

Instituto Nacional de Tecnología Industrial

Parque Tecnológico Miguelete
Avenida Gral. Paz 5445
Casilla de Correo 157
B1650WAB San Martín, Buenos Aires
Teléfono (54.11) 4724 6200 / 300 / 400
interno: 6323
www.inti.gov.ar
interlab@inti.gov.ar



**INFORME FINAL
ENSAYO INTERLABORATORIO
DETERMINACIÓN DE AC. TEREFTÁLICO POR HPLC
2^{da} ronda - 2005**

Lista de Participantes

Alcón Laboratorios Argentina S.A.

Estados Unidos 5335
Totuguitas – Buenos Aires
Argentina

CROMAQUIM S.R.L.

República Argentina 2815
Lanús – Buenos Aires
Argentina

Grupo Induser S.R.L.

Caseros 1613
Lomas de Zamora – Buenos Aires
Argentina

Instituto Biológico Argentino S.A.I.C.

Calle 606 Dr. Dessy N° 351
Florencio Varela – Buenos Aires
Argentina

Instrumentación y Control de Omar Nazarov

Av Derqui 4077
Capital Federal
Argentina

INTI – Plásticos

Av. Gral Paz 5445 edificio 16
Buenos Aires
Argentina

INTI – Química

Av. Gral Paz 5445 edificio 38
Buenos Aires
Argentina

Laboratorio Foodscience S.A.

Condarco 1136
Buenos Aires
Argentina

Laboratorios Richmond

Av. Elcano 4938
Capital Federal
Argentina

MAPRIMED S.A.

Av. Gral. E. Garzón 5928
Capital Federal
Argentina

PROANALISIS S.A.

Angel J. Carranza 1941/7
Capital Federal
Argentina

Síntesis Química S.A.I.C.

Houssay 2502 Ing. Allan
Florencio Varela – Buenos Aires
Argentina

INTRODUCCIÓN

Este ejercicio fue programado en base a la “**Norma EN 13130-2: 2004 Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias plásticas sujetas a limitaciones. Determinación de ácido tereftálico en simulantes de alimentos.**” El objeto de este ensayo es evaluar el contenido de ác. tereftálico a simulantes de alimentos.

El diseño de estos ejercicios interlaboratorio tuvo por objeto validar la metodología analítica y permitir al laboratorio participante evaluar su capacidad de medición. Esto último incluye el uso del instrumental y la capacidad de manipular muestras y preparar soluciones de calibración.

El método descrito en la Norma contempla el uso de estándar interno. Las ventajas del uso de estándar interno son fundamentalmente dos:

- disminuir la variabilidad de inyecciones sucesivas usando el cociente de áreas en lugar del valor absoluto de un área
- en el caso de realizar un tratamiento de la muestra previo a la inyección, agregando el estándar interno en concentraciones conocidas al comienzo del proceso es posible evaluar eventuales pérdidas.

La primera de estas ventajas es más útil en el caso de realizar mediciones en cromatógrafos gaseosos. En el caso de un equipo de HPLC con loop de inyección e inyector automático la variabilidad de inyecciones sucesivas es baja de modo que el uso de estándar interno no es tan crítico. Para evaluar este aspecto se solicitó a los participantes enviar los valores de las áreas obtenidas, lo cual permitió realizar los cálculos con y sin el uso de estándar interno y comparar los resultados.

El diseño del procedimiento de medición del primer ejercicio se realizó siguiendo exactamente los pasos descritos en la Norma de referencia. Se decidió enviar las muestras incluyendo el agregado de estándar interno para evitar una posible fuente de inhomogeneidad en las mismas. Otra de las razones fue minimizar el volumen de soluciones y muestras a enviar.

Las pruebas de estabilidad realizadas a priori en el laboratorio de INTI dieron resultados satisfactorios pero luego de enviadas las muestras se tuvo información acerca de diferentes tipos de problemas con la estabilidad de las mismas en los laboratorios participantes. Esto también se evidenció al analizar los resultados enviados por los participantes.

A partir de estos hallazgos se realizaron en INTI nuevos ensayos de estabilidad sobre muestras que se habían mantenido como testigos. Se observó que los problemas de estabilidad se debieron principalmente a la baja solubilidad del estándar interno, lo que provocó su precipitación, sobre todo en los casos en que las muestras fueron guardadas en heladera.

