

CONSIDERACIONES EN RELACIÓN A LOS PROTOCOLOS DE ANÁLISIS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Dr. Gerardo Fernández Martínez
Unidad de Técnicas Cromatográficas y Análisis de Aguas

OBJETIVOS

- Selección de la técnica en función de criterios analíticos y prácticos: ¿Qué debo comprar?
- Selección de la variables a considerar: optimización
- Adecuar las etapas de preparación de muestras a la técnica y al laboratorio
- Gestión y mantenimiento de instrumentos

DISEÑO DE MI LABORATORIO

INSTRUMENTACIÓN CROMATOGRÁFICA: HPLC-GC

- **ANALITOS A DETERMINAR:**
 1. Analitos de bajo peso molecular y bajo polaridad: Cromatografía de gases. COV
 2. Analitos de elevado peso molecular y elevada polaridad: Cromatografía de líquidos. Micotoxinas
 - Analitos cargados: Cromatografía iónica
 3. Analitos intermedios: Ambas opciones. Otros criterios. HAP

DISEÑO DE MI LABORATORIO

INSTRUMENTACIÓN CROMATOGRÁFICA: HPLC-GC

- **CRITERIOS ECONOMICOS**

1. Inversión inicial: Depende del modelo. Equiparable
2. Gasto de consumibles: gases, columnas, disolventes
3. Mantenimiento: En general mayor HPLC
4. Requisitos de instalación.

DISEÑO DE MI LABORATORIO

INSTRUMENTACIÓN CROMATOGRÁFICA: HPLC-GC

- **CRITERIOS ANALITICOS**

1. Matrices a analizar: matrices limpias (aguas, aire) vs matrices sucias (residuales, suelos, sedimentos alimentos)
2. Necesidad de sensibilidad: %, ppm, ppb, ppt
3. Necesidad de selectividad: identificación por tr o necesito algo mas?
4. Compatibilidad con los sistemas de preparación de muestra

- Infinidad de compuestos orgánicos

C, H, O, N, S y halógenos

- Muchos de ellos sujetos a legislación

pesticidas, antibióticos,
anabolizantes, HAP, ftalatos, PCB,
dioxinas, ...

- Gran variedad de tipo de
muestras (gaseosas, líquidas,
sólidas)

- Aire, gases de chimenea, atmósferas interiores...
- Agua, flúidos biológicos, aceites, efluentes,...
- Alimentos, suelos, lodos, sedimentos, tejidos humanos y animales, plantas, polímeros, envases...

MUESTREO
MUESTRA REPRESENTATIVA Y
HOMOGENEA

Toma de muestra

Pre-tratamiento y almacenamiento

PREPARACIÓN DE
LA MUESTRA

Extracción

Purificación-Fraccionamiento

Preconcentración

ANÁLISIS
CROMATOGRÁFICO

Separación, identificación y cuantificación

Tiempo de análisis

- Toma de muestra (6%)
- Preparación (> 60%)
- Análisis (6%)
- Gestión de datos (27%)

Requisitos/ Objetivos de las técnicas de preparación

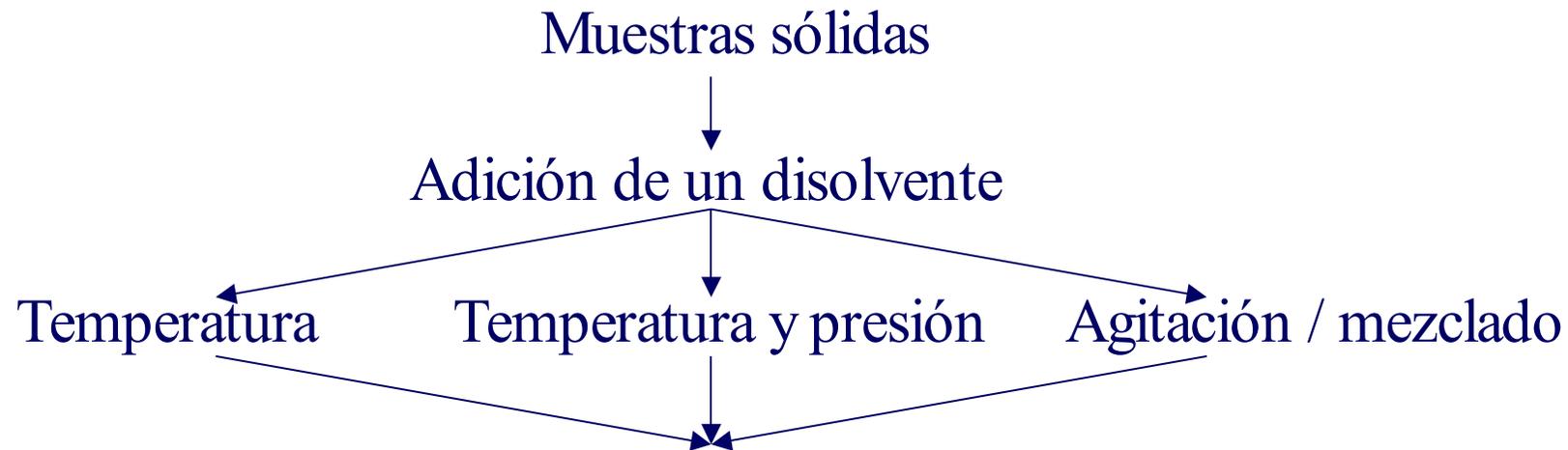
- Rapidez
- Eficacia
- Limpieza
- Selectividad
- Automatización?

- Sencillas
- Baratas
- Disolventes no tóxicos

EXTRACCIÓN

Objetivos

1. Obtener un extracto representativo de la muestra original enriquecido en los compuestos de interés
2. Compatible con la instrumentación analítica y con facilidad para la separación y detección de los mismos
3. Muestra en disolución



Técnicas de extracción

- Extracción cuantitativa del analito
- Extracción de otras especies

- Agitación / ultrasonidos
- Extracción Soxhlet/Soxtec
- Extracción con energía de microondas
 - Extracción con fluido supercrítico
 - Extracción acelerada
- Extracción con agua subcrítica

AGITACIÓN

- Para analitos unidos débilmente a la matriz e-> proceso suave e-> baja eficiencia
- Manual o automática
- Ultrasonidos (25-40 Hz e-> aumenta la eficiencia)

Es necesaria una homogeneización y reducción del tamaño de partícula para contacto más eficiente entre muestra y disolvente

