

# **CÁLCULO DE INCERTIDUMBRE EN MEDIDAS QUÍMICAS: ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO**

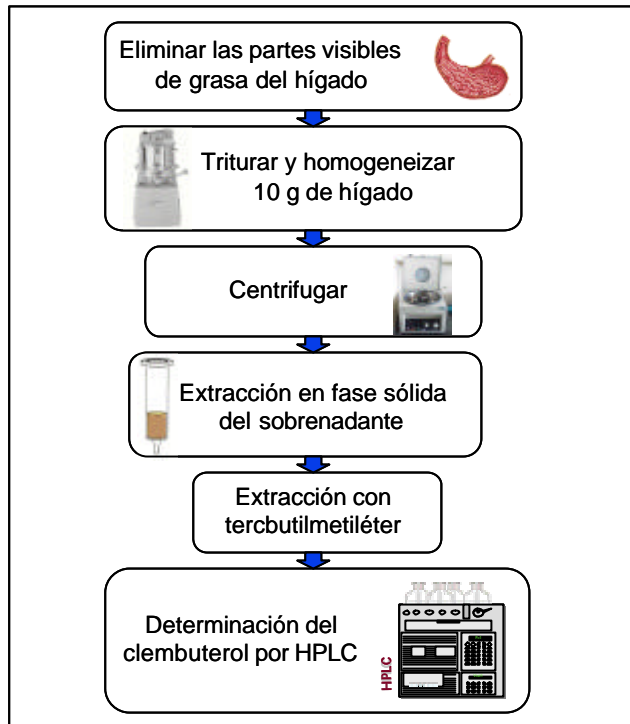
Alicia Maroto, Ricard Boqué, Jordi Riu, F. Xavier Rius

Departamento de Química Analítica y Química Orgánica  
Instituto de Estudios Avanzados. Universitat Rovira i Virgili.  
Pl. Imperial Tàrraco, 1. 43005-Tarragona. España

En anteriores artículos de esta serie hemos visto la importancia que tiene calcular la incertidumbre asociada a cualquier resultado analítico [Maroto 2001] así como las diversas estrategias existentes para calcular la incertidumbre [Maroto 2002]. Una de ellas consiste en calcularla de forma global, es decir, agrupando términos de incertidumbre siempre que sea posible, y utilizando la información que se genera durante el proceso de validación del método analítico [Maroto 1999]. La ventaja de esta aproximación es que requiere poco trabajo adicional puesto que los métodos siempre deben validarse antes de aplicarlos al análisis de muestras de rutina. En este artículo se explica cómo aplicar esta aproximación para calcular la incertidumbre en la determinación de clenbuterol en hígado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

## **1. Determinación de clenbuterol en hígado mediante HPLC**

El consumo de carne de animales tratados con elevadas cantidades de clenbuterol puede comportar la aparición de efectos graves en el consumidor, como alteraciones de tiroides, palpitaciones, insomnio, espasmos musculares, aumento de la presión sanguínea, etc. Por este motivo, la comunidad europea ha establecido un límite máximo de clenbuterol de 0.1  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en músculo, de 0.5  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  en hígado y riñón, y de 0.05  $\mu\text{g}/\text{L}$  en leche. El uso del clenbuterol administrado como fármaco de forma terapéutica y bajo prescripción veterinaria comporta un riesgo mínimo para el consumidor. Sin embargo, el uso ilegal del clenbuterol en animales como anabolizante para aumentar la cantidad de músculo puede dar lugar a graves intoxicaciones. Los graves efectos del clenbuterol han hecho que sea muy importante determinar su contenido en carnes y, especialmente, en hígado ya que es donde se encuentran las mayores concentraciones. La Figura 1 muestra las etapas del método analítico para determinar clenbuterol en hígado.



**Figura 1.** Etapas del método analítico para determinar clenbuterol en hígado por análisis cromatográfico.

En primer lugar, se deben triturar y homogeneizar 10 g de hígado después de haber eliminado las partes visibles de grasa. Una vez homogeneizada, la muestra se centrifuga y se realiza una extracción en fase sólida del sobrenadante con un cartucho C18. El clenbuterol retenido en el cartucho se eluye con metanol. Después, deben realizarse diversas extracciones con tercbutilmetiléter, evaporar a sequedad la fase orgánica y disolver el residuo en ácido clorhídrico 0.01 M. Finalmente, se determina el clenbuterol del extracto mediante HPLC. La concentración final de clenbuterol en hígado (expresada en  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) se calcula como:

