

**VALIDACIÓN, CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE Y DETERMINACIÓN DE
LA TRAZABILIDAD PARA LOS ENSAYOS DE NITROGENO KJELDAHL
Y NITROGENO AMONIAICAL EN EL LABORATORIO DE QUIMICA
AMBIENTAL EN LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA**

DANIELA MONTOYA CORRALES

1088281334

LUISA FERNANDA MONTOYA CORRALES

1088283597

DIRECTORA: LINA MARÍA GARCÍA.

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA, OCTUBRE DE 2012

**VALIDACIÓN, CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE Y DETERMINACIÓN DE
LA TRAZABILIDAD PARA LOS ENSAYOS DE NITROGENO KJELDAHL
Y NITROGENO AMONIACAL EN EL LABORATORIO DE QUIMICA
AMBIENTAL EN LA UNIVERSIDAD TECNOLOGICA DE PEREIRA**

DANIELA MONTOYA CORRALES

LUISA FERNANDA MONTOYA CORRALES

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR AL TÍTULO
DE TECNÓLOGO QUÍMICO**

DIRECTORA: LINA MARÍA GARCÍA.

ESPECIALISTA EN GESTIÓN DE LA CALIDAD

UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA

PROGRAMA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA

PEREIRA, OCTUBRE DE 2012

DEDICATORIA

Dedicamos este trabajo a dios por iluminar nuestras vidas y caminos en cada paso que damos.

A nuestra mamá, Carmenza Corrales Osorio, hermanos y tíos por ser nuestra fuente de inspiración para ser mejor cada día, por apoyarnos durante este proceso de formación, por su paciencia y amor que hizo posible culminar con éxito este proyecto.

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo agradecemos a Dios por enseñarnos a luchar y a perseverar para cumplir nuestras metas. Gracias al Laboratorio de Química Ambiental por facilitarnos sus instalaciones, materiales, equipos y reactivos para poder llevar a cabo el plan de trabajo propuesto.

De manera especial agradecemos a :

Nuestra directora de trabajo de grado Lina María García Moreno y a Clara Inés Arango Sotelo por su apoyo, dedicación, paciencia, comprensión, y la especial confianza depositada en nosotras para la realización de este proyecto. Gracias a su excelente guía y al conocimiento que lograron transmitirnos fue posible culminar con éxito este trabajo de grado.

Para nosotras fue muy importante poder contar con personas tan profesionales y especiales como Adriana Londoño, Andrés Mauricio Camacho, Mónica Rodas y Carolina Flores quienes siempre y en todo momento nos ofrecieron su ayuda y especial acompañamiento. Gracias a todos por sus consejos y por su apoyo incondicional lo cual fue clave en nuestro proceso de aprendizaje y en la culminación del trabajo de grado.

También queremos agradecer a todos nuestros profesores por ayudarnos en nuestro proceso de formación durante la carrera.

Por último queremos agradecer a todas las personas que desinteresadamente nos ayudaron a culminar con nuestra tesis.

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN.....	12
2. PLANTEAMIENTO DELPROBLEMA	13
3. JUSTIFICACION.....	14
4. OBJETIVOS.....	15
4.1. OBJETIVO GENERAL.....	15
4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	15
5. INTRODUCCION	16
6. MARCO DE REFERENCIA	19
6.1. DEFINICIONES (SEGÚN NTC-2194 E ISO 8402).....	19
6.2. REQUISITOS DE LA NORMA NTC/ISO/IEC 17025:2005 APLICABLES AL OBJETO DEL TRABAJO.....	21
6.3. ASPECTOS BASICOS DE LA METROLOGIA.....	22
6.3.1. METROLOGIA Y CALIDAD	23
6.3.2. METROLOGIA QUIMICA	25
6.3.3. CARACTERIZACION DEL ASEGURAMIENTO DE LA MEDIDA	26
6.4. VALIDACION.....	27
6.4.1. IMPORTANCIA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
6.4.2. NECESIDAD DE LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO	28
6.4.3. EL DEBER PROFESIONAL DEL QUÍMICO ANALÍTICO.....	29
6.4.4. ¿CUÁNDO DEBEN VALIDARSE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	29
6.4.5. ALGUNOS PARÁMETROS EMPLEADOS EN LA VALIDACIÓN.....	30
6.5. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE	33
6.5.1. FUENTES DE INCERTIDUMBRE.....	33
6.5.2. COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE	33
6.5.3. INCERTIDUMBRE Y ERROR.....	35
6.5.4. ELEMENTOS DE LA INCERTIDUMBRE DEMEDICIÓN.....	36
6.5.5. PROCESO DE ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN 37	
6.6. TRAZABILIDAD	38
6.6.1. PRINCIPIOS DE TRAZABILIDAD.....	39

6.6.2.	ESCALAS DE MEDICION, ESTANDARES Y UNIDADES	40
6.6.3.	CALIBRACIÓN.....	41
6.6.4.	EFFECTOS SOBRE LOS RESULTADOS MEDICIÓN.....	41
6.6.5.	CONTROL DE LAS CONDICIONES FIJADAS.....	42
6.6.6.	EL PAPEL DEL DESARROLLO DE METODOS	44
6.6.7.	TRAZABILIDAD E INCERTIDUMBRE DE MEDICION	44
6.6.8.	ACTIVIDADES ESCENCIALES EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA TRAZABILIDAD.....	45
7.	RESULTADOS DEL ENSAYO DE NITROGENO AMONIACAL.....	46
7.1.	EQUIPOS REACTIVOS Y VIDRERIA EMPLEADOS EN LA EJECUCION DEL PLAN DE VALIDACION.....	47
7.2.	Preparación de Soluciones de trabajo y Muestras adicionadas.....	49
7.3.	Nitrógeno amoniacal Método Volumétrico 4500-NH3C	50
7.4.	Determinación de Nitrógeno Amoniacal por el método Titulométrico	53
7.4.1.	OBJETIVO DE LA VALIDACION	53
7.4.2.	OBJETIVO DEL METODO	53
7.4.3.	CRITERIOS DE ACEPTACION.....	53
7.4.4.	PARAMETROS DE VALIDACION.....	54
7.4.5.	ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARAMETROS DE VALIDACION.	55
7.4.6.	ANALISIS DE MODO Y EFECTO DE FALLA (AMEF).....	56
7.4.7.	RESULTADOS PREVIOS A LA VALIDACION PARA DEFINIR EL LIMITE DE CUANTIFICACION EXPERIMENTAL (LC).....	58
7.5.	Discusión de Resultados	62
7.5.1.	LIMITES DE DETECCION Y CUANTIFICACION	63
7.5.2.	EXACTITUD EXPRESADA COMO %E.....	65
7.5.3.	PRECISION EXPRESADA COMO %CV	67
7.5.4.	RECUPERACION.....	71
7.6.	ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE.....	73
7.6.1.	MESURANDO	73
7.6.2.	MODELO MATEMATICO	73
7.6.3.	IDENTIFICACION DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE.....	73

7.6.4.	DIAGRAMA CAUSA-EFECTO	74
7.6.5.	CALCULOS	76
7.7.	TRAZABILIDAD EN MEDICIONES QUIMICAS	1
7.7.1.	ASEGURAMIENTO DE LA TRAZABILIDAD	2
7.9.	CONCLUSIONES	9
7.9.1.	CONTROL DE CALIDAD Y SEGUIMIENTO DE VALIDACION	9
8.	RESULTADOS DEL ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL	10
8.1.	QUIPOS, REACTIVOS Y VIDRERIA EMPLEADOS EN LA EJECUCION DEL PLAN DE VALIDACION	11
8.2.	NITROGENO KJELDAHL METODO VOLUMETRICO 4500-Norg C.	13
8.3.	DETERMINACION DEL NITROGENO KJELDAHL POR EL METODO VOLUMETRICO	16
8.3.1.	OBJETIVO DE LA VALIDACION	16
8.3.2.	OBJETIVO DEL METODO	16
8.3.3.	CRITERIOS DE ACEPTACION	16
8.3.4.	PARAMETROS DE VALIDACION	17
8.3.5.	ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARAMETROS DE VALIDACION	17
8.3.6.	PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO Y MUESTRAS ADICIONADAS	18
8.3.7.	ANALISIS DE MODO Y EFECTO DE FALLA (AMEF)	19
8.3.8.	RESULTADOS OBTENIDOS PARA DEFINIR LIMITE DE CUANTIFICACION EXPERIMENTAL (LC)	21
8.4.	RESULTADOS OBTENIDOS DE ESTANDARES Y MUESTRAS DURANTE LA VALIDACION	23
8.4.1.	DISCUSION DE RESULTADOS	23
8.4.2.	LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION	23
8.4.3.	EXACTITUD EXPRESADA COMO %E	26
8.4.4.	PRECISION EXPRESADA COMO %CV	28
8.4.5.	RECUPERACION	30
8.5.	ESTIMACION DE INSERTIDUMBRE EN LA MEDICION	31
8.5.1.	MESURANDO	32
8.5.2.	MODELO MATEMATICO	32

8.5.3.	IDENTIFICACION DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE.....	32
8.5.4.	DIAGRAMA CAUSA-EFECTO.....	33
8.5.5.	CALCULOS	33
8.6.	TRAZABILIDAD DEL ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL.....	36
8.7.	CARTAS DE CONTROL PARA ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL....	36
8.8.	CONCLUSIONES	40
8.9.	CONTROL DE CALIDAD Y SEGUIMIENTO DE VALIDACION.....	41
9.	CONCLUSIONES GENERALES	42
10.	RECOMENDACIONES.....	43
11.	BIBLIOGRAFIA.....	44
	ANEXOS.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Grafica de mejora continua.....	24
Figura 2: Flujograma.....	51
Figura 3: Primer Diagrama Causa-Efecto en la Estimación de la Incertidumbre de la medición en el análisis de Nitrógeno Amoniacal.....	75
Figura 4: Segundo Diagrama Causa-Efecto en la Estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de Nitrógeno Amoniacal.....	76
Figura 5: Contribuciones a la Incertidumbre del análisis de Nitrógeno Amoniacal.....	82
Figura 6: Trazabilidad del ensayo de Nitrógeno Amoniacal.....	1
Figura 7: FLUJOGRAMA	14
Figura 8: Contribuciones a la incertidumbre del análisis de Nitrógeno Kjeldahl.	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Objetivos y Resultado del ensayo de Nitrógeno Amoniacal	46
Tabla 2: Equipos.....	47
Tabla 3: Reactivos	47
Tabla 4: . Vidriería y materiales	49
Tabla 5: Criterios de Aceptación del Método	53
Tabla 6: Valores de referencia según Standard Methods for the examination of water and wastewater (DE 097). Página 4-112. Numeral 6 [19].	54
Tabla 7: . Parámetros característicos a evaluar para cada método.	54
Tabla 8: Actividades principales para dar cumplimiento a los parámetros de validación... ..	55
Tabla 9: Análisis de Modo y Efecto de falla	57
Tabla 10: Resultados obtenidos del patrón de 2 mgN/L.....	58
Tabla 11: Resultados obtenidos para el estándar de 3 mgN-NH ₃ /L	64
Tabla 12: Resultados de los Estándares.....	66
Tabla 13: . Consolidado de datos de recuperación de las muestras.....	67
Tabla 14: Datos obtenidos durante la validación para la repetibilidad Intermedia	69
Tabla 15: Datos obtenidos bajo condiciones de Reproducibilidad.....	70
Tabla 16: resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de las muestras.....	71
Tabla 17: Fuentes de Incertidumbre para el análisis de Nitrógeno Amoniacal.....	74
Tabla 18: Recopilación de resultados del estándar de 10 mg N/L para la elaboración de cartas de control.	3
Tabla 19:Tabla de factores para límites de control.....	6
Tabla 20: Recopilación de resultados del estándar de 50 mg N/L para la elaboración de cartas de control.	7
Tabla 21: Límites de control establecidos para las cartas de control	8
Tabla 22: . Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal.....	9
Tabla 23: Objetivos y Resultado del ensayo de Nitrógeno Kjeldahl	10
Tabla 24: Equipos	11
Tabla 25: Reactivos	11
Tabla 26: Vidriería y materiales	13
Tabla 27: Criterios de aceptación:.....	16
Tabla 28: Método 4500 –Norg B. Macro Kjeldahl. (DE 097). Pagina 4-133. Numeral 6. ...	17
Tabla 29: Análisis de Modo y Efecto de Falla.....	20
Tabla 30: Comparación de los criterios de aceptación del método para los estándares de 2, 3, 5 y 10 mgN/L.	21
Tabla 31: Resultados obtenidos para el estándar de 10 mgN/L.....	24
Tabla 32: Resultados de los estándares	26
Tabla 33: Consolidado de datos de recuperación de las muestras	28
Tabla 34: resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de las muestras.	31
Tabla 35: Fuentes de Incertidumbre para El análisis de Nitrógeno Kjeldahl.....	32

Tabla 36: Recopilación de resultados del estándar de 50 mg N/L para la elaboración de cartas de control.	37
Tabla 37: Recopilación de resultados del estándar de 100 mg N/L para la elaboración de cartas de control.	38
Tabla 38: LIMITES DE CONTROL DEFINIDOS	40
Tabla 39: Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el ensayo de Nitrógeno Kjeldahl.	41

1. RESUMEN

El Laboratorio de Química Ambiental cuenta con un sistema de gestión de la calidad que le permite demostrar que opera con un proceso de calidad viable, que es técnicamente competente, y el cual es capaz de generar resultados técnicamente válidos.

A fin de garantizar resultados validos en el laboratorio, el LQA tiene la necesidad de ampliar el alcance de la acreditación en los ensayos de Nitrógeno Amoniacal y Nitrógeno semi micro Kjeldahl para demostrar su competencia en el desarrollo, adaptación y validación de metodologías analíticas.

Las actividades realizadas en el presente trabajo se desarrollaron bajo los lineamientos de la NTC/ISO/IEC 17025:2005 que cumplen con las exigencias de un Sistema de Gestión de la Calidad. Cubriendo las exigencias de la normal se validaron las metodologías analíticas y se estimó la incertidumbre de la medición con trazabilidad asociada al Sistema Internacional.

Palabras Clave: Gestión de la Calidad, Nitrógeno Amoniacal, Nitrógeno Kjeldahl, competencia, Validación, Incertidumbre, Trazabilidad.

ABSTRACT

The laboratory of environmental chemistry has a system of quality management that allows you to demonstrate that it operates a quality system viable, which is technically competent, and which is able to generate technically valid results.

To ensure results valid in the laboratory, the LQA has the need to expand the scope of accreditation in the trials of ammonia nitrogen and nitrogen semi micro Kjeldahl to demonstrate their competence in the development, adaptation and validation of methodologies analysis.

The activities carried out in this work is developed under the guidelines of the NTC/ISO/IEC 17025: 2005 that comply with the requirements of a quality management system. Covering the requirements of the standard is validated the analytical methodologies and estimated uncertainty of measurement associated with the international system traceable.

Key Words: Management quality, ammonia nitrogen, Kjeldahl nitrogen, competition, validation, uncertainty, traceability.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Laboratorio de Química Ambiental, de la Universidad Tecnológica de Pereira, desarrolla actividades de investigación, docencia y prestación de servicios en materia ambiental, empleando técnicas analíticas que cumplen las exigencias de un sistema de gestión de calidad basado en la NTC-ISO/IEC 17025:2005. Los análisis que se realizan 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. Como decisión estratégica el Laboratorio de Química Ambiental ha decidido ampliar el alcance de la acreditación, con los parámetros de Nitrógeno Kjeldhal y Nitrógeno Amónico, haciéndose necesaria la validación de estos ensayos apoyados en los requisitos de la norma citada anteriormente y así posteriormente estimar la incertidumbre en la medición con el fin de garantizar que los resultados del ensayo tengan trazabilidad asociada.

3. JUSTIFICACION

El Laboratorio de Química Ambiental, de la Universidad Tecnológica de Pereira, tiene como propósito generar resultados de alta confiabilidad y calidad en todos sus ensayos para ofrecer el mejor servicio a los clientes.

Aunque en la actualidad, en el Laboratorio se emplean metodologías estandarizadas internacionalmente, se hace necesario validar las técnicas de análisis y evaluar la incertidumbre de las mediciones y de ésta forma establecer cuáles son las variables que pueden generar una mayor variación en el resultado final. Con esta información buscar mecanismos para controlar las variables que ocasionan variabilidad en las mediciones. También se hace necesario determinar la trazabilidad de las mediciones lo cual garantiza la realización de mediciones confiables.

Los requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración establecen que los laboratorios de ensayo y calibración deben tener y aplicar un procedimiento para validación de métodos y estimación de la incertidumbre de medición. A su vez el laboratorio debe establecer un procedimiento para la calibración de sus equipos.

Teniendo en cuenta que el Laboratorio de Química Ambiental se encuentra acreditado por el Instituto de Hidrología y Meteorología y estudios ambientales IDEAM, bajo la norma NTC-ISO/IEC 17025:2005 en seis de los ensayos que ejecuta, y con la filosofía del mejoramiento continuo adoptada por el laboratorio que atiende la demanda de los usuarios, se requiere ampliar el alcance de la acreditación cubriendo los ensayos de nitrógeno kjeldahl y nitrógeno amoniacal ya que por requerimientos de la normatividad estos parámetros deben ser evaluados para garantizar la calidad óptima de los vertimientos que tienen como destino final fuentes naturales. [1]

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Validar, estimar la incertidumbre y determinar la trazabilidad para los ensayos de nitrógeno kjeldhal y nitrógeno Amoniacal, apoyado en los lineamientos de la NTC-ISO/IEC 17025:2005, en el laboratorio de Química Ambiental, de la Universidad Tecnológica de Pereira.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Validar los ensayos de nitrógeno kjeldhal y nitrógeno amoniacal a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo, como: límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango de aplicación y recuperación.
- Estimar la incertidumbre de medición asociada a los ensayos validados.
- Determinar la trazabilidad para los ensayos validados.
- Generar la documentación necesaria para dar cumplimiento a los requisitos establecidos por la NTC-ISO/IEC 17025:2005 en los numerales 5.4.2. y 5.4.5

5. INTRODUCCION

El agua es un elemento fundamental de todos los ecosistemas y de las interacciones entre sus elementos constitutivos, por ser indispensable para los diferentes procesos biológicos. Cuando factores externos alteran la calidad y la cantidad del agua, es de esperarse que se presenten desbalances. Estos desbalances pueden ser manejados hasta cierto nivel, dado que la capacidad natural de absorción y auto limpieza de los ecosistemas les permite mantenerse en equilibrio. Sin embargo, cuando este nivel se supera, los organismos vivientes que hacen parte del ecosistema pierden capacidad de subsistencia y recuperación, desequilibrando el ciclo natural.

Los ecosistemas desequilibrados por alteraciones inmanejables del agua pierden también capacidad de ofrecer bienes y servicios ambientales como el agua misma, afectando a las comunidades beneficiarias de dichos servicios. Esto puede resultar en enfermedades e inclusive, la muerte cuando se trata de comunidades de alta vulnerabilidad[2].

Los ríos colombianos reciben y transportan cargas de agua utilizadas en los diferentes procesos socioeconómicos y vertidas mayoritariamente sin tratamiento previo; además, son los receptores de altos volúmenes de sedimentos originados por procesos de erosión, bien sea de origen natural o por acción del hombre[3]. Por otra parte, la demanda de agua y los vertimientos de aguas residuales a los cuerpos de agua se incrementan diariamente, debido al crecimiento de la población y de las actividades económicas, lo cual agrava esta situación y exige de acciones de monitoreo y control[4].

Una de las causas de degradación de los cuerpos de agua es el vertimiento de aguas residuales sin tratamiento previo adecuado. Éstas aportan, entre otros contaminantes, altas cargas de compuestos de nitrógeno, principalmente las aguas residuales domésticas, las provenientes de uso agrícola y las de algunos sectores industriales como el procesamiento de carnes y de leche.

En la evaluación de la calidad del agua, los compuestos de nitrógeno son de gran importancia debido a su participación en los procesos biológicos que ocurren en ella, como también por la toxicidad que pueden presentar para los organismos acuáticos.

Las aguas residuales presentan una elevada carga contaminante que corresponde, en gran parte, a la materia orgánica que contienen, en cuya composición se encuentran los compuestos de nitrógeno. Entre las formas de nitrógeno, unas de las de mayor interés en las aguas son el amoniacal y el total. El amoniacal es uno de los componentes transitorios en el agua, ya que es parte del ciclo del nitrógeno y se ve influido por la actividad biológica. Es un producto natural de la descomposición de los compuestos orgánicos nitrogenados. Las aguas superficiales no deben contener normalmente amoniacal. En general, la presencia de amoniacal libre o ion amonio se considera como una prueba química de contaminación reciente y peligrosa. Si el medio es aerobio, el nitrógeno amoniacal se transforma en nitritos.

El nitrógeno total está compuesto por el nitrógeno amoniacal más el nitrógeno orgánico, y este está constituido por las formas de nitrógeno correspondientes al nitrato, nitrito y amonio.

Dentro de la nueva institucionalidad del sector ambiental, a partir de la expedición de la ley 99 de 1993 que creó el Ministerio del Medio Ambiente, el instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales IDEAM, adscrito a dicho ministerio, se constituye en una institución de investigación. Su función está orientada a prestar apoyo científico al Sistema Nacional Ambiental, SINA, mediante información sistemáticamente acopiada, procesada y analizada, permitiendo de esta manera que la adopción de políticas ambientales esté debidamente sustentada y responda a las circunstancias particulares de Colombia. En otras palabras, el IDEAM debe proporcionar la información necesaria para definir desarrollos ambientales sostenibles, con el fin de que el recurso Agua en nuestros territorios sean racionalmente utilizado y debidamente protegido [5,6].

El IDEAM es la entidad encargada de la acreditación de los laboratorios en el sector ambiental, por esta razón requiere de un proceso de Acreditación internacional, el cual a su vez implica la implementación de la norma NTC/ISO/IEC 17025:2005 que contempla la validación de todas las metodologías que se aplican en el laboratorio [7].

Para los laboratorios es muy importante responder a esta necesidad del IDEAM, ya que la validación actúa como sistema de aseguramiento de la calidad mediante el cual se establecen evidencias documentadas para demostrar que un proceso conduce a resultados de calidad consistentes dentro de las especificaciones predeterminadas. Adicionalmente, por requerimientos de su sistema de calidad y para lograr el cumplimiento derivado de las buenas prácticas de laboratorio se debe demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para la finalidad o propósito

perseguido, ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos resultados proporcionan. La fiabilidad de los resultados se demuestra verificando la trazabilidad del método analítico y comprobándola periódicamente. Además de verificar la trazabilidad, es necesario suministrar un parámetro que proporcione una idea del grado de confianza de los resultados, es decir. Que refleje lo que puede alejarse el resultado analítico del valor considerado verdadero. Por tanto los laboratorios deben proporcionar resultados trazables y con una incertidumbre asociada [7].

En el presente trabajo se desarrollaron y validaron los procedimientos analíticos de nitrógeno amoniacal y nitrógeno semi-micro kjeldahl por el método titulo métrico para aguas residuales, superficiales y subterráneas. Para estas metodologías se realizó la verificación de la trazabilidad y se identificaron y cuantificaron las fuentes de incertidumbre asociadas al proceso de medición.

6. MARCO DE REFERENCIA

6.1. DEFINICIONES (SEGÚN NTC-2194 E ISO 8402)

Metrología -Ciencia de la medición: la metrología incluye aspectos teóricos y prácticos relacionados con las mediciones, cualquiera que sea su incertidumbre y cualquiera que sea el campo de la ciencia o de la tecnología al cual se aplique.

Exactitud de la medición: Cercanía del acuerdo entre el resultado de una medición y un valor verdadero de la magnitud por medir.

