

Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero

Nº 4 - setiembre 1984

Director: Dr. Enrique E. Boschi

E R R A T A

REVISTA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PESQUERO N° 4

PAG./COL./REGLON/FIG.			DONDE DICE	DEBE DECIR
10	2	26	pedido	podido
16	2	13	Grntved	Grøntved
16	2	34	tarcera	tercera
19	2	35	Porocentrum	Prorocentrum
20	2	30	Stuttgart	Stuttgart
20	2	32	Prorocentrum	Prorocentrum
65		1	Tn/Mn ²	t/Mn ²
69		3	Tn/Mn ²	t/Mn ²
71		5	Tn/Mn ²	t/Mn ²
109	2	1/2	9/150 = 0,06 ng/g	9/150 = 0,06 ng/mg

CONTRATAPA REGLON

"	3	Axselman	Akselman
"	17	conginaris	longinaris
"	18	Pendeidae	Penaeidae
"	20	lahille	Lahille

En el pie de página de las Págs. 21,49,63,81,93 y 103 del inicio de cada trabajo, donde dice Revista del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero debe decir Rev.Invest.Des.Pesq. -

Determinación experimental del límite de detección, en el análisis de metales pesados en organismos marinos, por espectrofotometría de absorción atómica

Por ANTONIO PÉREZ y VÍCTOR J. MORENO *

SUMMARY

The detection limit is defined as the minimum concentration of a substance in a sample that can be distinguished from the background with a given probability, using a particular analytical method. It is assumed that the concept of detection limit can be used satisfactorily to qualify an analytical method.

Some criteria which are necessary for intercalibration purposes are given in this paper. An algebraic method to calculate the detection limit easily and with minimum experimental work was developed. A method to determine the number of repetitions needed when the levels of the analyzed substance are near or under the detection limit of the method is also shown.

* Investigadores del INIDEP.

1. REVISION DEL CONCEPTO

El límite de detección permite cuantificar la mínima cantidad de sustancia susceptible de ser determinada con un método analítico dado, entendiéndose como tal, a todos los pasos requeridos a partir de la muestra hasta la expresión del resultado analítico incluyendo el instrumental utilizado.

El conocimiento "a priori" del límite de detección de un método analítico es especialmente importante en el análisis de trazas de metales donde los niveles a ser detectados están próximos a los encontrados en un análisis realizado en paralelo, pero sin el agregado de muestra (blanco).

El desarrollo de métodos analíticos con mayor sensibilidad y especificidad ha contribuido decisivamente al conocimiento actual en los distintos campos de la investigación como por ejemplo, en la fisiología de trazas de metales. Aquí es particularmente útil el conocimiento de los niveles de concentración de aquellos elementos con determinadas actividades metabólicas, así como los elementos y concentraciones cuya presencia conduce a cambios biológicos indeseables o a la muerte, como en el caso de ciertos contaminantes. La espectrofotometría de absorción atómica es una de las técnicas de mayor aplicación en este campo y el disponer del límite de detección de un método analítico en estos casos es de gran utilidad en el diseño experimental, ya que permite la selección de metodología e instrumental acorde a los niveles de concentración a determinar. Por último, una vez seleccionado el método analítico puede establecerse el número de repeticiones necesarias principalmente cuando las concentraciones que se desean determinar están próximas al límite de detección.

En la bibliografía no se observa uniformidad ni en la definición de "límite de detección", ni en la forma de medirlo.

De acuerdo a la teoría de la comunicación, efectuar una medición involucra la observación

de una señal, parte de la cual es indeseable y a la cual llamamos "ruido" (Hieftje, 1972). En la medida en que la intensidad de la señal se acerca a la intensidad del ruido se pierde la capacidad de detección. En consecuencia, es importante determinar la relación señal/ruido en un sistema para definir la calidad de una medición.

Generalmente se define como límite de detección la "concentración de sustancia que genera una relación señal/ruido igual a dos." Sin embargo, cuando se trata con concentraciones cuya señal es cercana a la originada por un blanco es muy difícil determinar experimentalmente la relación anterior.

