtración a vacío de 47 mm de diámetro.
- ▲ Cromatógrafo iónico *Methrom 792 IC BASIC* equipado con un detector de conductividad, bomba peristáltica, módulo de supresión química e interface.
- ▲ Columna *Metrosep A Supp 4*, de 250 mm de longitud y 4.0 mm de diámetro interno, empaquetada con partículas de alcohol polivinílico de 9 µm de diámetro recubiertas de grupos amonio cuaternario.
- ▲ Precolumna *Metrosep A Supp 4/5 Guard* de 5 mm de longitud, 4.0 mm de diámetro interno y partículas de 5 µm de diámetro.
- ▲ Cartuchos de extracción en fase sólida, SPE, de 0.5 mL de volumen *Grace Davison Discovery* o similar:

Tabla 2: Descripción de los cartuchos SPE empleados

Tipo de cartucho	Función
IC-H	Intercambia cationes por H <sup>+</sup> . Puede ser usado para la eliminación de cationes de la muestra y para reducir el pH
IC-Ag	Elimina exceso de haluros (Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup> , I <sup>-</sup> ) formando sales de plata
IC-Ba	Elimina exceso de sulfato precipitándolo como sulfato de bario
IC-RP	Eliminan componentes hidrofóbicos, detergentes, ácidos orgánicos... Los iones inorgánicos no son retenidos

## 5.5. REACTIVOS

Los reactivos que se utilizan durante el desarrollo de este PNT se indican a continuación. Todos ellos deben ser de calidad analítica para cromatografía.

- ▲ Fase móvil concentrada 180 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/170 mM NaHCO<sub>3</sub>. Se pesan 1.9078 ± 0.0001 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y 1.4281 ± 0.0001 g de NaHCO<sub>3</sub>, se disuelven en un matraz de 100 mL con aproximadamente 25 mL de agua ultrapura y se enrasa hasta 100 mL con agua ultrapura. Almacenar refrigerada (caducidad, 3 meses).
- ▲ Fase móvil diluida 1.8 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/1.7 mM NaHCO<sub>3</sub>. Se diluyen 10 mL de la fase móvil concentrada a 1000 mL con agua ultrapura. Se filtra a través de membranas de

 <i>[Dpto Química Analítica]</i>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 7 de 12
--	--	---

nylon de 0.45 µm de diámetro de poro y se somete a ultrasonidos durante 15 minutos para eliminar los gases disueltos (caducidad, 1 día).

- ▲ Disolución regeneradora del sistema de supresión química postcolumna 50 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se toman 2.8 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se añaden a un matraz de 1 L que contenga aproximadamente 250 mL de agua ultrapura, finalmente se enrasa a 1 L con agua ultrapura.
- ▲ Agua ultrapura para eliminar el exceso de ácido (caducidad, 1 día).
- ▲ Multipatrón de aniones concentrado que contenga 500 mg·L<sup>-1</sup> de F<sup>-</sup>, Cl<sup>-</sup> y Br<sup>-</sup>, y 1000 mg·L<sup>-1</sup> de NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> PO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>. Se pesan con precisión de ± 1 mg las cantidades de sal sódica o potásica anhidra, previamente secadas a 105 ± 5 °C, que se indican en la Tabla 3, y se disuelven en un matraz de 1 L con agua ultrapura (caducidad, 3 meses). También se pueden emplear patrones comerciales de concentraciones similares.

Tabla 3: Reactivos para la preparación de patrones

Anión (A <sup>-</sup> )	Reactivos	M molecular (g·mol·g <sup>-1</sup> )	M molecular A <sup>-</sup> (g·mol·g <sup>-1</sup> )	Tiempo desec. (h)	Masa (g)	C <sub>A-</sub> mg·L <sup>-1</sup>
Fluoruro	NaF	41.99	19.00	1	1.1050	500
Cloruro	NaCl	58.44	35.45	2	0.8242	500
Nitrito	NaNO <sub>2</sub>	69.00	46.01	1	1.4998	1000
Bromuro	NaBr	102.90	79.90	6	0.6439	500
Nitrato	NaNO <sub>3</sub>	84.99	62.01	24	1.3707	1000
Sulfato	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142.04	96.06	1	1.4790	1000

- ▲ Muestras para el control de calidad interno, CCI. Se preparan las disoluciones indicadas en la Tabla 4 a partir de un multipatrón concentrado de aniones distinto al preparado anteriormente para la calibración del equipo (caducidad, 1 día).

Tabla 4: Concentraciones de las muestras para el control de calidad interno

Anión	CCl <sub>1</sub>		CCl <sub>2</sub>	
	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>
Volumen (mL) de multipatrón concentrado, enrasar a 100mL con agua ultrapura	0.5 mL		25 mL	
Concentración final	2.5 mg·L <sup>-1</sup>	5 mg·L <sup>-1</sup>	125 mg·L <sup>-1</sup>	250 mg·L <sup>-1</sup>

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 8 de 12
--	--	---

## 5.6. OPERACIONES PREVIAS

Fijar en el cromatógrafo iónico las condiciones instrumentales indicadas en el *Anexo I*. Rellenar los reservorios con la fase móvil y purgar las bombas. Esperar a que la respuesta de la línea base sea estable y menor de  $20 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

## 5.7. PROCEDIMIENTO

### 5.7.1. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO

Se realiza el calibrado instrumental mensualmente o cada 500 inyecciones.

Se preparan los patrones de calibrado de forma que se cubra el rango de trabajo mediante dilución de la solución multipatrón de aniones concentrada, ver Tabla 5 (caducidad, 1 día).

Tabla 5: Concentración de los patrones de calibración seleccionados

Anión	Volumen (mL) de multipatrón concentrado, enrasar a 100 mL con agua ultrapura	Concentración (mg A <sup>-</sup> ·L <sup>-1</sup> )
F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Br <sup>-</sup>	0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3	0.5, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>		1, 5, 10, 15, 20, 25, 30

Se toma, con una jeringuilla de 5-10 mL con salida tipo Luer-Lock, agua ultrapura y se pasa a través de un filtro de nylon de 0.45 µm acoplado a la salida de la jeringuilla para eliminar partículas suspendidas. El filtrado es directamente introducido en el inyector del equipo para comprobar la ausencia de señal.

