



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Diseño y validación de nitritos en aguas de consumo según la
norma ISO17025 en un laboratorio agroalimentario**

María Cruz Correa

Oviedo, 20 de junio de 2020



Noemí de los Santos Álvarez, Profesora Titular del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo y Patricia de los Santos Álvarez, Profesora del Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “Diseño y validación de nitritos en aguas de consumo según la norma ISO 17025 en un laboratorio agroalimentario”

ha sido realizado por la alumna María Cruz Correa bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2019-20, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 20 de julio de 2020.

Fdo: Noemí de los Santos Álvarez

Patricia de los Santos Álvarez

Índice

1. Introducción	4
1.1. Sistemas de Gestión de la Calidad.....	4
1.2. UNE-EN ISO/IEC 17025:2017.....	6
1.2.1. Requerimientos de gestión	6
1.2.2. Requerimientos técnicos.....	7
1.3. Verificación y validación de métodos analíticos	9
1.3.1. Verificación de métodos	9
1.3.2. Validación de métodos.....	10
2. Planteamiento del problema	16
2.1. Nitritos.....	16
2.2. Aguas de consumo humano.....	17
2.3. Marco legal.....	17
2.4. Planteamiento del problema analítico.....	18
3. Objetivos	18
4. Desarrollo experimental.....	19
4.1. Procedimiento de rutina e informe de ensayo	19
4.2. Protocolo de validación.....	30
4.3. Ejecución experimental de la validación	40
4.4. Evaluación de los resultados analíticos.....	41
4.5. Certificado de validez del método	44
5. Conclusiones.....	46
6. Bibliografía	47
7. Anexos.....	49

1. Introducción

1.1. Sistemas de Gestión de la Calidad

La implantación de Sistemas de Gestión de la Calidad constituye una práctica generalizada en el ámbito empresarial. Las razones que pueden justificar este hecho son muy variadas, abarcando desde los aspectos vinculados a la disminución de costos e incrementos en la productividad, hasta aquellos otros relacionados con la necesidad de estandarizar el conjunto de procesos que permitan regular y controlar las actividades y funciones que se realizan en el seno de una empresa.

En este contexto los laboratorios de análisis físico-químico deben considerarse como una empresa cuyo objetivo general es producir información analítica que permita adoptar decisiones para resolver problemas planteados por la sociedad, la industria o un cliente en particular. Así pues, la calidad de la información que se genera en los laboratorios es decisiva, y de ahí que los laboratorios analíticos no puedan obviar la calidad. (Compañó R., Ríos Á., 2002)

Actualmente, la ISO (Organización Internacional de Normalización), a través de la norma ISO 9001:2015 define la calidad como el “grado en el que un conjunto de características inherentes de un objeto cumple con los requisitos” y añade en una nota de entrada que el término “calidad” puede utilizarse acompañado de adjetivos tales como pobre, buena o excelente. Teniendo en cuenta las definiciones que propone la propia norma de “características”, “objeto” y “requisitos” la calidad podría definirse como: “grado en que un conjunto de rasgos diferenciadores inherentes a un producto, servicio, proceso, persona, organización, sistema o recurso, cumple con unas necesidades o expectativas establecidas, generalmente implícitas u obligatorias”. (Compañó R., Ríos Á., 2002)

Los laboratorios deben establecer, desarrollar y poner en marcha una serie de actuaciones planificadas y sistemáticas que permitan demostrar y proporcionar fiabilidad y validez a los resultados de su actividad, es decir, a los resultados de las determinaciones analíticas que realizan. (Morillas, 2012)

La gestión de la calidad se entiende como un conjunto de actividades para dirigir y controlar un laboratorio en lo referente a la calidad. En la gestión de la calidad se deben definir los objetivos, la planificación, el control y el aseguramiento de la calidad. En resumen, un sistema de gestión de la calidad debe:

- determinar las necesidades del cliente o parte interesada para satisfacerlas,

- establecer los objetivos de la calidad,
- planificar los procesos para cumplir los objetivos,
- establecer y aplicar métodos para medir la eficacia y eficiencia de cada proceso,
- establecer los medios necesarios para evitar no conformidades y eliminar sus causas en caso de aparecer,
- definir y aplicar un método para la mejora continua del sistema de gestión de la calidad.

La serie de normas ISO 9000 constituye un conjunto de normas que proponen modelos genéricos para la implantación y el mantenimiento de sistemas de gestión de la calidad. En concreto, la norma ISO 9001 contiene los requisitos de los Sistemas de Gestión de la Calidad. Esta norma internacional recoge todos los requisitos que debe cumplir el sistema de gestión de la calidad de una organización para asegurar la calidad de sus productos o servicios. Una de las entidades certificadoras en España es AENOR, que además es la entidad de normalización.

La certificación es el procedimiento por el cual un organismo autorizado, verifica que una organización tiene un sistema de gestión conforme a las exigencias de una norma o de unas especificaciones técnicas.

La acreditación es el procedimiento mediante el cual un organismo autorizado reconoce que una organización es competente para la realización de una determinada actividad de evaluación de conformidad.

La certificación evalúa los procesos y la gestión de la organización, mientras que la acreditación realiza pruebas de la capacidad técnica.

La Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) es el organismo que establece y mantiene el sistema de acreditación a nivel nacional, siguiendo en todo momento las políticas y recomendaciones establecidas por la Unión Europea. Es la única entidad que puede acreditar una actividad en España.

Una de las ventajas de que un laboratorio de ensayo esté acreditado para la determinación de uno o varios analitos en las matrices correspondientes, es que se asegura la calidad técnica de los resultados analíticos obtenidos al analizar las muestras.

1.2. UNE-EN ISO/IEC 17025:2017

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 es la norma utilizada por los laboratorios de ensayo (no clínicos) y calibración que manejan un Sistema de Gestión de Calidad como norma de referencia para implantar y obtener la acreditación. En esta norma se recogen los requisitos para demostrar la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. La acreditación no se concede al laboratorio de forma genérica, sino que se concede para actividades específicas concretadas en el alcance de acreditación.

Dicha norma contiene dos secciones principales: requisitos de gestión y requisitos técnicos. Los requisitos de gestión se relacionan principalmente con la operación y eficiencia del sistema de gestión de calidad dentro del laboratorio. Los requerimientos técnicos tratan sobre la competencia del personal, selección y validación de métodos de calibración o ensayo, requisitos de trazabilidad metrológica y de equipos. Esta norma está alineada con los requerimientos de la ISO 9001, por tanto, toda organización que cumple con los requerimientos de ISO 17025 también cumple con los requerimientos de ISO 9001, aunque no al contrario (Macas Acurio, 2011). El hecho de que un laboratorio cumpla con la ISO 9001 no implica que esté certificado según dicha norma. Para ello es necesario un proceso de certificación de forma independiente.

La UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 es un documento desarrollado para fomentar la confianza en la capacidad para generar resultados válidos y trabajar de forma competente de los laboratorios de análisis.

1.2.1. Requerimientos de gestión

En el apartado 8 de la norma se detallan los requerimientos de gestión: control de documentos y registros, mejora, acciones para abordar riesgos y oportunidades, acciones correctivas, auditorías internas y revisión por la dirección.

En la norma se establece la necesidad de implementar y mantener un sistema de gestión que opere conforme a la norma ISO 9001, proporcionando para ello dos opciones para el desarrollo del sistema de gestión y para el cumplimiento de los requisitos generales y los requisitos del proceso.

- Opción A: establecer un sistema de gestión de la calidad que cumpla con los requerimientos de gestión indicados explícitamente.
- Opción B: esta opción es para los laboratorios que ya tienen establecido y mantienen un sistema de gestión de la calidad bajo la ISO 9001, ya que se supone que en esta norma se contemplan dichos requerimientos.

1.2.2. Requerimientos técnicos

El objetivo de los requerimientos técnicos es evaluar la capacidad técnica del laboratorio. La norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 en los apartados 5, 6 y 7 indica los requisitos relativos a la estructura, los recursos y al proceso.

En cuanto a los requisitos de estructura éstos definen y documentan el alcance y estructura que permite al laboratorio garantizar su competencia técnica, la eficacia del sistema y su integridad en todo momento.

Respecto a los requisitos relativos a los recursos, el laboratorio debe contar con personal, instalaciones y equipamiento suficientes y adecuados para llevar a cabo las gestiones y actividades propias del laboratorio.

El personal del laboratorio debe trabajar conforme al sistema de gestión del laboratorio, debe ser competente y estar cualificado para las actividades que va a realizar y desde la dirección se les debe comunicar sus tareas y responsabilidades.

Tanto las instalaciones del laboratorio como las condiciones ambientales deben ser tales que, aseguren que no afectan negativamente a la validez de los resultados, debiendo estar documentados los requisitos necesarios para realizar las actividades del laboratorio.

El laboratorio debe disponer de todo el equipamiento necesario para llevar a cabo sus actividades. Parte de ese equipamiento son los equipos de medición, que deben estar calibrados cuando la exactitud o la incertidumbre de medición afectan a la validez de los resultados o cuando es necesario determinar la trazabilidad metrológica.

La trazabilidad metrológica es la propiedad de un resultado de medida por la cual éste puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida (VIM, 2012).

En los requisitos del proceso en general la norma define criterios para la selección, verificación y validación de los métodos analíticos y para la selección de los procedimientos de muestreo y manipulación de ítems. Además, se definen las características que deben cumplir los registros técnicos, la evaluación de la incertidumbre, las actividades de aseguramiento de la validez de los resultados, así como los informes de ensayo, declaraciones de conformidad y opiniones e interpretaciones que puedan incluirse en ellos.

1.2.2.1. Aseguramiento de la validez de los resultados

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en su apartado 7.7 trata sobre las actividades de control de la calidad. En él se indica que el laboratorio debe disponer de procedimientos de control, que los resultados obtenidos en estos controles deben registrarse con objeto de detectar posibles tendencias anómalas y que, siempre que sea posible, deben aplicarse técnicas estadísticas para analizarlos. Entre las posibles actividades de control están:

- a) Uso de materiales de referencia o materiales de control de calidad
- b) Análisis de muestras estables analizadas anteriormente
- c) Repetición del ensayo o calibración utilizando los mismos métodos o diferentes
- d) Comprobación de la coherencia de los resultados para distintas características de la muestra.
- e) Participación en ensayos de intercomparación o ejercicios de aptitud. Controles externos.

En cuanto a esta última actividad, el laboratorio debe hacer un seguimiento de su desempeño mediante comparación con los resultados de otros laboratorios.

Los programas de control externo se basan en la aceptación, por parte de diversos laboratorios, de llevar a cabo unos análisis bajo la coordinación de una organización. El alcance de estos esquemas puede variar desde simples acuerdos que involucran el intercambio de materiales de referencia entre laboratorios, hasta extensos programas nacionales e internacionales, que pueden incluir decenas de laboratorios. Los ejercicios intercomparación pueden ser:

- *Ensayos de aptitud:* permiten evaluar la capacidad de los laboratorios para generar resultados con un nivel aceptable de competencia. Se trata de un programa sistemático de pruebas en que un grupo de laboratorios analiza muestras de composición conocida. Básicamente en estos ejercicios se lleva a cabo una evaluación del sesgo y de la precisión de los resultados generados por los laboratorios. Sirven también para ayudar a identificar errores y necesidades de capacitación del personal del laboratorio.
- *Ejercicios colaborativos:* tienen por finalidad la validación de métodos analíticos. En determinadas ocasiones el objetivo es mejorar un método que ya existe, pero que no parece apropiado para una determinada finalidad. Una vez que la organización establece el método, todos los laboratorios tienen que seguir de forma estricta un protocolo previamente consensuado y aplicar el mismo procedimiento analítico con el fin de determinar las características de funcionamiento.

Las etapas de ejecución que se llevan a cabo en los ejercicios de intercomparación por parte del organizador son:

1. Convocatoria del ejercicio. Deberá detallarse el objetivo del ejercicio, las condiciones de participación, analito, matriz, etc.
2. Envío del protocolo de trabajo y del material.
3. Recepción de resultados de los participantes.
4. Tratamiento estadístico y de gestión de los resultados recibidos de los laboratorios participantes.
5. Emisión del informe final.

El criterio más habitual para la evaluación de los laboratorios que participan en el ejercicio de intercomparación es la puntuación Z-score:

$$Z = (x_i - x_{ref})/s \quad \text{Ec. 1}$$

donde x_i es el resultado obtenido por cada laboratorio, x_{ref} el valor de referencia asignado y s la desviación típica del conjunto de resultados no discrepantes del ejercicio. (Martín V. , 2012).

Los resultados del laboratorio serán satisfactorios cuando el valor Z-score se encuentre entre -2,00 y +2,00. El valor del resultado será cuestionable cuando $2 < |Z| < 3$. Se concluirá que el resultado del laboratorio no es satisfactorio cuando $|Z| > 3$.

Cuando el laboratorio presenta resultados cuestionables o insatisfactorios se deberá identificar y documentar el problema y aplicar las medidas correctoras pertinentes.

1.3. Verificación y validación de métodos analíticos

1.3.1. Verificación de métodos

En el apartado 7.2 de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 se indica que el laboratorio debe usar métodos y procedimientos adecuados para todas las actividades que realiza. Cuando por parte del cliente no queda especificado el método a utilizar se recurrirá a métodos publicados en normas internacionales, regionales o nacionales o por organizaciones técnicas reconocidas, textos o revistas científicas, especificaciones del fabricante del equipo, o incluso se pueden utilizar métodos desarrollados por el laboratorio o modificados.

El laboratorio debe verificar los métodos normalizados que utilice, antes de ser utilizados, entendiendo por verificación la “aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados” (VIM, 2012). No debe confundirse con el término calibración, que hace referencia a las operaciones que establecen una relación entre dos

medidas, con sus incertidumbres de medida, a partir de patrones. El VIM define calibración como la “operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación”.