El límite de detección se define mejor como la cantidad o concentración más pequeña de una sustancia, que puede ser detectada a un nivel de probabilidad elegido previamente (Gabriels, 1970). Otros autores obtienen el valor del límite de detección a partir de ensayos en blanco, donde este límite es tomado como igual o mayor que tres desviaciones estándar del blanco (Report BITDC 1974). En otros casos el límite de detección se ha definido como la concentración que causa una absorbancia igual al doble de la desviación estándar de la absorbancia de un blanco, determinada especificando la longitud de la celda utilizada (Hawley e Ingle, 1975). También Stux y Rothery (1971) definen este valor como la altura de pico igual al doble de la desviación estándar de la línea-base de ruido. Finalmente Hubaux y Vos (1970), muestran cómo pueden introducirse estimadores de los límites de decisión y de detección considerando los límites de confianza de la curva de calibración lineal.

En este trabajo, utilizando los estimadores de Hubaux y Vos aplicamos un método de cálculo algebraico para determinar el límite de detección en métodos analíticos en general. Se prueba el método en distintos casos reales y se establecen los parámetros que permitirán una mejor comparación de métodos entre distintos laboratorios (intercalibración).

Los resultados obtenidos sirven de base para trabajos en curso de realización consistentes en

ejercicios de intercalibración entre laboratorios de distintos países entre los cuales participa el INIDEP, (IOC/GIPME, Intercomparison Programme for Contaminants in Biological Tissue, organizado por la Comisión Oceanográfica Intergubernamental de la UNESCO) y análisis a partidas de exportación de industrias pesqueras locales.

2. METODO ANALITICO: RELACION FUNCIONAL ENTRE LA SEÑAL DE SALIDA Y LA ENTRADA

En general, se considera un método analítico al proceso total que comienza en una entrada, que es la fracción de muestra portadora de una magnitud a medir, x , que será sometida a distintos tratamientos posibles como: fraccionamiento, extracción, cristalización, etcétera, y termina en una señal de salida, y , obtenida a través de algún sistema de detección.

Un análisis en paralelo seguido por el mismo método analítico pero en el cual se omite la muestra, es una entrada que llamamos blanco.

A la estimación de la relación funcional entre la señal de salida y la entrada, utilizando el mismo método analítico y obtenida a partir de una serie de blancos conteniendo cantidades

conocidas de x (estándares), la llamamos curva de calibración.

En la figura 1 se muestra cómo el dato de interés x , puede obtenerse si se conoce la relación funcional entre la señal de salida y la entrada:

$$y = f(x) \quad (1)$$

En la mayoría de los casos, la curva de calibración sigue o puede fácilmente ser convertida en un modelo lineal de la forma:

$$y = \alpha_0 + \beta x \quad (2)$$

Por lo anterior, la curva de calibración será una recta con ordenada en el origen igual a α_0 y pendiente igual a β . La estimación de α_0 dependerá de la señal correspondiente al blanco, y_0 , y eventualmente puede ser cero.

Si bien en algunos casos reales la curva se aparta de la linealidad, como es el caso de desviaciones de la ley de Beer en espectrofotometría de absorción, los errores se minimizan tomando pequeños intervalos de la curva de calibración que incluyan a la concentración a determinar. En nuestro caso, donde exploramos la zona de trabajo cercana a los límites de detección, el comportamiento se acerca al ideal.

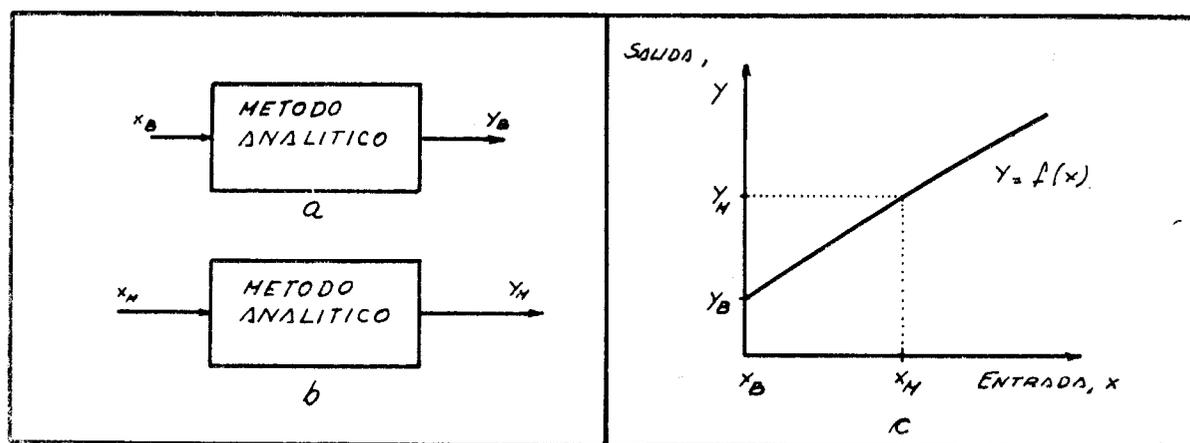


Figura 1: Método analítico. Relación señal-entrada.

