

DISMINUCIÓN DEL LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN DE ALGUNOS ENSAYOS FÍSICO-QUÍMICOS DEL AGUA EN EL LABORATORIO DE ESTUDIOS AMBIENTALES DEL CEAC

Lic. Dismey Sosa Rodríguez



dismey@ceac.cu

Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC), Cienfuegos, Cuba

● Resumen

Este estudio está dirigido a la validación parcial de ensayos fisicoquímicos en agua por espectrofotometría ultravioleta visible (UV). Dicha validación se realizó usando cubetas de 5 cm de espesor y un espectrofotómetro Génesys 10 UV. Los parámetros de validación determinados fueron linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, límite cuantificación, incertidumbre e incertidumbre expandida, expuesto en la Norma Cubana (NC TS-368:2004 *Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos*). Todos los parámetros de validación evaluados cumplieron con los requisitos normados, lo que garantiza una mayor confiabilidad en el trabajo analítico del laboratorio. También se logró disminuir el límite de cuantificación para todos los ensayos validados, lo cual permite determinar concentraciones de interés para investigaciones ecológicas. Elevados límites de cuantificación de ensayos para la determinación de nitrito, nitrato, ortofosfato y cromo hexavalente han impedido la cuantificación de estas especies químicas en cuerpos de agua como la bahía de Cienfuegos y algunos embalses de la provincia. Este trabajo pretende validar estos ensayos para poder disminuir los límites de cuantificación, y entregar una información que facilite la interpretación ecológica de los resultados de los ensayos realizados.

Palabras clave: validación, agua, límites de cuantificación, espectrofotometría.

● Abstract

This study is aimed at the partial validation of physicochemical tests in water for visible ultraviolet spectrophotometry (UV). This validation was performed using cuvettes of 5 cm thick and a Genesys 10 UV spectrophotometer. Validation parameters determined were linearity, repeatability, reproducibility, accuracy, quantification limit, uncertainty and expanded uncertainty, as outlined in the International Standard (TS-368 CN: 2004 *Guide for the validation of test methods for food chemicals*). All validation parameters tested met the requirements regulated, ensuring greater reliability in laboratory analytical work. Also able to reduce the limit of quantification for all validated assays, which allows to determine concentrations of interest for ecological research. High limits of quantification assays for the determination of nitrite, nitrate, orthophosphate and hexavalent chromium have prevented the quantification of chemical species in water bodies such as the Bay of Cienfuegos and some reservoirs in the province. This work aims to validate these tests in order to lower the limits of quantification, and deliver information to facilitate the ecological interpretation of the results of the tests.

Keywords: validation, water, limits of quantification, spectrophotometry.

Materiales y métodos

Para la validación de los métodos de ensayo se prepararon soluciones patrones trazables. Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro Génesys 10UV con cubetas de 5 cm de espesor. Los métodos que se describen se realizaron según el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).

Nitrito: El método para la determinación del ión NO_2^- se basa en la formación de un compuesto diazo altamente coloreado del ión nitrito con la sulfanilamida y el dicloruro de N-(1-naftil)-etilendiamina, el cual se mide en un espectrofotómetro a 543nm. Se preparó una solución patrón de trabajo (1 mg de $\text{N-NO}_2^-/\text{L}$): Se toman 3,3 mL de la solución de referencia de nitrito de concentración 304,35 mg/L de N-NO_2^- y se diluye a 1 000 mL con agua destilada a partir de esta solución madre se preparan patrones en el rango de concentraciones desde 0,001 5 hasta 0,08 mg/L, reportado en la norma.

Nitrato: El método se basa en el empleo de sulfato de hidracina como reductor de nitratos a nitrito (en un medio alcalino en presencia de trazas de cobre como catalizador de la reducción) y determinación del nitrito mediante la clásica reacción de Greiss. Se preparó una solución patrón de trabajo (7mg de $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$): Se toman 3,1 mL de la solución de referencia de nitrato de concentración $1\ 003 \pm 5$ mg/L de N-NO_3^- y se diluye a 1 000 mL con agua destilada. A partir de esta solución se prepararon patrones en el rango de concentraciones desde 0,005 hasta 0,140 mg/L, reportados en la norma.

Ortofosfato: El ortofosfato presente en la muestra reacciona con molibdato de amonio y tartrato de antimonio y potasio para formar un complejo. Este complejo es reducido por el ácido ascórbico para formar un complejo altamente coloreado de azul. Se preparó una solución patrón de trabajo (2,5 mg de $\text{P-PO}_4^{3-}/\text{L}$): Se toman 7,7 mL de la solución de referencia de fósforo de concentración 326,15 mg/L de P-PO_4^{3-} y se diluye a 1 000 mL con agua destilada. A partir de esta solución de trabajo se prepararon patrones en el rango de concentraciones desde 0,005 hasta 0,5 mg/L, reportados en la norma.

