

**VALIDACIÓN, DETERMINACIÓN DE LA TRAZABILIDAD Y ESTIMACIÓN DE
LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL Y DISPONIBLE TOTAL EN EL
LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012**

**VALIDACIÓN, DETERMINACIÓN DE LA TRAZABILIDAD Y ESTIMACIÓN DE
LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO PARA LA
DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL Y DISPONIBLE TOTAL EN EL
LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL DE LA UNIVERSIDAD
TECNOLÓGICA DE PEREIRA**

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

**Documento presentado como requisito parcial para optar al título de
QUÍMICO INDUSTRIAL**

**Directora
Lina María García Moreno
Especialista en Gestión de la Calidad y Normalización Técnica**

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE QUÍMICA
PEREIRA
2012**

NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

VALIDACIÓN, DETERMINACIÓN DE LA TRAZABILIDAD Y ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DEL MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO PARA LA DETERMINACIÓN DE FÓSFORO TOTAL Y DISPONIBLE TOTAL EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA AMBIENTAL DE LA UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

Presentado por:

OSCAR ANDRÉS CUÉLLAR GARCÍA

Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez revisada la versión escrita y presenciando la sustentación oral decidimos otorgar:

La nota de: _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy _____

Director: _____

**Lina María García Moreno
Especialista en Gestión de la Calidad y Normalización Técnica**

Jurado: _____

**Norma Patricia Durán Osorio
Magíster en Estadística e Investigación Operativa**

DEDICATORIA

A mi abuelita, Q.E.P.D, en el Reino de los Cielos, dedico con profundo sentimiento el logro que hoy he alcanzado, gracias por tu amor que en mi corazón siempre guardaré.

A Santiago y Verónica porque ellos fueron mi inspiración cada mañana al despertar para alcanzar este peddño que luego nos traerá prosperidad.

A mi padre Oscar y mi madre Gloria Inés, por apoyarme incondicionalmente para haber continuado mi formación profesional.

A mi tío Arturo por sus palabras de aliento y apoyo emocional.

Oscar Andrés Cuéllar García

AGRADECIMIENTOS

A Lina por sus consejos y orientación en los diferentes aspectos durante la ejecución del trabajo de grado.

A Clarita por sus observaciones para mejorar cada día.

A Mauricio por estar siempre presto a colaborarme cuando lo necesitaba

Igualmente a todo el personal del Laboratorio de Química Ambiental por su amabilidad para resolver mis inquietudes.

“Gracias, Laboratorio de Química, por abrirme sus puertas para no sólo haber realizado el proyecto de grado sino también por haber contribuido en mi formación como profesional integral”

A Norma por la revisión y asesoría del proyecto de grado.

Oscar Andrés Cuéllar García

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
TABLA DE CONTENIDO	iv
Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	viii
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. JUSTIFICACIÓN	2
3. OBJETIVOS	3
3.1 OBJETIVO GENERAL	3
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
4. MARCO DE REFERENCIA	4
4.1 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LAS MEDICIONES	4
4.2 METROLOGÍA	5
4.3 METROLOGÍA EN QUÍMICA	6
4.4 VALIDACIÓN	7
4.5 INCERTIDUMBRE	9
4.6 TRAZABILIDAD	13
4.7 MATRIZ AMEF	16

4.8 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO	17
5. METODOLOGIA	19
6. RESULTADOS	20
CONCLUSIONES	22
RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS	24
ANEXOS	26
GLOSARIO	71

Índice de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Comparación entre la metrología en Física y en Química	6
Tabla 2. Parámetros de Calidad de un método	8
Tabla 3. Magnitudes y unidades de medición química	14
Tabla 4. Resultados validación del ensayo Fósforo total y Fósforo Disponible Total	21
Tabla 5. AMEF Fósforo total	27
Tabla 6. Consolidado de datos validación Fósforo total	34
Tabla 7. Consolidado de datos muestra adicionada validación Fósforo total	35
Tabla 8. Ensayos límite de cuantificación Fósforo total	36
Tabla 9. Datos para la carta de control de Fósforo total	39
Tabla 10. Fuentes de incertidumbre ensayo Fósforo total	41
Tabla 11. Formato para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo total	42
Tabla 12. Curva de calibración Fósforo total	44
Tabla 13. AMEF Fósforo Disponible Total	51
Tabla 14. Consolidado de datos validación Fósforo Disponible Total	58
Tabla 15. Consolidado muestra adicionada validación Fósforo Disponible Total	59
Tabla 16. Ensayos límite de cuantificación Fósforo Disponible Total	60
Tabla 17. Datos para la carta de control Fósforo Disponible Total	63
Tabla 18. Fuentes de incertidumbre ensayo Fósforo Disponible Total	65
Tabla 19. Formato para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo disponible Total	66

Índice de Figuras

	Pág.
Figura 1. Pasos para guiar la estimación de la incertidumbre	11
Figura 2. Puntos críticos del ensayo del ensayo Fósforo total	26
Figura 3. Rango lineal ensayo Fósforo total	36
Figura 4. Rango de trabajo ensayo Fósforo total	37
Figura 5. Diagrama Causa – Efecto ensayo Fósforo total	41
Figura 6. Contribuciones a la incertidumbre del ensayo Fósforo total	47
Figura 7. Esquema del ensayo Fósforo total	48
Figura 8. Puntos críticos del ensayo Fósforo Disponible Total	50
Figura 9. Rango lineal ensayo Fósforo Disponible Total	60
Figura 10. Rango de trabajo ensayo Fósforo Disponible Total	61
Figura 11. Diagrama Causa – Efecto ensayo Fósforo Disponible Total	65
Figura 12. Contribuciones a la incertidumbre del ensayo Fósforo Disponible Total	68
Figura 13. Esquema del ensayo Fósforo Disponible Total	69

RESUMEN

El Laboratorio de Química Ambiental (LQA) cuenta con un sistema de gestión de calidad acreditado, por lo cual surge la necesidad de focalizar el desarrollo del presente trabajo desde el aseguramiento de la calidad de la medición, la cual se fundamenta en la validación, la incertidumbre y la trazabilidad.

Teniendo en cuenta que el LQA se encuentra acreditado por El Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), bajo la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 "Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración" y en coherencia con la filosofía del mejoramiento continuo adoptada por el laboratorio, se elaboraron estrategias que permitan incluir en el alcance de la acreditación los ensayos de Fósforo total y Fósforo Disponible Total, validando la metodología mediante la evaluación de los parámetros característicos del método, para luego mediante la revisión de cálculos asociar una incertidumbre acorde a los resultados que son trazables al SI.

“PALABRAS CLAVE”: Acreditación, aseguramiento de la calidad, fósforo total, Fósforo Disponible Total, incertidumbre, NTC/ISO/IEC 17025:2005, sistema de gestión de calidad, trazabilidad, validación.

ABSTRACT

The Environmental Chemistry Laboratory (LQA) has a quality management system accredited, so there is a need to focus the development of this work from the quality assurance of measurement, which is based on validation, uncertainty and traceability.

Considering that the Environmental Chemistry Laboratory is accredited by The Institute of Hydrology, Meteorology and Environmental Studies (IDEAM), under the NTC/ISO/IEC 17025:2005 "General Requirements for the Competence of Testing Laboratories and Calibration" and in coherence with the philosophy of continuous improvement adopted by the laboratory, strategies were developed for inclusion in the scope of accreditation tests like Total phosphorus and available Total phosphorus, validating the methodology by evaluating the characteristic parameters of the method, and then by reviewing associated uncertainty calculations according to the results that are traceable to the SI.

“KEY WORDS”: Accreditation, quality assurance, total phosphorus, available phosphorus, uncertainty, NTC/ISO/IEC 17025:2005 quality management system, traceability, validation.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El laboratorio de Química Ambiental (LQA), de la Universidad Tecnológica de Pereira, realiza análisis que están enfocados a la caracterización de aguas residuales, superficiales y subterráneas, atendiendo la demanda de los sectores académico, industrial y de la comunidad en general, cumpliendo las exigencias de un sistema de gestión de calidad basado en la NTC-ISO/IEC 17025:2005.¹ Como decisión estratégica ha decidido incluir en el alcance de la acreditación los ensayos de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total. Para este propósito se apoya en la norma ISO citada anteriormente, cuyo objetivo es dar lineamientos a laboratorios de ensayo y calibración para generar resultados técnicamente válidos.

¹ International Organization for Standardization. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. NTC-ISO/IEC 17025:2005

2. JUSTIFICACIÓN

El Laboratorio de Química Ambiental (LQA) cuenta con un sistema de gestión de calidad acreditado, por lo cual surge la necesidad de focalizar el desarrollo del presente trabajo desde el aseguramiento de la calidad de la medición, la cual se fundamenta en la validación, la incertidumbre y la trazabilidad. Ahora bien, la actividad analítica hace parte del proceso de medición en la cual se obtienen resultados que requieren una alta confiabilidad, por lo cual se hace pertinente la validación de los métodos de ensayo como parte del aseguramiento de la calidad, adicionalmente los datos producidos deben estar acompañados de una incertidumbre acorde a los mismos y deben ser trazables a patrones de referencia, generalmente a las unidades del Sistema Internacional (SI); además es un requerimiento indispensable que se debe cumplir teniendo en cuenta que el LQA se encuentra acreditado por El Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales (IDEAM), bajo la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 “Requisitos Generales para la Competencia de Laboratorios de Ensayo y de Calibración”² y en coherencia con la filosofía del mejoramiento continuo adoptada por el laboratorio se requiere ampliar el alcance de la acreditación incluyendo los ensayos de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total.

² Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. Resolución No. 0425 del 28 de Febrero de 2011.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVO GENERAL

Validar, estimar la incertidumbre y determinar la trazabilidad para los ensayos de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total apoyado en los lineamientos de la NTC–ISO/IEC 17025:2005 aplicada en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Tecnológica de Pereira.

3.1. OBJETIVOS ESPECIFICOS

3.1.1 Validar el ensayo de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo como son: Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango lineal y de trabajo, sensibilidad y porcentaje de recuperación.

3.1.2 Estimar la incertidumbre de medición asociada a los ensayos validados

3.1.3 Determinar la trazabilidad para los ensayos validados

3.1.4 Generar la documentación necesaria para dar cumplimiento a los requisitos establecidos en la NTC-ISO/IEC 17025:2005 en el numeral 5.4.2.

3.1.5 Presentar los resultados del trabajo de grado como base para realizar una divulgación científica de los mismos.

4. MARCO DE REFERENCIA

4.1 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LAS MEDICIONES

El rol que desempeña un laboratorio de ensayo acreditado es producir datos técnica y legalmente válidos con la mayor calidad posible, producto de las mediciones analíticas diarias que se llevan a cabo, es allí donde el aseguramiento de la calidad, cobra importancia puesto que tiene como objetivo optimizar la confiabilidad del proceso de medición, por lo que se hace necesario implementar un programa de aseguramiento de la calidad/control de calidad (*Quality Assurance/Quality Control*), QA/QC, por sus siglas en inglés a nivel interno del laboratorio; QA es un plan que el laboratorio genera donde se especifican las medidas necesarias para obtener resultados con exactitud y precisión conocida, mientras que QC es el conjunto de acciones dentro de una metodología de análisis para asegurar que el proceso de medición está bajo control.

Dentro del QA están asociados diversos documentos que entre muchos se citan la declaración de políticas de calidad, perfil profesional y responsabilidades de los analistas, procedimientos para recolección, preservación y recepción de muestras, documentación de equipos e instrumentos, referencias de normas utilizadas, procedimientos estándares de operación (SOP's), actividades de control de calidad (QC), procedimientos para la calibración, verificación y mantenimiento de equipos e instrumentos, entre otros; además es primordial que el personal de laboratorio comprenda sus roles y responsabilidades para realizar sus actividades enmarcadas dentro de políticas de calidad.

Un buen programa QC debe incluir por lo menos, demostración inicial de capacidad del analista, límite de detección y cuantificación del método de ensayo, curvas de calibración con un coeficiente de correlación apropiado, un blanco del método, duplicado de muestras, estándar de control de calidad, muestras adicionadas, criterios de aceptación de resultados, cálculos y estimaciones estadísticas, cartas de control y acciones correctivas por lo menos por cada set de muestras. La evaluación y el reporte final de los datos son los pasos finales en el proceso de control de calidad y constituyen una parte esencial del programa de aseguramiento de la calidad.

Conjuntamente, se debe establecer un plan para la evaluación de la calidad (*Quality assessment*), el cual es un proceso utilizado para garantizar que las

medidas de control de calidad se llevan a cabo de forma pertinente y para verificar la calidad de las mediciones realizadas en el laboratorio mediante el uso de muestras de control interno, participación en pruebas interlaboratorio y auditorías de calidad internas y externas³.

Un proceso de medición liga de manera ineludible aspectos técnicos, administrativos, estadísticos, instrumentales y de personal, estableciendo en cada uno de estos sus propios parámetros de control que aseguren la conformidad de los datos de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos en cada laboratorio⁴, por eso la implementación de un plan de mantenimiento y calibración de equipos (conocida también como proceso de confirmación metrológica) como el uso de cartas de control son herramientas metrológicas recomendadas para el control estadístico de procesos que deben integrarse de forma adecuada en el sistema de calidad para cerciorarse de que los resultados cumplan con ciertos requerimientos^{5,6}. Adicionalmente no es suficiente contar con un buen instrumento de medición y/o material de referencia, éste debe utilizarse de forma adecuada para obtener la confiabilidad y mejor capacidad de medición, lo que implica seleccionar el método de medición y/o calibración más conveniente una vez conocida la selectividad/especificidad y robustez del mismo⁷. La elaboración de un informe de resultados es el completo documental y final de un ensayo de medición, el cual debe cumplir con ciertos requisitos como lo son: exactos, precisos (no ambiguos), notificados en forma simplificada, entregados de forma impresa, con unidades de medida e incertidumbre asociada y dígitos significativos adecuados; todo lo anterior con el objeto de que el usuario final y/o cliente tenga una fácil interpretación y uso del contenido de los resultados⁸.

4.2 METROLOGIA⁹

Las actividades metrológicas de calibración, medición y ensayo son fundamentales para garantizar la calidad de las mediciones y procesos industriales así como de la calidad de vida. Ello supone la necesidad de contar con resultados trazables a patrones de referencia. El Reconocimiento de la competencia

³American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd. Washington, D.C., 2012.

⁴ MetAs & Metrólogos Asociados. El Proceso de Medición. No. 09 (La Guía MetAs, 2007). Pág. 1 – 3.

⁵ MetAs & Metrólogos Asociados. Herramientas de la metrología en sistemas de calidad. No. 09 (La Guía MetAs, 2004). Pág. 1 – 5.

⁶ MetAs & Metrólogos Asociados. Cartas de control para instrumentos de medición. No. 06 (La Guía MetAs, 2004). Pág. 1 – 5.

⁷ MetAs & Metrólogos Asociados. Capacidad de medición. No. 03 (La Guía MetAs, 2006). Pág. 2 – 8.

⁸ MetAs & Metrólogos Asociados. Expresión e interpretación de resultados experimentales en metrología. No. 05 (La Guía MetAs, 2007). Pág. 1 – 12.

⁹ Metrología – Abreviada. 3^a Ed. EURAMET, 2008. Pág 13 – 18.

metroológica en cada nivel de la cadena de trazabilidad puede establecerse mediante acuerdos o concertos de reconocimiento mutuo, así como mediante acreditación y revisión por pares.

4.3 METROLOGIA EN QUÍMICA

En la actualidad el aseguramiento de las mediciones químicas realizadas en el área ambiental, médica, alimenticia e industrial en términos de su confiabilidad y veracidad es un tema de suma importancia para el desarrollo económico y social de un país. La Metrología se ha desarrollado a partir de las mediciones físicas y se encarga de establecer la trazabilidad de los resultados a patrones de referencia definidos, normalmente al Sistema Internacional de Unidades (SI), con análisis completos de las contribuciones a la incertidumbre de medición para un nivel declarado de confianza, empleando materiales de referencia y métodos normalizados de ensayo. Respecto a las mediciones químicas la situación es más compleja ya que éstas generalmente no se realizan bajo condiciones definidas y controladas como se observa en la tabla 1. Es importante resaltar que el principal objetivo de las mediciones químicas es determinar la cantidad de una entidad química de interés en una matriz dada y no la composición total de la misma, de aquí, que el medio donde se realizan las mediciones no puede ser definido y controlado.

Metrología en Física y Química	Física	Química
Medición	Comparando una magnitud. Ej: Temperatura	Comparando una magnitud. Ej: DDT en leche
Unidades	m, s, K	Mol/Kg, mg/Kg
Influenciada por	Mediciones directas	Diversos factores que afectan la calidad la medición
Principal Impacto	Calibración de Equipos	Tratamiento Químico. Ej: extracción, digestión, material de referencia utilizado, calibración de equipos
Depende de	Generalmente es independiente de la muestra	Es Fuertemente dependiente de la muestra
Ejemplo	Longitud de una masa	Concentración de Pb en una muestra de agua, suelo.

Tabla 1. Comparación entre la metrología en Física y en Química

Muchas mediciones químicas son trazables a patrones ó a métodos de referencias, en otros casos las mediciones pueden ser consideradas trazables a un material de referencia (certificado) ya sea en forma de sustancia pura o de una matriz de material de referencia, donde la concentración del analíto ha sido certificada. El grado en el que los materiales de referencia proporcionan una cadena de trazabilidad al SI dependen de la calidad del vínculo a los valores obtenidos mediante mediciones de referencia ó a valores proporcionados por patrones de referencia.

Es indispensable conocer y aplicar en el Laboratorio el concepto de aseguramiento de la calidad de las mediciones sobre el cual se fundamenta la necesidad de desarrollar el presente trabajo, siendo sus pilares la validación, la trazabilidad y la incertidumbre.

4.4 VALIDACIÓN

Partiendo del concepto de validación como la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto¹⁰, surgen cuatro motivos por los que se hace necesario validar: Para cumplir las normativas, optimizar procesos, asegurar la calidad / mejorar productividad y reducir costos¹¹. Un método debe validarse cuando se adopta un método estandarizado ó se modifica una parte de éste y cuando se desarrolla un nuevo método para un uso específico.

En el contexto actual de la globalización de los mercados, existe una creciente demanda en cuanto a la comparabilidad de los resultados, esto conlleva a que el generador del resultado, en este caso el LQA, pueda demostrar documentalmente que sus resultados son trazables. Estos documentos hacen referencia, entre otros aspectos a un procedimiento normalizado de ensayo, a un equipo de medida bien calibrado y al uso de patrones de referencia; por ello el proceso de validación cobra importancia al tener un impacto directo sobre la calidad de estos datos¹².

¹⁰ International Organization for Standardization. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. NTC-ISO/IEC 17025:2005. Pág. 17.

¹¹ La importancia de la validación. En: Técnicas de Laboratorio. No 269 (_____, 2002); p.110 – 111.

¹² GREEN, JM. A Practical Guide to Analytical Method Validation. No. 68 (Analytical Chemistry, 1996). Pág. 305A - 309A.

Asegurar la trazabilidad de los resultados analíticos es una etapa clave para que el cliente tenga confianza en los resultados proporcionados por el laboratorio¹³. Sin embargo, es necesario suministrar un parámetro que proporcione una idea del grado de confianza de los resultados, por tanto, los analistas deben proporcionar resultados trazables con una incertidumbre asociada¹⁴, es decir, cuanto puede alejarse un valor del convencionalmente verdadero¹⁵; adicionalmente, mientras más estrictamente se cumplan los requerimientos, menor será la incertidumbre del resultado, lo que indica que existe una relación inversamente proporcional entre los requerimientos y la incertidumbre.