Para obtener la línea de calibrado se inyectan sucesivamente de la misma forma porciones homogéneas de los multipatrones de calibrado. La identificación de los aniones se hace en base a los tiempos de retención y la cuantificación se realiza midiendo el área de picos de cada anión.

Para asegurar la validez de las líneas de calibrado se deberá medir uno de los multipatrones de calibración al inicio de la sesión de trabajo, cada diez muestras o al finalizar la serie de muestras.

### 5.7.2. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se analiza uno de los CCI, introduciendo una réplica al inicio y otra al final de cada sesión de trabajo.

Una vez atemperadas las disoluciones, se comprueba que el pH de las muestras está dentro del rango admitido por la columna y precolumna; en caso de tener un pH ácido

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 9 de 12
--	--	---

se ajusta eluyendo la muestra por un cartucho de extracción IC-H. Si en las muestras están presentes altas concentración de haluros, sulfatos o iones inorgánicos que enmascaran la señal de alguno de los aniones a cuantificar, se eluirá la muestra por el/los cartucho/s de extracción adecuado/s, IC-H, IC-Ag, IC-Ba o IC-RP, para reducir la concentración de anión interferente.

Se realizan dos réplicas de cada muestra previamente filtradas con un filtro de nylon de 0.45 µm, diluyendo con agua desionizada, si fuese necesario, a concentraciones dentro del rango de calibración de cada anión, y se inyectan en las mismas condiciones que los patrones.

## 6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. CURVA DE CALIBRADO

Realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados:

$$Y = a + b \cdot C_{A^-} \quad ec. 1$$

donde  $Y$  es el área del pico medido en cuentas<sup>1</sup>,  $C_{A^-}$  es concentración de anión en  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $b$  la pendiente de la línea de calibrado en cuentas  $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$  y  $a$  la ordenada en el origen de la línea de calibrado medida en cuentas.

Las condiciones a cumplir por las rectas de calibrado son: el coeficiente de correlación debe ser,  $r^2 > 0.996$ ; y la pendiente y la ordenada, dependiendo del anión que se trate, deberán estar comprendidas entre los siguientes valores:

Tabla 6: Intervalos de confianza de los parámetros de calibración para la determinación de aniones

$A^-$	$b$ (cuentas·L·mg <sup>-1</sup> )	$a$ (cuentas)
$F^-$	$15.50 < b < 16.63$	$-10.05 < a < 0.30$
$Cl^-$	$9.51 < b < 10.69$	$-9.85 < a < 1.15$
$NO_2^-$	$6.48 < b < 7.08$	$-10.27 < a < 0.57$
$Br^-$	$3.80 < b < 4.02$	$-1.89 < a < 0.21$
$NO_3^-$	$5.05 < b < 5.49$	$-7.72 < a < 0.57$
$SO_4^{2-}$	$6.54 < b < 7.10$	$-9.33 < a < 1.05$

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 10 de 12
--	--	--

A los patrones de control del calibrado se les permitirá un error respecto al valor real  $\leq 5\%$ . En caso contrario, no se dará por buena la línea de calibrado almacenada y se recalibrará de nuevo.

## 6.2. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

La concentración de anión de la muestra se calcula interpolando en la ecuación de la línea de calibrado:

$$C_A \left[ \text{mg A}^- \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{Y - a}{b} \quad \text{ec. 2}$$

## 6.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Verificar que la columna es eficiente; para ello se comprobará que la separación de los picos de los patrones de control del calibrado llega a la línea base y los picos son simétricos, esto es, que los valores límite de resolución y asimetría son  $R > 1.3$  y  $A_s < 2$ .

Los valores obtenidos del análisis de las muestras de control de calidad interno se incluirán en los gráficos de control elaborados durante la validación del método. Se comprobará la validez del método según la tendencia de los valores representados.

Si el valor del %DER para una muestra medida es superior al valor objetivo impuesto durante la validación, %DER  $< 15\%$ , se realiza una tercera réplica y se recalculará el %DER pudiendo rechazar una de las réplicas como valor anómalo.

## 6.4. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de la concentración del anión en las muestras,  $I_A^-$ , se estima para cualquier concentración del rango de medida interpolando en las ecuaciones obtenidas durante la validación del método:

Tabla 7: Ecuaciones que relacionan incertidumbre-concentración de cada uno de los aniones

Fluoruro	$I_{F^-} = 0.0680 \cdot (C_{F^-})^{0.9889}$	Bromuro	$I_{Br^-} = 0.0807 \cdot (C_{Br^-})^{0.9573}$
Cloruro	$I_{Cl^-} = 0.0940 \cdot (C_{Cl^-})^{0.9786}$	Nitrato	$I_{NO_3^-} = 0.0729 \cdot (C_{NO_3^-})^{0.9963}$
Nitrito	$I_{NO_2^-} = 0.0608 \cdot (C_{NO_2^-})^{1.0459}$	Sulfato	$I_{SO_4^{2-}} = 0.0658 \cdot (C_{SO_4^{2-}})^{1.0071}$

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO, BROMURO, NITRATO Y SULFATO DISUELTO EN AGUAS POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA”</b>	Cód.: <b>PNT-Aniones</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 11 de 12
--	--	--

## 6.5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El valor de la incertidumbre se expresará con 2 cifras significativas. Si hay que suprimir cifras, se redondeará la segunda al número inmediatamente superior.

El valor de la medida final o de la concentración se redondeará sobre el dígito correspondiente a la segunda cifra significativa de la incertidumbre.

