



TÍTULO: ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

CÓDIGO: TP0131

VERSIÓN: 02

FECHA ÚLTIMA REVISIÓN:

COPIA N°: _____

ELABORADO POR: _____
GUSTAVO ALFONSO COY
LIDER AFQ

REVISADO POR _____
ROCIO DEL PILAR BOJACA B.
QUIMICA

APROBADO POR: _____
MARTA ELENA DUQUE SOLANO
COORDINADORA PFQA

* Este documento debe ser revisado por lo menos cada **dos** años.



PROCEDIMIENTO PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

1. INTRODUCCIÓN

La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el método, la matriz, el analito, la cantidad de parámetros de estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo mas o menos considerable (en algunos casos puede superar los seis meses).

En el presente documento se presenta un procedimiento de estandarización que se puede considerar como abreviado pero que incluye los parámetros fundamentales para que un método analítico una vez montado pueda empezar a reportar datos con adecuado y comprobable grado de confianza. El método así estandarizado debe ser sometido a un seguimiento sistemático por medio de “cartas o gráficas de control de calidad” y con ensayos particularmente diseñados con el propósito de ajustar los puntos débiles o los que no han quedado cubiertos en ésta estandarización. Con el procedimiento propuesto la precisión se da en términos de repetibilidad y una vez logrado éste objetivo, se puede desarrollar lo concerniente a la reproducibilidad entre analistas y luego entre laboratorios.

2. OBJETIVO

Mediante la aplicación del protocolo de estandarización se desea obtener en forma experimental y para las condiciones particulares del Laboratorio, los valores de los parámetros que servirán como criterios de confianza del método analítico; estos parámetros son: exactitud, precisión, linealidad, límite de detección, sensibilidad, y porcentaje de recuperación.

Se espera además obtener información o complementar la existente en lo relacionado con: Interferencias, limitaciones, tiempo de vida útil de la muestra para el analito de interés, tiempo de análisis y costo del análisis.

3. DEFINICIONES

3.1 EXACTITUD (VERACIDAD)

Proximidad entre el valor medio obtenido de un conjunto de resultados y el valor de referencia aceptado; normalmente se expresa en términos de error. Se tendrán como referencia los PATRONES preparados en el laboratorio, y por lo menos un patrón externo CERTIFICADO. La concentración de estos patrones deberá estar localizada dentro del rango de aplicación del método. La exactitud expresada como el porcentaje de error, se calcula por:



$$\% \text{ Error} = \frac{X_{\text{exp}} - X_{\text{real}}}{X_{\text{real}}} \times 100$$

3.2 PRECISIÓN

Indica el grado de concordancia entre los resultados obtenidos para réplicas de una misma muestra, aplicando el mismo procedimiento experimental bajo condiciones prefijadas. Usualmente se expresa en términos de la DESVIACIÓN ESTÁNDAR (s). Otra forma de expresar la precisión es la Desviación Estándar Relativa o COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV), que se calcula:

$$CV = \frac{s \times 100}{\bar{x}}$$

3.3 REPETIBILIDAD

Es una medida de la precisión de datos obtenidos por un solo operador trabajando siempre en las mismas condiciones (equipos, materiales y reactivos).

3.4 REPRODUCIBILIDAD

Es una medida de la precisión de los datos obtenidos entre dos o más analistas y/o laboratorios que utilizan el mismo método y similares condiciones.

3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN

La mayoría de criterios coinciden en que el límite de detección se define a partir de la más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación; este último se establece de modo que las probabilidades de que se presenten errores de tipo I (falso positivo) y II (falso negativo) sean razonablemente pequeñas. La práctica común identifica varios límites de detección, cada uno con un propósito definido, pero para fines prácticos se tomará el LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO (LDM), como la concentración mínima que puede ser medida con una exactitud y una precisión aceptables, definidas como criterio de calidad para el laboratorio del IDEAM en el documento "Lineamientos de calidad analítica", TP0100.

3.5.1. Límite de detección instrumental (LDI)

Concentración de analito que produce una señal superior a cinco veces la relación señal/ruido del instrumento; se ha establecido en 1,645 veces el valor s de los análisis de blancos. Resulta muy útil para valorar la concentración de analito o la cantidad de un extracto necesaria para producir una señal que permita calcular un LDM estimado.

3.5.2 Límite de detección del método (LDM):

Concentración de analito que, cuando se procesa a través del método completo, produce una señal con una probabilidad del 99% de ser diferente del blanco. Para siete réplicas de la muestra, la media debe ser 3,14s veces superior al



blanco, donde s es la desviación estándar de siete muestras. Para determinar el LDM se añade el analito al agua grado reactivo o a la matriz de interés para obtener una concentración (C_{Eb}) próxima al LDM estimado.