Como se aprecia en la tabla 2, los requisitos analíticos para un uso específico, determinan los parámetros ó criterios de calidad del método a utilizar para resolver el problema, estos criterios de calidad, conocidos como “*performance characteristics*” ó “*figures of merit*”, pueden ser de tipo **estadístico u operativo**, el laboratorio debe decir cuáles de esos parámetros necesitan caracterizarse. Una vez se haya finalizado la validación, es muy importante no sólo realizar los análisis estadísticos y estimar la incertidumbre del mesurando con una trazabilidad asociada sino también documentar el procedimiento de forma tal que el ensayo pueda reproducirse reduciendo en la medida de lo posible cualquier ambigüedad. El uso de SOP’s que reflejan los detalles de la metodología analítica aseguran que el método se aplica siempre del mismo modo¹⁶.

Tipo Estadístico u operativo
Selectividad / Especificidad
Robustez
Intervalo lineal y de trabajo
Límites de detección y cuantificación
Sensibilidad
Exactitud, Precisión
Recuperación

Tabla 2. Parámetros de Calidad de un método

¹³ RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. Exactitud y Trazabilidad. En: Técnicas de Laboratorio. No 254 (_____, 2000); p. 591 – 594.

¹⁴ RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. Incertidumbre y Precisión. En: Técnicas de Laboratorio. No 266 (_____, 2001); p.834 – 837.

¹⁵ DE BIÈVRE, P. Measurement results without statements of reliability (uncertainty) should not be taken seriously. No 6 (Accreditation and Quality Assurance, 1997); p. 269

¹⁶ RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. La validación de Métodos Analíticos. En: Técnicas de Laboratorio. No 252 (_____, 2000); Pág. 382 – 385.

El analista encargado de realizar la validación del ensayo debe ser técnicamente competente y tener suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio, además en esta actividad se encuentra implícita la necesidad de evaluar y confirmar que el método en cuestión tiene capacidades de desempeño consistentes para lo que fue previsto. La validación de un método en un laboratorio de ensayo deberá incluir por lo menos las siguientes actividades de acuerdo con la tabla 1, por las siguientes razones¹⁷:

- **Evaluación de selectividad y especificidad:** Para asegurar que el método responde exacta y específicamente al analito de interés y no a otras especies similares.

- **Prueba de Robustez:** Permite obtener información de forma rápida y sistemática de los efectos sobre pequeños cambios introducidos en el procedimiento, además proporciona una indicación de confiabilidad durante el uso rutinario del ensayo.

- **Intervalo lineal y de trabajo:** Es útil para determinar el intervalo donde la señal de respuesta tendrá una relación lineal con la concentración del analito.

- **Límites de detección y cuantificación:** Definen la capacidad de un método de ensayo para identificar y cuantificar un analito bajo condiciones de exactitud y precisión previamente establecidas.

- **Sensibilidad:** La sensibilidad es un parámetro útil para usar en fórmulas de cuantificación.

- **Exactitud y Precisión:** Indica que tan sesgados están los resultados y que dispersión existen entre ellos.

- **Recuperación:** Indica la eficiencia del método para cuantificar en su totalidad el analito de interés en una matriz dada.

4.5 INCERTIDUMBRE

Es muy importante que los resultados analíticos entregados en los reportes estén acompañados de su incertidumbre. La estimación de la incertidumbre de un ensayo requiere considerar todas las posibles fuentes de incertidumbre. En la práctica, puede surgir de la toma de muestras, condiciones de preservación, condiciones de medición, incertidumbres debido a efectos instrumentales y

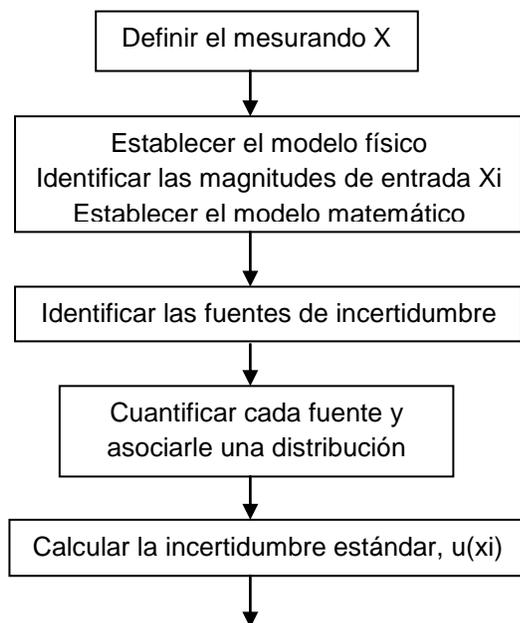
¹⁷ The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Eurcachem. 1998

calibración de equipos, incertidumbre del material volumétrico, valores de referencia, preparaciones de patrones, aproximaciones e hipótesis incorporadas en el método de medición y procedimiento, la variación aleatoria entre otras. Para estimar la incertidumbre combinada es necesario tomar cada fuente y realizar los cálculos por separado a fin de obtener la contribución de cada una. La incertidumbre de medición no implica duda acerca de la validez de la misma, por el contrario, el conocimiento de la incertidumbre implica una mayor confianza en la validez de un resultado, que de acuerdo con la definición del término, incertidumbre es:

“parámetro asociado con el resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que pueden ser atribuidos razonablemente al mesurando”.

Para la mayoría de los propósitos en química analítica se utiliza la incertidumbre expandida, U , la cual proporciona un intervalo de confianza determinado donde se encuentra con alta probabilidad el valor verdadero del mesurando¹⁸.

Los pasos para calcular la incertidumbre de un método de ensayo son muy simples, de forma tal que siguiendo los lineamientos de la figura 1, se puede estimar fácilmente¹⁹:



¹⁸ Quantifying uncertainty in analytical measurement. Eurachem / CITAC guide. 2nd Ed. 2000

¹⁹ SCHIMID, Wolfgang. LAZOS, Ruben. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional de Metrología, CENAM. México, 2000.

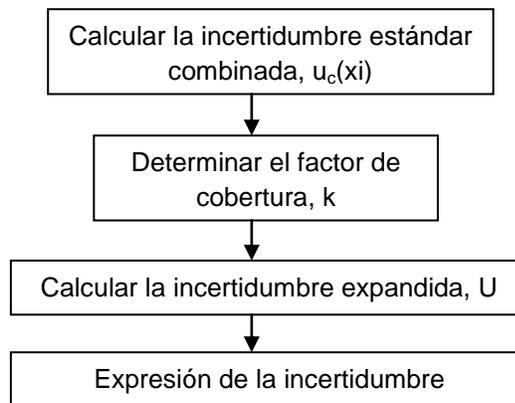


Figura 1. Pasos para guiar la estimación de la incertidumbre

Para definir el mesurando se requiere tanto una declaración clara e inequívoca de lo que se está midiendo, y una expresión cuantitativa que relacione el valor del mesurando con los parámetros de los cuales depende, además si es posible incluir las correcciones para los errores sistemáticos.

Un modelo físico de la medición consiste en el conjunto de suposiciones sobre el propio mesurando y las variables físicas ó químicas relevantes para la medición. Es importante identificar las magnitudes de entrada ó las variables que están directamente relacionadas con el proceso (ensayo). Además representar el modelo físico mediante un modelo descrito por un lenguaje matemático es esencial para estimar la incertidumbre, a pesar, de que éste supone aproximaciones originadas por la representación imperfecta ó limitada de las relaciones entre las variables involucradas.

Una vez determinados el mesurando, el principio, el método y el procedimiento de medición, se identifican las posibles fuentes de incertidumbre, las cuales provienen de los diversos factores involucrados en la medición. Por lo general es conveniente empezar con la expresión básica que se utiliza para calcular el valor del mesurando, ya que todos los parámetros de esta expresión pueden ser fuentes potenciales de incertidumbre. No es recomendable desechar alguna de las fuentes de incertidumbre por la suposición de que es poco significativa sin una cuantificación previa de su contribución, comparada con las demás y apoyada por mediciones. No obstante de acuerdo con la experiencia, y conocimiento del método de ensayo se permitirá calificar como irrelevantes algunas fuentes después de las debidas consideraciones. El diagrama causa – efecto es una de las diversas formas que ofrece un análisis adecuado, conveniente y bien estructurado de listar las posibles fuentes de incertidumbre, el cual consiste en una representación gráfica sencilla en la que se traza una línea horizontal que representa el mesurando. Sobre Este eje se trazan líneas oblicuas que

representan las posibles fuentes de contribución de la incertidumbre en la medición del mesurando, a su vez cada una de estas líneas recibe otras líneas perpendiculares que representan las subfuentes de incertidumbre, lo que conlleva a observar un grupo conformado una línea principal y las líneas secundarias que contribuyen a la incertidumbre.

La cuantificación de cada fuente de incertidumbre incluye la asignación de un valor (también conocida como incertidumbre original) y la asignación del tipo de distribución a la cual se refiere este valor. Por una parte existen dos formas principales para cuantificar las fuentes que son incertidumbre Tipo A e incertidumbre Tipo B, la primera está basada en un análisis estadístico de una serie de mediciones mientras que la segunda comprende toda la información externa u obtenida por experiencia. En cuanto al tipo de distribuciones existen principalmente de tipo normal, rectangular y triangular.

Al calcular la incertidumbre estándar, lo que se hace es unificar los valores de la incertidumbre original que tienen diferentes unidades en valores adimensionales y para ello se calcula la incertidumbre de acuerdo con el tipo de distribución que le fue asignado a cada valor.

El resultado de la combinación de las diferentes fuentes de incertidumbre se conoce como incertidumbre estándar combinada, que generalmente se calcula a través de la *ley de propagación de incertidumbre* ya que en la mayoría de los casos una magnitud de entrada está influenciada por diversas fuentes. Es posible encontrar que una pequeña variación de alguna de las fuentes tenga un impacto importante en el mesurando.

Frecuentemente se elige un factor de cobertura, k , que corresponde a un nivel de confianza determinado con un porcentaje de probabilidad de encontrar el valor verdadero del mesurando.

La incertidumbre expandida indica un intervalo de los valores que puede tomar probablemente el mesurando con un nivel de confianza determinado.

Finalmente, es indispensable comunicar sin ambigüedades la manera en que la incertidumbre está expresada. Cuando se reportan los resultados de los análisis de rutina en un laboratorio de ensayo, se recomienda la siguiente forma: $(x \pm U)$ (unidades), indicando el valor de k . Para la expresión numérica los valores de los resultados y su incertidumbre no se deben entregar con un número excesivo de dígitos, los resultados deben ser redondeados para ser coherente con la incertidumbre dada.

4.6 TRAZABILIDAD²⁰

Para lograr la comparabilidad de los resultados en el espacio y el tiempo, es esencial vincular todos los resultados de las mediciones individuales a una referencia común ó estándar de medición, de manera que puedan compararse a través de su relación con esa referencia. Esta estrategia se denomina "trazabilidad". El Vocabulario Internacional de términos básicos y generales en Metrología (VIM) define la trazabilidad como:

"Propiedad del resultado de una medición o el valor de un patrón tal que pueda ser relacionado a referencias establecidas, generalmente normas nacionales o internacionales, a través de un cadena ininterrumpida de comparaciones, todas teniendo incertidumbres establecidas".

Esta definición implica la necesidad de un esfuerzo a nivel nacional e internacional para proporcionar estándares de referencia ampliamente aceptados, y a nivel de cada laboratorio para demostrar los enlaces necesarios a dichas referencias. La trazabilidad es necesaria pero no suficiente para obtener resultados confiables, se requiere también tener implementado un sistema de control de calidad de las mediciones. Una característica clave de los buenos resultados es la comparabilidad, es decir, la capacidad de comparar los resultados de manera significativa sin importar donde se originen. La comparabilidad está provista, entre otras, por la trazabilidad a un set de unidades de medición y escalas consistentes. Para la mayoría de los resultados de las mediciones químicas se cuenta con el Sistema Internacional de unidades. Establecer la trazabilidad asegura que los valores de las magnitudes medidas y los valores de las condiciones especificadas están relacionados a estándares apropiados. Esta actividad se logra mediante calibración usando estándares de medición adecuados.

La naturaleza de la sustancia analizada es importante en todas las mediciones químicas, se expresen ó no en moles. En particular, cantidades expresadas como fracción másica son adimensionales, el punto es que para establecer la trazabilidad adecuadamente, cada resultado de la medición debe ser trazable a una referencia apropiada para la sustancia en particular, de acuerdo como se observa en la tabla 3 donde se resumen una selección de unidades derivadas importantes en las mediciones químicas.

²⁰ Traceability in chemical measurements: A guide to achieving comparable results in chemical measurements. Eurachem / CITAC guide. 2003. Eurachem / CITAC guide. 2003

Magnitud	Unidades
Fracción molar	mol/mol, %
Fracción másica	Kg/Kg, %
Fracción volumétrica	m ³ /m ³ , %
Concentración molar	mol/ m ³
Concentración másica	Kg/ m ³
Concentración en volumen	m ³ / m ³
Molalidad	mol/Kg
pH	1 (logaritmo negativo actividad ión hidrógeno)
Actividad Enzimática	Katal (mol*s ⁻¹), SI; U (μmol/min)
Pureza, es una característica importante de muchos materiales de referencia expresada en términos de algunas de las magnitudes referenciadas en la tabla	

Tabla 3. Magnitudes y unidades de medición química

Es necesario realizar un conjunto de actividades clave para establecer la trazabilidad de los resultados de un sistema de medición en un laboratorio de ensayo, las cuales son:

i) Especificación del mensurando, alcance de las mediciones e incertidumbre requerida: Una medición significativa requiere una especificación clara del mesurando. Adicionalmente es necesario prestar atención a algunas cuestiones específicas:

- Identidad del analito: En las mediciones químicas es necesario diferenciar que tipo de analito se está cuantificando, por ejemplo diferenciar entre especies moleculares o elementales.
- Condiciones de medición: Al establecer la trazabilidad es importante considerar que tipo de condiciones se aplican para realizar un ensayo ya que éstas forman parte de la definición formal de mesurando.
- Corrección por recuperación: Es importante indicar si la magnitud de interés es una cantidad de material recuperado a partir de una matriz ó si se trata de una cantidad total que se cree está presente. Esto es importante porque la corrección por recuperación requiere una medida adicional para calcular la corrección y en general se sumará a los requisitos de trazabilidad.
- Especificación en términos de un método: La definición del mesurando en términos de un procedimiento sólo conduce a una lista más larga de parámetros fijos. Sin embargo será necesario demostrar que los procedimientos alternativos brindan resultados equivalentes.

ii) Elección de un método adecuado: Una vez que el mesurando es conocido y comprendido, se debe seleccionar el mejor método disponible para trabajar bajo las condiciones actuales del laboratorio. Dentro del método se debe incluir la ecuación para cálculo del resultado de la medición y los controles de calidad necesarios así como las diferentes magnitudes de influencia (concentración de reactivos, tiempo, temperatura, etc.) que serán pertinentes para el propósito de establecer la trazabilidad, sujeta a la validación del método de ensayo.

iii) Validación del método de ensayo: En primer lugar la validación debe confirmar que el método y las condiciones de medición son adecuadas para el uso propuesto. La segunda consideración importante es que las referencias que se utilizan para controlar, calibrar y probar el método durante la validación son trazables. La validación juega un papel clave en el establecimiento de la trazabilidad, no es una actividad opcional, aún cuando se adopta un método estándar que ha sido validado y probado siempre será necesario al menos que el laboratorio compruebe que puede ejecutar el método correctamente realizando la validación del mismo aunque sea a un nivel no muy profundo.

iv) Identificación de la importancia relativa de cada magnitud de influencia: La importancia de las diferentes magnitudes de influencia está relacionada por su efecto cuantitativo sobre los resultados de la medición. Los efectos de las magnitudes físicas sobre los resultados son más fáciles de medir y controlar en comparación con los efectos químicos por lo que se hace necesario prestar más atención a estos últimos. Para decidir si un efecto necesita ser medido e incluido en las disposiciones de trazabilidad, normalmente es suficiente considerar el peor de los casos que razonablemente podría dar lugar a un error significativo en la medición.

v) Elección y aplicación de estándares de referencia apropiados: La calibración junto con los métodos validados es la clave para la trazabilidad. Sin embargo, en la práctica no siempre están disponibles certificados de calibración y materiales de referencia certificados por lo que se debe realizar un control detallado de los estándares de medición disponibles.

vi) Estimación de la incertidumbre: El requerimiento de la información de la incertidumbre surge de la necesidad de garantizar que las referencias usadas son suficientemente precisas para el propósito, y segundo, para proporcionar información similar para el resultado de la medición. El procedimiento mínimo que se debe llevar a cabo es: estimar la contribución de la incertidumbre de cada fuente, estimar la incertidumbre combinada y expandida del método de ensayo y confirmar que la incertidumbre expandida cumple los requerimientos de uso final.

Nótese que esta lista no implica necesariamente un orden de prioridades entre las actividades puesto que todas son importantes, lo relevante es que se lleven a cabo de forma apropiada para el propósito determinado. Adicionalmente estos lineamientos funcionan adecuadamente sólo en un contexto enmarcado por un aseguramiento de la calidad y control de calidad de las mediciones.

Concluyendo, la evidencia de la trazabilidad se presenta en los certificados de calibración ó estándares de referencia certificados. Por otra parte no es habitual suministrar detalles de la trazabilidad en los informes de ensayo, sin embargo, de ser necesario se informará sobre la identidad de los estándares de calibración utilizados para controlar las condiciones de medición.

4.7 MATRIZ AMEF²¹

AMEF ó Análisis de Modo y Efecto de Falla, es una herramienta para la mejora, utilizada para detectar por anticipado los posibles modos de falla, con el fin de establecer los controles adecuados que eviten la ocurrencia de defectos. Los objetivos que se desean alcanzar cuando se desarrolla un AMEF son: identificarlos modos de falla potenciales, sus posibles causas y el efecto, determinar las consecuencias de las fallas en el desempeño del sistema e identificar las acciones que pudieran eliminar o reducir la posibilidad de que ocurra el modo de falla. Cada vez que haya alguna modificación en el proceso se debe actualizar el AMEF.

La elaboración de una matriz AMEF se puede resumir en 11 pasos:

- i) Proceso:** Describe de manera breve y concreta el proceso que desea analizar
- ii) Modo de falla Potencial:** Es la manera en que podría fallar el proceso para cumplir con los requerimientos previstos.
- iii) Causas de falla potencial:** Situaciones que podrían dar origen al modo de falla, de modo que las acciones correctivas puedan ser orientadas hacia las causas pertinentes.
- iv) Grado de ocurrencia:** Se estima la frecuencia de la causa de falla potencial, utilizando una escala de 1 a 10, donde “1” indica remota probabilidad de ocurrencia y “10” muy alta probabilidad de ocurrencia.

²¹ _____. FMEA. Disponible en línea: <http://www.quality-one.com/fmea>. Consultado: Agosto de 2012.

v) Efecto de falla potencial: Se describe los efectos del modo de falla en términos de lo que el usuario final del producto pueda experimentar.

vi) Grado de severidad: Se estima la gravedad del efecto de falla potencial en el usuario final, utilizando una escala de 1 a 10, donde “1” indica una consecuencia sin efecto ocurrencia y “10” una consecuencia muy grave.

vii) Controles: Describe los controles actuales que están dirigidos a prevenir ó detectar el modo de falla potencial.

viii) Detección: Se estima la probabilidad de que los controles del proceso detecten el modo de falla potencial antes de terminar el proceso, utilizando una escala de 1 a 10, “1” indica alta probabilidad de que la falla se pueda detectar y “10” indica que es improbable de ser detectada.

ix) Número de Probabilidad de Riesgo, NPR: Es un valor que establece una *jerarquización* de los problemas a través de la multiplicación del grado de ocurrencia, severidad y detección, éste provee la prioridad con la que debe de atacarse cada modo de falla. Toma valores de 1 a 1000, para los NPR más altos se deben emprender acciones efectivas con el fin de reducir el riesgo de falla.

x) Acciones recomendadas: Es una descripción de las acciones correctivas ó preventivas encaminadas a eliminar ó disminuir la ocurrencia de la causa de falla potencial, reducir la severidad del modo de falla y/o incrementar la probabilidad de detección.

xi) Responsable: Se indica el área ó proceso y persona responsable de ejecutar las acciones recomendadas.

