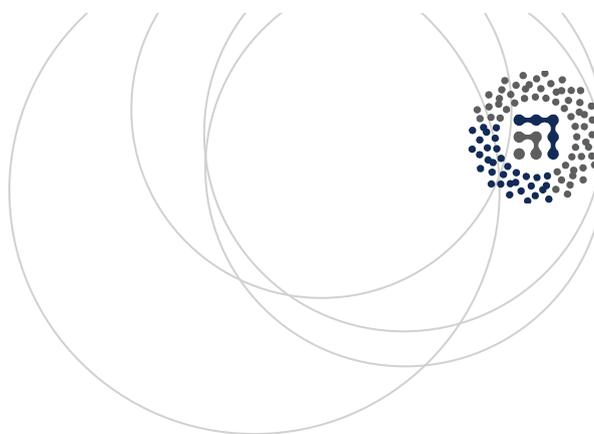


eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Gratu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado

Kimika Gradua / Grado en Química

Validación de métodos analíticos para la determinación de Amonio, Nitrato y Carbono Orgánico en aguas de estuario.

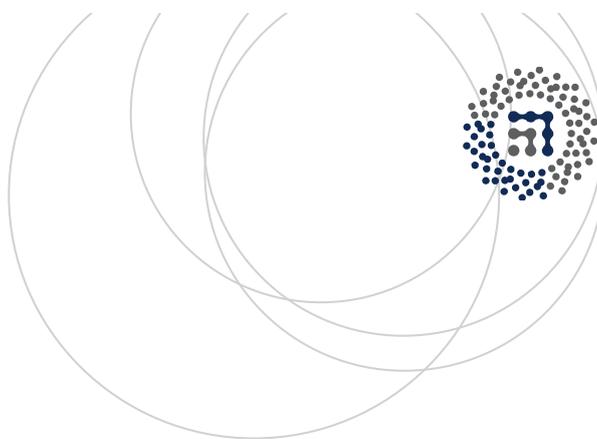
Egilea/Autor:

Sara Alberdi Martínez

Zuzendaria/Director/a:

Luis Angel Fernández Cuadrado

Leioa, 2015ko irailaren 2a /Leioa, 2 de septiembre de 2015



TRABAJO FIN DE GRADO

GRADO EN QUÍMICA

Validación de métodos analíticos para la determinación de Amonio, Nitrato y Carbono Orgánico en aguas de estuario.

MEMORIA PRESENTADA POR SARA ALBERDI MARTÍNEZ

FECHA Y MATRICULACIÓN: 2 DE SEPTIEMBRE DE 2015

DIRECTOR/A: LUIS ANGEL FERNÁNDEZ CUADRADO

DEPARTAMENTO: QUÍMICA ANALÍTICA

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	3
1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS	5
1.3. MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACION DE AMONIO Y NITRATO EN MUESTRAS DE ESTUARIO	6
1.4. MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACION DE CARBONO ORGÁNICO EN MUESTRAS DE ESTUARIO	8
2. OBJETIVOS	12
3. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO Y NITRATO MEDIANTE ELECTRODOS DE IÓN SELECTIVO (ISE)	13
3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES	13
3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	13
3.2.1. Intervalo lineal	14
3.2.2. Límite de detección	15
3.2.3. Medida de la concentración de NH₄⁺ y NO₃⁻ en las muestras.	16
3.2.4. Precisión de los análisis	17
3.2.5. Robustez de los procedimientos analíticos	18
3.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO	22
3.3.1. Intervalo lineal	22
3.3.2. Límite de detección	22
3.3.3. Medida de amonio en las muestras	23
3.3.4. Precisión del análisis	24
3.3.5. Robustez del procedimiento analítico	26
3.4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE NITRATO	27
3.4.1. Intervalo lineal	27

3.4.2.	Límite de detección	27
3.4.3.	Medida de nitrato en las muestras.....	28
3.4.4.	Precisión del análisis.....	29
3.4.5.	Robustez del procedimiento analítico	30
4.	VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO	
TOTAL.....	32
4.1.	REACTIVOS Y DISOLUCIONES.....	32
4.2.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	32
4.2.1.	Procedimiento de medida	33
4.2.2.	Intervalo lineal	36
4.2.3.	Calibrado y medida de una muestra	36
4.2.4.	Límite de detección y cuantificación.....	37
4.2.5.	Precisión del análisis.....	37
4.2.6.	Robustez del procedimiento analítico	38
4.3.	RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE TOC.....	40
4.3.1.	Calibrado.....	40
4.3.2.	Límite de detección y cuantificación.....	41
4.3.3.	Determinación de la concentración de carbono orgánico en una muestra	41
4.3.4.	Precisión del análisis.....	42
4.3.5.	Robustez del procedimiento analítico	45
5.	CONCLUSIONES.....	47
6.	BIBLIOGRAFÍA	49

1. INTRODUCCIÓN

La Organización Internacional para la Estandarización define la validación de un método analítico como “el proceso mediante el cual se demuestra que el método en cuestión es adecuado para alcanzar unos objetivos previamente establecidos, definidos en función de los requisitos o necesidades del cliente y de las posibilidades técnicas del laboratorio”[1].

Por tanto, la validación es el proceso por el cual se analiza si un método analítico es aceptable para la finalidad propuesta como solución a un problema analítico. La validación es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos mediante dicho método son fiables. Por tanto, se busca poder determinar con fundamento estadístico que el método es adecuado para los fines previstos. En este sentido, es importante que para el proceso de validación se asigne a un responsable de realizar dicha tarea de manera que esta se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable.

En este documento se denomina analito a la sustancia buscada o determinada en una muestra, que debe ser recuperada, detectada o cuantificada por el método y matriz al tipo de sustancia (líquida, sólida o gaseosa) compuesta que puede o no contener el analito de interés.

La validación de un método analítico debe establecer las características de desarrollo, las limitaciones de un método y la identificación de las variaciones que pueden cambiar dichas características [2] como, por ejemplo, las interferencias causadas por la matriz en la que esté contenida el analito, por lo que la validación debe detectar esas influencias y analizar el nivel de precisión que se pueda conseguir a partir de ellas.

Antes de iniciar la validación, el laboratorio debe tener establecido cuales son los requerimientos del método para establecer su alcance. Además, es esencial conocer el método a validar y su aplicabilidad, es decir, el analito, su concentración aproximada y la matriz (o matrices) en las cuales se encuentra. Cabe destacar que los requerimientos de validación pueden cambiar continuamente y variar ampliamente dependiendo del tipo de analito que se

quiera determinar, su matriz y la aplicabilidad del método analítico ya que los requerimientos de validación de un método analítico son muy diferentes dependiendo del contexto en el que se encuentre el analito y de las exigencias de la administración competente en cada caso (industria alimentaria, farmacéutica, medio ambiente, etc).

El desarrollo y la validación de un método analítico nuevo debe ser un proceso iterativo. Es decir, no puede separarse el proceso de validación de un método analítico del desarrollo de las condiciones del mismo [3] ya que hasta que no estén realizados los estudios de validación no es posible determinar si las condiciones del método son aceptables o no. De hecho, a menudo no es posible determinar con exactitud dónde termina el desarrollo del método y donde comienza la validación.

Los resultados de los estudios de validación tienen que indicar si es necesario hacer algún cambio en el procedimiento analítico habitual y una vez modificado se debe volver a realizar la validación para comprobar que el nuevo procedimiento se adecua al objetivo.

La validación de un método analítico debe realizarse cuando el método que se va a utilizar no esté normalizado [4] o se vaya a utilizar un método normalizado con una modificación significativa para comprobar que dicho cambio no produce una alteración significativa a la determinación del analito de interés. Los métodos no normalizados se corresponden con métodos que se han desarrollado por el laboratorio, métodos nuevos o métodos que se han utilizado en el laboratorio tradicionalmente pero que nunca han sido validados.

En el caso de la validación de un método empleado tradicionalmente por el laboratorio que aun no esté normalizado, la validación puede realizarse en base a los datos experimentales que se disponen en el laboratorio por lo que es necesario recopilar la mayor cantidad de datos históricos posibles. Por lo tanto, es una validación retrospectiva. Una vez ordenados y seleccionados los diferentes datos disponibles (curvas de calibrado, ensayos de repetitividad y reproducibilidad, cartas de control, etc.) se determinan los diferentes

parámetros de validación que se detallan en el apartado 1.1 y se evalúa si los datos obtenidos son aceptables.

Por otro lado, en el caso del desarrollo de un método nuevo, un método utilizado en otro laboratorio, un método que haya cambiado en el tiempo o para demostrar la equivalencia entre dos métodos se realiza la validación del método generando los datos experimentales necesarios para la determinación de los parámetros de validación y por lo tanto será necesario realizar un plan de validación y concretar los diferentes análisis que se deben realizar.

Además de la realización de una validación completa, en ocasiones se realiza una validación de verificación en el caso de métodos que una vez validados se quieran utilizar para un analito que se encuentre en otra matriz, que se quiera ampliar el método a otros analitos y en el caso de métodos validados que hayan sufrido una pequeña modificación como un cambio de detector o algún componente del equipo.

1.1. PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

Por lo general, los métodos para la validación deben contener estudios de selectividad, intervalo lineal, límite de detección, límite de cuantificación, exactitud, precisión y robustez [5]. Aunque hay un acuerdo general de la comunidad científica sobre el tipo de estudios que deben realizarse para obtener la validación de un método analítico, se encuentra una gran diversidad de estudios para indicar como deben desarrollarse [2].

La selectividad de un método analítico es el grado en que éste es capaz de cualificar y/o cuantificar el analito deseado en presencia de interferentes que habitualmente se encuentran en la matriz en la que se haya el analito. La selectividad se comprueba de acuerdo con el método analítico que se esté desarrollando. Habitualmente se analizan disoluciones estándar de concentración conocida del analito y se observan las variaciones entre ellas. En el caso de encontrar alguna diferencia significativa deberán ser identificadas y eliminadas. La sensibilidad permite observar la capacidad de respuesta

instrumental frente a una determinada cantidad de analito. Por lo que un método es sensible cuando una pequeña variación en la concentración del analito provoca una gran variación en la respuesta.

La precisión de un procedimiento analítico indica el grado de dispersión entre una serie de mediciones de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión se analiza mediante muestras homogéneas y auténticas pero en el caso de que no fuera posible obtener una muestra homogénea se puede realizar el análisis con muestras preparadas artificialmente. El análisis de precisión se considera en términos de repetitividad y reproducibilidad y se expresa habitualmente como la varianza, la desviación estándar o el coeficiente de variación de una serie de mediciones.

La repetitividad expresa la precisión bajo las mismas condiciones de medida en un corto intervalo de tiempo, normalmente en el mismo día, y la reproducibilidad expresa la variación entre las mediciones de la misma muestra realizadas en días diferentes. La precisión junto con la incertidumbre intrínseca de las medidas da lugar a la incertidumbre global de la determinación [6].

La exactitud expresa la cercanía de un resultado a un valor verdadero. Por tanto, se basa en la comparación de los resultados de un método con valores conocidos. Para ello se utilizan materiales de referencia certificados (CRM) que se encuentren en una matriz que sea similar a la de la muestra de interés.

El límite de detección del método es la cantidad mínima de analito en una muestra que puede ser detectada pero no cuantificada como un valor exacto. El límite de cuantificación es la menor cantidad de analito en una muestra que puede ser determinada cuantitativamente con precisión y exactitud. Estos dos límites se expresan como la concentración o cantidad de analito que puede ser detectado o cuantificado con un grado de certeza razonable.

El intervalo lineal de un procedimiento indica la capacidad del método para obtener resultados directamente proporcionales a la concentración de analito de la muestra dentro del intervalo definido. Por tanto, es el alcance del análisis

entre la parte superior e inferior de concentraciones de analito de la muestra para los que se ha demostrado que el procedimiento analítico posee un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectado por pequeñas variaciones de los parámetros del método y por lo tanto proporciona una indicación de la fiabilidad del procedimiento utilizado durante su uso normal. Por tanto, el objetivo de la determinación de la robustez es estudiar el método analítico describiendo las condiciones con las que se obtienen resultados confiables. Un método de ensayo es más robusto cuanto menos afectados se vean los resultados frente a una modificación de las condiciones analíticas que puedan afectar a dicho método (equipo, reactivos, flujos de gas, temperaturas, tiempos de reacción, estabilidad, etc.) [7].

Con los resultados obtenidos, el equipo responsable de la validación debe realizar los cálculos matemáticos, estadísticos y comparativos correspondientes [8] y de este modo evaluar los parámetros de validación y concluir si los criterios de aceptación del método se han cumplido y por tanto el método es aceptable o no.

Para el objetivo de la validación de la determinación de amonio, nitrato y carbono orgánico en muestras de agua de estuario, se discutirán los estudios y protocolos de validación llevados a cabo para asegurar la veracidad de los resultados obtenidos.

1.2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MUESTRAS

En esta investigación se ha realizado la validación de los métodos analíticos para la determinación de amonio, nitrato y carbono orgánico en muestras de agua de estuario.

