

VALIDACIÓN ANALÍTICA CORRESPONDIENTE AL ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES EN MUESTRAS DE AGUA Y EFLUENTES SEGÚN NORMA ASTM D 3921-96.

D. Silva¹, D. Polop¹, P. Roqué¹.

¹CEQUIMAP (Centro de Química Aplicada), Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Medina Allende esq. Haya de la Torre, Ciudad Universitaria, 5000, Córdoba, Argentina; e-mails: daniela.silva@live.com.ar, diegopolop@hotmail.com, proque@fcq.unc.edu.ar

RESUMEN

El presente trabajo demuestra, con el aporte de evidencia objetiva, que el método de análisis cumple con las exigencias de calidad explicitadas en la norma ASTM D 3921-96 además de los requerimientos de calidad fijados internamente de acuerdo con la Resolución Di.P.A.S 608/93 “Norma Provincial de Calidad y Control de Agua para Bebida” y el Decreto Provincial 415/99 “Norma para la protección de los recursos hídricos superficiales y subterráneos de la Provincia de Córdoba, Argentina.”. Esto involucra la determinación de un conjunto de parámetros de validación como aspecto fundamental para el aseguramiento de la calidad analítica de los resultados en la determinación de Hidrocarburos Totales en muestras de agua y efluente.

1. Introducción.

La presencia de aceites y grasas en aguas residuales domésticas e industriales es de interés público debido tanto a su efecto perjudicial en lo estético, como al impacto negativo que provoca en la vida acuática. Parámetros reglamentarios y normativos se han establecido para su monitoreo en agua y en efluentes, los cuales requieren una adecuada metodología para el aseguramiento de la calidad analítica de los resultados.

2. Objetivos.

Determinar y evaluar los siguientes parámetros: repetibilidad, precisión intermedia, veracidad, intervalo de trabajo, ámbito lineal, límites de detección y cuantificación, cálculo de incertidumbre metodológica y comparación entre analistas.

3. Materiales y Métodos.

3.1. Materiales y equipos utilizados.

Material de referencia (MR): mezcla de 3 mL 2,2,4 trimetilpentano ó isooctano y 3mL n-hexadecano, ambos de 99% de pureza, tetracloruro de carbono pro- análisis, solución de ácido sulfúrico (1:1), agua destilada, sulfato de sodio anhidro, tiras reactivas indicadoras de pH, papel de filtro.

Material de vidrio: tubos tipo HACH, ball pipetas doble aforo, probeta de 1000 mL y 50 mL, ampolla de decantación de 1000 mL, matraz de 50 mL y embudo.

Equipos: Balanza analítica precisión 0,1 mg A&D GR-200, Espectrómetro infrarrojo (IR) con transformada de Fourier controlado por software y celda de líquidos para IR.

3.2. Metodología.

La metodología empleada para el cálculo de la incertidumbre se realizó según “Michael Gluschke, et al. A case Study in the practical estimation of measurement uncertainty, Accred Qual Assur 10:107-111 (2005)2”. Estadísticos utilizados: Media, Repetibilidad (S_r), Precisión Intermedia (S_T), Varianza Interdiaria (S_{dd}^2), Varianza Intercorrida (S_{rr}^2), Desviación Estándar (SD), Desviación Estándar Relativa (RSD), Coeficiente de Variación (CV), Desviación Relativa de la Concentración medida (Δ), Incertidumbre relativa de Recuperación ($u_{rel}(\bar{R}m)$), Incertidumbre Combinada Relativa (u_c) e Incertidumbre Expandida Relativa (U). Los ensayos fueron realizados utilizando la Guía Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) versión EP5-A21.

4. Desarrollo.

4.1. Precisión

4.1.1. Ensayos de repetibilidad

Objetivo de la experiencia: Determinar el valor absoluto de SD y el correspondiente CV del método.

Diseño de la experiencia: Ensayo realizado, utilizando Guía CLSI versión EP5-A2 que define, dos corridas analíticas diarias (mañana-tarde) medidas por duplicado, realizadas por dos analistas alternadamente (10 corridas por analista). Experiencia efectuada con muestras de concentración teórica 21,3 mg/L, preparadas a partir de fortificado de blanco (750 mL de agua destilada contaminada con aproximadamente 16 mg de MR).

Estadísticos empleados: SD y CV

Resultados obtenidos

Tabla 1-Datos repetibilidad.

Parámetro	Valor
Media (mg/L)	24,4
SD (mg/L)	1,7
CV %	6,9

4.1.2. Ensayos de precisión intermedia

Objetivo de la experiencia: Determinar el valor de la SD y CV en condiciones de variabilidad máxima dentro del mismo laboratorio para compararlo con los especificados

por la norma ASTM D 3921-96 y a su vez efectuar comparación de desempeño entre analistas.