$$C_{\text{clenbuterol}} = \frac{C_{\text{HPLC}} \cdot V_{\text{ex}}}{R \cdot m_{\text{hígado}}} \cdot F_{\text{hom}} \quad [1]$$

donde  $C_{\text{HPLC}}$  es la concentración del extracto analizado por HPLC (en  $\mu\text{g}/\text{L}$ ),  $V_{\text{ex}}$  es el volumen final del extracto (en L),  $R$  es la recuperación del proceso de extracción,  $m_{\text{hígado}}$  es la masa de hígado analizada (en Kg),  $F_{\text{hom}}$  es el factor debido a la heterogeneidad de la muestra. A efectos prácticos, se asume que  $F_{\text{hom}}$  es igual a uno y por tanto no contribuye al resultado final. No obstante,  $F_{\text{hom}}$  tiene una incertidumbre asociada que sí contribuye a la incertidumbre final de los resultados.

## 2. Verificación de la trazabilidad de los resultados

La trazabilidad del contenido en clenbuterol puede verificarse utilizando un material de referencia certificado (CRM) [BCR 2000]. En este ejemplo se utilizó un CRM cuya concentración certificada de clenbuterol en hígado liofilizado y homogeneizado era  $1.21 \pm 0.11 \mu\text{g/Kg}$ . Además, en el certificado del CRM se disponía de la información de que la incertidumbre se había calculado utilizando un factor de cobertura de  $k = 2.2$ .

El CRM se analizó diez veces en el laboratorio en condiciones intermedias siguiendo el protocolo del método analítico. Es decir, el CRM se analizó en diferentes series y variando los equipos y los analistas. Los resultados obtenidos (expresados en  $\mu\text{g/Kg}$  de clenbuterol) se muestran en la Tabla 1:

Análisis	Resultado
1	1.21
2	1.28
3	1.32
4	1.34
5	1.36
6	1.19
7	1.25
8	1.30
9	1.26
10	1.22
Media	1.27
Desviación estándar	0.057

**Tabla 1.** Resultados del análisis del CRM

La desviación estándar de los resultados corresponde a la precisión intermedia del método ya que el CRM se analizó en condiciones intermedias.

La trazabilidad del método se verificó mediante un test *t*-Student:

$$t_{\text{cal}} = \frac{|\bar{x}_{\text{CRM}} - \bar{x}_{\text{método}}|}{\sqrt{\left(\frac{U_{\text{CRM}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{s_1}{\sqrt{n}}\right)^2}} = \frac{|1.25 - 1.27|}{\sqrt{\left(\frac{0.11}{2.2}\right)^2 + \left(\frac{0.057}{\sqrt{10}}\right)^2}} = 0.43 \quad [2]$$

Donde  $\bar{x}_{\text{CRM}}$  es la concentración certificada de clenbuterol,  $U_{\text{CRM}}$  es la incertidumbre asociada a dicha concentración y  $n$  es el número de veces que se analizó el CRM con el método analítico (en este caso,  $n=10$ ). El valor de  $t$  calculado,  $t_{\text{cal}}$ , debe compararse con el valor de  $t$  tabulado de dos colas para ( $n$ -

1) = 9 grados de libertad y un nivel de significación  $\alpha$  (en este ejemplo  $\alpha = 5\%$ ). El valor de  $t$  tabulado es 2.26; por tanto, los resultados proporcionados por el método son trazables al valor certificado del CRM ya que el valor de  $t$  tabulado es mayor que el valor de  $t$  calculado.

Una vez verificada la trazabilidad al CRM, se puede trasladar dicha trazabilidad a los resultados obtenidos al analizar las muestras de rutina de hígado. Para ello, es necesario que las *muestras de rutina sean similares al CRM* utilizado en términos de concentración y de matriz. Además, es necesario que *el método esté bajo condiciones de aseguramiento de la calidad* para poder asegurar a lo largo del tiempo que los resultados siguen siendo trazables.