Los estuarios son las regiones por donde los ríos descargan al mar, por lo que están vinculados con la influencia que ejercen las mareas en la unión de las aguas de río con las marítimas. Durante la pleamar, el agua marina ingresa al estuario y actúa como retención del agua que viene del río; en bajamar, en

cambio, la totalidad del agua entra con mucha fuerza en el océano. Por ello las muestras de agua de caracterizan por el proceso de mezcla de agua del río y agua del mar, dando lugar a muestras con diferente salinidad y por tanto diferente fuerza iónica. Durante un muestreo típico de aguas de estuario se obtienen muestras de agua de mar, muestras de río y muestras de diferente composición entre agua de río y de mar por lo que en cada una la matriz que contiene los analitos que se quieren medir es diferente. Además, el agua de estuario contiene gran variedad de iones y otros compuestos que pueden influir en la determinación del amonio, nitrato y carbono orgánico por lo que el efecto matriz es importante y deberá ser tenido en cuenta durante la realización de los experimentos de validación [9].

Por otra parte, aparece la dificultad de obtener muestras de referencia de los analitos que se quieren determinar en la matriz que se necesita y por tanto es necesario crear muestras de agua de mar artificial lo más parecidas posible a las muestras que se van a analizar.

1.3.MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACION DE AMONIO Y NITRATO EN MUESTRAS DE ESTUARIO

El método analítico elegido para la determinación de la concentración de amonio y nitrato en muestras de agua de estuario es la potenciometría mediante electrodos de ión selectivo (ISE por sus siglas en inglés) [10]. Además de este método, el amonio y el nitrato se pueden medir, entre otras técnicas frecuentes, con electroforesis capilar y cromatografía iónica pero se necesita tratar la muestra previamente a la realización del análisis y desalinizarla en algunos casos, por lo que el análisis se hace más complicado. Por otra parte, la principal ventaja del uso del ISE es que las muestras no necesitan pretratamiento y se pueden medir directamente mediante adiciones estándar para eliminar o minimizar el efecto matriz [9] , por lo que la determinación de la concentración de los iones se hace mucho más sencilla que con otros métodos.

El objetivo de una determinación potenciométrica es obtener información sobre

la composición de una disolución mediante la medida del potencial que aparece entre dos electrodos. La medida del potencial se realiza bajo condiciones reversibles, en forma termodinámica, y esto implica que se debe dejarse que transcurra el tiempo suficiente para llegar al equilibrio que se establece entre la membrana del electrodo y la disolución que contiene la muestra. Uno de los electrodos deberá ser el de referencia, de potencial constante y no debe sufrir cambios entre los experimentos. El cambio del potencial del sistema ha de ser debido únicamente al cambio del electrodo indicador, en este caso del electrodo de ion selectivo.

Los electrodos de ion selectivo son electrodos que poseen una membrana sensible y selectiva a un ion en particular. En este trabajo de validación se utilizaron dos electrodos de ión selectivo, uno de amonio y otro de nitrato. Cuando se sumerge el electrodo selectivo en la muestra, en su membrana se desarrolla un potencial debido a una reacción selectiva y espontánea. El electrolito del electrodo de referencia debe ser elegido teniendo en cuenta que no debe reaccionar con la muestra, contaminarla ni contener el analito que se esté midiendo. Además, es necesario que la fuerza iónica del electrolito sea superior a la de la muestra, en este caso el electrodo de referencia utilizado es de $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$ en medio KCl 3M. Otra variable que es importante tener en cuenta durante la utilización del ISE es la temperatura ya que ésta afecta a las medidas del potencial por lo que es necesario que permanezca constante durante el análisis, tanto durante la calibración como durante la medida de las muestras. Por último, el potencial de un ISE responde a la actividad de los iones y no a su concentración por lo que es necesario que tanto la fuerza iónica como la agitación de la muestra se mantengan constantes durante todo el proceso de medida.

La diferencia de potencial tiene relación directa con la actividad del ion que se está analizando, de acuerdo con la ecuación de Nernst (Ecuación 1.1)

$$E = E^o + \frac{RT}{nF} \ln Q \quad (1.1)$$

donde E = potencial de la disolución (mV), E° = potencial de referencia, R = constante de los gases, T = temperatura absoluta (K) , n = factor de valencia, F = constante de Faraday y Q = actividad del ión específico.

A pesar de que los electrodos selectivos de iones poseen un extraordinario potencial para el análisis de analitos importantes desde el punto de vista ambiental como fosfatos, nitritos y nitratos, se considera que estos dispositivos carecen de sensibilidad y selectividad para el análisis de trazas de analitos en muestras con matrices complejas como las de estuario que se pretenden validar. Aun así, hay varios artículos de los años 1970 y 1980 que demuestran que es posible utilizar el ISE en estos casos siempre que el análisis se lleve a cabo correctamente, con las condiciones de limpieza y estabilidad adecuadas para su buen funcionamiento.

1.4. MÉTODO DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACION DE CARBONO ORGÁNICO EN MUESTRAS DE ESTUARIO

La determinación de carbono orgánico de las muestras se realiza mediante un equipo específico para la medida de TOC [11-12]. Este equipo es un analizador automático que permite la medida del Carbono Total (TC), del Carbono Inorgánico (IC), del Carbono Orgánico Total (TOC) y del Carbono Orgánico No Purgable (NPOC). La medida se realiza por oxidación catalítica de los compuestos de carbono por combustión a 680°C sobre un catalizador de Pt con base de alúmina y la posterior detección del CO₂ generado con un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR) [13].

La medida de la cantidad de materia orgánica se puede establecer directamente a través del TOC o bien indirectamente a partir de la capacidad reductora del carbono existente en una muestra mediante la determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) y la Demanda Química de Oxígeno (DQO) [14]. A pesar de ello, el TOC es una medida más rápida, cuidadosa y directa del contenido orgánico ya que no depende del estado de oxidación inicial de la

materia, ni mide otros enlaces orgánicos, como nitrógeno e hidrogeno, o inorgánicos que pueden contribuir en la demanda de oxígeno medida.

En el valor de TOC contribuyen distintas sustancias, desde compuestos de origen natural, fruto de la actividad de los vegetales y animales, hasta compuestos sintéticos presentes como resultado de la actividad humana. Por tanto, esta concentración dependerá del lugar de recogida de la muestra y su uso.

Como se ha mencionado anteriormente, el método para la determinación de TOC se basa en una oxidación catalítica a 680°C en un horno que posee una columna de combustión con un catalizador de platino embebido en pequeñas esferas de Al_2O_3 (Figura 1.1). Como producto de la combustión se genera agua que se vaporiza y se elimina mediante una posterior condensación y el carbono (orgánico e inorgánico) que se oxida a CO_2 . Este dióxido de carbono se transporta empleando una corriente de aire exento de CO_2 y se mide mediante un detector de infrarrojos no dispersivo (NDIR). De esta forma se calcula el TC. El IC, que contempla dióxido de carbono disuelto, carbonatos y bicarbonatos, se obtiene mediante la acidificación de la muestra con ácido clorhídrico, proceso en el que se forma CO_2 que se analiza con el NDIR. El TOC se establece por diferencia de los anteriores (TC-IC) o aproximando el NPOC al TOC cuando la concentración de carbono inorgánico es mucho mayor que la del TOC, como indica el manual de uso del equipo. En este caso, el NPOC se obtiene mediante la acidificación de la muestra para eliminar todo el IC y una posterior agitación con el gas portador para eliminar todo el carbono orgánico purgable; entonces, la muestra acidificada y agitada se introduce en el tubo de combustión donde es oxidada para formar CO_2 . El transporte del CO_2 se realiza mediante el gas portador que antes de llegar al detector se hace pasar por una trampa de humedad y unos tubos lavadores de haluros para eliminar el vapor de agua y los haluros de la corriente de gas. En la Figura 1.2 se muestra un esquema del equipo de TOC- V_{CSN} utilizado en este trabajo.

carbono ya que la columna de combustión oxida toda la muestra indistintamente. El problema de la salinidad es que después de una serie de medidas de muestras de salinidad alta (unas 40-60 muestras según la experiencia obtenida durante la elaboración de este trabajo), la sal cristaliza en la columna de combustión formándose un tapón e impidiendo que todo el dióxido de carbono generado llegue al detector.

Por otra parte, el método de análisis por Infrarrojo no dispersivo (NDIR) ofrece el único método práctico libre de interferencias para detectar CO₂ en el análisis del TOC. La principal ventaja de usar este método es que se mide el CO₂ generado por oxidación del carbono orgánico en el reactor de oxidación, de modo directo y específico, en vez de depender de la medida de un parámetro secundario corregido, como el usado en las medidas de conductividad. El producto de oxidación fluye continuamente dentro y fuera del detector. En una región de absorción de la luz infrarroja específica del CO₂, en torno a 2350 cm⁻¹, se mide el gas que fluye a través del detector. Por otra parte, se realiza una segunda medida de referencia que no es específica del CO₂ y el resultado de la diferencia se relaciona con la concentración de CO₂ en el detector en ese instante. La suma de las medidas es un pico en una gráfica que se integra y relaciona con la concentración total de CO₂ que posee la muestra. La Figura 1.3 muestra una señal típica obtenida con este detector.

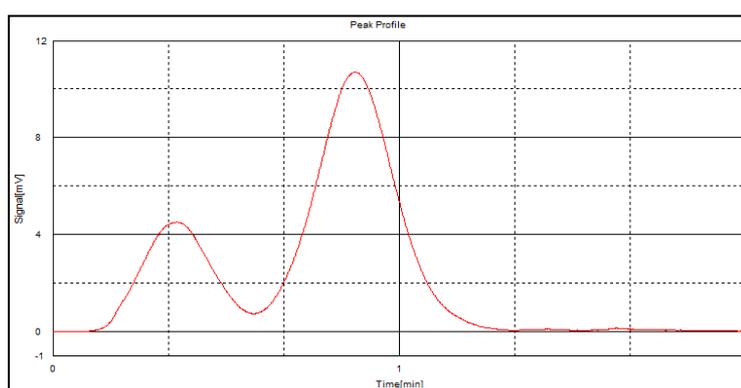


Figura 1.3. Señal típica de CO₂ obtenida con el equipo de TOC.

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta todos los aspectos que se han considerado en la introducción, el principal objetivo de este trabajo es la validación de métodos analíticos nuevos como son la determinación de amonio, nitrato y carbono orgánico total en muestras de aguas de estuario ya que, como se ha mencionado con anterioridad, no se han encontrado estudios para este tipo de muestras. A partir de este objetivo principal se pueden señalar los siguientes objetivos particulares:

- Comprobar la influencia de la diferente salinidad de las muestras en el desarrollo de métodos potenciométricos mediante ISE para la medida de nitrato y amonio y del equipo de TOC-V_{CSN} para la determinación de carbono orgánico.
- Con la ayuda de cálculos estadísticos, determinar la incertidumbre asociada a la determinación de la concentración de amonio, nitrato y carbono orgánico en las muestras.
- Analizar la posible variación de las muestras a lo largo del tiempo para comprobar su estabilidad.

3. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO Y NITRATO MEDIANTE ELECTRODOS DE IÓN SELECTIVO (ISE)

3.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los reactivos necesarios para llevar a cabo la validación de la determinación de amonio y nitrato son NH_4Cl , NH_4NO_3 , NaNO_3 y KNO_3 . Todos ellos se obtuvieron de Panreac (Panreac Química S.L.U, Barcelona, Spain). También se utilizó agua desionizada de calidad MilliQ (Millipore Co., MA, USA).

Se preparó agua de mar artificial de fuerza iónica 0.73 M a partir de 0.53 M de NaCl , 0.054 M de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.029 M de Na_2SO_4 , 0.011 M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.010 M de KCl y $2.39 \cdot 10^{-3}$ M NaHCO_3 . Se preparó además otra disolución de agua de mar artificial de fuerza iónica 0.43 M para lo que se realizan los cálculos necesarios a partir de los componentes de la disolución de 0.73 M.

Además se prepararon dos disoluciones de 3500 y 7000 mg/L de NH_4^+ en medio Cl^- y otras dos de las mismas concentraciones en medio NO_3^- en agua desionizada. Asimismo, se prepararon dos disoluciones de 3600 y 18000 mg/L de NO_3^- en medio Na^+ y otras dos de las mismas concentraciones en medio K^+ en agua desionizada. Por último, fue necesario preparar dos disoluciones de 40 y 3600 mg/L de NH_4^+ en agua de mar artificial de fuerzas iónicas 0.73 y 0.43 M, respectivamente, y dos disoluciones de 30 y 18000 mg/L de NO_3^- en agua de mar artificial de fuerzas iónicas 0.73 y 0.43 M, respectivamente.

3.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Como se ha mencionado en la introducción, la técnica analítica utilizada para la determinación de la concentración de amonio y nitrato en agua de estuarios es la potenciometría mediante el uso de electrodos selectivos de los respectivos iones. La principal ventaja de esta técnica es que las muestras de agua de estuario no necesitan pretratamiento y el análisis se realiza sobre la muestra original.