Cromo hexavalente: El cromo hexavalente reacciona en medio ligeramente ácido con la 1,5 difenilcarbazida formando un compuesto soluble de color rojizo-púrpura, el cual es susceptible a una medición espectrofotométrica a 540 nm. Se preparó una solución patrón de trabajo a partir de una solución de dicromato de potasio (0,05 mg de Cr^{+6}/mL) de aquí se toman 20 mL en 1 L de agua destilada para dar una concentración patrón de Cr^{+6} de (0,01mg de Cr^{+6}/mL). A partir de esta solución se prepararon patrones en el rango de concentraciones desde 0,005 hasta 0,5 mg/L en dos rectas diferentes.

Las pesadas se realizaron en una balanza analítica Sartorius ($\pm 0,1$ de precisión) y la absorbancia se midió con un espectrofotómetro con cubetas de 5 cm de espesor Génesys 10 UV.

Los parámetros de validación determinados fueron linealidad, repetibilidad, reproducibilidad, exactitud, límite cuantificación, incertidumbre e incertidumbre expandida, expuesto en la Norma Cubana (NC TS-368:2004 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos).

Linealidad: El estudio de linealidad fue realizado sobre el rango de concentraciones descritas anteriormente para cada uno de los analitos. Se realizó la recta de regresión con la cual se completó el estudio de linealidad.

Repetibilidad: En el estudio de repetibilidad se analizaron 10 réplicas de solución patrón de nitrito, nitrato, ortofosfato y cromo hexavalente de concentraciones 0,02 mg/L, 0,042 mg/L, 0,2 mg/L y para un rango bajo de concentración 0,025 mg/L y para un rango alto de concentración 0,200 mg/L respectivamente se realizaron por el mismo analista, en las mismas condiciones del laboratorio y con los mismos reactivos.

Reproducibilidad: En el presente estudio participaron 2 analistas, el analista 1 ensayó 5 réplicas de solución patrón de nitrito, nitrato, ortofosfato y cromo hexavalente de concentraciones 0,02mg/L, 0,042 mg/L, 0,2 mg/L, para un rango bajo de concentración 0,025 mg/L y para un rango alto de concentración 0,200 mg/L respectivamente en una jornada de trabajo, y el analista 2 ensayó 5 réplicas de

la misma solución en otra jornada de trabajo, en las mismas condiciones del laboratorio con los mismos reactivos y en el mismo equipo.

Exactitud: Para el estudio de exactitud se utilizó una solución patrón de nitrito, nitrato, ortofosfato y cromo hexavalente de concentración conocida y se realizó 5 replicas por cada analito.

Límite de cuantificación: Las determinaciones de estos valores se realizaron utilizando 10 blancos reactivos y calculando 10 veces su SD/pendiente de la recta

● Resultados

En la figuras 1-3 se presentan las rectas de regresión donde los coeficientes de correlación lineal para todos estos ensayos son altos y están entre 0,095-0,098 %, lo cual significa que la linealidad de la recta es satisfactoria.

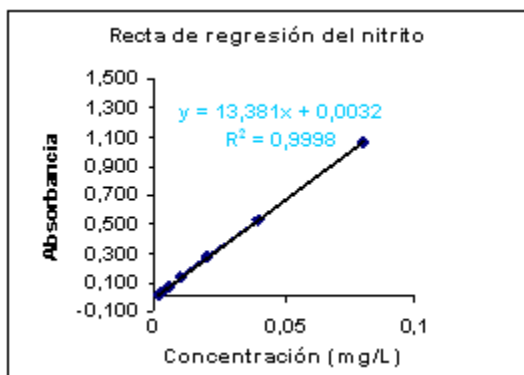


Fig. 1 Curva de calibración del nitrito.

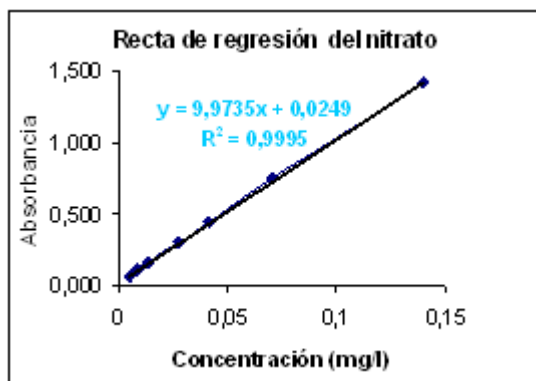


Fig. 2 Curva de calibración del nitrato.