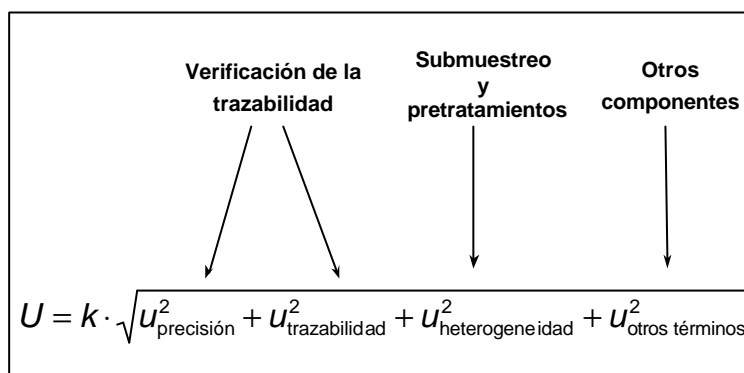
### 3. Cálculo de la incertidumbre de los resultados

#### *Identificación de las fuentes de incertidumbre*

Para calcular la incertidumbre de los resultados es necesario identificar todas las fuentes de incertidumbre de los términos de la expresión utilizada para calcular la concentración de clenbuterol (Ec. 1). En concreto, las fuentes de incertidumbre de la concentración del extracto analizado,  $C_{\text{HPLC}}$ , son debidas al proceso de extracción, a la recta de calibrado con patrones de clenbuterol y al análisis cromatográfico (es decir, a la inyección del extracto, al área obtenida y a la calibración del cromatógrafo). La incertidumbre del volumen de extracto analizado,  $V_{\text{ex}}$ , depende de la tolerancia y de la precisión del material volumétrico utilizado. La incertidumbre de la recuperación del proceso de extracción depende del análisis cromatográfico, de los pretratamientos realizados para extraer el clenbuterol en la muestra enriquecida y en la muestra sin enriquecer y de la cantidad de patrón adicionada. Las fuentes de incertidumbre de la masa de hígado analizada,  $m_{\text{hígado}}$ , dependen de la precisión y la calibración de la balanza. Por último, la incertidumbre del factor  $F_{\text{hom}}$  es debida a los procesos de homogeneización de la muestra (eliminación de partes visibles de grasa y trituración).

Como vemos, existen muchas contribuciones a la incertidumbre del resultado final y el cálculo individual de cada una de ellas siguiendo el procedimiento "bottom-up" propuesto por la ISO [Maroto, 2002] resultaría ciertamente complejo. Sin embargo, es posible agrupar términos y calcular la incertidumbre de forma global, aprovechando la información que se ha generado durante el proceso de verificación de la trazabilidad. La Fig. 2 muestra la expresión para

calcular globalmente la incertidumbre. Se observa que las fuentes de incertidumbre identificadas en la determinación de clenbuterol (y de forma general en la determinación de cualquier analito mediante cualquier método analítico) pueden agruparse en cuatro componentes: 1) incertidumbre debida a la precisión; 2) incertidumbre debida a la verificación de la trazabilidad; 3) incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra; y 4) incertidumbre debida a otros términos.



**Figura 2.** Componentes de incertidumbre de la estrategia basada en utilizar información generada durante la verificación de la trazabilidad.

La Fig. 2 muestra que los dos primeros términos de la expresión se pueden obtener utilizando la información generada durante el proceso de verificación de la trazabilidad, es decir, en este ejemplo en concreto cuando se analizó el CRM. La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la variabilidad experimental del método analítico, y en ella se incluyen las fuentes de incertidumbre asociadas a todas las etapas del método analítico, pero consideradas de una forma global. En este caso en concreto se incluye la precisión de la balanza, las etapas de extracción, la recta de calibrado, la recuperación y la precisión del material volumétrico. El segundo término,  $u_{\text{trazabilidad}}^2$ , considera la incertidumbre asociada a asegurar que el método proporciona resultados trazables. Para asegurar esto se ha debido analizar el CRM, con los consiguientes componentes de error asociados (incertidumbre del propio material y los mismos términos de incertidumbre asociados a la precisión del método,  $u_{\text{precisión}}^2$ ). El tercer término de la expresión considera la incertidumbre asociada a la heterogeneidad de las muestras de hígado. Esto es debido a que como el CRM es una muestra homogénea, la  $u_{\text{trazabilidad}}^2$  no tiene en cuenta las etapas de homogeneización que se tendrán que aplicar a las futuras muestras de rutina. Por último, el cuarto término, y en el caso concreto del análisis de clenbuterol, podría incorporar la incertidumbre asociada a la variabilidad de las matrices de las muestras de rutina (en caso de analizar

muestras que no fueran de hígado, o muestras de hígado de diferentes especies de animales).

