

VALIDACION DEL METODO DE DETERMINACION DE AOX (ESTUDIO PRELIMINAR)

S. Ruiz*, E. Griful**, D. López *** y M.C. Riva****

0.1 Resumen

El objetivo de este estudio es realizar la validación del método de determinación de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) verificando sus características técnicas, selectividad y especificidad, intervalo de trabajo, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud (sesgo e imprecisión). Para ello se ha cogido una serie de soluciones estándar que contienen cantidades conocidas de analito y cada solución se ha analizado por separado a través de un procedimiento de análisis con un protocolo bien definido¹⁾.

Palabras clave: Validación, método AOX, compuestos orgánicos halogenados.

0.2 Summary. VALIDATION OF THE AOX DETERMINATION METHOD (PRELIMINARY STUDY)

The objective of this study is to validate the method for the determination of adsorbable halogens compounds (AOX) verifying their characteristics, specificity and selectivity, work range, linearity, sensitivity, limit of detection, limit of quantification and accuracy (bias and precision). To this end, a series of standard solutions containing known amounts of analyte has been selected; each solution has been analysed by separate through an analytical procedure with a well defined protocol.

Key words: Validation, AOX method, organic halogens compounds.

0.3 Résumé

Dans le présent travail on étudie la validation de la méthodologie pour la détermination des composés organohalogenés adsorbibles (AOX) tout en vérifiant les caractéristiques techniques; la selectivité et l'especificité, intervalle du travail, la linealilé, la sensibilité, le limite de detection et de cuantification et aussi l'exactitude. Pour faire ça, ont été choisis des solutions standard avec quantités connues d'analyte et chaque solution a été analysée individuellement au moyen d'un procédé d'essai avec un protocole bien défini.

Mots clé: Validation, méthodologie AOX, composés organohalogenés.

1. INTRODUCCION

La legislación de la Comunidad Económica Europea ha dado muestras de sensibilización en relación a los Compuestos Orgánicos Halogenados Adsorbibles (AOX), debido a las implicaciones ecológicas que se derivan del uso de los hidrocarburos clorados.

En Alemania, se han establecido unos límites de 0,1 mg/l de AOX permisibles para ser descargados en los ríos y de 0,5 mg/l de AOX para los vertidos a conductos públicos.

En la Propuesta de Directiva del Consejo de la CEE relativa al vertido de residuos (23/04/1993) en lo que hace referencia a la presencia de AOX en los residuos, los límites se encuentran entre 0,6-3 mg/l para los residuos peligrosos, e inferior a 0,3 mg/l en el caso de los residuos inertes.

Este hecho, junto con el enorme interés que se ha creado entorno a los temas de implantación de sistemas de calidad en los laboratorios de ensayo, hace que sea necesario realizar la validación de los métodos de ensayo que se llevan a cabo en un laboratorio y concretamente en este estudio se realizará la validación del método de determinación de AOX.

La validación de un método establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos²⁾.

En este estudio preliminar, se evaluarán las siguientes características técnicas, selectividad y especificidad, intervalo de trabajo, linealidad, sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud.

* Sonia Ruiz Gómez, Ing. Técnica Química. Becaria del Laboratorio de Toxicología Ambiental, INTEXTER (U.P.C.).

** Dra. en Ciencias Matemáticas, Eulalia Griful Ponsati. Departamento de Estadística e Investigación Operativa de la UPC.

*** David López Ribas, Lic. en Ciencias Biológicas. Estudiante de Doctorado, Lab. Toxicología Ambiental, INTEXTER (U.P.C.).

**** Dra. en Ciencias Biológicas, M^o Carmen Riva Juan. Investigadora de la Universidad Politécnica de Catalunya. Jefa del Laboratorio de Toxicología Ambiental del INTEXTER (U.P.C.).

Se debe aclarar que en ningún momento se evaluará la robustez del método, ya que este tema se tratará en un estudio posterior.

2. PRINCIPIO DEL METODO

El método se basa en la determinación de AOX en muestras de agua acidificada con ácido nítrico. Mediante la adición de nitrato sódico a la muestra y tratamiento del carbón activado tras la fase de adsorción con una solución de nitrato sódico exento de haluros, los compuestos halogenados inorgánicos son desplazados del carbón⁽⁴⁾.