Incertidumbre de la medición: parámetro asociado con el resultado de una medición, que caracteriza a la dispersión de los valores que en forma razonable se le podrían atribuir a la magnitud por medir.

El resultado de la medición es la mejor estimación del valor de la magnitud por medir, y que todos los componentes de la incertidumbre, incluyendo los ocasionados por efectos sistemáticos, tales como los componentes asociados con correcciones y con patrones de referencia contribuyen a la dispersión.

Instrumento de medición: dispositivo destinado para efectuar mediciones, solo o en conjunto con uno o varios dispositivos adicionales.

Patrón de trabajo: patrón que se utiliza rutinariamente para calibrar o comprobar, instrumentos de medida.

Calibración: conjunto de operaciones que establecen. Bajo condiciones específicas, la relación entre los valores de las magnitudes que indiquen un instrumento de Medición o un sistema de medición, o valores representados por una medida materializada o por un material de referencia, y los valores correspondientes determinados por medio de los patrones.

Trazabilidad: propiedad del resultado de una medición o el valor de un patrón tal que puede estar relacionado a referencias establecidas, generalmente

normas nacionales o internacionales, a través de una cadena ininterrumpida de comparaciones, con todas las incertidumbres declaradas.

NOTAS

1 El concepto es a menudo expresada por el adjetivo trazable.

2 La cadena ininterrumpida de comparaciones se llama cadena de trazabilidad.

Calidad: conjunto de propiedades y de características de un producto o servicio, que le confieren su aptitud para satisfacer unas necesidades explícitas e implícitas.

Aseguramiento de la calidad: son todas aquellas acciones planificadas y sistemáticas necesarias para proporcionar la confianza adecuada de que un producto o servicio satisface los requisitos de calidad establecidos. Para que sea efectivo, el aseguramiento de la calidad requiere, generalmente, una evaluación permanente de aquellos factores que influyen en la adecuación del diseño y de las especificaciones según las aplicaciones previstas, así como también verificaciones y auditorías a las operaciones de producción, instalación e inspección. En una organización, el aseguramiento de la calidad sirve como una herramienta de la gestión [8,9].

Confirmación metrológica: es necesario tener presente el marco dentro del cual se requiere del proceso de confirmación metrológica, este proceso se entiende como necesario dentro de una organización para: Conocer, controlar, o minimizar el efecto de mediciones erróneas en la calidad resultante de un producto o servicio . Al revisar el concepto de Calidad declarado por ISO 9000 (2000), dice que es el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple Con los requisitos, esa necesidad o expectativa establecida que conforman el conjunto de especificaciones de un producto o servicio [10].

6.2. REQUISITOS DE LA NORMA NTC/ISO/IEC 17025:2005 APLICABLES AL OBJETO DEL TRABAJO

El numeral 5.4.5 *Validación de los métodos*, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos que diseña o desarrolla, los métodos normalizados empleados fuera del alcance previsto, así como las ampliaciones y modificaciones de los métodos normalizados, para confirmar que los métodos son aptos para el fin previsto. La validación debe ser tan amplia como sea necesario para satisfacer las necesidades del tipo de aplicación o del campo de aplicación dados. El laboratorio debe registrar los resultados obtenidos, el procedimiento utilizado para la validación y una declaración sobre la aptitud del método para el uso previsto [11].

El numeral 5.4.6 *Estimación de la incertidumbre de la medición*, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que Los laboratorios de ensayo deben tener y deben aplicar procedimientos para estimar la incertidumbre de la medición. En algunos casos la naturaleza del método de ensayo puede excluir un cálculo riguroso, metrológicamente y estadísticamente válido, de la incertidumbre de medición. En estos casos el laboratorio debe, por lo menos, tratar de identificar todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación razonable, y debe asegurarse de que la forma de informar el resultado no dé una impresión equivocada de la incertidumbre. Una estimación razonable se debe basar en un conocimiento del desempeño del método y en el alcance de la medición y debe hacer uso, por ejemplo, de la experiencia adquirida y de los datos de validación anteriores.

El numeral 5.6 *Trazabilidad de las mediciones*, la norma NTC/ISO/IEC/17025:2005 dice que Todos los equipos utilizados para los ensayos y/o las calibraciones, incluidos los equipos para mediciones auxiliares (por ejemplo, de las condiciones ambientales) que tengan un efecto significativo en la exactitud o en la validez del resultado del ensayo, de la calibración o del muestreo, deben ser calibrados antes de ser puestos en servicio. El laboratorio debe establecer un programa y un procedimiento para la calibración de sus equipos.

El numeral 5.9 *aseguramiento de la calidad de los resultados de ensayo y calibración*, de la norma ISO/IEC/17025:2005 dice que el laboratorio debe tener procedimiento de control de calidad de ensayo y calibración, apropiados para el

tipo y volumen de trabajo del laboratorio, para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos y calibraciones llevados a cabo, registrarlos con el objetivo de detectar tendencias, y en la medida de lo posible aplicar técnicas estadísticas para la revisión de resultados y puede incluir los elementos siguientes:

- a) Uso regular de materiales de referencia certificados (MRC) o secundarios,
- b) Participación en comparaciones interlaboratorio o ensayos de aptitud,
- c) Repetición de ensayos o calibraciones o de la calibración utilizando el mismo método o métodos diferentes,
- d) Repetición del ensayo o de la calibración de los objetos retenidos,
- e) Correlación de resultados para diferentes características de un instrumento [12]

6.3. ASPECTOS BASICOS DE LA METROLOGIA

Obtener mediciones exactas y confiables, es un requisito fundamental para toda organización que desee estar entre las más competitivas, “puesto que lo que no se mide no se mejora”. A partir de las mediciones se asegura la calidad de los bienes o servicios que se comercializan, generando gran relevancia al momento de tomar decisiones al interior de las organizaciones.

La metrología es la ciencia de la medición, cuyo objeto de estudio comprende los patrones, las magnitudes y los sistemas de unidades. En ella se realiza una continua búsqueda de tolerancias más reducidas, y se evalúan las implicaciones económicas de mediciones erróneas en un mundo donde se ha vuelto imperante la protección del medio ambiente.

La metrología presenta tres subdivisiones:

La metrología científica que se encarga de establecer y mantener las unidades de medida; La metrología industrial mejora los sistemas de medición que están directamente relacionados con la calidad del producto y la metrología legal se ocupa de la protección al consumidor, verificando que los procesos de medición implementados cumplan con los requerimientos técnicos que garanticen que el cliente se encuentre satisfecho con el bien o servicio adquirido.

Las organizaciones cambiaron su percepción hacia la metrología ya que solo la consideraban relevante para cumplir unos requisitos y así obtener una certificación. Han trascendido de cumplir con unas exigencias sobre los dispositivos de medida a una gestión de las medidas con el fin de que equipos y procesos de medición sean adecuados para su uso previsto.

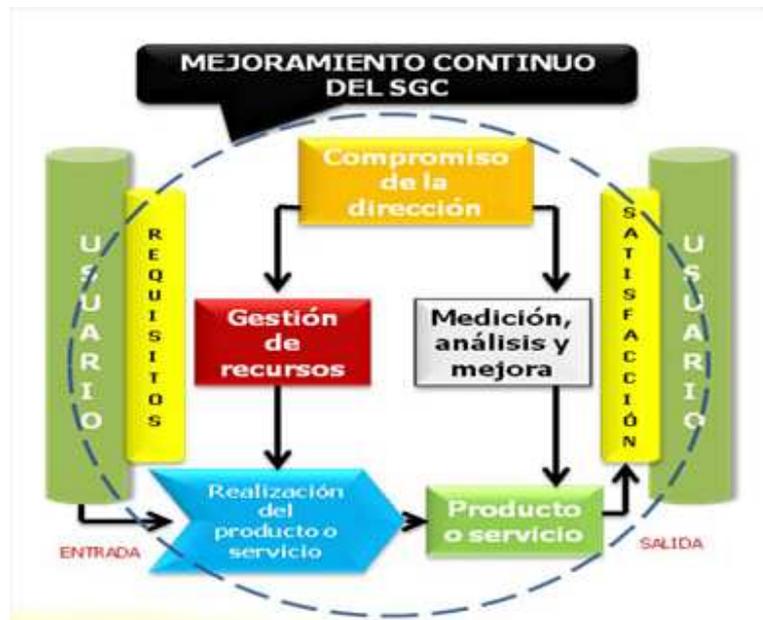
Para avanzar en un programa de mejoramiento de calidad es necesario contar, entre otras cosas con un sistema de mediciones confiable. Las mediciones y ensayo usualmente requieren de patrones de medición reproducible. Los resultados de las mediciones y ensayos están siempre sujetos a una incertidumbre [8].

6.3.1. METROLOGIA Y CALIDAD

Un proceso productivo es un conjunto de transformaciones en las que se controlan múltiples variables para lograr un producto final que cumpla con las expectativas requeridas, en el caso de un laboratorio el producto será un dato, por lo anterior no es posible admitir un proceso en el que no se controlen las características del producto a través de las mediciones. Producir y medir son actividades intrínsecas que se deben planear, ejecutar. Controlar y mejorar de manera simultánea.

Para garantizar un Sistema de la Gestión de la Calidad en cualquier tipo de organización es relevante contar con calidad en las medidas, ya que se recopila una cantidad de datos que determinan el cumplimiento de las especificaciones técnicas o criterios de calidad de los productos, a su vez permiten detectar tendencias en los procesos, lo que conduce a su regulación y por lo tanto a la búsqueda del mejoramiento continuo, como se observa en la figura 1.

Figura 1: Grafica de mejora continua.



La calidad de las medidas es exigida por medio de normatividades, referencias, solicitudes directivas y reglamentos internos, esta puede alcanzarse a través de calibraciones, verificaciones de equipos, cálculo de incertidumbres, validación de procesos de medida o control estadístico.

El aseguramiento de la medida tiene como finalidad lograr que los productos y procesos se encuentren exentos de errores significativos, por consiguiente integra procedimientos de obtención y análisis de datos, con el fin de minimizar la probabilidad de tomar decisiones incorrectas.

Para saber las condiciones en que se encuentra cada uno de los instrumentos utilizados dentro de un proceso industrial, es necesario realizarles la calibración correspondiente a intervalos periódicos de tiempo de tal manera que se pueda contar con la seguridad de que las mediciones realizadas con dichos instrumentos son confiables.

Sin embargo la calibración y ajuste de los instrumentos de medida no garantiza por sí sola la calidad de las medidas ya que esta no actúa sobre: Los posibles errores humanos, los defectos que pueda presentar una pieza o las condiciones ambientales, lo que hace es contribuir al correcto funcionamiento de los instrumentos.

6.3.2. METROLOGIA QUIMICA

Cada día se realizan en nuestro país miles de mediciones químicas, muchas de estas mediciones se realizan como parte de procesos industriales. Esto hace que su importancia en la economía sea fundamental.

Los resultados de los análisis químicos permiten desde el aseguramiento de la calidad de nuestros alimentos hasta el control de calidad de las materias primas en los procesos de manufactura en todo el país, pasando por el control de la contaminación ambiental y los aspectos relacionados con la salud.

Las mediciones que se realizan en el campo de la química han mostrado un rápido crecimiento principalmente en el área de la química analítica. Gran parte de este crecimiento se atribuye a diversos problemas relacionados con la contaminación ambiental, el tratamiento de desechos y en general a un mayor compromiso por el mejoramiento en la calidad de los productos siendo este último un factor clave en la competitividad de los mismos.

Los resultados que un laboratorio analítico emite pueden afectar las decisiones que en un momento dado determinaran el éxito o el fracaso de una organización, la aplicación de una política correcta de control ambiental, las decisiones en un litigio en transacciones comerciales ya sea a nivel nacional e internacional, etc.

La metrología química tiene como misión apoyar a los diversos sectores de la sociedad en la satisfacción de sus necesidades metrológicas presentes y futuras, estableciendo patrones nacionales de medición, desarrollando materiales de referencia y diseminando sus exactitudes por medio de servicios tecnológicos de la más alta calidad, para incrementar la competitividad del país, contribuir al desarrollo sustentable y a mejorar la calidad de vida de la población.

En metrología química se asume que al efectuar mediciones existe un control y aseguramiento efectivos de la calidad de modo que los procesos de medición sean estables y bajo control estadístico tanto como sea posible.

6.3.3. CARACTERIZACION DEL ASEGURAMIENTO DE LA MEDIDA

Si bien la descripción no coincide exactamente con los procesos llevados a cabo en un laboratorio de ensayo, la información tiene aplicación.

El aseguramiento de la medida contempla las siguientes actividades:

1. Determinación de los requerimientos de calidad de las medidas: En esta fase se arrojan los parámetros que definen el nivel de calidad admitido para las medidas, su significado y valor se señalan a partir de especificaciones y condiciones de medida.
2. Diseño del proceso de medida: Consiste en unificar los elementos (equipos de medida, software, características objeto de la medida, factor humano o condiciones ambientales) que conforman el proceso de medida asignado a cada lugar donde se controla el proceso. Para establecer un proceso de medida se debe estar al tanto de: Técnicas de medición, especificaciones de los equipos que se utilizan, influencia del operador de los resultados, normas internacionales, requisitos del cliente y procedimientos de calibración entre otros.
3. Configuración de los sistemas de medida: En esta etapa dependiendo del proceso productivo, se reúnen los procedimientos de medida asignados a cada lugar donde se controla el proceso con el objetivo de minimizar la cantidad de validaciones efectuadas al número de sistemas de medida definidos.
4. Ejecución de las pruebas de validación: En esta fase se efectúan las pruebas que definirán la aprobación de los procedimientos de medición. Estas se desarrollan evaluando la capacidad del sistema de medida para cumplir los requisitos de calidad de las medidas incluyendo en estas mediciones realizadas bajo diferentes condiciones que determinan la influencia de las distintas fuentes de error.
5. Planificación del control de los diferentes procedimientos de medida: Aquí se determinan las pruebas para garantizar que los procedimientos de medida cumplan con los criterios de aprobación a lo largo del tiempo.

La agrupación de controles implementados para asegurar la calidad de la medida en un margen de tiempo determinado se denomina comúnmente como Control de la Calidad de las Medidas.

6. Iniciación del proceso de medida: Al momento de iniciar un procedimiento de medida, se debe verificar en cada lugar donde se controla el proceso, que los elementos planificados cumplan con los requisitos especificados. En caso de encontrar algún elemento que no haya sido previsto en la etapa de diseño (Equipos de medida con rangos insuficientes, condiciones ambientales no aptas, etc.), se deben generar los cambios necesarios.

7. Control de calidad del procedimiento de medida: lo más aplicado en la industria para controlar la calidad en las medidas es la calibración de los equipos, ésta consiste en comparar los instrumentos con patrones trazados, y así determinar si dicho instrumento se encuentra trabajando dentro de las especificaciones. A su vez podría permitir el ajuste de las marcas de escalas de los equipos o la asignación de valores a las mismas.

8. Análisis de los datos y mejora: El desarrollo de las etapas anteriores es la base para identificar las acciones de mejora que pueden desencadenar cambios en el sistema [8,9]

6.4. VALIDACION

La validación 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 [7].

6.4.1. IMPORTANCIA DE VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Los objetivos primordiales de una validación es establecer un método y confirmar su desempeño por medio de tratamientos estadísticos y apreciaciones cualitativas por parte del laboratorio en general. De ahí radica la importancia de una adecuada validación, ya que establece bajo que circunstancias debe realizarse un análisis asegurando que los datos obtenidos cumplen en la totalidad la calidad deseada brindando seguridad y respaldo. Además proporciona criterios para el rechazo o re análisis de lecturas anómalas [13].

6.4.2. NECESIDAD DE LA VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Millones de mediciones analíticas se realizan diariamente en miles de laboratorio alrededor del mundo. Hay innumerables razones para realizar esas mediciones, por ejemplo: Como una forma de evaluar bienes para propósito de comercio; como apoyo a la salud; para verificar la calidad del agua para consumo humano; el análisis de la composición elemental de una aleación para confirmar su conveniencia en la construcción de aeronaves; en análisis forenses de fluidos corporales en investigaciones criminales. Virtualmente cada aspecto de la sociedad está apoyado de algún modo por mediciones analíticas.

El costo de realizar estas mediciones es elevado y surgen costos adicionales de las decisiones tomadas en base a los resultados. Por ejemplo las pruebas demuestran que algún alimento no es adecuado para su consumo pueden resultar en demandas por compensación; pruebas que confirmen la presencia de drogas prohibidas podrían ocasionar multas, encarcelamiento, o mas aún la ejecución en algunos países. Claramente es importante determinar el resultado correcto y ser capaz de demostrar que lo es [14].

6.4.3. EL DEBER PROFESIONAL DEL QUÍMICO ANALÍTICO

Si el resultado de una prueba no es confiable entonces tiene poco valor y la prueba no debió haberse realizado así, si un “cliente” encarga un trabajo analítico a un laboratorio, se supone que el laboratorio tiene un nivel de conocimiento experto que el cliente no tiene por sí mismo. El cliente espera poder confiar en los resultados reportados y por lo general sólo los cuestiona cuando surge una controversia. De este modo, el laboratorio y su personal tienen una clara responsabilidad de corresponder a la confianza del cliente proporcionando la respuesta correcta a la parte analítica del problema, en otras palabras, proporcionando resultados que han demostrado ser “adecuados a su propósito”.

Esto lleva implícito que las pruebas realizadas son apropiadas para la parte analítica del problema que el cliente desea resolver y que el informe final presenta los datos analíticos de tal manera que el cliente pueda entenderlos fácilmente y sacar conclusiones apropiadas. La validación del método permite a los químicos demostrar que el método es “adecuado para su propósito”.

Para que un resultado analítico concuerde con el propósito requerido, debe ser lo suficientemente confiable para que cualquier decisión basada en éste pueda tomarse con confianza. Así, el desempeño del método debe validarse y debe estimarse la incertidumbre del resultado a un nivel de confianza dado. La incertidumbre deberá ser evaluada y establecida de una forma que sea ampliamente reconocida, consistente de forma interna y fácil de interpretar. La mayor parte de la información requerida para evaluar la incertidumbre se puede obtener durante la validación del método.

6.4.4. ¿CUÁNDO DEBEN VALIDARSE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados para el uso en un problema analítico específico.

Por ejemplo:

- un nuevo método desarrollado para un problema específico;
- un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema;
- Cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo;
- un método establecido usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación.
- Para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

El alcance de la validación o la revalidación requerida dependerá de la naturaleza de los cambios hechos al aplicar un método a diferentes laboratorios, instrumentación, operadores y circunstancias en las cuales el método va a ser utilizado. Siempre es apropiado algún grado de validación, aun cuando se usan métodos aparentemente bien caracterizados ya sean de referencia o publicados [14]

6.4.5. ALGUNOS PARÁMETROS EMPLEADOS EN LA VALIDACIÓN

Selectividad / Especificidad: Capacidad del método para medir solo aquello que se intenta medir sin interferencias. Un método es específico cuando la determinación de un analito no es afectada por otras sustancias como por la matriz, reactivos u otros.

-Límite de detección (LD): La más pequeña cantidad detectable por encima del ruido de un procedimiento y dentro de un límite declarado de aceptación. Donde $LD = K \cdot \text{desviación estándar del ruido del fondo}$ (generalmente $K=3$)

-Límite de cuantificación (LC): Es la menor cantidad que puede ser predeterminada cuantitativamente con una incertidumbre asociada, para un

dado nivel de confianza. Donde $LC = K \cdot \text{desviación estándar del ruido del fondo}$ ($K=10$).

- linealidad: Es la capacidad de producir resultados proporcionales a la concentración del analito en las muestras dentro de un rango determinado de concentraciones ya sea directamente o por medio de una transformación matemática bien conocida.

-Rango de linealidad: Intervalos entre las concentraciones más bajas y más alta de analito determinadas, para las cuales se cumple la ley de Beer.

-Sensibilidad: Se refiere a la respuesta obtenida para una determinada cantidad de analito.

-Exactitud: proximidad Entre el valor medio obtenido de un conjunto de resultados y el valor de referencia aceptado.

Grado de aproximación entre los resultados de prueba y los valores de referencia aceptados. Se evalúa por medio del sesgo.

$$\%E = \frac{\text{Valor medio obtenido} - \text{Valor teorico}}{\text{Valor teorico}} \times 100$$

-Precisión Bajo condiciones de Repetibilidad: Grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.

-Precisión Bajo condiciones de Reproducibilidad: Expresa la variabilidad en la aplicación del método en diferentes condiciones. Métodos entre sí, analistas a través del tiempo, analistas entre sí.

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Donde (s) es la desviación estándar y (X) la media.

- Robustez: Es la medida de la capacidad de un procedimiento analítico para permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método.
- Recuperación: Fracción conocida de analito agregado a la muestra incógnita (muestra fortificada) previo al análisis. [14].
- En caso de presentarse diferencias entre las réplicas de las muestras analizadas se efectuará el rechazo de datos usando la prueba de Grubbs, la cual utiliza una prueba estadística, T, que es la diferencia absoluta entre el valor atípico, X_0 , y el promedio de la muestra (X) dividida por la desviación estándar de la muestra, s.

$$G = \frac{\text{Valor sospechoso} - X}{S}$$

Si G calculada es > G tabulada, el valor sospechoso se rechaza.

6.5. CALCULO DE LA INCERTIDUMBRE

La incertidumbre es la estimación unida al resultado del ensayo que caracteriza el intervalo de valores dentro del cual se puede asegurar que se encuentra presente el valor verdadero. La incertidumbre de Medición comprende en general muchos componentes. Algunos de estos componentes son evaluados desde la distribución estadística de los resultados de las series de mediciones y pueden ser caracterizados por desviaciones estándar.

La incertidumbre de medición no implica duda acerca de la validez de una medición, por el contrario el conocimiento de la incertidumbre incrementa la confianza en la validez de un resultado de medición [15].

6.5.1. FUENTES DE INCERTIDUMBRE

En la práctica la incertidumbre en los resultados podría incrementar debido a muchas posibles fuentes, incluyendo ejemplos como condiciones de mediciones, muestreo, efecto de matriz e interferencias, condiciones ambientales, incertidumbres de masas y material volumétrico, valores de referencia, aproximaciones y suposiciones incorporados en el procedimiento y método de medición y rango de variación [16].

6.5.2. COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE

En la estimación de la incertidumbre general puede ser necesario tomar cada fuente de incertidumbre y tratarlas por separado para obtener la contribución de esa fuente. Cada contribución separada de la incertidumbre es referida como un componente de incertidumbre. Cuando un componente de la incertidumbre es expresada como una desviación estándar, es conocida como incertidumbre estándar. Si hay una correlación entre cualquier componente entonces esto se tiene que tener en cuenta al determinar la covarianza.

Sin embargo a menudo es posible evaluar el efecto combinado de varios componentes. Esto puede reducir el esfuerzo general implicado, y donde los componentes cuya contribución es evaluada juntas son correlacionados, puede no haber una necesidad adicional tener en cuenta la correlación.

Para un resultado de medición y , la incertidumbre total es denominada la incertidumbre combinada estándar y denotada por $u_c(y)$, es una estimación de la desviación estándar igual a la raíz cuadrada positiva de la varianza total obtenida por combinación de todos los componentes de la incertidumbre, esto es lo que se conoce como ley de propagación de la incertidumbre.

Para más propósitos en química analítica una incertidumbre expandida U podría ser usada. La incertidumbre expandida proporciona un intervalo dentro del cual el valor del mesurando se cree que se encuentra con un alto nivel de confianza. U es obtenida de la multiplicación de la incertidumbre combinada estándar $u_c(y)$, por un factor de cobertura k . La elección del factor k es basado en el nivel de confianza decidido. Para una aproximación del nivel de confianza del 95%, k es 2.