Diseño de la experiencia: Repite las condiciones del ensayo de repetibilidad (4.1.1.).

Especificación de Calidad: El valor especificado en la Norma ASTM D 3921-96 para este parámetro es 4.78 mg/L.

Estadísticos empleados: Media, SD, CV.

Resultados Obtenidos

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^I \sum_{i=1}^2 (X_{ji1} - X_{ji2})^2}{4I}} = \text{Estimación de la Repetibilidad}$$

$$S_{dd}^2 = B^2 - \frac{A^2}{2} = \text{Estimación de la Varianza Interdiaria}$$

$$S_{rr}^2 = A^2 - \frac{S_{dd}^2}{2} = \text{Estimación de la Varianza Inter corrida}$$

$$A = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^I (\bar{X}_{j1} - \bar{X}_{j2})^2}{2I}} = \text{Desviación Estándar Intradiaria Inter corrida}$$

$$B = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^I (\bar{X}_j - \bar{X}_{...})^2}{I-1}} = \text{Desviación Estándar Diaria}$$

$I=n^{\circ}$ total de días; $j=n^{\circ}$ de corrida en el día; X_{ji} =resultados para el duplicado 1, corrida j en el día i ; X_{ji} =resultados para el duplicado 2, corrida j en el día i .

Tabla 2-Datos de precisión intermedia

Estimación de la Precisión Intermedia		
Parámetros	Valor	Valores ASTM 3921-96
Media	24,4 mg/L	20.0 mg/L
Grados de libertad (T)	40	--
Desviación Estándar Intradiaria Inter corrida (A)	1,6 mg/L	--
Desviación Estándar Diaria (B)	2,0 mg/L	--
Estimación de la Varianza Inter diaria (S_{dd}^2)	2,6 mg ² /L ²	--
Estimación de la Varianza Inter corrida (S_{rr}^2)	1,2 mg ² /L ²	--
Estimación de la precisión intermedia (S_T)	2,6 mg/L	4,78
CV%	10,6	23,9

De los parámetros evaluados se concluye que son comparables a los establecidos por la norma. Si bien el valor de la desviación estándar de la repetibilidad no se informa en la norma, este se utiliza en el cálculo de la precisión intermedia del cual se deduce su aceptación.

Comparación Analistas

Tabla 3- Datos comparación de analistas

Parámetros	Analista A	Analista B
Media (mg/L)	24,5	24,3
Desviación estándar (mg/L)	2,3	2,2
CV%	9,4	9,1

Test F para varianzas de dos muestras

Tabla 4- Datos test F

Parámetros	Valor
F experimental	1,11
F crítico (1 cola, P 0.05)	2,17
Resultado	F _{exp} < F _{crit} (cumple)

Test t para comparación de medias

Tabla 5- Datos test T

Parámetros	Valor
t experimental	0,28
t crítico (2 colas, P 0.05)	2,02
Resultado	t _{exp} < t _{crit} (cumple)

Del análisis estadístico de comparación entre analistas surge que ambos analistas no presentan diferencias estadísticas significativas para el nivel de confianza establecido del 95%.

4.2. Intervalo de trabajo.

Objetivo de la experiencia: Establecer el intervalo entre los niveles más bajo y más alto de concentraciones que pueden ser determinados con precisión y la exactitud aceptable.

Diseño de la Experiencia: Se preparan 11 concentraciones diferentes del analito, a partir de diluciones sucesivas del material de referencia.

Especificación de Calidad: No hay especificación para este parámetro.

Estadísticos utilizados: Método de comparación de Fisher y de Neuman-Keuls.

Resultados Obtenidos

Tabla 6- Datos de Diluciones

Valores de dilución (mg/L)	Replicado 1 Área	Replicado 2 Área	Replicado 3 Área
3,8	1,802	1,809	2,036
7,6	2,409	2,165	2,138
12,7	3,745	3,674	3,709
63,5	12,669	12,167	12,158
211,6	33,140	33,146	33,226
423,2	63,173	64,228	63,576
634,8	100,484	101,789	102,747
1058,0	165,063	163,159	164,378
2116,0	314,345	312,913	319,861
4231,9	483,586	491,400	490,690
6347,9	585,831	563,255	560,449

Tabla 7- Test de Fisher

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=7,71585
 Error: 20,7632 gl: 22
 Replicados Medias n

Replicados	Medias	n	
3,81	1,88	3	A
7,62	2,24	3	A
12,69	3,71	3	A
63,48	12,33	3	B
211,60	33,17	3	C
423,20	63,66	3	D
634,80	101,67	3	E
1057,98	164,20	3	F
2116,00	315,71	3	G
4231,90	488,56	3	H
6347,90	569,85	3	I

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

Tabla 8- Test de Neuman-Keuls.