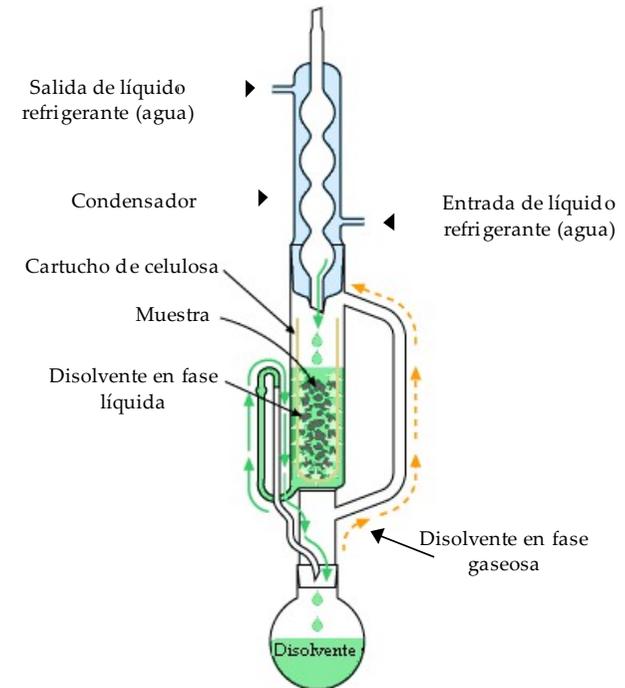
Ventajas e inconvenientes



- Simple,
- poco eficaz
- T Cantidad de muestra
- T Cantidad de disolvente
- T Tiempo de extracción
- Requiere filtración posterior/ evaporación del disolvente
- T Riesgos de contaminación/ pérdidas

SOXHLET

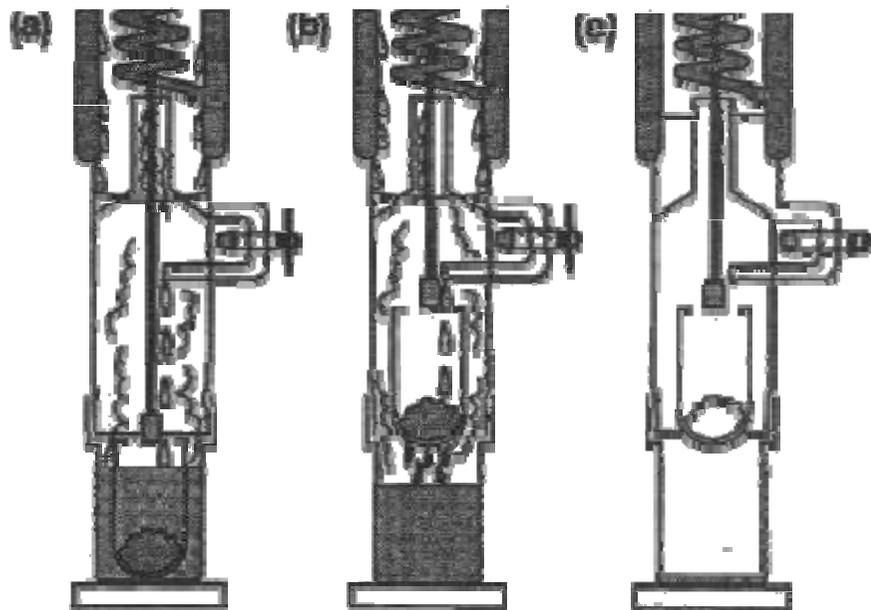
- Para analitos unidos intensamente a la matriz
- Proceso destilación/ condensación
- Manual o automático



Ventajas e inconvenientes

- Método de referencia/ estándar
- Tiempo de extracción largo (10 – 24 horas)
- Contacto muestra y disolvente es un proceso estático, excepto durante el breve período que se produce el sifón
- Los analitos deben ser estables a la temperatura de ebullición del disolvente => degradación de compuestos termolábiles
- Se emplea gran cantidad de disolventes, no requiere filtración y sí evaporación posterior del disolvente

SOXTEC



• Soxtec Avanti 2055

- a.- Solubilización de la materia extraíble de la muestra inmersa en el disolvente a ebullición
- b.- Lavado del disolvente extraído (similar a la extracción Soxhlet)
- c.- Concentración del extracto y recogida del disolvente destilado

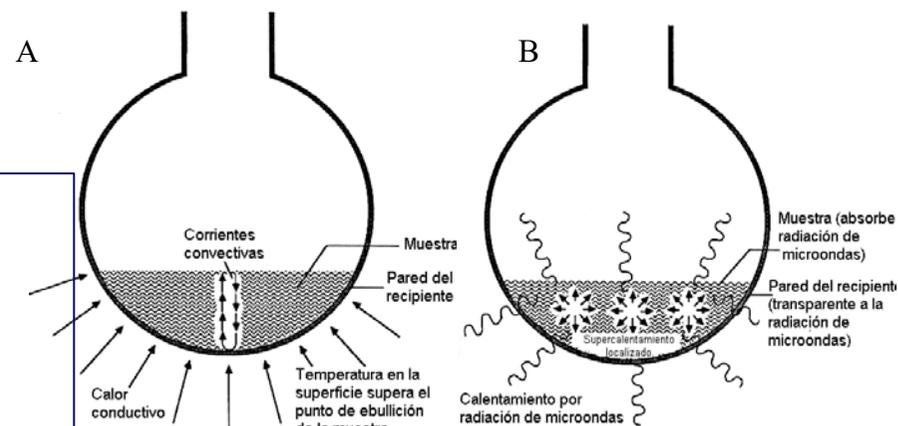
Ventajas e inconvenientes



- Reduce tiempo de extracción
- Realiza la extracción y la evaporación continua del disolvente e: reduce tiempo total de análisis
- Contacto muestra y disolvente es un proceso dinámico
- Los analitos deben ser estables a la temperatura de ebullición del disolvente e: degradación de compuestos termolábiles

MICROONDAS

- Comportamiento del disolvente frente a la radiación electromagnética e \rightarrow momento dipolar permanente
- Material: cuarzo, vidrio, plásticos (teflón y poliestireno)
- Recipientes abiertos y cerrados



Calentamiento por conducción (A) y por microondas (B)

Disolvente	Constante dieléctrica (ϵ)	Punto de ebullición (°C)	Temperatura reactor cerrado (°C)
Hexano	1.89	69	-
Diclorometano	8.9	39	140
Acetona	20.7	56	164
Metanol	32.6	65	151
Acetonitrilo	37.5	82	194

Temperatura; Tiempo de extracción, Cantidad de muestra, Tipo y volumen de disolvente, Número de reactores...

e \rightarrow OPTIMIZACIÓN

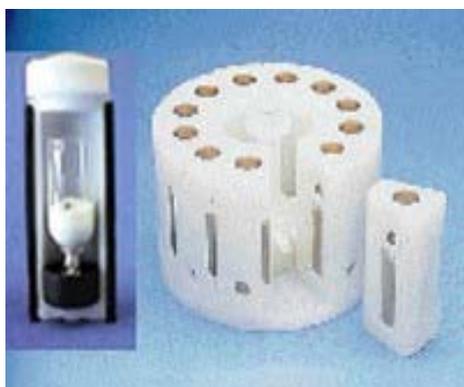
MICROONDAS

Ventajas e inconvenientes



- Rapidez: las extracciones se realizan en minutos (10-15min)
- Menor consumo de disolventes (10-20 mL)
- Automático, alto procesado de muestras
- Sin pérdidas de compuestos volátiles (recipientes cerrados)
- Sin contaminación
- Necesario la adición de un disolvente polar
- Filtración del extracto
- Limpieza posterior del extracto; escasa selectividad