1.3.2. Validación de métodos

La validación de un método consiste en confirmar, a través del examen y aportación de evidencias objetivas de que dicho método cumple los requisitos particulares para un uso específico previsto.

Se establece que el laboratorio debe validar:

- Métodos no normalizados: aquellos métodos nuevos, los métodos desarrollados por el laboratorio o aquellos que han venido siendo utilizados tradicionalmente por el laboratorio pero que no están normalizados.
- Métodos normalizados que han sido modificados significativamente o usados fuera del alcance de aplicación indicado en ellos.

Los métodos normalizados ya han sido validados por lo que, como se menciona en el apartado anterior, es suficiente con que cada laboratorio verifique que es capaz de aplicarlos alcanzando las características de funcionamiento indicadas en la validación del método para sus usos establecidos.

Existen diferentes técnicas para la validación de un método. En la NOTA 2 del apartado 7.2.2.1 de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 se nombran las siguientes técnicas, siendo necesario utilizar una o una combinación de varias de ellas:

- a) Calibración, evaluación del sesgo y precisión utilizando patrones de referencia o materiales de referencia.
- b) Evaluación de la incertidumbre de medición de los resultados.
- c) Evaluación sistemática de los factores que influyen en el resultado.
- d) Robustez del método de ensayo a través de la variación de parámetros controlados.
- e) Comparación de los resultados obtenidos con otros métodos validados
- f) Ejercicios de intercomparación con diferentes laboratorios.

1.3.2.1. Parámetros de la validación

La norma UNE-EN ISO/IEC 17025 en la nota del apartado 7.2.2.3 hace referencia a las características de desempeño que pueden ser definidas para los métodos validados.

Linealidad e intervalo de medición

La linealidad hace referencia a la proporcionalidad entre la concentración de analito y la medida obtenida. La determinación del intervalo lineal se realiza a través de la recta de calibrado teniendo en cuenta el coeficiente de regresión, que expresa la desviación del modelo lineal.

Cuando un método se utiliza para una determinación cuantitativa es necesario definir el intervalo de concentración del analito donde el método puede ser aplicado.

El intervalo de medición es el intervalo de trabajo en el cual el método proporciona resultados con las características requeridas. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica. (Morillas P. et al. 2016)

Sensibilidad

La sensibilidad es la variación de la respuesta del instrumento que corresponde a una variación de la magnitud medida (Morillas P. et al., 2016) . Se dice que un método es sensible cuando una pequeña variación de la concentración determina una gran variación de la respuesta.

Selectividad del método

Se entiende por selectividad la capacidad de un método para determinar un analito en particular de forma que no se vea afectado el resultado por la presencia de otras sustancias.

Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección se define, según el VIM, como valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia. La IUPAC recomienda por defecto los valores de α y β iguales a 0,05.

El límite de cuantificación es la concentración mínima de analito cuantificable por el método de ensayo con un nivel de repetibilidad, precisión y exactitud determinado. La señal producida debe ser lo suficientemente grande como para distinguirse de un blanco.

Veracidad. Sesgo y recuperación

La veracidad de una medida es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados a un valor de referencia. Puesto que realizar un número infinito de mediciones es imposible, se realiza una evaluación práctica de la veracidad mediante la determinación del sesgo.

La determinación del sesgo se basa en la comparación del valor medio de los resultados (\bar{X}) obtenidos por un método con su valor de referencia (X_{ref}). Para que el sesgo esté definido en todo el intervalo de trabajo se debe estudiar para diferentes concentraciones de analito comprendidas dentro dicho intervalo.

El sesgo puede expresarse en términos de error absoluto

$$Error\ absoluto = x - x_{ref} \quad Ec.2$$

o como porcentaje

$$Recuperación\ (\%) = \frac{X}{X_{ref}} \cdot 100 \quad Ec.3$$

$$Sesgo\ (\%) = 100 - Recuperación \quad Ec.4$$

Precisión: repetibilidad y reproducibilidad

La precisión se define como la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objeto, bajo condiciones de repetibilidad o reproducibilidad.

La “precisión de repetibilidad” es aquella que se obtiene cuando se realizan mediciones repetidas con el mismo procedimiento de medida, mismo equipo, mismo analista y lugar en un corto periodo de tiempo. Esta condición de precisión se denomina también, en procesos anidados “precisión intra-serie”.

La “precisión de reproducibilidad” es la que se obtiene bajo condiciones de medida diferentes: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos y laboratorios distintos.

Se habla también de “la precisión intermedia” que es aquella precisión obtenida por la realización de las medidas en un mismo laboratorio, en condiciones similares a las de reproducibilidad. En procesos anidados la precisión intermedia se suele denominar “precisión inter-serie”.

La precisión se puede determinar a través de la desviación típica relativa (RSD):

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{X}} \cdot 100 \quad \text{Ec.5}$$

donde s es la desviación típica del conjunto de mediciones cuyo valor dependerá de si se han establecido condiciones de repetibilidad, reproducibilidad o precisión intermedia.

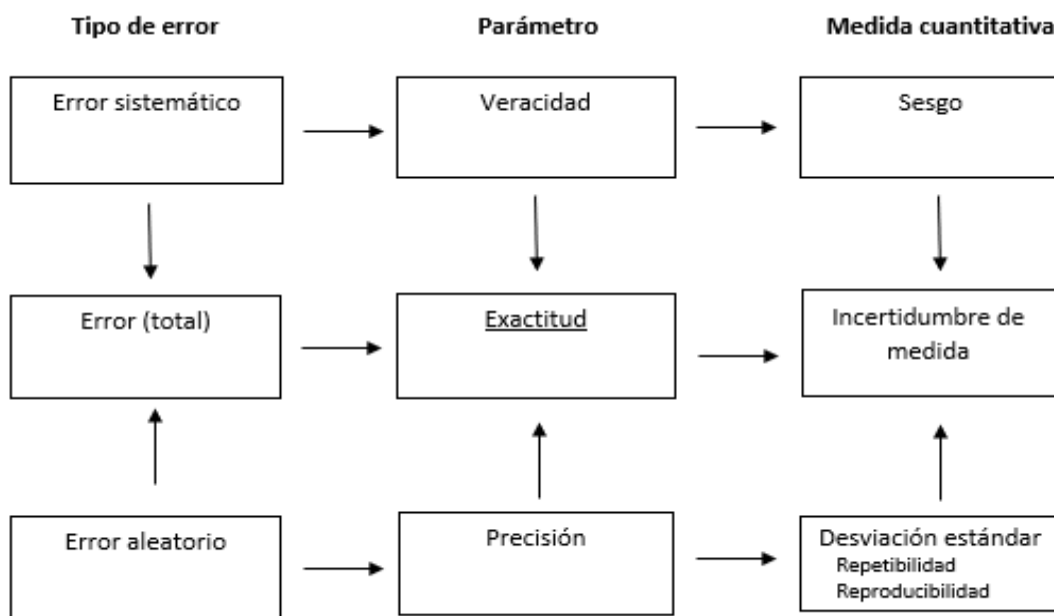
Exactitud

En el VIM se define exactitud como la proximidad entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando. El concepto de “exactitud de medida” no es una magnitud y no se expresa numéricamente.

La exactitud de los resultados evalúa los efectos sistemáticos y aleatorios a través de los parámetros de veracidad y precisión.

A continuación, se muestra la relación entre los conceptos que definen la exactitud (figura 1).

Figura 1. Esquema de las relaciones entre algunos conceptos utilizados para describir la calidad de los resultados de medición (Menditto, et al. 2007)



Incertidumbre de medida

La incertidumbre es un intervalo asociado a un resultado de medida que expresa el conjunto de valores que razonablemente pueden atribuirse a la magnitud que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos conocidos que afectan al resultado. La incertidumbre debe considerar todas las posibles fuentes de error de un proceso de medida.

La evaluación de cada contribución individual a la incertidumbre puede ser de dos tipos:

Tipo A: es una estimación experimental obtenida a partir de distribuciones estadísticas de mediciones y caracterizada por desviaciones típicas.

Tipo B: es una estimación teórica obtenida a partir de certificados de calibración, manuales del instrumento de medición, etc.

La estimación de la incertidumbre de medición se realiza mediante la aplicación de la propagación de errores combinando las incertidumbres individuales. Es lo que se denomina incertidumbre combinada (u). Si la relación entre cada contribución individual es desconocida se suman las incertidumbres individuales cuadráticamente.

La incertidumbre expandida (U) es aquella que proporciona un intervalo en el que se cree que está el valor del mensurando con un nivel de confianza dado, normalmente mayor que el de la incertidumbre combinada. Se calcula multiplicando la incertidumbre combinada por el factor k . Este factor k viene determinado por el nivel de confianza, así, para un nivel de confianza del 95%, el más habitual, el valor de k es dos.

En los métodos de ensayo de medida directa se puede identificar y cuantificar cada fuente de error individual que conlleva el procedimiento analítico. Si la estimación de la incertidumbre del procedimiento analítico se realiza a través del análisis de cada fuente de incertidumbre se habla de enfoque “de abajo a arriba”. Si la estimación de la incertidumbre se realiza a partir de datos de medida obtenidos en condiciones de la mayor variabilidad posible, pero sin conocer exactamente todos los factores que pueden afectar ni cómo lo hacen, se habla de enfoque “de arriba abajo”. Es el caso más habitual en los ensayos químicos.

Según este último enfoque la estimación de la incertidumbre expandida, U , (para un nivel de confianza del 95%) se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$U(x) = 2 \cdot \sqrt{u_{(\Delta sesgo)}^2 + u_{(\delta precisión)}^2} \quad \text{Ec.6}$$

en la que $u_{(\Delta sesgo)}^2$ es la contribución a la incertidumbre debida al sesgo y por lo tanto relacionada con el error sistemático y $u_{(\delta precisión)}^2$ es la contribución a la incertidumbre debida a la imprecisión y por tanto al error aleatorio de la medida.

Robustez

La robustez es una medida de la capacidad de un método analítico para permanecer inalterado por pequeñas variaciones deliberadas de los parámetros del método y proporciona una indicación de la fiabilidad durante su uso normal (Solís Y., 2013).

El estudio de la robustez lleva consigo la identificación de los factores del método que pueden afectar a los resultados. Cuanto más robusto es un método menos se afectarán los resultados frente a una modificación de las condiciones del análisis.

1.3.3. Proceso de validación

La validación de un método debe ser un proceso planificado (figura 2).

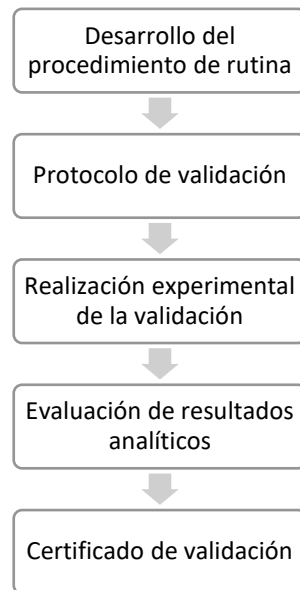
La primera etapa consiste en establecer un procedimiento detallado del modo de ejecución del método que se va a validar, ya que debe ser ejecutado de forma estricta durante la validación. Dependiendo de la forma en la que el laboratorio ejecute el método obtendrá unas características de desempeño u otras. Por ello debe quedar fijado mediante la puesta a punto previa a la validación.

A continuación, se debe planificar el proceso de validación con el mayor detalle posible plasmándolo en un protocolo que permita entender todas y cada una de las decisiones tomadas para poder declarar la validez del método. Un contenido típico de un protocolo de validación es el siguiente:

1. Planteamiento del objetivo de la validación
2. Necesidad analítica. Descripción de la necesidad de validar el método para el objetivo indicado.
3. Preparación previa. Condiciones necesarias del equipo y materiales utilizados. Antecedentes de utilización del método a validar.
4. Requisitos de validación. Requisitos que deben cumplir los parámetros de validación según el uso que se le vaya a dar al método (pueden ser requisitos legales, contractuales, de cliente, etc.).
5. Diseño experimental de la validación.
6. Obtención de los datos experimentales, de acuerdo al diseño anterior.
7. Tratamiento estadístico de datos. Obtención los valores propios del laboratorio para los parámetros de validación
8. Declaración de validez del método. El certificado de validación es un documento que emite él con las características de funcionamiento del método tal y como se ejecuta en

el laboratorio frente a los requisitos de validación y que debe ser firmado por las personas responsables.

Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de validación.



2. Planteamiento del problema

2.1. Nitritos

El nitrito es un ion de origen natural que forma parte del ciclo del nitrógeno que es un nutriente vital tanto para plantas como para animales. En el medio ambiente, existe como óxido nítrico (NO), nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Estos compuestos están siempre presentes en muestras cotidianas, como muestras ambientales, alimentarias y biológicas.

La presencia de nitritos en las aguas de consumo humano puede deberse a una oxidación incompleta del amoníaco o a la reducción del nitrato existente por acción bacteriana. El nitrito en aguas puede ser un indicativo de contaminación de carácter fecal.

El principal mecanismo de toxicidad de los nitritos es la oxidación del ion ferroso a ion férrico, lo que puede producir metahemoglobinemia, efectos cardiovasculares y efectos respiratorios (Pacheco, J., Pat Canul, R., Cabrera A., 2002). El nitrito puede reaccionar con las aminas en el cuerpo humano para formar nitrosaminas, con potenciales efectos cancerígenos.

Es, por las razones antes mencionadas, deseable un método analítico simple y sensible para la monitorización y análisis de rutina de nitritos en aguas de consumo humano.