A continuación se detalla el procedimiento experimental llevado a cabo para validar el procedimiento analítico seguido para la determinación de la concentración de amonio y nitrato mediante ISE. Cabe destacar que al aumentar la concentración de NH_4^+ aumenta el potencial de la disolución y al aumentar la concentración de NO_3^- disminuye el potencial de la disolución.

3.2.1. Intervalo lineal

El análisis del intervalo lineal del ISE para los dos analitos se llevó a cabo mediante la adición de cantidades controladas de dos disoluciones estándar de ambos sobre una muestra de 50 mL de agua de mar artificial con una fuerza iónica de 0.73 M. El procedimiento es análogo al empleado en el caso de un calibrado realizado por adiciones estándar. Las adiciones se llevaron a cabo con una bureta automática (Metrohm AG, Herisau, Switzerland), con agitación y temperatura constante de 25°C. Para ello se utilizó una celda con camisa termostática de forma que entra y sale agua atemperada previamente en un baño termostático. La medida se realizó con un electrodo de ión selectivo de amonio (Crison, Hach Lange Spain S.L.U., Barcelona, Spain) o de nitrato (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) y un electrodo de referencia de $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$ (Orion, Thermo Fisher Scientific, USA) unidos a un voltímetro (Metrohm AG, Herisau, Switzerland) con 1 mV de precisión.

El fabricante de los electrodos en el manual de uso de los mismos menciona un intervalo lineal de medida de 0.9 a 1800 mg/L para el amonio y de 0.4 a 62000 mg/L en el caso del nitrato. Las muestras de agua de estuarios en experimentos realizados previamente mostraron que contienen entre 0.8 y 50 mg/L de ión amonio y entre 5 y 225 mg/L de ión nitrato; por tanto, estos son los intervalos de concentraciones para los que se necesita comprobar la respuesta lineal.

Las adiciones comenzaron añadiendo a los 50 mL de agua de mar artificial una disolución estándar de aproximadamente 40 mg/L de NH_4^+ o 30 mg/L de NO_3^- (dependiendo del analito que se esté midiendo) en disolución de agua de mar artificial de fuerza iónica 0.73 M, ya que el analito que se está midiendo se

encuentra en tan baja concentración que no aporta fuerza iónica y es necesario que las condiciones de medida sean constantes durante todo el análisis. Con esta disolución se cubrió la primera parte del intervalo lineal del electrodo y por tanto la concentración mínima de analito necesaria para producir un cambio de 1 mV en la medida del potencial de la muestra que es la precisión del voltímetro. La zona alta del intervalo se analizó añadiendo a la muestra una disolución estándar de aproximadamente 3600 mg/L de NH_4^+ o de 18000 mg/L de NO_3^- en una disolución de agua de mar artificial de fuerza iónica 0.43 M, ya que el 0.3M restante para mantener la fuerza iónica constante lo aporta el NH_4Cl en el análisis del amonio y el NaNO_3 en el caso del nitrato. Las adiciones se realizaron intentando que el cambio del potencial fuese mínimo. Además, el cambio de concentración de las disoluciones estándar es importante para que la muestra de partida no aumente su volumen más de un 5% y las condiciones de medida no varíen.

3.2.2. Límite de detección

Como se ha descrito en la introducción, el límite de detección (LOD) es la concentración mínima de analito que es detectable con el equipo de medida y la incertidumbre requerida que se utiliza para la determinación de un analito y el límite de cuantificación (LOQ) es la mínima concentración que se puede determinar con dicha incertidumbre. Para el cálculo de los límites de detección y cuantificación es necesario medir repetidamente una muestra blanco (que no contenga el analito que se está analizando), hallar la media de las señales (S_{blanco}) y su desviación estándar (σ_{blanco}). Las señales correspondientes a LOD y LOQ (S_{LOD} y S_{LOQ} respectivamente) se calculan como se muestra en las Ecuaciones 3.1 y 3.2 [15].

$$S_{\text{LOD}} = S_{\text{blanco}} + 3\sigma_{\text{blanco}} \quad (3.1.)$$

$$S_{\text{LOQ}} = S_{\text{blanco}} + 10\sigma_{\text{blanco}} \quad (3.2.)$$

Las concentraciones correspondientes a LOD y LOQ se calculan utilizando la ecuación de la recta de calibrado.

El problema que se presenta con el tipo de muestras que se están analizando en este trabajo es que no se pueden obtener muestras que no contengan el analito. En el caso de tener una muestra sin el analito que se quiere medir (amonio o nitrato) no se podría determinar la concentración ya que la medida se realiza por adiciones estándar.

Por todo ello, el límite de detección se encuentra en la mínima concentración que produce un cambio cuantitativo en el potencial de la disolución (1 mV en este caso que es la precisión con la que mide el voltímetro utilizado). El límite de cuantificación en este caso no podría calcularse o sería igual que el límite de detección.

3.2.3. Medida de la concentración de NH_4^+ y NO_3^- en las muestras

Como se ha comentado en la introducción, las muestras de estuario poseen distinta salinidad y la fuerza iónica es diferente en cada una de ellas. Para evitar el efecto que esto pueda producir en la determinación de la concentración de amonio y nitrato, la medida de las muestras con la técnica del ISE se realizó mediante el método de adiciones estándar [16-17].

Para ello, se tomaron 25 mL de una muestra y se vertieron en una celda de medida termostaticada a 25°C y con agitación constante. Se introdujo en la muestra el electrodo selectivo del ión que se quiso determinar (NH_4^+ o NO_3^-) y el electrodo de referencia de $\text{Ag}_{(s)}/\text{AgCl}_{(s)}$ y se dejó estabilizar hasta que la medida que indicó el voltímetro fue constante. Una vez estabilizada, se realizó la primera adición de una disolución estándar de amonio o nitrato tal como se muestra en la Tabla 3.1 como ejemplo para la determinación del amonio. Hasta que la medida no fue estable no se realizó la siguiente adición.

Las adiciones tienen que ser de la misma concentración que la esperada en la muestra y el volumen el menor posible para que el incremento del volumen total de la disolución no sea demasiado grande ($\leq 5\%$) y las condiciones de medida no se vean alteradas. Para ello se emplearon dos disoluciones estándar

de cada analito de concentraciones 3500 y 7000 mg/L para el NH_4^+ y 5000 y 20000 mg/L para el NO_3^- .

Tabla 3.1. Ejemplo de las adiciones utilizadas para la determinación de NH_4^+ en las muestras.

	V añad. (mL)	$[\text{NH}_4^+]$ añad. (mg/L)
Inicial	0	0
Adición 1	0.1	27
Adición 2	0.2	54
Adición 3	0.3	81
Adición 4	0.4	108

3.2.4. Precisión de los análisis

La estimación de la incertidumbre en la determinación de la concentración de amonio y nitrato mediante adiciones estándar [18] se llevó a cabo mediante cálculos estadísticos. Primeramente se estimó el error de la concentración [S_{xe}] debido al método de las adiciones estándar según la Ecuación 3.3.

$$S_{xe} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{y_m^2}{b^2 \sum (x_i - x_m)^2}} \quad (3.3)$$

En la ecuación anterior $S_{y/x}$ representa el error estadístico calculado a partir de los errores aleatorios en la dirección del eje y; b la pendiente de la recta de calibrado; n el número de puntos de la ecuación; y_m^2 el valor medio de las medidas en el eje y. Por último, $(x_i - x_m)$ es la diferencia entre el valor de x en cada punto de la recta y el valor medio de x en todas las determinaciones.

Tras ello, se realizó la propagación de errores mediante el método de Kragten para obtener la incertidumbre intrínseca de la determinación de la concentración del analito deseado [19].

La medida de la precisión del análisis del amonio y nitrato en agua de estuarios se realizó como en anteriores ocasiones mediante adiciones estándar. Con el

objetivo de analizar la repetitividad del análisis se realizaron 10 medidas de la misma muestra en un mismo día y para la reproducibilidad tres repeticiones en diferentes días con una semana de diferencia entre ellos. De esta manera, se obtuvo la variación del resultado de la medida en el día y entre días.

Para ello se prepararon dos disoluciones estándar de 7000 mg/L de NH_4^+ y 20000 mg/L de NO_3^- en agua desionizada que se utilizaron para realizar las adiciones de amonio y nitrato a las muestras. El volumen de adición fue de 0.1 μL en el caso de la determinación del amonio y de 0.165 μL en el del nitrato.

3.2.5. Robustez de los procedimientos analíticos

La robustez del método analítico empleado para la determinación del amonio y nitrato se investigó mediante el test de Youden y Steiner [7] mediante un diseño experimental a partir de la elección de hasta 7 variables que pueden afectar a la estabilidad del análisis. La combinación de estas variables da lugar a 8 experimentos diferentes mediante los que se determina si el cambio inadvertido de alguna de las condiciones de medida afecta a la determinación de la concentración de los analitos. Cabe destacar que estos parámetros no son variables de optimización del método sino posibles cambios aleatorios que pueden darse durante el análisis y afectar al valor de la concentración obtenido.

En estos experimentos, la medida de las muestras se realizó mediante adiciones estándar sobre 25 mL de una muestra de agua real tomada en el Puerto Deportivo de Getxo con agitación y temperatura constantes (agitación media, 25°C).

Las variables elegidas para este estudio fueron: volumen inicial de muestra, concentración del estándar, temperatura, naturaleza de la sal que acompaña al amonio y agitación. En el caso del nitrato se añadió una variable más, un segundo electrodo selectivo de nitrato (del mismo fabricante).

En la Tabla 3.2 se detallan las variables que se eligieron para comprobar la robustez del método y sus valores de variación en el caso del amonio y en la Tabla 3.3 las correspondientes para el nitrato.

Tabla 3.2. Variables elegidas para la comprobación de la robustez del método utilizado para la determinación de amonio en las muestras.

Variables	Valor Normal	Valor Alternativo
V inicial (mL)	25	20
[NH ⁴⁺]estánd. (mg/L)	7000	3500
T (°C)	25	30
Sal	Cl ⁻	NO ₃ ⁻
Agitación	Media	Máxima

Tabla 3.3. Variables elegidas para la comprobación del método utilizado para la determinación de la concentración de nitrato en las muestras.

Variables	Parámetro Normal	Parámetro Alternativo
V inicial (mL)	25	20
[NH ⁴⁺]estánd.(mg/L)	20000	5000
T (°C)	25	30
Sal	Na ⁺	K ⁺
Agitación	Media	Máxima
Electrodo	1	2

A partir de estas variables se generaron 8 experimentos y se midió una muestra de agua del Puerto Deportivo mediante adiciones estándar, siguiendo las indicaciones de cada experimento, tal y como se muestra en las Tablas 3.4 para el amonio y 3.5 para el nitrato, calculándose a continuación las concentraciones de NH₄⁺ o NO₃⁻ presentes en la muestra. Este procedimiento se repitió en tres días diferentes para comprobar que el resultado obtenido fuera representativo los tres días y descartar la presencia de errores sistemáticos en la determinación.

Tabla 3.4. Experimentos realizados para la comprobación de la robustez en la determinación de amonio en las muestras de agua de estuario.

Experimento	V inicial (mL)	[NH ⁴⁺]estánd. (mg/L)	T (°C)	Sal	Agitación
1	25	7000	25	Cl ⁻	Media
2	25	7000	30	Cl ⁻	Máxima
3	25	3500	25	NO ₃ ⁻	Media
4	25	3500	30	NO ₃ ⁻	Máxima
5	20	7000	25	NO ₃ ⁻	Máxima
6	20	7000	30	NO ₃ ⁻	Media
7	20	3500	25	Cl ⁻	Máxima
8	20	3500	30	Cl ⁻	Media

Tabla 3.5. Experimentos realizados para la comprobación de la robustez en la determinación de nitrato en las muestras de agua de estuario.

Experimento	V inicial (mL)	[NO ₃ ⁻]estánd. (mg/L)	T (°C)	Sal	Agitación	Electrodo
1	25	20000	25	Na ⁺	Media	1
2	25	20000	30	Na ⁺	Máxima	2
3	25	5000	25	K ⁺	Media	2
4	25	5000	30	K ⁺	Máxima	1
5	20	20000	25	K ⁺	Máxima	1
6	20	20000	30	K ⁺	Media	2
7	20	5000	25	Na ⁺	Máxima	2
8	20	5000	30	Na ⁺	Media	1

Para estos experimentos, como se puede observar en las Tablas 3.4 y 3.5, fue necesario preparar cuatro disoluciones estándar de amonio y cuatro de nitrato. Las disoluciones de amonio son de 3500 y 7000 mg/L en medio Cl⁻ y las otras de 3500 y 7000 mg/L en medio NO₃⁻ y las de nitrato, dos de 5000 y 20000 mg/L

en medio Na⁺ y de 5000 y 20000 mg/L en medio K⁺. Las disoluciones se prepararon en agua desionizada ya que el volumen de adición es muy pequeño comparado con el volumen total de la muestra y la fuerza iónica del medio no varía al realizar las adiciones.