Sistema integrado de extracción empleando energía de microondas



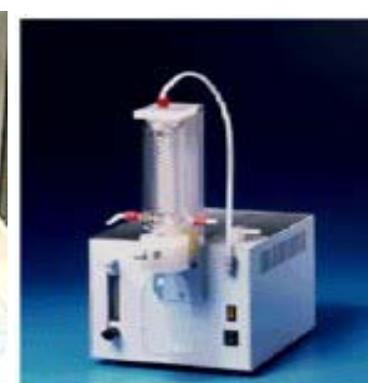
EXTRACCIÓN



FILTRACIÓN



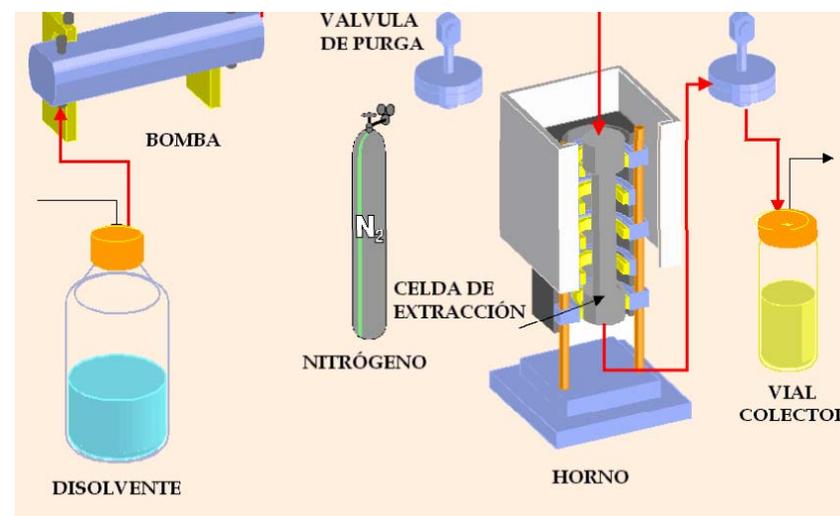
EVAPORACIÓN



RECUPERACIÓN
DISOLVENTE

EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS

- Utiliza disolventes orgánicos a alta temperatura (30-200°C) y presión (100-140 atm) e-> Extracción más eficiente



Introducir la muestra en la celda

Triturada/ tamizada
Eliminar humedad (sulfato de sodio)

Llenar la celda con disolvente

15-40 mL

Calentar y presurizar

< 200°C,
< 20MPa

Mantener la T y P durante un cierto tiempo

10-20 min

Bompear el disolvente a la celda

Purgar con N₂ para recoger el disolvente

EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS

Temperaturas altas (hasta 200°C):

- Aumentan la capacidad del disolvente de solubilizar los analitos
- Disminuye la viscosidad de los disolventes orgánicos y se favorece la penetración en la matriz

Presiones elevadas (hasta 3000 psi):

- Permiten al disolvente mantenerse líquido por encima de su punto de ebullición
- Permite al disolvente penetrar en la matriz de la muestra

Ventajas e inconvenientes

Equipo ASE 200® (Dionex)



- Rapidez: 10-20 min
- Menor consumo de disolventes (10-20 mL)
- Automático
- Recipientes cerrados
- Depende de la matriz
- Elevado coste

Muestras sólidas

	SOXHLET	SOXTEC	ULTRASONIDOS	EXTRACCIÓN FLUIDOS SUPERCRÍTICOS	EXTRACCIÓN CON MICROONDAS	EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES ACELERADA
ACEPTACIÓN	Técnica de referencia para otros métodos	Versión automática del Soxhlet	Menos aceptado que el Soxhlet	Se considera difícil para desarrollar métodos	Equipos comerciales para compuestos orgánicos partir de 1990s	Más reciente en el mercado que el microondas
TIEMPO DE EXTRACCIÓN	4 - 24 horas	4 - 5 horas	3-15min/ extrac. generalmente 3 extracciones	30 - 60 min	Tiempos cortos de extracción (5 min) Se pueden extraer varias a la vez (total 1h)	Tiempos cortos de extracción (15 min)
EMPLEO DE DISOLVENTE	250 - 500 mL /extracción	40-50 mL/ extracción	150-300 mL por extracción	10-30 mL	10 - 40 mL	15-25 mL
COSTE	Muy Económico	Económico	Relativamente económico	Elevado	Moderado	Elevado
FACILIDAD OPERACIÓN	Fácil de usar	Fácil de usar	Fácil de usar pero laborioso	Difícil de operar	Relativamente fácil de usar	Fácil de usar
TAMAÑO DE MUESTRA	> 10 g	> 10 g	Hasta 5 g	> 1g	Hasta 5g	> Hasta 10g
EXTRACCIÓN SIMULTANEA/ SECUENCIAL	Unidades individuales	Sistemas con 2-6 muestras simultaneas	Operación secuencial	Sistemas simultáneos O secuenciales	Operación simultanea de hasta 12 muestras	Operación secuencial hasta 24 muestras
MÉTODO EPA APROBADO	Si n° 3540	Si n° 3541	Si n° 3550	Si n° 3560,3561	Si n° 3546	Si n° 3545
PRINCIPAL DESVENTAJA	Empleo de grandes volúmenes de disolventes	Empleo de disolventes; más caro que el Soxhlet	No automatizable ; muy laborioso	Efectos de matriz; equipo costoso	Disolventes polares y filtración del extracto después de enfriar	Equipo costoso. Técnica nueva

Sistemas de extracción de contaminantes orgánicos en matrices sólidas

Muestras líquidas



Adición de un disolvente



**Técnicas de
extracción**

- Extracción cuantitativa del analito
- Extracción de otras especies

- Líquido-Líquido
- Extracción en fase vapor
- Extracción en fase sólida
- Microextracción en fase sólida

EXTRACCIÓN CON DISOLVENTES PRESURIZADOS

- Partición de la muestra entre dos líquidos inmiscibles en los cuales el analito y su matriz tienen distintas solubilidades (líquido-líquido).
- Implica la separación de una sustancia (solute) en una muestra líquida empleando un disolvente adecuado

K_{ow} ó $\text{Log } K_{ow}$

- Se define por coeficiente de distribución: $K_d = \frac{C_o}{C_{aq}}$

- Una expresión más útil es la fracción de analito extraído: $E = \frac{n_o}{n_t} = \frac{1}{(1 + V_{aq}/K_d V_o)}$

• Relación entre volúmenes (muestra y disolvente)

• Modificación de pH o fuerza iónica o mezcla de disolventes o extracciones sucesivas a diferentes pHs

EXTRACCIÓN DISCONTINUA

Extracción con embudos de decantación



Añadir
muestra y
disolvente



Agitar vigorosamente
manual o mecánicamente



Dejar
reposar



Separar la capa
orgánica

Disolventes

Eficiencia en la extracción, selectividad, inercia, punto de ebullición, toxicidad del disolvente, densidad relativa de las dos fases, tendencia a formar emulsiones, compatibilidad con el sistema de detección, disolventes de bajo punto de ebullición

COMPUESTOS NO POLARES: pentano, hexano, tolueno, diclorometano. Son no selectivos y extraen materiales lipofílicos (lípidos) al mismo tiempo que los analitos de interés