La Norma de referencia no hace ninguna mención a la estabilidad de las muestras, posiblemente debido a que se supone que entre la preparación de las mismas y su utilización transcurre poco tiempo.

Dados los problemas del primer ejercicio se decidió realizar la segunda ronda con un diseño más sencillo, teniendo en cuenta los problemas de inestabilidad antes mencionados.

La organización y evaluación de este estudio fue realizada por:

Dra. Celia Puglisi

Lic. Gabriela Fernández

Lic. Gabriela Munizza

Lic. Liliana Castro

Tco. Qco. Mariano Tilve



1. MUESTRAS ENVIADAS

1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

La muestra utilizada en este ejercicio interlaboratorio fue preparada utilizando ácido tereftálico Fluka 86420, lote y código de llenado 420415/1 43101, pureza ≥ 99 %, etanol absoluto p.a. y agua destilada tratada por ósmosis inversa.

La muestra fue preparada pesando la cantidad necesaria de ácido tereftálico en un matraz previamente calibrado y luego se completó el volumen con una solución acuosa de etanol 15%.

Se entregaron además los siguientes estándares sólidos:

Ácido tereftálico Fluka 86420, lote y código de llenado 420415/1 43101, pureza ≥ 99 %.

Ácido ortoftálico Fluka 80010, lote y código de llenado 420515/1 24901, pureza $\geq 99,5$ %.

1.2 VALORES

Se consignan a continuación la concentración e incertidumbre calculadas a partir de los datos obtenidos de la preparación gravimétrica.

	Concentración nominal de Ac. Tereftálico (mg/l)	U (mg/l)
Muestra 5	4,44	0,03

La incertidumbre en el valor de la concentración se calculó teniendo en cuenta todos los pasos efectuados en la preparación de la muestra y utilizando los procedimientos recomendados en la Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Eurachem, 2° Ed. 2000.

Se determinó la homogeneidad de las mismas tomando una muestra de cada diez siguiendo la secuencia de llenado. De esta manera se analizó el 10% del lote preparado, obteniéndose valores satisfactorios de acuerdo con las variaciones asociadas a la repetibilidad cromatográfica.

Se determinó la estabilidad de las muestras en el tiempo, obteniéndose valores satisfactorios.

2. RESULTADOS ENVIADOS POR LOS PARTICIPANTES

Los datos enviados por los participantes pueden verse en la Tabla 1. El número de cifras significativas y las unidades figuran tal como fueron informadas por los participantes.

En esta tabla también puede observarse el método utilizado por los participantes para realizar la cuantificación. Algunos participantes realizaron las mediciones utilizando como estándar interno el ácido ortoftálico entregado. Otros participantes utilizaron el método de estándar externo. El participante n° 6 utilizó ambos métodos.

Muchos de los participantes midieron cada uno de los frascos de la muestra como si se tratara de dos muestras diferentes. Se muestran todos los resultados informados.

En el gráfico 1 se muestra el valor promedio obtenido con la totalidad de los datos informados así como también el valor nominal de las muestras y el valor medio interlaboratorio obtenido con el procedimiento descrito en el ítem 3.

3. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

El tratamiento de los resultados se realizó de acuerdo con los procedimientos internacionalmente aceptados y que se citan en la Bibliografía.

En la primera etapa de la evaluación se procedió al examen crítico de los datos, descartándose aquellos que resultan obviamente discordantes.

En la etapa siguiente se procedió al análisis estadístico. Para ello se tuvieron en cuenta los laboratorios que enviaron un número de replicados igual a tres (ref. 1).

Estos datos fueron sometidos a las pruebas de Cochran y Grubbs, que se describen en el anexo 3.

La secuencia de operaciones realizadas se describe en el diagrama de flujo que figura en el anexo 2.

Los resultados del análisis estadístico pueden observarse en la Tabla 2.

Este procedimiento permitió seleccionar los datos estadísticamente aceptables, a partir de los cuales se calculó el valor medio interlaboratorio y los desvíos estándar (s_L) correspondientes para los analitos presentes en la muestra.

