



VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE CUANTIFICACIÓN DE ANIONES POR CROMATOGRAFÍA IÓNICA EN AGUA DEL RÍO DAULE

Augusta Jiménez Sánchez¹.

Yadira Collahuazo Reinoso

Universidad de Guayaquil,
dolores.jimenezs@ug.edu.ec.

Para citar este artículo puede utilizar el siguiente formato:

Augusta Jiménez Sánchez y Yadira Collahuazo Reinoso (2017): "Validación del método de cuantificación de aniones por cromatografía iónica en agua del río Daule.", Revista Caribeña de Ciencias Sociales (diciembre 2017). En línea: <http://www.eumed.net/rev/caribe/2017/12/cuantificacion-aniones-daule.html>

RESUMEN

La cuantificación confiable de un analito inicia con la validación del método de análisis, involucrando la competencia del personal y el uso de equipos adecuados. El presente trabajo buscó validar el método de ensayo para la cuantificación de aniones: cloruros, nitritos, nitratos), sulfatos y fosfatos, por Cromatografía iónica en muestras de agua del río Daule en Guayaquil Ecuador, según la metodología indicada por la Agencia de Protección ambiental en el método 4110B de Standar Methods. Se usó un cromatógrafo Metrohm 883 para cromatografía iónica, con detector de conductividad y supresor. Se consideró linealidad, intervalo de trabajo, precisión, repetibilidad instrumental, precisión intermedia, precisión del método, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y recuperación. Se usaron patrones y material de referencia certificado. Mediante el diseño experimental y procedimientos estadísticos empleados se demostró la linealidad del método para cada ión analizado ($R^2 > 0.99$), exactitud y porcentaje de recuperación entre los rangos esperados de cada analito, por lo que se concluye que el método es confiable para ser utilizado en la determinación de aniones en aguas de río.

Palabras clave: *Aniones, Validación, Cromatografía iónica.*

ABSTRACT

The trustworthy quantification of an analyte begins with the validation of the analysis method, involving the capacity of staff and the use of suitable equipment. The present study sought to validate the assay method for the quantification of anions: chlorides, nitrites, nitrates, sulphates and phosphates, by ionic chromatography in water samples from the Daule River in Guayaquil, Ecuador, according to the methodology indicated by

the Environmental Protection Agency in the 4110B method of Standar methods. A Metrohm 883 ionic chromatograph with conductivity and suppressor detector was used. It was considered linearity, working interval, precision, instrumental repeatability, intermediate precision, method precision, accuracy, detection limit, quantification limit and recovery. Patterns and certified reference material were used. Through the experimental design and statistical procedures used, the linearity of the method for each analyzed ion was demonstrated ($R^2 > 0.99$), accuracy and percentage of recovery between expected ranges of each analyte, therefore one concludes that the method is reliable to be used in the anions determination in river waters.

Key words: Anions, Validation, Ion chromatography.

INTRODUCCIÓN

La validación de un método analítica es el proceso que confirma por análisis experimentales y evidencias objetivas de que ese método cumple los requisitos particulares para el uso específico propuesto (ISO/IEC 17025, 2005). Adicionalmente se establecen y documentan las características de rendimiento de un método, y de diversos parámetros demostrando así la competencia del personal y si dicho método es adecuado para un propósito analítico particular (Sadzawka et al., 2007). A fin de ser precisos y exactos en la emisión de resultados de los diversos análisis, se requiere validar los métodos analíticos, ya sean estos usados en el control de calidad de productos o sean usados en investigaciones científicas. Es por ello, que previo a dar resultados a terceros, se realizó el presente trabajo en una matriz agua de río.

La presencia de especies químicas en el agua pueden advertir de un posible deterioro, a corto o largo plazo. Entre éstas se encuentran los aniones, tales como: cloruros que le comunican al agua un sabor desagradable y puede ser corrosivo; nitritos cuya presencia hace que el agua no se pueda potabilizar por el riesgo de causar la inutilización de la hemoglobina en la sangre, en especial en los infantes (Helmer y Meybeck, 1996; Helmer 1994), nitratos que podría indicar oxidación de la materia orgánica por bacterias, fertilizantes residuales, fosfatos y sulfatos , cuya presencia en cantidades superiores a lo permitido podrían causar daño a la población y al medio ambiente (Schindler, 2008; Moreno et al., 2010)

Las muestras de agua fueron tomadas en el río Daule, el cual es parte importante del Ecosistema Guayas donde habita el 42% de la población ecuatoriana (Montaño, 2010). Su conservación fue considerando la norma técnica INEN 2169:98 (INEN, 1998), esta Norma establece las precauciones generales que se deben tener en cuenta para conservar y transportar las muestras de agua e indica la técnicas de conservación usadas comúnmente.