2.2. Aguas de consumo humano

De acuerdo con el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, las aguas de consumo humano son todas aquellas aguas, ya sea en su estado original, ya sea después del tratamiento, utilizadas para beber, cocinar, preparar alimentos, higiene personal y para otros usos domésticos, sea cual fuere su origen e independientemente de que se suministren al consumidor, a través de redes de distribución públicas o privadas, de cisternas, de depósitos públicos o privados.

También se consideran aguas de consumo humano las utilizadas en la industria alimentaria para fabricación, tratamiento, conservación o comercialización de productos o sustancias destinadas al consumo humano, así como también las destinadas a la limpieza que puedan estar en contacto con los alimentos.

2.3. Marco legal

El Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero establece los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

Concretamente un agua cumple con los criterios sanitarios para considerarse de consumo humano cuando no contiene ningún tipo de microorganismo, parásito o sustancia en una cantidad o concentración que suponga un riesgo para la salud humana cumpliendo con los requisitos especificados en las partes A y B del Anexo I. Establece además los criterios sanitarios y el control que deben tener las instalaciones suministradoras de agua desde su captación hasta el consumidor, para garantizar la salubridad, calidad y limpieza de ésta con el fin de que las personas no sufran los efectos adversos derivados de cualquier tipo de contaminación.

En el Anexo I B del RD 140/2003 se indican los valores paramétricos requeridos para el agua de consumo humano referente al nitrito (tabla 1).

Tabla 1. Parámetros químicos Real Decreto 140/2003 Anexo I

Parámetro	Valor paramétrico (mg de NO₂⁻/l)
Nitritos en Red de distribución	0,5
Nitritos en la salida de la ETAP*	0,1

*Estación de tratamiento de agua potable

El Real Decreto dispone que los valores referidos en la tabla 1 serán el resultado de un método de análisis que permita medir concentraciones con un límite de cuantificación igual o inferior al 30%. Así mismo se establece que la incertidumbre de medida permitida es un 20% del valor paramétrico mientras que los resultados característicos mínimos respecto a sesgo, precisión y límite de detección son de un 10% respecto al valor paramétrico.

En el artículo 16 del Real Decreto se establece que todo laboratorio público o privado que realice determinaciones para los análisis de todo tipo comprendidos en el autocontrol, vigilancia sanitaria o grifo del consumidor, deberá implantar un sistema de calidad y validarlo ante una unidad externa de control de calidad, que realizará periódicamente una auditoria.

2.4. Planteamiento del problema analítico

En este trabajo se busca diseñar y validar un método de ensayo según las directrices de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017. El método de ensayo propuesto es un método colorimétrico para la determinación de nitritos en aguas.

El método que se quiere validar es el Spectroquant® Test en cubetas Nitritos, un kit comercial de laboratorios Merck. El test se fundamenta en una técnica colorimétrica, basada en la medida de la absorción de radiación en la zona visible del espectro electromagnético por sustancias coloreadas. Los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico en medio ácido una sal de diazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina generando un colorante azoico violeta rojizo. La concentración de nitrito es directamente proporcional a la concentración de este colorante.

El método de ensayo está desarrollado para la determinación de nitritos en aguas subterráneas, potables, superficiales de mar y residuales, así como para alimentos y suelos tras una preparación adecuada de la muestra (MERCK, 2019). Sin embargo, sólo se desea validar el método para la matriz aguas de consumo.

3. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo fin de máster es la validación de un método analítico, según la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017, para la determinación de nitritos en aguas de consumo de acuerdo con los requisitos establecidos en Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero.

Para conseguir este objetivo general se plantean los siguientes objetivos parciales:

- Elaboración de un procedimiento de rutina del ensayo o instrucción técnica incluyendo los registros, hojas de cálculo e informe de ensayo.
- Elaboración de un procedimiento de validación.
- Tratamiento estadístico de los resultados obtenidos por el laboratorio agroalimentario aplicando el procedimiento de validación diseñado.
- Evaluación de los resultados obtenidos y emisión de la declaración de validez o certificado de validación del método.

Además de estos objetivos experimentales, cabe añadir los siguientes objetivos académicos:

- Conocer y manejar con soltura la norma de calidad por la que se rigen los laboratorios de análisis.
- Conocer algunos ensayos que se utilizan actualmente en laboratorios agroalimentarios.
- Aproximarse al entorno laboral enfrentándose a una tarea habitual en el ámbito de la profesión en la que se enmarca el máster utilizando datos reales.

4. Desarrollo experimental

El trabajo experimental se desarrolló conforme al diagrama de flujo del proceso de validación (figura 2) por lo que se ha estructurado de forma que cada uno de los apartados siguientes corresponda con las etapas recogidas en dicho diagrama.

4.1. Procedimiento de rutina e informe de ensayo

Es necesario comenzar por establecer y documentar el procedimiento de rutina utilizado en el laboratorio. El procedimiento de rutina es el protocolo normalizado de trabajo que se deberá seguir siempre que se realice el análisis. En él se detalla todo lo necesario para la correcta ejecución de un ensayo, fundamento del método, materiales y equipos necesarios, descripción paso a paso de cada etapa del análisis, cálculos y registro de datos, control de calidad, entre otros.

En un laboratorio es necesario que el material y el equipo utilizado para el análisis esté verificado y calibrado, por lo que se ha desarrollado además un registro para la verificación del espectrofotómetro y para las pipetas que se utilizarán en el procedimiento de rutina. La norma UNE-EN-ISO 8655 de los aparatos volumétricos accionados mediante pistón en su Parte 2 (UNE-EN ISO 8655-2) describe los requisitos que debe cumplir las pipetas tipo pistón y en la Parte 6 (UNE-EN ISO 8655-6) de la norma se detalla el procedimiento necesario para llevar a cabo la verificación de las pipetas. Siguiendo las especificaciones de esta norma se realizó la hoja de cálculo incluida en el procedimiento de rutina (figura 4 del procedimiento de rutina).

El procedimiento de rutina se elaboró siguiendo los requisitos que establece la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 y se tuvieron en cuenta el manual de funcionamiento del equipo y del kit utilizado, así como la norma UNE-EN ISO5667-3:2018 sobre la conservación y manipulación de las muestras de agua.

El procedimiento de rutina elaborado se muestra en los apartados siguientes. Se incluye tal y como aparecería en la documentación del laboratorio, es decir, como texto independiente y por

tanto, la numeración de tablas y figuras no sigue la correlación que correspondería teniendo en cuenta la introducción de este trabajo.

PROCEDIMIENTO DE RUTINA DEL LABORATORIO. TEST EN CUBETAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS.

1. Objetivo

Describir la metodología establecida en el laboratorio XXX para la determinación de la concentración de nitritos en aguas, mediante un método colorimétrico.

2. Alcance

El método se aplica a aguas de consumo

El intervalo de medida validado es: 0,03 - 100 mg de NO_2^-/l .

3. Bibliografía

Test en cubetas Nitritos Spectroquant ref. 1.14547.0001. Revisión agosto 2019.

Manual de funcionamiento Spectroquant® Test en cubetas Nitritos.

Norma UNE-EN ISO/IEC 1025:2017.

4. Vocabulario/Definiciones

No se aplican definiciones en este procedimiento.

5. Responsabilidades

El análisis sólo debe ser realizado por analistas cualificados para ello. Es responsabilidad de los analistas cumplir con los requisitos establecidos en este procedimiento, sin hacer ningún cambio que no esté debidamente documentado y autorizado.

La revisión de los resultados y la firma de los informes son realizados por el responsable del laboratorio.

6. Fundamento del método de ensayo

Los iones nitrito forman con el ácido sulfanílico en medio ácido una sal de diazonio que reacciona con el diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina generando un colorante azoico violeta rojizo. La concentración de nitrito es directamente proporcional a la concentración de este colorante. Dicho colorante se determina fotométricamente a una longitud de onda de 525 nm. Intervalo de linealidad 0,03 – 2,10 mg de NO_2^-/l .

El procedimiento es análogo a EPA 354.1, APHA 4500-NO₂- B, DIN EN 26 777 y ISO 6777.

7. Equipos, materiales y reactivos

Equipos y material:

- Espectrofotómetro Merck Prove 100 con verificación en vigor.
 - Procedimiento de verificación: Una vez al mes se realiza una comprobación del espectrofotómetro. Se comprueba la fecha de caducidad de los patrones de control (Spectroquant® PhotoCheck) y se introducen en el espectrofotómetro,

las cubetas serán identificadas mediante el código de barras. Las absorbancias medidas deben estar comprendidas en el intervalo delimitado por (abs esperada \pm incertidumbre) indicada en el certificado del lote de los patrones utilizados. Se deberán registrar los resultados en la hoja VERIFICACIÓN ESPECTROFOTÓMETRO (figura 3 del Anexo).

- Test en cubetas Nitritos Spectroquant ref. 1.14547.0001
- MQuant® Tiras indicadoras universales pH 0 - 14, art. 109535
- Nitritos - solución patrón CRM, 0,200 mg/l de NO₂-N (0,657 mg de NO₂⁻/l), art. 125041
- Nitrito Solución Patrón trazable a SRM de NIST NaNO₂ en H₂O 1000 mg de NO₂⁻/l Certipur®
- Ácido sulfúrico 0,5 mol/l
- Pipeta 5,0 ml Clase A o AS
- Matraces aforados 100 ml Clase A o AS
- Agua destilada Milli-Q
- Membranas de filtración de tamaño de poro 0.45µm
- Jeringa para filtración
- Agitador Vórtex
- Cronómetro con verificación en vigor.

Preparación de reactivos:

Patrones de control:

- *Nitritos - solución patrón 0,03 mg NO₂⁻/l.*

Tomar 5 ml de solución patrón CRM 0,657 mg de NO₂⁻/l (0,200 mg/l NO₂-N) con pipeta volumétrica Clase A y completar a volumen en un matraz aforado de 100 ml con agua de tipo II o superior.

- *Nitritos - solución patrón 100 mg de NO₂⁻/l.*

Tomar 10 ml de solución trazable 1000 mg de NO₂⁻/l con pipeta volumétrica Clase A y completar a volumen en un matraz aforado de 100 ml con agua de tipo II o superior.

- *Nitritos- solución patrón 0,657 mg de NO₂⁻/l*

Este patrón no requiere preparación, se utilizará directamente la solución patrón CRM, 0,200 mg de NO₂-N/l (0,657 mg de NO₂⁻/l)

8. Procedimiento

Recepción de muestras y conservación

1. Las muestras deberán llegar al laboratorio en recipientes de plástico o vidrio limpios, sin roturas y sin conservantes, con un volumen mínimo de 40 ml y con la etiqueta con la fecha y hora de la toma. En el momento de la recepción se debe registrar la temperatura de las muestras que deberá estar a (5 \pm 3) °C.
2. El análisis de nitritos debe realizarse de inmediato. En casos excepcionales, mantener la muestra a (3 \pm 2) °C por un tiempo máximo de 24 horas.

En caso de que el método de conservación de la muestra o el tiempo transcurrido desde la toma hasta el inicio del análisis haya sido superado, se deberá mencionar en el informe de ensayo esta circunstancia indicando que puede afectar a la validez de los resultados.

Interferencias

Se ha comprobado de forma individual en disoluciones con 0,5 y con 0 mg de NO₂-N/l que las sustancias extrañas, hasta las concentraciones indicadas en la tabla no interfieren en la determinación. No se han controlado efectos acumulativos; sin embargo, éstos no pueden ser excluidos (tabla 1).

Tabla 1. Tabla de interferencias. Instrucciones Spectroquant® Test en cubetas Nitritos 1.14547.0001 agosto 2019.

Concentración de sustancias extrañas en mg/l o en %							
Ag⁺	1	Cu ²⁺	100	Pb ²⁺	1000	EDTA	1000
Ca ²⁺	1000	F ⁻	100	PO ₄ ³⁻	1000	Reductores	
Cd ²⁺	1000	Fe³⁺	1	S²⁻	10	(ácido ascórbico,	
CN ⁻	1000	Hg ²⁺	100	SiO ₃ ²⁻	1000	sulfitos)	10
CO ₃ ²⁻	100	Mg ²⁺	1000	Sn²⁺	10	NaCl	20 %
Cr ³⁺	100	Mn ²⁺	1000	Zn ²⁺	1000	NaNO ₃	20 %
Cr₂O₇²⁻	1	NH ₄ ⁺	1000			Na ₂ SO ₄	15 %

Método operativo

1. Si las muestras han sido refrigeradas, atemperarlas a temperatura ambiente (entre 15 y 25 °C)
2. El valor de pH de la muestra debe encontrarse en el intervalo de 2-10, en caso necesario ajustarlo añadiendo ácido sulfúrico 0,5 mol/l
3. Las muestras turbias se filtran a través de una membrana de filtración.
 - Se extrae con la jeringa el líquido que vaya a filtrarse.
 - Se enrosca la jeringa a la membrana de filtración.
 - Se sostiene la jeringa hacia arriba y se aprieta el pistón lentamente hasta que el filtro esté completamente humedecido y carente de burbujas de aire.
 - Se filtra el contenido de la jeringa en el recipiente de vidrio previsto.
4. Pipetear 5,0 ml de muestra filtrada, si ha sido necesario, en la cubeta de reacción. Cerrar la cubeta y agitarla vigorosamente hasta que el reactivo se haya disuelto completamente. También se puede utilizar un vórtex.
5. El valor de pH de la disolución de reacción debe encontrarse en el intervalo de 2-2,5. Medir el pH con MQuant® Tiras indicadoras universales pH 0 - 14. En caso de ser necesario, ajustar el pH con ácido sulfúrico 0,5 mol/l.
6. Dejar reposar 10 minutos (tiempo de reacción). La medida se realizará con un cronómetro verificado.

