

**LAIA SABATÉ SANCHO**

**Validació i Acreditació d'un mètode per  
ICP-MS per la determinació de metalls en  
diferents matrius**

---

**Treball de Fi de Grau**

**Dirigit pel Sr. Agustí Colom i Feliu**

**Grau en Química**



**UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI**

**Tarragona**

**2015**



## Abstract

Nowadays if a laboratory wants to guarantee the quality of their results, their technical competence and to have an international reputation it requires the UNE<sup>1</sup>-EN<sup>2</sup> ISO<sup>3</sup>/IEC<sup>4</sup> 17025 accreditation, which for simplicity is told ISO 17025. [1]

The main aim of this Project is to validate a method for the simultaneous determination of eleven metals in two different kind of water; Continental water and current drinking water. Once validated, the laboratory will apply for the accreditation of ISO 17025 to the Entitat Nacional d'Accreditació (ENAC). [2]

The following step will be the visits of a group of specialized auditors with the purpose of evaluate all the factors that contribute on the obtaining of the reliable results.

Finally, as the auditor requires, the method will be used on the analysis of an unknown sample for determinate the eleven metals studied.

---

<sup>1</sup> UNE: Acrònim de "Una Norma Espanyola"

<sup>2</sup> EN: Normes Europees

<sup>3</sup> ISO: Organització Internacional de Normalització

<sup>4</sup> IEC: Comissió Electrònica Internacional

# Index

1. Objectius.....	6
2. Introducció.....	6
3. Fonaments .....	8
3.1. Tècnica ICP-MS .....	8
3.2. Validació d'un mètode.....	10
3.2.1. Procés de validació .....	11
3.2.2. Paràmetres de Qualitat .....	11
3.2.2.1. La Selectivitat .....	12
3.2.2.2. Rang de Treball .....	12
3.2.2.3. Linealitat .....	12
3.2.2.4. Sensibilitat.....	13
3.2.2.5. Límit de Detecció (LD).....	14
3.2.2.6. Límit de Quantificació (LQ) .....	14
3.2.2.7 Robustesa.....	14
3.2.2.8. Precisió.....	15
3.2.2.9. Biaix.....	16
3.2.2.10. Incertesa .....	17
3.2.3. Requisits d'una validació pel RD.....	23
4. Part Experimental.....	24
4.1. Introducció .....	24
4.2. Equips, Materials i Reactius.....	25
4.2.1. Equips .....	25
4.2.1. Materials.....	25
4.2.1. Reactius .....	25
4.3. Preparació de Patrons i Mostra .....	26
4.3.1. Preparació del MIX .....	26
4.2.1. Preparació dels patrons.....	29
4.2.1. Preparació del Patró Intern .....	30

4.4. Anàlisi Instrumental.....	31
4.4.1 Condicionament previ a l'anàlisi .....	31
4.4.2 Anàlisi del mètode.....	31
4.4.3 Ús del mètode en una mostra desconeguda .....	33
4.5. Càlculs .....	34
5. Resultat i discussió.....	40
6. Conclusions.....	48
7. Bibliografia.....	50

## 1. Objectius

- ✓ Validar un mètode per la determinació d'onze metalls (B, Cr, Ni, Cu, As, Se, Sr, Cd, Sb, Ba i Pb) en aigua continental i de consum humà amb la tècnica ICP-MS per l'obtenció de l'acreditació de la ISO 17025 de les validacions anteriors, dins del rang de treball sol·licitat.
- ✓ Determinació dels onze metalls en una mostra cega utilitzant el mètode validat.

## 2. Introducció

Degut a l'escassetat de l'aigua als anys 70 a les comarques de Tarragona i a la dependència d'aquesta, al 1981 s'aprova al Parlament espanyol la Llei 18/1981 d'actuacions en matèria d'aigües de Tarragona. Gràcies a aquesta nova llei, la qual exigeix una major eficàcia en la distribució de l'aigua i en el seu aprofitament agrícola, i degut a les pèrdues que es produïen per l'absorció de la terra als canals de regadiu de la dreta i de l'esquerra del riu, es va portar a terme el revestiment d'aquests per tal d'aprofitar l'aigua que s'estava perdent. [3]

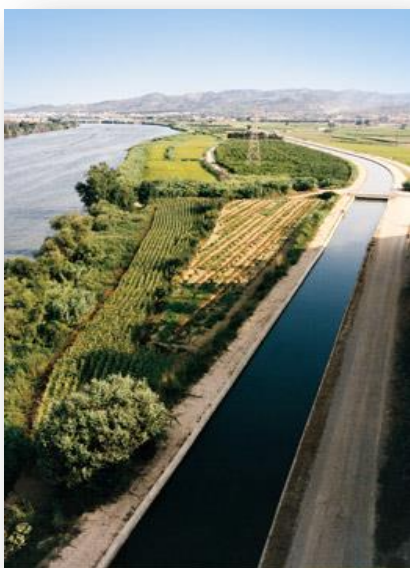


Figura 1. El Riu Ebre i un canal de regadiu.

L'any 1985 neix el que és avui el Consorci d'Aigües de Tarragona, CAT (**Figura 2**). Avui dia, el Consorci, capta l'aigua dels canals de regadiu, aprofitant així la seva recuperació, resultat del revestiment dels canals, la potabilitza a la planta de l'Ampolla, controla la seva qualitat i la distribueix als seus consorciats amb criteris d'eficiència, sostenibilitat i responsabilitat social. En la **Figura 1** es pot veure des d'una bona perspectiva, el Riu Ebre i un dels canals revestits.



Figura 2. Instal·lacions del CAT a l'Ampolla.

El Consorci d'Aigües de Tarragona és un ens amb personalitat jurídica pròpia sense ànim de lucre, format per la Generalitat de Catalunya, ajuntaments i indústries de la província de Tarragona i representants de les dues comunitats de regants del Delta de l'Ebre.

Per tal d'assegurar una major qualitat en els resultats, des de fa més d'un any, s'està treballant per aconseguir l'acreditació de la ISO 17025<sup>5</sup> de certs paràmetres. L'objectiu que s'ha proposat enguany és aconseguir l'acreditació d'onze metalls en Aigua de Consum<sup>6</sup> i en Aigua Continental<sup>7</sup> utilitzant la tècnica ICP-MS.

És imprescindible que els paràmetres estudiats dins d'un Rang de Treball d'interès compleixin amb els establerts pel Reial Decret 140/2003, de 7 de febrer [4]. Aquest document descriu, entre altres, els criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà.

A dia d'avui, el Consorci conta amb l'acreditació de certs paràmetres i té previst ampliar l'acreditació d'altres.

<sup>5</sup> La norma ISO/IEC 17025 es pot adquirir a [www.aenor.es](http://www.aenor.es)

<sup>6</sup> Aigua de Consum: Mostra d'aigua embotellada, de l'aixeta, etc.

<sup>7</sup> Aigua Continental: Mostra d'aigua provinent d'un riu, pantà, canal, etc.

### 3. Fonaments

#### 3.1. Tècnica ICP-MS

Un ICP-MS (Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometry) és un espectròmetre de masses capaç de subministrar informació qualitativa i quantitativa sobre la composició elemental inorgànica d'una mostra. En un ICP-MS té lloc la separació dels ions de l'analít, generats per una font de ionització, Plasma ICP, en funció de la relació massa/càrrega ratio,  $m/z$ . [5]

En aquesta tècnica poden aparèixer Interferències Espectrals com ara; Interferències Isobàriques i Interferències Poliatòmiques. El primer tipus poden sorgir, per exemple, com a resultat de la superposició de masses atòmiques de diferents elements. Per tal de solvatar l'efecte de les interferències, al tenir l'espectrometria de masses l'habilitat de mesurar ratios d'isòtops, a l'hora de processar els resultats, es selecciona l'isòtop lliure d'interferències isobàriques. Gràcies a la cel·la de Col·lisió/Reacció; Octapol, es poden suprimir aquelles interferències que són difícils d'eliminar. L'Octapol treballa tant amb l'He com l'H<sub>2</sub>. [6]

El mecanisme que es du a terme és el següent:

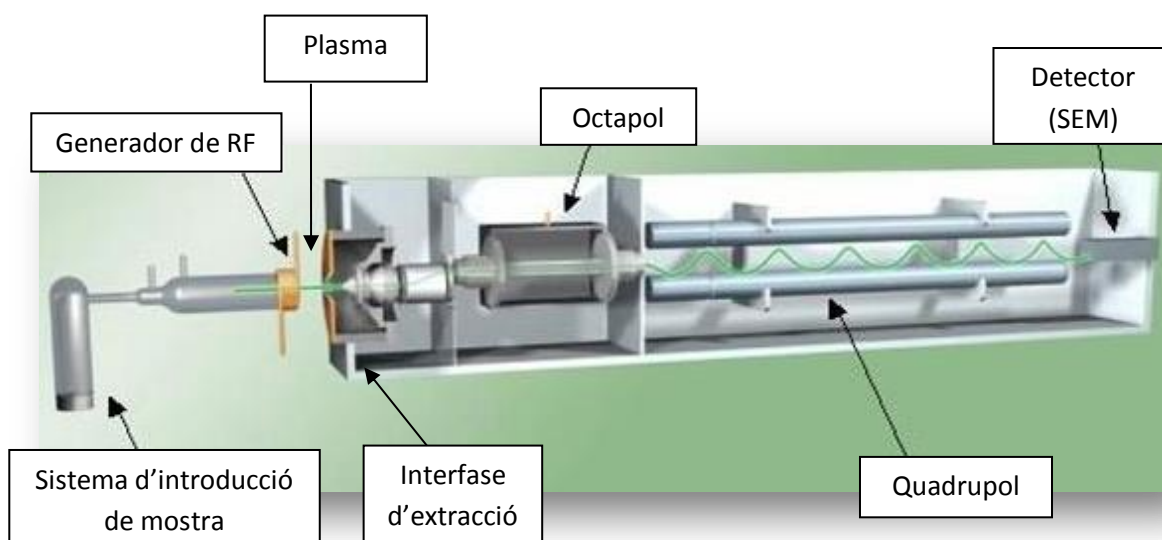


Figura 3. Representació del ICP-MS i les seves parts.