El factor de cobertura podría siempre indicarse de manera que la incertidumbre estándar combinada de la cantidad medida puede ser recuperada calculando la incertidumbre estándar combinada de otros resultados de medición que podrían depender en la cuantificación.

Los ensayos usualmente tienen el propósito de llevar a cabo la evaluación de la conformidad con requisitos establecidos, mediante la comparación de éstos con los resultados de sus mediciones, esto no los excluye de una declaración de la incertidumbre de medición en los resultados, además de ser una parte indispensable en la expresión de un resultado de medición. Los resultados de tal evaluación pueden ser conforme o no conforme [16].

6.5.3. INCERTIDUMBRE Y ERROR

Es importante distinguir entre incertidumbre y Error. Error es definido como la diferencia entre un resultado individual y el valor verdadero de el mesurando. En principio el valor de un error conocido puede ser aplicado como una corrección a los resultados.

Un error es considerado teniendo dos componentes a saber, un componente aleatorio y un componente sistemático.

Error aleatorio: típicamente surge de variaciones impredecibles de las magnitudes de influencia. Estas variaciones dan lugar a variaciones en observaciones repetidas del mesurando. El error aleatorio de un resultado analítico no puede ser compensado, pero por lo general se puede reducir mediante el aumento del número de observaciones.

Error sistemático: Es definido como un componente de error que en el curso de un número de análisis del mismo mesurando permanece constante o varía de una manera predecible. Esto es independiente del número de mediciones hechas y por lo tanto no puede ser reducido aumentando el número de análisis en condiciones de medición constante.

La incertidumbre toma la forma de un rango y si es estimada por un procedimiento analítico y tipo de muestra definida puede aplicarse a todas las determinaciones descritas. En general el valor de la incertidumbre no puede ser usado para corregir resultados de medición [16].

6.5.4. ELEMENTOS DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

6.5.4.1 El modelo matemático de la medición, descrito mediante una o varias expresiones matemáticas acompañadas de la nomenclatura correspondiente, y la mención explícita de las hipótesis necesarias para su validez.

6.5.4.2 La lista de las fuentes de incertidumbres significativas y una descripción, breve y suficiente de las mismas.

6.5.4.3 La mención a fuentes de incertidumbre que típicamente no aportan contribuciones significativas, pero que pueden resultar significativas bajo condiciones que pudieran ocurrir en el transcurso de una medición.

6.5.4.4 Una tabla con los componentes de incertidumbre que contenga al menos, para cada uno de ellos la incertidumbre de la medición, su variabilidad, la distribución de probabilidad que se le asocie, el coeficiente de sensibilidad y su contribución a la incertidumbre estándar combinada de la medición. La tabla también debe mostrar la incertidumbre estándar combinada y expandida.

6.5.4.5 Una nota relativa al tipo de distribución de probabilidad del mensurando

6.5.4.6 Recomendaciones sobre el cálculo y la expresión de la incertidumbre expandida de la medición, incluyendo preferentemente y cuando aplique, los grados de libertad asociados a cada contribución y el número efectivo de grados de libertad.

6.5.4.7 Una nota de advertencia sobre el propósito único de ilustración de la tabla presentada y sobre la obligación de cada laboratorio a realizar sus propias pruebas y consideraciones sobre la estimación de la incertidumbre de sus mediciones [16].

6.5.5. PROCESO DE ESTIMACIÓN DE LA INCERTIDUMBRE DE MEDICIÓN

La estimación de la incertidumbre es simple en principio. A continuación se resume las tareas que deben realizarse con el fin de obtener una estimación de la incertidumbre asociada con un resultado de medición.

6.5.5.1. ESPECIFICACIÓN DEL MESURANDO

Escribir una declaración clara de lo que se está midiendo incluyendo la relación entre el mensurando y las magnitudes de entrada (cantidades de medición, constantes, valores de calibración estándar etc.) de las que dependen.

Siempre que sea posible incluir correcciones por efectos sistemáticos conocidos. La especificación de la información deberá ser dada siempre en el proceso de operación normal (SOP) u otras descripciones de métodos.

6.5.5.2. IDENTIFICACIÓN DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE

Realizar una lista de las posibles fuentes de incertidumbre. Esto incluirá fuentes que contribuyen a la incertidumbre en los parámetros en la relación especificada anteriormente, pero puede incluir otras fuentes y debe incluir las fuentes que surgen de supuestos químicos.

6.5.5.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES DE INCERTIDUMBRE

Medir o estimar el tamaño del componente de incertidumbre asociada con cada fuente potencial de incertidumbre identificada. A menudo es posible estimar o determinar una sola contribución de la incertidumbre asociada con un número de fuentes separadas. Es también importante considerar si los datos disponibles representan suficientemente todas las fuentes de incertidumbre, planificar experimentos adicionales y estudios cuidadosamente para asegurar que todas las fuentes de incertidumbre son adecuadamente tenidas en cuenta [16].

6.5.5.4. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE COMBINADA

La información obtenida en la etapa anterior consiste en un número de contribuciones cuantificadas a la incertidumbre general, asociados con las fuentes individuales o con los efectos combinados de varias fuentes. Las contribuciones tienen que ser expresadas como desviaciones estándar, y se combinan de acuerdo a las normas apropiadas para dar una incertidumbre estándar combinada. El factor de cobertura apropiado debe ser aplicado para dar una incertidumbre expandida [16].

6.6. TRAZABILIDAD

Para lograr la comparabilidad de los resultados en el espacio y el tiempo, es esencial unir todos los resultados individuales de las mediciones a una referencia común estable o estándar de medición. Los resultados pueden ser comparados a través de su relación con esa referencia. Esta estrategia de vincular resultados a una Referencia que 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 una cadena ininterrumpida de comparaciones, todas teniendo incertidumbres establecidas" [17].

Esta definición implica una necesidad de un esfuerzo a nivel nacional e internacional para proporcionar estándares de referencia ampliamente aceptados, y en el nivel individual del laboratorio para demostrar los enlaces necesarios a dichas normas.

En el plano nacional e internacional, la comparabilidad entre los sistemas nacionales de medición está siendo continuamente mejorado por interoperación de patrones de medición en nivel del Instituto de Metrología Nacional (INM). Un acuerdo de reconocimiento multilateral se firmó en 1999 por los países miembros de la Convención del Metro, en respuesta a la necesidad de un esquema abierto, transparente para ofrecer a los usuarios información cuantitativa confiable sobre la comparabilidad de los sistemas nacionales de metrología.

La Medición individual de los laboratorios de ensayo, desempeñan su parte en el uso cuidadoso de mediciones apropiadas y normas de referencia para la calibración y el control de sus procesos de medición. En un entorno cada vez más regulado, los laboratorios están bajo mayor presión para demostrar que su uso de la medición y normas de referencia son en efecto apropiados y suficientes [18]

6.6.1. PRINCIPIOS DE TRAZABILIDAD.

Métodos, resultados y mesurandos:

El mesurando es una "cantidad objeto de la medición", tales como masa, volumen o concentración. Es muy importante que la cantidad a medir esté clara e inequívocamente definida. Por ejemplo, el volumen se define para una temperatura específica, y se aplica a una concentración de analito particular, y las especies químicas. Algunos mesurandos se definen en términos de los métodos utilizados, por ejemplo, plomo extraíble "requeriría la especificación de las condiciones de extracción. (Mсурandos definidas en términos de un método se denominan a veces "empírico", en comparación con medición "racional" a que puede ser descrita sin referencia a un método específico).

Los métodos de medición son los procedimientos destinados a proporcionar estimaciones de los valores de medición. Los métodos se han desarrollado y documentado, de manera que proporciona estimaciones fiables, y para el propósito de este documento se supondrá que el método es aceptado para proporcionar una estimación adecuada para el propósito determinado, y que incorpora todos los controles necesarios y correcciones.

Los resultados son los valores atribuidos al mesurando usando un método apropiado. Los resultados son consecuencia de las estimaciones de los mesurandos. Resultados tienen propiedades tales como incertidumbre, precisión y la trazabilidad [18]

6.6.2. ESCALAS DE MEDICION, ESTANDARES Y UNIDADES

Comparaciones significativas entre los resultados de la medición sólo son posibles si los resultados son expresados en las mismas unidades. Esto se logra en realidad citando resultados de la medición como múltiplos de una unidad dada; por ejemplo, una masa de 2,1 kilogramos tiene una masa igual a 2,1 veces la masa del kilogramo internacional. La masa del kilogramo Internacionales la unidad de masa. Claramente, con el fin de expresar una masa como un múltiplo de otro, los dos

se han de comparar. Es impráctico comparar todas las masas con el Kilogramo Internacional. Esta comparación es por lo tanto más comúnmente indirecta, a través de los patrones de referencia, que son a su vez calibrados frente a otros estándares. Esto forma una cadena de comparaciones que conduce a la unidad pertinente primaria o una “realización” aceptada de una unidad. Facilitar el acceso a unidades coherentes de medición por medio de estándares de referencia es la función principal de la trazabilidad, sin ella, no hay ninguna medida significativa.

Una escala de medición es simplemente un método acordado de utilizar unidades de medida y la definición de un origen (un punto cero). La Masa, la longitud y la concentración se expresa utilizando escalas lineales de medida con cero en el origen (que son “escalas de relación”); el pH, por

ejemplo, escala logarítmica con una referencia a una actividad de iones hidrógeno de 1. Cuando dos resultados se describen como “en la misma escala de medición” ambos se expresan en las mismas unidades y con el mismo origen [18].

6.6.3. CALIBRACIÓN

La calibración se describe por el VIM como el proceso de establecer la relación entre valores que se muestran por un instrumento de medida o sistema, y los valores proporcionados por mediciones estándar.

La calibración puede ser (y normalmente lo es) aplicada a las partes de un sistema de medición. En particular los instrumentos se calibran normalmente en forma aislada, y luego se usan en sistemas de medición más grandes. Los instrumentos tales como balanzas y termómetros están calibrados con menos frecuencia debido a que son relativamente estables en el mediano plazo, instrumentos como cromatografía de gases (GC) o el equipo espectrómetro de masas(ICP-MS) tienden a variar mucho más y típicamente se calibra con más frecuencia, a menudo en la misma prueba como un conjunto de elementos de ensayo. Para este propósito, generalmente se espera utilizar un producto químico puro como material de calibración, aunque se puede añadir a una matriz similar a las muestras esperadas con el fin de reducir los efectos de matriz. Bajo estas circunstancias, los valores estándar de referencia aparecerá en el cálculo del resultado (Quizás indirectamente) y es por tanto evidente que el resultado es atribuible a estos valores de referencia [18].

6.6.4. EFECTOS SOBRE LOS RESULTADOS MEDICIÓN

Cualquier medición puede ser como una o más determinaciones combinadas para dar un resultado bajo las condiciones especificadas. Por ejemplo, el análisis de una muestra de suelo para los contaminantes normalmente encontrados implica la determinación cuantitativa de la masa de tierra tomada, y la concentración de analito en un volumen medido de solución que contiene un extracto de la muestra. Todos estos parámetros están calificados en cierta medida por las condiciones de medición. La masa se determina mediante un

peso, en sentido estricto al vacío y en un campo gravitatorio especificado, el volumen se suele tomar como “volumen a 20 °C” y con condiciones de extracción- ya sea para la extracción completa o para una extracción parcial definida- normalmente se definen en términos de tiempo, disolvente, y temperatura. La masa, la concentración y tal vez el volumen, por supuesto, varían de una medición a la siguiente, teniendo en cuenta que se toman diferentes tamaños de muestras- son los valores medidos de las "variables" en el cálculo del resultado final. La extracción y otras condiciones se lleva a cabo generalmente cerca de sus valores nominales y no se espera que cambie, sino que son condiciones fijas, y generalmente no son están incluidas en el cálculo.

Para un método de medición dado, si las condiciones fijadas cambian, también lo hará el valor del resultado. Por ejemplo si las condiciones de extracción cambian significativamente.

Para un método de medición dado, si las condiciones fijadas cambian, también lo hará el valor del resultado. Por ejemplo, si las condiciones de extracción cambian significativamente de las especificadas en el método, el resultado será incorrecto, de igual modo lo sería si la masa o valores de concentración son incorrectos. De ello se deduce que tanto las condiciones fijas requeridas para la medición y los otros valores medidos y puestos en el cálculo del resultado afectan a los resultados analíticos. Si bien las condiciones de las cantidades fijas o variables que se miden son correctas, entonces también lo será el resultado. Estos valores medidos, tantos los incluidos en el cálculo o entre determinadas condiciones, son los “los valores de influencia” para la medición: todas tienen una influencia en el resultado y todo lo que debe ser controlado.

Lo más simple es mirar primero la forma en que las condiciones de medición fijas están controladas [18].

6.6.5. CONTROL DE LAS CONDICIONES FIJADAS

Si dos científicos desean obtener la misma lectura de una medición, el método más simple es utilizar el mismo instrumento de medición. Para continuar con el ejemplo del análisis de suelos con un sencillo aspecto físico de la medición, si un tiempo de extracción constante es importante, entonces dos analistas

simplemente podrían usar el mismo reloj para determinar el tiempo de extracción. Si se hace esto, es posible decir que todos los resultados tienen su origen en el tiempo dado por el reloj, el reloj ofrece el estándar de referencia de tiempo.

Esto funciona bien, y (al menos para un método dado) no se requiere que el reloj sea exacto. Mientras el reloj se ajusta, si todos los implicados utilizan el mismo reloj y el mismo intervalo de tiempo (es decir, cada resultado es atribuible al intervalo de tiempo de extracción dado por el reloj), todo los implicados compartirán un conjunto consistente de las condiciones y el momento de la extracción no causará una dispersión en los resultados.

Esto se convierte en inviable muy rápidamente sí es necesario un control muy estrecho. Es claramente inviable para el mismo reloj ser utilizado por muchos científicos en diferentes momentos y lugares. Lo que es necesario es una colección de relojes que muestran todo el mismo tiempo. En la práctica, la forma más sencilla de lograr esto es asegurar que todos los relojes son así mismos comparables con un reloj maestro y demostrar que indican el mismo intervalo, o corregirlo de modo que el intervalo correcto puede deducirse de las lecturas de cada reloj (esto es "calibración "contra el reloj maestro).Cada analista utilizando su propio reloj a continuación, genera el tiempo de extracción misma. Ahora es posible decir que no sólo los resultados de cada analista tienen su origen en el intervalo de su propio reloj, si no también que todos ellos son atribuibles al reloj maestro. Esta es la trazabilidad aun patrón de referencia único el reloj-maestro, en el ejemplo-que genera una medición coherente en los diferentes laboratorios.

Esto nos lleva a un principio fundamental; La trazabilidad a los patrones comunes de referencia permite a los laboratorios obtener el mismo conjunto de condiciones fijas requeridas para las mediciones.

Esto a su vez minimiza la variación debida a cambios en las condiciones fijas de medición [18]

6.6.6. EL PAPEL DEL DESARROLLO DE METODOS

El desarrollo de métodos por lo general produce un procedimiento operativo estándar, la incorporación de un conjunto de instrucciones para llevar a cabo una medición, un conjunto de condiciones de medida que define los valores de los parámetros que deben mantenerse estables, y una ecuación de la cual se calcula el resultado utilizando los valores de los parámetros medidos. Por consiguiente, proporciona una ecuación, que se espera que generen resultados consistentes, siempre que las condiciones especificadas se han establecido correctamente. La implicación es que si los valores de todos estos parámetros son trazables a referencias estables, los resultados serán consistentes.

El papel de la validación en el establecimiento de la trazabilidad es en consecuencia probar si el método está suficientemente bien definido e incorpora todos los requisitos de trazabilidad necesarios [18].

6.6.7. TRAZABILIDAD E INCERTIDUMBRE DE MEDICION

Para la estimación de la incertidumbre en un resultado en particular, el analista necesita no sólo las contribuciones a la incertidumbre que se derivan del procedimiento de medición entre sí (de precisión, limitaciones del operador etc.), sino también la incertidumbre asociada a sus valores de referencia. De ello se deduce que las mediciones útiles con incertidumbres sólo pueden proporcionarse si todos los parámetros necesarios son trazables hasta las referencias adecuadas y la incertidumbre en cada una de las referencias que se conocen [18]

6.6.8. ACTIVIDADES ESCENCIALES EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA TRAZABILIDAD.

- i) Especificación del mesurando, el alcance de las mediciones y la incertidumbre requerida.
- ii) La elección de un método adecuado para estimar el valor, es decir, un procedimiento de medición asociada con el cálculo, una ecuación y las condiciones de medición.
- iii) Demostrar, a través de la validación, que el cálculo y las condiciones de medición incluyen todos los valores de influencia que afectan significativamente el resultado, o el valor asignado a un estándar.
- iv) La identificación de la importancia relativa de cada magnitud de influencia
- v) La elección y aplicación de normas de referencia apropiados
- vi) Estimación de la incertidumbre [18].

7. RESULTADOS DEL ENSAYO DE NITROGENO AMONICAL

En la tabla 1 se muestran los objetivos trazados para desarrollar la validación del método de nitrógeno amoniacal y las actividades realizadas para dar cumplimiento a dichos objetivos.

Tabla 1: Objetivos y Resultado del ensayo de Nitrógeno Amoniacal

OBJETIVOS	RESULTADOS
<ul style="list-style-type: none"> Validar el ensayo de Nitrógeno Amoniacal a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo, como: Limite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de Repetibilidad y reproducibilidad, rango de aplicación y recuperación. 	<ul style="list-style-type: none"> AMEF (Análisis de Modo y Efecto de Falla). Ver numeral 7.4.6 Actividades principales para dar cumplimiento a los parámetros de validación. Ver numeral 7.4.5. Datos Obtenidos de estándares y muestras durante la validación. Precisión expresada como %CV. Ver numeral 7.5.3 y Exactitud expresada como %E ver numeral 7.5.2 Cartas de Control del Método de Nitrógeno Amoniacal. Ver numeral 7.9
<ul style="list-style-type: none"> Estimación de la incertidumbre de medición asociada al ensayo de Nitrógeno Amoniacal. 	<ul style="list-style-type: none"> Estimación de la Incertidumbre de Medición. Ver numeral 7.6
<ul style="list-style-type: none"> Determinación de la trazabilidad para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal. 	<ul style="list-style-type: none"> Trazabilidad en Mediciones Químicas. Ver numeral 7.7

7.1. EQUIPOS REACTIVOS Y VIDRERIA EMPLEADOS EN LA EJECUCION DEL PLAN DE VALIDACION.

Tabla 2: Equipos

Destilador kjeldahl. VelpScientifica.UDK 130 ^a
Titulador automático. Metróm 716 DMS
pH-metro. Fisher. AB 15
Purificador de agua. Simplicity U.V. Millipore
Balanza analítica SartoriusBP 221 S
Termostato julabo F34

Reactivos grado analítico o superior

Tabla 3: Reactivos

Agua tipo II. Resistividad 18,2 MΩ
Cloruro de amonio. Calidad Suprapur 99.995%
Titrisol de ácido sulfúrico 1N
Ácido sulfúrico 0.02N
Tris Hidroximetilaminometano – TRIS- $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$. Reactivo grado analítico
Soluciones amortiguadoras pH 7,00 y pH 4,00. MRC
Cloruro de Potasio 3M: Solución electrolito para rellenar y almacenar los electrodos de pH.
Solución buffer de boratos

Hidróxido de sodio, NaOH 6N
Hidróxido de sodio, NaOH 1N
Ácido sulfúrico 0.02 N
Tris Hidroximetilaminometano – TRIS- $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$. Reactivo grado analítico

A continuación se describe la preparación de los reactivos empleados para la ejecución del ensayo de nitrógeno amoniacal

- Solución de tetraborato de sodio 0,025 M: Pesar 9,5 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y diluir a 1L.
- Solución Buffer de Borato: Adicionar 88 mL 1N a 500 ml de una solución de tetraborato de sodio 0,025 M y diluir a 1L.
- Mezcla de Indicadores:

Solución A: Se disuelven 0,200 g de rojo de metilo en 100 ml de Etanol al 95%. También se puede usar isopropanol.

Solución B: Se disuelven 0,100 g de azul de metileno en 50 ml de etanol al 95%. También se puede usar isopropanol.

- Las soluciones A y B se mezclan en proporción 1+1. Esta mezcla puede conservarse aproximadamente durante 1 mes.

Tabla 4: . Vidriería y materiales

El material volumétrico empleado para el desarrollo de la validación es clase A

Tubos de digestión semi-micro kjeldahl de 100 mL
Erlenmeyer de 250 mL, clase A
Matraces aforados de 100 mL, clase A
Matraz aforado de 200 mL, clase A
Matraces aforados de 250 mL, clase A
Matraz aforado de 500 mL, clase A
Matraz aforado de 1000 mL, clase A
Beaker de 100 mL
Pipetas volumétricas clase A: 15 mL 25 mL, 50 mL, 75 mL, 100 mL.
Espátulas metálicas
Frascos lavadores

7.2. Preparación de Soluciones de trabajo y Muestras adicionadas.

- Solución madre de 100 mgN-NH₃/L: preparado por pesada directa de 0,3819 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 1L con agua destilada.
- Estándar bajo E1: Concentración teórica 3 mgN-NH₃/L: preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 15 mL y se llevan a un matraz aforado de 500 mL.

- Estándar 2: Concentración teórica de 10 mgN-NH₃/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 25 mL y se llevan a un matraz aforado de 250 mL.
- Estándar 3: Concentración teórica de 20 mgN-NH₃/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 50 mL y se llevan a un matraz aforado de 250 mL.
- Estándar 4: Concentración teórica de 50 mgN-NH₃/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 50 mL y se llevan a un matraz aforado de 100 mL.
- Estándar 5: Concentración teórica de 75 mgN-NH₃/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 75 mL y se llevan a un matraz aforado de 100 mL.
- Estándar 6: Concentración teórica de 100 mgN-NH₃/L preparado por pesada directa de 0,3819 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 1L con agua tipo II.