7. El color de la solución de medición permanece estable como mínimo 60 minutos después de transcurrido el tiempo de reacción antes indicado.
8. Para el encendido del equipo se pulsa el botón de encendido/apagado ON/OFF. El espectrofotómetro emite una señal audible y se inicia durante unos dos minutos. A continuación, la pantalla muestra un diálogo de autocomprobación que se inicia en el botón empezar. Una vez finalizada la autocomprobación aparece el menú principal en la pantalla.
9. El ajuste a cero siempre ha de realizarse antes del comienzo de una serie de mediciones y es requerido automáticamente por el instrumento. Pulsar en el botón de ajuste a cero. Se coloca la cubeta del blanco incluida en el kit y se inicia automáticamente el ajuste. Si el ajuste a cero es correcto, aparece una marca de verificación.
10. Se introduce la muestra en el espectrofotómetro y este lee el código QR seleccionando automáticamente el programa específico de nitritos y con él la longitud de onda. A continuación, se debe anotar el resultado que se muestra en la pantalla del espectrofotómetro en el registro de DATOS PRIMARIOS NITRITOS (figura 1 del Anexo).

Para cada tanda (20-25 muestras) se debe realizar un análisis por duplicado de una de las muestras, así como también el análisis de un blanco y un patrón de control (alternando entre los 3 patrones disponibles), que deberán quedar registrados en la hoja de control NITRITOS. REGISTRO DE BLANCOS Y PATRONES (figura 2 del Anexo).
11. Si la concentración de nitrito en la muestra es superior al intervalo lineal del equipo (2,30 mg de NO₂⁻/l) la pantalla mostrará "HI". En este caso se diluye la muestra y se repiten los pasos 4 a 10 hasta que el resultado esté comprendido en el intervalo lineal, preferentemente en su zona media.

9. Gestión de residuos

Los residuos generados durante el análisis, las cubetas de reacción y los botes de los reactivos finalizados se reenvían de nuevo al proveedor para su correcta gestión.

10. Anotaciones y cálculos

Tanto las observaciones pertinentes como los resultados se registran en la hoja de toma de DATOS PRIMARIOS NITRITOS.

11. Expresión del resultado

El resultado se lee directamente en el espectrofotómetro bien en mg de NO₂⁻/l o bien mg de NO₂-N/l.

Cuando se haya realizado una dilución el resultado analítico leído en el equipo debe ser multiplicado por el factor de dilución (D_F).

$$D_F = \frac{\text{Volumen final (volumen total)}}{\text{Volumen inicial (volumen de la muestra)}} \quad \text{Ec. 1}$$

Los resultados se expresarán hasta la cifra significativa del mismo nivel que la segunda cifra significativa de la incertidumbre. Cuando el valor medido sea menor de 0,03 mg de NO₂⁻/l se debe expresar el resultado como < 0,03 (L.C = 0,03).

12. Controles de calidad

Certificados de calidad para cada kit de prueba de los lotes según ISO 8466-1 y DIN 38402 A51

Control de calidad interno y criterio de aceptación o rechazo

Tabla 2. Controles de calidad internos.

Tipo de control	Material	Criterio de aceptación	Frecuencia
Blanco	Agua Tipo II	$\leq 0,01$ mg/l	1 por cada tanda
Sesgo	Patrones control 0,03 mg de NO_2^- /l 0,657 mg de NO_2^- /l 100 mg de NO_2^- /l	Sesgo $\leq 10\%$	1 por cada tanda ⁽¹⁾
Precisión	Muestra	RSD $\leq 10\%$	1 duplicado por cada tanda

Nota ⁽¹⁾: se irán alternando los patrones control de diferentes concentraciones.

Control de calidad externo

Una vez al año se participa en programas de evaluación externa (ejercicios de aptitud) organizado por proveedores acreditados para ello.

Los resultados del laboratorio serán satisfactorios cuando el valor Z-Score se encuentre entre -2,00 y +2,00. El valor del resultado será cuestionable cuando $2 < |Z| < 3$. Se concluirá que el resultado del laboratorio no es satisfactorio cuando $|Z| < 3$.

Cuando el laboratorio presenta resultados cuestionables o insatisfactorios se deberá identificar y documentar el problema y aplicar las medidas correctoras pertinentes.

13. Registros

En la hoja de toma de DATOS PRIMARIOS NITRITOS debe quedar registrado todos los datos y observaciones relevantes del análisis, incluyendo los resultados y debe estar firmado por el personal que realiza el análisis, responsable de laboratorio que lo revisa y el jefe del laboratorio que lo aprueba (figura 1 del Anexo).

Los resultados del análisis de blancos y patrones se registran en la hoja NITRITOS. REGISTRO DE BLANCOS Y PATRONES (figura 2 del anexo).

Cuando se realice la verificación del espectrofotómetro, los resultados deben registrarse en VERIFICACIÓN ESPECTROFOTÓMETRO (figura 3 del anexo).

Para la verificación del material volumétrico cuando sea necesario, se utilizará la hoja de control VERIFICACIÓN DEL MATERIAL VOLUMÉTRICO (figura 4 del anexo) y las tablas 1 y 2 del anexo.

14. Anexo

En las figuras 1 a 4 se anexan los registros necesarios para la ejecución de este procedimiento:

Figura 3. Registro de los datos de verificación del espectrofotómetro

Logo Laboratorio		VERIFICACIÓN ESPECTROFOTÓMETRO				
Equipo: Spectroquant Prove						
Patrones: Spectroquant® PhotoCheck						
Lote: HC691375						
Fecha / hora	Analista	Patrón	Valor de Referencia (Absorbancia)	Valor Obtenido (Absorbancia)	Tolerancia (±)	Conformidad
		525/1	0.200		0.020	
		525/2	0.495		0.030	
		525/3	0.998		0.040	
		525/4	1.490		0.050	
		525/1	0.200		0.020	
		525/2	0.495		0.030	
		525/3	0.998		0.040	
		525/4	1.490		0.050	
		525/1	0.200		0.020	
		525/2	0.495		0.030	
		525/3	0.998		0.040	
		525/4	1.490		0.050	
		525/1	0.200		0.020	
		525/2	0.495		0.030	
		525/3	0.998		0.040	
		525/4	1.490		0.050	
		525/1	0.200		0.020	
		525/2	0.495		0.030	
		525/3	0.998		0.040	
		525/4	1.490		0.050	

Figura 4. Hoja de cálculo para la verificación del material volumétrico.

Logo Laboratorio		Verificación Material Volumétrico	
Pipeta de pistón Código: <input type="text"/>		Fecha verificación: <input type="text"/>	Volumen de ensayo (μl): <input type="text"/>
Volumen nominal (μl): <input type="text"/>		Analista: <input type="text"/>	
Condiciones ambientales del ensayo			
Temperatura: <input type="text"/>		Presión (kPa): <input type="text"/>	Humedad Relativa (%): <input type="text"/>
	T ^o Ambiente	T ^o Líquido	
T ^o Inicial (°C)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
T ^o Final (°C)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
T ^o Media (°C)	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Medidas			
	m _i (mg)	V _i (μl)	Factor de corrección Z (Tabla A.1) <input type="text"/>
1	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
2	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
3	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
4	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
5	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
6	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
7	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
8	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
9	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
10	<input type="text"/>	<input type="text"/>	
Volumen Medio (μl)		<input type="text"/>	
Errores de Medición			
Error sistemático (e _s)		Error aleatorio (S _r)	
e _s (μl)	<input type="text"/>	s _r (μl)	<input type="text"/>
e _s comparable (%)	<input type="text"/>	CV (%)	<input type="text"/>
e _s máximo permisible (%)	<input type="text"/>	S _r Máximo permisible (%)	<input type="text"/>
Evaluación de conformidad	<input type="text"/>	Evaluación de conformidad	<input type="text"/>
Incertidumbre de Medición		Conformidad	
u= <input type="text"/>			

Tabla 1. Factores de correlación Z para la verificación del material volumétrico. UNE-EN ISO 8655-6

Tabla A.1
Factores de corrección Z para agua destilada como una función de la temperatura de ensayo y la presión del aire

Los valores Z en microlitros por miligramo

Temperatura °C	Presión del aire kPa						
	80	85	90	95	100	101,3	105
15,0	1,001 7	1,001 8	1,001 9	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 0
15,5	1,001 8	1,001 9	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 0	1,002 1
16,0	1,001 9	1,002 0	1,002 0	1,002 1	1,002 1	1,002 1	1,002 2
16,5	1,002 0	1,002 0	1,002 1	1,002 1	1,002 2	1,002 2	1,002 2
17,0	1,002 1	1,002 1	1,002 2	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 3
17,5	1,002 2	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 4	1,002 4	1,002 4
18,0	1,002 2	1,002 3	1,002 3	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 5
18,5	1,002 3	1,002 4	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 6	1,002 6
19,0	1,002 4	1,002 5	1,002 5	1,002 6	1,002 6	1,002 7	1,002 7
19,5	1,002 5	1,002 6	1,002 6	1,002 7	1,002 7	1,002 8	1,002 8
20,0	1,002 6	1,002 7	1,002 7	1,002 8	1,002 8	1,002 9	1,002 9
20,5	1,002 7	1,002 8	1,002 8	1,002 9	1,002 9	1,003 0	1,003 0
21,0	1,002 8	1,002 9	1,002 9	1,003 0	1,003 1	1,003 1	1,003 1
21,5	1,003 0	1,003 0	1,003 1	1,003 1	1,003 2	1,003 2	1,003 2
22,0	1,003 1	1,003 1	1,003 2	1,003 2	1,003 3	1,003 3	1,003 3
22,5	1,003 2	1,003 2	1,003 3	1,003 3	1,003 4	1,003 4	1,003 4
23,0	1,003 3	1,003 3	1,003 4	1,003 4	1,003 5	1,003 5	1,003 6
23,5	1,003 4	1,003 5	1,003 5	1,003 6	1,003 6	1,003 6	1,003 7
24,0	1,003 5	1,003 6	1,003 6	1,003 7	1,003 7	1,003 8	1,003 8
24,5	1,003 7	1,003 7	1,003 8	1,003 8	1,003 9	1,003 9	1,003 9
25,0	1,003 8	1,003 8	1,003 9	1,003 9	1,004 0	1,004 0	1,004 0
25,5	1,003 9	1,004 0	1,004 0	1,004 1	1,004 1	1,004 1	1,004 2
26,0	1,004 0	1,004 1	1,004 1	1,004 2	1,004 2	1,004 3	1,004 3
26,5	1,004 2	1,004 2	1,004 3	1,004 3	1,004 4	1,004 4	1,004 4
27,0	1,004 3	1,004 4	1,004 4	1,004 5	1,004 5	1,004 5	1,004 6
27,5	1,004 5	1,004 5	1,004 6	1,004 6	1,004 7	1,004 7	1,004 7
28,0	1,004 6	1,004 6	1,004 7	1,004 7	1,004 8	1,004 8	1,004 8
28,5	1,004 7	1,004 8	1,004 8	1,004 9	1,005 0	1,005 0	1,005 0
29,0	1,004 9	1,005 0	1,005 0	1,005 1	1,005 1	1,005 1	1,005 1
29,5	1,005 0	1,005 1	1,005 1	1,005 2	1,005 2	1,005 2	1,005 3
30,0	1,005 2	1,005 2	1,005 3	1,005 3	1,005 4	1,005 4	1,005 4

Tabla 2. Errores máximos permitidos para pipetas de pistón. UNE-EN ISO 8655-2 (verificación de material volumétrico)

Errores máximos permisibles para los tipos A y D1

Volumen nominal µl	Error sistemático máximo permisible		Error aleatorio máximo permisible	
	± %	± µl ^a	± % ^b	± µl ^c
1	5,0	0,05	5,0	0,05
2	4,0	0,08	2,0	0,04
5	2,5	0,125	1,5	0,075
10	1,2	0,12	0,8	0,08
20	1,0	0,2	0,5	0,1
50	1,0	0,5	0,4	0,2
100	0,8	0,8	0,3 ^d	0,3 ^d
200	0,8	1,6	0,3 ^d	0,6 ^d
500	0,8	4,0	0,3	1,5
1 000	0,8	8,0	0,3	3,0
2 000	0,8	16	0,3	6,0
5 000	0,8	40	0,3	15,0
10 000	0,6	60	0,3	30,0

^a Expresado como la desviación de la media de una medición multiplicada por diez del volumen nominal o seleccionado (véase la Norma ISO 8655-6:2002, apartado 8.4).

^b Expresado como el coeficiente de variación de una medición multiplicada por diez (véase la Norma ISO 8655-6:2002, apartado 8.5).

^c Expresado como la desviación típica de la repetibilidad de una medición multiplicada por diez (véase la Norma ISO 8655-6:2002, apartado 8.5).

^d Para pipetas tipo pistón de tipo D1 los errores máximos permisibles pueden ser ± 0,4%.

INFORME DE ENSAYO

Los datos obtenidos tras el análisis de las muestras se registran además en el Informe de ensayo (figura 3) que es el documento utilizado para comunicar los resultados al cliente.

Figura 3. Informe de resultados para presentar al cliente.