En este estudio, se presentan los resultados en la validación del método de análisis de cuantificación de iones usando cromatografía iónica con supresor, en una matriz de agua de río.

2. METODOLOGÍA

Para la realización de la validación es necesario cumplir con requisitos previos (Díaz, 2002; Ludwig, 1999; ICH-Q2A, 1995) como buenas prácticas de laboratorio, procedimiento analítico desarrollado, probado y documentado (Eurachem, 2005; Aguirre et al., 2001; ISO 9000, 2005), equipos calibrados, verificados y personal formado y entrenado (Eurachem, 2005). Adicionalmente se requiere definir los parámetros y criterios de aceptación de las diversas pruebas de acuerdo al método a validar y su necesidad, lo cual se realizó previamente.

2.1 Reactivos

Todos los reactivos usados corresponden calidad para análisis (P.A.).

Se usó agua ultra pura, es agua de calidad 1 según norma ISO 3696, a través de equipo Milli-Q. Carbonato de sodio (Na_2CO_3). Mallinckrodt 7528-04. Hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3). Mallinckrodt. Ácido sulfúrico (H_2SO_4) concentración al 95%. Mallinckrodt. Nitrato de Potasio (KNO_3) Panreac 131524.1210. Cloruro de sodio (NaCl) JT Baker. Sulfato de sodio (Na_2SO_4) Fisher Chemical.. Nitrito de sodio (NaNO_2) JT Baker 3780-0. Di hidrógeno fosfato de potasio (KH_2PO_4) JT Baker 3246-01.

Eluente: Disolución tampón 1 mmol Hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3) – 3.2 mmol carbonato de sodio (Na_2CO_3). Se disolvió 0.084 g de NaHCO_3 y 0.3392 g de Na_2CO_3 en un balón de aforo de 1 L con agua ultra pura, se mantuvo en el baño de ultrasonido por media hora, hasta eliminar las burbujas de CO_2 presentes y filtró a través de una membrana de 0.45 μm .

Regenerante: Disolución de 50 mmol de H_2SO_4 . Se preparó bajo una cabina de extracción; se trasvasó en un vaso de precipitación aproximadamente unos 3 ml de H_2SO_4 y con ayuda de una pipeta se tomaron 2.72 mL de H_2SO_4 en un balón de aforo de 1 L y se enrasó con agua ultra pura hasta el volumen indicado.

2.2 Equipos y materiales

Se usó jeringas de polietileno de 10 ml con aguja intercambiable. Filtros de membrana de 0.22 μm Millex-MF filtros de esteres de celulosa que se acoplan a la jeringa anterior. Cromatógrafo: Metrohm Basic IC plus 883, versión del programa 5.850.0107, mediante la detección de conductividad realiza el análisis iónico. Está compuesto de bomba, detector de conductividad, válvula de inyección, amortiguador de impulsos, supresor químico MSM II, columna, precolumna separadora, inyector automático de muestras y sistema de

adquisición de datos. Automuestreador, Automuestreador Metrohm compacto, versión del programa 5.863.0020. Tubos de polietileno adecuados para el automuestreador. Se usó la columna Metrosep A Supp 5 – 150/4,0, longitud 150 mm, diámetro interno 4.0 mm, tamaño de partícula 5 μm , flujo estándar 0.7 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, flujo máximo 0.8 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, presión máxima 15 mPa, capacidad de pH desde 3 hasta 12. Se usó además, Balanza analítica, marca Ohaus modelo Explorer Pro. Baño ultrasonido, marca Fisher Scientific, modelo FS60D. Cabina de extracción de gases, Frontier Junior. Potenciómetro, marca Thermo, modelo Orion 3 Star pH Benchop. Conductímetro, marca Thermo, modelo Orion 3 Star Conductivity Benchop. Desecador de vidrio. Purificador de agua Milli-Q.

El procedimiento empleado fue el método 4110 B de Standar Methods (Standar Methods, 2005), se usó el equipo Cromatógrafo iónico Metrohm 883 y su estandarización fue el inicio del proceso de validación.