- a) Señal correspondiente a la entrada de un blanco.
- b) Señal correspondiente a la entrada de muestra.
- c) Relación funcional Señal-Entrada.

3. LIMITE DE DETECCION

Llamamos límite de detección a la concentración mínima que puede ser distinguida del blanco con una probabilidad establecida.

La medida práctica del límite de detección de un determinado método analítico implica:

- 3.1. Obtener las señales: y_1, y_2, \dots, y_n ; correspondientes a una serie de estándares que incluyan al blanco: x_1, x_2, \dots, x_n .
- 3.2. Calcular la recta de regresión a partir de los datos obtenidos en 3.1 como mejor estimador de la curva de calibración.
- 3.3. Calcular el límite de detección al nivel de probabilidad establecido, dando como válidas las siguientes suposiciones:
 - a) Para cada x fijo, la variable aleatoria y es normal con media: $y = \alpha_0 + \beta x$.
 - b) Las n pruebas con que obtenemos los pares: $(x_1, y_1); (x_2, y_2); \dots; (x_n, y_n)$ son independientes.

La ecuación 2 puede ser evaluada, así como también estimarse las respectivas varianzas (Box y col., 1978; Mandel, 1976).

La ecuación 2 se evalúa con: $\hat{y} = a + bx$ (3)

donde: $a = \bar{y} - b\bar{x}$ (4)

$$y: b = \Sigma (x-\bar{x}) (y-\bar{y}) / \Sigma (x-\bar{x})^2 \quad (5)$$

siendo: \hat{y} estimador de y , a y b estimadores de α_0 y β , respectivamente.

Las estimaciones de las respectivas varianzas son:

$$s^2 = \sum (y-\hat{y})^2 / n-2 = \left[\sum (y-\bar{y})^2 - b^2 \sum (x-\bar{x})^2 \right] / n-2 = \left[\sum (y-\bar{y})^2 - b \sum (x-\bar{x})(y-\bar{y}) \right] / n-2 \quad (6)$$

Para la recta de regresión:

Para \hat{y} :

$$\hat{V}(\hat{y}) = (1/n + (x-\bar{x})^2 / \sum (x-\bar{x})^2) s^2 \quad (7)$$

Para a :

$$\hat{V}(a) = \hat{V}(\hat{y}_0) = (1/n + \bar{x}^2 / \sum (x-\bar{x})^2) s^2 \quad (8)$$

Para b :

$$\hat{V}(b) = (1 / \sum (x-\bar{x})^2) s^2 \quad (9)$$

Los límites para la recta de regresión con un nivel de significación de $1 - \alpha$ están dados por:

$$y \pm t_{\alpha/2} (\hat{V}(\hat{y}))^{1/2} \quad (10)$$

donde: $t_{\alpha/2} = t$ de Student para $n-1$ grados de libertad y nivel de significación $1 - \alpha$.

$$x_L = \left(t_{\alpha/2} (\hat{V}(\hat{y}_0))^{1/2} + t_{\alpha/2} (\hat{V}(\hat{y}_L))^{1/2} \right)_b \quad (11)$$

La concentración correspondiente al límite de detección se obtiene a partir de (ver Fig. 2).

Reemplazando (7) y (8) en (11) obtenemos:

$$x_L = \frac{2\bar{x} / \sum (x-\bar{x})^2 - 2b / t_{\alpha/2} s (1/n + \bar{x}^2 / \sum (x-\bar{x})^2)^{1/2}}{1 / \sum (x-\bar{x})^2 - (b / t_{\alpha/2} s)^2} \quad (12)$$

La ecuación 12 permite el cálculo del límite de detección x_L a partir de los datos experimentales.