Logo del laboratorio	Página 1 de 1												
<u>INFORME DE ENSAYO</u>													
Laboratorio XXX	Nº de informe:												
Dirección													
<table border="1"><tr><td>Cliente:</td><td>Nº de muestra:</td></tr><tr><td>Dirección:</td><td>Fecha inicio análisis:</td></tr><tr><td>Teléfono:</td><td>Fecha fin análisis:</td></tr><tr><td>Descripción de la muestra:</td><td></td></tr><tr><td>Fecha de toma de muestra:</td><td>Fecha de recepción:</td></tr><tr><td>Método de toma de muestra:</td><td>Condiciones de recepción:</td></tr></table>		Cliente:	Nº de muestra:	Dirección:	Fecha inicio análisis:	Teléfono:	Fecha fin análisis:	Descripción de la muestra:		Fecha de toma de muestra:	Fecha de recepción:	Método de toma de muestra:	Condiciones de recepción:
Cliente:	Nº de muestra:												
Dirección:	Fecha inicio análisis:												
Teléfono:	Fecha fin análisis:												
Descripción de la muestra:													
Fecha de toma de muestra:	Fecha de recepción:												
Método de toma de muestra:	Condiciones de recepción:												
<p>La muestra ha sido tomada por el cliente, por lo que el laboratorio no se responsabiliza de la misma. Están a disposición del cliente los datos de incertidumbre asociada al resultado cuando éste lo requiera. Los resultados corresponden únicamente a las muestras entregadas por el cliente tal y como se recibió.</p>													
Parámetro	Resultado	Método											
NITRITOS	mg NO ₂ /l	Spectroquant® Test en cubetas. Método colorimétrico											
Observaciones: _____													
Autoriza el informe: _____		Fecha de emisión del informe: _____											

4.2. Protocolo de validación

Una vez definido el procedimiento de rutina y el informe de ensayo, se estableció un protocolo para la validación del método.

Se diseñó un ensayo anidado para obtener la información necesaria para evaluar las características del método. Este ensayo permite conocer la máxima información requerida para la validación realizando el menor número de medidas posibles, lo que se traduce mayor efectividad con menor gasto económico.

Los resultados de un ensayo anidado permiten evaluar la repetibilidad y reproducibilidad relacionadas con factores que previsiblemente pueden afectar a los resultados, tales como la realización de los análisis en distintos días o el cambio de analista. El estudio de la repetibilidad se lleva a cabo realizando medidas por duplicado mientras que la reproducibilidad se estudiaría tomando medidas en diferentes días y diferentes condiciones. Para la elección del esquema de validación, además, se deben tener en cuenta otros factores como el equipamiento disponible, el personal, coste y tiempo. Con este objetivo se planteó un ensayo en el que se realizaron 20 medidas para cada muestra patrón de concentración conocida de analito. Estas 20 medidas se agruparon en 10 series analizadas en condiciones diferentes (diferentes días, distinto analista, etc.) y de cada serie se tomaron dos medidas en condiciones de repetibilidad (mismo día, analista, lote de reactivos, etc.).

Los requisitos para la validación del método se han establecido en función del Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero, donde se recogen los parámetros característicos necesarios que debe cumplir el método para el análisis de aguas de consumo (ver apartado 2.3. Marco legal).

Las muestras control se establecieron en concentraciones de 0,03, 2,1 y 100 mg de NO_2^-/l , cubriendo el intervalo de concentraciones más habituales de nitritos presentes en aguas de consumo y el límite de cuantificación establecido en el Real Decreto 140/2003. Estas tres concentraciones representan los niveles de validación del método y se prepararon a partir de una solución patrón trazable de nitrito. Esta solución es el material de referencia que presenta la misma matriz que las aguas de consumo.

El protocolo de validación resultante se muestra en los apartados siguientes, y de nuevo la numeración de tablas, figuras y ecuaciones no se corresponde con el orden general de este trabajo, sino que se muestra tal y como aparecería en el documento del laboratorio.

PROTOCOLO DE VALIDACIÓN. TEST EN CUBETAS PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRITOS EN AGUAS.

1. Objetivo

Validar el método Spectroquant Prove Test en cubetas para la determinación de nitritos en agua de consumo de acuerdo con el RD 140/2003 de 7 de febrero.

2. Necesidad analítica

Satisfacer la demanda analítica de nuestros clientes de la determinación de nitritos en agua de consumo de acuerdo con los requisitos definidos en el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero.

En igual medida, la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 establece la necesidad de validar los métodos analíticos por parte de los laboratorios de ensayo acreditados.

3. Preparación previa

Los materiales y equipos utilizados en esta validación han sido utilizados y verificados con anterioridad por el laboratorio, por lo que se consideran puestos a punto.

El fabricante del kit comercial Spectroquant Prove Test en cubetas para la determinación de nitritos en aguas declara que éste es conforme a normas internacionales de aplicación en aguas de consumo. El kit ha sido utilizado en el laboratorio para este fin sin ser validado hasta el momento su uso específico para el cumplimiento de los requisitos establecidos en el R.D. 140/2003. Estudios preliminares permitieron comprobar que el equipo muestra resultados adecuados dentro de las especificaciones propias del fabricante por lo que se considera puesto a punto.

Todo el material volumétrico utilizado, como matraces aforados y pipetas son de clase A o AS. Así mismo las pipetas accionadas mediante pistón que serán utilizadas en el ensayo, han sido verificadas siguiendo la Norma ISO 8655 como mínimo una vez al mes y han sido calibradas una vez al año de forma interna.

Otros equipos como cronómetros también han sido verificados previamente con periodicidad anual.

4. Requisitos de validación

El Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano, recoge en el Anexo I que los valores paramétricos para los nitritos son 0,5 mg/l y 0,1 mg/l para la red de distribución y para la salida de la ETAP respectivamente.

El método de análisis utilizado deberá ser capaz de medir concentraciones iguales al valor paramétrico con un límite de cuantificación igual o inferior al 30% del valor paramétrico. Por otro lado, la experiencia del laboratorio indica que en las muestras habituales del laboratorio raramente se encuentran concentraciones de nitritos superiores a 100 mg/l. Por todo lo anterior, se estableció como intervalo de validación el comprendido entre 0,03 y 100 mg de NO_2^- /l.

En el cuadro 2 del Anexo IV del Real Decreto 140/2003 quedan definidos los parámetros característicos que debe cumplir el ensayo y se presentan en la siguiente tabla:

Tabla 1. Parámetros característicos del método de análisis establecidos por el RD 140/2003 para la determinación de nitritos en agua.

Parámetros	Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)
Sesgo	10
Precisión	10
Límite de detección	10
Límite de cuantificación	30
Incertidumbre de medida	20

5. Diseño experimental de la validación

Niveles de validación:

Dada la extensión del intervalo de validación se realizará ésta en tres niveles de concentración de nitritos que abarquen dicho intervalo.

El intervalo de validación establecido está comprendido entre 0,03 y 100 mg de NO_2^-/l , por lo que se establecen tres niveles de validación con diferentes concentraciones de nitritos, preparados a partir de un estándar:

- Nivel superior. 100 mg de NO_2^-/l
- Nivel intermedio. 2,1 mg de NO_2^-/l
- Nivel inferior. 0,03 mg de NO_2^-/l

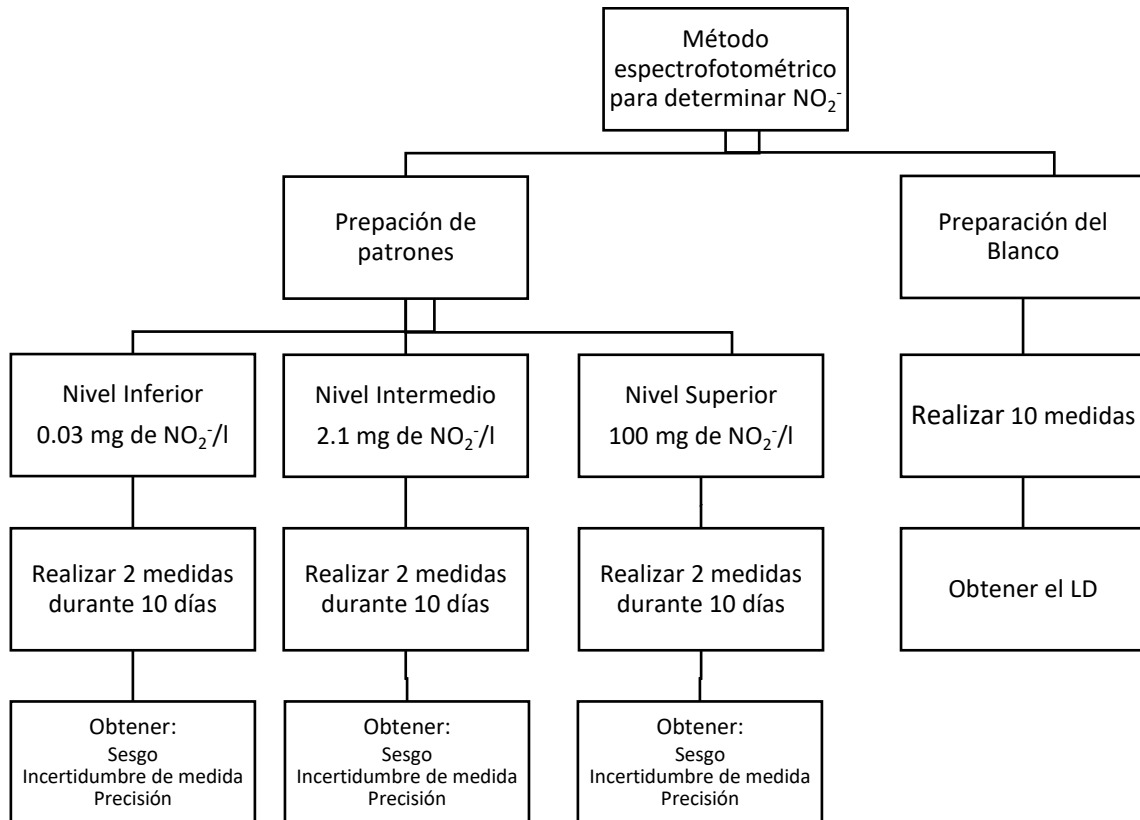
Esquema experimental de validación:

Con el fin de obtener los valores de los parámetros característicos del método cuando se ejecuta en este laboratorio se realizarán 20 medidas repetidas por nivel agrupadas en 10 series, analizada cada una en un día diferente (condiciones de reproducibilidad, en este caso, técnicos y patrones de verificación diferentes). Cada serie consta de 2 medidas repetidas en condiciones de repetibilidad (mismo técnico, equipo, lote de reactivos, etc.).

El análisis de las muestras se realizará según el método operativo descrito en el procedimiento de rutina del laboratorio.

Con el fin de obtener los valores de los parámetros característicos del método cuando se ejecuta en este laboratorio se establece el siguiente esquema experimental (figura 1):

Figura 1. Proceso de validación del método de determinación de nitritos.



Material de referencia:

- Nitrito Solución Patrón trazable a SRM de NIST NaNO₂ en H₂O 1000 mg de NO₂⁻/l Certipur®

Preparación de muestras:

- Muestra patrón para nivel superior de validación, 100 mg de NO₂⁻/l.

Tomar 10 ml de solución trazable 1000 mg de NO₂⁻/l con pipeta volumétrica Clase A y completar a volumen en un matraz aforado de 100 ml con agua de consumo con certificado de material de control.

- Muestra patrón para nivel intermedio de validación, 2,1 mg de NO₂⁻/l

Tomar 0,21 ml del estándar de 1000 mg de NO₂⁻/l con pipeta de pistón verificada y completar a volumen en matraz aforado de 100 ml con agua de consumo con certificado de material de control.

- Muestra patrón para nivel inferior de validación, 0,03 mg de NO₂⁻/l

Tomar 1 ml del estándar de 1000 mg de NO₂⁻/l con pipeta de pistón verificada y completar a volumen en un matraz aforado de 100 ml (solución intermedia de 10 mg de NO₂⁻/l)

Tomar 0,3 ml de solución intermedia de 10 mg de NO₂⁻/l con pipeta de pistón verificada y completar a volumen en un matraz aforado clase A de 100 ml con agua de consumo con certificado de material de control.

6. Tratamiento estadístico de los datos obtenidos

Los valores de los parámetros característicos del método se calculan de la siguiente manera a partir de los datos experimentales obtenidos en el esquema anterior:

Sesgo

La veracidad de medición es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados a un valor de referencia y se realiza una evaluación práctica de la veracidad mediante la determinación del sesgo.

La determinación del sesgo se basa en la comparación del valor medio de los resultados (\bar{X}) de del método con un valor de referencia (X_{ref}). En este caso \bar{X} corresponde al valor medio de las 10 series y las 2 repeticiones de cada serie.

El sesgo se calcula como:

$$Recuperación (\%) = \frac{\bar{X}}{X_{ref}} \cdot 100 \quad Ec.1$$

$$Sesgo (\%) = 100 - Recuperación \quad Ec.2$$

Precisión

La precisión se define como la proximidad entre las indicaciones o los valores medidos obtenidos en mediciones repetidas de un mismo objetivo bajo condiciones, en este caso, de reproducibilidad intermedia.

La precisión se puede determinar a través de la desviación típica relativa (RSD), que se expresa numéricamente mediante medidas de dispersión como la desviación estándar relativa:

$$RSD (\%) = \frac{S_R}{\bar{X}} \cdot 100 \quad Ec.3$$

La desviación estándar relativa (S_R) se determina a partir de:

$$S_R^2 = S_m^2 + S_r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right) \quad Ec.4$$

S_m^2 es la varianza experimental de las medias de cada serie y S_r^2 la media de las varianzas de cada serie. n es número de repeticiones de cada serie, en este caso 2.

La fórmula correspondiente a la varianza es:

$$S^2 = \frac{\sum(X_i - \bar{X})^2}{n-1} \quad Ec.5$$

Para la varianza de las medias (S_m^2), X_i es la media de cada serie, \bar{X} la media de las medias de cada serie y n el número de series. Para la determinación de la media de las varianzas (S_r^2), X_i son los valores experimentales de la serie y \bar{X} la media cada serie.

Límite de detección

Se define, según el VIM, como valor medido, obtenido mediante un procedimiento de medida dado, con una probabilidad β de declarar erróneamente la ausencia de un constituyente en un material, dada una probabilidad α de declarar erróneamente su presencia. La IUPAC recomienda por defecto los valores de α y β iguales a 0,05.