### *Cálculo de los diferentes componentes de incertidumbre*

A continuación se explica cómo se calcularon los diferentes términos de incertidumbre de la expresión propuesta en la Fig. 2. Tal y como se observa en esta figura, pueden obtenerse dos términos de incertidumbre a partir de la información obtenida durante la verificación de la trazabilidad: la incertidumbre debida a la precisión y la incertidumbre de la verificación de la trazabilidad.

#### 1. Incertidumbre debida a la precisión

La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la precisión intermedia del método analítico. La precisión intermedia del método puede obtenerse a partir del análisis del CRM ya que éste se analizó en condiciones intermedias. Por tanto:

$$u_{\text{precisión}} = \frac{s_1}{\sqrt{N}} = \frac{0.057}{\sqrt{10}} \mu\text{g/Kg} \quad [3]$$

Donde  $s_1$  es la desviación estándar de los 10 resultados obtenidos al analizar el CRM y  $N$  es el número de veces que se analiza la muestra de rutina en condiciones intermedias (normalmente,  $N=10$ ).

#### 2. Incertidumbre debida al proceso de verificación de la trazabilidad

Se calcula teniendo en cuenta la incertidumbre de la referencia y la precisión intermedia del método.

$$u_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\left(\frac{U_{\text{CRM}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{s_1}{\sqrt{n}}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{0.11}{2.2}\right)^2 + \left(\frac{0.057}{\sqrt{10}}\right)^2} = 0.053 \mu\text{g/Kg} \quad [4]$$

El primer término de la expresión corresponde al cuadrado de la incertidumbre estándar del CRM (es decir, corresponde a la incertidumbre expandida del CRM dividida por el factor de cobertura  $k$ ) y el segundo término corresponde a la incertidumbre del valor medio obtenido al analizar 10 veces el CRM.

### 3. Incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra

Para calcular la incertidumbre de la heterogeneidad, se realizó la homogeneización de 6 porciones de 10 g de una muestra de hígado. Después, se analizó cada una de las 6 porciones homogeneizadas con el procedimiento analítico (es decir, se extrajo el clenbuterol y se determinó el clenbuterol del extracto mediante HPLC). Cada una de las 6 porciones se analizó en condiciones de repetibilidad (es decir, las 6 muestras homogeneizadas las analizó el mismo el analista con el mismo equipo en un intervalo corto de tiempo). Se obtuvieron los siguientes resultados (expresados en µg/Kg de clenbuterol):

Porción	Resultado
1	1.05
2	1.08
3	1.01
4	1.17
5	1.22
6	1.12
Media	1.11
Desviación estándar, $s_{\text{porciones}}$	0.078

**Tabla 2.** Resultados de las 6 porciones homogeneizadas de una muestra hígado.

La incertidumbre de la heterogeneidad corresponde a la desviación estándar de los resultados obtenidos al analizar las 6 porciones de muestra:

$$u_{\text{heterogeneidad}} = \sqrt{s_{\text{porciones}}^2} = 0.078 \mu\text{g/Kg} \quad [5]$$

### 4. Incertidumbre debida a otros términos

En caso de que el laboratorio analice el hígado de diferentes tipos de carne (vacuno, ovino, porcino,...) es posible que la matriz de la muestra afecte al resultado final y dicho efecto debe considerarse como un término más de incertidumbre. En el ejemplo que presentamos hemos asumido que se analizan siempre muestras de una misma especie de animal.

#### *Cálculo de la incertidumbre final*

La incertidumbre final de los resultados se obtiene combinando los cuatro términos de incertidumbre estándar de la Tabla 3 y multiplicando por el factor

de cobertura  $k$ , tal y como muestra la Fig. 2. La incertidumbre final (asumiendo que las muestras de rutina se analizan una sola vez) es:

$$U = k \cdot u = 2 \cdot 0.11 = 0.22 \text{ } \mu\text{g/Kg} \quad [6]$$

en términos absolutos o

$$U = k \cdot u_R = 2 \cdot 0.0936 \cdot c = 0.187 \cdot c \text{ } \mu\text{g/Kg} \quad [7]$$

en términos relativos. Esta última expresión considera que los términos de incertidumbre varían linealmente con la concentración. Así, para una concentración de clenbuterol,  $c_{\text{clenbuterol}} = 0.50 \text{ } \mu\text{g/Kg}$ ,  $U = 0.09 \text{ } \mu\text{g/Kg}$ , mientras que para  $c_{\text{clenbuterol}} = 1.00 \text{ } \mu\text{g/Kg}$  entonces  $U = 0.18 \text{ } \mu\text{g/Kg}$ .