Ahora bien, de acuerdo a la ecuación 9, para obtener una mayor precisión en la pendiente b se requiere que el término $\Sigma (x-\bar{x})^2$ sea grande; esto se obtiene dispersando los x_i sobre todo el rango experimental posible. Una vez fijado el valor de $\Sigma (x-\bar{x})^2$, la mayor precisión posible en la intersección con la ordenada (y_0), se obtiene de acuerdo a la ecuación 8 haciendo \bar{x} tan pequeño como sea posible.

4. RECTA DE REGRESION Y LIMITE DE CONFIANZA

El límite de detección calculable a partir de la ecuación 12, depende de la recta de regresión como se muestra en la figura 3. Para un número de pruebas dado (x_i, y_i), x_L disminuye al

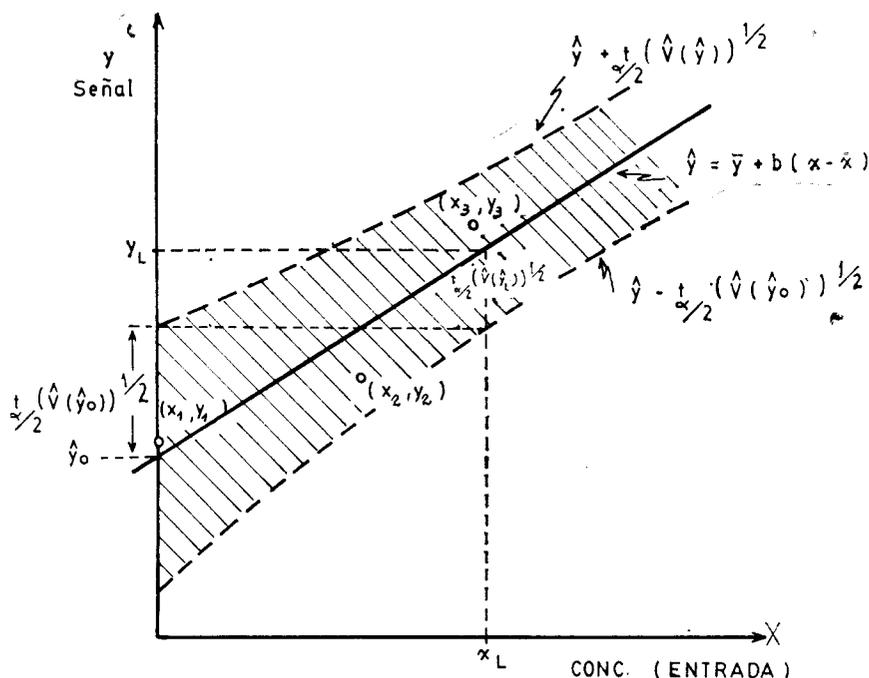


Figura 2: Cálculo del límite de detección a partir de los valores experimentales, la recta de regresión y su intervalo de confianza.

aumentar la pendiente, figuras 3 a y b y en la medida en que el intervalo de confianza se hace más angosto, figura 3 c y d.

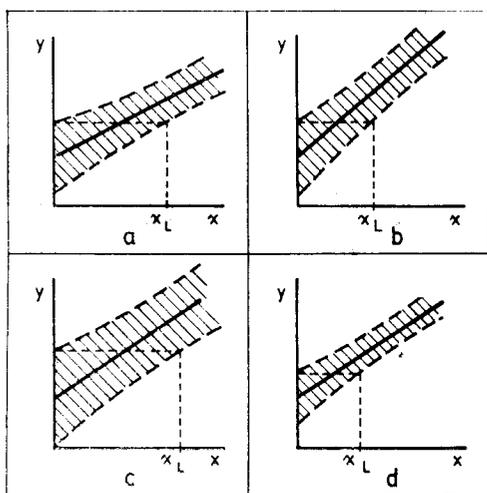


Figura 3: Dependencia del límite de detección, x_L , con la recta de regresión.
 a y b: Dependencia de x_L con la pendiente de la recta.
 c y d: Dependencia de x_L con el intervalo de confianza.

5. ELECCION DE LA SERIE DE ESTANDARES

Para compatibilizar los requerimientos enunciados en el párrafo 4, es obvio que la mayor cantidad de x_i deben de localizarse cerca de cero con pocos valores mayores a los efectos de obtener el valor deseado de $\Sigma (x-\bar{x})^2$.