Test:SNK Alfa=0,05
 Error: 20,7632 gl: 22
 Replicados Medias n

Replicados	Medias	n	
3,81	1,8823	3	A
7,62	2,2373	3	A
12,69	3,7093	3	A
63,48	12,3313	3	B
211,60	33,1707	3	C
423,20	63,6590	3	D
634,80	101,6733	3	E
1057,98	164,2000	3	F
2116,00	315,7063	3	G
4231,90	488,5587	3	H
6347,90	569,8450	3	I

Letras distintas indican diferencias significativas(p<= 0,05)

El intervalo de trabajo se establece entre los niveles de 12,7 mg/L y 1058,0 mg/L. El nivel inferior queda definido del análisis desarrollado en los tests anteriores donde se observa que no existe diferencia estadística significativa entre los tres niveles más bajos. Mientras que el nivel superior se fija debido a la saturación de la señal que presenta el equipo por encima de los 1058,0 mg/L.

4.3. Ámbito lineal.

Objetivo de la experiencia: Establecer si es aplicable el modelo lineal para explicar los datos de cuantificación. En el caso que lo sea determinar en qué intervalo. Establecer los niveles de concentración para las futuras calibraciones.
 Diseño de la Experiencia: Con la utilización de los datos y los resultados de la experiencia de ámbito de trabajo se efectuó el análisis estadístico de regresión lineal. El experimento consistió en ir quitando sucesivamente el valor más elevado de concentración y recalculando todos los parámetros relacionados.
 Especificación de Calidad: Entre 9 mg/L y 410 mg/L según Norma ASTM D 3921-96 para este parámetro.
 Estadísticos utilizados: Análisis de regresión lineal.
 Resultados:

Tabla 9 - Datos de Diluciones (Ámbito de Trabajo)

Niveles	Valores establecidos por dilución (mg/L)	Replicado 1 Área	Replicado 2 Área	Replicado 3 Área
1	12,7	3,75	3,67	3,70
2	63,5	12,67	12,17	12,16
3	211,6	33,14	33,15	33,23
4	423,2	63,17	64,23	63,58

5	634,8	100,48	101,79	102,75
6	1058,0	165,06	163,16	164,38

Tabla 10- Test de linealidad

Niveles de concent	S _{y/x}	r Pearson	R ² coef. de determinación	Test Linealidad InStat		
				F	p-valor	Si/No
3	0,5875	0,9991	0,9982	3981,2	<0.0001	SI
4	0,5654	0,9997	0,9995	20013,	<0.0001	SI
5	2,0322	0,9986	0,9972	4673,3	<0.0001	SI
6	1,8711	0,9995	0,9990	16017,2	<0.0001	SI

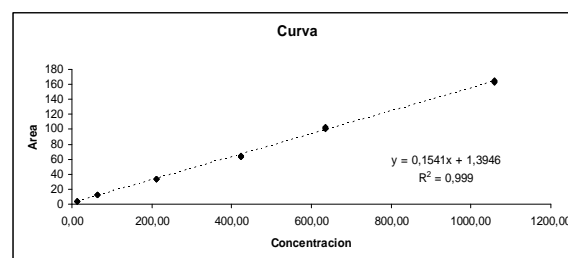


Fig. 1- Curva de calibración

Se analizaron distintos parámetros vinculados a asociación lineal en función de los niveles de concentración utilizados en el ensayo. Si bien en todos los casos hay asociación lineal, en el caso de los 6 niveles se observa una combinación entre los distintos valores de los parámetros que determinan su elección (un número apropiado de niveles de concentración, r y R² superiores a 0,995, S_{y/x} bajo, p y F cumplen) para la construcción de la curva de calibración que explican los datos de cuantificación. El intervalo para futuras preparaciones de curvas de calibración que respondan a una función lineal se establece entre 12,7 mg/L y 1058,0 mg/L.

4.4. Límite de Detección (LDM)

Objetivo de la experiencia: Determinar la menor cantidad de analito que puede ser distinguida con un nivel de confianza del 95% para efectuar la comparación contra valores normativos.
 Especificación de Calidad: Con las condiciones experimentales descritas en la norma ASTM D 3921-96 el valor expresado para el límite de cuantificación es 0,5 mg/L de hidrocarburos totales en la muestra. A partir de este valor podemos asociar un LDM como máximo 2 o 3 veces menor al de cuantificación.
 Estadísticos empleados: Media, SD y t Student (para 95% de confianza).
 Diseño de la experiencia: Se prepararon 8 muestras de concentración 0,9 mg/L aproximadamente por dos analistas (4 cada uno) a partir de 750 mL de agua destilada contaminada con 0,68 mg de MR.
 Resultados:

Tabla 11- Datos obtenidos para LDM

Parámetros	~0,9 mg/L
Media	0,9
Desviación estándar	0,1
LDM (como t x S) ¹	0,3

⁽¹⁾ Valor de t = 1,895

El valor observado se encuentra en el orden del valor esperado. Se considera que cumple con lo establecido como criterio de calidad.