Los resultados de nitrito y nitrato pueden expresarse como  $\text{N-NO}_2$  y  $\text{N-NO}_3^-$  multiplicando por los siguientes factores de conversión:

Tabla 8: Factores de conversión

$\text{NO}_2^- \xrightarrow{\times 0.3043} \text{N-NO}_2^- \xrightarrow{\times 3.2882} \text{NO}_2^-$	$\text{NO}_3^- \xrightarrow{\times 0.2259} \text{N-NO}_3^- \xrightarrow{\times 4.4267} \text{NO}_3^-$
---	---

## ANEXOS

### A.I: CONDICIONES INSTRUMENTALES

Tabla 9: Condiciones instrumentales del cromatógrafo iónico

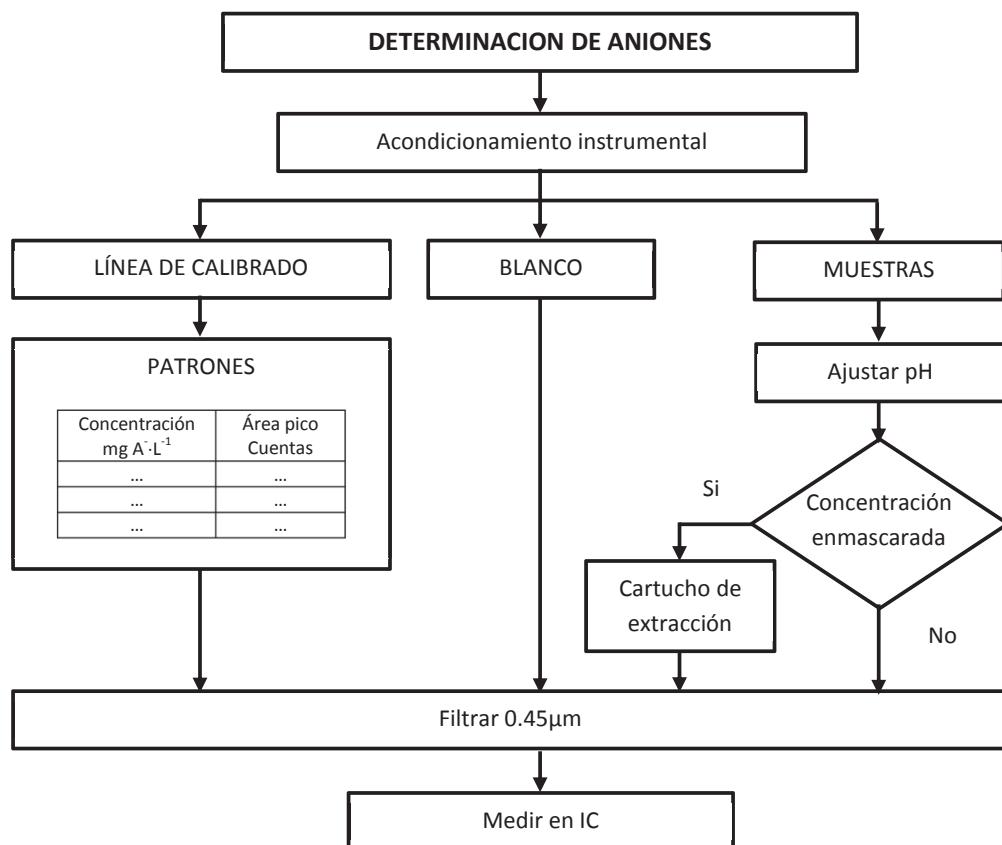
Parámetros instrumentales	Caudal: $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ Tiempo de cromatograma: 16 min Presión máxima: 12 MPa Presión mínima: 0 MPa Conductividad: $0 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$
Propiedades de integración	Delay: 3.2 min Anchura: 5 seg Pendiente: 3 Altura mínima: $0.1 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ Tipo de integración: valle-valle Tiempos de retención (según Tabla 10)
Condiciones de calibración	Método de calibración: patrón externo Base: Área Formula: $Y = K_1X + K_0$ Peso estadístico 1

Tiempos de retención para cada anión:

Tabla 10: Tiempos de retención indicados por el fabricante

Anión	$t_R$ (min)
$F^-$	3.6
$Cl^-$	5.1
$NO_2^-$	6.0
$Br^-$	7.4
$NO_3^-$	8.3
$SO_4^{2-}$	14.0

## A.II: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO





## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

### PNT-FENOL

“DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS.  
MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO  
DE LA 4-AMINOANTIPIRINA”

Rev.: 1

Fecha: dd/mm/aa

Pág.: 1 de 8

<b>Elaborado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Revisado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Aprobado por:</b> Nombre Apellido Apellido
<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA"</b>	Cód.: PNT-Fenol Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 2 de 8
--	---	---

## ÍNDICE

1. OBJETO .....	3
2. ALCANCE.....	3
3. REFERENCIAS .....	3
4. FUNDAMENTO.....	3
5. METODOLOGÍA.....	3
5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD .....	4
5.2. INTERFERENCIAS .....	4
5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA .....	4
5.4. INSTRUMENTAL.....	4
5.5. REACTIVOS.....	5
5.6. OPERACIONES PREVIAS .....	5
5.7. PROCEDIMIENTO.....	6
5.7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA .....	6
5.7.2. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO.....	6
5.7.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS .....	6
6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	7
6.1. CURVA DE CALIBRADO .....	7
6.2. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA.....	7
6.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO .....	7
6.4. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE .....	8
6.5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	8
ANEXO: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO.....	8

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO <b>"DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA"</b>	Cód.: PNT-Fenol Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 3 de 8
--	--	---

## 1. OBJETO

El objeto de este PNT es describir el ensayo para la determinación de fenol en agua mediante el método espectrofotométrico directo de la 4-aminoantipirina.

## 2. ALCANCE

Este PNT se aplica a la determinación de fenol en aguas residuales y continentales no tratadas.

El rango de trabajo es de 0.5 a 5 mg fenol·L<sup>-1</sup> y el de medida de 0.5 a 500 mg fenol·L<sup>-1</sup>, siendo la dilución máxima permitida 1:200.

## 3. REFERENCIAS

- ▲ **American Public Health Association. (1998).** Standard methods for examination of water and wastewater. 20th ed. APHA-AWWA-WPCF, Washington DC.
- ▲ **ASTM D1783-01. (2012).** Standard test methods for phenolic compounds in water. *American Society for Testing and Materials, ASTM*.
- ▲ **UNE 77053 (2002).** Calidad del agua. Determinación de fenoles. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*.
- ▲ **USEPA Method 420.1 (1983).** Phenolics (Spectrophotometric, Manual 4-AAP With Distillation). *United States Environmental Protection Agency, EPA*.