A continuación, el carbón activado cargado es quemado con corriente de oxígeno, con lo que los halógenos de compuestos orgánicos se convierten en haluros de hidrógeno. Estos son transportados a la celda de valoración donde se cuantificarán por microcoulombimetría⁽⁴⁾. La señal obtenida se deberá transformar en unidades de concentración mediante la siguiente fórmula:

$$[] = \frac{\hat{Y} \cdot M}{V \cdot F} \cdot D$$

donde :

[] = Concentración de AOX presente en la muestra (g/l).

\hat{Y} = Valor obtenido en la determinación de AOX en cada una de las muestras, expresado en mC.

M = Masa molecular del Cl (35,45 g/l).

V = Volumen de muestra (l).

F = Constante de Faraday (96487 C/mol).

D = Factor de Dilución. En los casos estudiados D=1 ya que no se realizan diluciones.

3. PROTOCOLO DE VALIDACION

Para realizar la validación del método de determinación de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX) en aguas, se analizan, utilizando como procedimiento analítico el descrito en la norma DIN 38409-H14/ISO 9562, cinco concentraciones conocidas de solución patrón de p-clorofenol que varían dentro del rango contemplado por el método (50, 100, 150, 200 y 250 ppb), más un blanco, realizándose 5 repeticiones de cada una de ellas. Los resultados obtenidos han sido los siguientes:

TABLA 1

Resultados obtenidos en la determinación de AOX según norma DIN 38409-H14/ISO 9562.

Concentración ppb (X)	Respuesta (Y)				
0	5,639	5,821	6,344	6,289	5,125
50	19,611	20,162	19,363	19,522	19,552
100	32,652	32,163	32,839	34,092	32,214
150	47,196	47,907	48,373	46,977	47,872
200	59,816	59,187	59,616	60,961	58,985
250	75,808	74,062	74,211	75,396	73,783

4. SELECTIVIDAD O ESPECIFICIDAD

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para medir exactamente un analito en presencia de interferencias que se puede suponer que estarán presentes en la matriz de la muestra⁽⁷⁾.

El método de determinación de los halógenos de compuestos orgánicos adsorbibles en carbón activo es adecuado para aquellas aguas con un valor de AOX por encima de 10 µg/l de los halógenos enlazados orgánicamente cloro, bromo y parcialmente yodo (calculado como cloro). El contenido de carbono orgánico disuelto debe ser menor que 10 mg/l y la concentración de cloro inorgánico menor a 1 g/l⁽⁴⁾.

5. INTERVALO DE TRABAJO E INTERVALO LINEAL

El intervalo de trabajo contemplado por el método, según las especificaciones analíticas del instrumento de medida (Analizador de Haluros y Sulfuros) se encuentra entre 10-1000 µg/l⁽⁵⁾.

6. LINEALIDAD

Se entiende como linealidad la capacidad de un método analítico de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo determinado⁽³⁾.

6.1. Recta de Regresión

Una vez obtenidos los resultados, estos se representan gráficamente en el llamado gráfico de calibración, donde se representa:

Eje X: Concentraciones de AOX (ppb)
Eje Y: Respuesta del instrumento (mC)

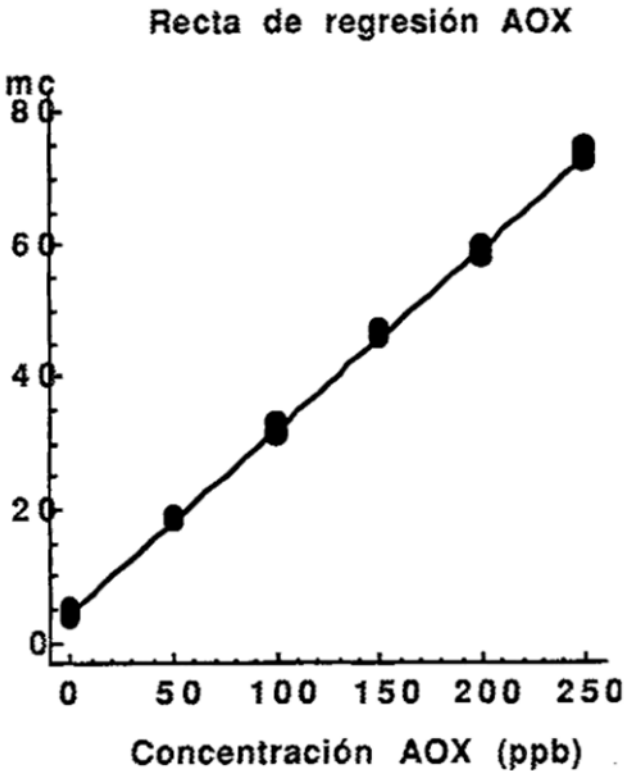


FIGURA 1: Gráfico de Calibración de los resultados obtenidos.

$$r = 0,999$$

$$\text{Recta de Regresión: } \hat{Y} = 0,273x + 5,828$$

En el Anexo 1 se ha realizado el análisis de residuos para verificar las hipótesis de normalidad y homocedasticidad del modelo lineal.