**a. Sistema d'Introducció de mostra**

La mostra en estat líquid és convertida en Aerosol (Nebulització).

**b. Font de ions**

Aquesta mostra en forma d'aerosol entra de manera continua a través d'una torxa de quars, al final de la qual, s'aplica llum i energia calorífica, provinent d'una font d'alta intensitat, a pressió atmosfèrica. En aquestes condicions la mostra entra en estat de plasma. En aquest moment succeeixen una sèrie de reaccions:

1. Des-solvatació  $\text{H}_2\text{O}_{(l)} \rightarrow \text{H}_2\text{O}_{(g)}$
2. Vaporització  $\text{MX}_{(s)} \rightarrow \text{MX}_{(g)}$
3. Atomització  $\text{MX}_{(g)} \rightarrow \text{M} + \text{X}$
4. Ionització  $\text{M} \rightarrow \text{M}^+$
5. Recombinació  $\text{M}^+ + \text{e}^- \rightarrow \text{M}$

**c. Interfase**

Tot seguit a la interfase, el feix de ions generat és focalitzat cap a l'analitzador de masses mitjançant un sistema de cons i de lents iòniques amb la finalitat de focalitzar el feix de ions i separar les espècies neutres. A la càmera de l'octapol és on es produeixen les reaccions que provoquen l'eliminació de les interferències poliatòmiques. [6]

**d. Analitzador de masses**

L'analitzador de masses; el Quadrupol; un filtre format per quatre barres cilíndriques de metall del mateix diàmetre i longitud. El ell té lloc la separació seqüencial dels diferents ions en funció de la relació massa/càrrega adequada.

**e. Detector**

Finalment, el detector tipus Multiplicador d'Electrons Secundaris (SEM) consisteix en una successió de dínodes discrets col·locats en cascada a potencials creixents que converteixen els ions incidents en una corrent elèctrica amplificada.

### 3.2. Validació d'un mètode

La validació d'un mètode d'assaig és una de les últimes etapes del procés d'anàlisi, imprescindible per a garantir la traçabilitat dels resultats i la seva fiabilitat. Internacionalment, és reconeguda com a criteri imprescindible per a l'establiment d'un complet sistema de qualitat. [7] Segons la normativa internacional a la que es vol acreditar el laboratori [8];

*“ La validació és la confirmació, a través de l'examen i l'aportació d'evidències objectives, de que es compleixen els requisits particulars per a un ús específic previst.”*

#### **ISO 17025 - [5.4.5.1]**

Un laboratori com el de QAMA, on es controla la qualitat de l'aigua, utilitzada com a consum humà, mitjançant anàlisis periòdics, ha de garantir que els resultats obtinguts compleixen amb els requisits establerts de les normatives adients de sanitat. Per tant, és vital que el responsable de l'anàlisi garanteixi resultats traçables per a assegurar que els paràmetres estudiats compleixen amb els requisits establerts.

Un mètode sempre s'ha de validar quan és necessari verificar que els seus paràmetres de qualitat s'adeqüen al problema analític plantejat.

La ISO 17025 especifica que s'ha de validar en el cas de:

- L'ús de mètodes no normalitzats
- L'ús de mètodes normalitzats amb informació incompleta
- L'ús de mètodes normalitzats fora del seu abast
- El control de qualitat detecta errors de mètode
- Demostrar l'equivalència de dos mètodes
- Re-validacions programades; exercicis interlaboratoris, controls de qualitat interns o externs...
- Ampliacions i modificacions dels mètodes normalitzats.

### **3.2.1. Procés de validació**

El procés de validació d'un mètode en un laboratori comença fixant els requisits, contrastant-los amb l'abast del mètode i finalitza omplint el registre de validació. Els requisits habituals del mètode venen imposats pels clients o per la legislació, tot i que, el mateix laboratori pot establir els seus propis requisits interns.

Una vegada haver obtingut les dades primàries, es procedeix a organitzar les dades, reorganitzar els càlculs, a l'aplicació de criteris i finalment a la complementació de registres. [1]

### **3.2.2. Paràmetres de qualitat:**

Abans de du a terme la validació d'un mètode d'assaig, s'han d'establir i conèixer els paràmetres de qualitat que s'han de validar: [7]

- La selectivitat
- Rang de treball
- Linealitat
- Sensibilitat
- Límit de detecció
- Límit de quantificació
- Robustesa
- Precisió
- Biaix
- Incertesa

En funció del mètode, el laboratori no ha d'avaluar tots aquests paràmetres, si més no, una part d'ells. [7]

### **3.2.2.1. La Selectivitat**

La selectivitat és la capacitat d'un mètode per a determinar exacta i específicament l'analit d'interès en presència d'altres components en la matriu de comportament similar.

S'avalua la selectivitat analitzant un paràmetre específic en diferents matrius, comprovant la recuperació i precisió obtinguts en els diferents casos.

### **3.2.2.2. Rang de treball**

El Rang de Treball és l'interval de concentracions en que el paràmetre analític pot ser determinat amb una exactitud i precisió acceptables.

A la pràctica, coincideix amb el rang comprès entre el límit de quantificació i la concentració màxima definida. De manera general, el límit de quantificació és específic per cada analit i cada matriu. En el cas de que la mostra sigui molt concentrada, es considera acceptable aplicar dilucions.

En aquest cas, el Rang de treball específic per cada metall es troba definit a la Taula 1.

### **3.2.2.3. Linealitat**

El Rang de linealitat és la zona on la relació entre la concentració de l'analit i la resposta són proporcionals. Es representa la relació amb una línia recta.

En aigües, és habitual utilitzar patrons preparats pel propi laboratori directament sobre aigua. Si existeixen interferències degudes a la matriu que no poden ser eliminades o controlades, s'ha d'avaluar la necessitat d'utilitzar el mètode d'addicions.

Per tal d'avaluar la linealitat del mètode, es du a terme la representació gràfica, on s'obté a més de l'equació de la recta, el Coeficient de Determinació ( $R^2$ ). Aquest coeficient proporciona la correlació entre les variables concentració i senyal analítica. El seu valor es troba sempre comprès entre 0 i 1, sent 1 el valor de millor correlació. En tècniques espectrofotomètriques és acceptable un 0,99. Si més no, aquest paràmetre avalua la recta de regressió en el seu conjunt, no avalua el grau d'ajust de cada un dels punts experimentals que intervenen, per lo que no és suficient per l'estudi de la linealitat del mètode. Per tant, és necessari completar l'estudi amb altres opcions, com ara:

- **Anàlisi de residuals de regressió**

El residual és, per a cada nivell de concentració, la diferència entre el valor obtingut i el valor de referència el del patró utilitzat. Aquests valors es poden representar en un gràfic sent la coordenada x la concentració teòrica i la y la residual.

- **Desviació del factor de resposta ( $RSD_{fr}$ )**

El factor resposta és el quocient entre la senyal de l'instrument per a una concentració y la pròpia concentració de l'analit. Els seus valors haurien de ser pràcticament constants. Per a comprovar-ho, es calcula la desviació estàndard de la sèrie formada pels factors de resposta en tot el Rang de Treball. El valor  $RSD_{fr}$  depèn del mètode d'assaig, en aquest cas, com a tècnica espectrofotomètrica (ICP-MS) pot variar un 10%.

#### **3.2.2.4. Sensibilitat**

La sensibilitat d'un mètode analític es correspon amb el quocient entre el canvi en la resposta d'un instrument i el canvi de resposta en l'estímul. L'estímul pot ser, per exemple, la concentració de l'analit.

En sistemes instrumentals, la sensibilitat està representada per la pendent de la recta de calibració.

### **3.2.2.5. Límit de detecció (LD)**

El Límit de Detecció és la menor quantitat o concentració d'un analit que es pot detectar de manera fiable, no necessàriament quantificable pel mètode. [IUPAC, 1985]

El Reial Decret 140/2003 defineix el límit de detecció com el triple de la desviació típica relativa dins del lot d'una mostra natural que conté una baixa concentració del paràmetre.

$$LD = \text{senyal del blanc} + 3 \cdot s$$

### **3.2.2.6. Límit de Quantificació (LQ)**

El Límit de Quantificació correspon al nivell mínim de concentració establert en el procés de validació, per una matriu determinada, en el que es compleixen els valors objectius de veracitat i precisió. Generalment, el límit de quantificació és el punt inferior de l'abast d'acreditació.

$$LD = \text{senyal del blanc} + 10 \cdot s$$

### **3.2.2.7. Robustesa**

La robustesa d'un procediment analític, és una mesura de la seva capacitat de no veure's afectat per variacions en les condicions experimentals en paràmetres del mètode, ja sigui en la temperatura, en el pH, temps de conservació dels reactius, etc. D'aquesta manera, proporciona fiabilitat durant la utilització normal.

### 3.2.2.8. Precisió

La precisió és el grau de concordança entre els valors obtinguts per repeticions d'una mateixa mostra sota unes condicions estipulades de repetibilitat i reproductibilitat. La mesura de la precisió es determina com la desviació estàndard del conjunt dels resultats obtinguts. A menor precisió, major desviació estàndard.

En els estudis de validació, la precisió s'ha d'avaluar en condicions de Reproductibilitat, és a dir, variant en lo possible els equips, els analistes, el dia de l'anàlisi, condicions ambientals, etc. [7]

- Desviació estàndard de **reproductibilitat** ( $S_R$ ), es pot expressar com un coeficient de variació o desviació estàndard relativa.