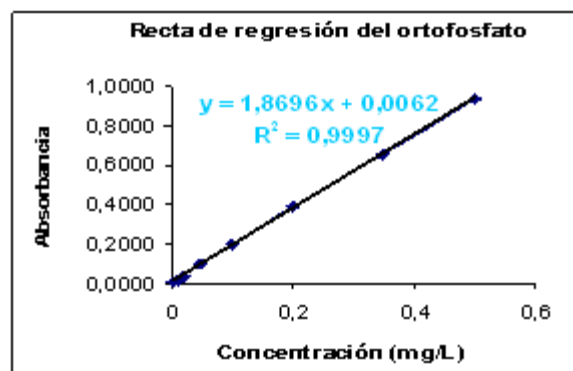


Fig. 3 Curva de calibración del ortofosfato.

En la tabla 1 se muestran los valores de los diferentes parámetros para cada analito dando un CV % para la linealidad entre 4,70-4,92% dando por debajo del 5% establecido lo cual indica que en todos los casos el método es lineal, el CV % de la repetibilidad y el de la reproducibilidad están entre (0,49-1,75 %) y (0,71-1,75 %) respectivamente dando por debajo del 3 % y el 5 % establecido, lo que significa que los métodos son repetibles y reproducibles bajo estas condiciones de validación.

La veracidad en todos los casos estuvo en el rango establecido < 5 % dando entre (0,27-0,94 %) demostrando la buena exactitud de los métodos descritos. Los límites de cuantificación para todos los métodos bajaron en comparación con los existentes, ayudando así la determinación de concentraciones pequeñas de dichos analitos en diferentes cuerpos de agua.

La disminución del L.C en especies nitrogenadas puede favorecer la cuantificación de nitrógeno en ecosistemas que presentan bajos valores de los mismos. Ejemplo la bahía de Cienfuegos.

Para realizar estudios ecológicos es necesario poder determinar concentraciones más bajas de $P-PO_4^{2-}$ que las calculadas según el LC usando anteriormente. Por ejemplo según la OECD (1982) cuando la clasificación trópica de un cuerpo de agua es la mesotrófica los valores de fósforo se ubican en el rango 10-35 $\mu g/L$. Como se observa el limite inferior de este intervalo es menor que el LC anterior, lo cual dificultaba la determinación del estado trófico de los cuerpos de agua cuando las concentraciones de fósforo eran bajas.

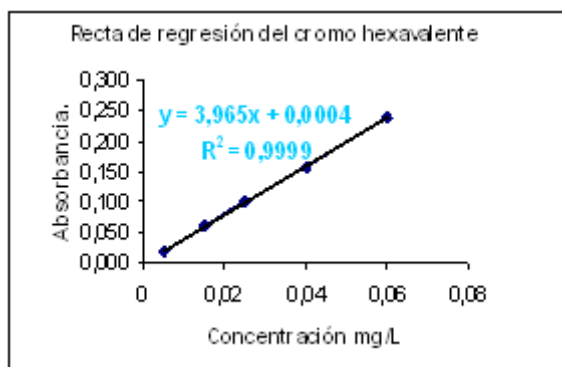
TABLA 1. DATOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DE NITRITO, NITRATO Y ORTOFOSFATO

Analito	Lineal. < 5 %	Repetib. < 3 %	Reprod. < 5 %	Veracid. < 5 %	L.C N	L.C v	Incert.	Incertid Exp.
N-NO ₂ ⁻	4,92	1,75	2,37	0,94	0,000 2	0,001	0,048 82	K= 2,57 0,14926
N-NO ₃ ⁻	4,93	0,49	0,71	0,70	0,001 7	0,040	0,050 42	K= 2,57 0,12959
P-PO ₄ ²⁻	4,70	0,68	1,12	0,27	0,004 4	0,016	0,048 82	K= 2,45 0,11961

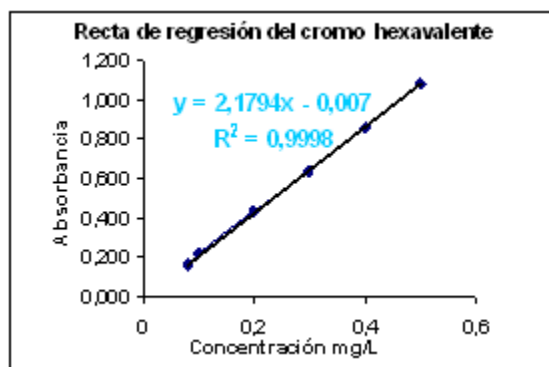
● Cromo hexavalente

Inicialmente se comenzó la validación del método siguiendo el procedimiento propuesto por el LEA, al realizar la curva de calibración con dichos datos el parámetro de la linealidad fue evaluado pero no cumplía con lo normado dando un valor de 15,85 > 5 %.