6.2. Errores y límite de confianza³⁾

La recta de regresión calculada anteriormente está sujeta a errores aleatorios en los valores de la pendiente ($\hat{b} \pm tS_{\hat{b}}$) de la ordenada en el origen ($\hat{a} \pm tS_{\hat{a}}$) donde $t_{(28;0,025)} = 2,048$ para un nivel de confianza $1-\alpha=0,95$ y $(n-2)$ grados de libertad.

$$\hat{a} \pm tS_{\hat{a}} = 5,828 \pm 0,547$$

$$\hat{b} \pm tS_{\hat{b}} = 0,273 \pm 0,0036$$

De forma similar puede evaluarse la imprecisión de la concentración determinada a partir de la recta de regresión mediante la expresión $X_0 \pm 2S_{X_0}$ (ver anexo 2) para cada valor X_0 de concentración correspondiente a cualquier valor Y_0 medido.

A continuación y a modo de ejemplo se exponen los resultados obtenidos en los puntos extremos de la recta (0, 250 ppb) y el punto medio (125 ppb).

TABLA 2

Evaluación de la imprecisión de la recta de regresión para un valor X_0 de la concentración

Concentración (X_0), ppb	$\pm 2S_{X_0}$ (ppb)
0	$\pm 6,342$
125	$\pm 6,133$
250	$\pm 6,342$

7. SENSIBILIDAD

La sensibilidad es la diferencia en la concentración de analito que corresponde a la diferencia más pequeña en la respuesta del método que puede detectarse⁷⁾, e indica la capacidad de respuesta del método analítico a pequeñas variaciones en la concentración del analito. Se calcula a partir de la pendiente de la línea de calibración, por tanto:

TABLA 3

Sensibilidad \pm L. de Confianza 95%

Ecuación	Resultado
$\hat{b} \pm tS_{\hat{b}}$	$0,27379 \pm 0,003617$

8. LIMITE DE DETECCION

El límite de detección es la concentración más baja de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, con razonable certeza por un procedimiento analítico dado⁽³⁾ y corresponde a una señal (Y_{LD}) igual a la señal media del blanco (\bar{Y}_b) más 3 veces la desviación estándar del blanco (S_b), por tanto:

$$Y_{LD} = \bar{Y}_b + 3S_b$$

TABLA 4
Límite de detección (C_{LD})

Ecuación	Resultado (ppb)
$C_{LD} = \frac{3 S_b}{b}$	9,050

9. LIMITE DE CUANTIFICACION

El límite de cuantificación es la concentración mínima (C_{LC}) de analito que puede determinarse con un nivel de aceptable exactitud y precisión³⁾ y corresponde a una señal (Y_{LC}) igual a la señal media (\bar{Y}_b) del blanco más 10 veces la desviación estándar del blanco (S_b), por tanto:

$$Y_{LC} = \bar{Y}_b + 10 S_b$$

TABLA 5
Límite de cuantificación (C_{LC})

Ecuación	Resultado (ppb)
$C_{LC} = \frac{10 S_b}{b}$	30,167

10. SESGO E IMPRECISION

Para evaluar la exactitud de un proceso de medida se utilizan dos parámetros el sesgo y la imprecisión.

10.1. Sesgo

El sesgo es una medida del error sistemático. Se define como la diferencia entre la media de repeticiones obtenidas en condiciones de repetibilidad y el valor de la concentración conocida⁷⁾.

En la Tabla 7 calculamos para cada concentración conocida el sesgo y la recuperación.