## 4. FUNDAMENTO

Este método es sensible a los fenoles -ortho- y -meta- sustituidos y, en condiciones adecuadas de pH, los sustituidos en posición -para- por grupos carboxilo, halógeno, metoxilo o ácido sulfónico.

Los compuestos fenólicos destilados reaccionan con la 4-AAP a pH 7.9 en presencia de ferricianuro potásico para formar un compuesto coloreado de antipirina. Este colorante es estable en solución acuosa y susceptible de medida fotométrica a una longitud de onda de 506 nm.

## 5. METODOLOGÍA

A continuación se describen las actividades a desarrollar, así como los medios necesarios para llevar a cabo este PNT.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA"</b>	Cód.: PNT-Fenol Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 4 de 8
--	---	---

## 5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Durante la destilación de la muestra, debido a las altas temperaturas que adquiere el material, se deben emplear guantes de protección térmicos.

## 5.2. INTERFERENCIAS

Las interferencias potenciales del método pueden deberse a diferentes causas:

- ▲ Sustancias oxidantes tales como cloro y aquellas capaces de oxidar el yoduro a yodo al acidificar. Se deben eliminar inmediatamente después de la toma de muestra añadiendo un exceso de sulfato ferroso,  $FeSO_4$ . Si no se eliminan las sustancias oxidantes, los compuestos fenólicos se oxidarán parcialmente.
- ▲ Especies reducidas de azufre. Se eliminan por acidificación a pH = 4 con ácido fosfórico, añadiendo sulfato de cobre y aireando la muestra brevemente por agitación. De esta manera, se eliminan las interferencias debidas al sulfuro y al sulfito.
- ▲ Aceites y alquitranes: El aceite o alquitrán se extraen con 50 mL de cloroformo de la solución acuosa, alcalinizada a pH = 12 con hidróxido sódico. Se desecha la fase orgánica que contiene el aceite o alquitrán y se elimina el exceso de cloroformo de la fase acuosa calentando al baño María antes de proceder a la fase de destilación.
- ▲ También pueden interferir concentraciones anormalmente altas de aminas aromáticas y formaldehído que son eliminadas añadiendo sulfato de amonio e hidróxido de sodio. En ambos casos posteriormente se acidifica y se procede a destilar.

## 5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

En las concentraciones a las que habitualmente se encuentran en las aguas residuales, los fenoles pueden sufrir una oxidación biológica y química. Si no van a analizarse dentro de las 4 h posteriores a su recogida, las muestras deben conservarse acidificadas a pH = 4 con ácido fosfórico y refrigeradas a temperaturas inferiores a 4°C. Las muestras así conservadas pueden almacenarse en botes de vidrio borosilicatado y analizarse dentro de las 24 horas después de su recogida.

Si se sabe que hay H<sub>2</sub>S ó SO<sub>2</sub> en la muestra, se aírea brevemente o se agita la muestra con precaución.

## 5.4. INSTRUMENTAL

El instrumental necesario para llevar a cabo este PNT es el siguiente:

- ▲ Material general de laboratorio.
- ▲ Manta calefactora eléctrica para matraces de 500 mL con T<sup>º</sup> regulable hasta 450°C.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA 4-AMINOANTIPIRINA"</b>	Cód.: <b>PNT-Fenol</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 5 de 8
--	---	--

- ▲ Equipo de destilación compuesto por: matraz de 500 mL, pieza acodada de 75° para destilación, refrigerante Dimroth encamisado de 300 mm de longitud y colector de 105°.
- ▲ pH-metro.
- ▲ Espectrofotómetro UV-visible con las siguientes especificaciones: ancho de cubeta 10 mm y longitud de onda  $506 \pm 1$  nm.

## 5.5. REACTIVOS

Los reactivos que se utilizan durante el desarrollo de este PNT se indican a continuación. Todos ellos deben ser de calidad analítica.

- ▲ Agua ultrapura (caducidad, 1 día).
- ▲ Ácido fosfórico (1:10). Diluir 10 mL de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  al 85% hasta 100 mL con agua ultrapura.
- ▲ Amoniaco 0.5 M. Diluir 31.6 mL de  $\text{NH}_3$  al 30% hasta 1 litro (caducidad, 2 meses).
- ▲ Solución tampón fosfato. Diluir  $104.5 \pm 0.1$  g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  y  $72.3 \pm 0.1$  g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en agua ultrapura hasta 1000 mL. El pH ha de ser 6.8 (caducidad, 2 meses).
- ▲ Solución de 4-aminoantipiridina al 2%. Disolver la cantidad necesaria de reactivo  $\pm 0.01$  g en el volumen adecuado con agua ultrapura para el análisis diario (caducidad, 1 día).
- ▲ Solución de ferricianuro potásico al 4%. Disolver la cantidad necesaria de reactivo  $\pm 0.01$  g en el volumen adecuado con agua ultrapura para el análisis diario. Almacenar en frasco topacio (caducidad, 1 día).
- ▲ Patrón concentrado de fenol,  $1000 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Pesar  $0.5000 \pm 0.0001$  g de fenol y diluir a 500 mL con agua ultrapura recién hervida y fría (caducidad, 3 meses).
- ▲ Muestras para el control de calidad interno, CCI. Se prepara una de las siguientes disoluciones a partir de un patrón concentrado de fenol distinto al empleado en la calibración del equipo (caducidad, 1 día):

Tabla 1: Concentraciones de las muestras para el control de calidad interno

	$\text{CCl}_1$	$\text{CCl}_2$
Volumen (mL) de patrón concentrado enrasar a 1000 mL con agua ultrapura	0.5 mL	5 mL
Concentración final	$0.5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$	$5 \text{ mg fenol}\cdot\text{L}^{-1}$

## 5.6. OPERACIONES PREVIAS

Se fija en el espectrofotómetro UV-vis la longitud de onda a 506 nm y se ajusta el cero de absorbancia.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO</b> <b>ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA</b> <b>4-AMINOANTIPIRINA”</b>	Cód.: PNT-Fenol Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 6 de 8
--	---	---

## 5.7. PROCEDIMIENTO

### 5.7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los fenoles se pueden separar de la matriz no volátil por destilación. Para ello, se toman volúmenes de muestra ligeramente superiores a 500 mL y se ajusta el pH a aproximadamente 4.0 con la disolución de ácido fosfórico. Omitir la etapa de ajuste de pH si la muestra se conserva como se describe en el apartado 5.3. A continuación, se vierten en el matraz de destilación 500 mL de la muestra y cuando han destilado aproximadamente 450 mL, se detiene la destilación. Cuando la muestra deja de hervir, se añade 50 mL de agua desionizada caliente al matraz de destilación y se continua destilando hasta recoger un volumen total de 500 mL. Los destilados se almacenan refrigerados a 4°C hasta su análisis

### 5.7.2. PREPARACIÓN DE LA CURVA DE CALIBRADO

Se realiza el calibrado instrumental diariamente.