Para la comprobación de la robustez, una vez realizados los experimentos y obtenida la concentración de amonio en cada uno de ellos, se determinó estadísticamente la validez de la técnica y los cambios en la medida debido a la alteración de alguna de las variables. Para ello fué necesario calcular el efecto de cada variable mediante el valor experimental ($V_{variable}$) de cada una de las variables analizadas según la Ecuación 3.4. y el valor límite teórico ($\Delta_{límite}$) para este caso como se indica en la Ecuación 3.5.

$$V_{variable} = \frac{\frac{1}{4}(\text{producto } [NH_4^+ \text{ o } NO_3^-]_{var.inic.})}{\frac{1}{4}(\text{producto } [NH_4^+ \text{ o } NO_3^-]_{var.alternat.})} \quad (3.4)$$

$$\Delta_{límite} = \frac{\sigma_{[NH_4^+ \text{ o } NO_3^-]} \times t_{student (95\%, 2 \text{ colas})}}{\sqrt{2}} \quad (3.5)$$

En la ecuación para la determinación del efecto de cada variable (3.4), en el numerador es necesario calcular el producto de la concentración calculada en los experimentos en los que se analiza el amonio o nitrato con el valor de los parámetros iniciales. En el denominador, el producto de las concentraciones calculadas para los experimentos en los que se utilizan los valores alternativos.

Para el cálculo del valor límite teórico (Ecuación 3.5), se necesita calcular la desviación estándar (σ) de todas las concentraciones calculadas y la t de student para una incertidumbre del 0.05% y dos colas.

Si el valor absoluto del efecto de cada variable analizada ($V_{variable}$) es menor que el valor de $\Delta_{límite}$, se considera que la variable es robusta. Si, por el contrario, el valor obtenido es mayor que el valor límite, esa variable no es robusta y una pequeña alteración de esa condición cambiaría el resultado de la concentración obtenida que ya no sería correcta. Por lo tanto, habría que controlar esa variable

con el mayor cuidado posible para minimizar los posibles errores de esta determinación.

3.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AMONIO

3.3.1. Intervalo lineal

El primer objetivo de la validación es la comprobación del intervalo lineal del electrodo de ión selectivo de amonio tal como se muestra en la Figura 3.1.

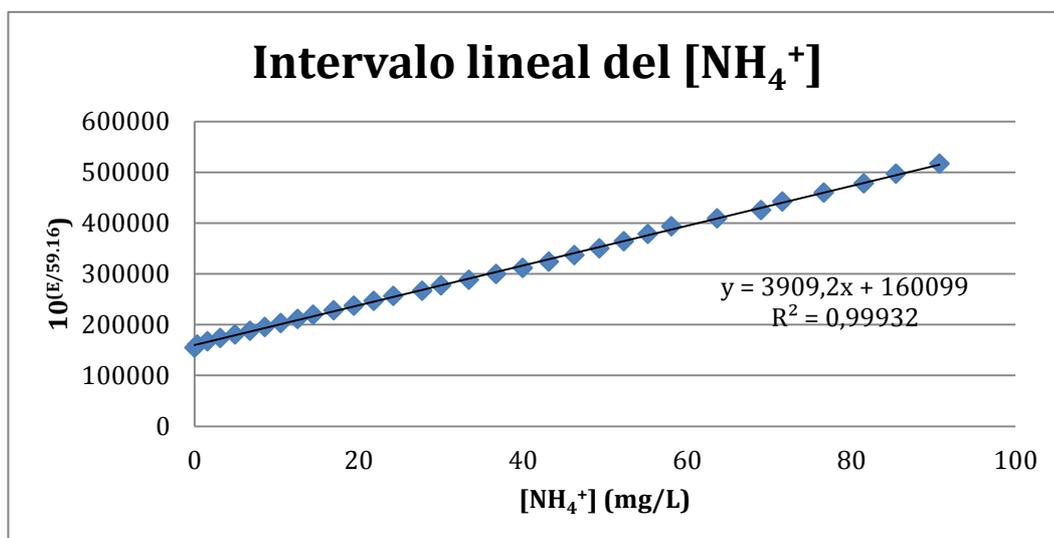


Figura 3.1. Intervalo lineal del amonio.

Tal como se ve en la Figura 3.1, la respuesta del electrodo es lineal, al menos, entre 0.3 y 90 mg/L de NH₄⁺.

3.3.2. Límite de detección

Para hallar el límite de detección de la determinación de amonio con el electrodo selectivo de iones, fue necesario analizar el intervalo lineal calculado en el apartado anterior. Como se ha mencionado en el procedimiento experimental, las ecuaciones habituales para el cálculo del límite de detección no se pueden utilizar ya que no hay muestras blanco; por tanto, se analiza la concentración de amonio que produce el mínimo cambio posible (1 mV) en el potencial de la disolución de agua de mar artificial sobre la que se realizaron las

adiciones de NH_4^+ . El límite de detección de esta determinación es de 0.3 mg/L de NH_4^+ .

3.3.3. Medida de amonio en las muestras

Tras la comprobación del intervalo lineal del electrodo de amonio, cabe destacar el modo en el que se realizó la determinación de la concentración de NH_4^+ en las muestras de agua de estuario. A modo de ejemplo, en la Tabla 3.6 aparece detallado el volumen de adición, la concentración añadida en cada una de las muestras y el potencial de la disolución una vez estabilizada la medida.

Tabla 3.6. Ejemplo de la determinación de amonio en una muestra de agua de estuario.

V añad. (mL)	$[\text{NH}_4^+]$ añad. (mg/L)	E (mV)	$10^{(E/59.16)}$
0	0.00	334	4.42E+05
0.1	27	350	8.24E+05
0.2	54	360	1.22E+06
0.3	81	367	1.60E+06
0.4	108	372	1.94E+06

Tras ello, se representó $10^{(E/59.16)}$ frente a la concentración de amonio en una gráfica dando lugar a una línea recta (Figura 3.2).

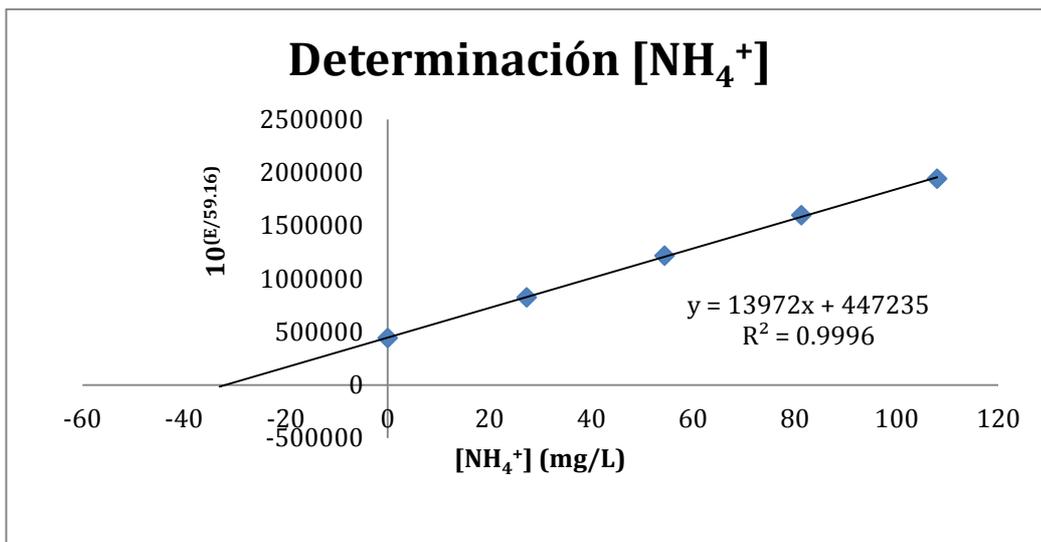


Figura 3.2. Gráfico de la determinación de amonio en las muestras mediante adiciones estándar.

La concentración de NH₄⁺ que contiene la muestra se obtiene en el punto de corte de dicha recta y el eje de abscisas.

3.3.4. Precisión del análisis

La incertidumbre global de la determinación del amonio se calculó como la raíz cuadrada de la suma de la varianza intrínseca (tal como se ha explicado en el apartado 3.2.3.) y la varianza por repeticiones (repetitividad y reproducibilidad).

La repetitividad del análisis de nitrato se comprobó midiendo 10 veces la misma muestra un mismo día. La reproducibilidad se comprobó con la determinación de la concentración de amonio de la misma muestra en diferentes días.

En la Figura 3.3 se representa el valor medio y el intervalo de confianza (IC) para los resultados de cada uno de los días en que se realizaron las medidas. El intervalo de confianza se calculó con un grado de incertidumbre del 0.05%, con la Ecuación 3.6 [15].

$$I. C. = X \pm \frac{t_{student} (95\%, N-1) \times \sigma}{\sqrt{N}} \quad (3.6)$$

donde X es la concentración media para cada día, N es el número de medidas realizadas, $(N-1)$ son los grados de libertad del análisis y σ es la desviación estándar de los resultados obtenidos.

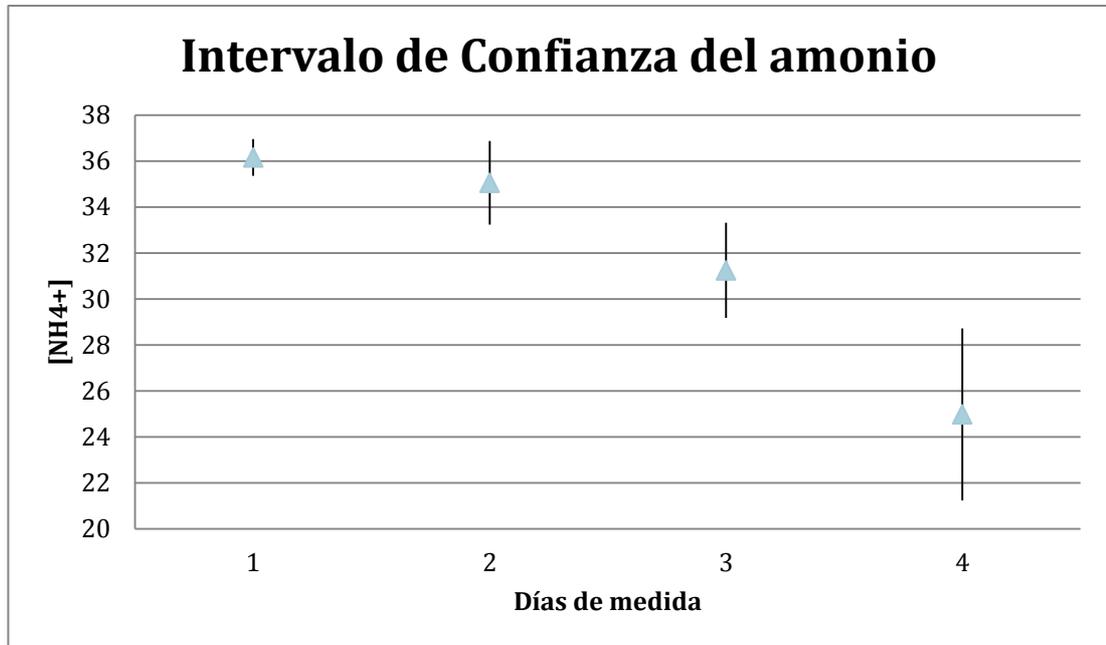


Figura 3.3. Representación del valor medio (triángulo de color azul) y el intervalo de confianza (línea vertical en cada día) de la determinación de amonio en cada uno de los 4 días en los que se realizó la medida.

Para que un análisis sea considerado como reproducible los intervalos de confianza de cada día de medida deben solaparse. En la Figura 3.3 se puede observar que los intervalos de confianza de los dos primeros días se solapan, el final del intervalo del tercer día se solapa con el principio del intervalo del segundo pero se encuentra por debajo de él en concentraciones menores. Por último, el cuarto día no se solapa con ninguno de los anteriores y se encuentra en concentraciones más bajas por lo que el análisis de ese día muestra diferencias significativas con el resto de los días.

Además, se puede observar que tanto los valores medios como los intervalos de confianza asociados a ellos van disminuyendo gradualmente cada día de medida. La diferencia temporal entre cada medida es de una semana por lo que

se puede afirmar que los análisis realizados las dos primeras semanas tras el muestreo dan valores reproducibles pero que a partir de la tercera semana los análisis muestran resultados con diferencias significativas al resto de los días por lo que el análisis solo es reproducible las dos primeras semanas tras el muestreo. Que la determinación de amonio con electrodo de ion selectivo no sea reproducible durante más tiempo que dos semanas puede ser debido a que en la muestra de agua la actividad biológica no está bloqueada y con el transcurso del tiempo la concentración de amonio varía por lo que es necesario realizar el análisis tan pronto como sea posible no excediendo las dos semanas.

Teniendo en cuenta todo lo indicado anteriormente, la concentración de amonio en esta muestra es 36 ± 2 mg/L.