10.2. Imprecisión

La imprecisión es una medida del grado de concordancia entre los análisis múltiples de una muestra dada. Se evalúa mediante análisis de réplicas, análisis repetidos de un estándar estable o análisis de adiciones conocidas sobre las muestras. Se especifica por la desviación estándar de los resultados. En esta valoración se incluyen los errores aleatorios implicados en la toma de muestras, así como los errores en la preparación y análisis de las muestras⁷⁾. La fórmula utilizada para el cálculo de la imprecisión es $\pm 2S_{x_{(1/m)}}$. Los resultados obtenidos en este estudio han sido:

TABLA 6
Determinación de la imprecisión

Concentración ± Exp.(ppb) ^(a)	$2S_{x_{(1/m)}}$
0,058 ±	3,330
50,456 ±	3,069
98,486 ±	2,934
152,809 ±	2,936
196,814 ±	3,058
251,378 ±	3,339

^(a)Calculado a partir de la ecuación de la recta.

TABLA 7
Determinación del sesgo y la recuperación

Concentración Teórica (ppb)	\bar{Y} (mC)	Concentración Exp. (ppb) ^(a)	Sesgo	Recuperación (%)
50	19,642	50,456	0,456	100,912
100	32,792	98,486	1,514	98,486
150	47,665	152,809	2,809	101,873
200	59,713	196,814	3,186	98,407
250	74,652	251,378	1,378	100,551

^(a)Calculado a partir de la ecuación de la recta

11. DISCUSION

A partir de este estudio se pretende dar una pauta para realizar los cálculos de la validación del método de determinación de compuestos orgánicos halogenados adsorbibles (AOX).

Para realizar el análisis de las muestras de concentración conocida se ha procedido según la norma DIN 38409-H14/ISO 9562 y se ha utilizado la guía metódica de ENAC (Guía para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos químicos. G-CSQ-01- Rev1.Abril 94) para definir los parámetros

que caracterizan la validación de un método de ensayo.

Para realizar la evaluación de la exactitud en la concentración de una muestra ordinaria, se debería repetir el estudio de la imprecisión y el sesgo, ya que los resultados pueden variar ligeramente debido a que el instrumento de medida (Analizador de Haluros y Sulfuros) utiliza su propia fórmula para determinar dichas concentraciones (ecuación apartado 2).

Al valor de la concentración de la muestra⁽⁶⁾ (calculada según la ecuación del apartado 2) (\bar{C}_m) se le debe restar el valor de la concentración obtenida en el blanco (\bar{C}_b) ("m" y "b" son el número de repeticiones realizadas respectivamente) de forma

que:

$$\bar{C}_s = \bar{C}_m - \bar{C}_b$$

Para evaluar la imprecisión de la medida se utiliza la expresión de la desviación estándar:

$$S_s = \pm \sqrt{s_m^2/m + s_b^2/b}$$

En el caso de la evaluación de la exactitud se debe calcular el sesgo y la recuperación de cada una de las muestras analizadas.

A modo de ejemplo calcularemos la imprecisión, sesgo y recuperación de las muestras de concentración conocida utilizadas en este estudio.

TABLA 8
Determinación de la incertidumbre y exactitud (sesgo y recuperación)

Concentración Teórica (ppb)	Concentración Exp. ^(b) (\bar{C}_s), ppb	$\pm 2s_s$	Sesgo	Recuperación (%)
50	50,696	$\pm 1,929$	0,696	101,392
100	99,010	$\pm 3,051$	0,990	99,010
150	153,654	$\pm 2,493$	3,654	102,436
200	197,920	$\pm 3,025$	2,080	98,960
250	252,806	$\pm 3,418$	2,806	101,122

^(b)Calculado a partir de la ecuación del apartado 2.

12. CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado se han obtenido los siguientes resultados:

-El valor del coeficiente de regresión de la recta ($r=0,999$) lo cual nos indica que el método de análisis es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

-El valor obtenido para el límite de detección del método (9,050 ppb) es el esperado ya que según las especificaciones analíticas del instrumento de medida (Analizador de Haluros y Sulfuros) éste debe ser aproximadamente 10 ppb.

-La exactitud del método se encuentra dentro de los límites aceptables expresados en la norma DIN 38409-H14/ISO 9562.

13. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la CICYT el apoyo financiero a través del proyecto AMB95-0408.