4.5. Límite de Cuantificación (LCM)

Objetivo de la experiencia: Determinar la menor cantidad de analito que puede ser cuantificado con un nivel de confianza del 95% para efectuar la comparación contra valores normativos.

Valor Especificado de Calidad: La norma ASTM D 3921-96 establece como límite de cuantificación 0,5 mg/L.

Reglamentarios: Efluentes ≤ 10 mg/L, agua de bebida ≤ 0,5 mg/L.

Cálculo: 3 x LDM

Resultados:

LCM = 3 x LDM = 0,9 mg/L de HIDROCARBUROS TOTALES.

Si bien el límite obtenido en el ensayo es mayor al requerimiento de la norma ASTM 3921-96, se considera satisfactorio ya que se encuentra en el orden de los requerimientos reglamentarios gubernamentales para los límites de hidrocarburos totales en efluentes.

4.6. Veracidad

Objetivo de la experiencia: Determinar la proximidad entre el promedio de una serie grande de resultados y el valor aceptado como verdadero del mesurando.

Especificación de Calidad: La norma ASTM D 3921-96 establece: para 20 mg/L un intervalo de aceptación de recuperación media 6,9 – 33,1 mg/L

Estadísticos empleados: Media, SD y Δ.

Diseño de la experiencia: Se analizaron muestras de MR de concentración conocida, (21,3 ± 0,2) mg/L (n= 40) preparadas contaminando 750 mL de agua destilada con ~16 mg de MR.

Resultados:

Tabla 12- Datos de veracidad

Parámetros	Ensayo	Valores normativos
Valor medio obtenido (mg/L)	24,4	20
Desviación estándar (mg/L)	2,6	4,78
Valor MR (mg/L)	21,3	--
Incertidumbre del MR (mg/L)	0,2	--
Δ (mg/L)	3,1 (14.6%)	6,9 – 33,1 (65%)

El resultado cumple claramente con los valores establecidos en la norma ASTM D 3921-96.

4.7. Incertidumbre

Objetivo: Establecer la incertidumbre para los ensayos de muestras problema.

Especificación de Calidad: No hay valores prefijados en la norma para este parámetro.

Estadísticos empleados: U

Resultados obtenidos:

$$RSD = \frac{S_T}{C_{obs}} = \frac{2.58}{24.43} = 0.10 \rightarrow (1)$$

$$u_{rel}(\bar{R}_m) = \sqrt{\left(\frac{6.66}{40 \times (24.43)^2}\right) + (0.009)^2} = 0.02 \rightarrow (2)$$

$$\Delta = \frac{\bar{C}_{obs} - C_{(MR)}}{C_{(MR)}} = \frac{24.43 - 21.32}{21.32} = 0.15 \rightarrow (3)$$

(1) Desviación estándar relativa, (2) Incertidumbre relativa de recuperación, (3) Desviación relativa de la concentración medida.

S_T = desviación estándar de los replicados del MR como precisión intermedia; C_{obs} promedio de los replicados del MR; C_{MR} = concentración del material de referencia; n = número de replicados; u (C_{MR}) = incertidumbre estándar del MR; R_m = media de recuperación

$$u_c(HT) = \sqrt{SDR^2 + u_{rel}(\bar{R}_m)^2 + \Delta^2} = 0,18 \rightarrow (4)$$

$$U(HT) = 2u_c(HT) = 2 \times 0.18 = 0.36 \rightarrow (5)$$

(4) Incertidumbre combinada relativa, (5) Incertidumbre expandida.

El análisis de las distintas componentes de la incertidumbre combinada se hizo en forma relativa valorando dos componentes: precisión y veracidad.

Con el valor de incertidumbre relativa combinada se calculó el valor de incertidumbre expandida relativa, utilizando para ello un factor de cobertura igual a 2 que proporciona una probabilidad de 95% de cobertura asumiendo una distribución normal (gausiana). Valor porcentual obtenido 36%.

5. Conclusión final.

Se observa un cumplimiento de los requisitos establecidos por la norma ASTM D 3921-96 así como por las disposiciones regulatorias de la provincia de Córdoba tomadas como referencias. Sin embargo para los límites máximos admisibles para contaminantes orgánicos en agua de bebida, el método no permite tomar una decisión cerca de los límites, debido a que el LCM obtenido es superior al valor de referencia.

La metodología para la determinación de hidrocarburos totales solo se considera aceptable en efluentes para los objetivos previstos.