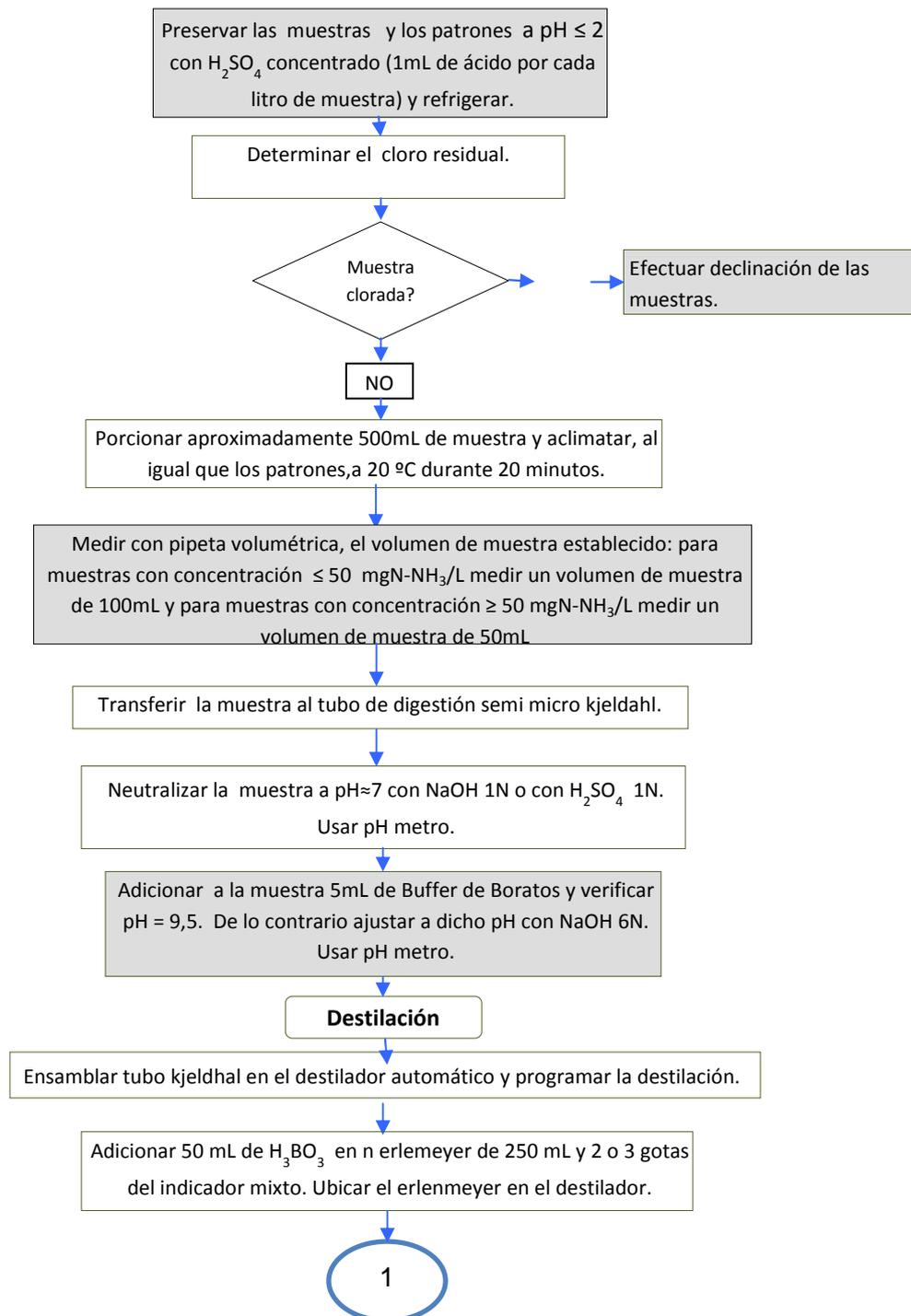
La preparación de las muestras adicionadas se realizó diariamente tal como se describe a continuación:

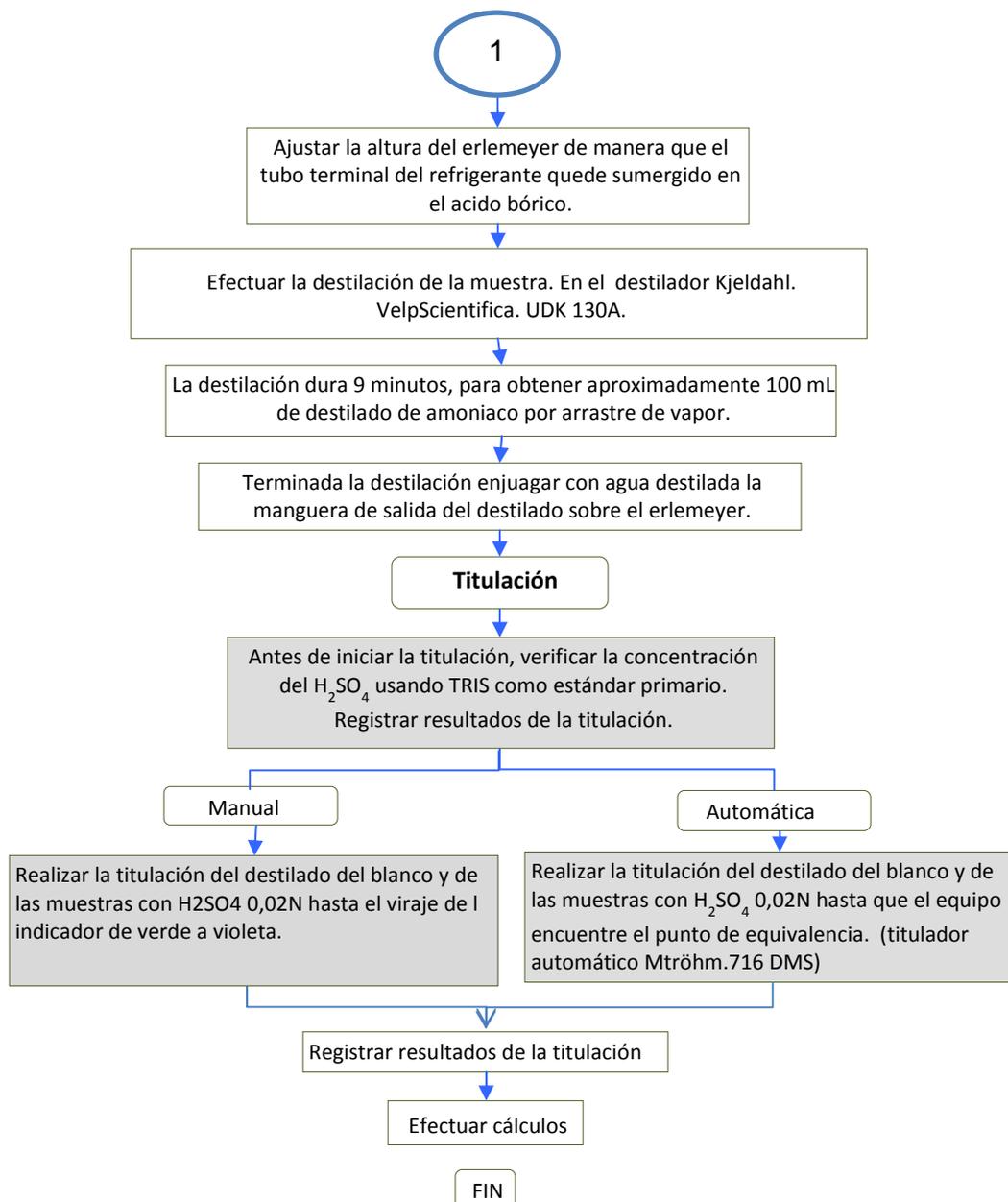
- Patrón de 200 mgN-NH₃/L: preparado por pesada directa de 0,15275 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 0,2 L con agua destilada.
- Patrón de 100 mgN-NH₃/L: preparado por pesada directa de 0,3819 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 1L con agua destilada.
- M1: Muestra ARD. Concentración aproximada 12,0 mg N-NH₃/L.
- M1 + Ab: Medir 250 mL de M1 y adicionarle 10 mL de un patrón de 100 mg N-NH₃/L.
- M1 + Aa: Medir 250 mL de M1 y adicionarle 8 mL de un patrón de 200 mg N-NH₃/L.

7.3. Nitrógeno amoniacal Método Volumétrico 4500-NH₃C

En la figura 2 se muestra el procedimiento que se llevó a cabo para la determinación del método de nitrógeno amoniacal tomado del standard methods for the examination of water & wastewater

Figura 2: Flujograma





Los elementos marcados con color gris representan las actividades críticas del proceso.

7.4. Determinación de Nitrógeno Amoniacal por el método Titulométrico

7.4.1. OBJETIVO DE LA VALIDACION

Comprobación de que el método tiene la repetibilidad, la reproducibilidad, la precisión intermedia y la exactitud suficiente para el objetivo de aplicación.

7.4.2. OBJETIVO DEL METODO

Matriz: Aguas residuales y aguas naturales (superficiales y subterráneas).

Analito: Ion amonio.

Rango de aplicación: Desde el límite de cuantificación a 100 mgN/L sin dilución de la muestra.

7.4.3. CRITERIOS DE ACEPTACION

En la tabla 5 se muestran los criterios de aceptación definidos para el método de nitrógeno amoniacal, evaluando la exactitud como porcentaje error y la precisión en términos de coeficiente de varianza.

Tabla 5: Criterios de Aceptación del Método

Estadístico	Valor	Unidades
Exactitud	$\leq 10\%$ para patrones	%E
Precisión	$\leq 10\%$ para patrones y muestras	% CV

Tabla6: Valores de referencia según Standard Methods for the examination of water and wastewater (DE 097). Página 4-112. Numeral 6 [19].

Estándar ugN/L	%E	%CV
200	20	69,8
800	5	28,6
1500	2,6	21,6

7.4.4. PARAMETROS DE VALIDACION

Tabla 7: . Parámetros característicos a evaluar para cada método.

Parámetro	Aplica	
	Sí	No
Límite de detección	X	
Límite de cuantificación	X	
Exactitud	X	
Precisión	X	
Precisión bajo condiciones de Repetibilidad	X	
Precisión bajo condiciones de Repetibilidad intermedia	X	
Precisión bajo condiciones de Reproducibilidad	X	
Recuperación	X	
Sensibilidad		X
Rango Lineal/ Rango de trabajo		X
Robustez		X

7.4.5. ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARAMETROS DE VALIDACION.

En la tabla 8 se relaciona las actividades principales realizadas para dar cumplimiento a los parámetros establecidos en el numeral 7.4.4

Tabla 8: Actividades principales para dar cumplimiento a los parámetros de validación.

Parámetro	Actividades Principales
Límite de detección y de cuantificación	<p>Posterior a la selección del Estándar bajo (Eb) adecuado y con el fin de determinar el límite de cuantificación cada día y durante 7 días se analizaron 2 réplicas de un estándar de concentración teórico cercano al límite de cuantificación (Eb).</p> <p>Con el lote de datos se calcula: el promedio aritmético (X_m), la desviación estándar (s), el coeficiente de variación (%CV), el porcentaje de error (%E).</p> <p>Los resultados de la desviación del Eb se asociaron a los límites de detección y de cuantificación.</p>
Exactitud, expresada como % E	<p>Con el fin de evaluar la exactitud del método se analizaron diariamente 2 réplicas, durante 7 días, de estándares a concentraciones teóricas diferentes.</p>
Precisión, expresada como porcentaje de coeficiente de variación (%CV).	<p>Para evaluar la precisión del método se analizaron diariamente réplicas de estándares y muestras dentro del rango de aplicación del método.</p> <p>La precisión se evaluó en términos de Repetibilidad y de Repetibilidad intermedia de los estándares.</p> <p>Así mismo se incluyeron 2 muestras naturales cuyos valores de Nitrógeno amoniacal y nitrógeno total se encuentran dentro del rango de aplicación del método así:</p> <p>M1: Muestra natural. Muestra de agua Residual Domestica (ARD).</p>

		M2: Muestra natural. Muestra de ARD Afluente de la PTAR de la UTP.
Precisión condiciones repetibilidad.	bajo de	El analista responsable aplicó el método a todos los estándares y muestras propuestas durante 7 días en la validación.
Precisión condiciones Repetibilidad Intermedia	bajo de	El analista responsable aplicó el método a todos los estándares y muestras propuestas un día dos veces: en la mañana y en la tarde.
Precisión condiciones reproducibilidad.	bajo de	El analista sustituto aplicará el método a todos los estándares y muestras propuestas durante 2 días en la validación.
Recuperación		<p>Con el fin de evaluar el porcentaje de recuperación se analizó una muestra real de ARD y se determinó su concentración, a la cual se le efectuó una adición baja (30% M1 y una adición alta (50%M1).</p> <p>La muestra y las muestras adicionadas se analizaron, por el analista responsable, durante 7 días en la validación. Un día de la validación se efectuó el análisis en la mañana y en la tarde y el analista sustituto efectuó el análisis durante 2 días de la validación.</p> <p>A partir de los valores promedio obtenidos, cada día, para la muestra y de los valores promedio obtenidos, cada día, para las adiciones se calculó el porcentaje de recuperación</p>

7.4.6. ANALISIS DE MODO YEFECTO DE FALLA (AMEF)

En la tabla 9 se muestran las causas y los efectos de falla potencial que se pueden presentar en cada una de las etapas del procedimiento de nitrógeno amoniacal.

Tabla 9: Análisis de Modo y Efecto de falla

Descripción del Proceso		Modo de falla potencial	Causas de falla potencial	Ocurrencia	Efecto de falla potencial	Severidad	Controles actuales	Detección	NPR
Etapas del proceso									
1	Lavado general del material con jabón libre de fosfatos	presencia de jabón	No se lavó con abundante agua. No se sigue el procedimiento establecido en el SOP 1-22 plan de higiene y limpieza.	3	Alto consumo de titulante en el blanco y se altera la concentración de las muestras.	7	Aplicación del procedimiento establecido en el SOP 1-22 Plan de higiene y limpieza: Lavado de material con abundante agua, luego con H ₂ SO ₄ concentrado, y por último con agua tipo II.	1	21
2	Preservar las muestras con H ₂ SO ₄ concentrado a pH ≤ 2 y Refrigerar	muestras con pH >2	Olvido de la actividad No verificar pH de la muestra con Papel indicador.	2	Oxidación de la materia orgánica debida a la actividad bacteriana y volatilización del amoníaco, lo cual genera pérdidas con consecuente sesgo negativo.	8	medir pH de la muestra con papel indicador antes y despuesde la etapa de conservación	1	16
3	Declorinar la muestra	muestra clorada	no remover cloro residual por adición del reactivo declorinador. Olvido de la actividad	6	No se cuantifica nitrógeno amoniacal, el nitrógeno se encontraría como cloroaminas.	8	Recopilación de información en el F 005 Recepción de muestras para saber si la muestra ha recibido tratamiento con cloro. Aplicación del procedimiento establecido en el SOP 3-04 numeral 7.2.2.2	4	192
4	Temperar las muestras y partones a 20°C	trabajar a temperatura ambiente	no garantizar los analisis a T= 20°C	2	Temperaturas muy altas o muy bajas interfieren en el analisis, por lo tanto los resultados son poco confiables	6	Las muestras se atemperan en un termostato a 20°C durante 20 minutos	6	72
5	Seleccionar un volumen de muestra	trabajar con volumenes de muestra poco representativos	El volumen de muestra no sea suficiente para cuantificar la muestra	6	El volumen de titulante disminuiría, lo cual llevaría a tener un mayor error en la cuantificación.	7	Se toma un volumen de muestra con pipeta volumetrica de acuerdo a la tabla 1.1 del SOP de nitrógeno amoniacal.	6	252
	Medir la muestra y los patrones	Trabajar con pipetas graduadas	El volumen de muestra medido no sea exacto.	3	El volumen de muestra tomado no sea exactamente el que se requiere, lo cual genera margen de error con consecuente sesgo negativo y con poca precisión en la cuantificación.	9	Medir las muestras y los patrones con pipeta volumetrica	9	243
6	Neutralizar a pH =7 con NaOH 1N	No llevar la muestra a pH=7	Olvido de la actividad, no verificar pH de la muestra con pH-metro, premura, no calibración del electrodo de pH, daño del equipo, expertiz	7	La solución buffer, no va a ser suficiente para llevar la muestra al pH requerido, y la forma predominante del nitrógeno va a ser en forma de sal, por lo tanto no se va a cuantificar todo el nitrógeno en forma de amoníaco, obteniendo pérdidas con consecuente sesgo negativo.	8	Se ajusta el pH a 7 empleando pH-metro, antes de adicionar la solución buffer	1	56
7	Adicionar solución buffer y ajuste de pH a 9,5.	Inadecuado ajuste del pH	Olvido de la actividad, no verificar pH de la muestra con pH-metro, premura, no calibración del electrodo de pH, daño del equipo, expertiz	5	No se cuantifica nitrógeno amoniacal sino ion amonio, obteniendo pérdidas con consecuente sesgo negativo.	9	Se ajusta pH a 9,5 empleando pH-metro	2	90
8	Recolectar el destilado en ácido bórico	No utilizar suficiente solución absorbente	Todo el amoníaco que se destila no se logra recolectar.	2	amoníaco que se destiló, porque no se logra absorber, lo cual genera pérdidas con consecuente sesgo negativo en los resultados.	9	se utiliza 50mL de ácido bórico al 2% como absorbente	1	18
9	Destilar muestras y patrones	manejo inadecuado del equipo, fallas en la energía eléctrica.	No seguir procedimiento descrito en la IT 12 destilador Kjeldahl. Velp Científica. UDK 130A, premura, daño del equipo.	2	No se obtiene por arrastre de vapor el nitrógeno amoniacal, no se puede cuantificar la muestra, no se puede continuar con el analisis.	9	Seguir procedimiento del uso del equipo descrito en la IT 12 destilador Kjeldahl. Velp Científica. UDK 130A, en caso de que se vaya la energía realizando la destilación repetir el analisis.	2	36
10	Estandarizar el ácido sulfúrico 0,02N	El H ₂ SO ₄ no tenga la concentración conocida	Olvido de la actividad no estandarizar el ácido	2	El reporte de los resultados no se haga con la concentración verdadera de H ₂ SO ₄ obteniendo resultados con consecuente sesgo negativo o positivo.	9	se estandariza el H ₂ SO ₄ con TRIS para verificar que su concentración sea de 0,02N y el resultado se incluye en la hoja de recolección de datos correspondiente	1	18
11	Titulación automática	Titulación efectuada por fuera de los parámetros establecidos. Parámetros de calibración del electrodo de pH fuera de	que el volumen de parada del titulante sea menor al requerido por la muestra, y el volumen que gasta en la titulación sea erróneo debido a la variación de pH.	2	se reportan resultados que no son confiables	10	Se calibra el electrodo de pH, se verifican los parámetros del método. Ver SOP Nitrógeno-Amoniacal, se determina el volumen de parada del titulante según el volumen de muestra.	1	20
12	Ejecutar cálculos	%CV fuera de especificaciones %E fuera de especificaciones	Muestras con características inhomogéneas Preparación inadecuada de patrones y Contaminación.	2	Al realizar el análisis de los patrones de control y las muestras, estos reporten unos resultados que se encuentran por fuera de las especificaciones del método. El análisis de las muestras no evidencia condiciones de repetibilidad. Repetir ensayo Se genera TENC	10	se reporta el TENC y se repite el análisis.	6	120

7.4.7. RESULTADOS PREVIOS A LA VALIDACION PARA DEFINIR EL LIMITE DE CUANTIFICACION EXPERIMENTAL (LC)

En las tablas 10 y 10.1 se presentan los resultados obtenidos previos a la validación de los patrones de 2 mgN/L y 3 mgN/L, para definir el patrón correspondiente al límite de cuantificación experimental, teniendo en cuenta que cumpla con los criterios de aceptación del método.

Tabla 10: Resultados obtenidos del patrón de 2 mgN/L

Patrón 2mg/L Corrida 1	Concentración mgN-NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviación estándar (S)	%CV	%E
Replica 1	2,72	2,36	0,24	10,2	18
Replica 2	2,39				
Replica 3	2				
Replica 4	2,53				
Replica 5	2,13				
Replica 6	2,31				
Replica 7	2,46				
Patrón 2mg/L Corrida 2	Concentración N-NH3	Promedio mg N-NH3	S	%CV	%E
Replica 1	2,56	2,46	0,10	3,87	23
Replica 2	2,37				
Replica 3	2,45				
Patrón 2mg/L Corrida 3	Concentración N-NH3	Promedio mg N-NH3	S	%CV	%E

Replica 1	2,35	2,33	0,13	5,4	16,5
Replica 2	2,44				
Replica 3	2,19				
Patrón 2mg/L Corrida 4	Concentración N-NH3	Promedio mg N-NH3	S	%CV	%E
Replica 1	2,53	2,33	0,22	9,52	17
Replica 2	1,93				
Replica 3	2,45				
Replica 4	2,29				
Replica 5	2,27				
Replica 6	2,49				
Patrón 2mg/L Corrida 5	Concentración N-NH3	Promedio mg N-NH3	S	%CV	%E
Replica 1	2,55	2,46	0,10	3,89	25
Replica 2	2,61				
Replica 3	2,46				
Replica 4	2,37				
Replica 5	2,37				
Replica 6	2,42				

Para el calculo del % CV se utiliza la siguiente ecuación:

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

Ejemplo corrida 1:

$$S=0,24$$

$$X= 2,36$$

$$\%CV = \frac{S}{X} \times 100$$

$$\%CV = \frac{0,24}{2,36} \times 100$$

$$\%CV = 10,2$$

$$\%E = \frac{(2,36 - 2,0) \text{ mgN/L}}{2,0 \text{ mgN/L}} \times 100$$

$$\%E = 18$$

Como se observa en la tabla 10 el patrón de 2 mgN-NH₃/L no cumple con los criterios de aceptación del método ya que durante las diferentes corridas se obtuvo un %E mayor de 10%, motivo por el cual se decidió efectuar la cuantificación con patrones de 3 mgN-NH₃/L. En la tabla 10.1 se recopilan los resultados experimentales de éste patron.

Tabla 10.1 Resultados obtenidos del patrón de 3 mgN-NH₃/L

Patrón 3mg/L Corrida 1	Concentración N-NH ₃	Promedio N-NH ₃	%CV	%E
Replica 1	3,25	3,3	5,72	10
Replica 2	3,21			
Replica 3	3,57			
Replica 4	3,12			
Replica 5	3,5			
Replica 6	3,15			
Patrón 3mg/L Corrida 2	Concentración N-NH ₃	Promedio N-NH ₃	%CV	%E
Replica 1	3,07	3,2	3,91	6,7
Replica 2	3,2			
Replica 3	3,32			
Patrón 3mg/L Corrida 3	Concentración N-NH ₃	Promedio N-NH ₃	%CV	%E
Replica 1	3,05	3,02	7,32	0,6
Replica 2	2,79			
Replica 3	3,23			
Patrón 3mg/L Corrida 4	Concentración N-NH ₃	Promedio N-NH ₃	%CV	%E
Replica 1	3,12	3,17	3,59	5,6
Replica 2	3,14			

Replica 3	3,23			
Replica 4	3,34			
Replica 5	3			
Replica 6	3,09			
Replica 7	3,25			

En la tabla 10.1 se observa que los resultados obtenidos para el patrón de 3 mgN-NH₃/L cumplen con los criterios de aceptación del método ya que se obtuvo un %CV y % E menor o igual al 10%.

Por esta razón se concluye que el límite de cuantificación experimental es 3 mgN-NH₃/L.

7.5. Discusión de Resultados

Al lote de datos de cada estándar o muestra obtenidos se les realizó la prueba F, ésta prueba considera la razón de dos varianzas muestrales, es decir, la razón de los cuadrados de las desviaciones estándar. La cantidad calculada (F) está dada por la ecuación 1.

$$Ec. 1 \quad F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

También se realizó la prueba de t la cual consiste en comparar dos medias muestrales (X_1 y X_2) para comprobar si estas medias difieren significativamente de cero. Si las dos muestras tienen desviaciones estándar que no sean significativamente diferentes, se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar a partir de las dos desviaciones estándar individuales s_1 y s_2 utilizando la ecuación 2

$$Ec.2 \quad s^2 = \frac{\{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2\}}{n_1 + n_2 - 2}$$

Se puede demostrar entonces que la prueba de t está dado por: Ecuación 3

$$Ec.3 \quad t = \frac{(x_1 - x_2)}{s \cdot \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

Donde t tiene n_1 y $n_2 - 2$ grados de libertad [20].

La prueba de f y de t para cada lote de datos se efectuó usando el software estadístico ProControl, para evaluar si las poblaciones de datos son homogéneas y tener un criterio adicional, para excluir del lote los datos estadísticamente desiguales e/o inhomogéneos. El procesamiento estadístico de los datos a través de procontrol hace parte de la documentación del laboratorio de química ambiental por lo tanto no se publica en este documento.

7.5.1. LIMITES DE DETECCION Y CUANTIFICACION

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante los días de validación para el estándar de menor concentración.

Tabla 11: Resultados obtenidos para el estándar de 3 mgN-NH3/L

Día	Estándar 3mgN/L
Día 1	3,34
	3,27
Día 2	3,16
	3,20
Día 3	3,13
	3,32
Día 4a	3,24
	2,96
Día 4b	2,96
	2,81
Día 5	2,98
	3,40
Día 6 (sustituto)	2,91
	3,13
Día7 (sustituto)	3,11
	3,08
\bar{x}	3,13
S	0,17
% CV	5,38
%E	4,17
Nº replicas	16

Al efectuar la prueba F, se pudo establecer que las poblaciones de datos obtenidas durante los 7 días de validación son homogéneas entre sí, lo que significa que no hay diferencias significativas en las distribuciones de cada uno de ellos, por lo tanto, pertenecen a la misma población de datos, lo que permite que los valores de LD y LC se puedan promediar.