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (1)$$

$$S_R (\%) = \left(\frac{S_R}{\bar{x}}\right) * 100 \quad (2)$$

On:

- $x_i$ , cada un dels resultats obtinguts
  - $\bar{x}$ , valor mig dels resultats obtinguts
  - $n$ , número de iteracions en condicions de reproductibilitat.
- Desviació estàndard de **repetibilitat** ( $S_r$ ), es calcula d'igual forma que l'anterior. Es pot expressar com un coeficient de variació o desviació estàndard relativa. En el cas que s'hagin determinat les dues, s'obté una **precisió combinada** ( $S_t$ ), equivalent a:

$$S_t = \sqrt{\frac{S_r^2}{n} + S_R^2} \quad (3)$$

La determinació de la precisió s'ha de realitzar en el l'Interval de Linealitat a varis nivells de concentració. A partir dels valors obtinguts en l'estudi de la precisió, es poden establir els límits de reproductibilitat i de repetibilitat, que se'n fan ús pel control de qualitat intern del laboratori.

- **Límit de Reproductibilitat,  $R$ :**

$$R = 2,8 \cdot S_R \quad (4)$$

- **Límit de Repetibilitat,  $r$ :**

$$r = 2,8 \cdot S_r \quad (5)$$

### 3.2.2.9. Biaix

El biaix descriu la diferència que existeix entre el valor mig de mesures repetides i el valor de referència assignat a la mateixa. És l'error sistemàtic<sup>8</sup> en contrast amb l'error aleatori<sup>9</sup>.

Es calcula mitjançant la següent expressió:

$$biaix (b) = \bar{V}_{MR} - \bar{V}_R \quad (6)$$

$$biaix (b \%) = \left( \frac{\bar{V}_{MR} - \bar{V}_R}{\bar{V}_{MR}} \right) * 100 \quad (7)$$

Per tal de contemplar la variació entre sèries, el biaix s'ha de determinar en condicions de Reproductibilitat i en tots els Rangos de Treball.

Alguns textos legals, com ara el RD 140/2003, s'inclou com a paràmetre de qualitat del mètode, el paràmetre Exactitud, però està definit com la diferència

---

<sup>8</sup> Error sistemàtic: Afecten al Biaix del resultat. Es pot donar com error de mostreig, de mesura, error humà, etc.

<sup>9</sup> Error aleatori: Error inevitable produït per esdeveniments incontrolables durant l'anàlisi.

entre el valor obtingut de la mitja d'una sèrie de rèpliques i el valor exacte d'un material de referència. Aquesta definició concorda amb la del biaix [7].

### 3.2.2.10. Incertesa

*Estimació unida al resultat de l'assaig que caracteritza l'interval de valors dins dels quals es pot assegurar que es troba present el valor veritable.*

**[ISO 3534-1:2006]**

En primer lloc, per a l'estimació de la Incertesa, s'han d'identificar les diferents contribucions que poden tenir influència sobre aquest valor. En aquest cas, a l'hora de fer el càlcul, s'ha de tenir en compte:

- La tolerància dels patrons i/o materials de referència utilitzats.
- La Incertesa dels equips emprats. En aquest cas el de la balança analítica.
- Les dilucions de cada paràmetre a determinar preparades abans de fer l'anàlisi.

Un cop es coneixen les contribucions anteriors, es procedeix a fer el càlcul de la Incertesa.

Per una banda, el valor de la Incertesa que interessa conèixer és el de la Incertesa Expandida ( $U$ ) que proporciona l'interval en el que s'espera trobar el valor vertader amb una determinada probabilitat. Aquesta Incertesa s'obté multiplicant la Incertesa Combinada ( $u_c$ ) per un factor de cobertura ( $k$ ) tal i com es mostra en l'equació (9). Normalment s'utilitza el valor de  $k = 2$ , ja que, assumint una distribució normal, implica una probabilitat del 95% de hi sigui el valor vertader.

$$U = k \cdot u_c \quad (9)$$

En termes generals, la combinació de les components d'Incertesa degudes a la Reproductibilitat (error aleatori),  $a$ , i a al Biaix del mètode (error sistemàtic),  $b$ , pot donar una aproximació acceptable a l'estimació de la Incertesa del mètode utilitzat, que tal com es mostra a l'equació 10, al sumar-se quadràticament, s'obté la Incertesa Combinada ( $u_c$ ).

$$u_c = \sqrt{u_a^2 + u_b^2} \quad (10)$$

Tenint en compte que en el present treball la Incertesa de mesura és calculada per l'estimació de les dades experimentals de validació o de control de qualitat mitjançant Patrons de Control, el càlcul de la incertesa combinada es realitza de la següent manera:

$$u_c = \sqrt{u_R^2 + u_{biaix}^2} \quad (11)$$

Sent:

- $u_c$ , Incertesa combinada
- $u_R$ , Incertesa típica de reproductibilitat dins del laboratori
- $u_{biaix}$ , Incertesa típica de biaix

Per a realitzar la suma quadràtica, tots els components han d'estar en termes absoluts o relatius (%). D'aquesta manera s'obté la Incertesa Expandida en tant per cent. L'equació anterior de la incertesa relativa quedaria de la manera següent (12):

$$u_c(\%) = \sqrt{u_R^2(\%) + u_{biaix}^2(\%)} \quad (12)$$

En el present estudi es porta a terme la tècnica d'addicions. Per tant, a l'hora de calcular la incertesa del mètode en els diferents metalls, s'hauria de tenir en compte. En aquest cas, a l'estudiar mitjançant un test F de Fisher si les desviacions dels punts de les rectes de les dos matrius respecte la matriu Mil-li

Q, són atribuïdes a l'error aleatori, i obtenir que són rectes comparables i que per tant, l'efecte de la matriu no altera la resposta dels paràmetres que es volen determinar, s'estima la Incertesa a partir de Materials de Referència, tal i com es calcula en matriu Mil-li Q.

Taula 1. Comparació de les variàncies mitjançant un Test F.

Recta	$s^2$	Graus de llibertat	F cal	F tab	Rectes equivalents
M. Continental	2,159	5	1,00	5,05	SI
M. Mil-li Q	2,159	5			

Tot seguit, es defineixen els diferents paràmetres dels que depèn la Incertesa Relativa del mètode utilitzat.

#### a. Càlcul de la component de l' incertesa de reproductibilitat ( $u_R$ )

La incertesa de reproductibilitat ( $u_R$ ) és la component de la Incertesa Combinada, deguda als errors aleatoris. L'error aleatori succeeix quan les mesures repetides, ja sigui d'un mateix subjecte o en diferents membres de la població en estudi, varien de manera no predictable [8].

El valor de la incertesa típica de reproductibilitat  $u_R$  pot associar-se a la dispersió  $S_R$  dels "n" resultats obtinguts en la mesura de la reproductibilitat d'una mostra, sent:

$$u_R = s_R = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (13)$$

A l'hora de calcular-ho en termes relatius:

$$u_R (\%) = \frac{u_R}{\bar{x}} * 100 \quad (14)$$

## b. Càlcul de la component de l' incertesa del biaix ( $u_{biaix}$ )

La component de l' Incertesa del biaix és la corresponent als errors sistemàtics. Tot seguit es defineix com calcular la component  $u_{biaix}$  a partir del Material de Referència Matricial. Per cada un dels materials de referència utilitzats per cada paràmetre a estudiar l'estimació d'aquest component és:

$$u_{biaix} = \sqrt{u_{MR}^2 + \left(\frac{s_{MR}}{\sqrt{n}}\right)^2 + b^2} \quad (15)$$

Sent:

- $u_{MR}$ , incertesa típica del material de referència (16)
- $s_{MR}$ , desviació estàndard de les mesures realitzades sobre el material de referència
- $n$ , número de repeticions realitzades
- $b$ , valor numèric del biaix (6).

Per al càlcul del  $u_{MR}$ , el certificat del material de referència expressa la seva incertesa amb un interval de confiança del 95% ( $k = 2$ ). Aquest cas descriu una distribució de tipus normal i la seva incertesa típica es calcula com:

$$u_{MR} = \frac{U_{MR}}{k} \quad (16)$$

Sent:

- $U_{MR}$  la incertesa expandida del Material de Referència utilitzat tenint en compte la o les dilucions prèvies (17)
- $k$  el factor de cobertura, 2.

La Incertesa Expandida del material de referència,  $U_{MR}$  (17), prové del producte entre el factor  $k$  i la incertesa combinada  $u_{c2}$  (18).

$$U_{MR} = k * u_{c2} \quad (17)$$

Tenint en compte les dilucions prèvies preparades, mitjançant la Llei de la propagació de les variàncies s'obté :

$$u_{c2} = \sqrt{\frac{C_1^2}{V_2^2} * u_{V_1}^2 + \frac{V_1^2}{V_2^2} * u_{C_1}^2 + \frac{C_1^2 * V_1^2}{V_2^4} * u_{V_2}^2} \quad (18)$$

On:

- $C_1$  és la concentració del Material de Referència del que es parteix.
- $V_1$  és el volum del Material de Referència que s'agafa per fer la dilució.
- $C_2$  és la concentració final de la dilució preparada.
- $V_2$  és el volum final de la dilució preparada.
- $u_{V_1}$  i  $u_{V_2}$  són les incerteses de la balança. (19)
- $u_{c1}$  és la incertesa del patró mare a partir del qual es realitza la dilució. (20)

La Incertesa de la balança emprada es calcula:

$$u_{V_x} = \frac{\text{Tolerància de la balança}}{\sqrt{3}} \quad (19)$$

La Incertesa del Material de Referència, a partir del qual es realitza la dilució:

$$u_{c1} = \frac{I_{MR}}{K} \quad (20)$$

Sent:

- $I_{MR}$  la incertesa del Material de Referència del qual es preparen les dilucions.

En el cas d'expressar els resultats amb termes relatius s'han de tenir en compte les següents expressions:

$$u_{MR} (\%) = \left( \frac{U_{MR}}{2} \right) * \frac{100}{\bar{V}_{MR}} \quad (21)$$

$$\frac{s_{MR}}{\sqrt{n}} (\%) = \left( \frac{\frac{s_{MR}}{\sqrt{n}}}{\bar{V}_{MR}} \right) * 100 \quad (22)$$

$$b(\%) = \frac{|\bar{V}_{MR} - \bar{V}_R|}{\bar{V}_{MR}} * 100 \quad (23)**$$

On:

- $\bar{V}_{MR}$  és el valor mig de les mesures realitzades amb el material de referència.
- $\bar{V}_R$  és el valor mig de les mesures de la reproductibilitat.