COMPUESTOS POLARES: acetonitrilo, metanol

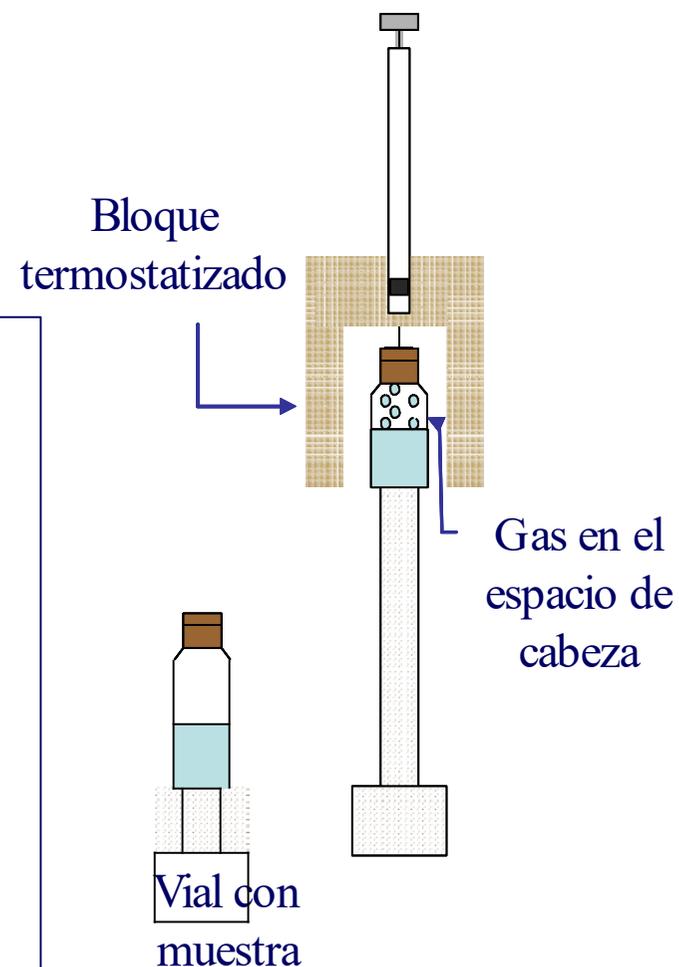
Ventajas e inconvenientes

- Bajo coste
- Amplia variedad de selectividad modificando los disolventes a emplear
- Formación de emulsiones.
- Se emplean volúmenes relativamente grandes de disolventes. Frecuentemente son tóxicos e inflamables
- Procedimiento laborioso
- Los disolventes deben ser de alta pureza. Minimizar contaminación e interferencias de fondo

EXTRACCIÓN POR ESPACIO DE CABEZA

- Estático
- Dinámico

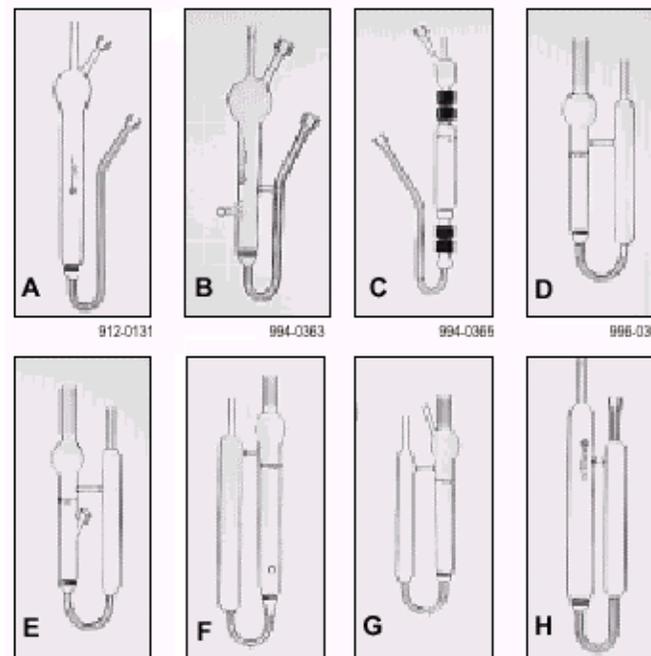
- Fue la primera técnica de extracción en fase gaseosa (estática)
- Solamente los analitos volátiles pasan a fase vapor y se separan de interferencias debidas a otros componentes de la matriz
- Presenta limitada sensibilidad debido a la temperatura de trabajo (25-30°C)
- Para mejorarla se emplea la dinámica, el gas inerte pasa de forma continua y arrastra los componentes volátiles de la fase gas hacia un adsorbente o trampa criogénica.



PURGA Y TRAMPA

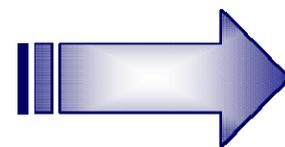
- Periódica. Sistema abierto
- Continua. Sistema cerrado

- Similar al espacio de cabeza dinámico, pero el gas inerte (N_2 , He, Ar) burbujea en el seno de la muestra.
- Para aumentar la extracción es necesario que la burbuja del gas inerte sea pequeña.
- El gas inerte arrastra los componentes volátiles hacia un adsorbente o trampa criogénica.



Closed-Loop Stripping (CLSA)

- Se recircula el gas inerte a través de la muestra y de la trampa adsorbente durante 2 horas. Posteriormente se eluye con un disolvente orgánico.



DESORCIÓN



Sistema automático

Terkmar Velocity XP®

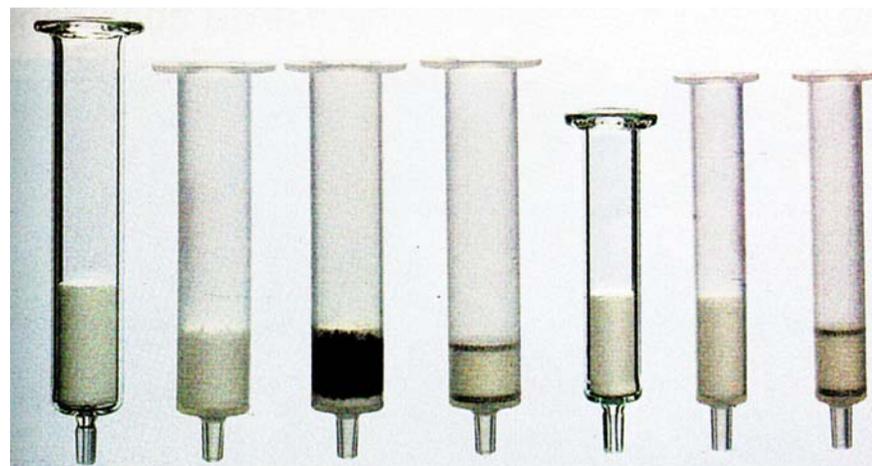
- Reduce el tiempo de análisis
- Automatización del proceso y control automático de posibles fuga del flujo de gas y de la formación y eliminación de espumas

EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SPE

- Diferente afinidad que presenta el analito (matriz) por una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc) o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido).
 - Puede realizarse en cartucho o en disco
- Miniaturización de las columnas cromatográficas convencionales
 - Extracción de muestras líquidas
 - El enriquecimiento y/ o purificación de los extractos obtenidos por cualquiera de las técnicas comentadas anteriormente

NOMBRES COMERCIALES

Sep-Pak (Waters), *Bond Elut* (Analytichem International), *TechElut* (HPLC Technology), *Extra-Sep* (Activosn), *Acubond* (J&W) y *Extrelut* (Merck).