De manera teórica el límite de detección se considera como 3 veces la desviación estándar del valor del Eb (3 mg/L) y el límite de cuantificación se considera como 10 veces la desviación estándar del valor del Eb.

Teniendo en cuenta el resultado de la desviación estándar obtenido para las 16 réplicas de Eb ($s = 0,17$ mg N-NH₃/L), el Límite de detección para el ensayo es 0,50 mg N-NH₃/L y el Límite de cuantificación es 1,68 mg N-NH₃/L. sin embargo teniendo en cuenta que el estándar de menor concentración que arroja resultados de exactitud y precisión dentro de los criterios de aceptación establecidos para el método ($\%CV \leq 10\%$ Y $\%E \leq 10\%$) corresponde a 3,00 mg N-NH₃/L se ha decidido establecer:

- **Límite de cuantificación: 3,00 mg N-NH₃/L**
- **Límite de detección: 0,90 mg N-NH₃/L**
-

7.5.2. EXACTITUD EXPRESADA COMO %E

A continuación se recopilan los resultados de los estándares durante los siete días de la validación.

Tabla 12: Resultados de los Estándares.

Día	Estándar 3mgN/L	Estándar 10mgN/L	Estándar 20mgN/L	Estándar 50mgN/L	Estándar 75mgN/L	Estándar 100mgN/L
Día 1	3,34	9,96	19,6	47,7	71,2	94,4
	3,27	9,71	18,9	48,1	71,7	89,1
Día 2	3,16	9,41	19,5	48,2	67,0	94,5
	3,20	9,37	19,2	48,2	71,2	94,3
Día 3	3,13	9,62	19,4	47,8	70,8	94,2
	3,32	9,71	19,4	48,0	71,1	90,2
Día 4a	3,24	9,11	19,3	46,5	70,8	93,6
	2,96	9,98	19,3	47,7	71,0	93,9
Día 4b	2,96	9,57	19,0	46,5	71,5	93,9
	2,81	9,66	19,1	49,7	71,3	95,1
Día 5	2,98	9,69	19,2	47,8	71,0	95,5
	3,40	9,38	19,6	48,2	73,1	96,0
Día 6 (sustituto)	2,91	9,48	19,5	47,9	71,7	94,5
	3,13	9,66	19,4	48,1	72,5	96,0
Día7 (sustituto)	3,11	9,44	19,0	48,0	71,1	83,2
	3,08	10,1	19,7	47,5	69,9	95,0
\bar{x}	3,13	9,62	19,3	47,9	71,1	93,3
S	0,17	0,26	0,23	0,72	1,30	3,28
% CV	5,38	2,66	1,20	1,51	1,83	3,51
%E	4,17	-3,84	-3,38	-4,27	-5,26	-6,67
Nº replicas	16	16	16	16	16	16

El análisis estadístico realizado a través del programa ProControl para los estándares evidencia en cuanto a la exactitud, evaluada a través del % E que cada grupo de patrones cumple con los parámetro de aceptación establecido para el método($\%CV \leq 10\%$ y $\%E \leq 10\%$).

7.5.3. PRECISION EXPRESADA COMO %CV

A continuación se consolidan los resultados obtenidos durante los días de validación para las muestras analizadas . Ver anexo 1.

Tabla 13: . Consolidado de datos de recuperación de las muestras

Día	Muestra baja (M1)	Muestra (M2)	Muestra baja + Adición	%R (M1 Ab)	Muestra baja + Adición	%R (M1 Aa)
Día 1	12,4	56,8	16,3	98,4	18,2	96,6
	12,9	57,5	15,5		18,2	
Día 2	12,5	58,9	15,4	93,2	19,1	106
	12,7	57,0	15,9		18,4	
Día 3	12,7	59,0	15,9	93,4	18,0	96,7
	12,8	58,4	15,8		18,7	
Día 4 ^a	12,9	57,6	15,9	93,4	18,1	91,9
	12,6	59,4				
Día 4 b	12,3	58,8	15,8	95,8	18,3	99,8
	12,8	49,4	15,7		18,4	
Día 5	12,6	57,7	15,8	93,1	18,3	98,2
	12,4	63,4	15,4		18,1	
Día 6	12,6	58,0	15,8	90,7	18,2	95,0

	12,7	55,1	15,6		18,1	
Día 7	12,7	58,9	16,4	98,6	18,0	88,6
	12,9		15,9		17,9	
Nº replicas	16	15	15	8	15	8
\bar{Y}	12,6	57,7	15,8	94,6	18,3	98,3
S	0,20	2,91	0,28	2,14	0,31	4,75
% CV	1,58	5,04	1,78	2,27	1,67	4,83
%E	No Aplica	No Aplica	No Aplica	-5,43	No Aplica	-3,36
3S						
10S						

La precisión bajo condiciones de repetibilidad se evaluó a partir de la prueba F.

Como se discutió anteriormente en el límite de detección y el límite de cuantificación, las series de datos obtenidas durante la validación muestra que las poblaciones de datos cumplen con los criterios de aceptación establecidos para el método ($\%CV \leq 10\%$).

Para las muestras naturales (M1, M1 (Ab), M1 (Aa) y M2 la prueba F muestra que todas las poblaciones de datos son estadísticamente iguales, ya que no hay diferencias significativas entre las varianzas de las series de datos obtenidas durante la validación, con un 95% de confianza.

La prueba de t muestra que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de datos de las muestras naturales (M1, M1 (Ab), M1 (Aa) y M2.

Las muestras naturales presentan %CV por debajo del 10% lo que evidencia condiciones de repetibilidad. Las muestras no presentan variabilidad que puedan afectar los resultados analíticos de las muestras que se analizan habitualmente en el laboratorio porque para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal se garantiza que el análisis se efectúe de acuerdo al tiempo máximo de almacenamiento establecido en el standard methods for the examination of water & wastewater. 22 st [19].

Repetibilidad Intermedia.

En la tabla 14 se muestran los resultados obtenidos para los diferentes patrones efectuando el análisis un día en la mañana y en la tarde.

Tabla 14: Datos obtenidos durante la validación para la repetibilidad Intermedia

Día	Estándar 3mgN/L	Estándar 10mgN/L	Estándar 20mgN/L	Estándar 50mgN/L	Estándar 75mgN/L	Estándar 100mgN/L
4a(mañana)	3,24	9,11	19,3	46,5	70,8	93,6
	2,96	9,98	19,3	47,7	71,0	93,9
4b(tarde)	2,96	9,57	19,0	46,5	71,5	93,9
	2,81	9,66	19,1	49,7	71,3	95,1
X	2,99	9,58	19,2	47,6	71,2	94,1
S	0,18	0,36	0,13	1,51	0,33	0,64
%CV	6,00	3,75	0,69	3,18	0,46	0,68
%E	0,25	-4,2	-4,04	-4,82	-5,12	-5,9

En la tabla 20 se observa que los valores de X_m , s , $CV\%$ y $E\%$ no difieren significativamente, y cumplen con los criterios de aceptación del método.

Los resultados para el mismo analista en la mañana y en la tarde proporcionan evidencia de condiciones de Repetibilidad.

Precisión bajo condiciones de Reproducibilidad:

Analista sustituto: Luz Adriana Londoño.

Tabla 15: Datos obtenidos bajo condiciones de Reproducibilidad

A continuación se muestran los resultados obtenidos por el analista sustituto durante la validación.

Día	Estándar 3 mgN/L	Estándar 10 mgN/L	Estándar 20 mgN/L	Estándar 50 mgN/L	Estándar 75 mgN/L	Estándar 100 mgN/L
6 (Sustituto)	2,91	9,48	19,5	47,9	71,7	94,5
	3,13	9,66	19,4	48,1	72,5	96,0
7 (Sustituto)	3,11	9,44	19,0	48,0	71,1	83,2
	3,08	10,1	19,7	47,5	69,9	95,0
\bar{x}	3,06	9,67	19,4	47,9	71,3	92,2
S	0,10	0,30	0,29	0,26	1,10	6,02
%CV	3,29	3,13	1,52	0,55	1,54	6,53
%E	1,92	-3,3	-3,0	-4,25	-4,93	-7,83

Se cálculo la desviación estándar media de las series de mediciones a través del software estadístico Procontrol con un 95% de seguridad estadística. Con esta prueba se evaluó la dispersion 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).

$$Ec. 4 \quad S_1 = \sqrt{\frac{1}{N - k} \sum_{i=1}^k (n_i - 1) S_i^2}$$

La desviación estándar media del método es 2,33 %CV valor que proporciona evidencia de condiciones de reproducibilidad y que se encuentra por debajo de los criterios de aceptación establecidos para el método.

7.5.4. RECUPERACION.

Tabla 16: resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de las muestras

Muestra baja (M1)	Muestra baja + Adición	%R (M1 Ab)	Muestra baja + Adición	%R (M1 Aa)
\bar{x}	12,6	94,6	18,3	98,3
%E	No Aplica	-5,43	No Aplica	-3,36

Los porcentajes de recuperación obtenidos para la muestra adicionada fueron de 94,6% para la adición baja y de 96,6% para la adición alta.

Los porcentajes de error obtenidos tanto para la adición baja (5,43%) como para la adición alta (3,36%) son menores al 10%, evidenciando que no existen efectos de matriz.

A continuación se muestra la forma en que se efectuaron los cálculos para los porcentajes de recuperación.

Ejemplo del cálculo del %R para la adición baja de M1:

$$\%R = \frac{(C_{ma} \times V_{ma}) - (C_m \times V_m)}{C_p \times V_{ap}}$$

Dónde:

C_{ma} : Concentración muestra adicionada

V_{ma} : Volumen de muestra adicionada

C_m : Concentración de la muestra sin adición

V_m : Volumen de muestra sin adición

C_p : Concentración del patrón

V_{ap} : Volumen adicionado del patrón

$$\%R = \frac{(15,9 \times 0,26) - (12,6 \times 0,25)}{100 \times 0,01} \times 100$$

$$\%R = 98,4$$

7.6. ESTIMACION DE LA INCERTIDUMBRE

7.6.1. MESURANDO

Medición de la cantidad de ión borato (H_2BO_3^-) presente en la muestra, producto de la destilación por arrastre de vapor, El cual se mide mediante la titulación con ácido sulfúrico 0,02N. La cantidad de ión borato presente es equivalente a la cantidad de amoníaco liberado.

7.6.2. MODELO MATEMATICO

$$\text{mgN-NH}_3/\text{L} = \frac{(A-B)_{\text{mL}} * N_{\text{H}_2\text{SO}_4 (\text{Eq/L})} * 14000_{(\text{mg/Eq})}}{V_{\text{m}(\text{mL})}}$$

Donde:

mgN-NH₃/L: Contenido de nitrógeno en la muestra

A: Volumen de ácido sulfúrico 0,02N consumido en la titulación de la muestra

B: Volumen de ácido sulfúrico 0,02N consumido en la titulación del blanco

N: Normalidad del ácido sulfúrico.

V_m: Volumen de muestra.

14000: Factor de Conversión a mg/L y debido al peso equivalente del nitrógeno.

7.6.3. IDENTIFICACION DE FUENTES DE INCERTIDUMBRE

A continuación se muestran las fuentes inmediatas de incertidumbre que afectan la cuantificación para los métodos de nitrógeno amoniacal.

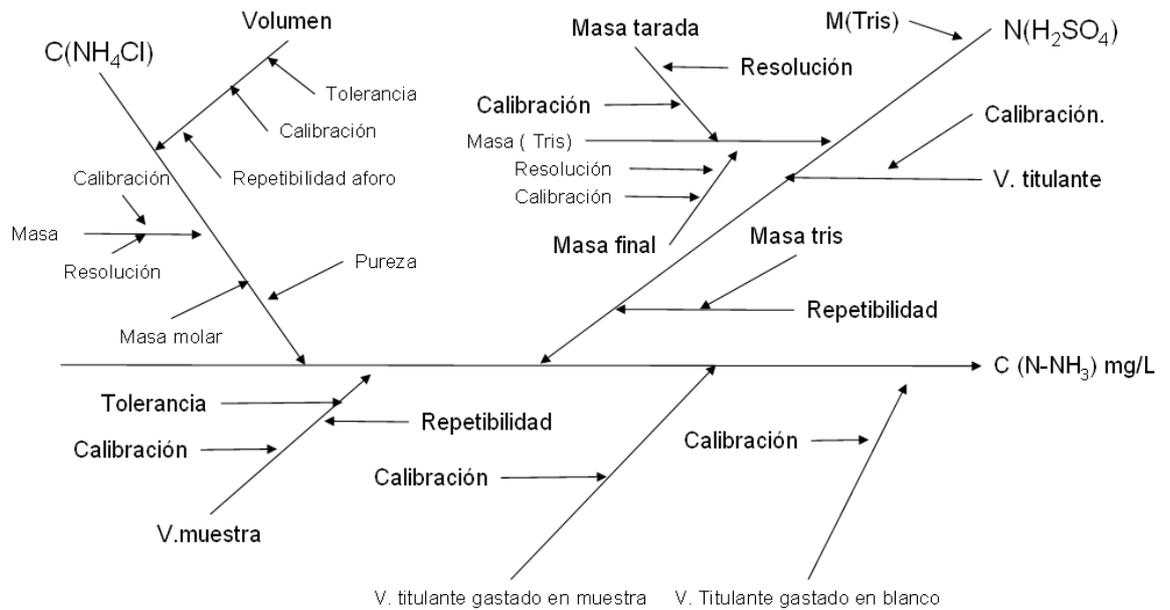
Tabla 17: Fuentes de Incertidumbre para el análisis de Nitrógeno Amoniacal.

Fuentes	Factor Critico en la Cuantificación.	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 100mgN/L.	X	
Preparación del Acido sulfúrico 0,02N	X	
Volumen de muestra	X	
Volumen de ácido sulfúrico consumido en la muestra	X	
Volumen de ácido sulfúrico consumido en elBlanco	X	
Ajuste de pH en la muestra		X
Destilación		X

7.6.4. DIAGRAMA CAUSA-EFECTO

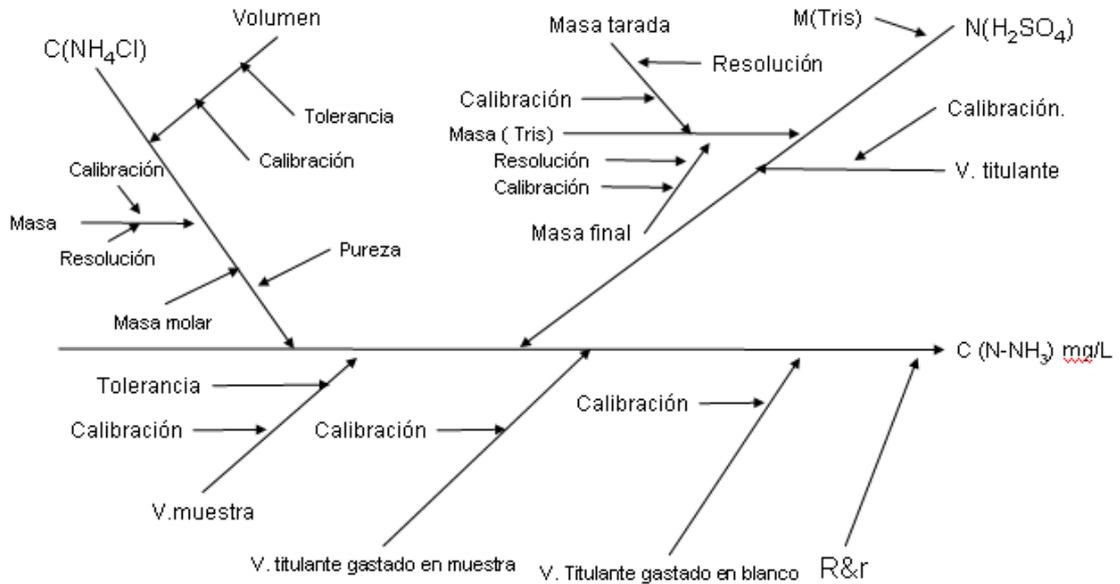
En las figuras 3 y 4 se muestra las fuentes que aportan incertidumbre al método de nitrógeno amoniacal.

Figura 3: Primer Diagrama Causa-Efecto en la Estimación de la Incertidumbre de la medición en el análisis de Nitrógeno Amoniacal



En la figura 4 se Integra una fuente de incertidumbre llamada Repetibilidad y Reproducibilidad (R y r) donde entran a formar parte todas las repetibilidades de aforo y pesos tomados.

Figura 4: Segundo Diagrama Causa-Efecto en la Estimación de la incertidumbre de la medición en el análisis de Nitrógeno Amoniacal



Donde R&r es la fuente de incertidumbre debida a la Repetibilidad y reproducibilidad del análisis.

7.6.5. CALCULOS

a) Incertidumbre debida a la solución madre de 100mgN-NH₃/L (U_{SM})

- **Masa de NH₄Cl (g) :** Valor estimado (X_i) = 0,3819
 Incertidumbre estándar de la Calibración de la balanza (U_{xi}) = 5,05442x10⁻⁵
 Incertidumbre estándar de la masa tarada (U_{xi}) = 0,00005
 Incertidumbre combinada (U_cX_i) :

$$\sqrt{(5,05442 \times 10^{-5})^2 + (0,00005)^2} = 7,10965 \times 10^{-5}$$

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi} /X_i) :

$$\frac{7,10965 \times 10^{-5}}{0,3819} = 0,000186165$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{7,10965 \times 10^{-5}}{0,3819} \right)^2 = 3,46575 \times 10^{-8}$$

- **Masa molar NH₄Cl (g/mol):** Valor estimado (X_i) = 53,4912
Incertidumbre estándar del Nitrógeno, Hidrogeno y Cloro:
N: 4,04145 × 10⁻⁵

H₄: 0,000161658

Cl: 0,000519615

Incertidumbre combinada (U_cX_i):

$$\sqrt{(4,04145 \times 10^{-5})^2 + (0,000161658)^2 + (0,000519615)^2} = 0,00054568$$

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi}/X_i):

$$\frac{0,00054568}{53,4912} = 1,02013 \times 10^{-5}$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{0,00054568}{53,4912} \right)^2 = 1,04067 \times 10^{-10}$$

- **Pureza NH₄Cl:** Valor estimado = 0,99995
Incertidumbre estándar: 2,88675 × 10⁻⁵
Incertidumbre combinada: 2,88675 × 10⁻⁵
Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi}/X_i):

$$\frac{2,88675 \times 10^{-5}}{0,99995} = 2,8869 \times 10^{-5}$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{2,88675 \times 10^{-5}}{0,99995} \right)^2 = 8,33417 \times 10^{-10}$$

- **Volumen (mL):** Valor estimado = 1000
Incertidumbre estándar matraz de 1000: 0,065, este valor corresponde a la incertidumbre después de haber realizado la calibración de este material volumétrico, dentro del cual se tiene en cuenta la tolerancia del matraz. la calibración del material volumétrico fue efectuado por el laboratorio de química ambiental.

Incertidumbre combinada: 0,065, este valor es igual a la incertidumbre estándar del matraz, ya que solo hay una fuente que aporta incertidumbre al volumen y es la calibración del matraz de 1000 mL. Ver figura 4.

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,065}{1000} = 0,000065$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{0,065}{1000}\right)^2 = 4,225 \times 10^{-9}$$

b) Incertidumbre debida al Volumen de muestra (U_{vm}):

Incertidumbre estándar de la pipeta Volumétrica de 100mL: 0,025

Incertidumbre combinada: 0,025

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,025}{100} = 0,00025$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{0,025}{100}\right)^2 = 6,25 \times 10^{-8}$$

c) Incertidumbre debida a la concentración de ácido sulfúrico ($U_{[H_2SO_4]}$)

• Masa del tris (g) : Valor estimado (X_i)= 0,0121
Incertidumbre estándar de la masa tarada: 0,00005

Incertidumbre estándar de la calibración de la balanza: $5,00172 \times 10^{-5}$

Incertidumbre combinada: $\sqrt{(0,00005)^2 + (5,00172 \times 10^{-5})^2} = 7,07229 \times 10^{-5}$

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{7,07229 \times 10^{-5}}{0,0121} = 0,005844865$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{7,07229 \times 10^{-5}}{0,0121} \right)^2 = 3,41625 \times 10^{-5}$$

- **Masa molar del TRIS (g/mol):** Valor estimado (X_i) = 241,24208
Incertidumbre estándar del Carbono, Hidrogeno, Nitrógeno y Oxígeno:

C₁₄: 0,006466323

H₁₁: 0,00044456

N: $4,04145 \times 10^{-5}$

O₃: 0,000519615

Incertidumbre combinada ($U_c X_i$):

$$\sqrt{(0,006466323)^2 + (0,00044456)^2 + (4,04145 \times 10^{-5})^2 + (0,000519615)^2}$$

$$= 0,006502507$$

Incertidumbre Estándar Relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,006502507}{241,24208} = 2,69543 \times 10^{-5}$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{0,006502507}{241,24208} \right)^2 = 7,26533 \times 10^{-10}$$

d) Incertidumbre debida al volumen de H₂SO₄ gastado en la muestra:

Valor estimado (X_i): 8 mL

Incertidumbre estándar del volumen de titulante: 0,025

Incertidumbre combinada ($U_c X_i$): 0,025

Incertidumbre estándar relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,025}{8} = 0,003125$$

$$\frac{U_c(x_i)}{X_i} = \left(\frac{0,025}{8} \right)^2 = 9,76563 \times 10^{-6}$$

e) Incertidumbre debida al volumen de H₂SO₄ gastado en el blanco:

Valor estimado(X_i): 1 mL

Incertidumbre estándar del volumen de titulante: 0,02245

Incertidumbre combinada ($U_c X_i$): 0,02245

Incertidumbre estándar relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,02245}{1} = 0,02245$$

$$\frac{U_c (xi)}{X_i} = \left(\frac{0,02245}{1} \right)^2 = 0,000504003$$

f) Incertidumbre por Repetibilidad y reproducibilidad:

Se calcula con la desviación estándar (s) más grande obtenida durante la validación, es decir 0,9941.

Valor estimado del estándar medio (E_m): 20 mL

Incertidumbre estándar: 0,12834

Incertidumbre combinada ($U_c X_i$): 0,12834

Incertidumbre estándar relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,12834}{20} = 0,00642$$

$$\frac{U_c (xi)}{X_i} = \left(\frac{0,12834}{20} \right)^2 = 4,11765 \times 10^{-5}$$

La incertidumbre relativa facilita el trabajo con incertidumbres provenientes de mediciones de distintas cantidades físicas en una operación matemática.