El resumen de estos resultados se encuentra en la siguiente tabla

Ac. tereftálico	Valor gravimétrico (mg/l)	Valor medio interlab. (mg/l)	Desviación estándar interlab. (s_L)	Desviación estándar interlab. relativa porcentual (s_L relativa %)
Muestra 5	4,44	4,44	0,14	3,1%

Luego se separaron los datos informados utilizando estándar interno y estándar externo. A cada grupo de resultados se le aplicó el mismo tratamiento descrito más arriba y se obtuvieron los resultados que se detallan a continuación.

Ac. tereftálico	Valor gravimétrico (mg/l)	Valor medio interlab. (mg/l)	Desviación estándar interlab. (s_L)	Desviación estándar interlab. relativa porcentual (s_L relativa %)
Resultados calculados utilizando estándar externo				
Muestra 5	4,44	4,51	0,13	2,9%
Resultados calculados utilizando estándar interno				
Muestra 5	4,44	4,35	0,12	2,8%

Como puede observarse no hay diferencias significativas entre los dos grupos de resultados.

En la Tabla 3 se resumen los valores numéricos correspondientes a las desviaciones de todos los resultados enviados con respecto al valor de referencia.



4. EVALUACION DEL DESEMPEÑO DE LOS LABORATORIOS

La evaluación del desempeño de los laboratorios participantes se realizó de acuerdo con los procedimientos aceptados internacionalmente y que se citan en la Bibliografía.

Se utilizó como criterio el cálculo del parámetro “z” definido de la siguiente manera:

$$z = (x_i - x_{ref}) / s_L$$

Donde: x_i = promedio para cada laboratorio = $\sum x_i / r$

x_{ref} = valor asignado a la concentración de los analitos de la muestra enviada. En este caso se utilizó el valor medio Interlaboratorio.

r = número de replicados informados (1, 2, 3)

y s_L = desviación estándar (estimador de la reproducibilidad o variancia entre laboratorios)

De acuerdo con la definición del parámetro z (anexo 3) el valor de la desviación estándar utilizada en este cálculo puede ser fijado a priori por acuerdo de los participantes en base a expectativas de desempeño. También puede ser estimado a partir de los resultados del interlaboratorio luego de eliminar los datos inconsistentes o fijarlo en base a métodos robustos para cada combinación de analito, material y ejercicio.

En este caso se utilizó la desviación estándar interlaboratorio obtenida con todo el conjunto de resultados, según el tratamiento estadístico descrito en el punto 3.

Cuando un sistema analítico se encuentra en condiciones de control estadístico, z debiera presentar prácticamente una distribución normal, con un valor medio de cero y un desvío estándar unitario. En estas condiciones, un valor de $|z| > 3$ sería muy raro de encontrar en tal sistema e indica un resultado no satisfactorio, mientras que la mayoría de los resultados debieran tener valores tales que $|z| < 2$.

Es posible establecer entonces la siguiente clasificación:

$|z| \leq 2$ satisfactorio $2 < |z| < 3$ cuestionable $|z| \geq 3$ no satisfactorio

Los valores de los parámetros z para la muestra pueden verse en el gráfico 2 (anexo 1).

5. CONCLUSIONES

- Se tratará de informar a la institución que redactó la norma de referencia acerca de los problemas que pueden surgir cuando se aplica este método debido a la inestabilidad de las soluciones que deben utilizarse.
- Se observa un muy buen grado de acuerdo en los resultados obtenidos por los participantes, lo cual confirma que en el ejercicio anterior los problemas encontrados se debían a la inestabilidad de las soluciones.
- No se observaron diferencias significativas entre los resultados obtenidos utilizando estándar interno y externo. Esto confirma lo dicho en la introducción acerca de que en el caso de un equipo de HPLC con loop de inyección e inyector automático la variabilidad de inyecciones sucesivas es baja de modo que el uso de estándar interno no es tan crítico.

A fin de lograr un mecanismo de mejora continua, solicitamos a los laboratorios que nos envíen cualquier sugerencia o comentario que consideren oportuno.