Se preparan los patrones de calibrado de forma que se cubra el rango de trabajo mediante dilución de la solución patrón de fenol concentrado. Se toman los siguientes volúmenes de patrón concentrado de fenol: 0 (blanco), 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mL, y se diluyen a 100 mL con agua ultrapura obteniéndose patrones de 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4 y 5 mg fenol·L<sup>-1</sup> (caducidad, 1 día).

Para asegurar la validez de las líneas de calibrado se deberá medir uno de los patrones de calibración al inicio de la sesión de trabajo, cada diez muestras o al finalizar la serie de muestras.

### 5.7.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Se analiza dos réplicas de uno de los CCI, al inicio de cada sesión de trabajo y al final.

Se realizan dos réplicas de cada muestra.

Se toman 100 mL de destilado de muestra o de CCI, o una porción que contenga no más de 5 mg de fenol y se diluye hasta 100 mL. Se realiza un blanco paralelamente.

Se tratan los patrones de la línea de calibrado, las muestras, el CCI y el blanco como sigue: se añaden 2.5 mL de la disolución de amoníaco y 2 mL de tampón fosfato (pH final aproximadamente 7.9). Se añade a continuación 1.0 mL de disolución 4-AAP, 1.0 mL de disolución K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> y se mezcla bien. Despues de 15 minutos, se transfiere la disolución coloreada a las cubetas de vidrio de 1 cm y se lee la absorbancia de patrones y muestras a 506 nm introduciendo en la cubeta de referencia el blanco.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE FENOL EN AGUAS. MÉTODO</b> <b>ESPECTROFOTOMÉTRICO DIRECTO DE LA</b> <b>4-AMINOANTIPIRINA”</b>	Cód.: <b>PNT-Fenol</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 7 de 8
--	---	--

## 6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. CURVA DE CALIBRADO

Realizar el ajuste lineal por mínimos cuadrados:

$$UA = a + b \cdot C_{\text{fenol}} \quad \text{ec. 1}$$

donde  $UA$  es la absorbancia proporcionada por el espectrofotómetro en unidades de absorbancia,  $C_{\text{fenol}}$  es la concentración de analito en  $\text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $b$  la pendiente de la línea de calibrado en  $\text{UA L} \cdot \text{mg fenol}^{-1}$  y  $a$  la ordenada en el origen de la línea de calibrado medida en  $UA$ .

La pendiente y ordenada en el origen de la línea de calibrado deben estar incluidas en los intervalos de confianza:  $0.13 < b < 0.14 \text{ UA mg fenol}^{-1}$  y  $-0.0086 < a < 0.0141 \text{ UA}$ . El coeficiente de correlación mínimo debe ser  $r^2 > 0.996$ .

A los patrones de control del calibrado se les permitirá un error respecto al valor real  $\leq 5\%$  para concentraciones medias o altas, e inferior al  $10\%$  para concentraciones próximas al límite de cuantificación. En caso contrario, no se dará por buena la línea de calibrado almacenada y se recalibrará de nuevo.

### 6.2. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

La concentración de anión de la muestra se calcula interpolando en la ecuación de la línea de calibrado:

$$C_{\text{fenol}} \left[ \text{mg fenol} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{UA - a}{b} \quad \text{ec. 2}$$

### 6.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Los valores obtenidos del análisis de las muestras de control de calidad interno se incluirán en los gráficos de control elaborados durante la validación del método. Se comprobará la validez del método según la tendencia de los valores representados.

Si el valor del %DER para una muestra medida es superior al valor objetivo impuesto durante la validación,  $\%DER < 15\%$ , se realiza una tercera réplica y recalcula el %DER pudiendo rechazar una de las réplicas como valor anómalo.

## 6.4. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de la concentración de fenol en las muestras,  $I_{fenol}$ , se estima para cualquier concentración del rango de medida interpolando en la ecuación obtenida durante la validación del método:

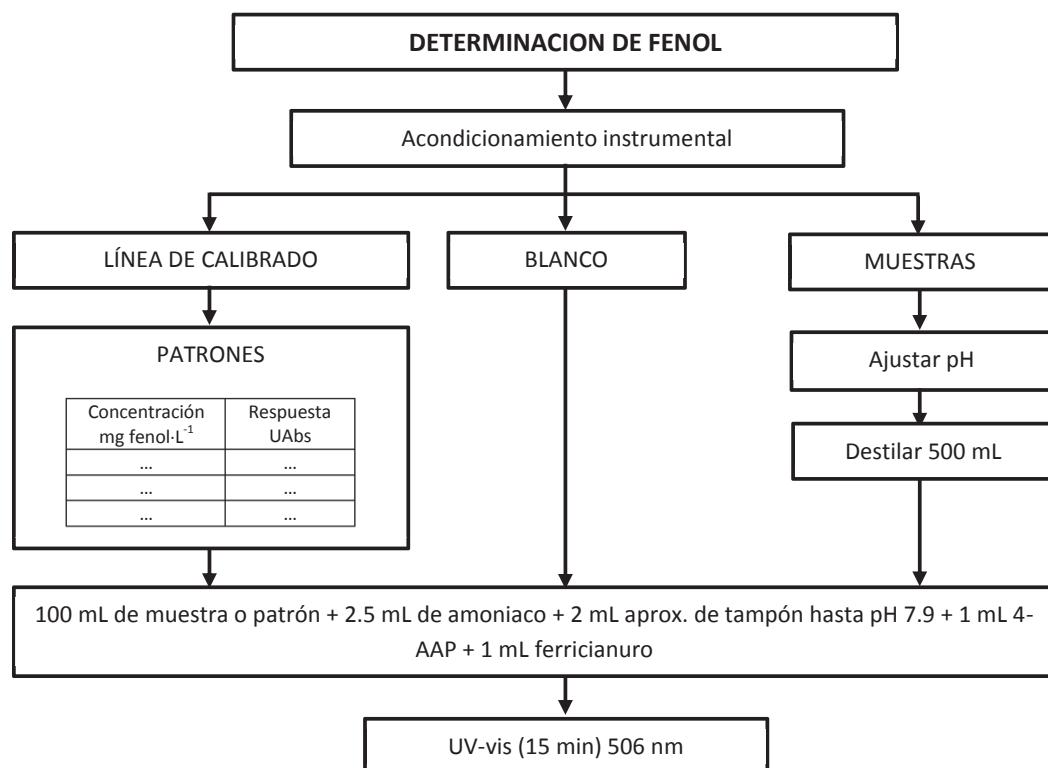
$$I_{fenol} = 0.1820 \cdot (C_{fenol})^{0.8667} \quad \text{ec. 3}$$