Como se observa en la ecuación anterior la incertidumbre relativa es el cociente entre la incertidumbre absoluta y el valor medido por lo tanto es adimensional (no tiene unidades) y depende de la magnitud de la variable medida.

g) Expresión de los resultados:

Incertidumbre relativa combinada:

$$\sqrt{\sum \left[\frac{U_c(x_i)}{X_i} \right]^2} = 0,024$$

$$\sqrt{(3,46575 \times 10^{-08})^2 + (1,04067 \times 10^{-10})^2 + (8,33417 \times 10^{-10})^2 + (4,225 \times 10^{-09})^2 + (6,25 \times 10^{-08})^2 + (3,41625 \times 10^{-05})^2 + (7,26533 \times 10^{-10})^2 + (9,76563 \times 10^{-06})^2 + (5,04003 \times 10^{-04})^2 + (4,11765 \times 10^{-05})^2}$$

$$= 0,024$$

$$\left(\frac{U_c(N - NH_3)}{(N - NH_3)} \right) = 0,024$$

Incertidumbre combinada:

$$U_c(N - NH_3) = (N - NH_3) * 0,024$$

Teniendo en cuenta que la distribución se comporta normalmente, el factor de cobertura (k) que utilizamos para expresar la incertidumbre expandida es 2, asegurando con un 95% de nivel de confianza que en ese rango se encuentra el valor verdadero del mesurando.

$$U(N - NH_3) = U_c(N - NH_3) * 2$$

$$U(N - NH_3) = (N - NH_3) * 0,048$$

Reporte de datos con incertidumbre asociada:

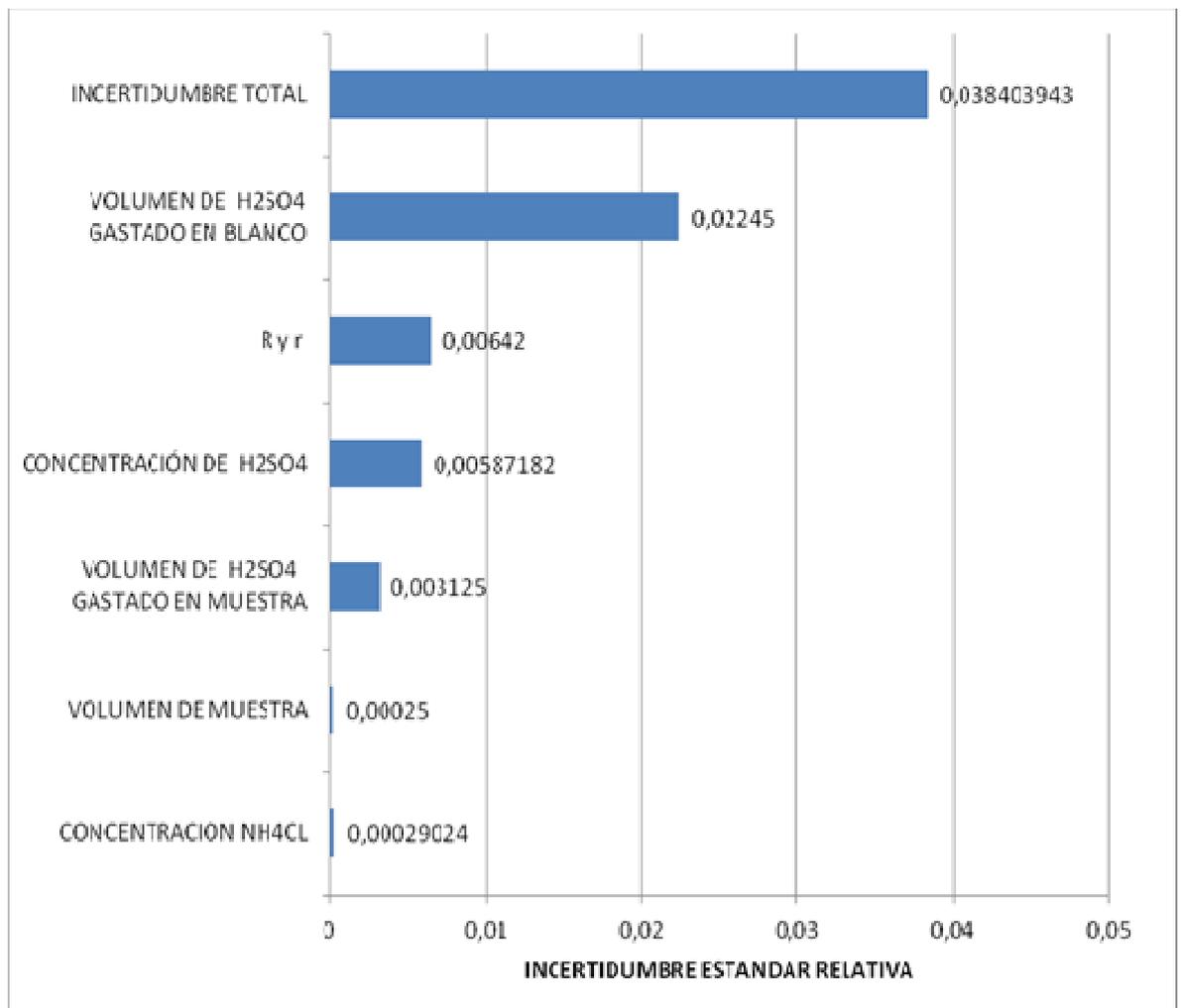
$$N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) \pm \left[N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) * 0,048 \right]$$

Ejemplo: Para la muestra de 12,7mgN/L la incertidumbre asociada a este valor se expresa así:

$$12,7\text{mgN/L} \pm \left[12,7 \left(\frac{\text{mgN}}{\text{l}}\right) * 0,048\right]$$

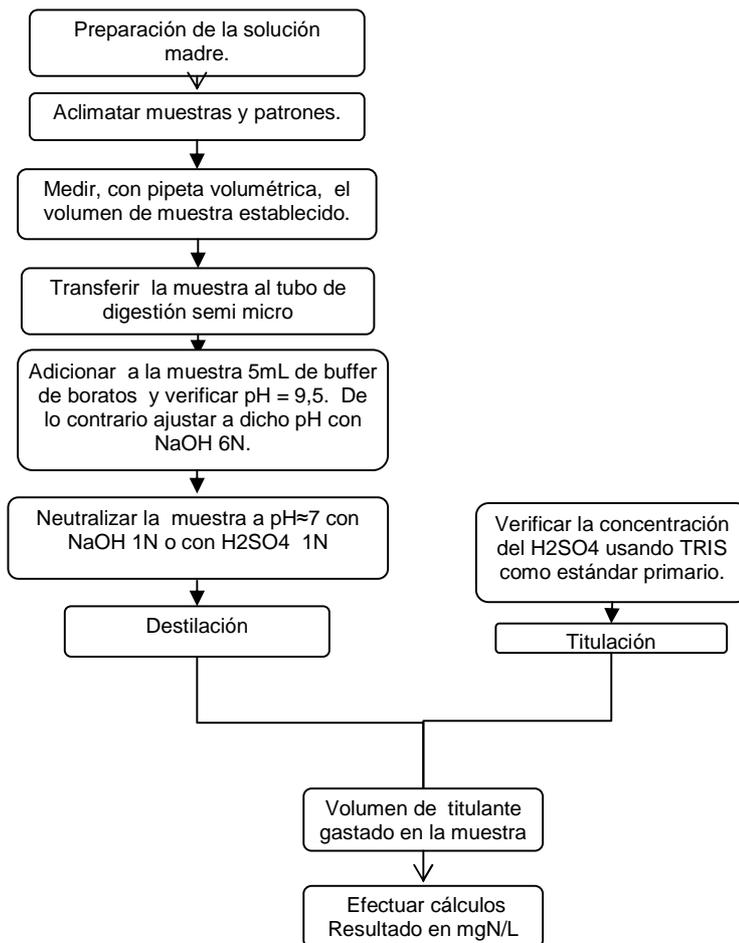
$$12,7\text{ mgN/L} \pm 0,6096\text{ mgN/L}$$

Figura 5: Contribuciones a la Incertidumbre del análisis de Nitrógeno Amoniacal



7.7. TRAZABILIDAD EN MEDICIONES QUIMICAS

Figura 6: Trazabilidad del ensayo de Nitrógeno Amoniacal.



En la figura 6 se muestran las diferentes etapas para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal de forma tal que se pueda tener un panorama general para establecer la trazabilidad del ensayo.

7.7.1. ASEGURAMIENTO DE LA TRAZABILIDAD

- preparación de la solución madre: La trazabilidad de la temperatura de la estufa para secar el material de referencia (NH_4Cl) se tiene por verificación con termopar calibrado.

Se asegura la trazabilidad del valor de la masa pesada del material de referencia mediante certificado de calibración de la balanza analítica (Sartorius BP221S certificado número 024825) y usándola bajo las condiciones de temperatura y humedad relativa controladas.

- Se asegura la trazabilidad del balón para la preparación del material de referencia, mediante una calibración hecha en el laboratorio al material volumétrico.

Aclimatar muestras y patrones: La temperatura del termóstato es trazable debido a la calibración que se realiza (Informe 01412 verificación y control de la temperatura de los equipos), empleando un termopar calibrado.

Para la preparación de los patrones se asegura la trazabilidad del balón mediante una calibración hecha en el laboratorio al material volumétrico y usando la solución a una temperatura de 20°C , para garantizar que los ensayos se están realizando a esta temperatura.

Medir con pipeta volumétrica el volumen de muestra establecido: 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.

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

- Titulación Automática: Se garantiza la trazabilidad del volumen de titulante mediante calibración del titulador automático (Informe 00312 calibración de material volumétrico graduado, método gravimétrico) realizada en el laboratorio.

Notas: Cada una de las calibraciones está acompañada de la declaración de incertidumbre de las mismas.

7.8. CARTAS DE CONTROL DEL METODO DE NITROGENO AMONICAL

En las tablas 18 y 19 se recopilan los resultados obtenidos de los estándares para la elaboración de las cartas de control. En el laboratorio se decidió generar cartas de control para dos patrones: 10 mg N-NH₃/L y 50 mg N-NH₃/L

Tabla 18: Recopilación de resultados del estándar de 10 mg N/L para la elaboración de cartas de control.

Patrón 10 mg N-NH ₃ /L					
Dato	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	9,96	9,84	9,71	9,96	0,3
	9,71				
2	9,41	9,39	9,37	9,41	0,04
	9,37				
3	9,62	9,67	9,62	9,71	0,09
	9,71				

4	9,11	9,55	9,11	9,98	0,9
	9,98				
5	9,57	9,62	9,57	9,66	0,1
	9,66				
6	9,69	9,54	9,38	9,69	0,3
	9,38				
7	9,48	9,57	9,48	9,66	0,2
	9,66				
8	9,44	9,77	9,44	10,10	0,7
	10,1				
Promedios		9,62	9,46	9,77	0,31
Promedio			9,62	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A ₂			1,88	NA	
Promedio Rango			0,31	mg/L	
LCS			10,2	mg/L	
LCI			9,03	mg/L	

A continuación se describe la forma como se efectuaron los cálculos para la elaboración de las cartas de control.

Se tomaron como ejemplo los valores de la tabla 18

Para cada subgrupo de datos se calculó su media y su rango así:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$$

Dónde: \bar{x} = promedio del subgrupo

$\sum x$ = sumatoria de datos

n = número de datos

$$\bar{x} = \frac{19,67}{2} = 9,84$$

Se determinó los rangos de los datos de la siguiente manera:

$R = \text{Valor máximo del subgrupo} - \text{Valor mínimo del subgrupo}$

$$R = 9,96 - 9,71$$

$$R = 0,3$$

Cálculo de la media de todos los datos:

$$\bar{x} = \frac{\sum x}{\text{Total de promedios}}$$

$$\bar{x} = \frac{76,95}{8}$$

$$\bar{x} = 9,62$$

Cálculo del rango promedio de todos los datos:

$$R = \frac{\sum R}{\text{Total de rangos}}$$

$$R = \frac{2,64}{8} = 0,31$$

Para determinar los límites de control para los rangos se utilizó la tabla 19 de factores para límites de control.

Tabla 19:Tabla de factores para límites de control

Tamaño de muestras	Factor A2
2	1,88
3	1,023
4	0,729
5	0,577
6	0,483
7	0,419
8	0,373
9	0,337
10	0,308

Calculó de los límites de control:

LCS= Límite de control superior.

$$LCS = \bar{x} + A_2 * R$$

$$LCS = 9,62 + (1,88 * 0,31)$$

$$LCS = 10,2$$

LCI= Límite de control inferior.

$$LCI = \bar{x} - A_2 * R$$

$$LCI = 9,62 - (1,88 * 0,31)$$

$$LCI = 9,03$$

Tabla 20: Recopilación de resultados del estándar de 50 mg N/L para la elaboración de cartas de control.

Patrón 50 mg N-NH ₃ /L					
Dato	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	47,7	47,9	47,7	48,1	0,40
	48,1				
2	48,2	48,2	48,2	48,2	0,00
	48,2				
3	47,8	47,9	47,8	48,0	0,20
	48				
4	46,5	47,1	46,5	47,7	1,20
	47,7				
5	46,5	48,1	46,5	49,7	3,20
	49,7				
6	47,8	48,0	47,8	48,2	0,40
	48,2				
7	47,9	48,0	47,9	48,1	0,20

	48,1				
8	48,0	47,8	47,5	48,0	0,50
	47,5				
Promedios		47,9	47,5	48,3	0,76
Promedio			47,9	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A ₂			1,88	NA	
Promedio Rango			0,76	mg/L	
LCS			49,3	mg/L	
LCI			46,4	mg/L	

Tabla 21: 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 para el (los) estándar (es) elegido (s).

Estándar (mg/L)	Por validación (Ver tabla No.3)		Por especificaciones (Ver literal 3)	
	10	50	10	50
LCS	10,2	49,3	11,0	55,0
LCI	9,03	46,4	9,00	45,0

7.9. CONCLUSIONES

Según resultados de la validación el método es apto para el alcance y el uso propuesto.

Tabla 22: . Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal.

Parámetros	Resultados
Límite de Detección teórico	2,4 mg N/L
Límite de Cuantificación teórico	8,0 mg N/L
Límite de Cuantificación experimental	10 mg N/L
Exactitud	%E máximo de 12,6
Precisión	%CV máximo de 9,17
Recuperación	Desde 90 hasta 101,5 %
Incertidumbre de la medición.	$N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) \pm \left[N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) * 0.050 \right]$

7.9.1. CONTROL DE CALIDAD Y SEGUIMIENTO DE VALIDACION

- Introducir un patrón cada seis muestras.
- Seguimiento de actividades R & R
- Verificar límite de cuantificación cada seis mese
- Participación en pruebas de desempeño.

8. RESULTADOS DEL ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL

En la tabla 23 se muestran los objetivos trazados para desarrollar la validación del método de nitrógeno kjeldahl y las actividades realizadas para dar cumplimiento a dichos objetivos.

Tabla 23: Objetivos y Resultado del ensayo de Nitrógeno Kjeldahl

OBJETIVOS	RESULTADOS
<ul style="list-style-type: none"> Validar el ensayo de Nitrógeno Kjeldahl a través de la estimación de los parámetros característicos del ensayo, como: Límite de detección, límite de cuantificación, exactitud y precisión bajo condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, rango de aplicación y recuperación. 	<ul style="list-style-type: none"> AMEF (Análisis de Modo y Efecto de Falla). Ver numeral 8.3.7 Actividades principales para dar cumplimiento a los parámetros de validación. Ver numeral 7.4.5. Datos Obtenidos de estándares y muestras durante la validación. Exactitud: Expresada como %E. Ver numeral 8.4.3 y Precisión expresada como %CV. Ver numeral 8.4.4 Cartas de Control. Ver numeral 8.4.4
<ul style="list-style-type: none"> Estimación de la incertidumbre de medición asociada al ensayo de Nitrógeno Kjeldahl. 	<ul style="list-style-type: none"> Estimación de la Incertidumbre de Medición. Ver numeral 7.6
<ul style="list-style-type: none"> Determinación de la trazabilidad para el ensayo de Nitrógeno Kjeldahl. 	<ul style="list-style-type: none"> Trazabilidad en Mediciones Químicas. Ver numeral 7.7

8.1. QUIPOS, REACTIVOS Y VIDRERIA EMPLEADOS EN LA EJECUCION DEL PLAN DE VALIDACION.

Tabla 24: Equipos

Digestor velpScientifica DK6
Destilador kjeldahl. VelpScientifica.UDK 130 ^a
Titulador automático. Metróm 716 DMS
pH-metro. Fisher. AB 15
Purificador de agua. Simplicity U.V. Millipore
Balanza analítica SartoriusBP 221 S
Termostato julabo F34

Reactivos grado analítico o superior

Tabla 25: Reactivos

Agua tipo II. Resistividad 18,2 MΩ
Cloruro de amonio. Calidad Suprapur 99,995%
Titrisol de ácido sulfúrico 1N
Ácido sulfúrico 0,02N
Tris Hidroximetilaminometano – TRIS- $[\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3]$. Reactivo grado analítico
Soluciones amortiguadoras pH 7,00 y pH 4,00. MRC
Cloruro de Potasio 3M: Solución electrolito para rellenar y almacenar los electrodos de pH.

Hidróxido de sodio, NaOH /Tiosulfato de sodio
Solución Catalizadora
Ácido bórico H_3BO_3
Solución Indicadora mixta (Rojo de metilo y Azul de metileno)

A continuación se describe la preparación de los reactivos empleados para la ejecución del ensayo de nitrógeno kjeldahl.

- Solución Digestora: Disolver 134 g de K_2SO_4 y 7,3g de $CuSO_4$ en 800ml de agua. Adicionar 134 mL de ácido sulfúrico concentrado, aclimatar y aforar a 1L.

- Solución de Hidróxido de sodio-Tiosulfato de sodio: Disolver 550 g de NaOH y 25 g de $Na_2S_2O_3$ en 1L de agua. Es necesario preparar la solución bajo cabina de extracción y utilizando enfriamiento.

- Mezcla de Indicadores:

Solución A: Disolver 0.200g de rojo de metilo en 100mL de etanol. También se puede usar isopropanol

Solución B: Disolver 0.11g de azul de metileno en 50mL de etanol. También se puede usar isopropanol.

Las soluciones A y B se mezclan en proporción 1+1. Esta mezcla puede conservarse aproximadamente una semana.

Material volumétrico clase A

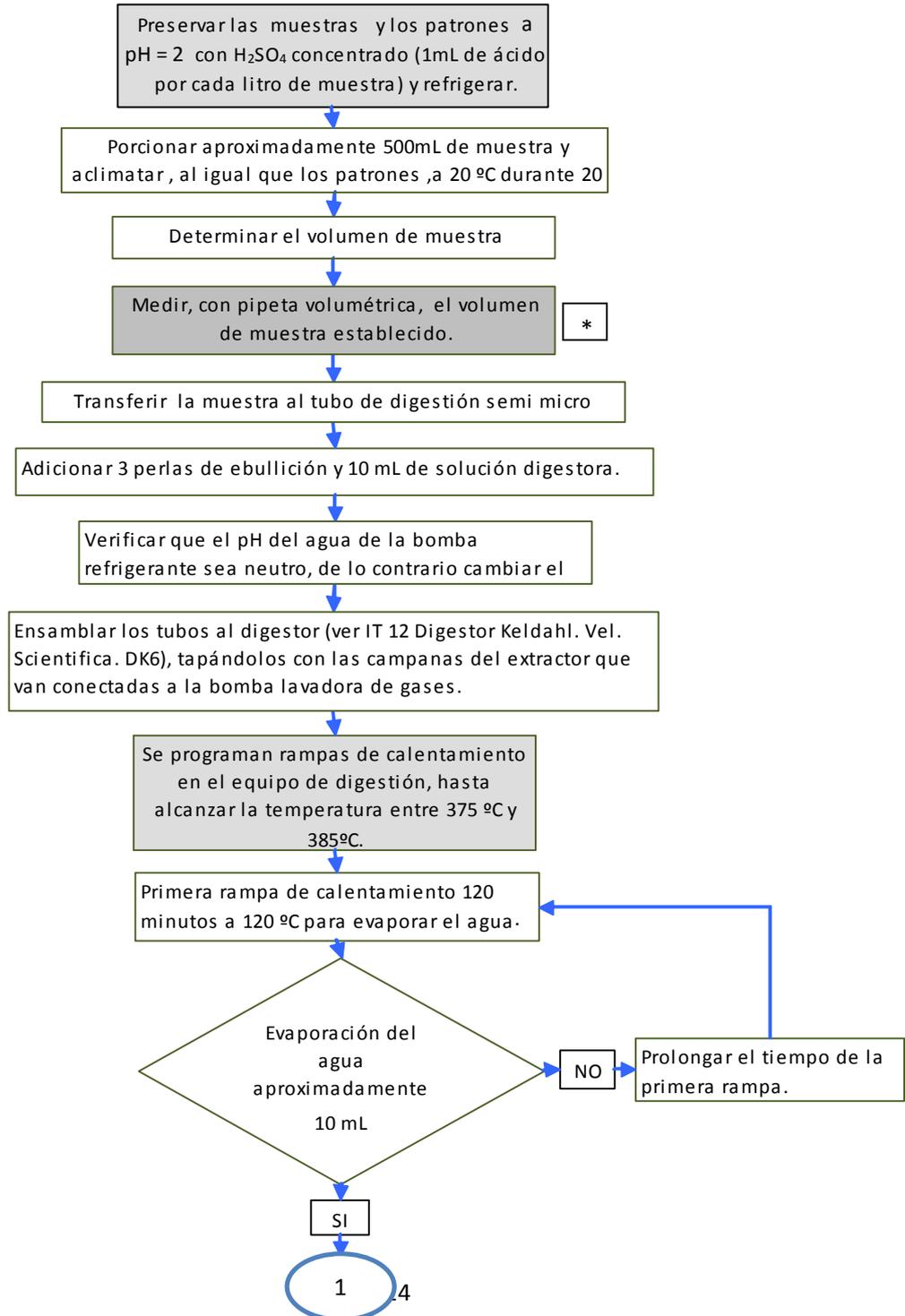
Tabla 26: Vidriería y materiales

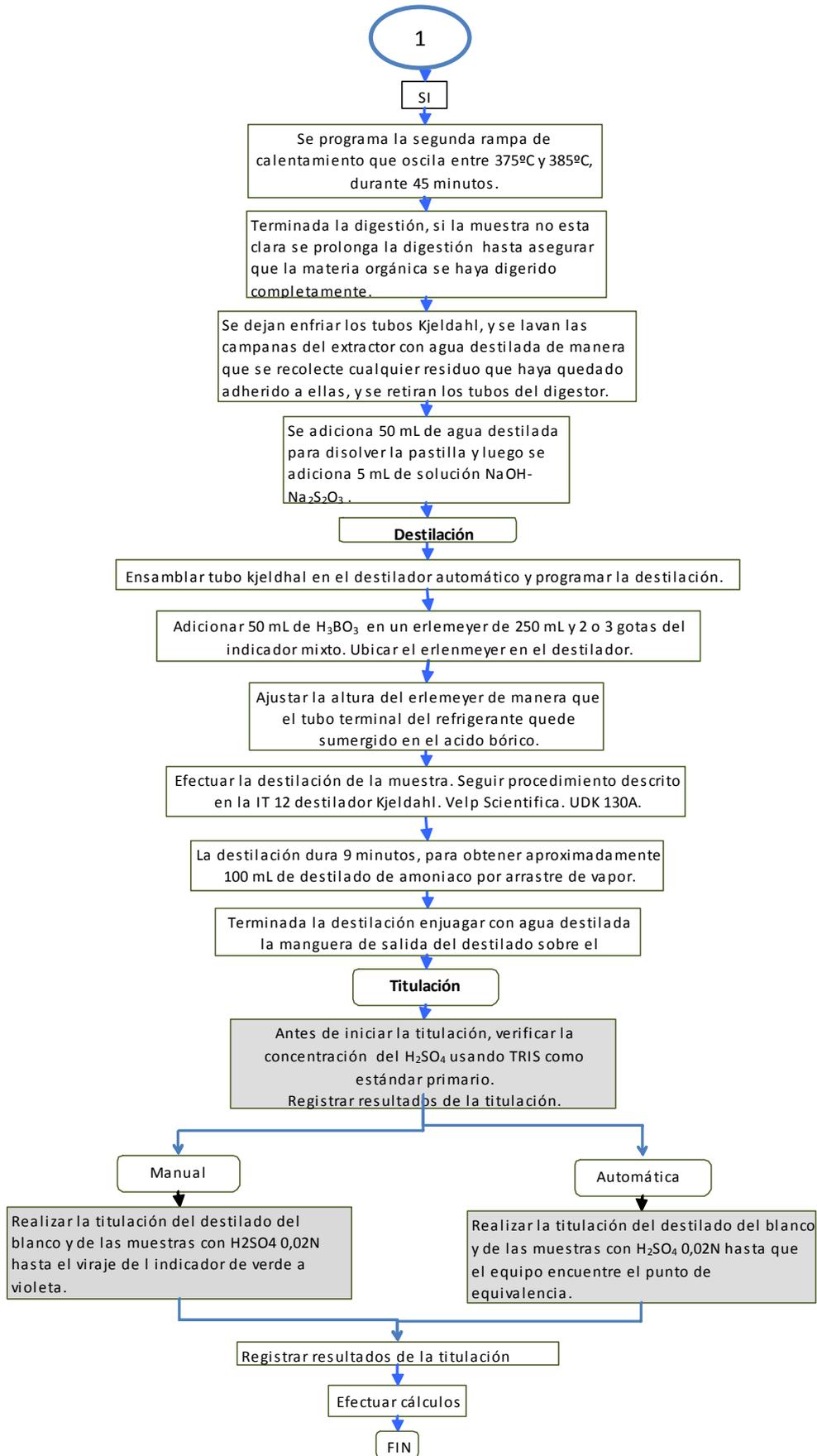
Tubos de digestión semi-micro Kjeldahl de 100 mL
Erlenmeyer de 250 mL, clase A
Matraces aforados de clase A. Diferentes Volúmenes.
Pipetas volumétricas clase A: Diferentes volúmenes
Espátulas metálicas
Frascos lavadores

8.2. NITROGENO KJELDAHL METODO VOLUMETRICO 4500-Norg C.

En la figura 7 se muestra el procedimiento que se llevó a cabo para la determinación del método de nitrógeno semi-micro kjeldahl tomado del standard methods for the examination of wáter & wastewater.