Para propósitos de validación, de acuerdo con el Real Decreto 140/2003, el límite de detección se establece como el quintuplo de la desviación típica (SD) de una muestra en blanco:

$$LD = 5 \cdot SD \quad \text{Ec.6}$$

obtenida de la media de las 10 lecturas del blanco.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es estrictamente la concentración más baja del analito que se puede cuantificar con un nivel de repetibilidad, precisión y exactitud determinado, y produce una señal lo suficientemente grande como para distinguirse de un blanco.

Cumpliendo con los requisitos del Real Decreto 140/2003, el límite de cuantificación para los métodos de determinación de nitritos en agua debe ser 0,03 mg de NO_2^-/l . El equipo Spectroquant® Prove utilizado en este método presenta el mismo valor de límite de cuantificación según los criterios del fabricante.

Por ello, si el nivel inferior de validación, 0,03 mg de NO_2^-/l , cumple con los requisitos establecidos, el límite de cuantificación podrá ser establecido en dicho valor.

Incertidumbre de medida

La incertidumbre es un intervalo asociado a un resultado de medida que expresa el conjunto de valores que razonablemente pueden atribuirse a la magnitud que se está midiendo. Una estimación de la incertidumbre debe tener en cuenta todos los efectos conocidos que afectan al resultado.

Dado que el diseño experimental escogido evalúa de forma conjunta las contribuciones a la incertidumbre que pueden afectar al resultado, la estimación de la incertidumbre (para un nivel de confianza del 95%) se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$U(x) = 2 \cdot \sqrt{u_{(\Delta sesgo)}^2 + u_{(\delta precisión)}^2} \quad \text{Ec.7}$$

en la que $u_{(\Delta sesgo)}^2$ es la contribución a la incertidumbre debida al sesgo y por lo tanto relacionada con el error sistemático y $u_{(\delta precisión)}^2$ es la contribución a la incertidumbre debida a la imprecisión y por tanto al error aleatorio de la medida.

En el procedimiento de rutina no se realizan repeticiones de las medidas, es decir, no se realizan réplicas de cada muestra, por lo que el cálculo de la incertidumbre de medida corresponde a:

$$U(x) = 2 \cdot \sqrt{(u_{VR})^2 + \frac{s_0^2}{n_0} + \frac{sesgo^2}{3} + S_m^2 + S_r^2 \left(1 - \frac{1}{n}\right)} \quad \text{Ec.8}$$

Donde u_{VR} es la incertidumbre combinada de preparación del patrón. $\frac{s_0^2}{n_0}$ es la incertidumbre del valor medio y su valor dependerá del análisis de las varianzas (ver apartado “análisis de las varianzas” más adelante).

- Incertidumbre combinada de preparación del patrón.

El patrón se ha preparado por dilución simple a partir del material de referencia Nitrito Solución Patrón trazable a SRM de NIST NaNO_2 en H_2O 1000 mg de NO_2^-/l Certipur®. La incertidumbre de un patrón preparado por dilución se puede estimar a partir de las incertidumbres de las magnitudes que intervienen en su obtención, es decir:

$$u_{VR} = \sqrt{C_F^2 \cdot \left[\left(\frac{u_{C_0}}{C_0} \right)^2 + \left(\frac{u_{V_0}}{V_0} \right)^2 + \left(\frac{u_{V_f}}{V_f} \right)^2 \right]} \quad \text{Ec.9}$$

Donde C_F^2 es la concentración final, después de cada dilución. u_{C_0} y C_0 corresponden a la incertidumbre y a la concentración inicial del patrón. V_0 es el volumen de la alícuota tomada del patrón y u_{V_0} la incertidumbre del material volumétrico utilizado para la medida de la alícuota. V_f es el volumen del matraz donde se prepara la dilución patrón y u_{V_f} es la incertidumbre asociada al volumen del matraz.

La incertidumbre de la concentración del patrón se estima a partir de:

$$u_{C_0} = \frac{U}{K} \quad \text{Ec.10}$$

siendo U la incertidumbre expandida del patrón obtenida de su certificado de análisis y $K=2$. En el caso de que el patrón sea una dilución intermedia el valor de u_{C_0} corresponde al valor determinado a partir de la ecuación 9.

Las incertidumbres asociadas al material volumétrico se determinan según:

$$U_V = \frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}} \quad \text{Ec.11}$$

La tolerancia es el error relativo de la medida del volumen del material. Viene especificada según la clase de exactitud del material.

- Análisis de las varianzas.

El valor medio de la muestra de cada nivel medido se puede calcular mediante la media global o mediante las medias de cada serie. Dependiendo del tipo de esquema de validación, estos valores no tienen por qué ser iguales, ni tampoco la estimación del valor de su incertidumbre.

Para determinar cuál es la mejor estimación de la media, se estudia la igualdad de las varianzas “dentro de las series” y “entre las series”, es decir, se estudia si la repetibilidad y la reproducibilidad entre series son significativamente iguales o no. Lo normal es que sean diferentes (mayor la variabilidad entre series) y entonces la mejor estimación de la media es la media de cada serie. Si ambas varianzas son iguales, la mejor estimación de la media es la media global.

Para la determinación de la varianza de la media global, en la ecuación X_i es cada valor experimental, y \bar{X} la media global.

El valor estadístico F representa el cociente de las dos varianzas muestrales.

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad \text{Ec.12}$$

Donde s_1^2 es la varianza experimental de las medias de cada serie (S_m^2) y s_2^2 es la media de las varianzas de cada serie (S_r^2).

Los grados de libertad del numerador corresponden con el número de series menos uno, mientras que los grados de libertad del denominador son el número de repeticiones menos uno por el número de series.

Los valores de F_{tab} se encuentran tabulados en función de los grados de libertad (figura 5 del Anexo)

Si $F_{\text{exp}} < F_{\text{tab}}$ las varianzas son significativamente iguales, por lo que la incertidumbre se estima con la varianza experimental de la media global.

$$\frac{s_0^2}{n_0} = \frac{s_r^2}{n \cdot p} \quad \text{Ec.13}$$

Si $F_{\text{exp}} > F_{\text{tab}}$ las varianzas son significativamente diferentes el valor de incertidumbre se estima a partir de la varianza experimental de las medias de cada serie.

$$\frac{s_0^2}{n_0} = \frac{s_m^2}{p} \quad \text{Ec.14}$$

7. Resultados

Los resultados de la medida de las muestras deben quedar registrados en el documento DATOS DE VALIDACIÓN para cada nivel de validación correspondiente (figura 3 del Anexo).

Los datos obtenidos de la medición del blanco se anotarán en el REGISTRO DE BLANCOS para la determinación del límite de detección (figura 4 del Anexo).

8. Declaración de validez del método

Figura 2. Certificado de validez del ensayo de validación.

Laboratorio XXX																													
Certificado de Validez																													
Declaración de Conformidad para el método:																													
Determinación de nitritos en aguas de consumo mediante Spectroquant Prove Test en cubetas																													
Especificaciones:																													
* UNE-EN ISO/EIC 17025:2017 * Real Decreto 140/2003																													
Intervalo de validación:																													
Desde 0.03 mg de NO ₂ ⁻ /l hasta 100 mg de NO ₂ ⁻ /l																													
Regla de Decisión:																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Parámetros</th> <th style="width: 50%;">Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Sesgo</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Precisión</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Límite de detección</td> <td style="text-align: center;">10</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Límite de cuantificación</td> <td style="text-align: center;">30</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Incertidumbre de medida</td> <td style="text-align: center;">20</td> </tr> </tbody> </table>			Parámetros	Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)	Sesgo	10	Precisión	10	Límite de detección	10	Límite de cuantificación	30	Incertidumbre de medida	20															
Parámetros	Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)																												
Sesgo	10																												
Precisión	10																												
Límite de detección	10																												
Límite de cuantificación	30																												
Incertidumbre de medida	20																												
Resultados:																													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th rowspan="2" style="width: 40%;">Parámetros</th> <th colspan="3" style="width: 60%;">Resultados característicos máximos</th> </tr> <tr> <th style="width: 20%;">Nivel inferior (0.03-1 mg de NO₂⁻/l)</th> <th style="width: 20%;">Nivel intermedio (1-50 mg de NO₂⁻/l)</th> <th style="width: 20%;">Nivel superior (50-100 mg de NO₂⁻/l)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center;">Sesgo (%)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Precisión (%)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Límite de detección</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Límite de cuantificación (mg/l)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Incertidumbre de medida (%)</td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>			Parámetros	Resultados característicos máximos			Nivel inferior (0.03-1 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel intermedio (1-50 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel superior (50-100 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Sesgo (%)				Precisión (%)				Límite de detección				Límite de cuantificación (mg/l)				Incertidumbre de medida (%)			
Parámetros	Resultados característicos máximos																												
	Nivel inferior (0.03-1 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel intermedio (1-50 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel superior (50-100 mg de NO ₂ ⁻ /l)																										
Sesgo (%)																													
Precisión (%)																													
Límite de detección																													
Límite de cuantificación (mg/l)																													
Incertidumbre de medida (%)																													
Conformidad de los resultados:																													
Realizado por:	Revisado por:	Aprobado por:																											
Fdo.	Fdo.	Fdo.																											

9. Anexo

Figura 3. Hoja de cálculo para el registro de los datos de validación.

Logo Laboratorio		Datos de Validación											
Nivel de Validación:				Factor de dilución:									
Valor de Referencia (mg/l NO ₂):													
Fecha y hora	Analista	Equipo	Lote de reactivos	Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)	Corrección con factor de dilución		X _i	Vr		
								Réplica 1	Réplica 2				
				1									
				2									
				3									
				4									
				5									
				6									
				7									
				8									
				9									
				10									
							Media						
							Varianza						

Figura 4. Registro de blancos para la validación.

Logo Laboratorio			Validación		
Registro de Blancos					
Fecha y hora	Analista	Equipo	Lote de reactivos	Número de lecturas	Blanco (mg/l de NO ₂)
				1	
				2	
				3	
				4	
				5	
				6	
				7	
				8	
				9	
				10	
				SD	
Límite de detección					
			LD		

Figura 5. Tabla de valores F de la distribución Fisher utilizada para el análisis de las varianzas.

Tabla 5. VALORES F DE LA DISTRIBUCIÓN F DE FISHER

$1 - \alpha = 0.9$ v_1 = grados de libertad del numerador
 $1 - \alpha = P(F \leq f_{1-\alpha, v_1, v_2})$ v_2 = grados de libertad del denominador