3.3.5. Robustez del procedimiento analítico

En la Tabla 3.7 se muestran los valores de V_{variable} calculados para cada variable analizada para la determinación de la concentración de amonio en cada uno de los tres días en los que se ha realizado el análisis.

Tabla 3.7. Resultados del cálculo del efecto de cada variable (V_{variable}) cada uno de los tres días en los que se repitió el análisis.

Variable	$V_{\text{variable}}(\text{Día1})$	$V_{\text{variable}}(\text{Día2})$	$V_{\text{variable}}(\text{Día3})$
Volumen inicial	5.48	4.33	5.01
[Estándar]	-1.50	-0.09	-1.87
Temperatura	-2.97	-2.37	-2.38
Naturaleza sal	-1.49	-2.47	-0.49
Agitación	1.08	-0.81	2.17

Los valores límite logrados para los diferentes días son: 6.01 el primer día, 5.09 el segundo y 5.82 el tercero. En todos los casos, el valor absoluto de los valores de V_{variable} están por debajo del $\Delta_{\text{límite}}$ por lo que todas las variables analizadas se pueden considerar robustas.

3.4. RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE NITRATO

3.4.1. Intervalo lineal

Al igual que en el caso del amonio, el primer objetivo de la validación es la comprobación del intervalo lineal tal como se muestra en la Figura 3.4.

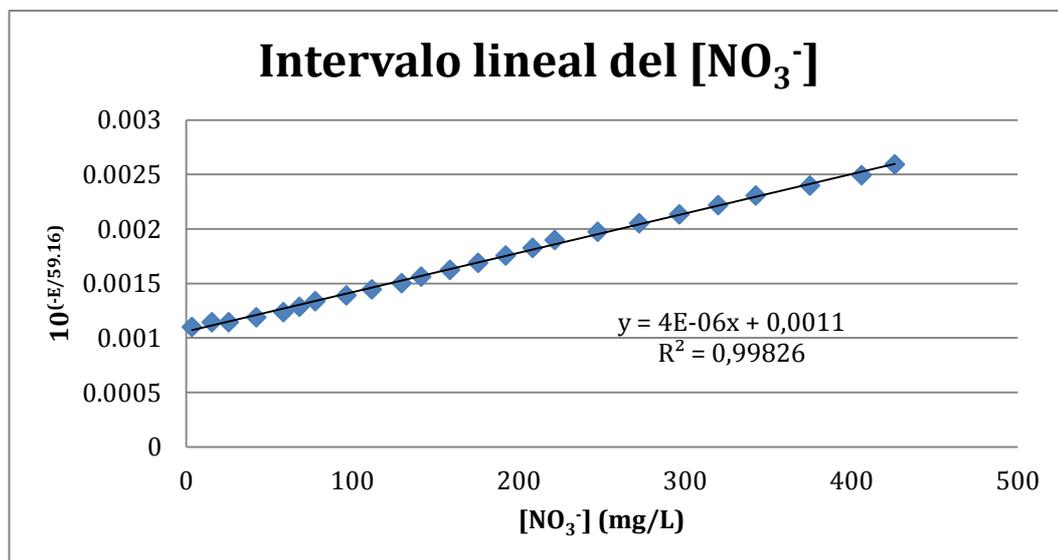


Figura 3.4. Intervalo lineal del nitrato.

La Figura 3.4 muestra que la respuesta del electrodo es lineal, al menos, entre 3 y 426 mg/L de NO_3^- .

3.4.2. Límite de detección

El cálculo del límite de detección de la determinación de nitrato mediante el electrodo de ion selectivo se realizó observando el intervalo lineal. El límite de detección en este caso se encuentra en 3 mg/L de NO_3^- ya que es la menor concentración que produce un cambio de 1 mV en el potencial de la disolución de agua de mar artificial con la que se analiza el intervalo lineal, por lo tanto, la mínima concentración de nitrato que se puede detectar con este procedimiento. Al igual que en el caso del amonio el límite de cuantificación no se podría calcular o sería el mismo que el de detección.

3.4.3. Medida de nitrato en las muestras

Una vez comprobado el intervalo lineal del electrodo de nitrato, se muestra a modo de ejemplo, el modo de realizar el cálculo de la concentración de NO_3^- a partir de las medidas que se realizaron. En la Tabla 3.8 se muestra detallado el volumen de adición, la concentración de estándar de NO_3^- añadida en cada una y el potencial de la disolución una vez estabilizada la medida. Además aparece una cuarta columna con el cálculo de $10^{(-E/59.16)}$ que se necesita para la representación gráfica de ese valor frente a la concentración de NO_3^- que da lugar a una línea recta (Figura 3.5).

Tabla 3.8. Ejemplo de la determinación de amonio en una muestra de agua de estuario.

V añad (mL)	$[\text{NO}_3^-]$ añad (mg/L)	E (mV)	$10^{(-E/59.16)}$
0	0	201	4.00E-04
0.165	135	186	7.18E-04
0.33	268	179	9.43E-04
0.495	400	173	1.19E-03
0.66	530	169	1.39E-03

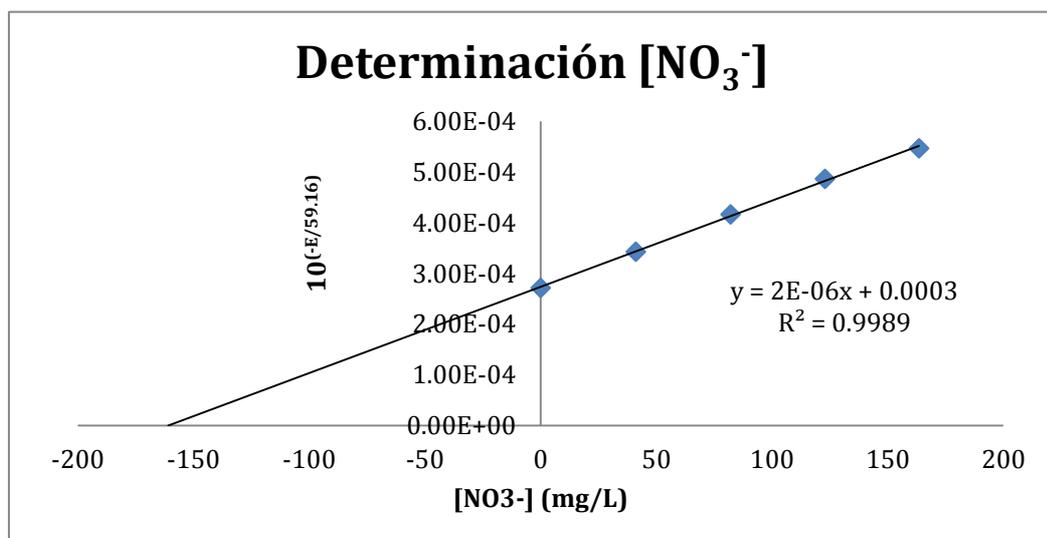


Figura 3.5. Determinación de la concentración de NO_3^- por adiciones estándar.

La concentración de NO_3^- de la muestra se obtiene a partir del punto de corte de la extrapolación de la recta resultante y el eje de abscisas.

3.4.4. Precisión del análisis

Una vez hallada la concentración de nitrato es necesario calcular la incertidumbre asociada a la concentración tal como se ha explicado en el apartado 3.3.4.

En la Figura 3.6 se muestra el intervalo de confianza al 95% de la determinación de nitrato los diferentes días en los que se midió la misma muestra. El intervalo de confianza se calcula a partir de la Ecuación 3.6.

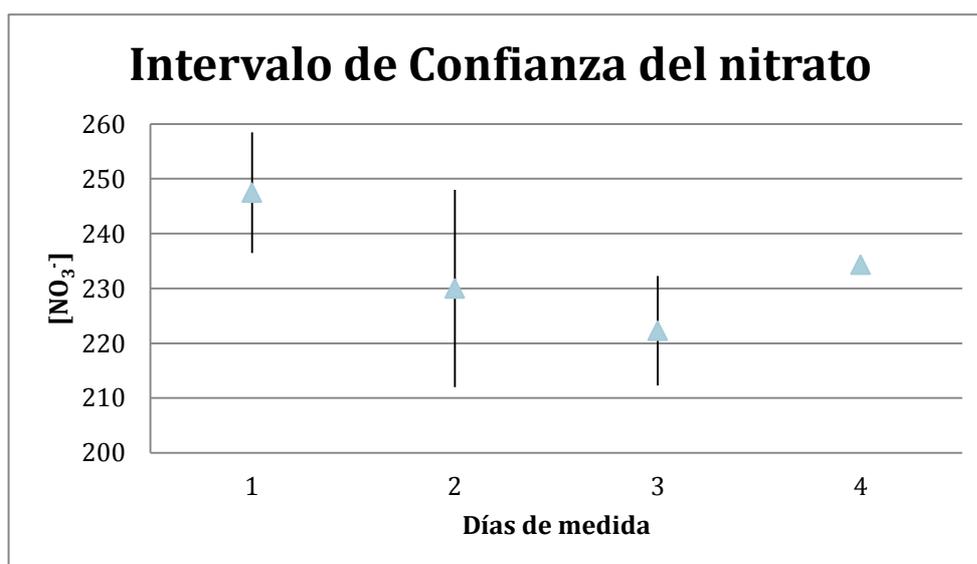


Figura 3.6. Representación del valor medio (triángulo de color azul) y el intervalo de confianza (línea vertical en cada día) de la determinación de amonio en cada uno de los 4 días en los que se realizó la medida.

Para que los resultados no presenten diferencias significativas, sus intervalos de confianza tienen que solaparse. Como se puede observar, los intervalos de confianza de los cuatro días en los que se midió la muestra se solapan por lo que los resultados de los análisis no muestran diferencias significativas. Por todo

ello se puede afirmar que la determinación de nitrato en las muestras es reproducible al menos en 4 semanas ya que el intervalo de tiempo entre un día de medida y el siguiente es de una semana.

Por lo tanto, la concentración de nitrato de la muestra analizada es 239 ± 22 mg/L.

3.4.5. Robustez del procedimiento analítico

Al igual que en el caso del amonio, en la comprobación de la robustez del electrodo selectivo de iones nitrato, tras realizar los experimentos y hallar la concentración de NO_3^- en cada uno de ellos se estimó estadísticamente la validez de la técnica. Por ello, se calculó el valor experimental del efecto de cada variable analizada (V_{variable}) según la Ecuación 3.4 y el valor límite teórico ($\Delta_{\text{límite}}$) para este caso, como se indica en la Ecuación 3.5. En la Tabla 3.9 se muestran los valores experimentales del efecto de cada variable calculados para cada día.

Tabla 3.9. Resultados del cálculo del efecto de cada variable (V_{variable}) en el caso de la determinación de amonio para cada uno de los tres días en los que se repitió el análisis.

Variable	$V_{\text{variable}}(\text{Día1})$	$V_{\text{variable}}(\text{Día2})$	$V_{\text{variable}}(\text{Día3})$
Volumen inicial	-3.01	1.13	-12.10
[Estándar]	-1.18	3.05	6.52
Temperatura	-12.54	-16.28	-14.03
Naturaleza sal	5.29	-4.47	3.12
Agitación	-0.63	4.90	-1.79
Electrodo	-8.79	10.12	2.12

Los valores límite obtenidos para cada día fueron: 14.82 para el primer día, 19.75 para el segundo y 17.95 para el tercer día. Como se puede comprobar, los valores absolutos de los valores experimentales obtenidos para cada variable

son siempre menores que el valor límite, por lo que las variables analizadas pueden considerarse robustas.

4. VALIDACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DEL CARBONO ORGÁNICO TOTAL

4.1. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Los reactivos necesarios para la validación de la determinación de carbono orgánico total son Ftalato ácido de potasio y Glucosa, ambos obtenidos de Panreac Química S.L.U, Barcelona, España y los disolventes agua desionizada de calidad MilliQ (Millipore Co., MA, USA) y agua de mar preparada artificialmente.

Se necesitó preparar dos disoluciones de 100 mg/L de carbono a partir de ftalato ácido de potasio en agua de mar artificial de fuerza iónica 0.73M y de fuerza iónica 0.01 M y dos de la misma concentración de C a partir de glucosa también de 0.73 y 0.01M de fuerza iónica. Por otro lado, se prepararon dos disoluciones de 100 mg/L de carbono a partir de ftalato ácido de potasio y glucosa en agua desionizada.

El agua de mar artificial se prepara a partir de 0.53 M de NaCl, 0.054 M de MgCl₂ 6H₂O, 0.029 M de Na₂SO₄, 0.011 M CaCl₂ 2H₂O, 0.010 M de KCl y 2.39 10⁻³ M de NaHCO₃.