Figura 7: FLUJOGRAMA





Nota: (*) para muestras con concentración de nitrógeno < 25 mgN/L se toma un volumen de muestra de 50 mL y para muestras con concentración de nitrógeno >25 mgN/L se toma un volumen de muestra de 15 mL.

8.3. DETERMINACION DEL NITROGENO KJELDAHL POR EL METODO VOLUMETRICO.

8.3.1. OBJETIVO DE LA VALIDACION

Ver numeral 7.4.1

8.3.2. OBJETIVO DEL METODO

Matriz: Aguas residuales y aguas naturales (superficiales y subterráneas).

Analito: Ion amonio.

Rango de aplicación: Desde el límite de cuantificación a 100mg/L sin dilución de la muestra.

8.3.3. CRITERIOS DE ACEPTACION

Tabla 27: Criterios de aceptación:

Estadístico	Valor	Unidades
Exactitud	≤ 15% para patrones	%E
Precisión	≤ 10% para patrones y muestras	% CV

Valores de referenciasegúnStandard Methods for the examination of water and wastewater (DE 097).Pagina 4-112.Numeral 6 [19].

Debido a que no hay valores de referencia para este método a continuación se incluyen algunos valores establecidos para el método macro.

Tabla 28: Método 4500 –Norg B. Macro Kjeldahl. (DE 097). Pagina 4-133. Numeral 6.

Estándar de ácido nicotínico (mg N/L)	%E	%CV
10	8,5% (Recobro 91,5%)	3,06
20	4,3% (Recobro 95,7%)	3,03

8.3.4. PARAMETROS DE VALIDACION

Ver numeral 7.4.4

8.3.5. ACTIVIDADES PRINCIPALES PARA DAR CUMPLIMIENTO A LOS PARAMETROS DE VALIDACION

Ver numeral 7.4.5

8.3.6. PREPARACION DE SOLUCIONES DE TRABAJO Y MUESTRAS ADICIONADAS.

Todos los estándares se prepararon con agua tipo II y se preservan con ácido sulfúrico concentrado, $\text{pH} \leq 2$.

- Solución madre. Concentración teórica de 100 mg N/L preparado por pesada directa de 0,3819 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 1L con agua tipo II
- Estándar bajo E1: Concentración teórica 10 mg N/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 50 mL y se llevan a un matraz aforado de 500 mL.
- Estándar 2: Concentración teórica de 25 mg N/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 50 mL y se llevan a un matraz aforado de 200 mL.
- Estándar 3: Concentración teórica de 50 mg N/L preparado por dilución a partir del patrón de cloruro de amonio de 100 mg/L, del cual se miden 100 mL y se llevan a un matraz aforado de 200 mL.
- Estándar 4: Concentración teórica de 100 mg N/L preparado por pesada directa.

La preparación de las muestras adicionadas se realizó diariamente tal como se describe a continuación:

- Patrón de 200 mgN/L: preparado por pesada directa de 0,15275 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 0,2 L con agua tipo II.
- Patrón de 100 mg N-NH₃/L: preparado por pesada directa de 0,3819 g de cloruro de amonio previamente secado durante una hora a 100 °C, y se diluye a 1L con agua tipo II.

- M1:Muestra ARD. Concentración aproximada 35 mg N/L.
- M1 + Ab: Medir 50 mL de M1 y adicionarle 6 mL de un patrón de 100 mg N/L.
- M1 + Aa: Medir 50 mL de M1 y adicionarle 5 mL de un patrón de 200 mg N/L

8.3.7. ANALISIS DE MODO Y EFECTO DE FALLA (AMEF)

En la tabla 29 se muestran las causas y los efectos de falla potencial que se pueden presentar en cada una de las etapas del procedimiento de nitrógeno keldahl.

Tabla 29: Análisis de Modo y Efecto de Falla

Descripción del Proceso		Modo de falla potencial	Causas de falla potencial	Ocurrencia	Efecto de falla potencial	Severidad	Controles actuales	Detección	NPR
Etapas del proceso									
1	Lavado general del material con jabón libre de fosfatos	presencia de jabón	No se lavó con abundante agua. No se sigue el procedimiento establecido en el SOP 1-22 plan de higiene y limpieza.	3	Alto consumo de titulante en el blanco y se altera la concentración de las muestras.	7	Aplicación del procedimiento establecido en el SOP 1-22 Plan de higiene y limpieza: Lavado de material con abundante agua, luego con H2SO4 concentrado, y por último con agua tipo II.	1	21
2	Preservar las muestras con H2SO4 a pH ≤ 2 y se refrigera	muestras con pH >2	Olvido de la actividad No verificar pH de la muestra con Papel indicador.	2	Oxidación de la materia orgánica debida a la actividad bacteriana y volatilización del amoniacal, lo cual genera pérdidas con consecuente sesgo negativo.	8	medir pH de la muestra con papel indicador antes y despues de la etapa de conservación	1	16
3	Temperar las muestras y partones a 20°C	trabajar a temperatura ambiente	no garantizar los analisis a T= 20°C	2	Temperaturas muy altas o muy bajas interfieren en el analisis, por lo tanto los resultados son poco confiables	6	Las muestras se atemperan en un termostato a 20°C durante 20 minutos	6	72
4	Seleccionar un volumen de muestra	trabajar con volúmenes de muestra poco representativos	El volumen de muestra no sea suficiente para cuantificar la muestra	6	El volumen de titulante disminuiría, lo cual llevaría a tener un mayor error en la cuantificación.	7	Se toma un volumen de muestra con pipeta volumétrica de acuerdo al N°1.1 del SOP de nitrógeno amoniacal.	6	252
5	Medir la muestra y los patrones	Trabajar con pipetas graduadas	El volumen de muestra medido no se exacto.		El volumen de muestra tomado no sea exactamente el que se requiere, lo cual genera margen de error con consecuente sesgo negativo y con poca precisión en la cuantificación.		Medir las muestras y los patrones con pipeta volumétrica		
6	Adicionar la solución digestora	Adicionar un volumen menor a 10 mL de solución digestora.	La solución digestora no sea suficiente para digerir toda la materia orgánica.	2	No se libera todo el nitrógeno orgánico como nitrógeno amoniacal, lo cual genera pérdida del analito con consecuente sesgo negativo.	8	Se adiciona los 10 mL de la solución digestora	8	128
7	Digestion de la muestra	El digestor se dañe por uso inadecuado. Programación incorrecta de las rampas de calentamiento.	El digestor no alcance la temperatura requerida para que se de la digestion de las muestras.		El nitrógeno orgánico no pasa en forma de nitrógeno amoniacal, lo cual genera pérdidas con consecuente sesgo negativo.		Se verifica que el digestor si alcance la temperatura de digestion requerida, tomando la temperatura con un termopar.		
8	Verificar pH del agua del refrigerante	pH ácido o básico	No verificar que el pH sea neutro	2	Puede corroer y dañar la bomba	6	Antes y durante la digestion se verifica que el pH del agua sea neutro, de lo contrario se procede a lavar la bomba y se cambia el agua	2	24
9	Adicion de la solución de NaOH-Na2S2O3	No adicionar la cantidad suficiente de la solución NaOH-Na2S2O3, para neutralizar el ácido	No se neutraliza el exceso de ácido sulfurico	2	El amoniacal queda atrapado en medio ácido y permanece en forma de sal, evitando que pueda liberarse todo el amoniacal en forma de gas, obteniendo pérdidas en la cuantificación con consecuente sesgo negativo.	8	adicionar igual cantidad de NaOH que de solución digestora	7	112
9	recoleccion del destilado en ácido bórico	no utilizar suficiente solución absorbente	todo el amoniacal que se destila no se logra recolectar.	2	No se cuantifica todo el amoniacal que se destiló, porque no se logra absorber, lo cual genera pérdidas con consecuente sesgo negativo en los resultados.	9	se utiliza 50mL de ácido bórico al 2% como absorbente	1	18
10	Estandarizacion del ácido sulfurico 0,02N	El H2SO4 no tenga la concentración conocida	que el volumen de parada del titulante sea menor al requerido por la muestra, y el volumen que gasta en la titulación sea erroneo debido a que el volumen de parada del titulante sea menor al requerido por la muestra, y el volumen que gasta en la titulación sea erroneo debido a la variación de pH	2	El reporte de los resultados no se haga con la concentración verdadera de H2SO4 obteniendo resultados con consecuente sesgo negativo o positivo.	9	se estandariza el H2SO4 con TRIS para verificar que su concentración sea de 0,02N y el resultado se incluye en la hoja de recolección de datos correspondiente	1	18
11	Titulación automática	Titulación efectuada por fuera de los parámetros establecidos. Parámetros de calibración del electrodo de pH fuera de especificaciones	que el volumen de parada del titulante sea menor al requerido por la muestra, y el volumen que gasta en la titulación sea erroneo debido a la variación de pH		se reportan resultados que no son confiables		Se calibra el electrodo de pH, se verifican los parámetros del método. Ver SOP Nitrógeno-Amoniacal, se determina el volumen de parada del titulante según el volumen de muestra.		
12	Ejecutar cálculos	%CV fuera de especificaciones %E fuera de especificaciones	Muestras con características inhomogéneas Preparación inadecuada de patrones y Contaminación.	2	Al realizar el análisis de los patrones de control y las muestras, estos reporten unos resultados que se encuentran por fuera de las especificaciones del método. El análisis de las muestras no evidencia condiciones de repetibilidad. Repetir ensayo Se genera TENC	10	se reporta el TENC y se repite el análisis.	6	120

8.3.8. RESULTADOS OBTENIDOS PARA DEFINIR LIMITE DE CUANTIFICACION EXPERIMENTAL (LC).

En las tablas 35 se presentan los resultados obtenidos previos a la validación de los patrones de 2 mgN/L , 3 mgN/L, 5 mgN/L y 10 mgN/L para definir el patrón correspondiente al límite de cuantificación experimental, teniendo en cuenta que cumpla con los criterios de aceptación del método.

Tabla 30: Comparación de los criterios de aceptación del método para los estándares de 2, 3, 5 y 10 mgN/L.

Patrón 2 mgN/L	Concentración mgN/L	Promedio mgN/L	%CV	%E
Replica 1	1,36	1,80	19,7	-10
Replica 2	1,4			
Replica 3	1,64			
Replica 4	1,77			
Replica 5	2,16			
Replica 6	2,18			
Replica 7	2,12			
Patrón 3 mgN/L	Concentración mgN/L	Promedio mgN/L	%CV	%E
Replica 1	1,47	1,76	12,3	-41,3
Replica 2	1,91			
Replica 3	1,72			

Replica 4	1,94			
Patrón 5 mgN/L	Concentración mgN/L	Promedio mgN/L	%CV	%E
Replica 1	3,45	3,18	0,0	-36,4
Replica 2	3,84			
Replica 3	3,42			
Replica 4	2,28			
Replica 5	2,91			
Patrón 10 mgN/L	Concentración mgN/L	Promedio mgN/L	%CV	%E
Replica 1	8,21	8,52	2,82	-14,8
Replica 2	8,33			
Replica 3	8,61			
Replica 4	8,70			
Replica 5	8,76			

La tabla 38 muestra que los resultados obtenidos para los patrones de concentración de 2, 3 y 5 mgN/L no cumplen con los criterios de aceptación del método, ya que el %CV es superior a 10% y el % E superior a 15%, motivo por el cual se decidió efectuar la cuantificación con patrones de 10 mgN/L.

A diferencia de estos resultados el patrón de 10 mgN/L evidencia condiciones de repetibilidad obteniendo una precisión y exactitud bajo los criterios de aceptación del método, ya que se obtuvo un %CV menor al 10 y %E menor al 15.

Debido a esto se concluye que el límite de cuantificación experimental es 10 mgN/L.

8.4. RESULTADOS OBTENIDOS DE ESTANDARES Y MUESTRAS DURANTE LA VALIDACION

8.4.1. DISCUSION DE RESULTADOS

Al lote de datos de cada estándar o muestra obtenidos se les realizó las Pruebas F y T usando el software estadístico ProControl, para evaluar si las poblaciones de datos son homogéneas y tener un criterio adicional, para excluir del lote los datos estadísticamente desiguales e/o inhomogéneos.

8.4.2. LIMITES DE DETECCION Y DE CUANTIFICACION

A continuación se muestran los resultados obtenidos durante los días de validación para el estándar de menor concentración.

Tabla 31: Resultados obtenidos para el estándar de 10 mgN/L

Corrida	Estándar 10mgN/L
1	8,91
	8,99
2	10,8
	8,01
3	8,21
	8,33
4	8,61
	8,07
5	8,7
	8,76

De manera teórica el límite de detección se considera como 3 veces la desviación estándar del valor del Eb (10 mgN/L) y el límite de cuantificación se considera como 10 veces la desviación estándar del valor del Eb.

Al efectuar la prueba F, se pudo establecer que las poblaciones de datos obtenidas durante los días de validación son homogéneos entre sí, lo que significa que no hay diferencias significativas en las distribuciones de cada uno de ellos, por lo tanto, pertenecen a la misma población de datos, lo que permite que los valores de LD y LC se puedan promediar.

De manera teórica el límite de detección se considera como 3 veces la desviación estándar del valor del Eb (10 mgN/L) y el límite de cuantificación se considera como 10 veces la desviación estándar del valor del Eb. (Ver Tabla 38)

Teniendo en cuenta el resultado de la desviación estándar obtenido para las 10 réplicas de Eb ($s = 0,80$ mg N/L), el Límite de detección para el ensayo sería 2.4 mg N/L y el Límite de cuantificación sería 8,0 mg N/L. sin embargo teniendo en cuenta que el estándar de menor concentración que arroja resultados de exactitud y precisión dentro de los criterios de aceptación establecidos en el numeral 6.2.3 corresponde a 10 mg N/L se ha decidido establecer:

- **Límite de cuantificación: 10 mg N/L**
- **Límite de detección: 3 mg N/L**

8.4.3. EXACTITUD EXPRESADA COMO %E

Tabla 32: Resultados de los estándares

A continuación se recopilan los resultados obtenidos de los estándares durante los días de la validación.

Corrida	Estándar 10mgN/L	Estándar 25mgN/L	Estándar 50mgN/L	Estándar 100mgN/L (Reproducibilidad)	Estándar 100mgN/L
1	8,91	22,2	41,0	95,5	85,6
	8,99	22,6	49,0	92,6	93,9
2	10,8	22,5	46,0	90,5	85,5
	8,01	25,1	42,1	94,2	88,6
3	8,21	25,4	42,5	90,1	96,3
	8,33	24,5		88,3	98,3
4	8,61	19,9	44,8	97,0	99,8
	8,07		46,8	81,3	
5	8,7		47,2	89,5	95,7
	8,76		49,3	93,4	95,2
6				89,8	95,7
				90,6	101
7				94,5	95,7
				90,6	97,2
8				95,9	

				98,9	
9				80,0	
				82,2	
10				102	
				96,9	
Parámetros					
X	8,74	23,2	45,4	91,7	94,5
S	0,80	1,95	3,02	5,73	4,96
%CV	9,17	8,43	6,64	6,25	5,25
%E	-12,6	-7,3	-9,2	-8,3	-5,5

Los espacios que se encuentran de color gris indica que no se realizaron replicas durante esos días, teniendo en cuenta el tiempo de digestión para muestras y patrones. Para un volumen de muestra de 15 mL se requería programar la primera rampa de calentamiento para reducir su volumen durante 30 minutos a 120 °C, y la segunda rampa de calentamiento se programaba para digerir la materia orgánica durante 45 minutos a 380 °C.

Para un volumen de muestra de 50 mL se requería programar la primera rampa de calentamiento para reducir su volumen durante 60 minutos a 120 °C, y la segunda rampa de calentamiento se programaba para digerir la materia orgánica durante 45 minutos a 380 °C.

Teniendo en cuenta lo anterior cada día de la validación se programó montar tres digestiones.

El análisis estadístico realizado a través del programa ProControl para los estándares evidencia en cuanto a la exactitud, evaluada a través del %E que

cada grupo de patrones cumple con el parámetro de aceptación establecido para el método.

La prueba de t muestra que las poblaciones de datos obtenidas durante los días de validación son estadísticamente iguales.

8.4.4. PRECISION EXPRESADA COMO %CV

A continuación se consolidan los resultados obtenidos durante los días de validación para las muestras analizadas

Tabla 33: Consolidado de datos de recuperación de las muestras

Corrida	Muestra (M1) mgN/L	Muestra baja + Ab mgN/L	%R M1 (Ab)	Muestra (M1) mgN/L	Muestra baja + Aa mgN/L	%R (M1) (Aa)	Muestra alta M2 mgN/L
1	42,7	49	101,5	44,8	55,2	79,6	74,2
	47,5	50,6	76,4	42,3	59,5	116	73,2
2	35,3	43,6	112,8	42,1	56,3	99,2	68,7
	33,4	43,5	127,7	38,6	53,1	99,1	69,1
3	33,7	43,7	127	36,8	49,2	86,6	76,7
	37,9	41,4	70,6	37,9	49,2	81,1	72,5
4	36,5	45,7	122,4	34	46,6	86,3	73,2
	37,7	41,9	76,9	32,7	44,3	80,1	68,8
5	35,2	42,4	102,4	35,9	47,6	82,3	66,2

	35,2	41,9	97,7				
Parámetros							
X	37,5	44,4	101,5	38,3	51,2	90	71,4
S	4,41	3,14	21,4	4,04	5,05	12,3	3,35
%CV	11,8	7,08	21	10,5	9,86	13,7	4,70
%E	No aplica	No aplica	1,54	No aplica	No aplica	-9,97	No aplica

Precisión bajo condiciones de repetibilidad se evalúa a partir de la prueba F.

Como se discutió anteriormente en el límite de detección y el límite de cuantificación, la serie de datos obtenidas son iguales estadísticamente obteniendo coeficientes de varianza dentro de los criterios de aceptación del método.

Para los estándares evaluados durante la validación la prueba F muestra que todas las poblaciones de datos son estadísticamente iguales, con un 95% de confianza. Se obtuvo % CV dentro de los criterios de aceptación del método.

Para las muestras naturales (M1, M1(Ab) , M1 (Aa) y M2) la prueba F muestra que todas las poblaciones de datos son estadísticamente iguales, ya que no hay diferencias significativas entre las varianzas de las series de datos obtenidas durante la validación, con un 95% de confianza.

La prueba de t muestra que no hay diferencias significativas entre las poblaciones de datos de las muestras naturales (M1, M1 (Ab), M1 (Aa) y M2).

Repetibilidad Intermedia:

En la tabla 33 se observa que los valores de \bar{X}_m , s , CV% y E% no difieren significativamente, y cumplen con los criterios de aceptación del método.

Como actividades r y R se considera el análisis de réplicas de los estándares en los cuales se evaluó que la exactitud (en términos de %Error) y la precisión (evaluada en términos de %CV) permanecieron dentro de los criterios de aceptación del método.

Para las muestras que se analizan habitualmente en el laboratorio, se garantiza que el análisis se efectúe de acuerdo al tiempo máximo de almacenamiento establecido en el standard methods for the examination of water & wastewater. 22 st.

Precisión bajo condiciones de Reproducibilidad.

Se calculó la desviación estándar media de las series de mediciones a través del software estadístico Procontrol con un 95% de seguridad estadística. Con esta prueba se evaluó 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).

La Desviación estándar media del método es 6.20 %CV valor que proporciona evidencia de condiciones de reproducibilidad y que se encuentra por debajo de los criterios de aceptación establecidos para el método

8.4.5. RECUPERACION

Tabla 34: resultados obtenidos de los porcentajes de recuperación de las muestras.

Corrida	Muestra (M1) mgN/L	Muestra baja + Ab mgN/L	%R M1 (Ab)	Muestra (M1) mgN/L	Muestra baja + Aa mgN/L	%R (M1 (Aa)	Muestra alta M2 mgN/L
<i>x</i>	37,5	44,4	101,5	38,3	51,2	90	71,4
%E	No Aplica	No Aplica	1,54	No Aplica	No Aplica	-9,97	No Aplica

Los porcentajes de recuperación obtenidos para la muestra adicionada fueron de 101,5% para la adición baja y de 90% para la adición alta.

Los porcentajes de error obtenidos tanto para la adición baja como para la adición alta evidencian que no existen efectos de matriz. (Ver tabla 40.)

Los porcentajes de error obtenidos tanto para la adición baja como para la adición alta evidencian que no existen efectos de matriz.

8.5. ESTIMACION DE INSERTIDUMBRE EN LA MEDICION.

8.5.1. MESURANDO

ver numeral 7.6.1

Medición de la cantidad de ion borato (H_2BO_3^-) presente en la muestra, producto de la destilación por arrastre de vapor, El cual se mide mediante la titulación con ácido sulfúrico 0,02N. La cantidad de ion borato presente es equivalente a la cantidad de amoníaco liberado.

8.5.2. MODELO MATEMATICO

ver numeral 7.6.2

8.5.3. IDENTIFICACION DE LAS FUENTES DE INCERTIDUMBRE

A continuación se muestran las fuentes inmediatas de incertidumbre que afectan la cuantificación para los métodos de nitrógeno kjeldahl.

Tabla 35: Fuentes de Incertidumbre para El análisis de Nitrógeno Kjeldahl

Fuentes	Factor Critico en la Cuantificación.	
	Aplica Incertidumbre	No Aplica Incertidumbre
Preparación de la solución madre de 100mgN/L.	X	
Preparación del Acido sulfúrico 0,02N	X	
Volumen de muestra	X	
Volumen de ácido sulfúrico consumido en la muestra	X	
Volumen de ácido sulfúrico consumido en elBlanco	X	
Digestion de las muestras y patrones		X
Destilación		X

8.5.4. DIAGRAMA CAUSA-EFECTO

Para la estimación de la incertidumbre de Nitrógeno Kjeldahl, se emplea el mismo diagrama Causa-Efecto de Nitrógeno Amoniacal. Ver numeral 7.6.4

8.5.5. CALCULOS

Ver numeral 7.6.5

Incertidumbre por Repetibilidad y reproducibilidad para Nitrógeno Kjeldahl:

La incertidumbre por Repetibilidad y reproducibilidad (R y r) se calcula con la desviación estándar (s) más grande obtenida durante la validación, la cual fue 3,8861.