A partir d'aquestes últimes expressions, l'equació (15) queda de la següent manera:

$$u_{biaix} (\%) = \sqrt{u_{MR}^2 (\%) + \frac{s_{MR}}{\sqrt{n}} (\%) + b(\%)} \quad (24)$$

Per acabar, amb la relació de l'equació del  $u_{biaix}$  (24) i de  $u_R$  (14) s'obté la incertesa combinada (12) i finalment la Incertesa expandida del mètode en termes relatius.

$$U (\%) = k \cdot u_c (\%) \quad (25)$$

Donat que el valor de la Incertesa obtingut pot variar significativament depenent de la matriu o del rang de concentració aplicat, l'estimació s'ha de fer en les diferents matrius a les que s'aplica el mètode i en els diferents rangs de treball.

Al tenir deu valors de reproductibilitat de cada rang de treball i de cada paràmetre d'interès, s'estableix la incertesa del mètode d'assaig en funció dels resultats obtinguts. De tal manera que s'estudia la Incertesa del valor més gran i del més petit dels deu valors i s'estableix la Incertesa més desfavorable.

### 3.2.3. Requisits d'una validació pel RD

Per tal de validar el mètode utilitzat, s'han de complir una sèrie de requisits. En concret, el RD 140/2003 exigeix per a uns paràmetres específics, en el qual en el document hi figuren nou dels onze metalls estudiats, que el mètode utilitzat compleixi amb el Límit de Detecció indicat i que sigui capaç de mesurar concentracions iguals al 10% del Valor Paramètric<sup>10</sup> (VP) amb una Exactitud i Precisió Combinada especificada al mateix document. A la Taula 2 s'hi poden observar els paràmetres i exigències que es demana per la validació del mètode. [4]

Taula 2. Requisits que s'han de complir exigits pel RD 140/2003.

Element	Precisió Combinada (%)	Biaix (%)	Valor Paramètric (µg/L)	Concentració mínima a quantificar segons RD (µg/L)
Bor	10	10	1000	100
Crom	10	10	50	5
Níquel	10	10	20	2
Coure	10	10	2000	200
Arsènic	10	10	10	1
Seleni	10	10	10	1
Cadmi	10	10	5	0,5
Antimoni	25	25	10	1
Plom	10	10	10	1

En un principi, s'espera que els quatre Rangs de Treball compleixin amb aquests requisits, en el cas de que algun Rang Baix no els complís, el punt baix de l' Interval d'Acreditació s'adjudicaria al següent Rang que ho fes.

<sup>10</sup> Valor Paramètric: Nivell màxim o mínim fixat per a cada un dels paràmetres que s'ha de controlar.

## 4. Part experimental

### 4.1. Introducció

Per tal de realitzar la determinació d'onze metalls pesants, es defineix el mètode de treball, en concret, del Bor, Crom, Níquel, Coure, Arsènic, Seleni, Estronci, Cadmi, Antimoni, Bari i Plom, fent servir la mateixa sistemàtica de treball d'un mètode ja validat, que es va fer servir per demanar l'acreditació d'altres metalls, amb l'objectiu de validar un mètode per determinar en concret els metalls d'interès a un Rang de Treball específic. En aquest cas, el mètode de treball és un multi-tune que convina el poder treballar simultàniament en: No gas (Ar), Heli (cel·la de col·lisió) i Hidrògen com a gas reactiu, per tal de minimitzar les interferències; tant poliatòmiques com isobàriques.

El Consorci d'Aigües de Tarragona, porta més de 25 anys analitzant aigües tant de matriu continental com de consum humà, és per això, que degut a l'experiència, es coneix l'interval de treball en el que es troba cada metall d'interès. L'interval de treball de cada element es descriu a la Taula 3. Les mostres amb concentracions superiors al rang corresponent, s'han de diluir prèviament.

Taula 3. Intervals de Treball de cada paràmetre d'interès.

Element	Rang de Treball (µg/L)
Bor	25 - 200
Crom	1,5 - 10
Níquel	1 - 5
Coure	10 - 50
Arsènic	1 - 5
Seleni	1 - 5
Estronci	25 - 200
Cadmi	0,1 - 1
Antimoni	1 - 5
Bari	25 - 200
Plom	1 - 5

Al treballar amb matrius diferents, en aigua Continental i en aigua de Consum Humà, es procedeix a fer l'anàlisi instrumental i la Validació de la mateixa manera. En els pròxims apartats es descriu el procés pràctic realitzat.

## **4.2. Equips, Materials i Reactius.**

### **4.2.1. Equips**

- ICP-MS Agilent 7500 CE
- Autosampler Agilent
- Chiller
- PC amb el programa CHEMSTATION
- Balança analítica Mettler AT261.
- Sistema d'extracció equip ICP
- Bomba de buit

### **4.2.2. Materials**

- Micropipeta de 0-1000µL
- Micropipeta de 0-100µL
- Vials cònics Deltabab Ref 401.204
- Vials 6,5 ml. Deltalab Codi 401.100
- Matràs aforat de 100 mL

### **4.2.3. Reactius**

- Aigua Milli-Q
- Aigua Continental
- Aigua de Consum Humà
- HNO<sub>3</sub> 65% MERCK
- Solució de sintonització de metalls 37965 Agilent

- Solució de Patró Intern de 200 ppb

### **4.3. Preparació de Patrons i Mostra**

- Patrons per la construcció de la recta de calibratge.  
Format pels diferents Materials de Referència certificats de 1000 µg/ml de cada metall.
- Patrons de Control preparats amb concentracions que es troben dins de l'Interval de Treball establert per cada metall. En funció de la concentració que presentin se'ls assigna com Rang Baix, Rang Mig i Rang Alt. En el cas del Rang Baix es preparen dos patrons de concentracions diferents però dins del mateix Rang, d'aquesta manera a l'hora d'estudiar la validació del mètode, si hi hagués el cas de que el primer patró no es pogués validar, es gaudiria d'un segon patró de Rang Baix per obtenir més Interval de Validació i d'Acreditació.
- Patró Intern de 200 ppb. Formats per patrons mare de 1000 µg/ml de diferents proveïdors:
  - Solució patró Gali de 1000 µg/ml. PANREAC 765909.1208
  - Solució patró Ytri de 1000 µg/ml. Jt:Baker 5790
  - Solució patró Rodi de 1000 µg/ml. Chem-Lab CL01.1811.0100
  - Solució patró Tali de 1000 µg/ml. PANREAC 765931.1208

#### **4.3.1. Preparació del MIX**

En aquest projecte l'objectiu on es vol arribar és a la determinació d'onze metalls continguts en una matriu concreta, per tant, a l'hora de preparar els patrons, prèviament s'ha de construir una solució que contingui una concentració específica d'aquests metalls i a partir d'aquesta, preparar els patrons corresponents. A aquesta solució se li anomena MIX.

A l'hora de crear-lo, s'ha de tenir en compte els Interval de Treball de cada metall. És per això, que es creen dilucions intermitges per als metalls que tenen un Interval de Treball molt estret i amb concentracions molt baixes, per després, a l'hora de crear el MIX final, es pipetegin d'aquestes solucions, quantitats coherents. Les dilucions de les que es fan referència són; el MIX 1, format pels metalls que tenen un interval entre 1 i 5 µg/L: el Ni, As, Se, Sb i Pb, i el MIX 2, format pel metall amb un interval entre 0,1 i 1 µg/L; el Cd.

D'aquesta manera, en el cas del MIX 1; Emprant una micropipeta de 0 - 1000 µL, es transfereix quantitativament el volum descrit a la Taula 2, de la solució mare de cada metall i es porta a un vial cònic de 10mL amb la matriu de treball adequada acidificada amb un 1% de nítric.

Taula 4. Preparació del MIX 1.

Element	Concentració patró mare (mg/L)	Volum (mL)
Níquel	1000	1
Arsènic	1000	1
Seleni	1000	1
Antimoni	1000	1
Plom	1000	1
Aigua Milli Q + 1% HNO <sub>3</sub> (volum final)		10 mL

En el cas del MIX 2, com es mostra a la Taula 3, a l'estar format només pel Cadmi, es transfereix quantitativament el volum de la solució mare corresponent, i es porta a un vial cònic de 10mL amb la matriu de treball acidificada.

Taula 5. Preparació del MIX 2.

Element	Concentració patró mare (mg/L)	Volum (mL)
Cadmi	1000	1
Aigua Milli Q + 1% HNO <sub>3</sub> (volum final)		10 mL

A l'hora de crear el MIX Final, es fan les últimes dilucions de tots els metalls, transferint el volum corresponent de patró de cada metall descrit a la Taula 4 al vial cònic de 50 mL. Per aquells que s'ha preparat una dilució intermitja (MIX 1 o 2), a l'hora de pipetejar el volum corresponent, es parteix del MIX preparat i no del Material de Referència del qual ja es va fer la primera dilució.

Finalment, en el mateix MIX, s'obté una concentració específica de cada paràmetre en el que pipetejant quatre o cinc volums diferents, es preparen els quatre patrons de control o els 5 patrons per crear la recta de calibratge on les concentracions de cada metall entren dins dels seus intervals de treball específics. A la Taula 6 es mostren les concentracions dels diferents metalls que formen el MIX final.

Taula 6. Preparació del MIX Final.

Element	Concentració patró mare (mg/L)	Volum (mL)	Concentració final (µg/L)
<b>Bor</b>	1000	1	20000
<b>Crom</b>	1000	0,05	1000
<b>Níquel</b>	100	0,25	500
<b>Coure</b>	100	0,25	5000
<b>Arsènic</b>	100	0,25	500
<b>Seleni</b>	100	0,25	500
<b>Estronci</b>	1000	1	20000
<b>Cadmi</b>	100	0,05	100
<b>Antimoni</b>	100	0,25	500
<b>Bari</b>	1000	1	20000
<b>Plom</b>	1000	0,25	500
Aigua Milli Q + 1% HNO <sub>3</sub> (volum final)		50 mL	

Si es posa com a exemple el cas del Bor, com bé descriu la Taula 3, el seu Interval de Treball es troba entre 25 i 200 µg/L. En aquest cas, no cal fer una dilució prèvia. De tal manera que, pipetejant 1mL del seu material de referència de 1000 µg/mL i portant-ho al MIX final que és d'un volum de 50mL, s'obtindrà una concentració final de 20000 µg/L de Bor.