Aplicaciones

- Eliminación de interferencias: proteínas de fluidos biológicos, grasas de alimentos, etc. (50% de su uso)
- Preconcentración del analito: se alcanzan factores de enriquecimiento muy elevados (30% de su uso)
- Cambio de fase: el analito se encuentra en una emulsión, suspensión o un disolvente incompatible con la técnica de determinación final
- Conservación y transporte: muestreo de campo

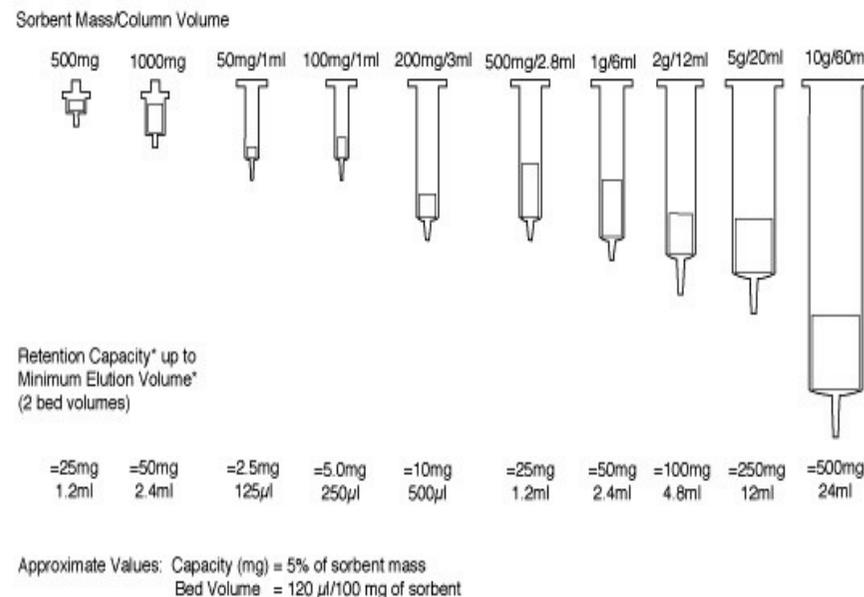
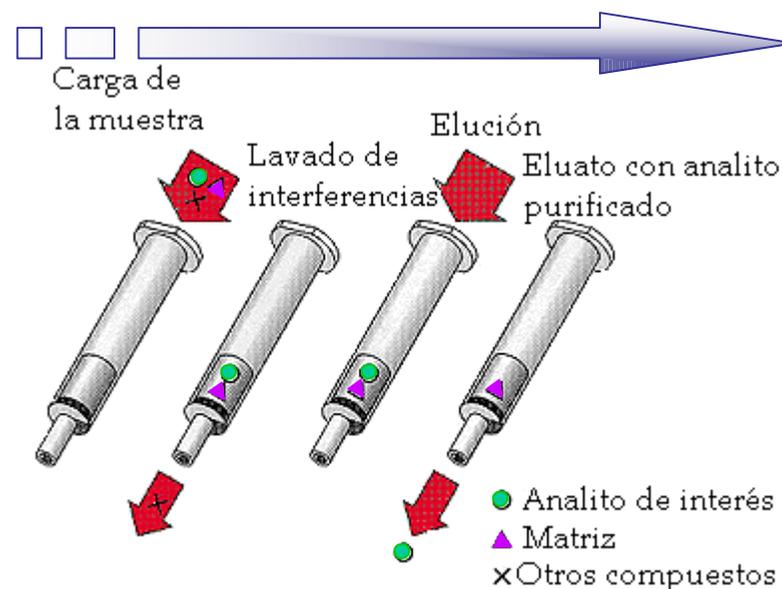
Ventajas

- Rapidez
- Bajo consumo de disolventes
- Mayor número de muestras/ run

Muestras líquidas

- Paso de la muestra a través de la fase sólida
- Retención de los analitos
- Elución con disolvente adecuado

- Capacidad del adsorbente: máxima cantidad de analito que es capaz de retener una cantidad determinada de adsorbente (en compuestos a nivel traza no resulta un problema)
- Volumen de ruptura: volumen máximo de muestra que puede hacerse pasar a través del adsorbente sin pérdidas del analito



Muestras líquidas

- Adsorbentes inorgánicos como silicagel, alúmina y florisil
- Fases enlazadas a materiales de sílica:
 - octadecil, octil, hexil, etil, ciclohexil, fenil, cianopropil, diol, aminopropil, N-propiletlenodiamina, sulfonilpropil, carboximetil, dietilaminopropil, etc.)
- Resinas de intercambio aniónico y catiónico (ácido carboxílico, ácido propilsulfónico, ácido bencenosulfónico, amina primaria/ secundaria, aminopropilo, amina cuaternaria)
- Polímeros (ej. estireno divinilbenceno o polivinilpirrolidina)
- Resinas quelantes
- Fases especiales

Muestras líquidas

	TIPO DE SORBENTE		
	Gel de sílice, florisil, alúmina, fase enlazada amino o diol	Octadecil, Cianopropil	Cambio iónico
<i>Disolvente para aplicar la muestra</i>	hexano, tolueno, diclorometano	agua, <i>buffers</i>	agua, <i>buffers</i>
<i>Disolventes de elución</i>	Acetato de etilo, acetona, acetonitrilo	metanol/agua; soluciones acetonitrilo/aguasalinas	<i>buffers</i> ,
<i>Orden elución de los componentes de la muestra</i>	menor a mayor polaridad	primero los más menos polares	primero ionizados
<i>Cambio disolvente para eluir solutos retenidos</i>	incrementar polaridad del disolvente	disminuir fuerza polaridad del disolvente	incrementar iónica del disolvente, variar e pH