2.3 Validación del método

La validación del método analítico (NCh 2725, 2002) por Cromatografía iónica consistió en diversas pruebas cuyos parámetros se exponen a continuación:

Linealidad: Se evaluó la linealidad al estudiar siete soluciones por triplicado en un intervalo de concentraciones de 0, 0.1, 0.2, 1, 5, 10 y 20 ppm para Cl^- y SO_4^{2-} y 0, 0.05, 0.1, 0.5, 2.5, 5 y 10 ppm para NO_2^- , NO_3^- y PO_4^{3-} . Se determinó la ecuación de la recta de regresión lineal, se realizó la prueba de t del coeficiente de correlación de regresión lineal, se calcularon los coeficientes R^2 , r, los límites de confianza, desviación estándar del intercepto (S_a), desviación estándar de la pendiente (S_b), límite de detección, límite de cuantificación y residual ($S_{y,x}$), se realizó el test de Cochran y se determinó el coeficiente de variación (CV) del factor de respuesta.

Precisión (repetibilidad instrumental, repetibilidad del método y precisión intermedia).

Repetibilidad instrumental: Se tomó una alícuota de una misma solución estándar de 4.5 ppm de Cl^- , 2.5 ppm de NO_2^- , 2.5 ppm de NO_3^- , 2.5 ppm de PO_4^{3-} y 5 ppm de SO_4^{2-} . Se realizaron siete repeticiones. Se calculó media, desviación estándar y CV.

Precisión intermedia: Se realiza durante dos días distintos. Cada día se prepara 4 soluciones estándares cuyas concentraciones fueron de 10 ppm de Cl^- , 5 ppm de NO_2^- , 5 ppm de NO_3^- , 5 ppm de PO_4^{3-} y 10 ppm de SO_4^{2-} . Cada día se realizó el análisis de las cuatro soluciones. Se calculó media, desviación estándar y CV.

Precisión del método: Se seca las sales en estufa a 104 $^{\circ}\text{C}$ por 2 h, y se preparan soluciones nuevas para obtener concentraciones de 5 ppm de Cl^- , 2.5 ppm de NO_2^- , 2.5 ppm de NO_3^- , 2.5 ppm de PO_4^{3-} y 5 ppm de SO_4^{2-} . Se calculó media (M), desviación estándar (S) y coeficiente de variación relativa CV.

Exactitud (análisis de soluciones de concentración conocida, adiciones de estándar, análisis de material de referencia certificado (MRC)).

Análisis de soluciones de concentración conocida: Se preparan soluciones que contengan, 1, 1.8, 2, 3.6, 7.5 y 13 ppm de Cl^- , 0.3, 1, 2, 3.8 y 7.5 ppm de NO_2^- , 0.3, 1, 2, 3.8 y 7.5 ppm de NO_3^- , 0.3, 1, 2, 3.8 y 7.5 ppm de PO_4^{3-} y 1, 2, 3.6, 7.6 y 15 ppm de SO_4^{2-} . Se realizaron 5 a 11 repeticiones de las corridas. Se calculó media (M), desviación estándar (S) y coeficiente de variación relativa % CV y % de recuperación de cada repetición. Los resultados de recuperación obtenidos fueron analizados a través de una prueba t de porcentaje de recuperación.

Análisis de MRC: Se utilizó el MRC PRIMUS, que contiene 10 ± 0.02 ppm de Br^- , Cl^- , F^- , NO_3^- , PO_4^{3-} y SO_4^{2-} . Se realizó 8 lecturas. Se calculó media, desviación estándar y CV y % de recuperación. Se realizó una prueba t de análisis de media *versus* valor verdadero.

Adición de estándar a una muestra conocida: Una muestra de agua de río es homogenizada y dividida en partes iguales para su fortificación y análisis. Se realiza la fortificación añadiendo en dos muestras de agua independientemente 2.25 y 13.52 ppm de Cl^- , 1.25 y 7.5 ppm de NO_3^- , 1.25 y 7.5 ppm de PO_4^{3-} y finalmente 2.5 y 15 ppm de SO_4^{2-} . Se calculó media, desviación estándar, CV y porcentaje de recuperación.

Límite de detección: Se Preparan soluciones hasta determinar la mínima concentración a ser detectada. Se parte desde la concentración calculada con los datos de la pendiente e intercepto en la recta de calibración hasta la detección del anión.

Límite de Cuantificación: A partir de los valores calculados, se preparan soluciones de estándares hasta encontrar la concentración que al hacer una prueba t de medias, no haya diferencia significativa entre esos valores. Se realizaron 10 repeticiones de las concentraciones seleccionadas. Se calculó media, desviación estándar, CV y porcentaje de recuperación. Se realizó una prueba t de análisis de medias.