## 6.5. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

El valor de la incertidumbre se expresará con 2 cifras significativas. Si hay que suprimir cifras, se redondeará la segunda al número inmediatamente superior.

El valor de la medida final o de la concentración se redondeará sobre el dígito correspondiente a la segunda cifra significativa de la incertidumbre.

## ANEXO: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO





## PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO

### PNT-A&G

“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS MEDIANTE  
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GRAVIMETRÍA”

Rev.: 1

Fecha: dd/mm/aa

Pág.: 1 de 9

<b>Elaborado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Revisado por:</b> Nombre Apellido Apellido	<b>Aprobado por:</b> Nombre Apellido Apellido
<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa	<b>Fecha:</b> dd/mm/aa

 <b>UVa</b> <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN</b> <b>AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y</b> <b>GRAVIMETRÍA"</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 2 de 9
--	---	--

## ÍNDICE

1. OBJETO .....	3
2. ALCANCE.....	3
3. REFERENCIAS .....	3
4. FUNDAMENTO.....	3
5. METODOLOGÍA.....	4
5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD .....	4
5.2. INTERFERENCIAS .....	4
5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA.....	4
5.4. INSTRUMENTAL .....	5
5.5. REACTIVOS .....	5
5.6. PROCEDIMIENTO .....	6
6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS .....	8
6.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA.....	8
6.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO .....	8
6.3. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE .....	8
6.4. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.....	8
ANEXO .....	9
A.I: ESQUEMA DEL EQUIPO DE FILTRACIÓN A VACÍO .....	9
A.II: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO.....	9

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GRAVIMETRÍA”</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 3 de 9
--	---	--

## 1. OBJETO

El objeto de este PNT es describir el ensayo para la determinación gravimétrica de aceites y grasas, A&G, en aguas mediante extracción en fase sólida con n-hexano.

## 2. ALCANCE

Este PNT se aplica para la determinación de A&G en aguas residuales y continentales no tratadas.

El rango de ensayo y de medida es de 50 a 4000 mg A&G·L<sup>-1</sup>.

Este PNT es aplicable a la determinación de hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, grasas animales, ceras, jabones, grasas y materias relacionadas. No es aplicable a hidrocarburos ligeros (productos derivados del petróleo desde la gasolina al fuel-oil) que se volatilizan a temperaturas por debajo de 70°C o aceites y grasas poco viscosos que no se separan por filtración.

## 3. REFERENCIAS

- ▲ **American Public Health Association. (1998).** Standard methods for examination of water and wastewater, 20<sup>th</sup> ed. APHA-AWWA-WPCF, Washington DC.
- ▲ **ASTM D4281-95 (2005).** Standard Test Method for Oil and Grease (Fluorocarbon Extractable Substances) by Gravimetric Determination. *American Society for Testing and Materials, ASTM*.
- ▲ **UNE 77037 (1983).** Método de análisis de agua en vertidos industriales. Determinación de aceite y grasa total recuperable. Método de extracción de Soxhlet. *Asociación Española de Normalización y Certificación, AENOR*.
- ▲ **USEPA Method 1664, revision B (2010).** N-hexane extractable material (HEM; oil and grease) and silica gel treated n-hexane extractable material (SGT-HEM; non-polar material) by extraction and gravimetry. *United States Environmental Protection Agency, EPA*.

## 4. FUNDAMENTO

El proceso de medida consiste en extraer los aceites y grasas del medio acuoso a un medio orgánico de la forma siguiente: la muestra, una vez acidificada a pH < 2 para evitar la saponificación y la formación de emulsiones inestables, se filtra a través de un filtro específico para la determinación de A&G en el cual quedan retenidos los aceites y grasas que son posteriormente eluidos con n-hexano. El extracto final se filtra a través

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN</b> <b>AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y</b> <b>GRAVIMETRÍA”</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 4 de 9
--	---	--

de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  para secarlo. Por último, se evapora el disolvente, se deja enfriar en un desecador y se pesa el residuo.

## 5. METODOLOGÍA

A continuación se describen las actividades a desarrollar, así como los medios necesarios para llevar a cabo este PNT.

### 5.1. MEDIDAS DE SEGURIDAD

Realizar la extracción de las muestras y la destilación del disolvente en vitrina debido a la alta toxicidad del n-hexano.