Discos laminares
Bakerbond Speedisk[®]C₁₈

VENTAJAS

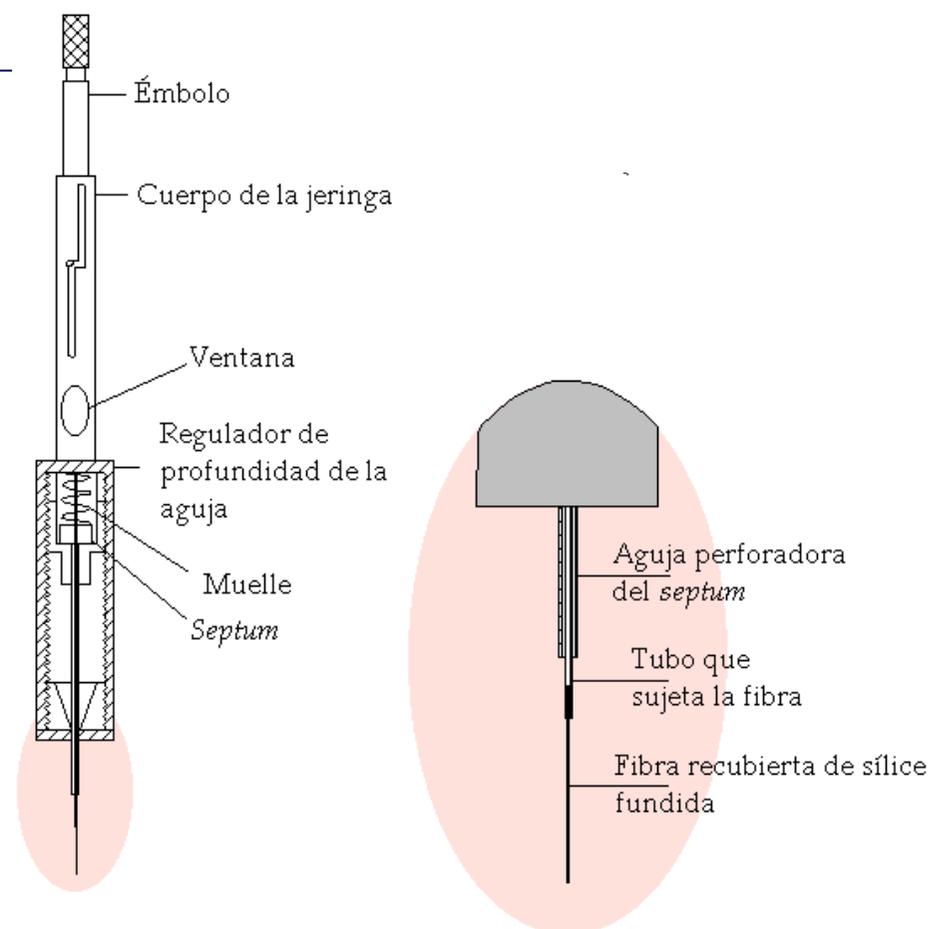
- Procesado de muestras sin necesidad de filtrado previo
- Elevados flujos de paso de muestra(mayor caudal, por ejemplo, 30mL/ min frente a 5mL/ min)

INCONVENIENTES

- Elevado coste

MICRO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA SPME

- SPME utiliza una fibra de sílice fundida cubierta con un adsorbente (polidimetilsiloxano, poliacrilato, divinilbenceno, etc.) incluida en una jeringa GC modificada para extraer muestras y pasar los analitos directamente al inyector del cromatógrafo.



Muestras líquidas

1. Atravesar el *septum* del vial de la muestra
2. Exponer la fibra a la muestra
3. Retraer al fibra y extraer el dispositivo

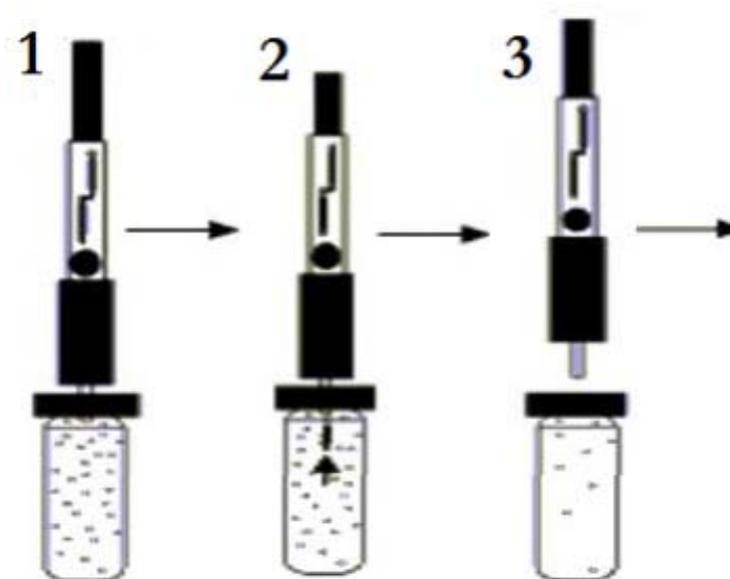
Directa o
inmersión

Espacio de
cabeza

- Dejar volumen 30-50% del vial
- Mayor extracción y rapidez

- Rellenar más del 80% del vial (1-5 mL)
- Justo debajo de la superficie de la muestra

Importante fijar la posición de la fibra
(reproducibilidad)



$$n = K_{fs} V_f V_s C_o / (K_{fs} V_f + V_s)$$

K_{fs} = coeficiente de partición del analito entre la fibra y la matriz de la muestra

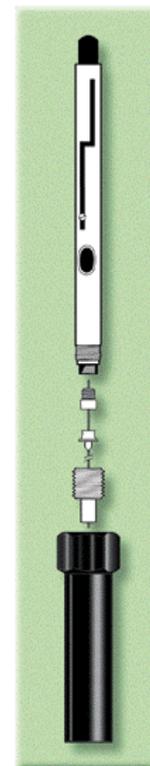
V_f = volumen de fase en la fibra

V_s = volumen de muestra

C_o = concentración inicial de analito en la muestra

Variables a OPTIMIZAR

- Polaridad de la fibra
- Porosidad/ área superficial
- Espesor de la fibra
- Tiempo de extracción: crítico establecer el equilibrio; 15-20 min (hasta 30s). Depende del tamaño de los compuestos, tipo de fibra, concentración de analito
- Temperatura: crítica en la precisión.
- Agitación: Reduce el tiempo de equilibrio. Precisión y exactitud. Crucial en semivolátiles por inmersión.
- Ajuste de pH



Fiber holder for automated sampling/HPLC



Fiber holder for manual sampling



Portable field sampler



VENTAJAS DE LA SPME

Rapidez: el tiempo de equilibrio es de 2-15 minutos

Sensibilidad: se alcanzan límites de detección de partes por trillón empleando detectores GC-MS

Economía: se reduce el gasto de disolventes y material, ya que las fibras son reutilizables (la vida de las fibras depende de las condiciones de uso, pudiendo emplearse hasta 100 veces)

Versatilidad: permite emplear cualquier cromatógrafo de gases o GC-MS con cualquier sistema de inyección

COMPARACIÓN TÉCNICAS PARA ANÁLISIS DE MUESTRAS LÍQUIDAS)

TÉCNICA	LÍMITE DE DETECCIÓN	PRECISIÓN (% RSD)	COSTE	TIEMPO	USO DISOLVENTE
<i>Purge & Trap</i>	ppb	1-30	Alto	30 min	No
<i>Stripping-CLSA</i>	ppt	3-20	Alto	2 h	No
Espacio de cabeza	ppm		Bajo	30 min	No
LLE	ppt	5-50	Alto	1 h	1000 mL
SPE	ppt	7-15	Medio	30 min	> 100 mL
SPME	ppt	< 1-12	Bajo	5 min	No

MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y LIMPIEZA

ESTA ETAPA FRECUENTEMENTE DETERMINA EL TIEMPO TOTAL DE ANÁLISIS Y EL ÉXITO DEL MISMO

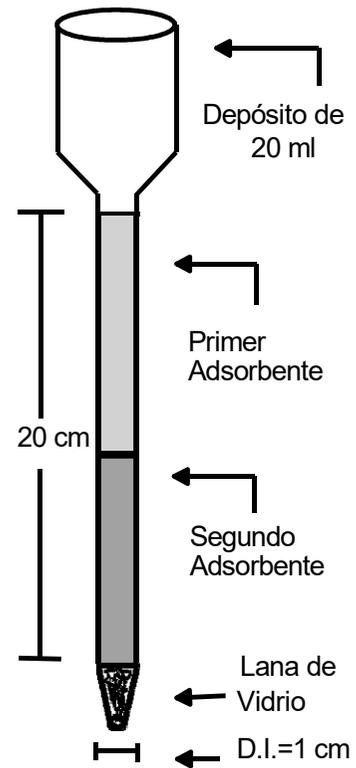
- Eliminación eficiente de las interferencias de la matriz
- Concentración o dilución del analito
- Preparación del analito en la forma más adecuada para el análisis final por cromatografía