En forma tentativa se adopta el siguiente criterio:

5.1. Número de estándares, $n = 6$

5.2. Concentración de estándares,

- $x_1 = x_1 = 0$
- $x_2 = 0$
- $x_3 = 0$
- $x_4 = 4s$
- $x_5 = 7s$
- $x_6 = 10s$

donde: s = Desviación estándar, conocida de experiencias anteriores o estimada a partir de repeticiones sobre una misma muestra.

6. DETERMINACION DEL LIMITE DE DETECCION EN EL ANALISIS DE MERCURIO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

En el método estudiado, se tratan 150 mg de material biológico, se someten a digestión en medio sulfúrico-nítrico, completando el ataque con permanganato de potasio. La solución obtenida se reduce con un exceso de sulfato estannoso bariendo con aire el mercurio atómico formado hacia la celda del espectrofotómetro. Se sobreentiende que todas las variables como: volúmenes, concentraciones, caudales de aire, longitud de celda, etcétera, están especificadas.

La respuesta del instrumento (Shimadzu 640-13) en mVolt, proporcional a la absorbancia, se obtiene directamente del instrumento digital, tomando el máximo de la señal en cada caso.

6.1. Estimación de s

Frecuentemente la desviación estándar de valores individuales es conocida de trabajos anteriores. Aquí la obtuvimos a partir de 5 repeticiones sobre la misma muestra.

Muestra: Músculo de delfín.

Resultados obtenidos: En el cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos al analizar 5 submuestras. En el cuadro 2 se muestran los

CUADRO 1

Análisis de 5 submuestras de músculo de delfín.

Sub-muestra	Peso, mg	Señal, mV	Conc. mg Hg/kg (Peso húmedo)
1	231,1	153	0,68
2	134,7	93	0,69
3	163,4	103	0,64
4	142,0	97	0,69
5	147,0	94	0,64

resultados de 5 estándares con los que se obtuvo la curva de calibración (recta de regresión), utilizada en el cálculo de las concentraciones.

CUADRO 2

Análisis de 5 estándares (Curva de calibración)

Estándar Nº	ng de Hg	Señal, mV	Recta de regresión $y = a + bx$
1	50	54	a = 5,66
2	75	76	
3	100	97	b = 0,935
4	150	145	$\therefore y = 5,66 + 0,935 \times$
5	200	194	

Con los resultados de concentración obtenidos con las submuestras se estima el valor medio, \bar{x} y la desviación estándar, s :

$$\bar{x} = 0,67 \text{ mg/kg de mercurio total.}$$

$$s = 0,03 \text{ ,, ,, ,, ,,}$$

6.2. Determinación de x_L

Conocida la desviación estándar s , y considerando 150 mg de muestra como promedio en cada análisis, los estándares deben contener, siguiendo el criterio enunciado en el párrafo 5, aproximadamente las siguientes cantidades de mercurio:

$$x_4 = 150 \times 0,03 \times 4 = 18 \text{ ng}$$

$$x_5 = 150 \times 0,03 \times 7 = 31,5 \text{ ng}$$

$$x_6 = 150 \times 0,03 \times 10 = 45 \text{ ng}$$

En el cuadro 3 se muestran las señales obtenidas con una serie de estándares con cantidades de mercurio aproximadas a las calculadas:

CUADRO 3

Señales obtenidas con una serie de estándares

n	ENTRADA		SEÑAL DE SALIDA	
	x_i	Hg, ng	y_i	Señal, mV
1	x_1	0	y_1	14
2	x_2	0	y_2	12
3	x_3	0	y_3	10
4	x_4	20	y_4	27
5	x_5	35	y_5	34
6	x_6	50	y_6	51

Eligiendo un nivel de significación, $1 - \alpha = 0,95$; $t_{\alpha/2} = 2,571$. Con los datos del cuadro 3 puede calcularse ahora el límite de detección, x_L mediante la ec. 12:

$x_L = 9$ ng de Hg, este resultado significa, utilizando el presente método, que puede detectarse al nivel de probabilidad establecido,

95 %, una concentración de: $9 / 150 = 0,06$ ng/g.

En la figura 4 se muestra el cálculo gráfico correspondiente a estos mismos datos. Los resultados de cálculo para el correspondiente intervalo de confianza se muestran en el cuadro 4.