4.8 IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DEL FÓSFORO²²

El fósforo es el undécimo elemento más abundante sobre la superficie de la tierra y se encuentra comúnmente en forma de fosfato. Desempeña un papel importante en los procesos bioquímicos, es un factor clave en la eutrofización de las aguas superficiales y es un nutriente esencial que estimula el crecimiento de microorganismos y macroorganismos fotosintéticos. La química del fósforo es muy importante en diversos campos, por ejemplo, en el área médica y clínica, la agricultura, la metalurgia y en las ciencias ambientales. En los últimos años,

²²NAGENDRAPPA, G; MAHADEVAIAH, M; YOGENDRA KUMAR, M; ABDUL GALIL, M; SURESHA, M. A Simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. No. 4 (E-Journal of Chemistry, 2007) Pág. 467 – 473.

grandes cantidades de fosfato han sido utilizados en la elaboración de bebidas, detergentes, fertilizantes, pesticidas y también en la industria azucarera, por tanto este analíto se puede encontrar en aguas residuales domésticas e industriales así como en lodos biológicos en forma orgánica como inorgánica.

5. METODOLOGIA

La metodología que se empleó para dar cumplimiento a cada uno de los objetivos propuestos en el presente documento se describe como una serie de actividades.

5.1 Revisión de metodologías analíticas:

5.1.1 Documentación del ensayo de fósforo tomado del *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd. 2012. Método 4500 P – E.

5.1.2 Procedimiento Estándar de Operación SOP 3-13. Fósforo total como ortofosfatos. Método del ácido ascórbico. 4500 P–E. Laboratorio de Química Ambiental.

5.2 Elaboración de matriz AMEF (Análisis de modo y efecto de falla), teniendo en cuenta que la herramienta fue adaptada por parte del LQA.

5.3 Definición de los parámetros característicos del método:

5.3.1 Evaluación de la competencia para desarrollar el análisis y Elaboración del plan de validación de acuerdo con el formato de trabajo que fue aportado por el LQA.

5.4 Ejecución de actividades analíticas:

5.4.1 Inducción a la actividad analítica, reconocimiento de equipos y puesta a punto del método.

5.4.2 Recolección, preparación de muestras y ejecución del plan de validación.

5.5 Procesamiento de datos:

5.5.1 Desarrollo de cálculos y estimaciones estadísticas a los datos recolectados usando el software ProControl®.

5.6 Análisis de los resultados:

5.6.1 Análisis de las estimaciones estadísticas acorde al plan de validación.

5.7 Estimación de la incertidumbre de medición, teniendo en cuenta que se hizo la revisión de los cálculos ya existentes en el laboratorio.

5.8 Determinar la trazabilidad del método de ensayo.

5.9 Generación de la documentación soporte con los resultados.

5.10 Elaboración de un borrador para divulgación con los resultados del trabajo.

6. RESULTADOS

De acuerdo con los objetivos trazados para la elaboración del presente trabajo, se realizó un cuadro resumen donde se señala el producto obtenido de las actividades realizadas, materializándose en los diferentes documentos que se describen en la tabla 4, que se incluirán como anexos.

Objetivo Específico	Resultado
Validar el ensayo de Fósforo total a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo como son: Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango lineal y de trabajo, sensibilidad y porcentaje de recuperación.	Ver Anexo A: Puntos críticos del ensayo Fósforo total Ver Anexo B: AMEF Fósforo total Ver Anexo C: Plan de validación Fósforo total Ver Anexo D: Resultados validación Fósforo total
Validar el ensayo de Fósforo Disponible Total a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo como son: Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango lineal y de trabajo, sensibilidad y porcentaje de recuperación.	Ver Anexo G: Puntos críticos del ensayo Fósforo Disponible Total Ver Anexo H: AMEF Fósforo Disponible Total Ver Anexo I: Plan de validación Fósforo Disponible Total Ver Anexo J: Resultados validación Fósforo Disponible Total
Estimar la incertidumbre de medición asociada al ensayo validado	Ver Anexo E: Estimación de la incertidumbre del ensayo Fósforo total Ver Anexo K: Estimación de la incertidumbre del ensayo Fósforo Disponible Total
Determinar la trazabilidad para el ensayo validado	Ver Anexo F: Trazabilidad del ensayo Fósforo total Ver Anexo L: Trazabilidad del ensayo Fósforo Disponible Total

<p>Generar la documentación necesaria para dar cumplimiento a los requisitos establecidos en la NTC-ISO/IEC 17025:2005 en el numeral 5.4.2</p>	<p>La documentación que soporta que el LQA aplica de forma adecuada el método de ensayo para el análisis de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total se evidencia en los anexos del A al L.</p>
<p>Presentar los resultados del trabajo de grado como base para realizar una divulgación científica de los mismos.</p>	<p>De forma preliminar, se entregó al LQA un documento que se encuentra en construcción con los resultados del ensayo de fósforo total.</p>

Tabla 4. Resultados validación del ensayo Fósforo total y Fósforo Disponible Total

CONCLUSIONES

Se validó el ensayo de Fósforo Total a través de los parámetros característicos como Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango lineal y de trabajo, sensibilidad y porcentaje de recuperación lo que permitió concluir que el método es apto para el alcance y uso propuesto en el numeral 1 del anexo C.

Se validó el ensayo de Fósforo Disponible Total a través de los parámetros característicos como Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango lineal y de trabajo, sensibilidad y porcentaje de recuperación lo que permitió concluir que el método es apto para el alcance y uso propuesto en el numeral 1 del anexo I.

Se estimó la incertidumbre de medición asociada a los ensayos de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total lo que genera una mayor confianza en la validez del resultado permitiendo establecer las fuentes que en mayor proporción contribuyen a la misma para tomar acciones correctivas, eliminar errores sistemáticos y obtener resultados analíticos más confiables.

Para los ensayos de Fósforo Total y Fósforo Disponible Total se estableció que cada una de las mediciones involucradas en los ensayos son trazables a las unidades del Sistema Internacional.

Con la documentación generada (anexos del A al L) a través del desarrollo del presente trabajo se demostró que el método de ensayo para determinar fósforo utilizado por el Laboratorio de Química Ambiental es apropiado para el uso específico previsto.

Se elaboró un documento con la estructura de un artículo con base en los resultados del ensayo de Fósforo Total que fue entregado al Laboratorio de Química Ambiental con el objetivo de presentarlo posteriormente ante una revista de carácter científico cuyos temas de interés sean del ámbito ambiental.

RECOMENDACIONES

Como oportunidad de mejora se sugiere analizar un duplicado de una muestra adicionada simultáneamente con los ensayos para evaluar la precisión y el porcentaje de recuperación del analito de interés, cumpliendo así en su totalidad con los nuevos controles de calidad estipulados en el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd Ed.*

Se sugiere que para el ensayo de Fósforo Total se digieran los patrones de la curva de calibración al igual que el patrón de control y se comparen los resultados obtenidos sin digestión utilizando un patrón o muestra de concentración conocida para observar si existen pérdidas del analito que se puedan disminuir.

REFERENCIAS

- [1] International Organization for Standardization. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. NTC-ISO/IEC 17025:2005
- [2] Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales, IDEAM. Resolución No. 0425 del 28 de Febrero de 2011.
- [3] American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd. Washington, D.C., 2012.
- [4] MetAs & Metrólogos Asociados. El Proceso de Medición. No. 09 (La Guía MetAs, 2007). Pág. 1 – 3.
- [5] MetAs & Metrólogos Asociados. Herramientas de la metrología en sistemas de calidad. No. 09 (La Guía MetAs, 2004). Pág. 1 – 5.
- [6] MetAs & Metrólogos Asociados. Cartas de control para instrumentos de medición. No. 06 (La Guía MetAs, 2004). Pág. 1 – 5.
- [7] MetAs & Metrólogos Asociados. Capacidad de medición. No. 03 (La Guía MetAs, 2006). Pág. 2 – 8.
- [8] MetAs & Metrólogos Asociados. Expresión e interpretación de resultados experimentales en metrología. No. 05 (La Guía MetAs, 2007). Pág. 1 – 12.
- [9] Metrología – Abreviada. 3^a Ed. EURAMET, 2008. Pág 13 – 18.
- [10] La importancia de la validación. En: Técnicas de Laboratorio. No 269 (_____, 2002); p.110 – 111.
- [11] GREEN, JM. A Practical Guide to Analytical Method Validation. No. 68 (Analytical Chemistry, 1996). Pág. 305A - 309A.
- [12] RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. Exactitud y Trazabilidad. En: Técnicas de Laboratorio. No 254 (_____, 2000); p. 591 – 594.
- [13] RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. Incertidumbre y Precisión. En: Técnicas de Laboratorio. No 266 (_____, 2001); p.834 – 837.

- [14] DE BIÈVRE, P. Measurement results without statements of reliability (uncertainty) should not be taken seriously. No 6 (Accreditation and Quality Assurance, 1997); p. 269
- [15] RIUS, F. Xavier. MAROTO, Alicia. BOQUÉ, Ricard. RIU, Jordi. La validación de Métodos Analíticos. En: Técnicas de Laboratorio. No 252 (_____, 2000); Pág. 382 – 385.
- [16] The fitness for purpose of analytical methods: A laboratory guide to method validation and related topics. Eurachem. 1998
- [17] Quantifying uncertainty in analytical measurement. Eurachem / CITAC guide. 2nd Ed. 2000
- [18] SCHIMID, Wolfgang. LAZOS, Ruben. Guía para estimar la incertidumbre de la medición. Centro Nacional de Metrología, CENAM. México, 2000.
- [19] Traceability in chemical measurements: A guide to achieving comparable results in chemical measurements. Eurachem / CITAC guide. 2003. Eurachem / CITAC guide. 2003
- [20] _____. FMEA. Disponible en línea: <http://www.quality-one.com/fmea>. Consultado: Agosto de 2012.
- [21] NAGENDRAPPA, G; MAHADEVAIAH, M; YOGENDRA KUMAR, M; ABDUL GALIL, M; SURESHA, M. A Simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. No. 4 (E-Journal of Chemistry, 2007) Pág. 467 – 473.
- [22] MCKELVIE, I; PEAT, D; WORSFOLD, P. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. No.10 (Analytical Proceedings Including Analytical Communications, 1995) Pág. 437- 445.
- [23] ROBARDS, K; MCKELVIE, I; BENSON, R; WORSFOLD, P; BLUNDELL, N; CASEY, H Determination of carbon, phosphorus, nitrogen and silicon species in waters. No. 3 (Analytica Chimica Acta, 1994) Pág 147-190.
- [24] WORSFOLD, P; GIMBERT, L; MANKASINGH, U; OMAKA, O; HANRAHAN, G; GARDOLINSKI, P; HAYGARTH, P; M; TURNER, B; KEITH-ROACH, M; MCKELVIE, I. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. No. 2 (Talanta, 2005) Pág. 273 – 293
- [25] HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill: USA, 2000. Pág. 35 – 47

ANEXOS

Anexo A. Puntos críticos del ensayo Fósforo total

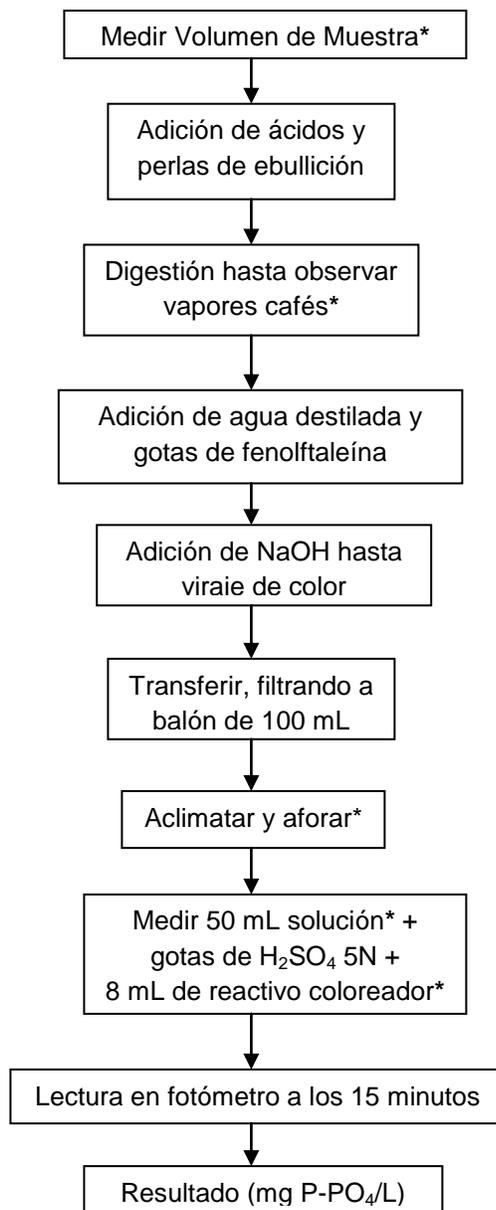


Figura 2. Puntos críticos del ensayo Fósforo Total.

En la figura 2, se esquematiza el análisis de fósforo total con los puntos críticos (*).

Nota: Para la adecuada preparación del reactivo coloreador remitirse al *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd. 2012. Método 4500 P – E.

Anexo B. AMEF Fósforo total

Descripción del Proceso		Modo de falla potencial	Causas de falla potencial	Ocurrencia	Efecto de falla potencial	Severidad	Controles actuales	Detección	NPR	Acciones recomendadas	Área/proceso/persona responsable
Etapas del proceso											
1	Medir 100 mL Mx y transferirlos a balón Kjeldahl	Medir más o menos del volumen indicado	Manejo incorrecto de la pipeta	3	Datos inexactos	8	Entrenamiento para realizar el pipeteado correctamente	2	48		Analista LQA
2	Adicionar 5 mL HNO ₃ conc, 1 mL H ₂ SO ₄ conc y Perlas de ebullición	No agregar alguno de los dos ácidos ó perlas de ebullición	Falta de atención en el orden de adición de los ácidos o de las perlas	3	Determinación de sólo una parte de fósforo como ortofosfatos en la muestra	8	Leer SOP del ensayo	2	48		
3	Ubicar balón en hornilla, girar perrilla a posición 3 y encender digestor	Ubicar perrilla en posición incorrecta. No encender digestor	Visualización equivocada de la posición indicada	2	Determinación de sólo una parte de fósforo como ortofosfatos en la muestra	8	Cerciorarse del buen estado y funcionamiento del digestor	2	32		
4	Digerir hasta observar vapores café	Detener calentamiento en un lapso de tiempo superior a la formación de vapores café	Dejar un tiempo excesivo la digestión	3	Determinación de sólo una parte de fósforo como ortofosfatos en la muestra	8	Emplear un temporizador para la revisión del tiempo de digestión	2	48	Apagar digestor luego de digerir todas las muestras	
5	Dejar enfriar a temperatura ambiente	No dejar enfriar el tiempo necesario	Premura para realizar etapa de neutralización	2	Procesamiento inadecuado de la muestra	3	Revisión de la temperatura del balón	2	12		
6	Agregar 20 mL Agua destilada y unas gotas de fenolftaleína.	Adicionar menos del volumen indicado. No agregar fenolftaleína	Determinación inadecuada de la cantidad de volumen. Falta de atención	2	Procesamiento inadecuado de la muestra	3	Utilizar una probeta adecuada para medir el volumen. Revisar el estado del indicador	2	12		
7	Neutralizar con NaOH 33% hasta viraje a color rosa pálido	Agregar más NaOH del requerido	Dispensar más gotas de las necesarias	4	Procesamiento inadecuado de la muestra	3	Agitar solución adecuadamente	1	12		
8	Filtrar solución neutralizada a balón de 100 mL	Mala agitación antes de filtrar contenido	Agitación inapropiada	2	Pérdida de muestra	3	Observar que la solución posea una ligera coloración rosa	2	12		
9	Agregar agua de lavados	Mala agitación antes de filtrar contenido	Agitación inapropiada	2	Pérdida de muestra	3	Utilizar siempre agua destilada	2	12		
10	Aclimatar a 20 °C en baño termostado y luego aforar	No dejar aclimatar el tiempo requerido. Aforar incorrectamente	Tiempo insuficiente para aclimatar. Visualización inadecuada del aforo	3	Disminución de la concentración de fósforo	8	Verificar temperatura del baño	2	48	Observar que la temperatura del baño esté a 20 °C	
11	Medir 50 mL de Mx adicionándola en beaker de 100 mL	Medir más o menos del volumen indicado	Determinación inadecuada de la cantidad de volumen	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Revisión del funcionamiento de las pipetas	2	48		
12	Agregar H ₂ SO ₄ 5N para eliminar coloración	Adicionar más volumen del necesario	Dispensar más gotas de las necesarias	3	Procesamiento inadecuado de la muestra	3	Adicionar el ácido gota a gota	2	18		
13	Adicionar 8 mL Reactivo Coloreador y agitar	Adicionar más o menos del volumen indicado	Determinación inadecuada de la cantidad de volumen	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Preparar siempre el reactivo coloreador antes de realizar el ensayo	1	24	Preparar sólo la cantidad necesaria de acuerdo con el número de muestras	
14	Calentar lámparas mínimo 10 minutos, hacer lecturas después de 15 minutos pero antes de 30 minutos	No permitir el calentamiento previo de las lámparas y realizar lecturas fuera del tiempo indicado	No realizar el procedimiento en los tiempos indicados	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Verificar encendido de todo el equipo. Efectuar las mediciones antes de 30 minutos	2	48	Verificar que se haya cargado el método de fosfatos	

Tabla 5. AMEF Fósforo total

Anexo C. Plan de validación Fósforo total

1. Alcance

El método es apropiado para determinar Fósforo Total (como ortofosfatos) en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales (domésticas e industriales), en el rango comprendido entre 0.03 mg P-PO₄/L y 0.60 mg P-PO₄/L.

2. Principio

Este método es aplicable para la determinación de Fósforo Total por conversión de las formas de fósforo a ortofosfatos por medio de una digestión ácida, seguida de una determinación colorimétrica, en la cual el molibdato de amonio y el tartrato antimonolítico de potasio reaccionan en medio ácido con ortofosfatos para formar un heteropoliácido (Ácido Fosfomolibdico) de color amarillo pálido, que es reducido por el ácido ascórbico a molibdeno de color azul, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito²³ y puede ser determinado por fotometría a 880 nm, donde las reacciones que se llevan a cabo se representan por medio de las ecuaciones 1 y 2:^{24,25,26}



3. Criterios de Aceptación

Exactitud expresada como porcentaje de error (% E) menor ó igual al 10 % para patrones.

Precisión expresada como porcentaje de coeficiente de variación (% CV) menor ó igual al 10 % para los patrones y muestras.

²³ American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd. Washington, D.C., 2012.

²⁴ McKELVIE, I; PEAT, D; WORSFOLD, P. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. No.10 (Analytical Proceedings Including Analytical Communications, 1995) Pág. 437- 445.

²⁵ ROBARDS, K; MCKELVIE, I; BENSON, R; WORSFOLD, P; BLUNDELL, N; CASEY, H Determination of carbon, phosphorus, nitrogen and silicon species in waters. No. 3 (Analytica Chimica Acta, 1994) Pág 147-190.