Sistemas de "clean-up"

MÉTODOS DE PURIFICACIÓN Y LIMPIEZA CROMATOGRÁFICOS

COLUMNA DE RELLENO



Muestras líquidas

Gel de sílice	Ampliamente utilizado como adsorbente general. Ligeramente ácido. Se activa calentándolo a 180°C 8 - 12h
Alúmina	Disponible en forma neutra (pH 6.9 - 7.1), ácida (pH 3.5-4.5) y básica (pH 10 - 15). La neutra se emplea para todas las aplicaciones. La básicas tiene fuertes propiedades de intercambiador catiónico en disoluciones acuosas y se emplea para separar sustancias lábiles en medio ácido. La ácida actúa como cambiador aniónico y se emplea para separar ácidos orgánicos. Se activa a 400°C 8 - 12 h.
Florisil	Ampliamente utilizado para la limpieza de extractos de pesticidas. Adsorción irreversible de compuestos básicos. Se activa calentando a 130°C 8 - 12 h.
Tierra de diatomeas (celite)	Se emplea ocasionalmente como adsorbente de moléculas polares o muestras lábiles.
Carbón	<u>Adsorbente general para eliminar especies orgánicas en muestras acuosas. Elevada área superficial.</u> Ampliamente utilizados para recuperar compuestos traza orgánicos de muestras de acuosas. Elevada afinidad por compuestos orgánicos neutros; químicamente inerte y baja retención de agua. Los analitos se recuperan por elución con <u>disolventes orgánicos o por desorción térmica.</u>
Polímeros porosos	
Cambiadores iónicos	Empleados para la recuperación de sustancias ácidas y básicas tales como los fenoles, amidas, esteroides, ácidos orgánicos y aminoácidos.
Geles de porosidad controlada	No son materiales adsorbentes. Se emplean por exclusión por tamaño. Los geles compatibles con disolventes orgánicos (Sephadex LH -20 y Bio -Beads SX) se emplean para separar pequeñas moléculas de analitos de la masa de la matriz de alto peso molecular. Los geles compatibles con agua se emplean <u>para recuperar moléculas bioquímicas</u>

Sistemas de extracción de contaminantes orgánicos en matrices líquidas

ADSORBENTE	Ejemplo de uso	Formas disponibles
Alúmina	Analitos no polares con interferentes polares. Ej. pesticidas, hidrocarburos ésteres	Neutra, ácida, alcalina Se activa a 400°C durante 8-12 h
Silica gel	Alcoholes, ácidos orgánicos, especies polares	Generalmente activado, puede ser desactivado Se activa a 180°C durante 8-12 h
Florisil	Muy utilizado en procesos de limpieza, particularmente para pesticidas,	Se activa a 130°C durante 8-12 h
Carbón	Adsorbente general de Compuestos orgánicos elevada área superficial	Activado
GELES DE POROSIDAD CONTROLADA	Materiales no adsorbentes se emplean por exclusión de tamaño. Compatibles con disolventes	Geles de poliestireno, polivinilacetato; dextranos ligados, acrilamida, agarosa, etc.

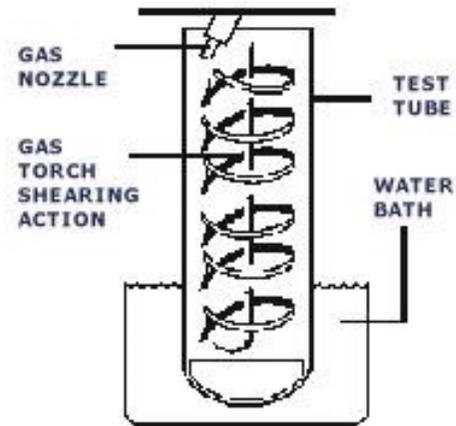
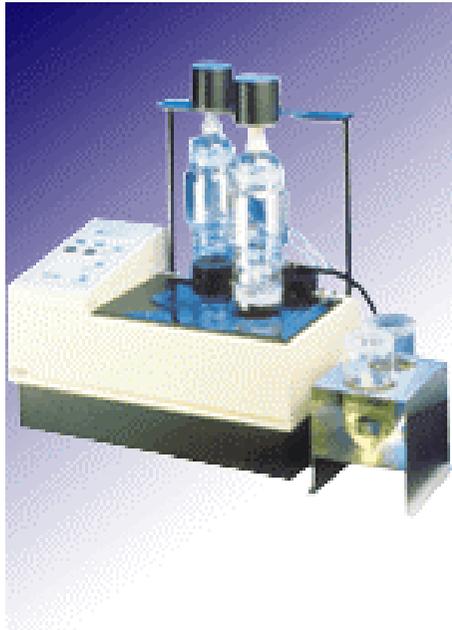
SISTEMA DE CONCENTRACIÓN AUTOMÁTICO