Fue necesario buscar una solución para que el método no incumpliera con la norma, para lo cual se hizo una recta de regresión en un intervalo bajo de concentraciones (0,005-0,06 mg/L) y otra en un intervalo más alto (0,08-0,5mg/L) con cubetas de 5 y 3 cm de espesor respectivamente. En la figura 4 se muestra las rectas de regresión obtenidas.



a) A bajas concentraciones



b) A altas concentraciones.

Fig. 4 Curvas de calibración del cromo hexavalente.

En la tabla 2 y 3 se presentan los resultados de los parámetros de validación del cromo hexavalente dando una linealidad en ambos casos menor que el 5 % establecido, la repetibilidad, reproducibilidad y exactitud también dieron menor del 3 %, 5 %, y 5 % respectivamente.

En la figura 5 se expone la comparación realizada entre los límites de cuantificación existentes y los nuevos calculados, donde se muestra que para el nitrito el límite de cuantificación fue 5 veces menor que el existente, 24 veces para el nitrato, 4 veces para el ortofosfato y 2 veces para el cromo hexavalente.

TABLA 2. DATOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL CROMO HEXAVALENTE PARA BAJAS CONCENTRACIONES

Cubetas de 5 cm	Linealid. < 5 %	Repetib. < 3 %	Reprod. < 5 %	Veracidad. < 5 %	L.C	Invertid.	Invertid. Exp.
	0,87	0,98	1,90	2,04	0,001 2	0,030 54	K= 3,18 0,097 11

TABLA 3. DATOS DE LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN DEL CROMO HEXAVALENTE PARA CONCENTRACIONES ALTAS

Cubetas de 3 cm	Linealidad < 5 %	Repetibilidad < 3 %	Reproducción < 5 %	Veracidad < 5 %	Invertid.	Invertid. Exp.
	2,15	1,44	1,60	1,03	0,031 51	$K= 2,78$ 0,087 60

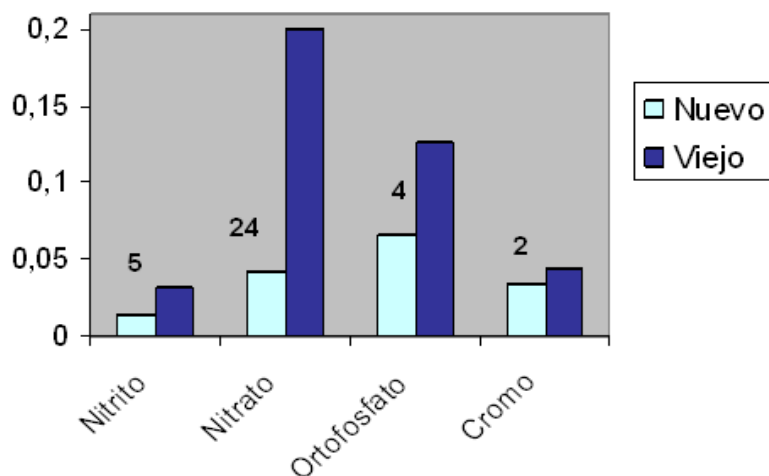


Fig. 5 Comparación entre los límites de cuantificación existentes y los nuevos calculados.



Conclusiones

El proceso de validación de los ensayos de nitrito, nitrato, ortofosfato y cromo hexavalente cumplió con los parámetros establecidos en la Norma Cubana (NC TS-368:2004 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos) y permitió la disminución de los límites de cuantificación de los ensayos validados.



Bibliografía

- Manual de instrucciones y procedimientos del Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC). *Procedimiento para la validación de ensayos L-SA-004*.
- NORMA CUBANA. 2004 NC TS-368:2004 Guía para la validación de métodos de ensayo químicos para alimentos. Oficina Nacional de Normalización. República de Cuba.
- OECD. 1982. *Eutrophication of Waters. Monitoring, Assessment and Control*.
- Organisation for Economic Co-Operation and Development, Paris, 154 pp.
- APHA-AWWA-WPCF. 1998. *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*. 20th ed. Washington, DC. 22648 pp.