3.6 LINEALIDAD

Se refiere a la proporcionalidad entre la concentración y la señal producida por el instrumento y se debe verificar si en el laboratorio se cumple el intervalo y tipo de linealidad que reporta la literatura del método.

3.7 SENSIBILIDAD

Es una medida del factor de respuesta del instrumento como una función de la concentración. Normalmente se mide como la pendiente de la curva de calibración. Como valor se puede reportar el promedio para las curvas obtenidas en los ensayos de estandarización y en la medición de muestras, indicando su desviación estándar.

3.8 RECUPERACIÓN

Es la capacidad que tiene un procedimiento analítico para determinar cuantitativamente una especie química que ha sido adicionada a una muestra. Se expresa como Porcentaje

3.9 BLANCO DE LABORATORIO O BLANCO DE MÉTODO (BK)

Es un sistema físico que no contiene muestra real y por consiguiente no debería contener el analito de interés, pero que debe contener todos los reactivos que se utilizan en el método de análisis, y ser sometido a las mismas condiciones y al mismo procedimiento que las muestras reales y los estándares. En lugar de muestra, el volumen faltante se completará con agua grado reactivo que deberá tener la calidad recomendada por el método respectivo.

3.10 MUESTRA (M)

Para este propósito, el término se refiere a cada sistema físico que sea sometido al procedimiento de análisis siguiendo el método que se está estandarizando, ya sea un Blanco, un Estándar, una Muestra Adicionada, o una Muestra Real propiamente dicha.

3.11 MUESTRA ADICIONADA(MA)

Es una muestra natural o real a la cual se le ha adicionado una cantidad conocida del analito que se estudia. Esta adición debe hacerse en la forma prevista en el diseño de las condiciones de estandarización para que sea reproducible.

3.12 ESTANDARIZACIÓN



Confirmación mediante examen y provisión de evidencias objetivas que demuestran que un método analítico cumple los requisitos particulares para un uso específico, en el laboratorio. Sirve para demostrar que los procedimientos realizados son adecuados para el fin propuesto. Se estandariza el sistema analítico y el método.

3.13 INTERVALO LINEAL

Intervalo de concentración de analito sobre el cual el método produce resultados proporcionales a la misma.

3.14 INTERVALO DE TRABAJO O DE LETURA DIRECTA

Intervalo de concentración donde actúa el método en cuestión, sin ninguna dilución. Debe estar incluido en el rango lineal.

3.15 INTERVALO DE APLICACIÓN DEL MÉTODO

Intervalo de concentración para el método incluyendo la mayor dilución permitida para una muestra. En general se acepta hasta una dilución de cien veces, a menos de que el método no lo permita.

4. ETAPA PRELIMINAR A LA ESTANDARIZACION

La etapa preliminar es parte integrante y pre-requisito de la estandarización; consiste en una serie de pasos que permiten obtener información relevante y orientar el proceso de la estandarización propiamente dicha.

4.1 DOCUMENTACIÓN Y MONTAJE DE LA METODOLOGÍA

- Selección del método para cada analito y por cada matriz. Debe contener los criterios de selección correspondientes.
- Creación de un archivo físico (carpeta) para toda la documentación generada en el proceso. La carpeta debe radicarse en el archivo técnico y estar disponible para su consulta permanente.
- Tener y conocer el protocolo del método, disponiendo de una copia de trabajo (debe incluir bibliografía).
- Conocimiento del fundamento físico y químico del método y de la técnica a la cual pertenece éste. Se debe elaborar un resumen conciso.
- Conocimiento exacto del funcionamiento del equipo de medición. En lo posible se debe tener el diagrama de flujo para el manejo del equipo o por lo menos los pasos que se deben seguir en orden cronológico para su



adecuada operación desde el encendido hasta el apagado (instructivo del equipo).