Per la creació dels Patrons de Control o dels Patrons de la recta, es fan servir MIX idèntics però amb el Material de Referència de diferent proveïdor. Per tant, es crearan dos MIXS.

#### 4.3.2. Preparació dels patrons

En el cas de la preparació dels 5 patrons per construir la recta, es pipeteja, amb ajuda d'una micropipeta, un volum de 12, 25, 40, 50 i 100  $\mu\text{L}$  portant-los a cinc vials cònics d'un volum final de 10 mL amb la matriu acidificada. D'aquesta manera, es creen els cinc patrons que serviran per construir la recta de calibratge del mètode per cada paràmetre. De tal forma que s'obtindrà una recta de calibratge per cada patró. En la Figura 4 s'observa un petit esquema de la preparació d'aquests.

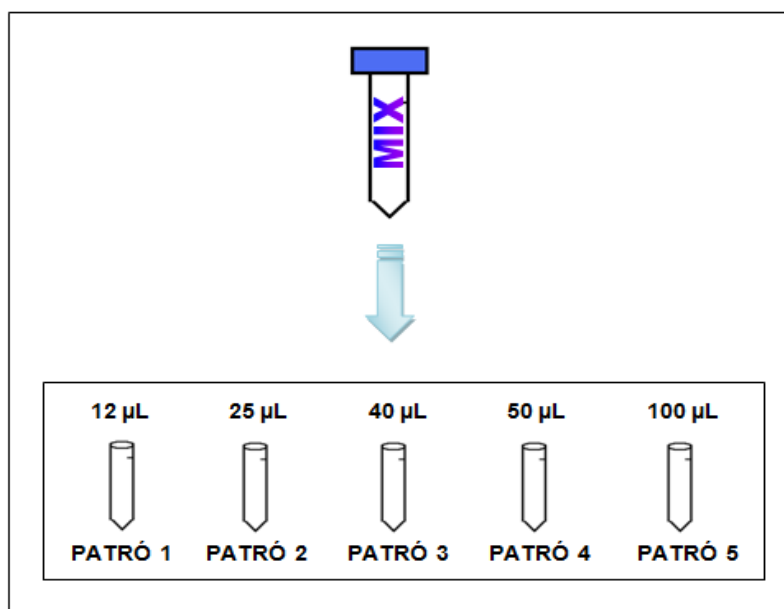


Figura 4. Esquema de la preparació dels cinc patrons.

Una vegada preparat el MIX Final, en aquest cas es pipetegen: 10, 25, 40 i 100  $\mu\text{L}$  i es porten a quatre vials cònics de 10 mL amb la matriu acidificada.

Tant la solució del MIX Final per la preparació dels cinc patrons per construir la recta de calibratge, com el MIX Final per la preparació dels quatre Patrons de Control, conservats a 4°C, són estables sis mesos. Els patrons que depenen d'aquestes solucions s'han de preparar el mateix dia de treball.

A l'hora de fer les dilucions, es fan per pesada, per tenir més precisió i exactitud i disminuir els errors volumètrics. D'aquesta manera, s'ha anotat cadascuna de les pesades per a calcular exactament la concentració i calcular després la incertesa.

Si es continua amb l'exemple del Bor, respectant els volums anteriors, s'obtindrà tant pels cinc patrons utilitzats per construir la recta de calibratge com pels de control, patrons amb un rang de concentracions de 24 a 200 ppb, just el rang de l' Interval de treball.

#### 4.3.3. Preparació del Patró Intern.

Fent ús d'una micropipeta de 0-100µL, es transfereix quantitativament el volum de patró descrit a la taula següent i es porta a un a un matràs aforat de 100 mL amb Aigua Milli-Q acidificat amb un 1% d'Àcid Nítric.

Taula 7. Preparació del Patró Intern de 200 ppb.

Element	Concentració patró mare (mg/L)	Volum (µL)
Gali	1000	20
Ytri	1000	20
Rodi	1000	20
Tali	1000	20
Aigua Milli Q + 1% HNO <sub>3</sub> (volum final)		100 mL

Aquesta solució conservada a temperatura ambient, és estable tres mesos.

## **4.4. Anàlisi Instrumental**

### **4.4.1. Condicionament previ a l'anàlisi**

Processar els patrons i les mostres entre 15 i 25 °C, condicions ambientals habituals de treball en el laboratori.

Les mostres han d'estar acidificades en un 1 - 2% amb HNO<sub>3</sub> 65%. D'aquesta manera, si l'anàlisi no es fa d'immediat es pot conservar a 4°C durant un mes.

Per tal de mostrejar l'instrument de forma automàtica, és necessari traspasar els blancs, patrons i les mostres a vials de 6,5 mL.

### **4.4.2. Anàlisi del mètode**

Per tal de començar amb l'anàlisi es requereix analitzar:

- Tres Blancs de la matriu d'interès.
- Cinc Patrons de concentracions equidistants, dins de l'interval d'linearitat assignat per cada metall, per a construir la recta de calibratge.
- Quatre Patrons de Control; Dos de rang Baix, un de Mig i un d'Alt.

Un cop generat el Plasma i estabilitzat l'equip, només queda preparar-lo per començar amb l'anàlisi. S'edita el mètode indicant les característiques de les mostres a analitzar, especificant les concentracions exactes dels cinc patrons per construir la recta de calibratge i les concentracions del Patró Intern. Un dels passos importants de la creació del mètode és assignar el Patró Intern a cadascun dels elements. S'assigna aquell que la seva massa sigui més propera. Es guarda el nou mètode i s'edita la seqüència, assignant el nom de cadascun dels patrons i de les mostres en funció de la posició que ocupen al

carro de mostreig. Tot seguit es posa en marxa la seqüència i s'analitza de forma automàtica.

Un cop fet l'anàlisi, es pot veure en detall les rectes de calibratge de cada metall i les del Patró Intern, així com el número de comptes, les RSD, la Ratio, les equacions de les rectes i el Coeficient de Determinació,  $R^2$ . Si les rectes de calibratge dels patrons i el Patró Intern són vàlides, voldrà dir que el mètode segueix dins lo previst i que, per tant, es pot processar a l'obtenció dels resultats de les mostres, en aquest cas, per l'estudi de la validació del mètode, dels quatre Patrons de Control.

L'ús del Patró Intern s'utilitza com a eina de suport per controlar que el mètode funciona correctament. A cada element se li assigna, en funció de la seva massa, un dels quatre elements que formen el Patró Intern. Per tal d'assegurar que el mètode funciona correctament, s'han de veure dos situacions:

- b. Pel que fa a la representació gràfica del PI, s'hauria de veure un sol punt, és a dir, que cadascun dels elements tingués la mateixa senyal.
- c. Respecte el resultat de les mostres, es permet que la senyal de PI assignat pateixi una desviació màxima d'un d'un  $\pm 30\%$  respecte el senyal dels patrons de la recta.

En el cas de que el Patró Intern no entri dins els límits establerts, voldria dir que hi ha interferències a la matriu. Una de les possibilitats per fer desaparèixer aquest efecte és fent dilucions fins trobar aquella en la que l'efecte matriu hagi desaparegut. Una vegada trobada la dilució en la que no hi ha efecte matriu es pot prosseguir a fer una addició estàndard per tal de que la resposta de recuperació del mètode sigui satisfactòria.

A l'hora de calcular els paràmetres de qualitat per du a terme la validació del mètode, es requereix tenir un mínim de valors de Repetibilitat i de Reproductibilitat.

Per obtenir els valors de la Repetibilitat s'analitzen en un dia 10 mostres d'un Patró de Control específic en les mateixes condicions. El dia següent es procedeix a fer el mateix amb l'anàlisi de 10 mostres d'un altre Patró Control i així successivament fins obtenir les 10 repeticions dels quatre Patrons de Control. Pel cas dels valors de la Reproductibilitat, s'analitzen els quatre Rangs de Patró de Control durant 10 dies, obtenint així 10 valors de cada Patró de Control en diferents dies.

#### **4.4.3. Ús del mètode en una mostra desconeguda**

Un cop validat el mètode, s'utilitza per determinar els onze metalls en una mostra desconeguda, tal com es faria si vingués un Auditor per estudiar l'acreditació de la ISO.

Es contempla una Mostra desconeguda de 100 mL en un envàs de polietilè acidificada amb un 1-2% d'Àcid Nítric 65%.

En primer lloc, es preparen els patrons per construir la recta de calibratge. Tot seguit, es prepara una bateria de dilucions que s'analitzen directament de la més diluïda a la més concentrada junt amb la mostra sense dilució. Un cop obtingut els resultats es passen a analitzar:

- Es comprova que el resultat del Patró de Control s'ajusta a les condicions establertes del Gràfic de Control específic de cada paràmetre en cada Rang de Treball.
- Es controla la senyal del Patró Intern. Es rebutgen aquelles dilucions que la seva senyal no es troba dins del  $\pm 30\%$  del senyal obtingut dels patrons de la recta.
- D'aquelles dilucions on el Patró Intern corresponent es troba dins del  $\pm 30\%$ , es seleccionen aquelles que el seu resultat es troba dins l'Interval de validació.
- A l'hora de donar els resultats obtinguts, s'ha de tenir en compte les dilucions efectuades.

## 4.5. Càlculs

Generalment, una vegada s'han obtingut els valors de la Repetibilitat i Reproductibilitat dels onze metalls, abans de procedir al càlcul dels diferents paràmetres de qualitat, es du a terme l'estudi de les dades obtingudes fent ús del Test de Grubbs de detecció de punts aberrants. Sempre que sigui necessari, si es sospita d'un valor anòmal se li ha d'aplicar la següent equació:

$$G_{cal} = \frac{x_1 - \bar{x}}{s} \quad (15)$$

Si  $G_{cal} > G_{tab}$ , per un nivell de confiança determinat, el punt sospitós es considera aberrant i s'ha d'eliminar. Això vol dir que, es tornen a estudiar les dades obtingudes obviant el valor rebutjat.