ANEXO 1
Tablas y gráficos



Tabla 1
Datos enviados por los participantes

Lab n°	n° muestra	Día 1	Día 2	Día 3	Método
01	n.i.	4,101	4,069	4,378	Estándar interno
03	20	4,25	4,29	4,23	Estándar interno
03	08	4,23	4,25	4,24	Estándar interno
04	02	4,598	4,599	4,599	Estándar interno
05	15	4,46	4,39	4,3	Estándar interno
05	23	4,27	4,36	4,27	Estándar interno
06	04	4,285	4,292	4,301	Estándar interno
06	04	4,517	4,519	4,527	Estándar externo
06	35	4,340	4,336	4,342	Estándar interno
06	35	4,517	4,527	4,512	Estándar externo
07	13	4,659	4,645	4,657	Estándar externo
07	22	4,575	4,567	4,570	Estándar externo
08	03	1,576	1,576	1,562	Estándar interno
08	24	1,516	1,502	1,502	Estándar interno
09	n.i.	4,37	4,42	4,40	Estándar interno
11	n.i.	4,293	4,275	4,317	Estándar externo
12	n.i.	4,27	4,39	4,22	Estándar interno
12	n.i.	4,26	4,37	4,23	Estándar interno
13	06	4,57	4,57	4,55	Estándar interno
15	n.i.	4,479	4,445	4,456	Estándar interno

Tabla 2
Resultados luego del tratamiento estadístico

n° Lab	Muestra 5			
	R 1	R 2	R 3	T
01	4,10	4,07	4,38	C
03	4,25	4,29	4,23	
03	4,23	4,25	4,24	
04	4,60	4,60	4,60	
05	4,46	4,39	4,30	C
05	4,27	4,36	4,27	C
06	4,29	4,29	4,30	
06	4,52	4,52	4,53	
06	4,34	4,34	4,34	
06	4,52	4,53	4,51	
07	4,66	4,65	4,66	
07	4,58	4,57	4,57	
08	1,58	1,58	1,56	I
08	1,52	1,50	1,50	I
09	4,37	4,42	4,40	
11	4,29	4,28	4,32	
12	4,27	4,39	4,22	C
12	4,26	4,37	4,23	C
13	4,57	4,57	4,55	
15	4,48	4,45	4,46	

Tabla 3
Desvíos respecto del v. medio interlaboratorio
y del valor de nominal

n° Lab	Valor medio mg/l	% desv.v.medio interlab y v. nominal
01	4,18	-5,8
03	4,26	-4,1
03	4,24	-4,5
04	4,60	3,6
05	4,38	-1,3
05	4,30	-3,2
06	4,29	-3,3
06	4,52	1,8
06	4,34	-2,3
06	4,52	1,8
07	4,65	4,8
07	4,57	2,9
08	1,57	-64,6
08	1,51	-66,1
09	4,40	-1,0
11	4,30	-3,3
12	4,29	-3,3
12	4,29	-3,5
13	4,56	2,8
15	4,46	0,5

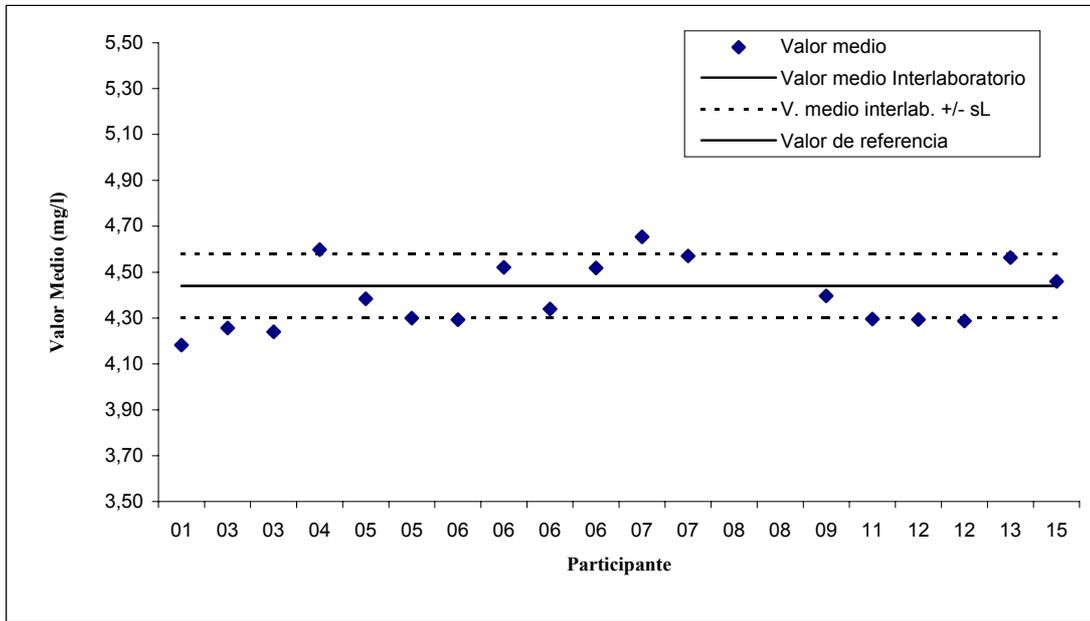
T: resultado del tratamiento estadístico