²⁶ WORSFOLD, P; GIMBERT, L; MANKASINGH, U; OMAKA, O; HANRAHAN, G; GARDOLINSKI, P; HAYGARTH, P; M; TURNER, B; KEITH-ROACH, M; MCKELVIE, I. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. No. 2 (Talanta, 2005) Pág. 273 - 293

4. Parámetros de Validación

Se considera que aplican para la validación los siguientes parámetros: Límite de cuantificación y detección, rango lineal y de trabajo, exactitud y precisión, porcentaje de recuperación y sensibilidad.

4.1 Límites de detección LD y de cuantificación LC

Previamente a la validación del método se realizaron varios ensayos analizando patrones de diferente concentración, con el fin de determinar cuál de ellos cumple con los criterios de aceptación establecidos en cuanto a exactitud expresada como % E y precisión como % CV. Posterior a la selección del estándar adecuado y con el objetivo de ratificar el límite de cuantificación experimental, se evaluarán réplicas de un patrón de concentración 0.03 mg P-PO₄/L.

4.2 Rango Lineal

Para la determinación del rango lineal se analizarán una serie de patrones que comprendan aproximadamente el rango sugerido por el método (Según *Standard Methods* Ed 22. de 0.15 a 1.3 mg P-PO₄/L).

4.3 Rango de trabajo

Con base en el resultado del rango lineal se definirá el rango de concentraciones en los cuales se obtengan resultados coherentes con los criterios de calidad especificados por el laboratorio. El patrón más bajo será la concentración definida como límite de cuantificación.

4.4 Exactitud

Con el fin de evaluar la exactitud del método se analizarán diariamente 2 réplicas, durante 7 días, de 3 estándares de diferente concentración. Los estándares se preparan a partir de diluciones de la solución madre de 50 mg P-PO₄/L:

- **Solución Madre:** Concentración teórica de 50 mg P-PO₄/L, preparada por pesada directa de 0.2195 g de Fosfato monobásico de Potasio MR, secado previamente a 105 °C por 1 hora y disuelto en 1 L de agua destilada aforando a 20 °C.
- **Patrón Intermedio:** Concentración teórica de 2.5 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 10 mL de la solución madre y diluyendo a 200 mL con agua destilada aforando a 20 °C.

- **Estándar Bajo, Eb:** Concentración teórica de 0.03 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 3 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 250 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Estándar Medio, Em:** Concentración teórica de 0.30 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 30 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 250 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Estándar Alto, Ea:** Concentración teórica de 0.60 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 60 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 250 mL con agua destilada aforando a 20 °C.

4.5 Precisión

Para evaluar la precisión del método se analizarán diariamente réplicas de estándares y muestras dentro del rango de aplicación del método. La precisión se evaluará en términos de Repetibilidad y de Repetibilidad intermedia de los estándares.

Así mismo se incluirán 2 muestras naturales cuyos valores de fósforo (como ortofosfato) se encuentran dentro del rango de aplicación del método. El objeto de incluir muestras en este parámetro es conocer la precisión en términos de %CV cuando se analizan duplicados de muestras; a la vez que se analiza específicamente para esta determinación el efecto de las diluciones sobre el resultado.

M1 → Muestra PTAR – UTP

ARD – Efluente. Con una concentración de fósforo cercana a 0.30 mg P-PO₄/L.

M2 → Muestra PTAR – UTP

ARD – Afluente. Con una concentración de fósforo cercana a 0.32 mg P-PO₄/L con un factor de dilución, FD = 20 veces.

Estándares y muestras	Eb	Em	Ea	M1	M2
Concentración mg P-PO ₄ /L	0.03	0.30	0.60	Aprox. 0.30	Aprox.0.32

4.5.1 Precisión en términos de Repetibilidad

El analista responsable aplicará el método a todos los estándares y muestras propuestas durante 7 días en la validación.

4.5.2 Precisión en términos Repetibilidad intermedia

El analista sustituto aplicará el método a todos los estándares y muestras propuestos.

4.5.3 Reproducibilidad

Se evaluará la Desviación estándar media de las series de mediciones. En esta prueba es posible evaluar la dispersión de cada una de las series de datos (s) frente al número total de datos (N) y al número total de series de mediciones (k).

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) s_i^2}$$

Donde:

n = Número de mediciones por serie

N = Número total de mediciones

k= Número de series de mediciones.

Se espera que la desviación estándar media de las series de mediciones cumpla con los criterios de aceptación establecidos.

4.6 Recuperación

Con el fin de evaluar el porcentaje de recuperación se analizará 1 muestra de agua (M1) que contiene una concentración aproximada de 0.30 mg P-PO₄/L a la cual se le efectuará una adición baja (Ab) de aproximadamente 0.06 mg P-PO₄/L (20%) y una adición alta (Aa) de aproximadamente 0.16 mg P-PO₄/L (53%) de la concentración de la muestra.

La muestra y las muestras adicionadas se analizarán por el analista responsable durante 7 días en la validación. El analista sustituto efectuará el análisis durante 2 días al final de la validación. A partir de los valores promedio obtenidos, cada día,

para la muestra y de los valores promedio obtenidos, cada día, para las adiciones se calculará el porcentaje de recuperación. Una vez terminada la validación se espera obtener un porcentaje de recuperación de $100\% \pm 20\%$.

Las adiciones sugeridas se harán diariamente, a partir de una solución patrón de 5.0 mg P-PO₄/L y una solución patrón de 10 mg P-PO₄/L. La preparación de las muestras adicionadas se describe a continuación:

- **Patrón de 5.0 mg P-PO₄/L:** Preparado por dilución, midiendo 10 mL de la solución madre y diluyendo a 100 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Patrón de 10.0 mg P-PO₄/L:** Preparado por dilución, midiendo 10 mL de la solución madre y diluyendo a 50 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **M1 + Ab:** Medir 250 mL de la muestra M1, adicionarle 3 mL de solución patrón de 5.0 mg P-PO₄/L, homogenizando adecuadamente.
- **M1 + Aa:** Medir 250 mL de la muestra M1, adicionarle 4 mL de solución patrón de 10.0 mg P-PO₄/L, homogenizando adecuadamente.

4.7 Sensibilidad

En el LQA se ha establecido que la determinación de la sensibilidad aplica a procedimientos de ensayo en los que se requiera la construcción de curvas de calibración. La sensibilidad estará dada por el valor promedio de la pendiente de las curvas de calibración obtenidas durante la validación.

5. Materiales

5.1 Equipos

Estufa de secado marca Binder

Balanza analítica marca Sartorius BP 221 S

Cabina de extracción de gases y humos marca C4 modelo C 120X

Agitador magnético marca Heidolph MR 3001 con barras magnéticas

Termóstato marca Julabo modelo F34

Digestor de Fósforo marca Gerhardt tipo KI 16

Fotómetro marca Hewlett Packard modelo 8453

5.2 Reactivos

Agua destilada
Fosfato monobásico de Potasio, MR
Ácido Nítrico concentrado
Ácido Sulfúrico concentrado
Hidróxido de Sodio p.a
Ácido Sulfúrico 5 N
Tartrato antimonalítico de potasio p.a
Molibdato de amonio p.a
Ácido Ascórbico p.a
Fenolftaleína

5.3 Material de Vidriería

Balones de digestión Kjeldahl
Balones aforados de 100 mL, 200 mL, 250 mL, 1000 mL. Clase A
Pipetas aforadas de 3 mL, 4 mL, 8 mL, 10 mL, 15 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL.
Pipetas graduadas de 10 mL.
Beakers de 100 mL, 250 mL, 1000 mL.
Erlenmeyer de 100 mL, 250 mL.
Probetas de 50 mL y 100 mL
Embudos de 5 cm de diámetro
Espátula
Frasco lavador
Varilla de vidrio
Papel filtro cualitativo Munktell No. 125

Anexo D. Resultados validación Fósforo total

1. Recolección de datos

En la tabla 6, se encuentra el consolidado de datos producto de la validación y en la tabla 7 el consolidado de la muestra adicionada.

Fecha	VARIABLE	Valor nominal (mg/L)	0,03		0,30		0,60		NA		NA		NA		100	NA	NA	100
		Análito	Estándar bajo (Eb)		Estándar medio (Em)		Estándar alto (Ea)		Muestra baja (M1)		Muestra alta (M2)		Muestra baja + Adición Baja (M1Ab)		%R (M1Ab)	Muestra baja + Adición Alta (M1Aa)		%R (M1Aa)
		Uso	LDM, LCM, Exactitud, Precisión	Promedio	Exactitud, precisión. Creación de Cartas de control	Promedio	Exactitud, precisión	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada
		Unidades	mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		%R	mg/L	mg/L	%R
Día	Analista																	
07/05/2012	Día 1	Oscar Cuéllar	0,030 0,031	0,03	0,285 0,286	0,29	0,56 0,56	0,56	0,28 0,28	0,28	6,36 6,37	6,37	0,33 0,33	0,33	89,9	0,42 0,42	0,42	91,7
08/05/2012	Día 2	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,285 0,285	0,29	0,58 0,58	0,58	0,29 0,29	0,29	6,36 6,37	6,37	0,36 0,36	0,36	124	0,45 0,45	0,45	105
10/05/2012	Día 3	Oscar Cuéllar	0,027 0,027	0,03	0,261 0,261	0,26	0,58 0,56	0,57	0,29 0,29	0,29	6,31 6,32	6,32	0,34 0,34	0,34	90,1	0,43 0,43	0,43	91,8
30/07/2012	R/ Día 4	Oscar Cuéllar	0,033 0,032	0,03	0,286 0,286	0,29	0,57 0,55	0,56	0,30 0,30	0,30	6,22 6,23	6,23	0,35 0,35	0,35	90,3	0,45 0,46	0,46	101
14/05/2012	Día 5	Oscar Cuéllar	0,027 0,026	0,03	0,286 0,288	0,29	0,58 0,58	0,58	0,30 0,30	0,30	6,28 6,30	6,29	0,34 0,34	0,34	73,5	0,43 0,43	0,43	85,6
01/08/2012	R/ Día 6 (mañana)	Oscar Cuéllar	0,032 0,031	0,03	0,305 0,305	0,31	0,55 0,55	0,55	0,28 0,28	0,28	6,34 6,35	6,35	0,33 0,33	0,33	89,9	0,43 0,42	0,43	94,9
16/05/2012	Día 7	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,273 0,273	0,27	0,57 0,57	0,57	0,29 0,29	0,29	6,25 6,29	6,27	0,33 0,33	0,33	73,3	0,42 0,42	0,42	85,5
22/06/2012	Día 6 (Sustituto 1)	Mauricio Camacho	0,030 0,030	0,03	0,293 0,301	0,30	0,57 0,58	0,58	0,30 0,30	0,30	6,28 6,42	6,35	0,35 0,36	0,36	98,8	0,45 0,39	0,42	79,2
25/06/2012	Día 7 (Sustituto 1)	Mauricio Camacho	0,029	0,03	0,265 0,283	0,27	0,55 0,55	0,55	0,31 0,31	0,31	6,12 6,14	6,13	0,35 0,36	0,36	82,1			
22/05/2012	Día 6 (Sustituto)	Mónica Rodas	0,031 0,028	0,03	0,303 0,303	0,30	0,58 0,60	0,59	0,35 0,34	0,35			0,39 0,40	0,40	91,2	0,48 0,49	0,48	90,6
30/07/2012	Día 7 (Sustituto)	Mónica Rodas	0,035 0,031	0,03	0,290 0,280	0,29	0,57 0,57	0,57										
Total datos		n	21		22		22		19		18		20			18		
Prueba F		ProControl	Ver registros Procontrol															
Prueba t		ProControl	Ver registros Procontrol															
Rango		Mínimo	0,03	0,03	0,27	0,27	0,55	0,55	0,28	0,28	6,12	6,13	0,33	0,33	73,3	0,39	0,42	79
		Máximo	0,04	0,03	0,31	0,31	0,60	0,59	0,35	0,35	6,42	6,37	0,40	0,40	124	0,49	0,48	105
Media		\bar{x}	0,03	0,03	0,29	0,29	0,57	0,57	0,30	0,30	6,30	6,30	0,35	0,35	90	0,44	0,44	92
Desviación		s	0,00	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,02	0,02	0,08	0,08	0,02	0,02	14,30	0,02	0,02	7,93
Coeficiente variación		%CV	7,22		4,63		2,37		6,34		1,27		1,24		5,61		5,70	
Error		%Error	-0,06		-4,80		-5,22		NA		NA		NA		NA		-9,70	
LDM		3s	0,01															
LCM		10s	0,02															

Tabla 6. Consolidado de datos validación Fósforo Total

Fecha	VARIABLE	Valor nominal (mg/L)	NA		NA		100,0		NA	NA	100,0	
		Analito	Muestra baja (M1)		Muestra baja + Adición Baja		%R (M1Ab)		Muestra baja + Adición Alta		%R (M1Aa)	
		Uso	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Promedio
		Unidades	mg/L		mg/L		%R		mg/L	mg/L	%R	%R
		Día	Analista									
07/05/2012	Día 1	Oscar Cuéllar	0,28	0,28	0,33	0,33	90	89,9	0,42	0,42	92	91,7
			0,28		0,33		90		0,42		92	
08/05/2012	Día 2	Oscar Cuéllar	0,29	0,29	0,36	0,36	124	124	0,45	0,45	105	105
			0,29		0,36		124		0,45		105	
10/05/2012	Día 3	Oscar Cuéllar	0,29	0,29	0,34	0,34	90	90,1	0,43	0,43	92	91,8
			0,29		0,34		90		0,43		92	
30/07/2012	R/ Día 4	Oscar Cuéllar	0,30	0,30	0,35	0,35	90	90,3	0,45	0,46	98	101
			0,30		0,35		90		0,46		105	
14/05/2012	Día 5	Oscar Cuéllar	0,30	0,30	0,34	0,34	73	73,5	0,43	0,43	86	85,6
			0,30		0,34		73		0,43		86	
01/08/2012	R/ Día 6 (mañana)	Oscar Cuéllar	0,28	0,28	0,33	0,33	90	89,9	0,43	0,43	98	94,9
			0,28		0,33		90		0,42		92	
16/05/2012	Día 7	Oscar Cuéllar	0,29	0,29	0,33	0,33	73	73,3	0,42	0,42	85	85,5
			0,29		0,33		73		0,42		85	
22/06/2012	Día 6 (Sustituto 1)	Mauricio Camacho		0,30	0,35	0,36		107	0,45	0,42	286	173
			0,30		0,36		107		0,39		60	
25/06/2012	Día 7 (Sustituto 1)	Mauricio Camacho	0,31	0,31	0,35	0,35	74	73,7				
			0,31		0,35		74					
28/06/2012	Día 6 (Sustituto)	Mónica Rodas	0,35	0,35	0,39	0,40	74	91,2	0,48	0,49	86	92,4
			0,34		0,40		108		0,49		99	
26/06/2012	Día 7 (Sustituto)	Mónica Rodas										
Total datos		n	19		20		19		18		18	
Prueba F		ProControl	Ver registros ProControl									
Prueba t		ProControl	Ver registros ProControl									
Rango		Mínimo	0,28	0,28	0,33	0,33	73,3	73,3	0,39	0,42	60,2	85
		Máximo	0,35	0,35	0,40	0,40	124	124	0,49	0,49	286	173
Media		\bar{x}	0,30	0,30	0,35	0,35	89	90	0,44	0,44	102	102
Desviación		s	0,02	0,02	0,02	0,02	16,31	15,86	0,02	0,02	46,93	27,24
Coeficiente variación		%CV	6,34	6,32	5,56	5,67	18,24	17,56	5,48	5,05	45,88	26,64
Error		%Error	NA	NA	NA	NA	NA	-9,70	NA	NA	NA	2,29
LDM		3s										
LCM		10s										

Tabla 7. Consolidado de datos muestra adicionada validación Fósforo Total

1.1 Límite de detección y Límite de cuantificación

En la tabla 8, se muestran los ensayos realizados para determinar el Límite de detección LD y el Límite de cuantificación LC. Los criterios de aceptación para %E y %CV son del 5%.

El Límite de cuantificación definido fue de 0,03 mg P-PO₄/L; si bien el patrón de 0,02 mg P-PO₄/L también cumple con los requisitos establecidos, se optó por el estándar de mayor concentración para trabajar con un mayor margen de seguridad.

El límite de detección definido fue de 0,01 mg P-PO₄/L

	Ensayo 1			Ensayo 2				Ensayo 3			Ensayo 4	
mg/L P-PO ₄	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03
	0,010	0,021	0,036	0,011	0,021	0,030	0,040	0,011	0,020	0,030	0,021	0,030
	0,012	0,026	0,035	0,010	0,020	0,030	0,040	0,011	0,020	0,030	0,020	0,031
	0,014	0,025	0,036	0,011	0,022	0,031	0,041	0,011	0,021	0,031	0,021	0,031
	0,014	0,025	0,038	0,012	0,023	0,031	0,040	0,011	0,022	0,030		
	0,013	0,026	0,038	0,009	0,023	0,031	0,040	0,010	0,020	0,031		
	0,013	0,025	0,038	0,010	0,019	0,031	0,041	0,010	0,020	0,030		
Promedio	0,013	0,025	0,037	0,010	0,021	0,031	0,040	0,011	0,020	0,030	0,021	0,031
Desviación	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
% CV	12,0	7,2	3,3	6,7	7,7	1,1	1,1	5,3	3,9	0,9	0,9	1,3
%Error	25,8	23,1	23,1	4,6	6,0	1,9	0,6	8,2	2,3	1,2	2,8	1,9

Tabla 8. Ensayos Límite de Cuantificación Fósforo total

1.2 Rango Lineal

El rango lineal se encuentra entre 0,02 mg P-PO₄/L y 1,2 mg P-PO₄/L, como se observa en la figura 3.

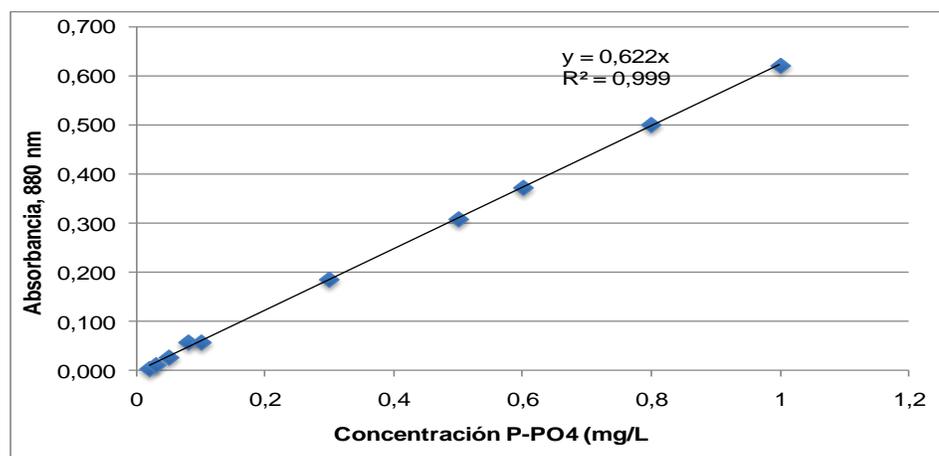


Figura 3. Rango lineal ensayo Fósforo total

1.3 Rango de trabajo

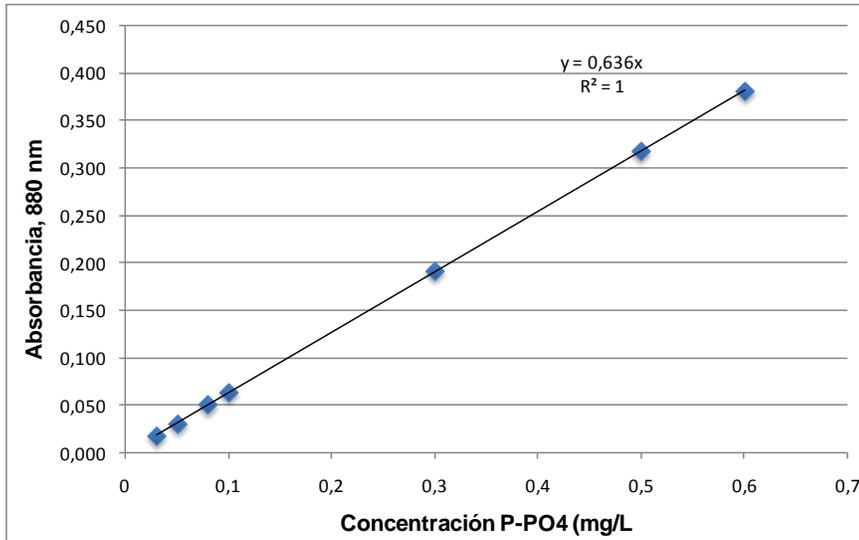


Figura 4. Rango de trabajo ensayo Fósforo total

Si bien el rango lineal se encuentra comprendido entre 0,02 mg P-PO₄/L y 1,2 mg P-PO₄/L, se optó por el rango de trabajo comprendido entre 0,03 mg P-PO₄/L y 0,60 mg P-PO₄/L (Ver figura 4), lo cual obliga a que se realicen diluciones a muestras que estén por encima de esta concentración, dado que durante la estandarización se encontró que algunas muestras con concentraciones superiores a 1,2 mg P-PO₄/L entraban en el rango de trabajo (sesgo negativo), causando errores en la cuantificación, pues una vez se efectuaban diluciones se encontraba que su concentración era mayor.