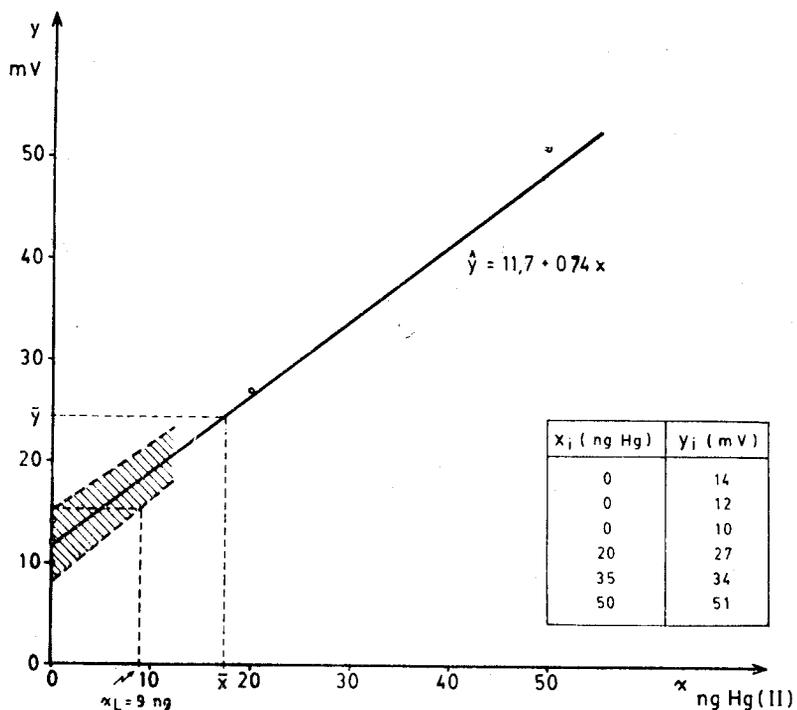


Figura 4: Cálculo gráfico del límite de detección.

CUADRO 4
Intervalo de confianza para la recta de regresión.

x	y	$t_{\alpha/2} (v(\bar{y}))^{1/2}$	Lim. sup.	Lim. inf.
0	11,7	3,50	15,20	8,20
2	13,2	3,33	16,51	9,85
4	14,7	3,17	17,87	11,53
6	16,1	3,03	19,13	13,07
8	17,6	2,90	20,50	14,70
10	19,1	2,80	21,90	16,30
12	20,6	2,71	23,31	17,89

7. VARIACION DEL LIMITE DE DETECCION CON EL NUMERO DE REPETICIONES

De la ec. 12 y figura 2 vimos que el límite de detección está dado por:

Considerando que la variancia se reduce con el número de repeticiones, j , de acuerdo a:
 $V(\bar{y}) = V(y)/j$ donde: j = Número de repeticiones, el límite de detección para j repeticiones, $x_L(j)$, estará dado por:

La ec. 13 permite el cálculo del número de repeticiones, j , requeridas para llevar al límite de detección de x_L a $x_L(j)$.

8. APLICACION A UN CASO PRACTICO

Se determina plomo en una solución acuosa mediante espectrofotometría de absorción atómica con el siguiente método analítico:

Espectrofotómetros: Shimadzu mod. AA/640/13

Longitud de onda: 217,0 nm

Llama: aire-hidrógeno; Caudal de aire: 10 l/min

Caudal de hidrógeno: 15,0 l/min

Altura de quemador: 5 mm

Corrección con lámpara de deuterio. Intensidad: 2

Expansión de lectura: Por 5

Tiempo de integración de la señal: 6 segundos.

Spray: 20

8.1 Determinación de la desviación estándar del método

Muestra: Solución acuosa de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Pb (II). ($x_M = 1 \mu\text{g/ml}$).

Lecturas: Se lleva a cero el instrumento con agua destilada y se realizan 4 lecturas. Los resultados en mVolt se muestran en el cuadro 5.

CUADRO 5

Señales obtenidas con una muestra de 1 $\mu\text{g/ml}$ de Pb(II).