Prueba de adecuabilidad del sistema (tiempo de retención, número de platos teóricos y asimetría): Se inyecta una misma muestra seis veces y se verifica el tiempo de retención de cada anión, el número de platos teóricos y el valor de asimetría.

3. RESULTADOS

La Tabla 1 presenta los resultados en la validación del método de cuantificación de aniones en agua por cromatografía iónica. Como se puede observar, el método analítico cumple con los rangos de aceptación establecidos para los parámetros estudiados en las concentraciones seleccionadas y en las condiciones de trabajo establecidas.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Al evaluar la linealidad del método, se obtuvo un coeficiente de correlación que demuestra que existe correlación entre la variable concentración y las lecturas obtenidas.

Para confirmar se realizó el test t de regresión cuyo resultado confirmó la existencia de linealidad. A partir del test de residuales se confirmó la validez del método y se estableció el rango de trabajo.

El estudio de precisión fue realizado a partir de precisión instrumental, intermedia y del método, las mismas que cumplieron de acuerdo a los criterios de aceptación.

Tabla 1. Resultados de la validación

Parámetro	Procesamiento	Cuantificación de aniones por CI					criterios de aceptación				
		Cloruro	Nitrito	Nitrato	Fosfato	Sulfato	Cloruro	Nitrito	Nitrato	Fosfato	Sulfato
<i>Selectividad</i>	Resolución	4.4	8.8	10.2	4	-	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5	>1.5
<i>Linealidad</i>	Coefficiente de determinación	0.9992	0.9998	0.999	0.999	0.999	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
	Coefficiente de correlación	0.9996	0.9999	0.999	0.999	0.999	0.998	0.998	0.998	0.998	0.998
	t de correlación	154.29	352.89	253.41	246.92	258.71	>2.11	>2.13	>2.10	>2.12	>2.10
	Varianza (test de Cochran)	0.484	0.761	0.631	0.536	0.652	0.684	0.797	0.684	0.684	0.797
	% CV factor de respuesta	6.27	3.64	3.85	2.94	2.33	5	5	5	5	5
	LD	0.24	0.07	0.06	0.04	0.12					
	LC (ppm)	1	0.3	0.3	0.3	1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Rango trabajo(ppm)	1-20	0.3-10	0.3-10	0.3-10	1-20	0-40	0-20	0-20	0-20	0-40
<i>Precisión</i>											
Instrumental	% CV	0.534	0.612	0.803	0.412	0.536	5	5	5	5	5
Intermedia	% CV	2.84	0.093	0.239	1.93	0.202	5	5	5	5	5
Del método	% CV	0.172	0.113	0.259	0.570	0.599	5	5	5	5	5
<i>Exactitud</i>											
Concentración conocida	% CV	4.67	3.32	3.30	2.46	5.25	5	5	5	5	5
	% Recuperación	100.14	96.55	97.76	102.28	102.75	75-120	75-120	75-120	75-120	75-120
	texp. de % recuperación	0.075	2.53	1.65	2.26	1.28	<2.57	<2.57	<2.57	<2.57	<2.57
MRC	% CV	3.31		1.33	2.60	2.88	80-115	80-115	80-115	80-115	80-115
	% Recuperación	97.42		99.42	99.88	97.82					
	texp. de medias	2.36		1.23	0.12	2.22	2.36	2.36	2.36	2.36	2.36
Adición 1 1.25	% CV	5.68	1.10	2.24	8.21	5.87	8	8	8	8	8
	% recuperación	97.43	88.56	97.53	98.12	99.16	75-120	75-120	75-120	75-120	75-120
Adición 2 7.5	% CV	1.08	1.25	0.59	1.43	0.68	6	6	6	6	6
	% recuperación	92.25	95.74	93.21	97.77	99.35	80-115	80-115	80-115	80-115	80-115
<u>Prueba de Adecuabilidad</u>	Tiempo de retención	5.03	6.00	8.50	12.44	14.32	5.04	6.00	8.48	12.42	14.30

<i>d del sistema</i>	% CV	0.543	0.422	0.247	0.166	0.162	<2	<2	<2	<2	<2
	# Platos teóricos	10330	9596	1133	1225	1407	2000	2000	2000	2000	2000
	Asimetría	1.17	1.18	1.23	1.09	1.07	<2	<2	<2	<2	<2
<i>Estándar inicio y fin de trabajo</i>	% CV	0.80	1.80	1.30	1.86	0.53	<2	<2	<2	<2	<2

tepx: t de student de experimentos

Para la evaluación de la exactitud se realizó el análisis de concentraciones conocidas, el análisis de un MRC y la fortificación de muestras. Las recuperaciones obtenidas cumplieron los criterios de aceptación, se realizó además un test t de recuperación para las diferentes concentraciones dando respuesta conforme a lo planteado.