### 5.2. INTERFERENCIAS

Estas interferencias pueden deberse a diferentes causas:

- ▲ En la determinación de aceites y grasas no se mide una cantidad absoluta de una sustancia específica. Más bien, se determinan cuantitativamente grupos de sustancias con características físicas similares sobre la base de su solubilidad común. Los A&G que pueden ser determinados son hidrocarburos relativamente no volátiles, aceites vegetales, sebos animales, ceras, jabones, grasas y compuestos similares como lípidos biológicos y los hidrocarburos minerales. El n-hexano, además, tiene la capacidad de disolver otras sustancias orgánicas tales como compuestos orgánicos de azufre, ciertos tintes orgánicos, detergentes... Por otro lado, los residuos más pesados del petróleo pueden contener una porción significativa de materiales que no son extraíbles con n-hexano.
- ▲ El método no es aplicable para medir fracciones de bajo punto de ebullición que se volatilizan a temperaturas por debajo de 70°C durante la eliminación del disolvente, como hidrocarburos de cadena corta y aromáticos sencillos.

### 5.3. TOMA Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras recogidas no deben subdividirse para la realización de réplicas, por lo que se deben recoger de forma separada, en envases de vidrio de boca ancha y aclarados previamente con n-hexano para eliminar todo vestigio de aceite y grasa. El volumen de muestra que debe recogerse es aquel que proporcione una cantidad de aceite y grasa comprendida entre 50 y 1000 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Se marca el frasco de muestra a la altura del menisco de agua para la determinación del volumen de la muestra. Si la muestra no ha sido acidificada en el momento de su recogida, se añade al frasco de muestra HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (1:1) hasta que el pH < 2. Analizar antes de 28 días.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GRAVIMETRÍA"</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 5 de 9
--	---	--

## 5.4. INSTRUMENTAL

El instrumental necesario para llevar a cabo este PNT es el siguiente:

- ▲ Material general de laboratorio.
- ▲ Equipo de filtración a vacío para filtros de 47 mm de diámetro, marca Scharlab (ver Anexo A1).
- ▲ Tubos Nessler de vidrio de 100 mL de capacidad y 28 mm de diámetro.
- ▲ Filtros SPE Pacific TM O&G Disk 1664-47-HT de Horizon Technologies de 47 mm de diámetro específicamente diseñados para este método.
- ▲ Desecador con llave de vacío.
- ▲ Papel de filtro de 15 cm de diámetro Whatman nº 40 o equivalente.
- ▲ Matraces redondos de cuello corto de 250 mL de capacidad y peso inferior a 110 g.
- ▲ Embudos de vidrio de 70 mm de diámetro.
- ▲ Probetas graduadas con volúmenes comprendidos entre 100 mL y 2000 mL.
- ▲ Balanza analítica con 0.0001 g de resolución y 110 g de fondo de escala.
- ▲ Rotavapor a  $70 \pm 5^\circ\text{C}$ .
- ▲ Bomba de vacío de membrana.
- ▲ pH-metro o papel indicador de pH.
- ▲ Estufa de aire forzado a  $105 \pm 5^\circ\text{C}$ .

## 5.5. REACTIVOS

Los reactivos que se utilizan durante el desarrollo de este PNT se indican a continuación. Todos ellos deben ser de calidad analítica.

- ▲ Agua bidestilada (caducidad, 1 día).
- ▲ Solución ácido clorhídrico (1:1). Añadir lentamente y mientras se agita HCl concentrado sobre agua bidestilada, mezclando volúmenes iguales. Alternativamente se puede utilizar  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , preparado de la misma manera.
- ▲ Metanol (caducidad, ver envase).
- ▲ Sulfato sódico anhidro secado a  $200-250^\circ\text{C}$  durante 24 h y almacenado en desecador hasta su uso (caducidad, ver envase).
- ▲ n-hexano con una pureza mínima de 85% y menos de 0.0001% de residuo seco (caducidad, ver envase).
- ▲ Muestras para el control de calidad interno, CCI. Se prepara una de las siguientes mezclas:

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>"DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN</b> <b>AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y</b> <b>GRAVIMETRÍA"</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 6 de 9
--	---	--

- CCl<sub>1</sub>, mezcla 50 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Se pesan 0.0250 g de ácido esteárico y 0.0250 g de hexadecano, se añaden a un matraz de 1 L y se enrassa con agua bidestilada. La suma total de la masa de los reactivos debe ser 0.0500 ± 0.0001 g (caducidad, 1 día).
- CCl<sub>2</sub>, mezcla 250 mg A&G·L<sup>-1</sup>. Se pesan 0.1250 g de ácido esteárico y 0.1250 g de hexadecano, se añaden a un matraz de 1 L y se enrassa con agua bidestilada. La suma total de la masa de los reactivos debe ser 0.2500 ± 0.0001 g (caducidad, 1 día).

## 5.6. PROCEDIMIENTO

Se analiza una réplica de uno de los CCI al inicio de cada sesión de trabajo.

Realizar dos réplicas de cada muestra y un blanco paralelamente.

▲ Preparación de la muestra

A la llegada de la muestra al laboratorio, se marca el menisco en el recipiente que la contiene. Se mide el pH y se acidifica la muestra a pH < 2 con HCl 1:1 y se refrigerara. El volumen de muestra analizado se determina después de su análisis rellenando la botella que contenía la muestra con agua hasta la línea marcada antes de la acidificación y midiendo el volumen de agua empleado con una probeta.

▲ Preparación del matraz

Se secan los matraces redondos de 250 mL en la estufa a 105°C durante 2 horas y se almacenan en un desecador. Antes de iniciar el análisis se pesan en la balanza analítica. Los matraces deben ser manipulados en todo momento con guantes o pinzas.

▲ Preparar el equipo de filtración

Se introduce un tubo Nessler dentro del quitasato y se coloca el filtro SPE con la cara rugosa hacia arriba. A continuación se lavan las paredes del embudo el equipo de filtración con una alícuota de 10 mL de n-hexano hasta que el filtro esté totalmente empapado por el disolvente; se esperan 5 segundos y se aplica vacío recogiendo el disolvente en el tubo Nessler. Se hace un segundo lavado con otros 10 mL de n-hexano aplicando vacío durante 1 minuto hasta que el filtro esté seco. Se recupera el n-hexano por destilación.

Si la muestra contiene elevada cantidad de sólidos en suspensión puede ser recomendable colocar sobre el filtro de aceites y grasas un prefiltro de fibra de vidrio para evitar la colmatación del filtro SPE y reducir el tiempo de filtración.