4.2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El instrumento utilizado para la determinación de la concentración de carbono orgánico en las muestras de agua de estuario fue un analizador TOC-V_{CSN} (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). Este equipo mide el NPOC que es el carbono orgánico no purgable ya que los compuestos de carbono que se evaporarían al purgar la muestra son hidrocarburos de cadena corta volátiles que no están presentes en las muestras de agua de estuario. Como se ha mencionado anteriormente, la columna de combustión quema la muestra que pasa a CO₂ gas y se mide con un detector de Infrarrojo No Dispersivo (NDIR). El programa de control de este instrumento mide el área de la señal del detector que es proporcional a la concentración de carbono.

Aunque, como se ha comentado en la introducción la muestra no necesita pretratamiento y se puede medir directamente, cabe destacar que tras 40-60 medidas la sal que contienen las muestras taponan la columna y es necesario limpiar bien el catalizador y volver a realizar un nuevo calibrado.

4.2.1. Procedimiento de medida

La validación de la determinación de la concentración de carbono orgánico total en las muestras de estuario se realizó mediante la función de medida NPOC (Carbono Orgánico No Purgable) del equipo.

Para poner en marcha el analizador, en primer lugar se abre una bombona de aire exento de CO₂ y se enciende el equipo. Tras ello se enciende el horno donde se encuentra la columna de combustión y se pone a calentar hasta llegar a 680°C.

La medida del NPOC se realiza primeramente indicando el volumen deseado de inyección de muestra sobre la columna de combustión. Para la medida del NPOC el manual de uso del equipo indica que el volumen óptimo de inyección es de 100 µL. Una vez indicado este volumen el equipo toma de la muestra que se quiere medir 5 veces más volumen que el de inyección ya que no solo realiza una única medida del carbono orgánico no purgable sino que realiza 5 al indicarle que haga la inyección múltiple. Antes de obtener este volumen, el equipo realiza una limpieza del compartimento de obtención de la muestra, para ello toma una porción de la muestra que purga mediante una corriente de gas para limpiar dicho compartimento de compuestos volátiles. En el momento de obtener la muestra de la que se va a realizar la medida se añade una pequeña cantidad de ácido clorhídrico al 1.5% y se purga la muestra con el gas portador durante 1.5 minutos para eliminar los compuestos volátiles que pueda contener la muestra.

Tras ello, se inyectan 100 µL de la muestra a la columna de combustión que se encuentra en el horno a 680°C, oxidándose esta a dióxido de carbono gaseoso y se mide en el detector. Tras ello, el equipo calcula el área del pico detectado.

Por último, cabe destacar que el equipo cada vez que toma una muestra la mide 5 veces seguidas o, en el caso de que se elija un volumen de inyección mayor, tres veces si se le indica que realice inyecciones múltiples, por lo que una vez traducida la señal del detector el equipo vuelve a inyectar la muestra previamente purgada. En el caso de realizar una inyección discreta cada vez que el equipo inyecta una muestra y la mide, desecha el resto y vuelve a tomar, limpiar y purgar la muestra antes de la siguiente medida.

4.2.1.1. Digitalización de datos

Uno de los mayores problemas en la determinación del carbono orgánico en las muestras ha sido la extracción de los datos del equipo. El programa informático que acompaña al equipo no permite guardar las señales obtenidas ni de forma gráfica, ni en una tabla de datos por lo que sería necesario confiar que el valor de área calculado por el programa sea el correcto. Por otra parte, este software tampoco permite elegir el punto exacto de comienzo y final del pico por lo que la integración de aquellas muestras que presenten colas o alguna impureza que haga que la señal no muestre un perfil adecuado sería incorrecta.

La mejor forma que se ha encontrado para la extracción de los datos del ordenador es la digitalización de la imagen de la señal del detector de infrarrojo obtenido con el programa on-line WebPlotDigitizer*. Primero se realiza una impresión de pantalla o un recorte del espectro y se guarda como una imagen jpg o png, como se muestra en la Figura 1.3 en la Introducción.

Una vez guardada, la imagen se carga en el programa de digitalización. Este programa permite convertir la imagen en una tabla de datos (señal vs tiempo). Para ello, se toman unos valores de referencia en los ejes de coordenadas de forma que el programa establezca cualquier punto de la imagen a partir de ellos. Después se selecciona el color de la línea del gráfico para que el programa detecte los datos que se quieren digitalizar frente al resto de la imagen.

En las Figuras 4.1 y 4.2 aparecen sobre el espectro obtenido en el equipo, los

* <http://arohatgi.info/WebPlotDigitizer/app/> Visitada por última vez 2.09.2015.

puntos calculados por el programa de digitalización. La Figura 4.1 muestra la digitalización realizada con un incremento de 1 pixel.

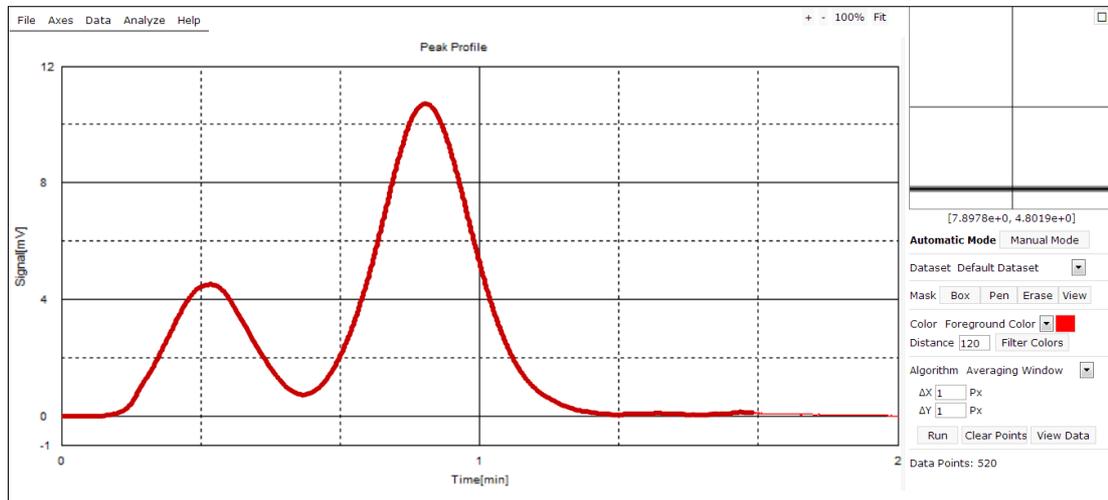
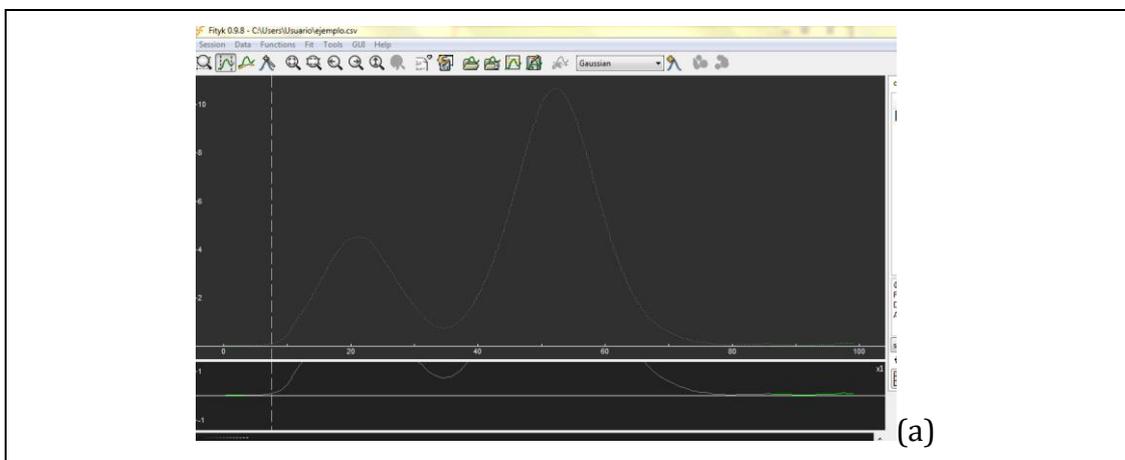


Figura 4.1. Digitalización de los datos con un incremento de 1 pixel a partir de la señal obtenida del equipo.

Se extraen los datos del programa como una tabla en formato csv. Tras la digitalización de la señal del espectro, se emplea el programa Fytik [20] para calcular la integral de las señales. Para ello, el programa abre el archivo csv (Figura 4.2a) y permite calcular la integral de la señal entre los límites elegidos por el usuario (Figura 4.2b).



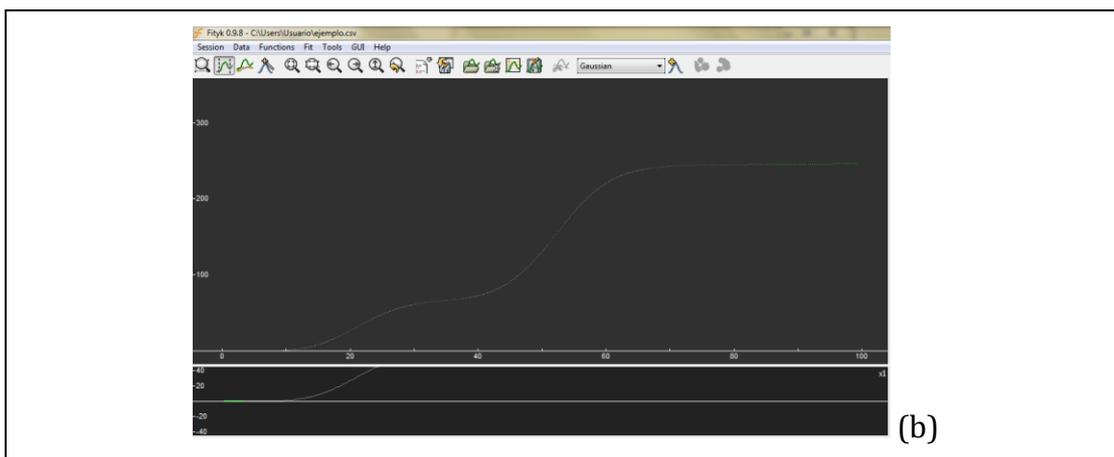


Figura 4.2. (a) Archivo en formato csv abierto con el programa Fityk; (b) Integración de la señal realizada con el programa Fityk.

4.2.2. Intervalo lineal

Al igual que en el caso de la validación del método para la determinación del nitrato y amonio, el primer objetivo de la validación de la determinación del TOC es la comprobación del intervalo lineal. El manual del uso del equipo indica una linealidad desde 0 a 25000 mg/L y el intervalo de concentraciones de carbono orgánico en agua de estuarios va desde 0 a 6 mg/L como máximo, como se ha comprobado en experimentos anteriores. El intervalo de concentraciones esperado en el análisis de agua de estuario es muy pequeño en comparación con el intervalo lineal que ofrece el equipo por lo que a partir de los diferentes calibrados que se realizaron se comprobó la linealidad de la respuesta.

4.2.3. Calibrado y medida de una muestra

La determinación de la concentración de carbono orgánico en las muestras de agua se llevó a cabo mediante un calibrado externo. Para ello, se prepararon 100 mL de una disolución estándar de 100 mg/L de C a partir de ftalato ácido de potasio. Puesto que el efecto matriz de las muestras no afecta a la determinación de carbono la disolución se realizó en agua desionizada. A partir de ella, se prepararon 9 disoluciones de calibrado en agua desionizada entre 0 y 6 mg/L de C aumentando la concentración de carbono en cada una de ellas, con tres disoluciones blanco y una repetida en el medio.

Una vez preparadas las disoluciones se midieron en el analizador de TOC, seleccionando para ello las condiciones de medida habituales en el programa del equipo.

4.2.4. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) de la determinación del carbono orgánico se calcularon mediante las Ecuaciones 3.1 y 3.2 mencionadas previamente en el apartado 3.2.2. Para ello, a la vez que las disoluciones de calibrado, se realizan tres medidas de una disolución blanco, es decir, que no contengan el analito que se esté determinando. Por ello, los primeros puntos del calibrado serán tres disoluciones de agua desionizada que es la matriz en la que se encuentran las disoluciones de calibrado.

4.2.5. Precisión del análisis

La incertidumbre global de la determinación del TOC se calculó como la raíz cuadrada de la suma de la varianza intrínseca y la varianza por repeticiones.

En este caso la ecuación de la incertidumbre del calibrado [15] (S_{x_0}) varía con respecto a la utilizada para ISE ya que en este caso se empleó un calibrado externo (Ecuación 4.1). Después se calculó la incertidumbre intrínseca de la determinación de carbono orgánico mediante la propagación de errores con el método de Kragten.

$$S_{x_0} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m} + \frac{(y_0 - y_m)^2}{b^2 \sum (x_i - x_m)^2}} \quad (4.1)$$

En la Ecuación (4.1) $S_{y/x}$ es el error estadístico calculado a partir de los errores aleatorios en la dirección del eje y; b la pendiente de la recta de calibrado; n es número de puntos de la ecuación, m es el número de repeticiones de cada punto; y_0 el valor experimental de y a partir del que se determina el valor de la concentración x_0 del analito analizado; y_m la media de los valores de y utilizados

en la recta de calibrado y por último, $(x_i - x_m)$ es diferencia entre el valor de x en cada punto de la recta y el valor medio de x en todas las determinaciones.