C: datos eliminados por aplicación de la prueba de Cochran

G: datos eliminados por aplicación de la prueba de Grubbs

I: datos considerados como inconsistentes

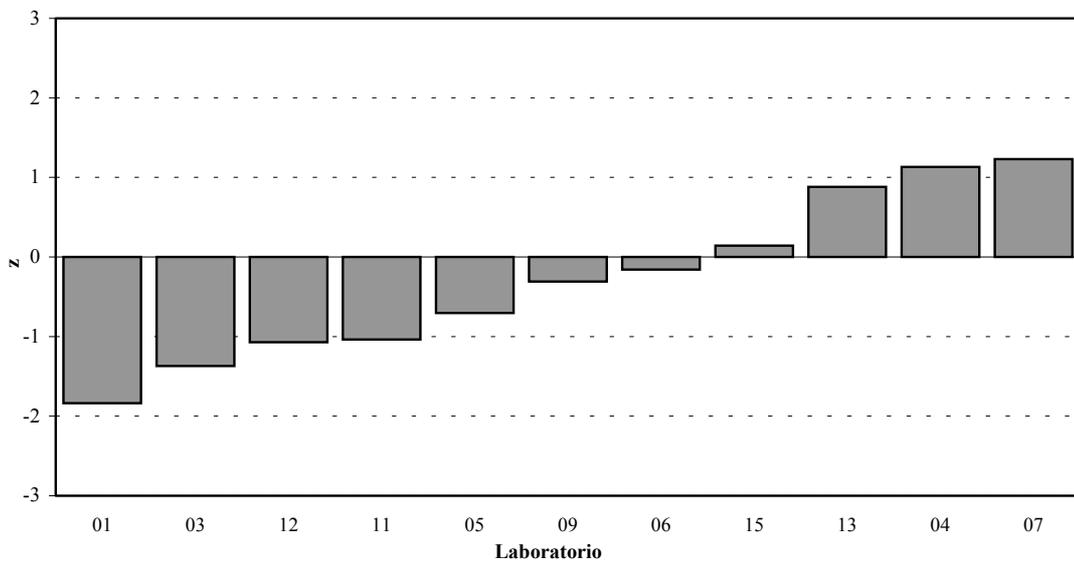
Gráfico 1
Datos enviados por los participantes



Laboratorio cuyos valores exceden el ámbito del gráfico:

n° part.	Valor medio
08	1,57
08	1,51

Gráfico 2
Parámetro z

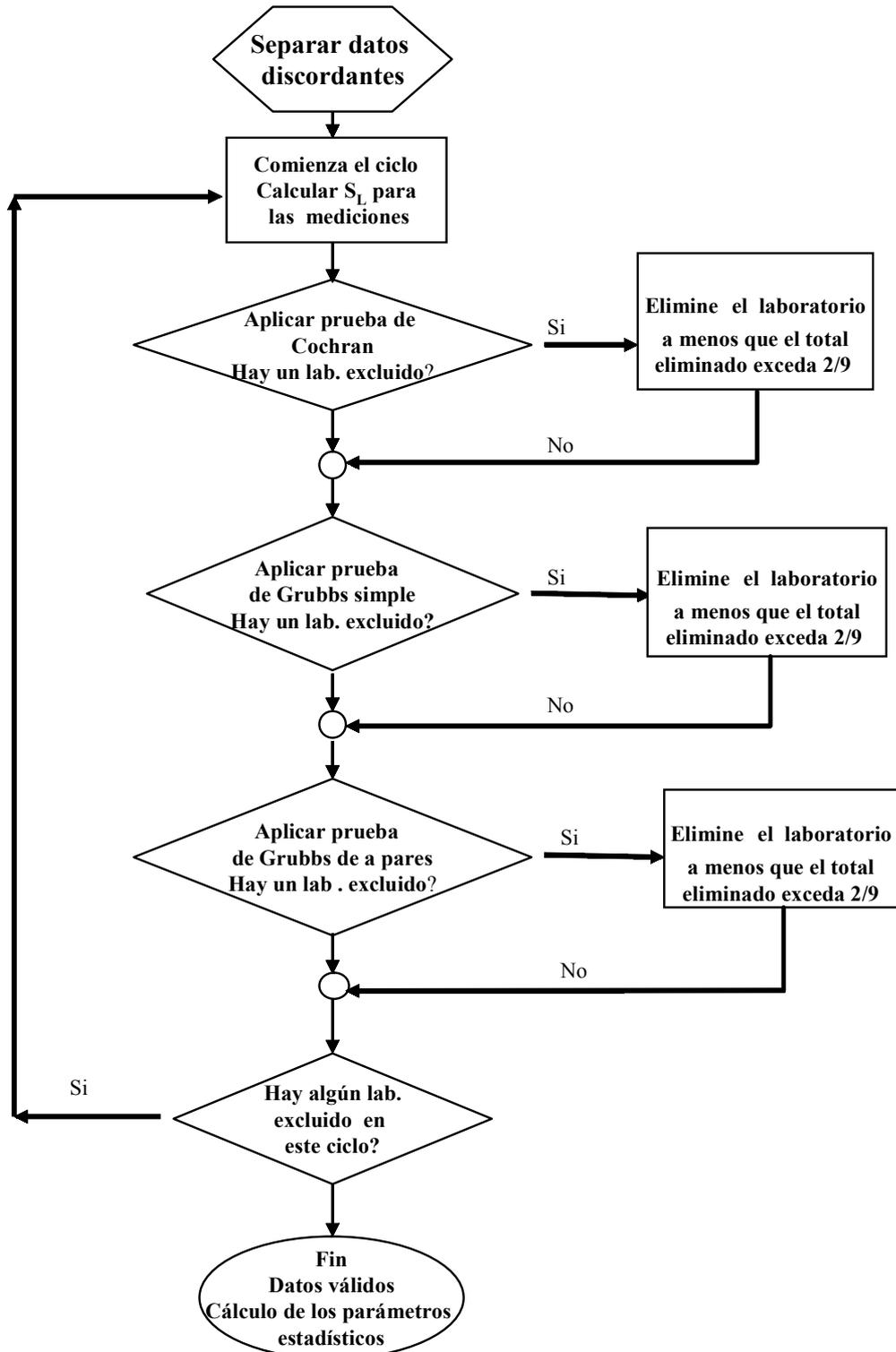


Laboratorio cuyo valor excede el ámbito del gráfico:

n° part.	z
8	-20,7



ANEXO 2 Diagrama de tratamiento estadístico



ANEXO 3

Definiciones de repetibilidad y reproducibilidad de un método de ensayo

Resultado de un ensayo: Es el valor de una característica obtenido mediante la realización de un método determinado. El método puede especificar que se realicen un cierto número de observaciones y que reporte el promedio como resultado del ensayo. También puede requerir que se apliquen correcciones estándar. Por lo tanto puede suceder que un resultado individual provenga de varios valores observados.

Precisión: Es el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo, que se obtuvieron bajo condiciones especificadas.

Repetibilidad: Indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo, obtenidos utilizando el mismo método, en idénticos materiales, en el mismo laboratorio, por el mismo operador, usando el mismo equipo y en un corto intervalo de tiempo.

Desvío estándar de repetibilidad: Es el desvío estándar de los resultados de un ensayo obtenido en las condiciones mencionadas en el párrafo anterior. Es un parámetro de la dispersión de los resultados de un ensayo en condiciones de repetibilidad.

Valor de repetibilidad r: Es el valor por debajo del cual se espera que se encuentre, con una probabilidad del 95%, la diferencia absoluta entre dos valores individuales del resultado de un ensayo, obtenidos en condiciones de repetibilidad.

Reproducibilidad: Indica el grado de acuerdo entre resultados mutuamente independientes de un ensayo obtenidos con el mismo método, en idénticos materiales, en diferentes laboratorios, con diferentes operadores y utilizando distintos equipos.

Desvío estándar de la reproducibilidad: Es el desvío estándar de los resultados de ensayos obtenidos en condiciones de reproducibilidad. Es un parámetro que indica la dispersión de la distribución de resultados de un ensayo en condiciones de reproducibilidad.