Una vegada es disposa de les dades sense valors aberrants, es procedeix a calcular els paràmetres de qualitat descrits en l'apartat 3.2.2.

Finalment, al tractar-se de la validació d'un mètode per a que després sigui acreditat per un Auditor, es comprova que els resultats obtinguts entrin dins lo especificat pel Reial Decret 140/2003.

Seguint amb l'exemple del Bor, a continuació, es mostren els càlculs realitzats per obtenir els paràmetres de qualitat per a aquest paràmetre en una matriu d'Aigua Continental. A les taules 6 i 7 es mostren els resultats de la Repetibilitat i Reproductibilitat obtinguts.

Taula 8. Dades de Repetibilitat del Bor en Aigua Continental.

Repetibilitat				
	08.07.15	14.07.15	15.07.15	17.07.15
	PC-RB1 (µg/L)	PC-RB2 (µg/L)	PC-RM (µg/L)	PC-RA (µg/L)
	23,40	53,17	86,19	269,10
	22,80	54,79	87,65	272,20
	22,77	54,07	84,70	272,30
	21,95	54,36	86,76	272,80
	22,02	55,60	86,56	274,70
	21,36	54,91	87,57	275,00
	21,50	55,66	86,40	280,50
	21,18	57,61	90,19	279,10
	21,34	56,71	90,28	276,90
	21,20	57,75	90,39	277,00
$S_{repe} =$	0,787	1,514	1,979	3,488
$V_m =$	21,95	55,46	87,67	274,96
$n =$	10	10	10	10

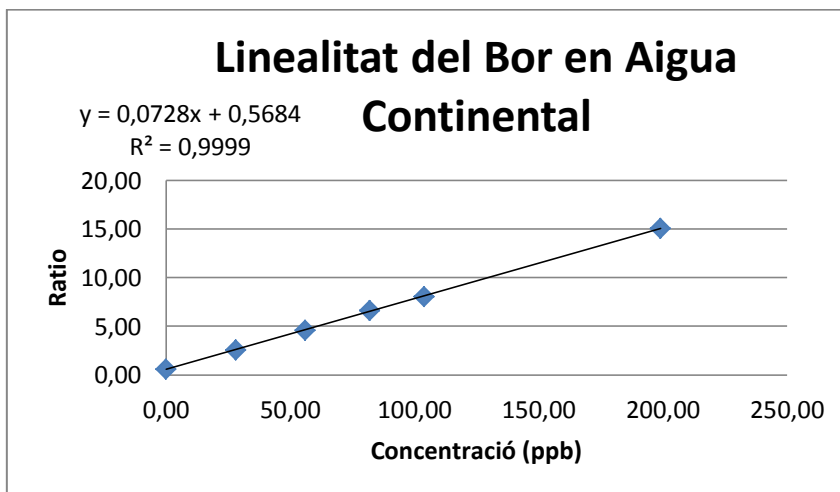
Taula 9. Dades de Reproductibilitat del Bor en Aigua Continental.

Reproductibilitat				
	PC-RB1 (µg/L)	PC-RB2 (µg/L)	PC-RM (µg/L)	PC-RA (µg/L)
08.07.15	21,95	53,93	80,07	197,70
14.07.15	29,96	55,46	96,21	218,20
15.07.15	27,54	56,54	87,67	219,10
17.07.15	30,68	52,83	83,51	274,96
20.07.15	32,01	54,01	87,93	206,20
21.07.15	23,96	53,39	79,73	192,40
22.07.15	32,60	52,24	76,70	199,80
23.07.15	27,55	50,65	79,73	195,30
24.07.15	28,03	51,31	79,47	198,80
27.07.15	24,34	53,68	86,86	203,00
$S_{repro} =$	3,572	1,778	5,885	24,351
$V_m =$	27,86	53,40	83,79	210,55
$n =$	10	10	10	10
$V_R =$	25,53	51,18	81,68	207,6

On:

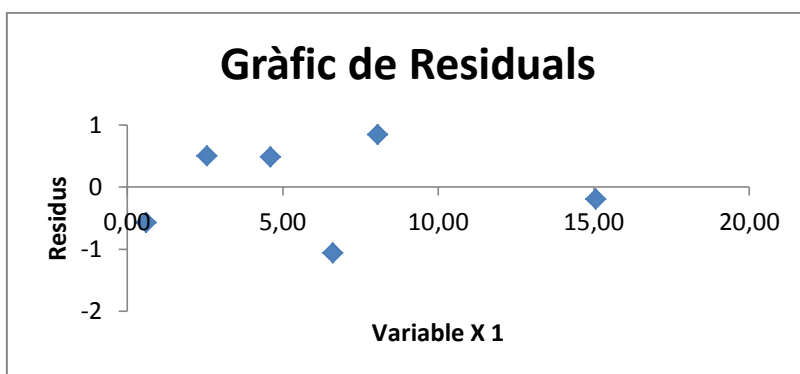
- PC- RB1, Patró de Control Rang Baix 1
- PC-RB2, Patró de Control Rang Baix 2
- PC-RM; Patró de Control Rang Mig
- PC-RA; Patró de Control Rang Alt
- S, desviació estàndard
- V, la mitjana de les dades
- n, número de mostres analitzades.

En primer lloc, es controla la linealitat de la recta de calibratge estudiant els Residuals de Regressió i comprovant que la Desviació del Factor Resposta (RSD) no variï més d'un 10%, segons lo estipulat per tècniques com l'ICP-MS.



Concentració (ppb)	Ratio
0,00	0,61
28,07	2,58
55,94	4,61
81,99	6,61
103,80	8,06
199,00	15,07

Gràfic 1. Representació de la recta de calibratge del Bor en Aigua Continental.



Taula 10. Factor Resposta.

	RSD
	0,092
	0,082
	0,081
	0,078
	0,076
$X_{fr} =$	0,082
$S_{fr} =$	0,006
<b>fr =</b>	<b>7,6</b>

Gràfic 2. Gràfic de Residuals.

Com es pot observar en el Gràfic 1, es mostra una bona proporcionalitat entre la concentració i la resposta de l'instrument. El Coeficient de Correlació,  $R^2$  és pròxim a 1: 0.9999, la recta és totalment lineal. Si es para atenció al Gràfic de Residuals, Gràfic 2, es comprova que el número de residuals positius és igual al de negatius, que els residuals estan distribuïts aleatòriament, que no presenten tendència i que a més, no hi ha cap valor discrepant<sup>11</sup> en el conjunt de dades experimentals. Per tant, es considera que el model de línia recta és vàlid.

Pel que fa al Factor Resposta (Taula 10), és d'un 7.6%, per baix del 10%, per tant, es confirma que hi ha una bona linealitat.

A continuació, per comprovar que el mètode funciona correctament i que es troba dins lo previst, s'estudia la resposta del Patró Intern, en que per ser vàlid, com s'ha dit anteriorment, a les gràfiques dels quatre elements: Ga, Y, Rh i Tl, hi hauria d'aparèixer un sol punt i la resposta cps dels quatre Patrons de Control haurien d'estar dins del  $\pm 30\%$  respecte al senyal obtingut pels patrons de la recta. A continuació es mostra com a exemple el cas del Rodi.

<sup>11</sup> Valor discrepant: Poden estar causats per un error humà o per una falta de linealitat.

Taula 11. Control del Patró de Control del Rh.

	Ratio Rh	Patrons de Control	Ratio
<b>Blanc</b>	52830	<b>RB -1</b>	51142
<b>P<sub>recta</sub> 1</b>	51360	<b>RB -2</b>	50455
<b>P<sub>recta</sub> 2</b>	50730	<b>RM</b>	49164
<b>P<sub>recta</sub> 3</b>	50420	<b>RA</b>	48445
<b>P<sub>recta</sub> 4</b>	50700		
<b>P<sub>recta</sub> 5</b>	50640		
<b>X<sub>m</sub> =</b>	51113		
<b>30%</b>	66447		
<b>-30%</b>	35779		

Com es pot comprovar a la Taula 11, la resposta dels quatre Patrons de Control es troben dins del  $\pm 30\%$  del senyal obtingut dels patrons per construir la recta de calibratge. Per tant, en aquest cas, el mètode funciona correctament.

S'utilitza el mateix procediment pels altres tres elements que formen el patró Intern. Com en aquest cas el Patró Intern és vàlid es pot procedir a l'obtenció de les dades, tractament de valors aberrants i càlcul dels paràmetres de qualitat.

Si es para atenció a la Taula 9, es mostren en vermell dos valors que podrien ser aberrants. Per confirmar-ho s'utilitza un Test de Grubbs, seguint l'equació (15).

$$G_{cal} = \frac{96.21 - 83.79}{5.885};$$

$$G_{cal} = 2.11$$

$$G_{tab,10,0.025} = 2.29$$

Com la  $G_{cal} < G_{tab}$ , el valor sospitós 96.21 de la Reproductibilitat del Patró Control de Rang Mig, no és un *outlier* i sí es té en compte. Si s'aplica el mateix

procediment pel cas del segon punt sospitós del Rang Mig dels valors de la Reproductibilitat, 274.96, s'obté una  $G_{cal}$  major que 2.29, es considera un punt aberrant i per tant, s'elimina de les dades. D'aquesta manera, canvia la desviació estàndard, la mitjana i el número de repeticions serà 9.

A continuació es procedeix al càlcul dels paràmetres de qualitat.

Per una banda, el Bor conta amb un Interval de treball de 25 - 200 ppb, descrit a la Taula 3. Pel que fa al límit de Detecció és el triple de la desviació estàndard relativa i el de Quantificació deu vegades la desviació estàndard relativa. [4] Taula 12.