$v_2 \backslash v_1$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	39.004	49.500	53.253	55.833	57.240	58.204	58.906	59.439	59.857	60.195	60.473	60.705	60.902	61.073	61.220	61.350	61.465	61.566	61.658	61.740
2	18.526	9.000	9.162	9.243	9.293	9.326	9.349	9.367	9.381	9.392	9.401	9.408	9.415	9.420	9.425	9.429	9.433	9.436	9.439	9.441
3	5.538	5.462	5.391	5.343	5.309	5.285	5.266	5.252	5.240	5.230	5.222	5.216	5.210	5.205	5.200	5.196	5.193	5.190	5.187	5.184
4	4.545	4.325	4.191	4.107	4.051	4.010	3.979	3.955	3.936	3.920	3.907	3.896	3.886	3.878	3.870	3.864	3.858	3.853	3.848	3.844
5	4.060	3.780	3.619	3.520	3.453	3.405	3.368	3.339	3.316	3.297	3.282	3.268	3.257	3.247	3.238	3.230	3.223	3.217	3.212	3.207
6	3.776	3.463	3.289	3.181	3.108	3.055	3.014	2.983	2.958	2.937	2.920	2.905	2.892	2.881	2.871	2.863	2.855	2.848	2.842	2.836
7	3.589	3.257	3.074	2.961	2.883	2.827	2.785	2.752	2.725	2.703	2.684	2.668	2.654	2.643	2.632	2.623	2.615	2.607	2.601	2.595
8	3.458	3.113	2.924	2.806	2.725	2.666	2.624	2.590	2.561	2.538	2.519	2.502	2.488	2.475	2.464	2.454	2.446	2.438	2.431	2.425
9	3.360	3.006	2.813	2.693	2.611	2.551	2.508	2.474	2.444	2.416	2.396	2.379	2.364	2.351	2.340	2.330	2.320	2.312	2.305	2.298
10	3.285	2.924	2.728	2.605	2.522	2.461	2.418	2.383	2.352	2.323	2.302	2.284	2.269	2.255	2.244	2.233	2.224	2.215	2.208	2.201
11	3.225	2.860	2.660	2.536	2.452	2.390	2.347	2.312	2.280	2.250	2.227	2.209	2.193	2.179	2.167	2.156	2.147	2.138	2.130	2.123
12	3.177	2.807	2.604	2.480	2.394	2.331	2.287	2.252	2.219	2.188	2.165	2.147	2.131	2.117	2.105	2.094	2.084	2.075	2.067	2.060
13	3.136	2.763	2.560	2.434	2.347	2.283	2.239	2.203	2.170	2.138	2.115	2.097	2.080	2.066	2.053	2.042	2.032	2.023	2.014	2.007
14	3.102	2.726	2.522	2.395	2.307	2.243	2.199	2.162	2.129	2.096	2.073	2.054	2.037	2.022	2.010	2.000	1.990	1.981	1.972	1.962
15	3.073	2.695	2.490	2.363	2.274	2.209	2.165	2.128	2.094	2.061	2.037	2.017	2.000	1.985	1.972	1.961	1.950	1.941	1.932	1.924
16	3.048	2.668	2.462	2.335	2.245	2.180	2.136	2.098	2.064	2.030	2.006	1.985	1.968	1.953	1.940	1.928	1.917	1.908	1.899	1.891
17	3.026	2.645	2.437	2.310	2.219	2.154	2.110	2.071	2.037	2.002	1.978	1.956	1.940	1.925	1.912	1.900	1.889	1.879	1.870	1.862
18	3.007	2.624	2.416	2.288	2.197	2.132	2.087	2.048	2.014	1.979	1.954	1.932	1.916	1.900	1.887	1.875	1.864	1.854	1.845	1.837
19	2.990	2.605	2.397	2.269	2.178	2.112	2.067	2.028	1.993	1.958	1.932	1.910	1.894	1.878	1.865	1.852	1.841	1.831	1.822	1.814
20	2.975	2.589	2.381	2.253	2.162	2.096	2.051	2.012	1.977	1.941	1.915	1.893	1.877	1.861	1.847	1.834	1.823	1.813	1.804	1.796
21	2.961	2.575	2.367	2.239	2.148	2.082	2.037	1.998	1.962	1.926	1.900	1.878	1.862	1.846	1.831	1.818	1.807	1.797	1.788	1.780
22	2.949	2.561	2.353	2.225	2.134	2.068	2.023	1.984	1.948	1.911	1.885	1.863	1.847	1.831	1.816	1.803	1.792	1.782	1.773	1.765
23	2.937	2.549	2.341	2.213	2.122	2.056	2.011	1.972	1.936	1.899	1.873	1.851	1.835	1.819	1.804	1.791	1.780	1.770	1.761	1.753
24	2.927	2.538	2.330	2.202	2.111	2.045	1.999	1.960	1.924	1.887	1.861	1.839	1.823	1.807	1.792	1.779	1.768	1.758	1.749	1.741
25	2.918	2.528	2.319	2.191	2.100	2.034	1.988	1.949	1.913	1.876	1.850	1.828	1.812	1.796	1.781	1.768	1.757	1.747	1.738	1.730
26	2.909	2.519	2.310	2.182	2.091	2.025	1.979	1.940	1.904	1.867	1.841	1.819	1.803	1.787	1.772	1.759	1.748	1.739	1.730	1.722
27	2.901	2.511	2.302	2.174	2.083	2.017	1.971	1.932	1.896	1.859	1.833	1.811	1.795	1.779	1.764	1.751	1.740	1.731	1.722	1.714
28	2.894	2.503	2.294	2.166	2.075	2.009	1.963	1.924	1.888	1.851	1.825	1.803	1.787	1.771	1.756	1.743	1.732	1.723	1.714	1.706
29	2.887	2.495	2.286	2.158	2.067	2.001	1.955	1.916	1.880	1.843	1.817	1.795	1.779	1.763	1.748	1.735	1.724	1.715	1.706	1.698
30	2.881	2.489	2.279	2.151	2.060	1.994	1.948	1.909	1.873	1.836	1.810	1.788	1.772	1.756	1.741	1.728	1.717	1.708	1.699	1.691
40	2.835	2.440	2.230	2.099	2.008	1.942	1.896	1.857	1.821	1.784	1.758	1.736	1.720	1.704	1.689	1.676	1.665	1.656	1.647	1.639
50	2.809	2.412	2.197	2.065	1.974	1.908	1.862	1.823	1.787	1.750	1.724	1.702	1.686	1.670	1.655	1.642	1.631	1.622	1.613	1.605
60	2.791	2.393	2.177	2.045	1.954	1.888	1.842	1.803	1.767	1.730	1.704	1.682	1.666	1.650	1.635	1.622	1.611	1.602	1.593	1.585
70	2.779	2.380	2.164	2.032	1.941	1.875	1.829	1.790	1.754	1.717	1.691	1.669	1.653	1.637	1.622	1.609	1.598	1.589	1.580	1.572
80	2.769	2.370	2.154	2.022	1.931	1.865	1.819	1.780	1.744	1.707	1.681	1.659	1.643	1.627	1.612	1.599	1.588	1.579	1.570	1.562
90	2.762	2.363	2.146	2.014	1.923	1.857	1.811	1.772	1.736	1.699	1.673	1.651	1.635	1.619	1.604	1.591	1.580	1.571	1.562	1.554
100	2.756	2.356	2.139	2.007	1.916	1.850	1.804	1.765	1.729	1.692	1.666	1.644	1.628	1.612	1.597	1.584	1.573	1.564	1.555	1.547
200	2.731	2.329	2.111	1.979	1.878	1.812	1.766	1.727	1.701	1.675	1.653	1.631	1.615	1.599	1.584	1.571	1.560	1.551	1.542	1.534
500	2.716	2.313	2.095	1.963	1.862	1.796	1.750	1.711	1.685	1.659	1.637	1.615	1.599	1.584	1.569	1.556	1.545	1.536	1.527	1.519
1000	2.711	2.308	2.089	1.957	1.856	1.790	1.744	1.705	1.679	1.653	1.631	1.609	1.593	1.578	1.563	1.550	1.539	1.530	1.521	1.513

Elaborada por Inma Patricia Valdez y Alfaro.

4.3. Ejecución experimental de la validación

De acuerdo con el objetivo de determinar la validez del método Spectroquant® Prove Test en cubetas para la determinación de nitritos en aguas de consumo, se procedió a la medida de los patrones según el procedimiento descrito en el apartado 5 del protocolo de validación. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

- Nivel inferior.

Tabla 2. Resultados del análisis de la muestra patrón para el nivel inferior de validación.

Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)
1	0,033	0,03	0,006
2	0,033	0,033	0,006
3	0,04	0,038	0,01
4	0,029	0,029	0,006
5	0,033	0,033	0,008
6	0,04	0,039	0,01
7	0,035	0,033	0,006
8	0,033	0,033	0,006
9	0,04	0,038	0,008
10	0,035	0,035	0,008

- Nivel intermedio.

Tabla 3. Resultados del análisis de la muestra para el nivel intermedio de validación.

Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)
1	2,108	2089	0,006
2	2,107	2,104	0,006
3	2,111	2,094	0,01
4	2,106	2,103	0,006
5	2,095	2,104	0,008
6	2,083	2,088	0,01
7	2,104	2,095	0,006
8	2,098	2,109	0,006
9	2,103	2,111	0,008
10	2,095	2,089	0,008

- Nivel superior.

Tabla 4. Resultados del análisis de la muestra patrón para el nivel superior de validación.

Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)
1	0,984	0,983	0,006
2	1,001	1,003	0,006
3	1,008	0,995	0,01
4	0,995	0,99	0,006
5	1,009	0,99	0,008
6	1,006	0,993	0,01
7	0,989	0,997	0,006
8	0,996	1,004	0,006
9	0,998	1,004	0,008
10	0,992	0,986	0,008

4.4. Evaluación de los resultados analíticos

Se procedió a continuación al análisis estadístico de los resultados (figuras 5, 6 y 7 del Anexo) para la obtención de los parámetros característicos del método.

Sesgo

La determinación del sesgo se realizó a través del valor de recuperación según la ecuación 1 y 2 del protocolo de validación.

Tabla 5. Resumen de los resultados obtenidos de recuperación y sesgo.

Nivel de validación	\bar{X} (mg de NO ₂ ⁻ /l)	X _{ref} (mg de NO ₂ ⁻ /l)	Recuperación (%)	Sesgo (%)
Nivel inferior	0,027	0,03	90,67	9,33
Nivel intermedio	2,092	2,1	99,64	0,36
Nivel superior	99,61	100	99,61	0,39

Precisión

Mediante el coeficiente de variación definido en la ecuación 3 y 4 del protocolo de validación se determinó la precisión para cada nivel de validación, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 6. Valores de precisión.

Nivel de validación	Precisión (%)
Nivel inferior	8,17
Nivel Intermedio	0,44
Nivel superior	0,79

Límite de detección

A partir de los valores de matriz se determinó el límite de detección según la ecuación 6 del protocolo de validación.

Tabla 7. Límite de detección (LD)

Número de lecturas	mg de NO ₂ ⁻ /l
1	0,006
2	0,006
3	0,01
4	0,006
5	0,008
6	0,01
7	0,006
8	0,006
9	0,008
10	0,008
SD	0,002
LD	0,008

El límite de detección expresado en porcentaje respecto al valor paramétrico a la salida de la ETAP (0,1 mg de NO₂⁻/l) es del 8 %.

Incertidumbre de la medida

- Incertidumbre combinada de preparación del patrón.

Para cada nivel de validación se preparó una solución patrón tal y como se describe en el apartado 5 de Diseño experimental de la validación. Para determinar la incertidumbre combinada de la preparación de estos patrones se utilizó la ecuación 9 del protocolo de validación. En el caso particular de la incertidumbre de la muestra patrón de 0,03 mg de NO₂⁻/l se tuvo en cuenta la incertidumbre generada en la preparación de la solución intermedia.

Tabla 8. Incertidumbre combinada de preparación del patrón.

Concentración del patrón (mg de NO ₂ ⁻ /l)	u (±mg/l)
0,03	0,0002
2,1	0,01
100	0,4

- Análisis de las varianzas.

Para la estimación de la incertidumbre de la medida fue necesario determinar si las varianzas atribuibles a la variabilidad “dentro de series” y a la variabilidad “entre series” eran significativamente iguales, tal y como se describe en el apartado de Tratamiento Estadístico de los Resultados en el protocolo de validación.

En la tabla 9 se recogen los valores de F_{exp} tras la realización del Test F utilizado para la comparación de las varianzas.

El valor de F_{tab} para este ensayo es 2,347, teniendo en cuenta que los grados de libertad del numerador son 9 y del denominador 10.

Tabla 9. Test F de comparación de varianzas.

Nivel de validación	F _{exp}	Comparación de varianzas	Varianza utilizada para la estimación de la incertidumbre $\frac{s_0^2}{n_0}$
Nivel inferior	4,960	Significativamente diferentes	$\frac{s_m^2}{p}$
Nivel intermedio	1,064	Significativamente iguales	$\frac{s_r^2}{n \cdot p}$
Nivel superior	0,855	Significativamente iguales	$\frac{s_r^2}{n \cdot p}$

- Incertidumbre de la medida.

A partir de la ecuación 8 se estima la incertidumbre de la medida para cada solución patrón y se definen los intervalos de los niveles de validación en los que se cumple esa incertidumbre.

Tabla 10. Valores de incertidumbre de medida para cada nivel de validación.

Nivel de validación	U(%)
Nivel inferior	20%
Nivel Intermedio	2%
Nivel superior	4%

Con estos datos se establecen los siguientes intervalos de incertidumbre: 20% para concentraciones entre 0,03 y 1 mg de NO_2^-/l , 2% para valores entre 1 y 50 mg de NO_2^-/l , y 4% para el intervalo de 50 a 100 mg de NO_2^-/l (tabla 10).

En resumen, la validación del método en el nivel inferior era necesaria para poder establecer si el método cumplía con el límite de cuantificación establecido en el R.D. 140/2003 (0,03 mg de NO_2^-/l), hecho que se cumple debido a que, cuando las concentraciones de nitritos presentes en la muestra se encuentran entre 0,03 y 1 mg de NO_2^-/l los resultados característicos mínimos respecto al sesgo, precisión e incertidumbre de medida están por debajo de los límites permitidos.

El límite de detección se calculó a través de la ecuación 6 del protocolo de validación, a partir de valores obtenidos de la matriz, es decir, de blancos de muestra, y su valor es de un 8% del valor paramétrico. Por tanto, se cumple con los requisitos expuestos en el Real Decreto, ya que el valor máximo permitido es de un 10%, es decir 0,01 mg de NO_2^-/l .

Cuando se analizan concentraciones entre 1 y 100 mg de NO_2^-/l , los valores del sesgo, precisión e incertidumbre de medida se encuentran dentro de los límites establecidos por el Real Decreto 140/2003 y no presentan grandes variaciones. No obstante, a concentraciones altas, entre 50 y 100 mg de NO_2^-/l los valores son ligeramente superiores. El intervalo lineal del espectrofotómetro Spectroquant® Prove se encuentra entre 0,03 y 2,1 mg de NO_2^-/l , por lo que las muestras de concentración superior han de ser diluidas, lo que supone una contribución adicional a la incertidumbre de medida.

4.5. Certificado de validez del método

De acuerdo con los resultados obtenidos se puede confirmar que el método colorimétrico para la determinación de nitritos en agua mediante espectrometría que se ha desarrollado cumple con los requisitos establecidos en el Real Decreto 140/2003 de 7 de febrero por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano.

De esta manera se puede declarar la validez del método para su uso previsto mediante un certificado de validez que debe estar firmado por los responsables del laboratorio (figura 4).

Figura 4. Certificado de validez del método.