Valor de reproducibilidad r: Es el valor por debajo del cual se espera que se encuentre, con una probabilidad del 95%, la diferencia absoluta entre dos valores individuales del resultado de un ensayo, obtenidos en condiciones de reproducibilidad.

Tratamiento de los resultados

Definiciones

n = número de datos

Valor medio = $x_{1/2}$ = media aritmética = $(\sum x_i) / n$

Desvío estándar = $S_d = [\sum (x_i - x_{1/2})^2 / n-1]^{1/2}$

Desvío % respecto del valor medio = $[(x_i - x_{1/2}) / x_{1/2}] 100$

Desvío % respecto del valor de referencia = $[(x_i - x_{ref}) / x_{ref}] 100$

Definición del parámetro z

El primer paso para evaluar un resultado es calcular cuan apartado está ese dato del valor asignado o del valor de la referencia, es decir: $x_i - \text{valor ref. (ref. 2 y 5)}$.

Muchos esquemas de evaluación de datos utilizan la relación entre esta diferencia y el valor del desvío estándar para comparar los resultados.

El valor del desvío estándar que se utiliza puede ser fijado a priori por acuerdo de los participantes en base a expectativas de desempeño. También puede ser estimado a partir de los resultados del interlaboratorio luego de eliminar los datos inconsistentes o fijarlo en base a métodos robustos para cada combinación de analito, material y ejercicio.

Cuando puede considerarse que un sistema analítico “se comporta bien”, z debiera presentar prácticamente una distribución normal, con un valor medio de cero y un desvío estándar unitario. En estas condiciones, un valor de $|z| > 3$ sería muy raro de encontrar en tal sistema e indica un resultado no satisfactorio, mientras que la mayoría de los resultados debieran tener valores tales que $|z| < 2$.

Es posible establecer entonces la siguiente clasificación:

$|z| \leq 2$ satisfactorio $2 < |z| < 3$ cuestionable $|z| \geq 3$ no satisfactorio

Prueba de Grubbs

Para calcular la estadística del test de Grubbs simple, se calcula el promedio para cada laboratorio (por lo menos de tres datos) y luego el desvío estándar de esos L promedios (designada como la s original). Se calcula el desvío standard del conjunto de los promedios luego de haber eliminado el promedio más alto (s_a) y lo mismo luego de haber eliminado el promedio más bajo (s_b).

Entonces se calcula la disminución porcentual en el desvío estándar como sigue:

$100 \times [1 - (s_b / s)]$ y $100 \times [1 - (s_a / s)]$

El mayor de estos dos decrecimientos porcentuales se compara con el valor crítico de Grubbs para el número de laboratorios considerado (probabilidad = 2,5 %) y cuando lo excede se rechaza, recomenzando el ciclo.



Prueba de Cochran

Dado un conjunto de desvíos estándar s_i , todas calculadas a partir del mismo número de replicados de resultados de ensayo, el criterio de Cochran resulta:

$$C = s_{\max}^2 / \sum s_i^2$$

Este valor de C se compara con el valor crítico de las correspondientes tablas para un 95% de nivel de confianza.

Se entra en la tabla con el número de observaciones asociadas a cada variancia (triplicado en este caso) y el número de variancias comparadas (número de participantes).

Si C excede el valor crítico tabulado, el dato del laboratorio correspondiente es rechazado y se reinicia el ciclo.

BIBLIOGRAFÍA

1. ISO 5725. Parts 1-6 (1994). Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
2. ISO - CASCO 322 . Proficiency testing by interlaboratory comparisons.
Part 1 : Development and operation of proficiency testing schemes.
Part 2: Selection and use of proficiency testing schemes by laboratory accreditation bodies.
3. ASTM E 691 - 79. Standard practice for conducting an interlaboratory test program to determine the precision of test methods.
4. Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies. Pure & Appl. Chem. , Vol. 67, 2, 331 - 343 (1995).
5. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories.
Pure & Appl. Chem., Vol. 65, 9, 2123 - 2144 (1993).
6. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Eurachem, 2º Ed. 2000.
7. EN 13130-2: 2004. Materiales y artículos en contacto con alimentos. Sustancias plásticas sujetas a limitaciones. Parte 2: Determinación de ácido tereftálico en simulantes de alimentos.