1.4 Exactitud

En cuanto a la exactitud, evaluada a través del %E de los estándares, se pudo evidenciar que el método cumple con el criterio de aceptación establecido en el literal tres del anexo C.

1.5 Precisión

La precisión de la medición se evaluó bajo condiciones de Repetibilidad y de reproducibilidad. En cuanto a la precisión, evaluada a través del %CV, se pudo evidenciar que el método cumple con los criterios de aceptación establecidos en el literal tres del anexo C para todos los estándares.

Las muestras naturales presentan %CV del 6,32% y 1,24%, sin embargo esta variabilidad no afecta los resultados analíticos de las muestras que se analizan habitualmente en el laboratorio porque para el ensayo de Fósforo total se ha establecido una prioridad 3 en la ejecución de los ensayos con lo cual se garantiza que el análisis de Fósforo se efectúe de acuerdo al tiempo máximo de almacenamiento establecido en el DE 097.

De manera general, las pruebas F y T realizadas (Los datos pertenecen al LQA, razón por la cual no se muestran), con el software estadístico Procontrol®, no muestran diferencias significativas entre las varianzas, motivo por el cual, se considera que existe Repetibilidad y Repetibilidad intermedia entre el analista responsable y el analista sustituto.

La desviación estándar media del método es 3,96 %CV, valor que se calculó a través del software estadístico Procontrol con un 95% de seguridad estadística, el cual proporciona evidencia de condiciones de reproducibilidad y que se encuentra por debajo de los criterios de aceptación establecidos en el LQA.

1.6 Recuperación

De acuerdo con la tabla 7, los porcentajes de recuperación obtenidos para la muestra adicionada fueron del 90% para la adición baja y 92% para la adición alta.

Los porcentajes de error obtenidos tanto para la adición baja (2,78%) como para la adición alta (8,70%) son menores al 20%, evidenciando que no existen efectos de matriz.

1.7 Sensibilidad

El valor promedio de la pendiente de las curvas de calibración obtenidas durante la validación fue de 0,636 cuyo valor se traduce en la sensibilidad del método.

1.8 Límites de control establecidos para las cartas de control

Después de haber efectuado la validación del método se han definido los siguientes límites de control (**LCS = 0,29 mg/L** y **LCI = 0,28 mg/L**) para el estándar medio, de acuerdo con la tabla 9. Sin embargo estos límites son muy estrechos y no reflejan en realidad la variación del proceso de medición, por eso para elaborar la carta de control del método se hará con base los límites de control por especificación (**LCS = 0,33 mg/L** y **LCI = 0,27 mg/L**).

Patrón 0,30 mg/L					
Día	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	0,285	0,286	0,285	0,286	0,001
	0,286				
2	0,285	0,285	0,285	0,285	0,000
	0,285				
3	0,261	0,261	0,261	0,261	0,000
	0,261				
4	0,286	0,286	0,286	0,286	0,000
	0,286				
5	0,286	0,287	0,286	0,288	0,002
	0,288				
6	0,305	0,305	0,305	0,305	0,000
	0,305				
7	0,273	0,273	0,273	0,273	0,000
	0,273				
1 Sustituto	0,293	0,297	0,293	0,301	0,008
	0,301				
2 Sustituto	0,265	0,274	0,265	0,283	0,018
	0,283				
1 Sustituto 2	0,303	0,303	0,303	0,303	0,000
	0,303				
Promedios		0,286	0,284	0,287	0,003
Promedio			0,29	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A ₂			1,88	NA	
Promedio Rango			0,003	mg/L	
LCS			0,29	mg/L	
LCI			0,28	mg/L	
LCS (Por Especific. 10%)			0,33	mg/L	
LCI (Por Especific. 10%)			0,27	mg/L	

Tabla 9. Datos para la carta de control de Fósforo total

1.9 Según resultados de la validación el método es apto para el alcance y el uso propuesto en el numeral 1 del anexo C.

Anexo E. Estimación de la incertidumbre del ensayo Fósforo total

1. Mesurando

Se mide la absorbancia a 880 nm del complejo de molibdeno proveniente de la reducción del ácido fosfomolibdico causada por el ácido ascórbico.

2. Modelo matemático

$$y = mx$$

Donde, y: Absorbancia

x: Concentración (mg P-PO₄/L)

m: Sensibilidad del método (L/mg P-PO₄)

3. Principio de medición

Las diferentes formas de fósforo presentes en la muestra se convierten a ortofosfatos por medio de una digestión ácida, luego mediante una determinación colorimétrica, en la cual el molibdato de amonio y el tartrato antimonolítico de potasio reaccionan en medio ácido con ortofosfatos para formar un heteropoliácido (Ácido Fosfomolibdico) de color amarillo pálido, que es reducido por el ácido ascórbico a molibdeno de color azul, se mide la absorbancia a 880 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

4. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Las siguientes consideraciones se tienen en cuenta para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo total:

- Temperatura de trabajo: 20 °C, utilizando un termóstato calibrado
- Agua destilada libre del analito de interés
- Reactivos grado analítico
- Fotómetro calibrado y correcto funcionamiento del equipo según Procedimiento Estándar de operación e Instrucción de trabajo.

Las posibles fuentes de incertidumbre se resumen en la tabla 10 y posteriormente se desarrollaran en la figura 5.

Procedimiento	Factor crítico en la cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 50 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de la solución intermedia de 2,5 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de la solución de trabajo de 0,3 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de muestra	X	
Preparación blanco de digestión		X
Digestión de muestra		X
Construcción curva de calibración	X	
Preparación blanco de curva de calibración		X
Lectura fotométrica de patrones y muestras	X	
Repetibilidad y reproducibilidad (R y r)	X	

Tabla 10. Fuentes de incertidumbre ensayo de Fósforo total.

5. Diagrama Causa – Efecto

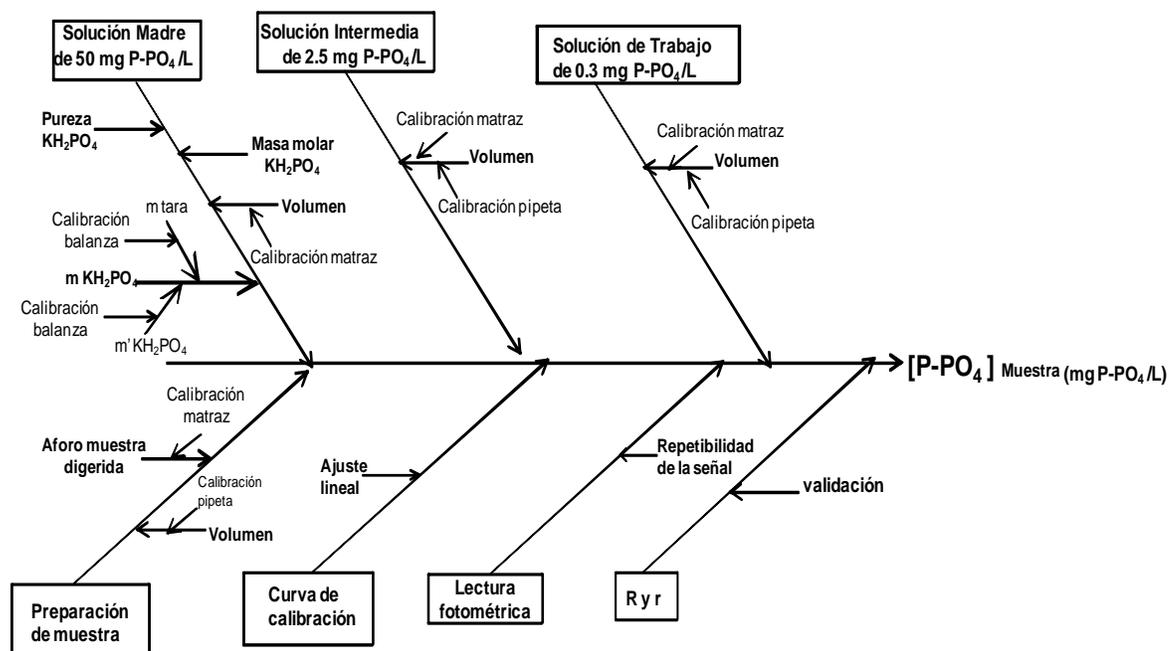


Figura 5. Diagrama Causa – Efecto ensayo Fósforo total

6. Cálculos

Fuente de Incertidumbre Magnitud de entrada X_i	Valor estimado x_i	Fuente de información	Incertidumbre original		Tipo de distribución	Incertidumbre estándar $u(x_i)$	Incertidumbre combinada (por fuente) s $u_c(x_i)$	Incertidumbre estándar relativa $U(x_i)/x_i$	$[u_c(x_i)/x_i]^2$
			Valor	Unidades					
PREPARACION DEL FOSFATO MONOBASICO DE POTASIO 50 mg/L									
Peso del Reactivo	0,2195			g			7,09322E-05	0,000323154	1,04E-07
Calibración de la balanza		Fabricante	0,000100626	g	B. normal. K=2	0,00005031			
tara		Fabricante	0,0001	g	B. normal. K=2	0,00005			
Pureza del Reactivo	0,9996	Certificado	0,0005	N/A	B. rectangular.	0,00029	0,00029	0,000288791	8,34E-08
Peso formula del reactivo	136			g/mol			0,000699906	5,14637E-06	2,65E-11
K		Referencia	0,0001	g/mol	B. rectangular	5,7735E-05			
H ₂		Referencia	0,00007	g/mol	B. rectangular	8,0829E-05			
P		Referencia	0,00002	g/mol	B. rectangular	1,1547E-06			
O ₂		Referencia	0,0003	g/mol	B. rectangular	6,9282E-04			
Dilución del reactivo	1000			N/A			0,065	0,000065	4,225E-09
Incertidumbre calibración del balón B20-1000		Calculada	0,13	mL	B. normal. K=2	0,065			
PREPARACION DE PATRONES INTERMEDIOS Y DE TRABAJO									
Preparación patrón de 2,5 mg/L				mg/L					
Incertidumbre calibración del balón B4-100	100	Calculada	0,02	mL	B. normal. K=2	0,01	0,01	0,0001	1,00E-08
Incertidumbre calibración de pipeta PV37	5	Calculada	0,01	mL	B. normal. K=2	0,005	0,005	0,001	1,00E-06
Preparación patrón de 0,3 mg/L				mg/L					
Incertidumbre calibración del balón B5-100	200	Calculada	0,13	mL	B. normal. K=2	0,065	0,065	0,000325	1,06E-07
Incertidumbre calibración de pipeta PV37	24	Calculada	0,02	mL	B. normal. K=2	0,02	0,02	0,000833333	6,94E-07
PREPARACION DE MUESTRAS									
Medición del volumen de muestra	100			mL			0,025	0,00025	6,25E-08
Incertidumbre calibración pipeta PV40		Calculada	0,05	mL	B. normal. K=2	0,025			
Aforo de la muestra después de digerirla	100			N/A			0,01	0,000100	1,00E-08
Incertidumbre calibración del balón B4-100		Calculada	0,02	mL	B. normal. K=2	0,01			
Señal del equipo por medición de muestras y patrones	0,3			UA			3,52E-03	1,174E-02	1,38E-04
Repetibilidad de la señal		Mediciones	6,10E-03	UA	A. normal	3,52E-03			
Incertidumbre de la curva de calibración ajustada por mínimos cuadrados	0,3			UA			0,0011	0,00366667	1,34E-05
Desviación en la medición de la ordenada (Absorbancia)		Cálculos	0,0011	UA					
Repetibilidad y reproducibilidad (R & r)	0,3			N/A			1,49E-03	4,96E-03	2,46E-05

Tabla 11. Formato para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo Total

En la tabla 11 se observan de donde provienen los valores para la estimación de la incertidumbre de medición del ensayo Fósforo total, por lo cual se aplicarán las ecuaciones 3 y 4:

$$\frac{U(x)}{x} = \sqrt{\sum \left(\frac{U(x_i)}{x_i}\right)^2} \quad (3)$$

Donde:

$$U(x_i) = \frac{\text{Incert. original}}{\text{Tipo de distribución}} \quad (4)$$

a. Incertidumbre por la solución madre de 50 mg P-PO₄/L, U_{SM}:

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = \sqrt{\left(\frac{7,09322 * 10^{-5}}{0,2195}\right)^2 + \left(\frac{0,00029}{0,9996}\right)^2 + \left(\frac{0,000699906}{136}\right)^2 + \left(\frac{0,065}{1000}\right)^2} = 4,38 * 10^{-4}$$

b. Incertidumbre por la solución intermedia de 2,5 mg P-PO₄/L, U_{SI}:

$$\frac{U_{(SI)}}{[SI]} = \sqrt{\left(\frac{0,01}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,005}{5}\right)^2} = 1,00 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por la solución de trabajo de 0,3 mg P-PO₄/L, U_{ST}:

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = \sqrt{\left(\frac{0,065}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{24}\right)^2} = 8,94 * 10^{-4}$$

d. Incertidumbre por preparación de la muestra, U_{Mx}:

$$\frac{U_{(Mx)}}{[Mx]} = \sqrt{\left(\frac{0,025}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,01}{100}\right)^2} = 2,69 * 10^{-4}$$

e. Incertidumbre por Lectura fotométrica, U_{LF}:

$$\frac{U_{(LF)}}{[LF]} = \sqrt{\left(\frac{3,52 * 10^{-3}}{0,3}\right)^2} = 1,17 * 10^{-2}$$

f. Incertidumbre por Repetibilidad y reproducibilidad, U_{Ryr}:

$$\frac{U_{(Ryr)}}{[Ryr]} = \sqrt{\left(\frac{1,49 * 10^{-3}}{0,3}\right)^2} = 4,96 * 10^{-3}$$

g. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC}:

La ecuación para estimar la incertidumbre por el ajuste lineal de la curva de calibración es la que se describe en 5:

$$U_{(CC)} = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_M - \bar{C})^2}{s_{xx}}}$$

(5)

Donde,

s: Desviación estándar residual regresión lineal

b: Pendiente curva de calibración

p: Número de mediciones de la muestra objeto de estudio

n: Número de patrones de la curva de calibración

C_M: Concentración de la muestra

\bar{C} : Concentración promedio de los patrones

S_{xx} : suma de cuadrados de los residuales de las concentraciones obtenidas

Para realizar el cálculo de \bar{C} , se utilizan los datos obtenidos en la validación, de forma tal que las concentraciones de los patrones se encuentran en la tabla 12:

Concentración del Patrón (mg P-PO ₄ /L)	Absorbancia
0,03	1,8441 E-2
0,05	3,0732 E-2
0,08	5,1293 E-2
0,10	6,3837 E-2
0,30	0,19219
0,50	0,31794
0,60	0,38184

Tabla 12. Curva de calibración Fósforo total

La ecuación de la recta se observa en 6: $y = 0,637x$ (6)

$$\bar{C} = \frac{0,03 + 0,05 + 0,08 + 0,10 + 0,30 + 0,50 + 0,60}{7}$$

$$\bar{C} = 0,24 \text{ mg P} - \text{PO}_4/\text{L}$$

S_{xx} y s se calculan mediante las ecuaciones 7 y 8:

$$S_{xxx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 \quad (7)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b_0 + b_i * C_i)]^2}{n - 2}} \quad (8)$$

Donde,

A_i : Absorbancia del patrón i

b_0 : Intercepto de la curva de calibración (en este caso = 0,00)

b_i : Pendiente de la curva de calibración

C_i : Concentración del patrón i

C_i	$(C_i - \bar{C})^2$
0,03	0,0441
0,05	0,0361
0,08	0,0256
0,10	0,0196
0,30	0,0036
0,50	0,0676
0,60	0,1296
$\sum (C_i - \bar{C})^2$	0,326

Por lo tanto, se tiene que:

$$S_{xx} = \sum_{i=1}^n (C_i - \bar{C})^2 = 0,326$$

C_i	A_i	$[A_i - (b_0 + b_i * C_i)]^2$
0,03	1,8441E-2	4,48E-7
0,05	3,0732 E-2	1,25E-6
0,08	5,1293 E-2	1,11E-7
0,10	6,3837 E-2	1,88E-8
0,30	0,19219	1,19E-6
0,50	0,31794	3,14E-7
0,60	0,38184	1,30E-7
	$\sum_{i=1}^n [A_i - (b_0 + b_i * C_i)]^2$	3,46E-6

De lo anterior se obtiene:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n [A_i - (b_0 + b_i * C_i)]^2}{n - 2}} = \sqrt{\frac{3,46 E - 6}{5}} = 8,32 E - 4$$

Se asumirá que la concentración de la muestra, C_M , es de 0,30 mg P-PO₄/L, que corresponde a la mitad del rango trabajo, para efectos prácticos de cálculo.

$$U_{(CC)} = \frac{8,32 E - 4}{0,637} \sqrt{\frac{1}{2} + \frac{1}{7} + \frac{(0,30 - 0,24)^2}{0,326}} = 0,0011$$

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = \sqrt{\left(\frac{0,0011}{0,3}\right)^2} = 3,67 * 10^{-3}$$

h. Incertidumbre combinada ensayo Fósforo total

Se combinan cada una de las contribuciones a la incertidumbre del ensayo.

$$\frac{U_{(P-PO_4/L)}}{[P - PO_4/L]} = \sqrt{\begin{matrix} (4,38 * 10^{-4})^2 + (1,00 * 10^{-3})^2 + (8,94 * 10^{-4})^2 + (2,69 * 10^{-4})^2 \\ + (1,17 * 10^{-2})^2 + (4,96 * 10^{-3})^2 + (3,67 * 10^{-3})^2 \end{matrix}}$$

$$\frac{U_{(P-PO_4/L)}}{[P - PO_4/L]} = 1,33 * 10^{-2}$$

i. Incertidumbre expandida, K = 2. Intervalo de Confianza = 95%

$$\frac{U_{(P-PO_4/L)}}{[P - PO_4/L]} = 1,33 * 10^{-2} * 2$$

$$\frac{U_{(P-PO_4/L)}}{[P - PO_4/L]} = 0,03$$

j. Expresión de los resultados

$$[P-PO_4/L]_{\text{muestra}} = [P-PO_4/L]_{\text{muestra}} \pm (0,03 * [P-PO_4/L]_{\text{muestra}})$$

k. Contribuciones a la incertidumbre de Fósforo total

En la figura 6 se observa como las diversas fuentes contribuyen a la incertidumbre del ensayo fósforo total.