14. BIBLIOGRAFIA

1. Miller, James N. , " Basic Statistical Methods for Analytical Chemistry.Part 2. Calibration and

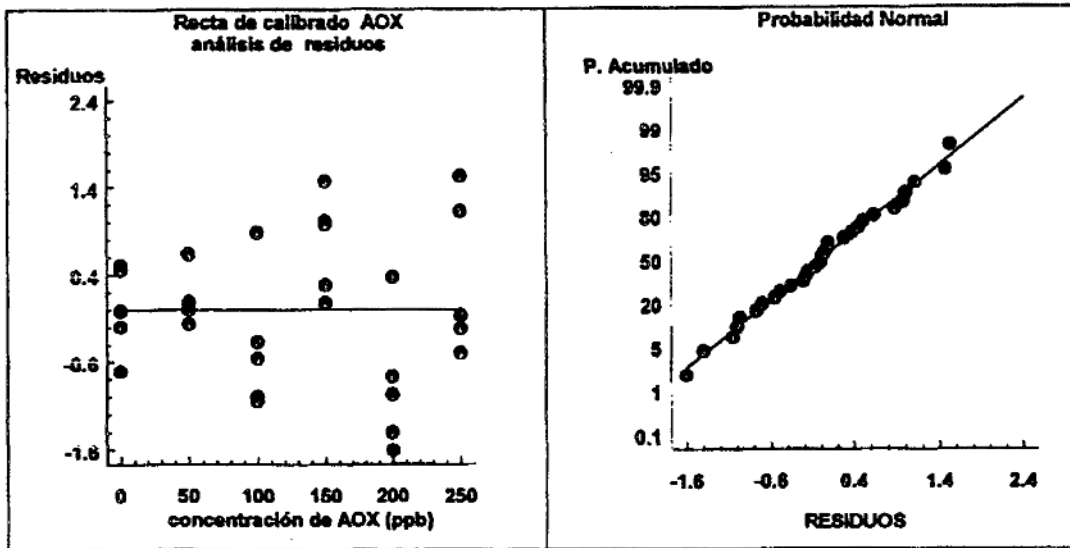
- Regression Methods" . Analyst, . Vol 116. Page:3-14, January (1991).
2. Guía para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos químicos. G-CSQ-01. Rev1. Abril 94.
 3. Miller, J.C. y Miller, J.N."Estadística para Química Analítica". Addison-Wesley Iberoamerican, S.A. (1993).
 4. DIN 38409-H14 "Determinación de halógenos de compuestos orgánicos adsorbibles (AOX)".
 5. Euroglas, Analytical Instruments "ECS 2000 Organic Halogen and Sulfur Analyser".
 6. Taylor, J.K. "Quality Assurance of Chemical Measurements". De. Lewis Publishers. (1986).
 7. "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" 19th Edition 1995, published by: American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Environment Federation (WEF) .
 8. ISO 9562: "Calidad del agua. Determinación de halógenos de compuestos orgánicos adsorbibles (AOX)".

Trabajo presentado en: 1996.12.02.

Aceptado en: 1996.12.09.

ANEXO 1

Análisis de residuos. Validación de la recta de regresión:



$$\hat{y} = \hat{a} + \hat{b}x + \varepsilon \text{ donde } \varepsilon \sim N(0, \sigma^2)$$

ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA REGRESIÓN

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1,000	16397,403	16397,403	24037,127	0,000
Residuos	28,000	19,101	0,682		
Total	29,000	16416,504			

	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Probabilidad
O.en el Origen (a)	5,828	0,267	21,800	0,000
Pendiente (b)	0,274	0,002	155,039	0,000

ANEXO 2

	Ecuación	Resultado
Coef. de Correlación (r)	$r = \frac{\sum \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\left\{ \left[\sum (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$	0,99942
Pendiente (b)	$\hat{b} = \frac{\sum \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sum (x_i - \bar{x})^2}$	0,27379
Ord. en el Origen (a)	$\hat{a} = \bar{y} - \hat{b}\bar{x}$	5,82784
Desviación estándar de la lectura instrumental ($S_{x/y}$)	$S_{x/y} = \left\{ \frac{\sum (\bar{y}_i - \hat{a} - \hat{b}x_i)^2}{n-2} \right\}^{1/2}$ n-2 grados de libertad	0,82594
Desviación estándar de la ord. en el origen (a)	$S_{\hat{a}} = S_{x/y} \left\{ \frac{\sum x_i^2}{n \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$	0,26733
Desviación estándar de la pendiente (b)	$S_{\hat{b}} = \frac{S_{x/y}}{\left\{ \sum (x_i - \bar{x})^2 \right\}^{1/2}}$	0,00177
Desviación estándar de X_0	$S_{x_0} = \frac{S_{x/y}}{b} \left\{ 1 + 1/n + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$	
Desviación estándar de X_0 para m repeticiones	$S_{x_0(m)} = \frac{S_{x/y}}{b} \left\{ 1/m + 1/n + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2} \right\}^{1/2}$	