- Inventario de los reactivos que se necesitan para toda la estandarización (identificación, precauciones, calidad, cantidad, grado de pureza, conservación del reactivo puro y en solución).
- Inventario de vidriería y otros materiales necesarios, señalando las cantidades necesarias para cada día y requerimientos para su limpieza.
- Establecer los procedimientos para la descontaminación y limpieza del material y para la disposición de los desechos.
- Verifique si los formatos de captura de datos existentes se adaptan a los requerimientos específicos de la metodología, de lo contrario diseñe y presente un formato para su aprobación, al líder de análisis.
- Verificación y optimización de las condiciones y de los parámetros instrumentales, incluyendo curva de calibración.
- Definición del intervalo de aplicación del método, teniendo como criterios:
 - Información de la literatura (protocolo).
 - Interés específico (ambiental).
 - Información del equipo a utilizar.
 - Ensayos preliminares en el Laboratorio.
- Diseñar el plan y un procedimiento detallado para la preparación y análisis de reactivos, estándares, muestras y muestras adicionadas de acuerdo con el tiempo de vida útil de cada uno y la estabilidad del analito. Este plan deberá ser presentado para revisión previa del grupo de fisicoquímica y tiene como objetivo establecer el límite de detección (LDI y LDM), la sensibilidad, la linealidad y demás variables básicas del método.

4.2 PARTE EXPERIMENTAL O DE MEDICIONES (PREVALIDACIÓN)

Antes de iniciar el proceso de estandarización se debe establecer por mediciones programadas:

- Límite de detección instrumental (LDI): Este parámetro se estima con el procesamiento de diez alícuotas de agua destilada. El límite de detección instrumental estimado se obtiene aplicando el factor de 1,645 a la desviación estándar calculada. En los métodos donde no se puede aplicar las mediciones de blancos (Volumetría, electrometría), tomar como base los datos metrológicos del material volumétrico.
- Patrón casi cero: Este se determina aplicando el factor de 5 a la desviación estándar obtenida para los blancos, del ensayo del límite de detección instrumental. Una vez calculado, se prepara el patrón y se realizan ensayos sobre 10 alícuotas diferentes para establecer si este patrón, cumple con los



criterios de coeficiente de variación (CV) y % de Error, menor al 10 %. Si este criterio no se cumple, preparar un patrón de concentración un poco mas alta y realizar nuevamente los ensayos y así sucesivamente hasta lograr los niveles aceptados de precisión y exactitud.

- Intervalo lineal del método: De acuerdo con los criterios para el intervalo de aplicación del método y la determinación del patrón casi cero, se prepara una curva de calibración en un rango amplio y mediante inspección visual y el cálculo del coeficiente de correlación, se establece este intervalo. No aplica para métodos volumétricos y gravimétricos.
- Intervalo de trabajo: Debe estar dentro del rango lineal, este se determina de acuerdo a la matriz de estudio y dentro de él se plantean los patrones, bajo, medio y alto, que se procesarán en la validación.
- Sensibilidad : El valor corresponde a la pendiente de la curva de calibración. No aplica para métodos volumétricos y gravimétricos.
- Observación de variables instrumentales o metodológicas particulares del Laboratorio que puedan afectar el proceso de medición en aquellos aspectos en que no se pueda seguir estrictamente el protocolo.

5. PROCEDIMIENTO DE ESTANDARIZACION (Validación)

5.1 PARTE EXPERIMENTAL O DE MEDICIONES

Antes de iniciar las mediciones, el analista debe garantizar que el método está montado y que el equipo funciona en condiciones óptimas para la lectura de muestras. La parte experimental consiste en el procesamiento de las “muestras” y el registro de los resultados en el formato adecuado para cada técnica y para cada grupo diario de ENSAYOS (Ensayo No 1, Ensayo No 2, ... Ensayo No 7). En total se deben correr un mínimo de 7 ensayos en días diferentes que pueden ser continuos o alternos, con una diferencia máxima de 3 días entre un ensayo y otro (viernes - lunes). En este paso se debe tener en cuenta la estabilidad de parámetro a analizar, disponibilidad de material o equipo y las condiciones específicas del método a validar.

El grupo básico de “muestras” a correr en cada ensayo es:

- BK (Blanco de reactivos y procedimiento)
- E.b (Estándar de concentración baja, que nos permita calcular el LDM)
- E.m (Estándar de concentración media; aprox. El 50% del rango)
- E.a (Estándar de concentración alta; aprox. El 90% del rango)



- M1 (Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración <50% del rango)
- M2 (Muestra natural para ver efectos de la matriz real, concentración >>M1)
- M1A.b (M1 adicionada con un nivel bajo, máximo el 30% del valor de M1)
- M1A.a (M1 adicionada con un nivel alto, mínimo el 50% del valor de M1)
 - Mc (Muestra o estándar certificado). Se sugiere utilizarlo en el último o los dos últimos ensayos.