▲ Acondicionamiento del filtro

Se humedece el filtro SPE con 10 mL de metanol hasta que el filtro esté totalmente sumergido, evitando que se seque; se espera 5 segundos y se aplica vacío nuevamente recogiendo el metanol en el tubo Nessler, y descartándolo a continuación.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GRAVIMETRÍA”</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 7 de 9
--	---	--

Seguidamente se lava el filtro con 20 mL de agua para eliminar el residuo de metanol evitando que el filtro se seque. Se retira el tubo Nessler del montaje.

#### ▲ Extracción de las muestras

Una vez acondicionado el filtro se filtra la muestra lentamente a vacío, minimizando el contacto de la muestra con el embudo, para evitar la adsorción de los aceites y grasas a las paredes, no llenando para ello más de 2/3 del volumen del embudo. Para muestras con muchos sólidos en suspensión se deja decantar, se filtra el sobrenadante primero y se vierte el sólido al final antes de que se seque el filtro. Si quedan sólidos adheridos a las paredes de la botella y del embudo, se pueden arrastrar con agua; también se puede emplear una espátula dejando el residuo encima del filtro.

Una vez que la muestra se ha filtrado totalmente, se continúa secando el filtro haciendo vacío no más de 8 minutos para evitar la pérdida de compuestos volátiles. Si queda una capa de sedimento húmedo en el filtro se mezclan 5 g de sulfato de sodio con una espátula, hasta que el sedimento aparezca seco, granulado y suelto.

#### ▲ Elución del analito

Se desecha el líquido del quitasato, se introduce dentro un tubo Nessler y se acopla al resto del equipo de filtración. Se lavan las paredes de la botella que contenía la muestra con 3 porciones de 10 mL de n-hexano agitando durante un minuto, añadiéndolo a continuación al embudo y haciendo vacío para que filtre lentamente. Se lavan las paredes del embudo con otras tres porciones de 15 mL de n-hexano y, por último se vierten otras dos porciones de 15 mL de n-hexano haciendo nuevamente vacío hasta que se haya transferido todo al tubo Nessler.

#### ▲ Secado del extracto

Se filtra el extracto de n-hexano a través de un embudo cónico en el que se ha colocado un filtro *Whatman* nº 40 o similar de 15 cm de diámetro y 10 g de sulfato de sodio. El filtrado seco se recoge en un matraz redondo de 250 mL almacenado en desecador y previamente pesado. Una vez filtrado el extracto se lava el tubo Nessler con 15 mL de n-hexano y el filtrado se junta con la porción anterior. Se lava el filtro con n-hexano limpio juntándolo con las porciones anteriores.

#### ▲ Eliminación del disolvente

Se destila el n-hexano en un rotavapor a 70°C. Cuando la destilación esté finalizando se aplica vacío unos segundos para destilar el n-hexano final. Por último se introduce el matraz en un desecador, se hace vacío hasta alcanzar la temperatura ambiente y se pesa en la balanza analítica.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN</b> <b>AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y</b> <b>GRAVIMETRÍA”</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 8 de 9
--	---	--

## 6. CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

### 6.1. CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA

La concentración de aceites y grasas en las muestras se calcula según:

$$C_{AG} \left[ \text{mg AG} \cdot \text{L}^{-1} \right] = \frac{P_f - P_i - (P_{f-B} - P_{i-B})}{V_M} \cdot 10^6 \quad \text{ec. 1}$$

donde  $C_{A&G}$  es la concentración de A&G en la muestra,  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $P_i$  y  $P_f$  son las masas del matraz antes y después de la determinación de A&G, medidas en g,  $P_{i-B}$  y  $P_{f-B}$ , son las masas del matraz antes y después de la determinación del blanco, medidas en g y  $V_M$  el volumen de muestra, mL.

### 6.2. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Los valores obtenidos del análisis de las muestras para el control de calidad interno se incluirán en los gráficos de control elaborados durante la validación del método. Se comprobará la validez del método según la tendencia de los valores representados.

Si el %DER para una muestra medida es superior al valor objetivo impuesto durante la validación, %DER <15%, se realiza una tercera réplica y recalcula el %DER pudiendo rechazar una de las réplicas como valor anómalo.

### 6.3. ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE

La incertidumbre de la concentración de A&G en las muestras,  $I_{A&G}$ , se estima para cualquier concentración del rango de medida interpolando en la siguiente ecuación, obtenida durante la validación del método:

$$I_{A&G} = 0.4136 \cdot (C_{A&G})^{0.8472} \quad \text{ec. 2}$$

### 6.4. EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

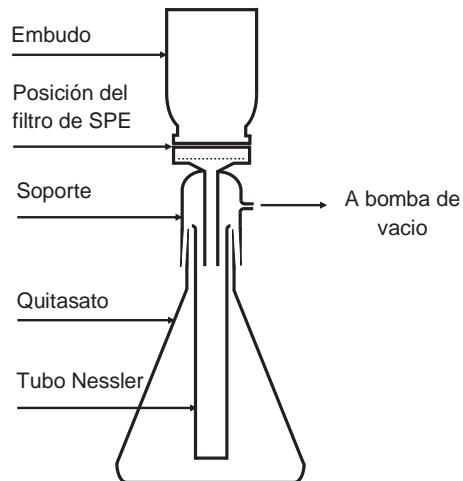
El valor de la incertidumbre se expresará con 2 cifras significativas. Si hay que suprimir cifras, se redondeará la segunda al número inmediatamente superior.

El valor de la medida final o de la concentración se redondeará sobre el dígito correspondiente a la segunda cifra significativa de la incertidumbre.

 <small>[Dpto Química Analítica]</small>	<b>PROCEDIMIENTO NORMALIZADO DE TRABAJO</b> <b>“DETERMINACIÓN DE ACEITES Y GRASAS EN AGUAS MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA Y GRAVIMETRÍA”</b>	Cód.: <b>PNT-A&amp;G</b> Rev.: 1 Fecha: dd/mm/aa Pág.: 9 de 9
--	---	--

## ANEXOS

### A.I: ESQUEMA DEL EQUIPO DE FILTRACIÓN A VACÍO



### A.II: DIAGRAMA DE FLUJO DEL ENSAYO