Como valor estimado para esta magnitud de entrada como fuente de incertidumbre, se eligió dentro del rango de concentraciones aplicadas durante la validación, el estándar de 50 mg/L.

Valor estimado del estándar medio (Em): 50 mg/L

Incertidumbre estándar: 0.50173, este valor corresponde a la desviación más grande obtenida durante la validación dividido entre un factor de cobertura K=2 ya que se trata de una distribución normal.

La incertidumbre combinada es igual a la incertidumbre estándar calculada ya que la única magnitud de entrada que aporta incertidumbre es la R y r, no hay otras subfuentes que estén unidas a dicha magnitud de entrada. Ver figura 4.

Incertidumbre combinada ($U_c X_i$): 0,50173

Incertidumbre estándar relativa (U_{xi} / X_i):

$$\frac{0,50173}{50} = 0,01003$$

$$\frac{U_c (xi)}{X_i} = \left(\frac{0,50173}{50}\right)^2 = 0,000100694$$

Expresión de los resultados:

Incertidumbre relativa combinada:

$$\sqrt{\sum \left[\frac{U_c (xi)}{X_i}\right]^2} = 0,025$$

$$\left(\frac{U_c(N - NH_3)}{(N - NH_3)}\right) = 0,025$$

Incertidumbre combinada:

$$U_c(N - NH_3) = (N - NH_3) * 0,025$$

Teniendo en cuenta que la distribución se comporta normalmente, el factor de cobertura (k) que utilizamos para expresar la incertidumbre expandida es 2, asegurando con un 95% de nivel de confianza que en ese rango se encuentra el valor verdadero del mesurando.

Incertidumbre Expandida con K=2

$$U(N - NH_3) = U_c(N - NH_3) * 2$$

$$U(N - NH_3) = (N - NH_3) * 0,050$$

Reporte de datos con incertidumbre asociada:

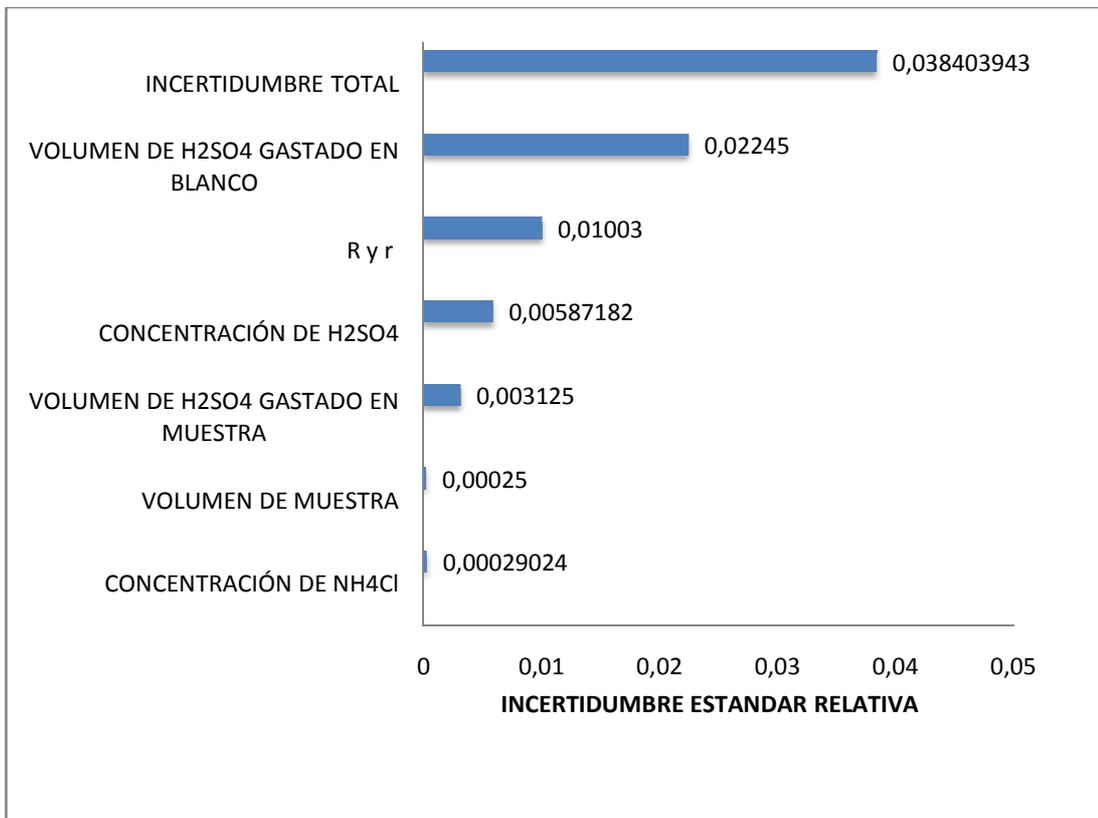
$$N - NH_3 \left(\frac{mg}{L}\right) \pm \left[N - NH_3 \left(\frac{mg}{L}\right) * 0,050 \right]$$

Ejemplo: Para la muestra de 35,3mgN/L la incertidumbre asociada a este valor se expresa así:

$$35,3mgN/L \pm \left[35,3 \left(\frac{mgN}{l}\right) * 0,050 \right]$$

$$35,3 mgN/L \pm 1,765 mgN/L$$

Figura 8: Contribuciones a la incertidumbre del análisis de Nitrógeno Kjeldahl.



8.6. TRAZABILIDAD DEL ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL

Las etapas que se tuvieron en cuenta en el aseguramiento de la trazabilidad para el ensayo de Nitrógeno Amoniacal son las mismas para el Ensayo de Nitrógeno Kjeldahl. Ver numeral 7.7

8.7. CARTAS DE CONTROL PARA ENSAYO DE NITROGENO KJELDAHL

En las tablas 36 y 37 se recopilan los resultados obtenidos de los estándares para la elaboración de las cartas de control. En el laboratorio se decidió generar cartas de control para dos patrones: 50 mg N/L y 100 mg N/L

Tabla 36: Recopilación de resultados del estándar de 50 mg N/L para la elaboración de cartas de control.

Patrón 50 mg N/L					
Dato	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	41,0	45,0	41,00	49,00	8,0
	49,0				
2	46,0	44,1	42,10	46,00	3,9
	42,1				
3	42,5	42,5	42,50	42,50	0,0
4	44,8	45,8	44,80	46,80	2,0
	46,8				
5	47,2	48,3	47,20	49,30	2,1
	49,3				
Promedio		45,1	44,15	46,72	3,20
Promedio			45,1	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A₂			1,88	NA	
Promedio Rango			3,20	mg/L	
LCS			51,1	mg/L	

LCI	39,1	mg/L
-----	------	------

Tabla 37: Recopilación de resultados del estándar de 100 mg N/L para la elaboración de cartas de control.

Patrón 100 mg N/L					
Dato	Réplicas	Promedio (mg/L)	Mínimo	Máximo	Rango
1	95,5	94,1	92,6	95,5	2,90
	92,6				
2	90,5	92,4	90,5	94,2	3,70
	94,2				
3	90,1	89,2	88,3	90,1	1,80
	88,3				
4	97,0	89,2	81,3	97,0	15,70
	81,3				
5	89,5	91,5	89,5	93,4	3,90
	93,4				
6	89,8	90,2	89,8	90,6	0,80
	90,6				
7	94,5	92,6	90,6	94,5	3,90
	90,6				
8	95,9	97,4	95,9	98,9	3,00
	98,9				
9	80,0	81,1	80,0	82,2	2,20
	82,2				
10	102	99,5	96,9	102,0	5,10
	96,9				
11	85,6	89,8	85,6	93,9	8,30
	93,9				
12	85,5	87,1	85,5	88,6	3,10
	88,6				
13	96,3	97,3	96,3	98,3	2,00
	98,3				
14	99,8	99,8	99,8	99,8	99,80
15	95,7	95,5	95,2	95,7	0,50
	95,2				
16	95,7	98,4	95,7	101,0	5,30
	101,0				
17	95,7	96,5	95,7	97,2	1,50
	97,2				
Promedios		93,0	91,1	94,9	9,62
Promedio			93,0	mg/L	
Tamaño subgrupo			2	NA	
Factor A ₂			1,88	NA	
Promedio Rango			9,62	mg/L	
LCS			111,1	mg/L	
LCI			74,9	mg/L	

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 para el (los) estándar (es) elegido (s). Ver tabla 38

Tabla 38: LÍMITES DE CONTROL DEFINIDOS

Estándar (mg/L)	Por validación (Ver tabla No.3)		Por especificaciones (Ver literal 3)	
	50	100	50	100
LCS	51,6	111	57,5	115
LCI	38,7	74,9	42,5	85,0

8.8. CONCLUSIONES

Según resultados de la validación el método es apto para el alcance y el uso propuesto.

Tabla 39: Conclusiones acerca de los parámetros de calidad analítica para el ensayo de Nitrógeno Kjeldahl.

Parámetros	Resultados
Límite de Detección teórico	2.4 mg N/L
Límite de Cuantificación teórico	8.0 mg N/L
Límite de Cuantificación experimental	10 mg N/L
Exactitud	%E máximo de 12,6
Precisión	%CV máximo de 9.17
Recuperación	Desde 90 hasta 101,5 %
Incertidumbre de la medición.	$N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) \pm \left[N - NH_3 \left(\frac{mg}{L} \right) * 0.050 \right]$

8.9. CONTROL DE CALIDAD Y SEGUIMIENTO DE VALIDACION.

Ver numeral 7.8

9. CONCLUSIONES GENERALES

Se demostró mediante el trabajo experimental, con la evaluación estadística de los resultados experimentales y teniendo como base los criterios de aceptación establecidos, que cada método analítico es exacto, y preciso en el intervalo de concentraciones estudiadas.

De esta forma mediante los estudios realizados se establece que las características de desempeño analítico cumplen con los requisitos para la aplicación analítica propuesta, siendo confiables y repetibles para ser utilizados en la comprobación de las especificaciones de calidad.

La fiabilidad de los resultados se demostró verificando la trazabilidad de las metodologías analíticas con incertidumbre asociada a las mediciones. Con esto se demostró que las metodologías analíticas desarrolladas en el presente trabajo proporcionan resultados fiables y adecuados para la finalidad o propósito perseguido ya que muchas de las decisiones que se toman están basadas en la información que estos proporcionan.

Los ensayos de nitrógeno amoniacal y nitrógeno kjeldahl fueron auditados por el Instituto de Hidrología, Meteorología y Estudios Ambientales de Colombia (IDEAM), en el Laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Tecnológica de Pereira. En donde el informe emitido por la comisión del IDEAM indica que se encontraron cero no conformidades. Lo cual asegura la calidad de los datos obtenidos durante el proceso de validación y la competencia técnica del laboratorio.

Por lo cual se puede concluir que los criterios de aceptación establecidos para los métodos de nitrógeno amoniacal y nitrógeno kjeldahl son adecuados para el fin propuesto, lo cual asegura la alta calidad en los resultados obtenidos, proporcionando seguridad y confianza en los clientes.

10. RECOMENDACIONES

- Aunque el límite de cuantificación establecido para el método de nitrógeno kjeldahl es adecuado para el fin propuesto se recomienda teniendo en cuenta la diversidad de muestras que analiza el laboratorio, realizar ensayos adicionales para determinar un límite de cuantificación menor al obtenido experimentalmente para el método de nitrógeno kjeldahl, teniendo en cuenta que el laboratorio también analiza muestras con concentraciones bajas de nitrógeno.
- Aunque el laboratorio cuenta con un sistema de tratamiento de los residuos ácidos que se recolectan durante la digestión de las muestras del método de nitrógeno kjeldahl, se recomienda utilizar los residuos básicos que quedan al final de la destilación de las muestras para neutralizar los residuos ácidos y así se logra economizar el gasto de reactivos como NaOH comercial.

11. BIBLIOGRAFIA

[1]. ICONTEC, requisitos Generales de competencia de Laboratorios de Ensayo y Calibración. NTC- ISO/IEC 17025, Bogotá 2000.

[2] DEPARTAMENTO TÉCNICO ADMINISTRATIVO DEL MEDIO AMBIENTE (DAMA), INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Calidad del Recurso Hídrico de Bogotá D.C. 2004.

[3] INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Estudio Nacional del Agua. 2000.

[4] DEPARTAMENTO TÉCNICO ADMINISTRATIVO DEL MEDIO AMBIENTE (DAMA), INSTITUTO DE HIDROLOGIA, METEOROLOGIA Y ESTUDIOS AMBIENTALES (IDEAM). Calidad del Recurso Hídrico de Bogotá D.C. 2004.

[5] COLOMBIA CONGRESO DE COLOMBIA. Ley 99 del 22 de diciembre de 1993. Bogotá: El congreso, 1993.

[6] COLOMBIA, MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. Ley 99 del 22 de Diciembre de 1993. Bogotá: El ministerio, 1993.

[7] ICONTEC. NTC/ISO/IEC 17025:2005. "Requisitos generales de competencia de laboratorios de ensayo y calibración". Bogotá DC.

[8] Norma NTC-2194 Vocabulario de Términos Básicos y Generales en Metrología.

[9] Organización Internacional de Normalización. 1994. Norma Standard ISO 8402: Gestión de la calidad y Aseguramiento de Calidad. Vocabulario. ISO.

[10] ISO 10012:2003, Measurement management systems – Requirements for measurement processes and measuring equipment, International Standard, ISO – International Organization for Standardization, 2003.

[11] ISO/IEC 17025. (2005). General Requirements for the Competence of Testing and calibration Laboratories. ISO, International Organization for

Standardization & IEC, International Electrotechnical Commission. Ginebra, Zuisa.

[12] ISO/IEC 17025. (2005). International Standard: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. International Organization for Standardization / International Electrotechnical Commission.

[13] INSTITUTO COLOMBIANO DE NORMAS TÉCNICAS Y CERTIFICACIÓN. NORMA TECNICA COLOMBIANA NTC-ISO-IEC 8402: Quality management and Quality Assurance, 1994.

[14] EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Edition 1998. Page.8. Publicación Técnica ACNM-MRD-PT-030.

Disponible en Internet: <http://www.metroquimica.com.ar/descargas/Eurachem-Guia-Validacion-CNM-MRD-030-2da-Ed.pdf>

[15] Guide To The Expression Of Uncertainty In Measurement. ISO, Geneva 1993. (ISBN 92-67-10188-9).

[16] EURACHEM, Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Laboratory of the Government Chemist, London (1995). ISBN 0-948926-08-2.

[17] King B. The practical realization of the traceability of chemical measurements. National Analytical Measurement Laboratory Australia Draft 1999.

[18] EURACHEM/ CITAC Guide. Traceability in Chemical Measurement. A guide to achieving comparable results in Chemical measurement. 2003

[19] STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER & WASTEWATER. 22 st Edition. DE 097 Página 4-112, 4-133. Numeral 6

[20] JEMILLER, JNMILLER, Estadística de química analítica, Editorial Pearson. Pág.(41-47).

ANEXOS

Anexo 1. Resultados obtenidos de estándares y muestras durante la validación.

Día 1 de la Validación

Patrón/ Muestra	Concentraci ón mgN- NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviació n	% CV	%E
3mgN/L	3,34	3,31	0,05	1,5	10,3
	3,27				
10mgN/L	9,96	9,84	0,17	1,73	-1,65
	9,71				
20mgN/L	19,6	19,3	0,50	2,61	-3,5
	18,9				
50mgN/L	47,7	47,9	0,32	0,66	-4,24
	48,1				
75mgN/L	71,2	71,5	0,35	0,49	-4,73
	71,7				
100mgN/L	94,4	91,8	3,75	4,08	-8,29
	89,1				
M1	12,4	12,7	0,35	2,79	
	12,9				

M1(Ab)	16,3	15,9	0,55	3,49	
	15,5				
M1 (Aa)	18,2	18,2	0,02	0,13	
	18,2				
M2	56,8	57,2	0,54	0,94	
	57,5				

Muestras Adicionadas

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,9	18,2
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,6	12,6
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	98,4	96,6

Día 2 de la Validación.

Patrón/ Muestra	Concentraci ón mgN- NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviació n	% CV	%E
3mgN/L	3,16	3,18	0,03	0,81	6,03
	3,20				
10mgN/L	9,41	9,39	0,03	0,32	-6,12
	9,37				
20mgN/L	19,5	19,4	0,22	1,15	-3,24
	19,2				
50mgN/L	48,2	48,2	0,05	0,10	-3,6
	48,2				
75mgN/L	67	69,1	2,95	4,26	-7,88
	71,2				
100mgN/L	94,5	94,4	0,17	0,18	-5,61
	94,3				
M1	12,5	12,6	0,10	0,83	
	12,7				
M1(Ab)	15,4	15,7	0,34	2,18	
	15,9				
M1 (Aa)	19,1	18,8	0,47	2,52	
	18,4				

M2	58,9	57,90	1,4	2.42	
	57,0				

Muestras Adicionadas

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,7	18,8
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,6	12,6
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	93,2	106,3

Día 3 de la validación

Patrón/ Muestra	Concentraci ón mgN- NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviació n	% CV	%E
3mgN/L	3,13	3,22	0,13	4,11	7,27
	3,32				
10mgN/L	9,62	9,67	0,06	0,66	-3,34
	9,71				
20mgN/L	19,4	19,4	0,01	0,05	-3,03
	19,4				
50mgN/L	47,8	47,9	0,14	0,29	-4,2
	47,0				
75mgN/L	70,8	71,0	0,22	0,31	-5,4
	71,1				
100mgN/L	94,2	92,2	2,81	3,05	-7,81
	90,2				
M1	12,7	12,8	0,08	0,65	
	12,8				
M1(Ab)	15,9	15,9	0,03	0,17	
	15,8				
M1 (Aa)	18	18,3	0,53	2,92	
	18,7				

M2	59	58,70	0,40	0,67	
	58,4				

Muestras Adicionadas

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,9	18,4
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,8	12,8
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	93,4	96,7

A continuación se muestra los resultados obtenidos de los diferentes patrones y muestras efectuando el análisis un día en la mañana (día 4a).

Día 4a de la Validación (Repetibilidad Intermedia)

Patrón/ Muestra	Concentración mgN-NH₃/L	Promedio mgN-NH₃/L	Desviación	% CV	%E
3mgN/L	3,24	3,1	0,2	6,45	3,27
	2,96				
10mgN/L	9,11	9,55	0,62	6,49	-4,53
	9,98				
20mgN/L	19,3	19,3	0,00	0,00	-3,51
50mgN/L	46,5	47,1	0,81	1,71	-5,76
	47,7				
75mgN/L	70,8	70,9	0,11	0,16	-5,49
	71				
100mgN/L	93,6	93,8	0,22	0,24	-6,21
	93,9				
M1	12,9	12,8	0,20	1,59	
	12,6				
M1(Ab)	15,9	15,9	1,63	11,09	

M1 (Aa)	18,1	18,1	1,27	7,4	
M2	57,6	58,5	1,24	2,12	
	59,4				

Muestras Adicionadas

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,9	18,1
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,8	12,8
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	93,7	91,9

A continuación se muestra los resultados obtenidos de los diferentes patrones y muestras efectuando el análisis un día en la tarde (día 4b).

Día 4b de la Validación (Repetibilidad Intermedia)

Patrón/ Muestra	Concentración mgN-NH₃/L	Promedio mgN-NH₃/L	Desviación n	% CV	%E
3mgN/L	2,96	2,89	0,1	3,67	-3,6
	2,81				
10mgN/L	9,57	9,62	0,06	0,66	-3,8
	9,66				
20mgN/L	19,0	19,1	0,07	0,37	-4,5
	19,1				
50mgN/L	46,5	48,1	2,26	4,70	-3,8
	49,7				
75mgN/L	71,5	71,4	0,14	0,20	-4,8
	71,3				
100mgN/L	93,9	94,5	0,85	0,89	-5,5
	95,1				
M1	12,3	12,6	0,35	2,82	
	12,8				

M1(Ab)	15,8	15,8	0,07	0,45	
	15,7				
M1 (Aa)	18,3	18,4	0,07	0,38	
	18,4				
M2	58,8	56,7	2,90	5,11	
	54,7				

Muestras Adicionadas.

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,8	18,4
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,6	12,6
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	95,8	99,8

Día 5 de la Validación.

Patrón/ Muestra	Concentraci ón mgN- NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviació n	% CV	%E
3mgN/L	2,98	3,19	0,29	9,12	6,33
	3,4				
10mgN/L	9,69	9,54	0,22	2,30	-4,6
	9,38				
20mgN/L	19,2	19,4	0,28	1,46	-3,1
	19,6				
50mgN/L	47,8	48	0,25	0,53	-4,0
	48,2				
75mgN/L	71	72,1	1,49	2,07	-3,9
	73,1				
100mgN/L	95,5	95,8	0,35	0,37	-4,2
	96				
M1	12,6	12,5	0,14	1,13	
	12,4				
M1(Ab)	15,8	15,6	0,28	1,81	
	15,4				
M1 (Aa)	18,3	18,2	0,14	0,78	
	18,1				
M2	57,7	60,6	4,03	6,66	

	63,4				
--	------	--	--	--	--

Muestras Adicionadas

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,6	18,2
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,5	12,5
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,001	0,008
% Recuperación	%	93,1	98,2

Día 6 de la Validación

Patrón/ Muestra	Concentración mgN-NH3/L	Promedio mgN-NH3/L	Desviación	% CV	%E
3mgN/L	2,91	3,02	0,16	5,15	0,7
	3,13				
10mgN/L	9,48	9,57	0,13	1,33	-4,3
	9,66				
20mgN/L	19,5	19,5	0,07	0,36	-2,5
	19,4				
50mgN/L	47,9	48,0	0,14	0,29	-4,0
	48,1				
75mgN/L	71,7	72,1	0,56	0,78	-3,87
	72,5				
100mgN/L	94,5	95,3	1,06	1,11	-4,8
	96,0				
M1	12,6	12,7	0,07	0,56	
	12,7				
M1(Ab)	15,8	15,7	0,14	0,9	
	15,6				
M1 (Aa)	18,2	18,2	0,07	0,39	
	18,1				
M2	58,0	56,6	2,12	3,75	

	55,1				
--	------	--	--	--	--

Muestras Adicionadas.

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	15,7	18,2
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,7	12,7
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	90,7	95,0

Día 7 de la Validación.

Patrón/ Muestra	Concentraci ón mgN- NH3/L	Promedio mgN- NH3/L	Desviació n	% CV	%E
3mgN/L	3,11	3,10	0,02	0,69	3,3
	3,08				
10mgN/L	9,44	9,77	0,47	4,78	-2,3
	10,1				
20mgN/L	19,0	19,4	0,49	2,56	-3
	19,7				
50mgN/L	48,0	47,8	0,35	0,74	-4,4
	47,5				
75mgN/L	71,1	70,5	0,85	1,20	-6,0
	69,9				
100mgN/L	83,2	89,1	8,34	9,36	-10,9
	95,0				
M1	12,7	12,8	0,14	1,1	
	12,9				
M1(Ab)	16,4	16,2	0,35	2,19	
	15,9				
M1 (Aa)	18,0	18,0	0,07	0,39	
	17,9				
M2	58,9	58,9	0,00	0,00	

Muestras Adicionadas.

Variables	Unidades	M1Ab	M1Aa
Concentración muestra adicionada	mg/L	16,2	18
Volumen muestra adicionada	L	0,26	0,258
concentración muestra sin adición	mg/L	12,8	12,8
Volumen muestra sin adición	L	0,25	0,25
Concentración patrón	mg/L	100	200
Volumen adicionado de patrón	L	0,01	0,008
% Recuperación	%	101,2	90,3