**Taula 12. Interval de Treball, Límit de detecció i de Quantificació pel Bor en Aigua Continental.**

Element	Interval de Treball (µg/L)	Límit de Detecció (µg/L)	Límit de Quantificació (µg/L)
Bor	25-200	10,7	35,7

A continuació es mostra el càlcul de la precisió del Bor en Aigua Continental en el Rang Baix 1. Els càlculs es fan seguint les equacions (2) i (3).

$$S_{Repro;RB1} (\%) = \left( \frac{3.572}{27.86} \right) * 100 \quad S_{Repro;RB1} = 12.82 \%$$

$$S_{repe;RB1} (\%) = \left( \frac{0.787}{21.95} \right) * 100 \quad S_{repe;RB1} = 3.59 \%$$

$$S_t = \sqrt{\frac{3.59^2}{10} + 12.82^2} \quad S_t = 12.87 \%$$

Per una altra banda, pel càlcul del biaix es té en compte la Reproductibilitat tal com descriu l'equació (7).

$$biaix (b \%) = \left( \frac{27,86 - 25,53}{25,53} \right) * 100$$

$$biaix = 9,13 \%$$

A l'hora de calcular la Incertesa es procedeix tal i com es descriu a l'apartat 3.2.2.10.

## 5. Resultat i discussió

Continuem amb el cas del Bor:

En primer lloc, el Límit de Detecció és un paràmetre que actualment els Auditors no requereixen alhora d'acreditar el mètode, tot i així, en el cas del Bor, el LD descrit a la Taula 12, és de 10.7 i tenint en compte que el LQ teòric és 35.7, ens adonem que el punt baix de l'interval de Treball que s'ha utilitzat per fer els patrons, 25 µg/L, no és el correcte i no permet obtenir quantitativament resultats fiables, ja que, tot i que es troba per sobre del Límit de Detecció, no pas del Límit de Quantificació i per tant, l'Interval de Treball adequat del mètode aniria de 37.5 a 200 µg/L.

Taula 13. Precisió Combinada, Biaix i Incertesa dels tres Rangs de Treball del Bor en Aigua Continental.

Element	Precisió Combinada (%)				Biaix				Incertesa % (µg/L)			
	RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA
Bor	14	4	7	5	9	4	3	2	34	12	16	11

Taula 14. Límits de Quantificació i Interval d'Acreditació del Mètode pel Bor.

Element	Concentració mínima a quantificar segons RD (µg/L)	Concentració mínima real quantificable (µg/L)	Interval d'Acreditació (µg/L)
Bor	100	50	50 - 20000

En segon lloc, com es pot observar a la Taula 13, el primer Rang Baix no compleix amb la condició del 10% de la Precisió Combinada que exigeix el Reial Decret i a més la Incertesa que s'ha obtingut en aquest Rang és molt alta, per tant la concentració mínima a quantificar s'adjudica al Rang Baix 2; 50 µg/L, Taula 14. El punt baix de l'Interval d'Acreditació pertany al Límit de Quantificació, segons el Reial Decret, i el punt màxim; la concentració de partida dels patrons, per tant de la concentració del MIX. En conseqüència, l'

Interval d'Acreditació del Bor en matriu d'Aigua Continental anirà de 50 – 20000 µg/L. Pel Rang Baix 1 no es podria donar resultats.

Per altra banda, si es para atenció a la Taula 14, al considerar el Límit de Quantificació la mínima concentració quantificable amb una exactitud i precisió adequades; els 50 µg/L es troben per baix dels 100 µg/L requerits pel Reial Decret, és a dir, que amb el nostre mètode s'aconsegueix quantificar el Bor en Aigua Continental a una concentració més baixa que la exigida.

En relació al l' Interval de Treball i el d'Acreditació, 35.7 - 200 µg/L i 50 - 20000 µg/L respectivament, un cop validat i acreditat el mètode, a l'hora de preparar els patrons, es podria utilitzar com a punt baix de la recta el 50 µg/L per tal d'assegurar-se de donar resultats òptims.

En termes generals, tot seguit es mostren les discussions respectives dels resultats obtinguts al determinar els onze metalls, en aquest cas, en matriu Continental, Taules 15, 16 i 17.

En primer lloc, una vegada s'obtenen els resultats de Reproductibilitat i Repetibilitat dels onze metalls i haver descartat els valors aberrants que hi poguessin haver, es calculen els Límits de Detecció i Quantificació del mètode.

Taula 15. Límits de Detecció i Quantificació del mètode pels diferents paràmetres.

Element	Límit de Detecció (µg/L)	Límit de Quantificació (µg/L)
Bor	10,7	35,7
Crom	0,4	1,5
Níquel	0,3	1,0
Coure	2,3	7,7
Arsènic	0,3	0,9
Seleni	0,2	0,7
Estronci	7,9	26,2
Cadmi	0,04	0,1
Antimoni	0,2	0,7
Bari	8,6	28,7
Plom	0,2	0,7

Tot seguit, es calculen els paràmetres de qualitat; Precisió Combinada, Biaix i Incertesa pels diferents metalls estudiats. Es recorda que un dels factors per a que el mètode sigui vàlid és que els paràmetres mencionats compleixin amb lo exigít pel Reial Decret 140/2003, Taula 10. Fent aquest estudi, es pot conèixer quins Rangs de Treball el mètode no compleix amb lo establert i per tant es podria estudiar quin seria l' Interval d'Acreditació que s'hauria de sol·licitar.

**Taula 16. Precisió, Biaix i Incertesa dels quatre Rangs dels diferents paràmetres a validar en matriu Continental.**

Element	Precisió Combinada (%)				Biaix (%)				Incertesa % (µg/L)			
	RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA
Bor	14,0	3,6	7,2	4,6	9,0	4,4	2,6	2,0	34	12	16	11
Crom	13,8	3,7	4,9	3,1	19,3	18,2	17,4	11,9	47	37	36	25
Níquel	15,5	4,1	4,4	2,6	4,1	3,4	0,2	3,8	34	12	10	10
Coure	12,0	3,1	6,7	2,4	3,2	4,1	4,4	1,4	27	11	16	6
Arsènic	13,6	4,2	5,3	3,6	1,1	2,1	1,7	4,9	30	11	12	13
Seleni	10,0	5,4	6,5	4,1	1,4	1,5	0,0	3,2	23	13	14	11
Estronci	10,4	2,9	5,3	3,7	4,9	5,5	5,0	0,7	25	13	15	8
Cadmi	9,0	5,2	5,5	10,0	2,3	2,7	1,8	1,6	25	14	15	9
Antimoni	10,4	3,1	3,9	2,3	0,8	1,1	1,8	5,3	22	7	9	12
Bari	11,2	3,3	5,1	3,3	3,0	4,9	4,1	0,3	25	13	13	7
Plom	10,6	3,6	5,5	2,9	1,5	1,9	0,3	3,7	23	8	12	10

A la Taula 16, es mostren els resultats obtinguts dels paràmetres de qualitat referits anteriorment. Si es para especial atenció, en el cas dels cinc primers metalls i del Bari, la Precisió Combinada dels primers patrons de Rang Baix, marcats en vermell, no compleixen amb el 10% establert per la normativa, i pel que fa a les incerteses, són més altes que les dels altres Rangs. En conclusió, els Intervals sol·licitats per acreditar es veuran influenciats i el punt baix d'aquest interval s'adjudicarà al següent patró que compleix amb els requisits de la normativa.

En el cas del Crom, com es pot veure a la Taula anterior, al no complir cap Rang amb lo exigít respecte al Biaix i a l'obtenir Incerteses elevades, no es podria validar el mètode ni acreditar per la ISO 17025.

Per altra banda, tenint en compte la informació anterior, es pot conèixer la concentració mínima quantificable real. Un altre factor del que depèn la validació i acreditació del mètode és que la concentració mínima quantificable obtinguda sigui inferior o igual al 10% del Valor Paramètric específic per cada paràmetre. Amb ajuda de la Taula 17 es pot comparar la concentració mínima quantificable segons el Reial Decret respecte a l'obtinguda.

Taula 17. Comparació de LQ obtinguts amb els exigits pel RD.

Element	Concentració mínima a quantificar segons RD (µg/L)	Concentració mínima real quantificable (µg/L)
<b>Bor</b>	100	50
<b>Crom</b>	5	2
<b>Níquel</b>	2	1,25
<b>Coure</b>	200	12,5
<b>Arsènic</b>	1	1
<b>Seleni</b>	1	0,6
<b>Estronci</b>	-	24
<b>Cadmi</b>	0,5	0,1
<b>Antimoni</b>	1	0,6
<b>Bari</b>	-	50
<b>Plom</b>	1	0,6

D'aquesta manera, si es comparen els valors de la taula anterior, en tots els casos, el mètode utilitzat quantifica els paràmetres per baix del límit exigít, per tant és conclou que el mètode que s'utilitza al laboratori per quantificar aquests onze metalls dóna bons resultats i a conseqüència és comprova que sensible a nivells traça.

Finalment, amb totes les conclusions obtingudes es pot estimar quin és l'Interval de Treball al que s'hauria d'aplicar el mètode i el d'Acreditació que s'hauria de sol·licitar.