La precisión del análisis mide la repetitividad que mide la variación del análisis de la misma muestra en un mismo día para lo que se mide repetidamente la muestra en un mismo día y la reproducibilidad que mide la variación del análisis de la misma muestra en días diferentes.

En esta técnica, como se ha mencionado anteriormente, la salinidad de las muestras afecta a la estabilidad de la columna de combustión. Por ello, se realizó el análisis de la repetitividad y la reproducibilidad en muestras con diferente salinidad. Para estos análisis se eligieron 3 muestras de estuario con diferente salinidad: 5.91 mg/L para la de salinidad baja, 28.6 mg/L para la de media y 33.5 mg/L para la de salinidad alta.

4.2.6. Robustez del procedimiento analítico

La robustez del procedimiento analítico llevado a cabo para la determinación de la concentración de carbono orgánico presente en las muestras de agua de estuario se investigó con un diseño experimental de 8 experimentos a partir de la combinación 7 variables que pueden afectar a la estabilidad del análisis del C que se conoce como test de Youden y Steiner. En el equipo de TOC las variables que se eligieron para comprobar la robustez fueron el compuesto carbonado utilizado para llevar a cabo la calibración, la salinidad de la muestra, el tiempo de purga, el volumen y tipo de inyección, el flujo de aire y el porcentaje de ácido clorhídrico. Los valores de variación de las variables elegidas se muestran en la Tabla 4.1. Estos parámetros no se utilizan para optimizar la técnica analítica si no para detectar posibles errores en la determinación de la concentración de carbono debido a cambios aleatorios que puedan ocurrir durante el análisis.

Tabla 4.1. Variables elegidas para la comprobación de la robustez de la determinación del TOC.

Variable	Valor Normal	Valor Alternativo
Compuesto	Ftalato ácido de Potasio	Glucosa
Salinidad (mol/L)	0.7	0.01
Tiempo purga (min)	1.5	2
Inyección	Múltiple	Discreta
V inyección (μL)	100	105
Flujo aire	Medio	Bajo
% HCl	1.5	2

A continuación, se prepararon 8 disoluciones de 10 mL de los experimentos de 2.5 mg/L de C, a partir de dos disoluciones estándar de 100 mg/L de ftalato ácido de potasio y glucosa en agua de mar artificial de salinidad 0.7 y 0.01 mg/L según las indicaciones de la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Experimentos que se realizaron para la comprobación de la robustez en la determinación de la concentración de carbono orgánico total.

Experimento	Compuesto	Salinidad (mol/L)	Tiempo de purga (min)	Inyección	V inyección (μL)	Flujo aire	%HCl
1	Ftalato	0.7	1.5	Múltiple	100	Medio	1.5
2	Ftalato	0.7	2	Múltiple	105	Bajo	2
3	Ftalato	0.01	1.5	Discreta	100	Bajo	2
4	Ftalato	0.01	2	Discreta	105	Medio	1.5
5	Glucosa	0.7	1.5	Discreta	105	Medio	2
6	Glucosa	0.7	2	Discreta	100	Bajo	1.5
7	Glucosa	0.01	1.5	Múltiple	105	Bajo	1.5
8	Glucosa	0.01	2	Múltiple	100	Medio	2

Tras la preparación de las disoluciones, se midieron en el analizador de TOC. La determinación de la concentración de carbono en cada experimento se realizó interpolando el área en la recta de calibrado medida previamente. Tras ello, se calculó la robustez de la técnica mediante cálculos estadísticos.

Primeramente se calculó el efecto de cada variable para lo que se halló el valor

experimental ($V_{variable}$) de cada una de ellas según la Ecuación 4.2. Después se calculó el valor límite teórico ($\Delta_{límite}$) para cada día en los que se realizaron las medidas de los experimentos de robustez utilizando la Ecuación 4.3.

$$V_{variable} = \frac{\frac{1}{4}(\text{producto } [C]_{var.inic.})}{\frac{1}{4}(\text{producto } [C]_{var.alternat.})} \quad (4.2)$$

$$\Delta_{límite} = \frac{\sigma_{[C]} \times t_{student(95\%,2 \text{ colas})}}{\sqrt{2}} \quad (4.3)$$

En la Ecuación 4.2, en el numerador es necesario calcular el producto de la concentración de carbono calculada en los experimentos con las variables iniciales. En el denominador, el producto de las concentraciones de carbono calculadas para los experimentos en los que se utilizan los valores alternativos.

Para el cálculo del valor límite teórico, se necesita calcular la desviación estándar (σ) de todas las concentraciones calculadas y la t de student al 95% de confianza y dos colas.

Según este test, como ya se ha mencionado anteriormente, para que una variable sea robusta el valor de cada variable ($V_{variable}$) tiene que ser menor que el valor límite para cada día ($\Delta_{límite}$). Por todo ello, las variables que no sean robustas tienen que ser controladas con la mayor precisión posible para minimizar los posibles errores de la determinación de carbono orgánico mediante el equipo de TOC.

4.3. RESULTADOS DE LA DETERMINACION DE TOC

4.3.1. Calibrado

En la Figura 4.3 se muestran tres rectas de calibrado realizadas en tres días diferentes una vez limpiado el catalizador y la columna de combustión.

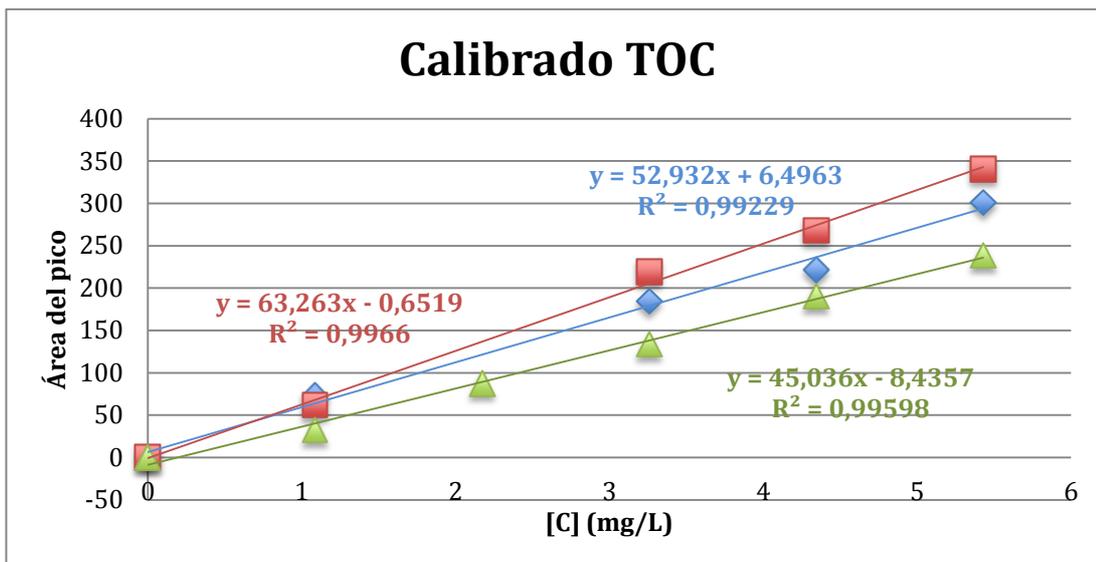


Figura 4.3. Rectas de calibrado calculadas en tres días diferentes para la determinación del TOC.

Como se puede comprobar en la Figura 4.3, se han eliminado algunos puntos de las rectas de calibrado ya que estos puntos son marginales detectados mediante la evaluación de residuos utilizando el test Q de Dixon [15].

4.3.2. Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y de cuantificación se calcularon con la medida de la concentración de carbono de tres muestras blanco. Una vez calculadas las concentraciones de estas muestras, se calculó su valor medio y su desviación estándar. El límite de detección se calculó con la concentración media más tres veces su desviación estándar y el límite de cuantificación con la suma de diez veces la desviación estándar al valor medio. El resultado se muestra a continuación.

$$\text{LOD} = 0.5 \text{ mg/L}$$

$$\text{LOQ} = 1.1 \text{ mg/L}$$

4.3.3. Determinación de la concentración de carbono orgánico en una muestra

La determinación de la concentración de carbono orgánico de las muestras se lleva a cabo con el equipo de TOC. Las condiciones de medida son las normales del equipo que se han mencionado en el apartado de procedimiento de medida (apartado 4.2.1). Para ello se inyectaron las diferentes muestras en el equipo de TOC y se obtuvieron tras la digitalización de los datos, el área de cada pico que es proporcional a la concentración de carbono.

La concentración de carbono orgánico que posee la muestra analizada se calculó con la recta de calibrado más cercana en el tiempo. Para ello, una vez calculado el área del pico se interpola en la recta de calibrado obteniendo la concentración de C.

4.3.4. Precisión del análisis

Mediante la ecuación del cálculo de la incertidumbre asociada al calibrado y la propagación de errores según Kragten [19] se calculó el incertidumbre intrínseca de la concentración de carbono. La incertidumbre total se calculó como la raíz cuadrada de la suma de la varianza intrínseca y la varianza por repeticiones.

La varianza por repetición se calculó a través de la repetitividad y de la reproducibilidad en la determinación de la concentración de carbono orgánico. Para ello se midió 10 veces la misma muestra en un mismo día para calcular la repetitividad y 5 veces en tres días diferentes con una separación temporal de una semana entre ambas medidas para el cálculo de la reproducibilidad. Se eligieron 3 muestras diferentes de distinta salinidad para comprobar la precisión del análisis en muestras con diferente concentración de sal.

En las Figuras 4.4, 4.5 y 4.6 se muestran los valores medios y los intervalos de confianza obtenidos utilizando la Ecuación 3.6 para las muestras de estuario de diferente salinidad. Por ello en cada gráfico se representa el intervalo de confianza para cada día en el que se ha medido la misma muestra.

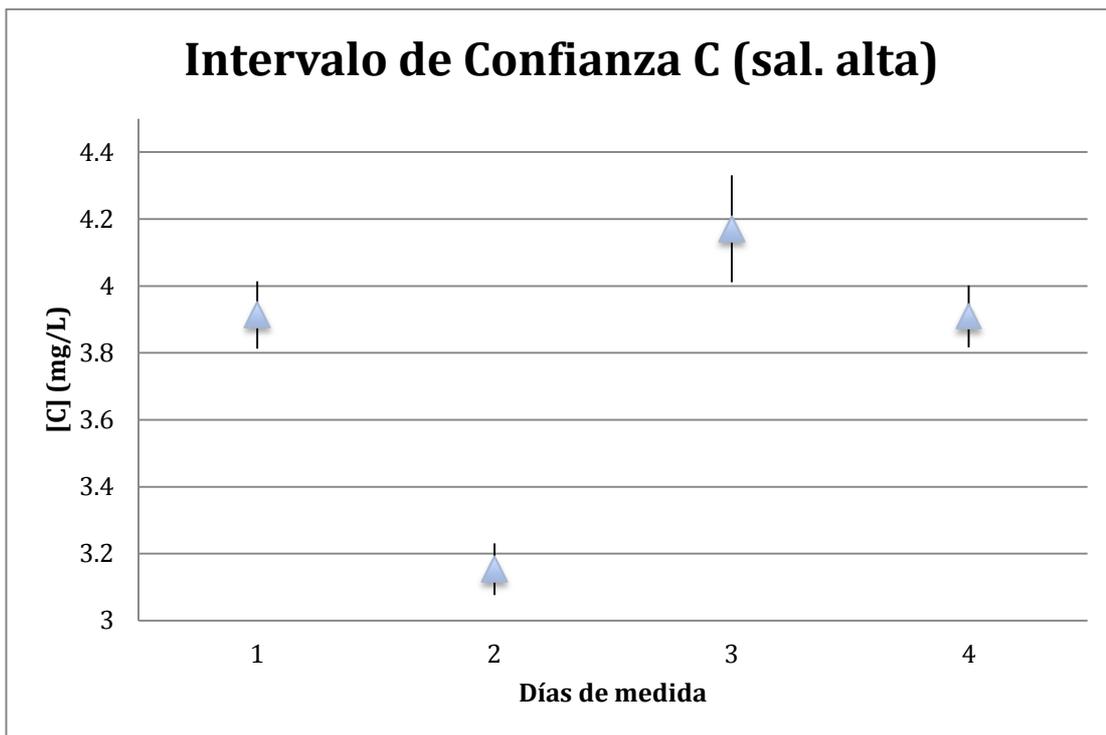


Figura 4.4. Representación del valor medio (triángulo de color azul) y el intervalo de confianza (línea vertical en cada día) de la determinación de carbono en cada uno de los cuatro días en los que se realizó la medida de la muestra de salinidad alta.