Este grupo básico de “muestras” se debe correr mínimo por duplicado para un total de 16 datos diarios (18, si hay estándares certificados). En esta etapa o de corrida de los ensayos es donde se obtienen todos los datos primarios y requiere que en su ejecución se cumplan ciertas condiciones mínimas:

- Cada grupo de muestras se analiza en el mismo día corriendo todas las muestras en forma paralela.
- Es recomendable que el proceso se inicie siempre a la misma hora y lo suficientemente temprano para que se pueda cumplir con el análisis de todas las muestras, teniendo en cuenta que pueden ocurrir imprevistos.
- Todo el material de vidrio deberá ser lavado previamente de acuerdo con el procedimiento establecido en el Laboratorio para cada uso y deberá ser sometido a la revisión o control de calidad correspondiente.
- El formato de captura de datos se deberá diligenciar en el mismo momento en que se obtienen los datos (no transcribir, copiar, etc.). Las cifras erradas se deben corregir inmediatamente dejando constancia por parte del analista en forma clara en que consistió el error.

5.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Utilizando las fórmulas presentadas en las definiciones, calcular:

5.2.1 Rechazo de datos.

Calcular el estadístico T para los valores extremos de cada grupo (máximo y mínimo), de la siguiente manera:

- Ordenar los datos de menor a mayor: $[x_{bajo}, x_2, x_3, \dots, x_{alto}]$
- Calcular x_{prom} y s
- Calcular T como: $T = (x_{alto} - x_{prom})/s$ para un valor alto; $T = (x_{prom} - x_{bajo})/s$ para un valor bajo



- Si el T calculado es mayor que el T de tablas (para un nivel de confianza del 95% y n mediciones, Anexo, Tabla 1), el dato se rechaza. De acuerdo con el tamaño pequeño de las poblaciones que se van a manejar, se pueden rechazar como máximo dos datos; si la aplicación del criterio de rechazo da positiva para más de dos datos, el ensayo deberá repetirse.

5.2.2 Límite de detección del método.

- Calcular la desviación estándar (s) y el promedio, tomando todos los datos de los 7 ensayos (14 datos), para el estándar bajo, a partir de una tabla de distribución desigual de t (Anexo, Tabla 3), se selecciona el valor de t para n-1 grados de libertad y un nivel de confianza del 99%:

$$LDM = \overline{C}_{Eb} + t_{n-1} \times s$$

5.2.3 Precisión.

Calcular la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (CV) y el límite de confianza del 95% (LC₉₅) para cada "muestra" tomando todos los datos de los 7 ensayos (14 datos).

5.2.4 Exactitud.

Calcular para cada estándar y para el patrón certificado el porcentaje de error relativo en cada determinación. Determinar para cada tipo de "muestra" el valor promedio de error relativo.

5.2.5 Porcentaje de Recuperación.

Calcular el %R para cada nivel de concentración adicionado. Reportar indicando la recuperación para estándares y la recuperación para muestras reales. Se debe reportar la recuperación media, el rango de %R y su desviación estándar. (%R) y se calcula como:

$$\%R = \frac{\overline{C}_x - C_{BK}}{C_A} \times 100$$

donde:

- C_x = concentración promedio de las determinaciones,
- C_{BK} = concentración del blanco, y
- C_A = concentración real adicionada.

La recuperación sobre muestras reales se calcula por:



$$\%R_M = \frac{C_{MA} - \bar{C}_M}{C_A} \times 100$$

donde:

C_M = concentración promedio de la muestra no adicionada,

C_{MA} = medida de la concentración en la muestra adicionada, y

C_A = concentración conocida adicionada a la muestra.

5.3 ELABORACIÓN Y PRESENTACIÓN DE DOCUMENTOS

El responsable de la estandarización deben presentar los siguientes documentos:

5.3.1 Informe de pre estandarización:

Debe contener los resultados de los ensayos realizados en esta etapa incluyendo: reactivos, vidriería, equipos, insumos. Además debe presentar una propuesta de estandarización que se entrega al líder de análisis fisicoquímico para su discusión y aprobación con el Oficial de calidad. (Entregar en medio impreso)

5.3.2 Informe de estandarización

Es una descripción breve de todo el proceso de estandarización realizado y que debe contener los siguientes numerales: objetivo, metodología (reactivos, equipos, materiales, condiciones de trabajo, procedimiento), análisis estadístico de los resultados, conclusiones y cuadro de parámetros de estandarización. (Entregar en medio impreso y magnético)

5.3.3 Carpeta de soporte técnico

Contiene todos los documentos originales producidos durante el proceso de estandarización, las notas y observaciones del analista, hojas de captura de datos, cálculos, y demás información que permita la revisión del proceso y/o su replicación por otro analista o por otro laboratorio. Estos documentos deben ser almacenados en orden cronológico.