**Taula 18. Interval de Treball i d'Acreditació del mètode pels onze paràmetres estudiats en matriu Continental.**

Element	Interval de Treball (µg/L)	Interval d'Acreditació (µg/L)
Bor	35,7 - 200	50 - 20000
Crom	1,5 - 10	2 - 1000
Níquel	1 - 5	1,5 - 500
Coure	7,7 - 50	15 - 5000
Arsènic	0,9 - 5	1,5 - 500
Seleni	0,7 - 5	1 - 500
Estronci	26,2 - 200	30 - 20000
Cadmi	0,1 - 1	0,5 - 100
Antimoni	0,7 - 5	1 - 500
Bari	28 - 200	50 - 20000
Plom	0,7 - 5	1 - 500

Seguint la mateixa tècnica per la validació del mètode en matriu Continental, s'obté la validació del mètode en matriu d'Aigua de Consum. Els resultats es mostren a les taules següents:

**Taula 19. Alguns paràmetres de qualitat dels paràmetres estudiats en Aigua de Consum**

Element	Límit de Detecció (µg/L)	Límit de Quantificació (µg/L)	Precisió Combinada (%)				Biaix				Incertesa (%)			
			RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA	RB1	RB2	RM	RA
Bor	7,2	24,0	11,1	5,6	3,9	3,9	13,5	4,4	1,2	0,1	36	15	9	8
Crom	0,3	1,0	11,2	6,8	4,4	4,6	18,1	19,6	16,2	16,3	43	41	34	34
Níquel	0,2	0,8	14,7	6,4	6,9	2,0	4,5	2,9	0,2	0,9	32	15	10	5
Coure	2,8	9,2	17,1	5,2	5,2	4,1	7,4	4,8	2,6	2,1	38	16	12	10
Arsènic	0,2	0,7	13,6	6,7	4,8	3,1	2,2	2,3	0,5	1,3	30	13	10	7
Seleni	0,3	0,9	17,2	6,7	6,4	4,4	3,3	1,3	1,7	2,2	39	14	14	10
Estronci	2,0	6,7	3,1	5,6	3,5	3,4	8,6	7,4	5,2	3,8	21	19	13	10
Cadmi	0,03	0,1	8,1	6,5	4,6	2,1	3,0	0,1	3,0	0,1	26	14	15	5
Antimoni	0,2	0,7	11,8	6,5	4,5	3,3	2,5	1,9	0,4	1,3	25	14	10	7
Bari	2,8	9,3	4,3	5,9	3,4	1,5	7,7	6,8	4,9	5,0	36	15	9	8
Plom	0,3	0,9	15,1	6,8	5,0	3,3	3,6	0,9	0,8	1,4	35	15	11	8

Taula 20. Comparació dels LQ, Intervals de Treball i d'Acreditació del mètode en Aigua de Consum.

Element	Concentració mínima a quantificar segons RD (µg/L)	Concentració mínima real quantificable (µg/L)	Interval de Treball (µg/L)	Interval d'Acreditació (µg/L)
Bor	100	50	24 - 200	50 - 20000
Crom	5	2	1 - 10	2 - 1000
Níquel	2	1,25	0,8 - 5	1,5 - 500
Coure	200	12,5	9,2 - 50	15 - 5000
Arsènic	1	1	0,7 - 5	1,5 - 500
Seleni	1	1	0,9 - 5	1 - 500
Estronci	-	12	6,7 - 200	15 - 20000
Cadmi	0,5	0,1	0,1 - 1	0,5 - 100
Antimoni	1	1	0,7 - 5	1 - 500
Bari	-	50	9,3 - 200	50 - 20000
Plom	1	1	0,9 - 5	1 - 500

Una vegada assolit l'objectiu principal que era la validació del mètode en les dos matrius diferents, es sol·licitaria a ENAC, que mitjançant un Auditor, es valorés les validacions del mètode realitzades, per tal d'acreditar la ISO 17025 i així demostrar als clients que necessitin l'estudi de les seves aigües en els diferents paràmetres estudiats, que el resultat emès pel laboratori és de gran qualitat.

Una vegada obtinguda l'acreditació de la ISO 17025 pel mètode, s'ha de comprovar periòdicament la continuïtat de la qualitat dels resultats emesos. Per això, el laboratori QAMA té establert un Pla de Control de la Qualitat.

Tal com diu un apartat de la ISO 17025:

*“El laboratori ha d'efectuar periòdicament, d'acord amb un calendari i un procediment predeterminat, auditories internes de les seves activitats per a verificar que les seves operacions continuen complint amb els requisits del sistema de gestió i d'aquesta Norma Internacional”*

L'objectiu de l'establiment d'un Pla de Qualitat és el compliment de verificar que s'obté la resposta esperada en l'aplicació del mètode validat per la determinació dels diferents paràmetres, mitjançant:

- L'ús del Gràfic de Control específic de cada element i definit en cada Rang de Treball.
- L'anàlisi de materials de referència amb traçabilitat.
- La participació planificada en exercicis d'intercomparació.
- El Control Intern del Laboratori, en que una vegada al mes es fa un duplicat de mostres en condicions de Repetibilitat i de Reproductibilitat, de manera que es controlen els seus límits descrits a les equacions 4 i 5.
- L'anàlisi d'un Patró de Control cada deu mostres o patrons a analitzar. Els Patrons de Control s'alternen de forma aleatòria seguint un cicle, en el que d'aquesta manera es té un regular control del mètode en els diferents Rangs de Treball.

Posant punt i a part a l'objectiu assolit, es procedeix a utilitzar el mètode validat per la determinació dels onze metalls en una mostra desconeguda.

Quan s'han de donar resultats a l'analitzar una mostra desconeguda tenint en compte les incerteses del mètode validat anteriorment, s'assigna la Incertesa més desfavorable respecte les dos matrius estudiades. Això es fa, ja que al no conèixer la procedència de la mostra no es pot assignar una Incertesa de matriu continental o de consum humà. En el cas d'alguns paràmetres en els que en les diferents matrius tenen diferent Interval de Treball, s'adjudica la Incertesa del que compregui un menor interval. D'aquesta manera s'han obtingut els resultats següents:

Taula 21. Resultats de la mostra desconeguda.

Elements	Resultats experimentals obtinguts µg/L	Factor de dilució	Resultats definitius µg/L	Incertesa
<b>B</b>	104,4	2,1	222,4	16
<b>Cr</b>	0,1	2,1	0,2	47
<b>Ni</b>	1,3	2,1	2,7	15
<b>Cu</b>	1,1	2,1	2,3	16
<b>As</b>	2,1	2,1	4,4	13
<b>Se</b>	0,2	2,1	0,4	14
<b>Sr</b>	59,1	20,3	1201,4	25
<b>Cd</b>	0,01	2,1	0,01	26
<b>Sb</b>	0,5	2,1	1,1	14
<b>Ba</b>	30,5	2,1	65,0	13
<b>Pb</b>	0,2	2,1	0,5	15

Com es pot observar, tots els paràmetres han patit una dilució 1:2 exceptuant l'Estronci amb una 1:20.

Una manera de confirmar que el mètode validat proporciona resultats fiables, a la mateixa mostra desconeguda se li ha aplicat la tècnica d'addicions estàndard, en que com es pot veure a la taula adjunta, s'han obtingut molt bones recuperacions.

Taula 22. Resultats de la mostra desconeguda amb Addició Estàndard.

Elements	Resultats experimentals obtinguts µg/L	[Add Std] µg/L	Resultats experimentals teòrics µg/L	Resultats experimentals amb addició µg/L	Recuperació %
<b>B</b>	104,4	44,6	149,0	141,1	94,7
<b>Cr</b>	0,1	2,2	2,3	2,3	96,5
<b>Ni</b>	1,3	1,1	2,4	2,4	99,5
<b>Cu</b>	1,1	11,2	12,3	11,6	94,3
<b>As</b>	2,1	1,1	3,2	3,2	101,4
<b>Se</b>	0,2	1,1	1,3	1,2	93,6
<b>Sr</b>	59,1	45,3	104,4	94,7	90,8
<b>Cd</b>	0,01	0,2	0,2	0,2	101,9
<b>Sb</b>	0,5	1,2	1,7	1,5	93,1
<b>Ba</b>	30,5	45,5	76,1	74,1	97,4
<b>Pb</b>	0,2	1,1	1,3	1,3	97,8

## **6. Conclusions**

The conclusions acquired by doing this work are resumed in the following points:

- In the first place, the good response of the method has been corroborated obtaining the validation of ten metals in different working ranks in function of the requirements of the RD. Consequently different accreditation intervals had been established.
- The Chrome case could not have been validated by the ISO 17025 because the obtained results aren't inside the defined parameters by the RD, however the laboratory can give those results as long as they mention it on the final report. Even so, the validation of this element can be studied individually.
- The comparison of the different matrix straights with the ones of the Milli Q has been checked by using the F test. The conclusion is that those variances are caused by the random error and the matrix has no effect on the expected result.
- Once analysed the unknown sample, the standard additions technique has been used as a complementary tool. Due to the very good recuperations obtained has been also demonstrated that the matrix has no effect on the expected result. The recuperations with more than a 100% rate are associated with the uncertainty of the method.
- In general terms it has been demonstrated that the used technique is very sensible to the low levels and suitable for the analysis of those metals.

- Finally, with the accreditation of the ISO 17025, the laboratory will reach the international standards and prove their good results adding prestige to his work method and competitiveness.

## 7. Bibliografia

- [1] Sagrado. S; Bonet. E; Medina. M.J; Martín. Y. *Manual Práctico de Calidad en los Laboratorios: Enfoque ISO 17025*. Madrid: AENOR, 2004.
- [2] Entidad Nacional de acreditación. <http://www.enac.es/> (accessed July 16, 2015).
- [3] Consorci d'Aigües de Tarragona. <http://www.ccaait.com/> (accessed July 23, 2015).
- [4] Reial Decret 140/2003, de 7 de Febrer. *Establiment dels criteris sanitaris de la qualitat de l'aigua de consum humà*.
- [5] Vicerrectorado de Investigación; Universidad de Oviedo. Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma ICP. <http://www10.uniovi.es/tutoriales/ICP/presentacion.swf> (accessed August 31, 2015).
- [6] Dean, J. *Practical Inductively Coupled Plasma Spectroscopy*. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2005.
- [7] AEAS. (2012). *Criterios para la validación de los métodos de Ensayos Físico-Químicos y Microbiológicos*. Guía para el funcionamiento de los Laboratorios de Ensayo de Aguas, Parte II, pp. 1 - 94.
- [8] ISO/IEC 17025:2005. *Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración*.
- [9] Rius, F. X.; Maroto, A.; Boqué, R.; Riu, J. La validación de métodos analíticos. *Articles de divulgació*, July 21, 2015.
- [10] Ruisánchez. I; Trullols. E; Rius, F. X. Validació de mètodes analítics qualitius. *Articles de divulgació*, July 22, 2015.