Laboratorio XXX																													
Certificado de Validez																													
Declaración de Conformidad para el método:																													
Determinación de nitritos en aguas de consumo de acuerdo al R.D. 140/2003 mediante Spectroquant Prove Test en cubetas																													
Especificaciones:																													
<ul style="list-style-type: none"> * UNE-EN ISO/EIC 17025:2017 * Real Decreto 140/2003 																													
Intervalo de validación:																													
Desde 0.03 mg de NO ₂ ⁻ /l hasta 100 mg de NO ₂ ⁻ /l																													
Regla de desición:																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Parámetros</th> <th>Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sesgo</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Precisión</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Límite de detección</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>Límite de cuantificación</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>Incertidumbre de medida</td> <td>20</td> </tr> </tbody> </table>			Parámetros	Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)	Sesgo	10	Precisión	10	Límite de detección	10	Límite de cuantificación	30	Incertidumbre de medida	20															
Parámetros	Resultados característicos máximos (% del valor paramétrico)																												
Sesgo	10																												
Precisión	10																												
Límite de detección	10																												
Límite de cuantificación	30																												
Incertidumbre de medida	20																												
Resultados:																													
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">Parámetros</th> <th colspan="3">Resultados característicos máximos</th> </tr> <tr> <th>Nivel inferior (0.03-1 mg de NO₂⁻/l)</th> <th>Nivel intermedio (1-50 mg de NO₂⁻/l)</th> <th>Nivel superior (50-100 mg de NO₂⁻/l)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Sesgo (%)</td> <td>9.33</td> <td>0.36</td> <td>0.39</td> </tr> <tr> <td>Precisión (%)</td> <td>8.17</td> <td>0.44</td> <td>0.79</td> </tr> <tr> <td>Límite de detección (%)</td> <td>8</td> <td>8</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>Límite de cuantificación (mg/l)</td> <td>30</td> <td>30</td> <td>30</td> </tr> <tr> <td>Incertidumbre de medida (%)</td> <td>20</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> </tbody> </table>			Parámetros	Resultados característicos máximos			Nivel inferior (0.03-1 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel intermedio (1-50 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel superior (50-100 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Sesgo (%)	9.33	0.36	0.39	Precisión (%)	8.17	0.44	0.79	Límite de detección (%)	8	8	8	Límite de cuantificación (mg/l)	30	30	30	Incertidumbre de medida (%)	20	2	4
Parámetros	Resultados característicos máximos																												
	Nivel inferior (0.03-1 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel intermedio (1-50 mg de NO ₂ ⁻ /l)	Nivel superior (50-100 mg de NO ₂ ⁻ /l)																										
Sesgo (%)	9.33	0.36	0.39																										
Precisión (%)	8.17	0.44	0.79																										
Límite de detección (%)	8	8	8																										
Límite de cuantificación (mg/l)	30	30	30																										
Incertidumbre de medida (%)	20	2	4																										
Conformidad de los resultados:																													
El método cumple con las especificaciones requeridas para la determinación de nitritos en aguas de consumo, por lo que se declara su validez.																													
Realizado por:	Revisado por:	Aprobado por:																											
Fdo.	Fdo.	Fdo.																											

5. Conclusiones

Se ha elaborado un procedimiento de ensayo para la determinación de nitritos en aguas de consumo mediante el método colorimétrico del kit Test en cubetas Nitritos Spectroquant acorde con la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 y las instrucciones del kit.

Se han elaborado registros y hojas de cálculo para la verificación del espectrofotómetro de medida a partir de las instrucciones del fabricante y para la calibración del material volumétrico a pistón a partir de las normas internacionales de referencia cumpliendo los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017.

Se ha diseñado un formato de informe de ensayo que cumple con los requisitos mínimos exigidos en la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 para estos registros.

Se han establecido las características de funcionamiento que debe cumplir el método, parámetros de la validación, para ser válido para su uso previsto (cumplimiento del Real Decreto 140/2003), así como los materiales de referencia, equipos y materiales necesarios para dicha validación, cumpliendo los requisitos de la norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2017.

Se ha diseñado el proceso de validación del método mencionado para el cumplimiento del Real Decreto 140/2003 en aguas de consumo aplicando un ensayo anidado en tres niveles de concentración en muestras de referencia preparadas a partir de materiales de referencia certificados consistente en la medición por duplicado de las muestras durante 10 días.

Se ha realizado el tratamiento estadístico de los resultados experimentales obtenidos del ensayo anidado mediante hojas de cálculo diseñadas específicamente, obteniéndose los valores característicos del método tal y como se ejecuta en el laboratorio para el sesgo, la precisión, la incertidumbre y los límites de cuantificación y de detección.

Se ha elaborado un formato de certificado de validez del método y emitido el correspondiente a la validación realizada.

Se ha demostrado que el método validado cumple con los requisitos establecidos en el Real Decreto 140/2003 para su uso en el control de la concentración de nitritos en las aguas de consumo.

De todo lo anterior se demuestra que se han alcanzado los objetivos académicos planteados al haber realizado un estudio en profundidad y aplicación práctica de varias normas utilizadas habitualmente en el entorno profesional de laboratorios de ensayo.

6. Bibliografía

Compañó, R. and Ríos Castro, Á. (2002) *“Garantía de la calidad en los laboratorios analíticos”*. ISBN: 8497560248. Editorial Síntesis. Publicado en España.

Morillas, P. (2012) *“Guía para el Funcionamiento de Ensayos de Aguas”*. http://www.aeas.es/documentos/Guia_Lab_AEAS_Parte_I.pdf [Consulta: 17 de junio de 2020]

UNE-EN ISO/IEC 17025:2017 (2017) *“Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración”*.

Macas Acurio, A. J. (2011) *“Validación de métodos analíticos para la determinación de cloro libre residual, cromo hexavalente, cromo total y nitritos en muestras de agua, en el centro de investigaciones y control ambiental “CICAM””*. ISBN: 1802702199. <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/3136> [Consulta: 20 de junio de 2020]

‘Vocabulario Internacional de Metrología - Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM)’, (2012) 3ª Edición, ISBN: NIPO 074-13-004-1.

Morillas P. et al. (2016) *“Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos – Una guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados”* 1ª Edición, ISBN: 9789187461590. https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf [Consulta: 8 de julio de 2020]

Solís Y. (2013) *“Validación de métodos analíticos para la determinación de boro, fluoruros y nitritos en agua mediante espectrofotometría de luz visible”*. ISBN: 9789896540821. <https://core.ac.uk/reader/71899756> [Última consulta: 8 de julio de 2020]

MERCK. Test en cubetas Nitritos Spectroquant® ref. 1.14547.0001. Revisión agosto 2019.

Supelco® (2014). Manual de funcionamiento Spectroquant® Prove.

UNE-EN ISO 8655-2:2002 (2003). *“Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 2: Pipetas tipo pistón”*.

UNE-EN ISO 8655-6:2002 (2003). *“Aparatos volumétricos accionados mediante pistón. Parte 6: Métodos gravimétricos para la determinación del error de medición”*.

UNE-EN ISO 5667-3:2018 (2019). *“Calidad del agua. Muestreo. Parte 3: Conservación y manipulación de las muestras de agua”*.

Pacheco, J., Pat Canul, R., A., (2002) *“Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y efecto en los seres vivos”* ‘Ingeniería: revista académica’.

Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. Boletín Oficial del Estado núm. 45, ref. BOE-A-2003-Texto consolidado-1-agosto-2018.

Martín V. (2012). Proyecto fin de carrera. *“Selección de métodos estadísticos para la interpretación de intercomparaciones en ensayos de áridos finos”*. http://oa.upm.es/15045/1/PFC_VICTOR_MARTIN_LOPEZ.pdf [Consulta: 25 de junio de 2020]

7. Anexos

Figura 5. Hoja de cálculo con datos experimentales para el nivel inferior de validación.

Logo Laboratorio			Validación								
Nivel de Validación: Valor de Referencia (mg/l NO ₂):			Inferior 0.03	Factor de dilución:				1			
Fecha y hora	Analista	Equipo	Lote de reactivos	Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)	Corrección con factor de dilución		X _i	Vr
								Réplica 1	Réplica 2		
				1	0.033	0.03	0.006	0.027	0.024	0.026	4.50E-06
				2	0.033	0.033	0.006	0.027	0.027	0.027	0.00E+00
				3	0.04	0.038	0.01	0.03	0.028	0.029	2.00E-06
				4	0.029	0.029	0.006	0.023	0.023	0.023	0.00E+00
				5	0.033	0.033	0.008	0.025	0.025	0.025	0.00E+00
				6	0.04	0.039	0.01	0.03	0.029	0.030	5.00E-07
				7	0.035	0.033	0.006	0.029	0.027	0.028	2.00E-06
				8	0.033	0.033	0.006	0.027	0.027	0.027	0.00E+00
				9	0.04	0.038	0.008	0.032	0.03	0.031	2.00E-06
				10	0.035	0.035	0.008	0.027	0.027	0.027	0.00E+00
							Media	0.027		0.027	1.10E-06
							Varianza	5.75E-06		5.46E-06	

SESGO. Estimación del error sistemático.								
Error Absoluto	0.0028	Error Relativo (%)	9.33	Recuperación (%)	90.67	Sesgo (%)	9.33	
Indice de Compatibilidad	3.54	Test de Fisher	S ₁ ²	5.46E-06	Grados de libertad	9	F _{tab}	F _{exp}
			S ₂ ²	1.10E-06		10	2.347	4.960
Varianzas Significativamente Diferentes								

INCERTUDUMBRE de la medida.							
Incertidumbre combinada de preparación del patrón							
CF1	Concentración del patrón	Concentración material de referencia	Volumen pipeta de pistón (ml)	Volumen matraz (ml)	U _{ref1}	0.058	
	10	1000	1	100	U _{ref}	0.12	
	u	3.5	4.62E-03	0.058			
CF2	0.03	10	0.3	100	U _{ref2}	0.00022	
	u	0.058	0.0014	0.058	U _{ref}	0.00045	
					U _{ref}	1.49%	
Incertidumbre de medida.							
				U _(x)	6.07E-03	20%	

Precisión			
Presición de Reproducibilidad			
S _R	0.0025	u _(presición)	0.000006
CV (%)	8.17		

Figura 6. Hoja de cálculo con datos experimentales para el nivel de validación intermedio

Logo Laboratorio		Validación									
Nivel de Validación:		Intermedio		Factor de dilución:		1					
Valor de Referencia (mg/l NO ₂):		2.1									
Fecha y hora	Analista	Equipo	Lote de reactivos	Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)	Corrección con factor de dilución		X _i	Vr
								Réplica 1	Réplica 2		
				1	2.108	2.089	0.006	2.102	2.083	2.093	1.81E-04
				2	2.107	2.104	0.006	2.101	2.098	2.100	4.50E-06
				3	2.111	2.094	0.01	2.101	2.084	2.093	1.45E-04
				4	2.106	2.103	0.006	2.1	2.097	2.099	4.50E-06
				5	2.095	2.104	0.008	2.087	2.096	2.092	4.05E-05
				6	2.083	2.088	0.01	2.073	2.078	2.076	1.25E-05
				7	2.104	2.095	0.006	2.098	2.089	2.094	4.05E-05
				8	2.098	2.109	0.006	2.092	2.103	2.098	6.05E-05
				9	2.103	2.111	0.008	2.095	2.103	2.099	3.20E-05
				10	2.095	2.089	0.008	2.087	2.081	2.084	1.80E-05
Media								2.09		2.09	5.38E-05
Varianza								8.26E-05		5.73E-05	

SESGO. Estimación del error sistemático.							
Error Absoluto	0.0076	Error Relativo (%)	0.36	Recuperación (%)	99.64	Sesgo (%)	0.36
Indice de Compatibilidad	0.60	Test de Fisher	S1 ²	5.73E-05	Grados de libertad	F _{tab}	F _{exp}
			S2 ²	5.38E-05	9	2.347	1.064
					10		
Varianzas Significativamente Iguales							

INCERTUDUMBRE de la medida.						
Incertidumbre combinada de preparación del patrón						
Concentración del patrón	Concentración material de referencia	Volumen pipeta de pistón (ml)	Volumen matraz (ml)	U _{ref}	0.012	
2.1	1000	0.21	100	U _{ref}	0.024	
u	3.5	9.70E-04	0.058			
Incertidumbre de medida.						
			U _(x)	5.16E-02		
				2%		

Precisión			
Reproducibilidad Intermedia			
SD	0.009	u	0.00008
CV (%)	0.44		

Figura 7. Hoja de cálculo con datos experimentales para el nivel superior de validación.

Logo Laboratorio		Validación									
Nivel de Validación:			Superior			Factor de dilución:			100		
Valor de Referencia (mg/l NO ₂):			100								
Fecha y hora	Analista	Equipo	Lote de reactivos	Serie	Réplica 1 (mg/l)	Réplica 2 (mg/l)	Matriz (mg/l)	Corrección con factor de dilución		X _i	Vr
								Réplica 1	Réplica 2		
				1	0.984	0.983	0.006	98.394	98.294	98.344	5.00E-03
				2	1.001	1.003	0.006	100.094	100.294	100.194	2.00E-02
				3	1.008	0.995	0.01	100.79	99.49	100.140	8.45E-01
				4	0.995	0.99	0.006	99.494	98.994	99.244	1.25E-01
				5	1.009	0.99	0.008	100.892	98.992	99.942	1.80E+00
				6	1.006	0.993	0.01	100.59	99.29	99.940	8.45E-01
				7	0.989	0.997	0.006	98.894	99.694	99.294	3.20E-01
				8	0.996	1.004	0.006	99.594	100.394	99.994	3.20E-01
				9	0.998	1.004	0.008	99.792	100.392	100.092	1.80E-01
				10	0.992	0.986	0.008	99.192	98.592	98.892	1.80E-01
							Media	99.61		99.61	4.64E-01
							Varianza	0.621		3.97E-01	

SESGO. Estimación del error sistemático.

Error Absoluto	0.39	Error Relativo (%)	0.39	Recuperación (%)	99.61	Sesgo (%)	0.39
Indice de Compatibilidad	0.87	Test de Fisher		S ₁ ²	3.97E-01	Grados de libertad	9
				S ₂ ²	4.64E-01	F _{tab}	2.347
						F _{exp}	0.855
Varianzas Significativamente Iguales							

INCERTIDUMBRE de la medida.

Incertidumbre combinada de preparación del patrón							
Concentración del patrón	Concentración material de referencia	Volumen pipeta (ml)	Volumen matraz (ml)	u _{ref}	0.37		
100	1000	10	100	U _{ref}	0.75		
u	3.5	1.15E-02	0.058				
Incertidumbre de medida.							
				U _(x)	3.96		
					4%		

Precisión

Reproducibilidad Intermedia							
				SD	0.79	u	0.63
				CV (%)	0.79		