En la Figura 4.4 que representa los valores calculados para cada día en los que se midió la muestra de salinidad alta se puede comprobar que los intervalos de confianza se solapan excepto los resultados del segundo día. Al no observarse ninguna tendencia en los diferentes días de medida, se puede determinar que los resultados obtenidos para el segundo día de medida no son correctos y ha ocurrido algún error en el análisis, por lo que el resultado de este día no se tendrá en cuenta para el cálculo de la reproducibilidad.

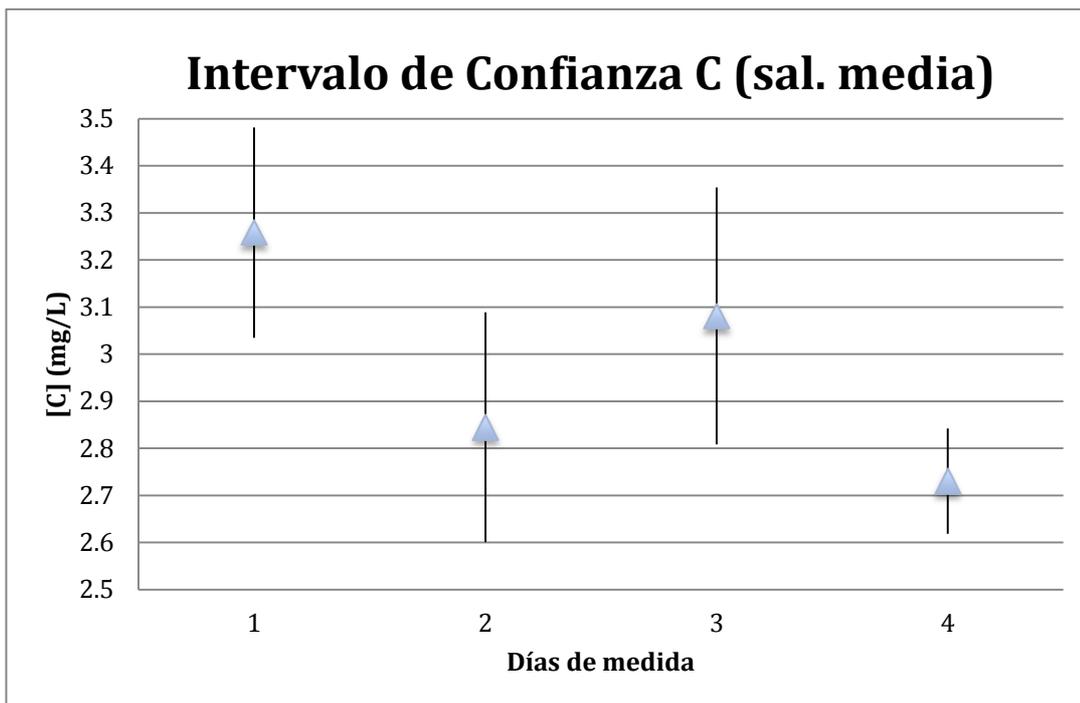


Figura 4.5. Representación del valor medio (triángulo de color azul) y el intervalo de confianza (línea vertical en cada día) de la determinación de carbono en cada uno de los cuatro días en los que se realizó la medida de la muestra de salinidad media.

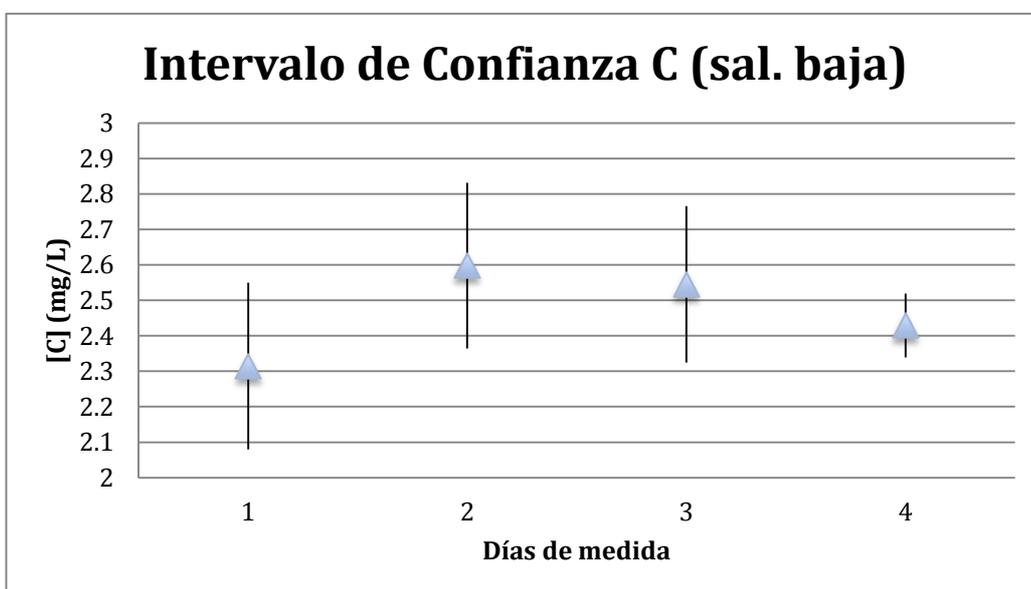


Figura 4.6. Representación del valor medio (triángulo de color azul) y el intervalo de confianza (línea vertical en cada día) de la determinación de carbono en cada uno de los cuatro días en los que se realizó la medida de la muestra de salinidad baja.

En el caso de las muestras de salinidades media y salinidad baja, se puede comprobar que los intervalos de confianza de los cuatro días en los que se realizaron las medidas se solapan por lo que la determinación de NPOC es reproducible al menos en cuatro semanas, que es el tiempo que transcurrió desde el primer análisis al último.

En la Tabla 4.3 se muestran las concentraciones de TOC de las tres muestras con sus respectivas incertidumbres.

Tabla 4.3. Concentraciones de TOC de las tres muestras con sus respectivas incertidumbres

Salinidad	[C] mg/L		
Alta	4.0	±	0.2
Media	3.1	±	0.4
Baja	2.4	±	0.4

4.3.5. Robustez del procedimiento analítico

La robustez del procedimiento analítico se estimó estadísticamente, para ello una vez realizados los experimentos de robustez y calculada la concentración de carbono en cada una de las muestras, se calculó el efecto de cada variable (V_{variable}) mostrados en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Valores calculados del efecto de cada variable para los tres días en los que se realizó el análisis.

Variable	V_{variable}(Día1)	V_{variable}(Día2)	V_{variable}(Día3)
Compuesto	-0,040	0,003	2,507
Salinidad	-0,076	-0,061	-5,640
Tiempo de purga	0,031	0,030	1,862
Inyección	0,004	0,022	-2,728
V inyección	-0,004	-0,009	-0,387
Flujo aire	-0,215	-0,214	-6,530
% HCl	0,014	-0,006	0,278

Tras ello, se calculan los valores límite ($\Delta_{\text{límite}}$) para cada día que son de 0.209 para el primer día, 0.201 para el segundo y 8.566 para el tercero. Como se ha mencionado anteriormente, si el valor límite calculado para cada día es mayor que el valor absoluto del efecto de alguna variable para ese día, esa variable no es robusta.

Se puede comprobar que en los dos primeros días el valor del efecto del flujo del aire supera el valor límite ($\Delta_{\text{límite}}$) para esos días por lo que esa variable no es robusta. Esto se comprobó los dos primeros días en los que se realizaron las medidas de los experimentos de robustez; por ello, la variación del flujo de aire se hizo más pequeña para así comprobar si una menor disminución haría la variable robusta. En el tercer día de las medidas de los experimentos de robustez se comprobó que todas las variables son robustas por lo que una variación pequeña en el flujo de aire no afectó a la determinación de carbono orgánico en las muestras. Aun así, es conveniente controlar minuciosamente el flujo del aire antes de realizar alguna medida de NPOC.

5. CONCLUSIONES

Tras la realización de los experimentos descritos en este trabajo se puede considerar cumplido el objetivo principal del mismo: la validación de los métodos analíticos para la determinación de la concentración de amonio y nitrato mediante la técnica analítica del electrodo de ión selectivo y la determinación de la concentración de Carbono Orgánico Total mediante el uso del TOC.

Por una parte, se ha comprobado que la técnica analítica del ISE para la validación de la determinación de amonio y nitrato muestra un intervalo lineal adecuado para las concentraciones de analito esperadas en las muestras de estuarios. Por otra parte, siendo los dos métodos robustos, una pequeña alteración inadvertida en las condiciones de medida no afecta al resultado de la determinación. Además, se ha descubierto mediante el análisis de precisión de la determinación de amonio que este analito no es estable en el tiempo ya que muestra una tendencia a la baja en los diferentes días en los que se analizó la misma muestra. Esto no ocurre en el caso del nitrato por lo que este analito es estable al menos en el intervalo temporal en el que se realizó el análisis.

En la validación de la determinación de TOC, se ha comprobado que la respuesta del equipo es lineal para el intervalo de concentraciones de carbono orgánico esperadas en aguas de estuario y que la concentración de este analito en la misma muestra es estable a lo largo del tiempo. Sin embargo, es necesario controlar el flujo de la corriente del aire del equipo ya que se ha comprobado que variaciones amplias de esta variable la hacen no robusta.

Por otra parte se han validado los diferentes métodos para muestras de agua de estuario ya que no había estudios previos en aguas con estas características. En la determinación del amonio y nitrato el uso de las adiciones estándar eliminó el efecto matriz de las muestras y en la determinación del carbono orgánico total, el analizador de TOC no se ve afectado por la salinidad de las muestras siempre y cuando se limpie y se vuelva a realizar el calibrado tras medir 40 ó 60

muestras de este tipo e impedir que se forme un tapón de sal cristalizada en la columna.

Por último, cabe señalar que no se ha podido realizar la validación de los métodos analíticos estudiados en lo referente a su exactitud al carecer, por una parte, de materiales de referencia certificados para estos parámetros, y por otra, de otras técnicas analíticas adecuadas para llevar a cabo estas determinaciones.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] ISO/IEC, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories, Second Edition, 2005.
- [2] J.M. Green, Peer reviewed: a practical guide to analytical method validation, *Anal. Chem.* 68 (1996) 305A–309A.
- [3] EURACHEM, ed., The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics, Engl. ed. 1.0, LGC, Teddington, Middlesex, 1998.
- [4] Eurachem, Co-operation on International Traceability in Analytical Chemistry, Quality assurance for research and development and non-routine analysis., LGC, Teddington, 1998.
- [5] I.H.T. Guideline, others, Validation of analytical procedures: text and methodology, Q2 R1. 1 (2005).
- [6] M.H. Ramsey, S.L. Ellison, Eurachem/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement uncertainty arising from sampling: a guide to methods and approaches, (2007).
- [7] P. Bedregal, B. Torres, M. Ubillús, P. Mendoza, E. Montoya, Robustness in NAA evaluated by the Youden and Steiner test, *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 278 (2008) 801–806. doi:10.1007/s10967-008-1704-5.
- [8] M.H. Ramsey, S.L.R. Ellison, "EURACHEM/EUROLAB/CITAC/Nordtest/AMC Guide: Measurement Uncertainty Arising for Sampling: A Guide to Methods and Approaches", 2007.
- [9] G. Bagur, M. Sanchezvinas, D. Gazquez, M. Ortega, R. Romero, Estimation of the uncertainty associated with the standard addition methodology when a matrix effect is detected, *Talanta.* 66 (2005).
- [10] R. De Marco, G. Clarke, B. Pejic, Ion-Selective Electrode Potentiometry in Environmental Analysis, *Electroanalysis.* 19 (2007) 1987–2001.

- [11] I. Bisutti, I. Hilke, M. Raessler, Determination of total organic carbon – an overview of current methods, *TrAC Trends Anal. Chem.* 23 (2004) 716–726.
- [12] O. Thomas, H. El Khorassani, E. Touraud, H. Bitar, TOC versus UV spectrophotometry for wastewater quality monitoring, *Talanta.* 50 (1999) 743–749.
- [13] J. Qian, K. Mopper, Automated high-performance, high-temperature combustion total organic carbon analyzer, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3090–3097.
- [14] E.T. Peltzer, B. Fry, P.H. Doering, J.H. McKenna, B. Norrman, U.L. Zweifel, A comparison of methods for the measurement of dissolved organic carbon in natural waters, *Mar. Chem.* 54 (1996).
- [15] J.N. Miller, J.C. Miller, *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Pearson Education, 2005.
- [16] L. Cuadros Rodríguez, A.M. Campaña, F. Ales Barbero, C. Jimenez Linares, M. Roman, Validation of Analytical Instrumental Method by Standard Addition Methodology, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471–476.
- [17] M. Thompson, Standard additions: myth and reality, *AMCTB.* 37 (2009).
- [18] R.C. Castells, M.A. Castillo, Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model, *Anal. Chim. Acta.* 423 (2000) 179–185.
- [19] J. Kragten, Calculating standar deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique, *Anayst.* 119 (1994) 2161–2166.
- [20] M. Wojdyr, Fityk: a general-purpose peak fitting program, *J. Appl. Crystallogr.* 43 (2010) 1126–1128.