5.3.4 Procedimiento estándar de operación:

Con los datos de la validación incluidos y las modificaciones y/o precisiones que se hayan incluido al método original.

5.3.5 Parámetros de estandarización:

Corresponde al cuadro parámetros de estandarización del método en medio impreso y magnético. Si alguno de los parámetros no aplica, digite en la casilla la sigla N.A:



CUADRO PARÁMETROS DE ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO

NOMBRE DEL METODO:			
CÓDIGO DEL PSO:			
FECHA DEL INFORME DE ESTANDARIZACIÓN:			
PARÁMETRO	VALOR	UNIDADES	OBSERVACION
LIMITE DE DETECCION			Corresponde al límite de cuantificación.
PRECISION EN TÉRMINOS DE %CV			Nivel de Concentración bajo
			Nivel de Concentración alto
EXACTITUD EXPRESADO COMO % DE ERROR RELATIVO			Nivel de Concentración bajo
			Nivel de Concentración alto
RANGO DE TRABAJO (Lectura Directa)			Sin dilución de la muestra
INTERVALO DE APLICACIÓN DEL METODO			Con la mayor dilución posible o aceptable.
RECUPERACION EXPRESADO COMO %			Nivel de Concentración bajo
			Nivel de Concentración alto

ANEXO. Tablas de valores estadísticos

Mapa 1. Valores críticos T para rechazo de datos

n	95%	N	95%	n	95%	n	95%
3	1,15	11	2,24	19	2,53	27	2,69
4	1,46	12	2,29	20	2,56	28	2,71
5	1,67	13	2,33	21	2,58	29	2,72
6	1,82	14	2,37	22	2,6	30	2,74
7	1,94	15	2,41	23	2,62	40	2,87
8	2,03	16	2,44	24	2,64	50	2,96
9	2,11	17	2,47	25	2,66	60	3,03
10	2,18	18	2,50	26	2,67	100	3,21

 IDEAM	Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial - República de Colombia			
	SUBDIRECCIÓN DE HIDROLOGÍA - PROGRAMA DE FISCOQUÍMICA AMBIENTAL			
	Código: TP0131	Fecha: 10/02/2006	Versión: 02	Página: 12 de 12
ESTANDARIZACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS			Hoja No.:	

Mapa 2. Valores de la distribución t para calcular LC 95 %

gl	95%	gl	95%	gl	95%	gl	95%
1	12,71	11	2,20	21	2,08	50	2,01
2	4,30	12	2,18	22	2,07	∞	1,96
3	3,18	13	2,16	23	2,07		
4	2,78	14	2,14	24	2,06		
5	2,57	15	2,13	25	2,06		
6	2,45	16	2,12	26	2,06		
7	2,36	17	2,11	27	2,05		
8	2,31	18	2,10	28	2,05		
9	2,26	19	2,09	29	2,05		
10	2,23	20	2,09	30	2,04		

Mapa 3. Valores de la distribución t (99%) para calcular LDM

gl	99%	gl	99%	gl	99%	gl	99%
1	31,82	11	2,72	21	2,52	40	2,42
2	6,96	12	2,68	22	2,51	50	2,40
3	4,54	13	2,65	23	2,50	60	2,39
4	3,75	14	2,62	24	2,49	70	2,38
5	3,36	15	2,60	25	2,48	80	2,37
6	3,14	16	2,58	26	2,48	90	2,37
7	3,00	17	2,57	27	2,47	100	2,36
8	2,90	18	2,55	28	2,47	∞	2,33
9	2,82	19	2,54	29	2,46		
10	2,76	20	2,53	30	2,46		

6. BIBLIOGRAFÍA

Quality assurance in the National Water Quality Laboratory; Canada Centre for Island Waters, Burlington, Ontario. 2ª. Ed., 1986.

Standard Methods for the examination of water and wastewater, 20th Edition, 1998.

Programa de Garantía de calidad. Grupo de Salud Ambiental. Instituto Nacional de Salud, Santa Fe de Bogotá, D. C., 1994 (sin publicar).

Memorias del curso "Análisis Instrumental", Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Enero de 1997.

Información escrita suministrada por el Químico Guillermo Cortés, contratista del IDEAM, mayo de 1998.

Memorias del curso "Validación de Métodos de Ensayo, Metrología Química y Estimación de Incertidumbre en Matrices Ambientales" Séptimo seminario del proceso de acreditación de laboratorios ambientales.