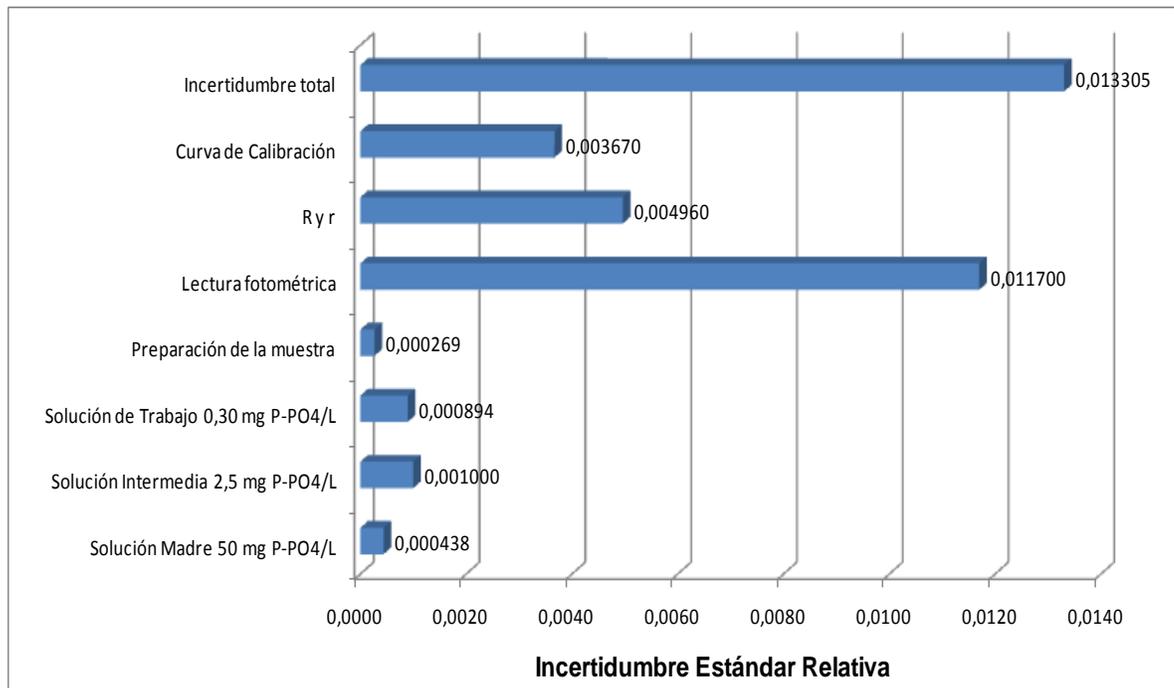


Figura 6. Contribuciones a la incertidumbre del ensayo Fósforo Total

Anexo F. Trazabilidad del ensayo Fósforo total

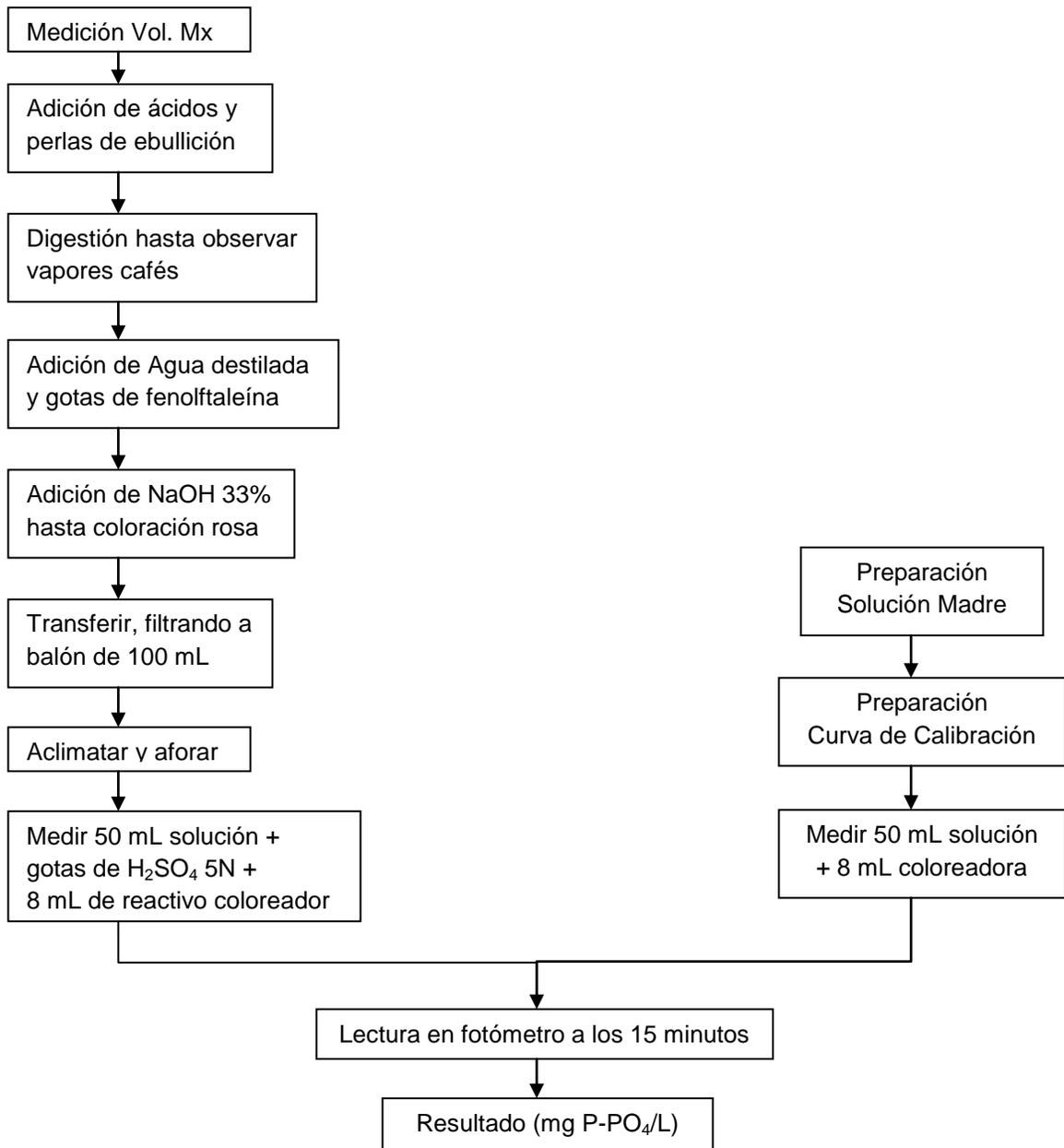


Figura 7. Esquema del ensayo Fósforo total

En la figura 7, se esquematizan las diferentes etapas para el ensayo de fósforo total de forma tal que se pueda tener un panorama general para establecer la trazabilidad del ensayo.

Aseguramiento de la trazabilidad

Medición Vol. Mx: La trazabilidad de la temperatura del termóstato se tiene por calibración con termómetro calibrado.

Se asegura la trazabilidad de la medición del volumen usando la pipeta bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Transferir, aclimatar y aforar a un balón de 100 mL: Se asegura la trazabilidad del balón mediante una calibración hecha en el laboratorio del material volumétrico y usando la solución a 20 °C.

Medir 50 mL solución + Gotas de H₂SO₄ 5N + 8 mL Reactivo coloreador: Se asegura la trazabilidad de la medición de los volúmenes de solución y coloreadora usando las pipetas bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Lectura en el Fotómetro: Se asegura la trazabilidad en la lectura mediante certificación de mantenimiento y tests del equipo realizada según el fabricante.

Preparación de la solución madre: La trazabilidad de la temperatura de la estufa para secar el material de referencia se tiene por verificación con termómetro calibrado.

Se asegura la trazabilidad del valor de la masa pesada del material de referencia mediante certificado de calibración de la balanza analítica y usándola bajo las condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

Se asegura la trazabilidad del balón mediante una calibración hecha en el laboratorio del material volumétrico.

Preparación de la Curva de Calibración: Se asegura la trazabilidad de las pipetas usándolas bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Se asegura la trazabilidad de los balones mediante una calibración hecha en el laboratorio del material volumétrico, y usando las soluciones a 20 °C.

Anexo G. Puntos críticos del ensayo Fósforo Disponible Total

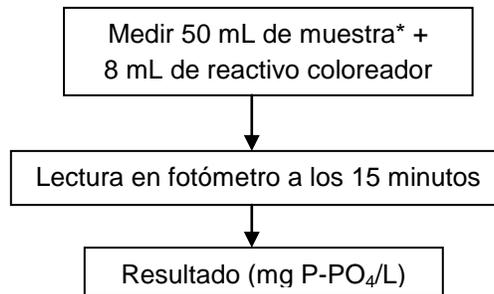


Figura 8. Puntos críticos del ensayo Fósforo Disponible Total

En la figura 8, se esquematiza el análisis de Fósforo Disponible Total con los puntos críticos (*).

Nota: Para la adecuada preparación del reactivo coloreador remitirse al *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 22nd. 2012. Método 4500 P – E.

Anexo H. AMEF Fósforo Disponible Total

Descripción del Proceso		Modo de falla potencial	Causas de falla potencial	Ocurrencia	Efecto de falla potencial	Severidad	Controles actuales	Detección	NPR	Acciones recomendadas
Etapas del proceso										
1	Medir 50 mL. Mx y transferirlos a un beaker de 100 mL.	Medir más o menos del volumen indicado	Manejo incorrecto de la pipeta	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Entrenamiento para realizar el pipeteado correctamente	2	48	
2	Adicionar 8 mL. Reactivo Coloreador y agitar	Adicionar más o menos del volumen indicado	Determinación inadecuada de la cantidad de volumen	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Preparar siempre el reactivo coloreador antes de realizar el ensayo	1	24	Preparar sólo la cantidad necesaria de acuerdo con el número de muestras
3	Calentar lámparas mínimo 10 minutos, hacer lecturas después de 15 minutos pero antes de 30 minutos	No permitir el calentamiento previo de las lámparas y realizar lecturas fuera del tiempo indicado	No realizar el procedimiento en los tiempos indicados	3	Reporte erróneo de fósforo. Sesgo negativo	8	Verificar encendido de todo el equipo. Efectuar las mediciones antes de 30 minutos	2	48	Verificar que se haya cargado el método de fosfatos

Tabla 13. AMEF Fósforo Disponible Total

Anexo I. Plan de validación Fósforo Disponible Total

1. Alcance

El método es apropiado para determinar Fósforo Disponible Total (como ortofosfatos) en aguas naturales (superficiales y subterráneas) y residuales (domésticas e industriales), en el rango comprendido entre 0.03 mg P-PO₄/L y 0.60 mg P-PO₄/L.

2. Principio

Este método es aplicable para la determinación de Fósforo Disponible Total por una determinación colorimétrica, en la cual el molibdato de amonio y el tartrato antimonolítico de potasio reaccionan en medio ácido con ortofosfatos para formar un heteropoliácido (Ácido Fosfomolibdico) de color amarillo pálido, que es reducido por el ácido ascórbico a molibdeno de color azul, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito²⁷ y puede ser determinado por fotometría a 880 nm, donde las reacciones que se llevan a cabo se representan por medio de las ecuaciones 1 y 2:^{28,29,30}



3. Criterios de Aceptación

Exactitud expresada como porcentaje de error (% E) menor ó igual al 10 % para patrones.

Precisión expresada como porcentaje de coeficiente de variación (% CV) menor ó igual al 10 % para los patrones y muestras

²⁷ American Public Health Association, American Water Works Association & Water Environment Federation. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd. Washington, D.C., 2012.

²⁸ McKELVIE, I; PEAT, D; WORSFOLD, P. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. No.10 (Analytical Proceedings Including Analytical Communications, 1995) Pág. 437- 445.

²⁹ ROBARDS, K; MCKELVIE, I; BENSON, R; WORSFOLD, P; BLUNDELL, N; CASEY, H Determination of carbon, phosphorus, nitrogen and silicon species in waters. No. 3 (Analytica Chimica Acta, 1994) Pág 147-190.

³⁰ WORSFOLD, P; GIMBERT, L; MANKASINGH, U; OMAKA, O; HANRAHAN, G; GARDOLINSKI, P; HAYGARTH, P; M; TURNER, B; KEITH-ROACH, M; MCKELVIE, I. Sampling, sample treatment and quality assurance issues for the determination of phosphorus species in natural waters and soils. No. 2 (Talanta, 2005) Pág. 273 - 293

4. Parámetros de Validación

Se considera que aplican para la validación los siguientes parámetros: Límite de cuantificación y detección, rango lineal y de trabajo, exactitud y precisión, porcentaje de recuperación y sensibilidad.

4.1 Límites de detección y de cuantificación

Previamente a la validación del método se realizaron varios ensayos analizando patrones de diferente concentración, con el fin de determinar cuál de ellos cumple con los criterios de aceptación establecidos en cuanto a exactitud expresada como %E y precisión como %CV. Posterior a la selección del estándar adecuado y con el objetivo de ratificar el límite de cuantificación experimental, se evaluarán réplicas de un patrón de concentración 0.03 mg P-PO₄/L.

4.2 Rango Lineal

Para la determinación del rango lineal se analizarán una serie de patrones que comprendan aproximadamente el rango sugerido por el método (Según *Standard Methods* Ed 22. de 0.15 a 1.3 mg P-PO₄/L).

4.3 Rango de trabajo

Con base en el resultado del rango lineal se definirá el rango de concentraciones en los cuales se obtengan resultados coherentes con los criterios de calidad especificados por el laboratorio. El patrón más bajo será la concentración definida como límite de cuantificación.

4.4 Exactitud

Con el fin de evaluar la exactitud del método se analizarán diariamente 2 réplicas, durante 7 días, de 3 estándares de diferente concentración. Los estándares se preparan a partir de diluciones de la solución madre de 50 mg P-PO₄/L:

- **Solución Madre:** Concentración teórica de 50 mg P-PO₄/L, preparada por pesada directa de 0.2195 g de Fosfato monobásico de Potasio MR, secado previamente a 105 °C por 1 hora y disuelto en 1 L de agua destilada aforando a 20 °C.
- **Patrón Intermedio:** Concentración teórica de 2.5 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 10 mL de la solución madre y diluyendo a 200 mL con agua destilada aforando a 20 °C.

- **Estándar Bajo, Eb:** Concentración teórica de 0.03 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 3 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 250 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Estándar Medio, Em:** Concentración teórica de 0.30 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 24 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 200 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Estándar Alto, Ea:** Concentración teórica de 0.60 mg P-PO₄/L, preparado por dilución, midiendo 48 mL del Patrón intermedio y diluyendo a 200 mL con agua destilada aforando a 20 °C.

4.5 Precisión

Para evaluar la precisión del método se analizarán diariamente réplicas de estándares y muestras dentro del rango de aplicación del método. La precisión se evaluará en términos de Repetibilidad y de Repetibilidad intermedia de los estándares.

Así mismo se incluirán 2 muestras naturales cuyos valores de fósforo (como ortofosfato) se encuentran dentro del rango de aplicación del método. El objeto de incluir muestras en este parámetro es conocer la precisión en términos de %CV cuando se analizan duplicados de muestras; a la vez que se analiza específicamente para esta determinación el efecto de las diluciones sobre el resultado.

M1 → Muestra PTAR – UTP

ARD – Efluente. Con una concentración de fósforo cercana a 0.16 mg P-PO₄/L.

M2 → Muestra PTAR – UTP

ARD – Afluente. Con una concentración de fósforo cercana a 0.60 mg P-PO₄/L con un factor de dilución, FD = 10 veces.

Estándares y muestras	Eb	Em	Ea	M1	M2
Concentración mg P-PO ₄ /L	0.03	0.30	0.60	Aprox. 0.16	Aprox.0.60

4.5.1 Precisión en términos de Repetibilidad

El analista responsable aplicará el método a todos los estándares y muestras propuestas durante 7 días en la validación.

4.5.2 Precisión en términos Repetibilidad intermedia

El analista sustituto aplicará el método a todos los estándares y muestras propuestos

4.5.3 Reproducibilidad

Se evaluará la Desviación estándar media de las series de mediciones. En esta prueba es posible evaluar la dispersión de cada una de las series de datos (s) frente al número total de datos (N) y al número total de series de mediciones (k).

$$s_I = \sqrt{\frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) s_i^2}$$

Donde:

n = Número de mediciones por serie

N = Número total de mediciones

k= Número de series de mediciones.

Se espera que la desviación estándar media de las series de mediciones cumpla con los criterios de aceptación establecidos.

4.6 Recuperación

Con el fin de evaluar el porcentaje de recuperación se analizará 1 muestra de agua (M1) que contiene una concentración aproximada de 0.16 mg P-PO₄/L a la cual se le efectuará una adición baja (Ab) de aproximadamente 0.05 mg P-PO₄/L (33%) y una adición alta (Aa) de aproximadamente 0.14 mg P-PO₄/L (87%) de la concentración de la muestra.

La muestra y las muestras adicionadas se analizarán por el analista responsable durante 7 días en la validación, durante un día en la mañana y en la tarde. El analista sustituto efectuará el análisis durante 2 días al final de la validación.

A partir de los valores promedio obtenidos, cada día, para la muestra y de los valores promedio obtenidos, cada día, para las adiciones se calculará el porcentaje de recuperación. Una vez terminada la validación se espera obtener un porcentaje de recuperación de $100\% \pm 20\%$.

Las adiciones sugeridas se harán diariamente, a partir de una solución patrón de 2.0 mg P-PO₄/L y una solución patrón de 3.5 mg P-PO₄/L. La preparación de las muestras adicionadas se describe a continuación:

- **Patrón de 2.0 mg P-PO₄/L:** Preparado por dilución, midiendo 4 mL de la solución madre y diluyendo a 100 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **Patrón de 3.5 mg P-PO₄/L:** Preparado por dilución, midiendo 7 mL de la solución madre y diluyendo a 100 mL con agua destilada aforando a 20 °C.
- **M1 + Ab:** Medir 150 mL de la muestra M1, adicionarle 4 mL de solución patrón de 2.0 mg P-PO₄/L, homogenizando adecuadamente.
- **M1 + Aa:** Medir 150 mL de la muestra M1, adicionarle 6 mL de solución patrón de 3.5 mg P-PO₄/L, homogenizando adecuadamente.

4.7 Sensibilidad

En el LQA se ha establecido que la determinación de la sensibilidad aplica a procedimientos de ensayo en los que se requiera la construcción de curvas de calibración. La sensibilidad estará dada por el valor promedio de la pendiente de las curvas de calibración obtenidas durante la validación.

5. Materiales

5.1 Equipos

Estufa de secado marca Binder

Balanza analítica marca Sartorius BP 221 S

Cabina de extracción de gases y humos marca C4 modelo C 120 X

Agitador magnético marca Heidolph MR 3001 con barras magnéticas

Termóstato marca Julabo modelo F34

Digestor de Fósforo marca Gerhardt tipo KI 16

Fotómetro marca Shimadzu modelo UV – 1700

5.2 Reactivos

Agua destilada
Fosfato monobásico de Potasio, MR
Ácido Nítrico concentrado
Ácido Sulfúrico concentrado
Ácido Sulfúrico 5 N
Tartrato antimonalítico de potasio p.a
Molibdato de amonio p.a
Ácido Ascórbico p.a
Fenolftaleína

5.3 Material de Vidriería

Balones de digestión Kjeldahl
Balones aforados de 100 mL, 200 mL, 250 mL, 1000 mL. Clase A
Pipetas aforadas de 3 mL, 4 mL, 8 mL, 10 mL, 15 mL, 25 mL, 50 mL, 100 mL.
Pipetas graduadas de 10 mL.
Beakers de 100 mL, 250 mL, 1000 mL.
Erlenmeyer de 100 mL, 250 mL.
Probetas de 50 mL y 100 mL
Embudos de 5 cm de diámetro
Espátula
Frasco lavador
Varilla de vidrio
Papel filtro cualitativo Munktell No. 125

Anexo J. Resultados validación Fósforo Disponible Total

1. Recolección de datos

En la tabla 14, se encuentra el consolidado de datos producto de la validación y en la tabla 15 el consolidado de la muestra adicionada.