Syncore polyvap

SISTEMA DE CONCENTRACIÓN AUTOMÁTICO

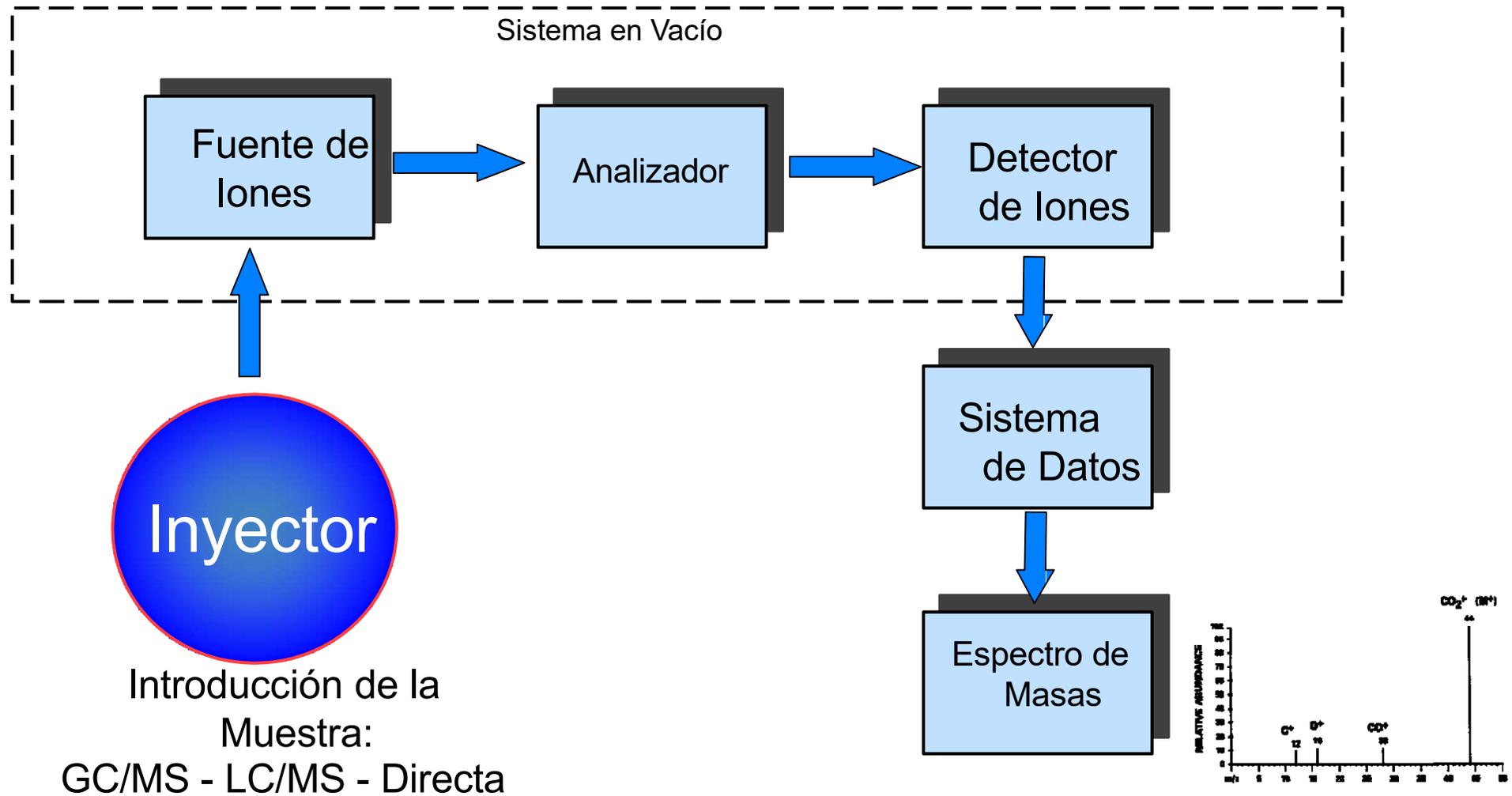
Turbo Vap II-



Turbo Vap II-ASE



Diagrama de un Espectrómetro de Masas



VALIDACIÓN DE MÉTODOS

- ADECUACIÓN AL USO PREVISTO
- ¿OPTIMIZAR= VALIDAR?
- REQUISITOS: equipos adecuados, personal cualificado, instalaciones correctas, material de calidad.
- ¿VALIDAR=CONTROL DE CALIDAD?

¿CUANDO DEBO VALIDAR?

- Métodos diseñados por el laboratorio.
- Métodos de ensayo no normalizados
- Métodos normalizados fuera de su ámbito de aplicación
- Métodos normalizados modificados por el laboratorio

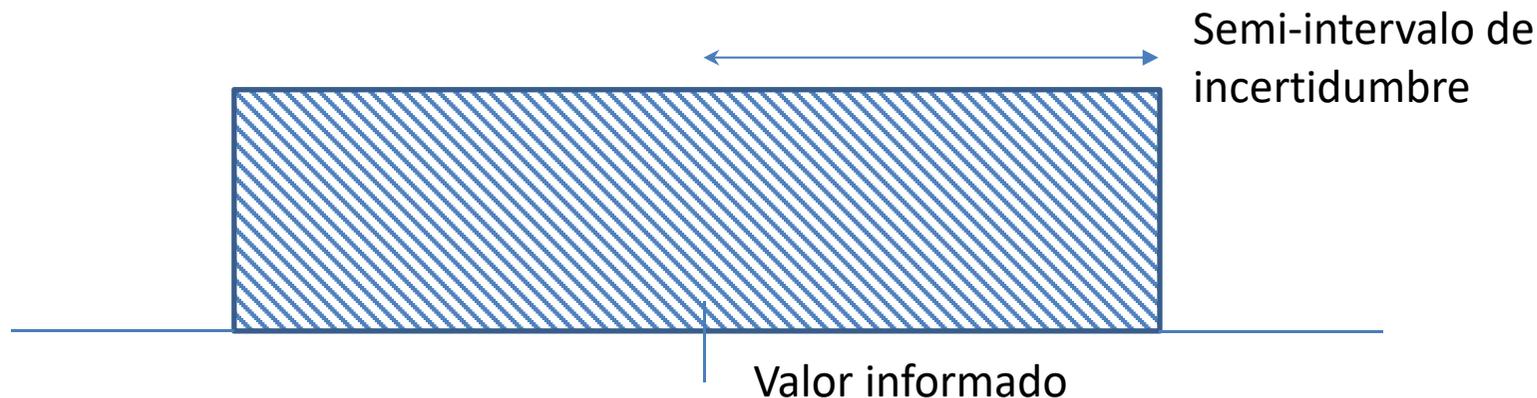
PARÁMETROS A VALIDAR

TIPO DE ENSAYO	PARÁMETROS A ESTUDIAR
ENSAYO CUALITATIVO	SELECTIVIDAD LÍMITE DE DETECCIÓN
ENSAYO CUANTITATIVO	SELECTIVIDAD LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN EXACTITUD PRECISIÓN LINEALIDAD INTERVALO DE TRABAJO INCERTIDUMBRE

INCERTIDUMBRE

La incertidumbre es el intervalo dentro del cual se encontrará, con una probabilidad determinada, el valor verdadero del analito analizado.

Dentro del resultado informado +/- el semintervalo de incertidumbre debe encontrarse el valor verdadero de la muestra.



INCERTIDUMBRE

Indica la confianza o “calidad” del resultado informado por el laboratorio.



La incertidumbre es un cálculo,
no una medida

Hay que identificar y calcular
TODAS las contribuciones

Incetidumbres demasiado pequenas = SOSPECHA
En métodos cromatográficos: 10-50 %

INCERTIDUMBRE: CÁLCULOS

MEDIDAS DIRECTAS	MÉTODO DE “CAJA NEGRA”
Identificación de fuentes de error	Determinar la exactitud en validación
Cuantificación de los errores como desviaciones típicas	Determinar la precisión en la validación
Sumar las desviaciones típicas en forma de varianzas	Considerar las incertidumbres de los materiales de referencia empleados en la validación
Extender la incertidumbre al 95% de probabilidad	$I_{\text{método}} = I_{\text{exact}} + I_{\text{precisión}} + I_{\text{mr}}$

INCERTIDUMBRE

- La incertidumbre se podrá dar en valor absoluto o en porcentaje.
- El cálculo de la incertidumbre se realizará a cada uno de los niveles de la validación.
- Podemos agrupar los valores por tramos a asignar un valor máximo.
- La incertidumbre es nuestro “colchón de seguridad”
- No es necesario recalcular si no hay cambios, pero hay que controlar las contribuciones con el “CONTROL DE CALIDAD”

CONTROL DE CALIDAD

- COMPROBAR QUE EL MÉTODO FUNCIONA EN RUTINA CON LOS PARÁMETROS DE VALIDACIÓN
- **CONTROL INTERNO:**
- Periódico, en el rango de trabajo, patrones, MRC, criterios de aceptación y rechazo.
- **CONTROL EXTERNO:**
- Participación en ejercicios intercomparación

ACREDITACIÓN

An aerial photograph of a coastal city, likely San Sebastián, Spain, showing a dense urban area built on a hillside overlooking the sea. The city features a mix of traditional and modern architecture, a large marina with many boats, and a prominent white tower structure on a pier extending into the water. The sky is clear and blue.

**GRACIAS POR SU
ATENCIÓN**