Lectura Nº	Señal, mVolt
1	95
2	90
3	96
4	101

Con los resultados del cuadro 5 se obtiene el valor medio de la señal, la desviación estándar de los resultados individuales y la desviación estándar del valor medio:

$$\bar{y} = 95,5 \text{ mV}$$

$$S_y = 4,5 \text{ mV}$$

$$S_{\bar{y}} = S_y/\sqrt{j} = 2,5 \text{ mV}$$

8.2 Determinación del límite de detección con y sin repeticiones

De acuerdo al método establecido, se preparan los respectivos estándares utilizando para x_4 , x_5 y

x_6 las concentraciones correspondientes a 4s, 7s y 10s, respectivamente. x_1 , x_2 y x_3 son blancos.

En el cuadro 6 se muestran los resultados y el cálculo del límite de detección para cada caso:

CUADRO 6
Determinación del límite de detección con y sin repeticiones

Sin repeticiones, (j = 1)				Con repeticiones (j = 4)							
$s_y = 4,5 \text{ mV} = 0,047 \text{ } \mu\text{g/ml}$				$\bar{S}_y = 2,25 \text{ mV} \equiv 0,024 \text{ } \mu\text{g/ml}$							
x_1	Conc. $\mu\text{g/ml}$	y_1	Señal, mV	x_1	Conc.	y_1 mV	j				
							1	2	3	4	
x_1	0	y_1	5	x_1	0	y_1	0	-3	-2	-10	
x_2	0	y_2	1	x_2	0	y_2	-5	-7	-9	-3	
x_3	0	y_3	8	x_3	0	y_3	2	0	-4	-5	
x_4	0,19	y_4	28	x_4	0,10	y_4	9	12	10	7	
x_5	0,33	y_5	36	x_5	0,17	y_5	20	16	15	16	
x_6	0,47	y_6	53	x_6	0,24	y_6	31	27	25	19	
Límite de detección, x_L											
j = 1				j = 4							
$x_L = 0,076 \text{ } \mu\text{g/ml}$				$x_L = 0,034 \text{ } \mu\text{g/ml}$							

Los resultados experimentales son coincidentes con los esperados y muestran una de las formas que permiten reducir el límite de detección; esto resulta sencillo en este caso, donde una repetición sólo insume 6 segundos para su ejecución.

9. CONCLUSIONES

- 9.1 Se precisa el concepto de límite de detección generalizando su aplicación a cualquier proceso de medición.
- 9.2 Se establece un método de cálculo válido para aquellos casos en que la relación señal-entrada sigue un modelo lineal.
- 9.3 Se fija un criterio de selección para n , x_i y $1-\alpha$ que permite el cálculo del límite de detección en una forma claramente específica-

da. Esto último es particularmente importante ya que permite una mejor comparación de métodos analíticos entre distintos laboratorios.

- 9.4 Se muestra la variación que presenta el límite de detección al aumentar el número de repeticiones.
- 9.5 Se dan ejemplos de cálculo para distintos métodos analíticos por espectrofotometría de absorción atómica.

BIBLIOGRAFIA

- BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G., y HUNTER, J. S. 1978. *Statistics for experimenters*. John Wiley, New York. pp. 1-653.
- GABRIELS, R. 1970. A general method for calculating the detection limit in chemical analysis. *Anal. Chem.* Vol. 42: 1439-1440.

- HAWLEY, J. E. e INGLE, J. D. (Jr.). 1975. Improvements in cold vapor atomic absorption determination of mercury. *Anal. Chem.* Vol. 47: 719-723.
- HIEFTJE, G. M. 1972. Signal-to-noise enhancement through instrumental techniques. *Anal. Chem.* Vol. 44: 81 A - 88 A.
- HUBAUX, A. y VOS, G. 1970. Decision and detection limits for linear calibration curves. *Anal. Chem.* Vol. 42: 849-855.
- MANDEL, J. 1976. Statistical methods in analytical chemistry, en *Treatise on analytical chemistry*. Part. III vol. 3 Ed. by I. M. Kolthoff, P. J. Elving y F. H. Stross. John Wiley. New York. pp. 79-124.
1974. Report prepared by the mercury analysis working party of the Bureau International Technique du Chlore.
- Standarization of methods for the determination of traces of mercury. *Analytica Chimica Acta*, Vol. 72: 37-48.
- STUX, R. y ROTHERY, E. 1971. A simple procedure for determining mercury at ppb levels. *Varian techtron. Technical topics*. 3 pp.