Fecha	VARIABLE	Valor nominal (mg/L)	0,03		0,30		0,60		NA		NA		NA		100	NA	NA	100
		Análito	Estándar bajo (Eb)		Estándar medio (Em)		Estándar alto (Ea)		Muestra baja (M1)		Muestra alta (M2)		Muestra baja + Adición Baja (M1Ab)		%R (M1Ab)	Muestra baja + Adición Alta (M1Aa)		%R (M1Aa)
		Uso	LDM, LCM, Exactitud, Precisión	Promedio	Exactitud, precisión, Creación de Cartas de control	Promedio	Exactitud, precisión	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada
		Unidades	mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		mg/L		%R	mg/L	mg/L	%R
Día	Analista																	
19/06/2012	Día 1	Oscar Cuéllar	0,029 0,030	0,03	0,297 0,297	0,30	0,593 0,593	0,59	0,16 0,16	0,16	5,88 5,86	5,87	0,2 0,2	0,22	108	0,29 0,29	0,29	102
20/06/2012	Día 2	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,299 0,299	0,30	0,600 0,598	0,60	0,16 0,16	0,16	5,87 5,88	5,88	0,2 0,2	0,21	102	0,29 0,29	0,29	101
21/06/2012	Día 3	Oscar Cuéllar	0,031 0,030	0,03	0,300 0,299	0,30	0,598 0,598	0,60	0,16 0,16	0,16	5,99 5,98	5,99	0,2 0,2	0,22	113	0,29 0,29	0,29	103
22/06/2012	Día 4	Oscar Cuéllar	0,030 0,031	0,03	0,301 0,303	0,30	0,610 0,604	0,61	0,16 0,16	0,16	5,92 5,90	5,91	0,2 0,2	0,21	103	0,3 0,3	0,30	102
25/06/2012	Día 5	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,300 0,300	0,30	0,600 0,600	0,60	0,16 0,16	0,16	5,94 5,93	5,94	0,2 0,2	0,22	108	0,3 0,3	0,30	103
26/06/2012	Día 6	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,301 0,301	0,30	0,601 0,600	0,60	0,16 0,16	0,16	5,95 5,95	5,95	0,2 0,2	0,21	97,39	0,3 0,3	0,30	103
27/06/2012	Día 7 (Mañana)	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,301 0,300	0,30	0,600 0,600	0,60	0,16 0,16	0,16	5,95 5,95	5,95	0,2 0,2	0,21	103	0,3 0,3	0,29	104
27/06/2012	Día 7 (Tarde)	Oscar Cuéllar	0,030 0,030	0,03	0,300 0,300	0,30	0,600 0,600	0,60	0,16 0,16	0,16	5,95 5,95	5,95	0,2 0,2	0,21	103	0,3 0,3	0,29	100
27/06/2012	Día 1 Sustituto	Mauricio Camacho	0,028 0,029	0,03	0,296 0,297	0,30	0,594 0,596	0,60	0,16 0,16	0,16	5,82 5,84	5,83	0,2 0,2	0,21	101	0,3 0,3	0,28	100
28/06/2012	Día 2 Sustituto	Mauricio Camacho	0,029 0,030	0,03	0,290 0,300	0,30	0,590 0,592	0,59	0,14 0,15	0,14	5,86 5,89	5,88	0,2 0,2	0,19	100	0,3 0,3	0,27	101
26/06/2012	Día 1 Sustituto 2	Mónica Rodas	0,031 0,032	0,03	0,301 0,303	0,30	0,597 0,601	0,60			5,86 5,89	5,88						
Total datos		n	22		22		22		20		22		20		20			
Prueba F		ProControl	Ver registros Procontrol															
Prueba t		ProControl	Ver registros Procontrol															
Rango		Mínimo	0,03	0,03	0,29	0,30	0,59	0,59	0,14	0,14	5,82	5,83	0,19	0,19	97,4	0,27	0,27	100
		Máximo	0,03	0,03	0,30	0,30	0,60	0,60	0,16	0,16	5,99	5,99	0,22	0,22	113	0,30	0,30	104
Media		\bar{x}	0,03	0,03	0,30	0,30	0,60	0,60	0,16	0,16	5,91	5,91	0,21	0,21	104	0,29	0,29	102
Desviación		s	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,05	0,05	0,01	0,01	4,51	0,01	0,01	1,38
Coeficiente variación		%CV	2,69		0,90		0,73		3,89		3,98		0,79		3,41		3,49	
Error		%Error	-0,26		-0,25		-0,28		NA		NA		NA		NA		NA	
LDM		3s	0,00															
LCM		10s	0,01															

Tabla 14. Consolidado de datos validación Fósforo Disponible Total

Fecha	VARIABLE	Valor nominal (mg/L)	NA		NA		100,0		NA		100,0	
		Analito	Muestra baja (M1)		Muestra baja + Adición Baja		%R (M1Ab)		Muestra baja + Adición Alta		%R (M1Aa)	
		Uso	Precisión, % Recuperación	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Promedio	Precisión, % Recuperación	Promedio	Reactividad cruzada	Promedio
		Unidades	mg/L		mg/L		%R		mg/L		mg/L	
		Día	Analista	mg/L		mg/L		%R		mg/L		%R
19/06/2012	Día 1	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,22	0,22	109	108	0,29	0,29	102	102
			0,16		0,22		108		0,29		102	
20/06/2012	Día 2	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,21	0,21	102	102	0,29	0,29	101	101
			0,16		0,21		102		0,29		100	
21/06/2012	Día 3	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,22	0,22	115	113	0,29	0,29	103	103
			0,16		0,22		110		0,29		103	
22/06/2012	Día 4	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,21	0,21	102	103	0,30	0,30	102	102
			0,16		0,21		103		0,30		103	
25/06/2012	Día 5	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,22	0,22	109	108	0,30	0,30	104	103
			0,16		0,22		107		0,30		103	
26/06/2012	Día 6	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,21	0,21	98	97,4	0,29	0,30	101	103
			0,16		0,21		97		0,30		106	
27/06/2012	Día 7 (Mañana)	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,21	0,21	103	103	0,29	0,29	104	104
			0,16		0,21		103		0,30		104	
27/06/2012	Día 7 (Tarde)	Oscar Cuéllar	0,16	0,16	0,21	0,21	103	103	0,29	0,29	100	100
			0,16		0,21		103		0,29		100	
27/06/2012	Día 1 Sutilito	Mauricio Camacho	0,16	0,16	0,21	0,21	103	101	0,28	0,28	100	100
			0,16		0,20		98		0,29		101	
28/06/2012	Día 2 Sutilito	Mauricio Camacho	0,14	0,14	0,19	0,19	101	99,9	0,27	0,27	103	101
			0,15		0,19		98		0,27		100	
26/06/2012	Día 1 Sutilito 2	Mónica Rodas	0,16	0,16	0,21	0,21	96	98,5	0,29	0,29	101	100
			0,16		0,21		101		0,29		99	
Total datos		n	22		22		22		22		22	
Prueba F		ProControl	Ver registros ProControl									
Prueba t		ProControl	Ver registros ProControl									
Rango		Mínimo	0,14	0,14	0,19	0,19	95,9	97,4	0,27	0,27	99,4	100
		Máximo	0,16	0,16	0,22	0,22	115	113	0,30	0,30	106	104
Media		\bar{x}	0,16	0,16	0,21	0,21	103	103	0,29	0,29	102	102
Desviación		s	0,01	0,01	0,01	0,01	4,66	4,56	0,01	0,01	1,66	1,42
Coeficiente variación		%CV	3,71	3,78	3,26	3,32	4,52	4,42	2,25	2,27	1,63	1,39
Error		%Error	NA	NA	NA	NA	NA	3,29	NA	NA	NA	1,80
LDM		3s										
LCM		10s										

Tabla 15. Consolidado muestra adicionada validación Fósforo Disponible Total

1.1 Límite de detección y Límite de cuantificación

En la tabla 16, se muestran los ensayos realizados para determinar el límite de detección LD y el Límite de cuantificación LC. Los criterios de aceptación para %E y %CV son del 5%.

El Límite de cuantificación definido fue de 0,03 mg P-PO₄/L; si bien el patrón de 0,02 mg P-PO₄/L también cumple con los requisitos establecidos, se optó por el estándar de mayor concentración para trabajar con un mayor margen de seguridad.

El límite de detección definido fue de 0.01 mg P-PO₄/L

	Ensayo 1			Ensayo 2				Ensayo 3			Ensayo 4	
mg/L P-PO ₄	0,01	0,02	0,03	0,01	0,02	0,03	0,04	0,01	0,02	0,03	0,02	0,03
	0,010	0,021	0,036	0,011	0,021	0,030	0,040	0,011	0,020	0,030	0,021	0,030
	0,012	0,026	0,035	0,010	0,020	0,030	0,040	0,011	0,020	0,030	0,020	0,031
	0,014	0,025	0,036	0,011	0,022	0,031	0,041	0,011	0,021	0,031	0,021	0,031
	0,014	0,025	0,038	0,012	0,023	0,031	0,040	0,011	0,022	0,030		
	0,013	0,026	0,038	0,009	0,023	0,031	0,040	0,010	0,020	0,031		
	0,013	0,025	0,038	0,010	0,019	0,031	0,041	0,010	0,020	0,030		
Promedio	0,013	0,025	0,037	0,010	0,021	0,031	0,040	0,011	0,020	0,030	0,021	0,031
Desviación	0,002	0,002	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000
% CV	12,0	7,2	3,3	6,7	7,7	1,1	1,1	5,3	3,9	0,9	0,9	1,3
%Error	25,8	23,1	23,1	4,6	6,0	1,9	0,6	8,2	2,3	1,2	2,8	1,9

Tabla 16. Ensayos Límite de Cuantificación Fósforo Disponible Total

1.2 Rango Lineal

El rango lineal se encuentra entre 0,02 mg P-PO₄/L y 1,2 mg P-PO₄/L, como se observa en la figura 9.

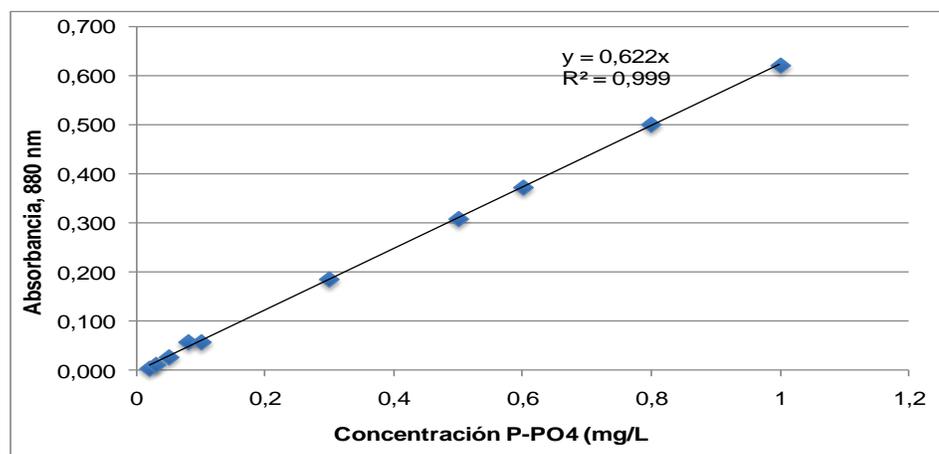


Figura 9. Rango lineal ensayo Fósforo Disponible Total

1.3 Rango de trabajo

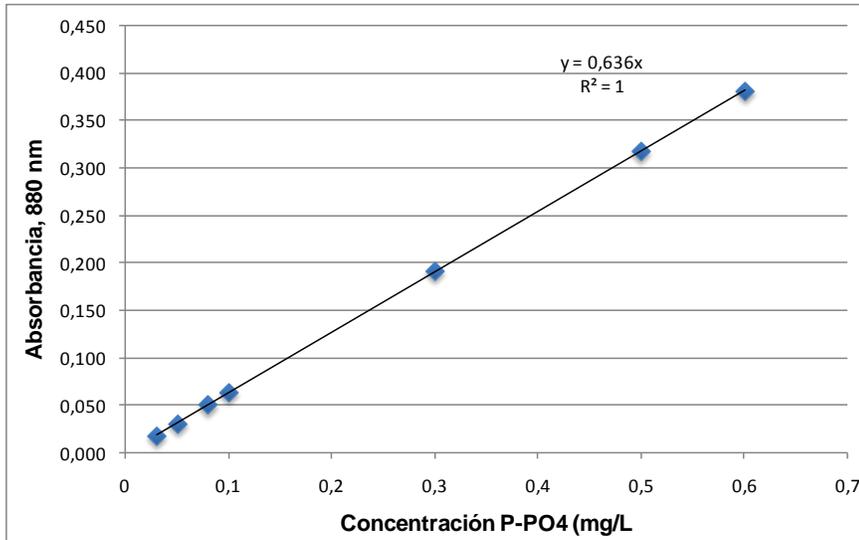


Figura 10. Rango de trabajo ensayo Fósforo Disponible Total

Si bien el rango lineal se encuentra comprendido entre 0,02 mg P-PO₄/L y 1,2 mg P-PO₄/L, se optó por el rango de trabajo comprendido entre 0,03 mg P-PO₄/L y 0,60 mg P-PO₄/L (Ver figura 10), lo cual obliga a que se realicen diluciones a muestras que estén por encima de esta concentración, dado que durante la estandarización se encontró que algunas muestras con concentraciones superiores a 1,2 mg P-PO₄/L entraban en el rango de trabajo (sesgo negativo), causando errores en la cuantificación, pues una vez se efectuaban diluciones se encontraba que su concentración era mayor.

1.4 Exactitud

En cuanto a la exactitud, evaluada a través del %E de los estándares, se pudo evidenciar que el método cumple con el criterio de aceptación establecido en el literal tres del anexo I.

1.5 Precisión

La precisión de la medición se evaluó bajo condiciones de Repetibilidad y de reproducibilidad. En cuanto a la precisión, evaluada a través del %CV, se pudo evidenciar que el método cumple con los criterios de aceptación establecidos en el literal tres del anexo I para todos los estándares.

Las muestras naturales presentan %CV del 3,89% y 0,80%, sin embargo esta variabilidad no afecta los resultados analíticos de las muestras que se analizan habitualmente en el laboratorio porque para el ensayo de Fósforo Disponible Total se ha establecido una prioridad 1 en la ejecución de los ensayos con lo cual se garantiza que el análisis de Fósforo se efectúe de acuerdo al tiempo máximo de almacenamiento establecido en el DE 097.

De manera general, las pruebas F y T realizadas (Los datos pertenecen al LQA, razón por la cual no se muestran), con el software estadístico Procontrol[®], no muestran diferencias significativas entre las varianzas, motivo por el cual, se considera que existe Repetibilidad y Repetibilidad intermedia entre el analista responsable y el analista sustituto. Los resultados para el mismo analista en la mañana y en la tarde proporcionan evidencia de condiciones de Repetibilidad.

La desviación estándar media del método es 0,88 %CV, valor que se calculó a través del software estadístico Procontrol con un 95% de seguridad estadística, el cual proporciona evidencia de condiciones de reproducibilidad y que se encuentra por debajo de los criterios de aceptación establecidos en el LQA.

1.6 Recuperación

De acuerdo con la tabla 14, los porcentajes de recuperación obtenidos para la muestra adicionada fueron del 103% para la adición baja y del 102% para la adición alta.

Los porcentajes de error obtenidos tanto para la adición baja (0,00%) como para la adición alta (3,33%) son menores al 20%, evidenciando que no existen efectos de matriz.

1.7 Sensibilidad

El valor promedio de la pendiente de las curvas de calibración obtenidas durante la validación fue de 0,636 cuyo valor se traduce en la sensibilidad del método.

1.8 Límites de control establecidos para las cartas de control

Después de haber efectuado la validación del método se han definido los siguientes límites de control (**LCS = 0,30 mg/L** y **LCI = 0,30 mg/L**) para el estándar medio, de acuerdo con la tabla 17. Sin embargo estos límites son muy estrechos y no reflejan en realidad la variación del proceso de medición, por eso

para elaborar la carta de control del método se hará con base los límites de control por especificación (**LCS = 0,33 mg/L** y **LCI = 0,27 mg/L**).

Patrón 0,30 mg/L					
Día	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	0,297	0,297	0,297	0,297	0,000
	0,297				
2	0,299	0,299	0,299	0,299	0,000
	0,299				
3	0,300	0,300	0,299	0,300	0,001
	0,299				
4	0,301	0,302	0,301	0,303	0,002
	0,303				
5	0,300	0,300	0,300	0,300	0,000
	0,300				
6	0,301	0,301	0,301	0,301	0,000
	0,301				
7 (Mañana)	0,301	0,301	0,300	0,301	0,001
	0,300				
7 (Tarde)	0,300	0,300	0,300	0,300	0,000
	0,300				
1 Sustituto	0,296	0,297	0,296	0,297	0,001
	0,297				
2 Sustituto	0,290	0,295	0,290	0,300	0,010
	0,300				
1 Sustituto 2	0,301	0,302	0,301	0,303	0,002
	0,303				
Promedios		0,299	0,299	0,300	0,002
Promedio			0,30	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A ₂			1,88	NA	
Promedio Rango			0,002	mg/L	
LCS			0,30	mg/L	
LCI			0,30	mg/L	
LCS (Por Especific. 10%)			0,33	mg/L	
LCI (Por Especific. 10%)			0,27	mg/L	

Tabla 17. Datos para la carta de control de Fósforo Disponible Total

1.9 Según resultados de la validación el método es apto para el alcance y el uso propuesto en el numeral 1 del anexo I.

Anexo K. Estimación de la incertidumbre del ensayo Fósforo Disponible Total

1. Mesurando

Se mide la absorbancia a 880 nm del complejo de molibdeno proveniente de la reducción del ácido fosfomolibdico causada por el ácido ascórbico.

2. Modelo matemático

$$y = mx$$

Donde, y: Absorbancia

x: Concentración (mg P-PO₄/L)

m: Sensibilidad del método (L/mg P-PO₄)

3. Principio de medición

Mediante una determinación colorimétrica, en la cual el molibdato de amonio y el tartrato antimonolítico de potasio reaccionan en medio ácido con fósforo en forma ortofosfatos para formar un heteropoliácido (Ácido Fosfomolibdico) de color amarillo pálido, que es reducido por el ácido ascórbico a molibdeno de color azul, se mide la absorbancia a 880 nm, cuya intensidad es proporcional a la concentración del analito en la muestra.

4. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Las siguientes consideraciones se tienen en cuenta para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo total:

- Temperatura de trabajo: 20 °C, utilizando un termóstato calibrado
- Agua destilada libre del analito de interés
- Reactivos grado analítico
- Fotómetro calibrado y correcto funcionamiento del equipo según Procedimiento Estándar de operación e Instrucción de trabajo.

Las posibles fuentes de incertidumbre se resumen en la tabla 18 y posteriormente se desarrollaran en la figura 11.

4. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Procedimiento	Factor crítico en la cuantificación	
	Aplica Incertidumbre	No aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 50 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de la solución intermedia de 2,5 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de la solución de trabajo de 0,3 mg P-PO ₄ /L	X	
Preparación de muestra	X	
Preparación blanco de digestión		X
Digestión de muestra		X
Construcción curva de calibración	X	
Preparación blanco de curva de calibración		X
Lectura fotométrica de patrones y muestras	X	
Repetibilidad y reproducibilidad (R y r)	X	

Tabla 18. Fuentes de incertidumbre ensayo Fósforo Disponible Total

5. Diagrama Causa – Efecto

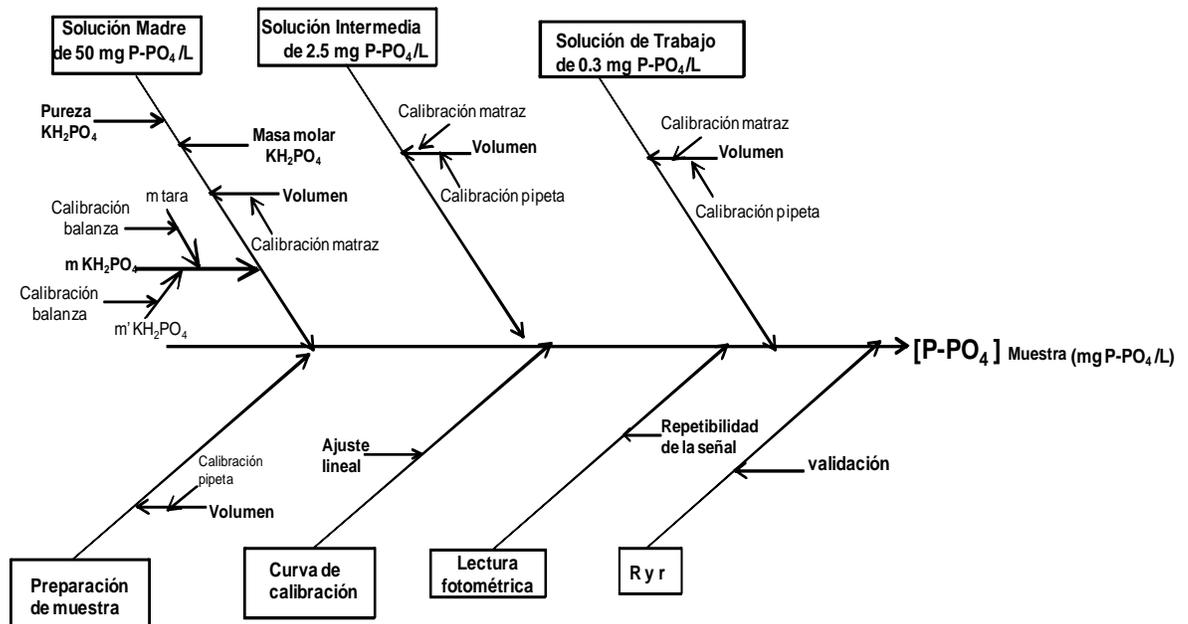


Figura 11. Diagrama Causa – Efecto ensayo Fósforo Disponible Total

6. Cálculos

De la misma manera que para el ensayo de fósforo total se utilizarán las mismas ecuaciones para la estimar la incertidumbre de medición del ensayo Fósforo disponible total, observándose en la tabla 19 el origen de los valores para realizar el respectivo cálculo.

Fuente de Incertidumbre Magnitud de entrada X_i	Valor estimado x_i	Fuente de información	Incertidumbre original		Tipo de distribución	Incertidumbre estándar $u(x_i)$	Incertidumbre combinada (por fuente) $u_c(x_i)$	Incertidumbre estándar relativa $u(x_i)/x_i$	$[u_c(x_i)/x_i]^2$
			Valor	Unidades					
PREPARACIÓN DEL FOSFATO MONOBÁSICO DE POTASIO 50 mg/L									
Peso del Reactivo	0,2195			g			7,09322E-05	0,000323154	1,04E-07
Calibración de la balanza		Fabricante	0,000100626	g	B, normal, K=2	0,00005031			
tara		Fabricante	0,0001	g	B, normal, K=2	0,00005			
Pureza del Reactivo	0,9996	Certificado	0,0005	N/A	B, rectangular,	0,00029	0,00029	0,000288791	8,34E-08
Peso formula del reactivo	136			g/mol			0,000699906	5,14637E-06	2,65E-11
K		Referencia	0,0001	g/mol	B, rectangular	5,7735E-05			
H ₂		Referencia	0,00007	g/mol	B, rectangular	8,0829E-05			
P		Referencia	0,00002	g/mol	B, rectangular	1,1547E-06			
O ₂		Referencia	0,0003	g/mol	B, rectangular	6,9282E-04			
Dilución del reactivo	1000			N/A			0,065	0,000065	4,225E-09
Incertidumbre calibración del balón B20-1000		Calculada	0,13	mL	B, normal, K=2	0,065			
PREPARACIÓN DE PATRONES INTERMEDIOS Y DE TRABAJO									
Preparación patrón de 2,5 mg/L				mg/L					
Incertidumbre calibración del balón B4-100	100	Calculada	0,02	mL	B, normal, K=2	0,01	0,01	0,0001	1,00E-08
Incertidumbre calibración de pipeta PV37	5	Calculada	0,01	mL	B, normal, K=2	0,005	0,005	0,001	1,00E-06
Preparación patrón de 0,3 mg/L				mg/L					
Incertidumbre calibración del balón B5-100	200	Calculada	0,13	mL	B, normal, K=2	0,065	0,065	0,000325	1,06E-07
Incertidumbre calibración de pipeta PV37	24	Calculada	0,02	mL	B, normal, K=2	0,02	0,02	0,000833333	6,94E-07
PREPARACIÓN DE MUESTRAS									
Medición del volumen de muestra	50			mL			0,01	0,0002	4,0E-08
Incertidumbre calibración pipeta PV40		Calculada	0,02	mL	B, normal, K=2	0,01			
Señal del equipo por medición de muestras y patrones	0,3			UA			3,52E-03	1,17E-02	1,38E-04
Repetibilidad de la señal		Mediciones	6,10E-03	UA	A, normal	3,52E-03			
Incertidumbre de la curva de calibración ajustada por mínimos cuadrados	0,3			UA			0,0011	0,003666667	1,344E-05
Desviación en la medición de la ordenada (Absorbancia)		Cálculos	0,0011	UA					
Repetibilidad y reproducibilidad (R & r)	0,3			N/A	A, normal		3,69E-04	1,23E-03	1,52E-06
		Cálculos	0,003				3,69E-04		

Tabla 19. Formato para estimar la incertidumbre del ensayo Fósforo disponible total

a. Incertidumbre por la solución madre de 50 mg P-PO₄/L, U_{SM}:

$$\frac{U_{(SM)}}{[SM]} = \sqrt{\left(\frac{7,09322 * 10^{-5}}{0,2195}\right)^2 + \left(\frac{0,00029}{0,9996}\right)^2 + \left(\frac{0,000699906}{136}\right)^2 + \left(\frac{0,065}{1000}\right)^2} = 4,38 * 10^{-4}$$

b. Incertidumbre por la solución intermedia de 2,5 mg P-PO₄/L, U_{SI}:

$$\frac{U_{(SI)}}{[SI]} = \sqrt{\left(\frac{0,01}{100}\right)^2 + \left(\frac{0,005}{5}\right)^2} = 1,00 * 10^{-3}$$

c. Incertidumbre por la solución de trabajo de 0,3 mg P-PO₄/L, U_{ST}:

$$\frac{U_{(ST)}}{[ST]} = \sqrt{\left(\frac{0,065}{200}\right)^2 + \left(\frac{0,02}{24}\right)^2} = 8,94 * 10^{-4}$$

d. Incertidumbre por preparación de la muestra, U_{Mx} :

$$\frac{U_{(Mx)}}{[Mx]} = \sqrt{\left(\frac{0,01}{50}\right)^2} = 2,0 * 10^{-4}$$

e. Incertidumbre por Lectura fotométrica, U_{LF} :

$$\frac{U_{(LF)}}{[LF]} = \sqrt{\left(\frac{3,52 * 10^{-3}}{0,3}\right)^2} = 1,17 * 10^{-2}$$

f. Incertidumbre por Repetibilidad y reproducibilidad, U_{Ryr} :

$$\frac{U_{(Ryr)}}{[Ryr]} = \sqrt{\left(\frac{3,69 * 10^{-4}}{0,3}\right)^2} = 1,23 * 10^{-3}$$

g. Incertidumbre por la curva de calibración, U_{CC} :

Los cálculos para estimar la incertidumbre por el ajuste lineal de la curva de calibración son los mismos que se utilizaron para el ensayo de fósforo total.

$$\frac{U_{(CC)}}{[CC]} = \sqrt{\left(\frac{0,0011}{0,3}\right)^2} = 3,67 * 10^{-3}$$

h. Incertidumbre combinada ensayo Fósforo total

Se toman cada una de las contribuciones anteriores a la incertidumbre

$$\frac{U_{(P-PO4/L)}}{[P-PO4/L]} = \sqrt{\frac{(4,38 * 10^{-4})^2 + (1,00 * 10^{-3})^2 + (8,94 * 10^{-4})^2 + (2,00 * 10^{-4})^2}{+(1,17 * 10^{-2})^2 + (1,23 * 10^{-3})^2 + (3,67 * 10^{-3})^2}}$$

$$\frac{U_{(P-PO4/L)}}{[P-PO4/L]} = 1,24 * 10^{-2}$$

i. Incertidumbre expandida, $K = 2$. Intervalo de Confianza = 95%

$$\frac{U_{(P-PO4/L)}}{[P-PO4/L]} = 1,24 * 10^{-2} * 2$$

$$\frac{U_{(P-PO4/L)}}{[P-PO4/L]} = 0,02$$

j. Expresión de los resultados

$$[P-PO_4/L]_{\text{muestra}} = [P-PO_4/L]_{\text{muestra}} \pm (0,02 * [P-PO_4/L]_{\text{muestra}})$$

k. Contribuciones a la incertidumbre de Fósforo Disponible total

En la figura 12 se observa como las diversas fuentes contribuyen a la incertidumbre del ensayo fósforo total

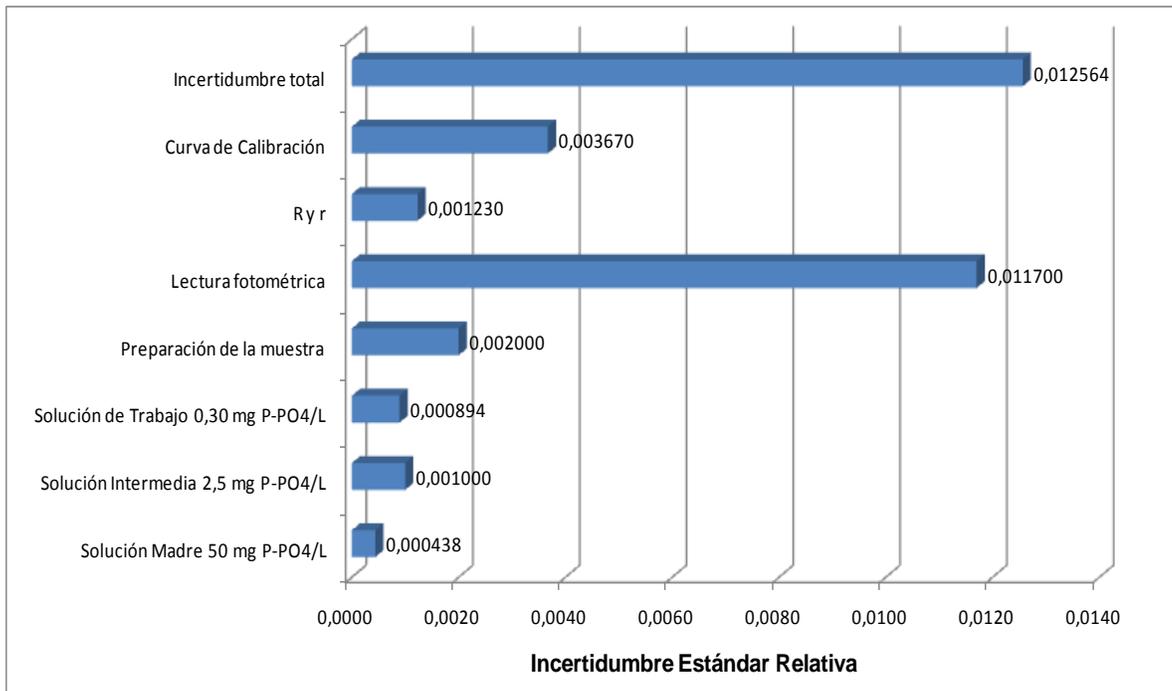


Figura 12. Contribuciones a la incertidumbre del ensayo Fósforo Disponible Total

Anexo L. Trazabilidad del ensayo Fósforo Disponible Total

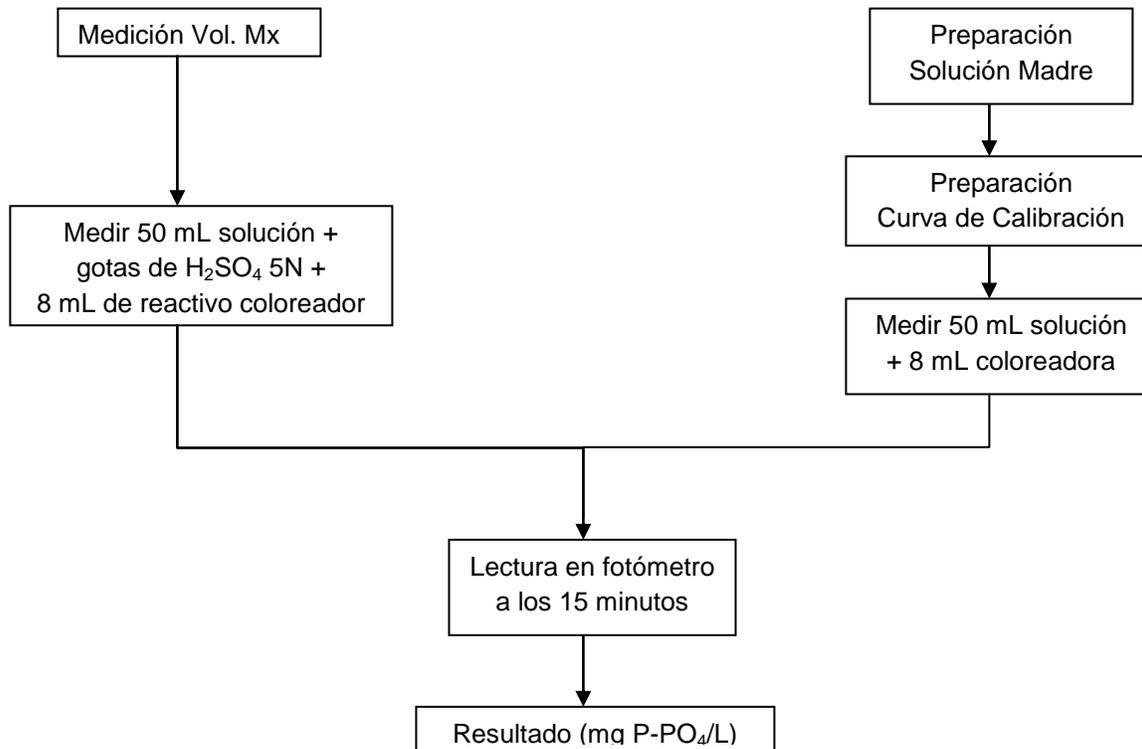


Figura 13. Esquema del ensayo Fósforo Disponible Total

En la figura 13, se esquematizan las diferentes etapas para el ensayo de fósforo total de forma tal que se pueda tener un panorama general para establecer la trazabilidad del ensayo.

Aseguramiento de la trazabilidad

Medición Vol. Mx: La trazabilidad de la temperatura del termóstato se tiene por calibración con termómetro calibrado.

Se asegura la trazabilidad de la medición del volumen usando la pipeta bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Medir 50 mL solución + Gotas de H₂SO₄ 5N + 8 mL Reactivo coloreador: Se asegura la trazabilidad de la medición de los volúmenes de solución y coloreadora usando las pipetas bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Lectura en el Fotómetro: Se asegura la trazabilidad en la lectura mediante certificación de mantenimiento y tests del equipo realizada por el fabricante.

Preparación de la solución madre: La trazabilidad de la temperatura de la estufa para secar el material de referencia se tiene por calibración con termómetro calibrado.

Se asegura la trazabilidad del valor de la masa pesada del material de referencia mediante certificado de calibración de la balanza analítica y usándola bajo las condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

Se asegura la trazabilidad del balón mediante una calibración hecha en el laboratorio del material volumétrico.

Preparación de la Curva de Calibración: Se asegura la trazabilidad de las pipetas usándolas bajo las condiciones descritas por el fabricante, además se cuenta con una calibración hecha en el laboratorio.

Se asegura la trazabilidad de los balones mediante una calibración hecha en el laboratorio del material volumétrico, y usando las soluciones a 20 °C.

GLOSARIO³¹

Análisis: Proceso que provee de información química o física a cerca de los constituyentes de una muestra o de la muestra en sí.

Analito: Constituyente de interés en una muestra.

Blanco del método: Muestra que sin contener analito pasa a través de todos los pasos del método.

Calibración: Proceso para asegurar que la señal de la medición dada por un equipo o instrumento es correcta.

Curva de calibración: Resultado de la estandarización que muestra gráficamente como la señal del método cambia respecto a la cantidad de analito.

Determinación: Análisis de una muestra que busca la identidad, la concentración o las propiedades del analito.

Estandarización: Proceso para establecer la relación entre la cantidad de analito y la señal del método.

Exactitud: Diferencia entre el resultado obtenido y el resultado esperado, usualmente dividido entre el resultado esperado y reportado como porcentaje de error relativo, E%.

Incertidumbre: Rango de posibles valores para una medición.

Límite de cuantificación: Mínima cantidad de analito que puede ser cuantificada con un alto grado de confianza.

Límite de detección: Cantidad más pequeña de analito que puede ser detectada con confianza, pero no cuantificada.

Linealidad: Capacidad del método para producir resultados proporcionales, directamente o mediante una transformación matemática, a la concentración del analito en las muestras, dentro de un determinado rango.

Matriz: Todos los constituyentes de una muestra a excepción del analito.

³¹HARVEY, D. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill: USA, 2000. Pág. 35 – 47.

Medición: Determinación experimental de una propiedad química o física del analito, usualmente producto de la comparación con un patrón trazable a un estándar definido y aceptado.

Mesurando: Magnitud particular sujeta a medición.

Método: Forma de analizar una muestra para un analito específico en una matriz específica.

Muestra: Parte del sistema que se somete a análisis.

Precisión: Indicación de la reproducibilidad de la medida o resultado.

Procedimiento: Directriz escrita que resume cómo analizar una muestra.

Protocolo: Directriz escrita para analizar una muestra, especificada por una agencia.

Prueba t: Prueba estadística para comparar dos medias y ver si su diferencia es suficientemente grande para explicar errores indeterminados.

Prueba f: Prueba estadística para comparar dos varianzas y ver si su diferencia es suficientemente grande para explicar errores indeterminados.

Regresión lineal: Técnica matemática para ajustar una ecuación, a una tendencia lineal, obtenida experimentalmente.

Residual: Diferencia entre un valor experimental y el obtenido por la ecuación de regresión lineal.

Sensibilidad: Medida de la habilidad del método para distinguir entre dos muestras con diferente concentración de analito, reportada como el cambio de la señal por unidad de cambio en la cantidad de analito.

Técnica: Principio químico o físico que puede ser usado para analizar una muestra.

Validación³²: Es la confirmación, a través del examen y el aporte de evidencias objetivas, de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto.

³² International Organization for Standardization. Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. NTC-ISO/IEC 17025:2005. Pág. 17.