Los límites de detección y cuantificación fueron corroborados experimentalmente, y la prueba t realizada para el límite de cuantificación cumplió el criterio de aceptación.

Los valores de tiempo de retención, número de platos teóricos y prueba de asimetría fueron aceptables de acuerdo al criterio de aceptación para la prueba de adecuabilidad del sistema.

5. CONCLUSIONES

El método es selectivo de los aniones estudiados sin que se hayan presentado interferencias.

La función respuesta del método mostró una excelente linealidad ya que el coeficiente r mostró una correlación superior a 0.999. Los límites de cuantificación comunican una gran certeza a los resultados ya que se trabaja encima del valor mínimo que el equipo puede detectar.

La precisión de los resultados muestran dispersiones y coeficiente de variación aceptables dentro de lo esperado, menor a 5 %. La exactitud de los resultados es satisfactoria debido a la recuperación cercana al 100 % y un % CV aceptable. El método validado cumple las exigencias solicitadas por Eurachem, ICH y del propio laboratorio.

Agradecimientos

El presente trabajo fue posible realizarlo gracias a la colaboración del Departamento de Ciencias Químicas de la Escuela Politécnica del Litoral.

Bibliografía

1. Aguirre Ortega, L., & García Junca, T. (2001). *Validación de métodos analíticos. Monografías de AEFI*. Barcelona.

2. AOAC. (2002). *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*.
3. Díaz Marot, A. (2002). *Validación de Métodos y equipos de análisis químico*. Barcelona: Instituto Químico de Sarriá.
4. Eurachem. (2005). *Métodos Analíticos Adecuados a su propósito* (Segunda ed.). Los Cués: Centro Nacional de Metrología.
5. Helmer, R. (1994). *Overview: Water quality monitoring: national and international approaches in Hydrological, Chemical and Biological Processes of transformation and Transport of Contaminants in Aquatic Environments*. (P. Norman E, A. Rod J, & T. Vladimir V, Eds.) Wallingford, Great Britain.
6. Helmer, R., & Meybeck, M. (1996). *An Introduction to water quality in Water Quality Assessments. A guide to Use of Biota, Sediments and water in environmental Monitoring* (2da edición ed.). (D. Chapman, Ed.) Great Britain: University Press, Cambridge.
7. ICH-Q2A. (1995). *Guide line for industry. Text on validation of analytical procedures*.
8. INEN. (1998). *Norma Técnica INEN 2169:98, Calidad de agua. Muestreo, manejo y Conservación de muestras*. Quito, Ecuador.
9. INN.(Instituto Nacional de Normalización). (1998). *Norma Chilena Oficial. NCh411/6.of98 Calidad de Agua. Muestreo. Parte 6: Guía para el muestreo de ríos y cursos de agua*.
10. ISO/IEC 17025. (2005). *Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración*. 38 p.
11. Ludwing, H. (1999). *Validation and ualification in Analytical Laboratories*. USA: Interpharm.
12. Metrohm. (2010). *850 Professional IC. 2.850.2110-Anion MCS Prep 1. Manual*. Herisau: Teachware Metrohm AG.
13. Montaña, M. (2010). *Ecosistema Guayas (Ecuador): Recursos, Medio Ambiente y Sostenibilidad en la perspectiva del Conocimiento Tropical*. In *Tesis Doctoral*. Elche.
14. Moreno, D., Quintero, J., & López, A. (2010). *Métodos para identificar, diagnosticar y evaluar el grado de eutrofia*. *Contactos* 78, 25-33.
15. NCh 2725. (2002). *Directrices para la aplicación de NCh-ISO 17025 en los laboratorios que realizan ensayos y análisis químicos*. Intituto Nacional de Normalización. Santiago, Chile.

16. Sadzawka, carrasco, & Demanet. (2007). *guía para la validación de los métodos de análisis en lodos y suelos*. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas.
17. Schindler, D. W., Hecky, R. E., Findlay, D. L., Stainton, M. P., Parker, B. R., & Paterson, M. J. (2008, Agosto 12). *PNAS*. Retrieved Febreo 1, 2013, from Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: Results of a 37-year whole-ecosystem experiment: http://www.pnas.org/content/105/32/11254.abstract?ijkey=193442f62c223a79a31696a755bf00a107e708cf&keytype2=tf_ipsecsha
18. Standar Methods. (2005). *Standard Methods for the Examination of water and wastewater* 20th edition.