La incertidumbre se ha calculado en ambos casos utilizando un factor de cobertura  $k = 2$ . Por tanto, hay aproximadamente un 95% de probabilidad de que la concentración verdadera de clenbuterol de una muestra de rutina esté contenida dentro del intervalo proporcionado por la concentración obtenida al analizar la muestra de rutina y su incertidumbre asociada,  $U$ .

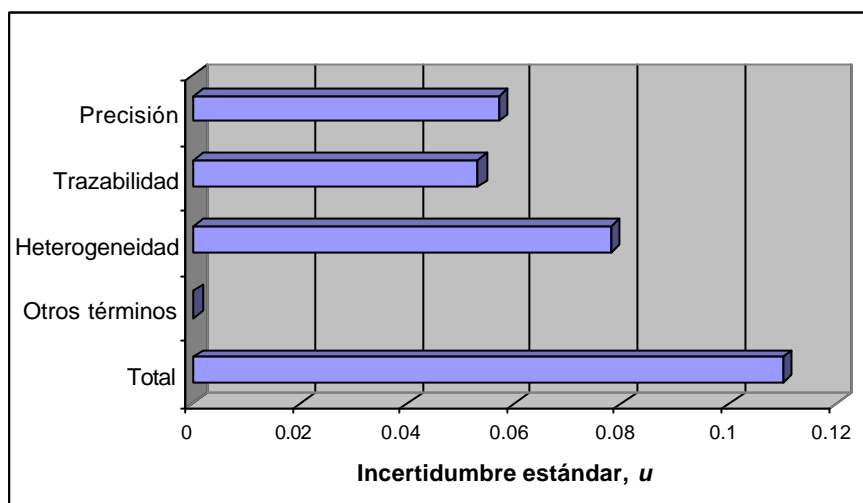
Término, $x$	Incertidumbre estándar, $u(x)$ ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Concentración ( $\mu\text{g/Kg}$ )	Incertidumbre estándar relativa $u(x)_R$
Precisión	0.057	1.27	0.0449
Trazabilidad	0.053	1.25	0.0424
Heterogeneidad	0.078	1.11	0.0703
Otros términos	-	-	-
Total	0.094	-	0.0936

**Tabla 3.** Componentes de incertidumbre en el análisis de clenbuterol por HPLC

La Tabla 3 muestra la incertidumbre estándar (en términos absolutos y relativos) de los cuatro componentes de incertidumbre de la Fig. 2. La incertidumbre de cada uno de los componentes en términos relativos se calcula dividiendo el valor de incertidumbre estándar por el nivel de concentración de clenbuterol en el que se ha obtenido dicho valor de incertidumbre. Por último, la Tabla 3 también muestra la incertidumbre total en términos absolutos y relativos.

La Fig. 3 muestra cómo contribuye cada uno de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total. Se observa que la incertidumbre debida a la heterogeneidad es la que tiene mayor contribución a la incertidumbre final

del resultado. No obstante, se observa que las incertidumbres debidas a la precisión y a la trazabilidad también contribuyen a la incertidumbre final de forma muy similar. Si se requiriese rebajar la incertidumbre de los resultados deberíamos incidir en los puntos que, *a priori*, contribuyen más a dicha incertidumbre y, por ejemplo, nos podríamos plantear la optimización de los procesos de homogeneización y/o extracción de la muestra. Otra posibilidad para disminuir la incertidumbre final sería verificar la trazabilidad de los resultados con un CRM con una incertidumbre asociada menor.



**Figura 3.** Contribución de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total. Todos los términos de incertidumbre están expresados como incertidumbre estándar,  $u$ .

Es importante resaltar que el laboratorio debe estar bajo *condiciones de aseguramiento de la calidad* para que, a lo largo del tiempo, el laboratorio pueda asegurar: 1) que sus resultados siguen siendo trazables; y 2) que sigue siendo válida la incertidumbre calculada [Maroto, 2002]. Otro aspecto importante a tener en cuenta es que el intervalo de concentraciones para aplicar las Ec. 6-7 no debería abarcar más de un orden de magnitud. En caso contrario deberíamos verificar la trazabilidad y calcular la precisión del método a más de un nivel de concentración.

## Conclusiones

En este artículo hemos abordado el cálculo de la incertidumbre en análisis cromatográfico. En concreto, hemos explicado cómo calcular la incertidumbre en la determinación de clenbuterol en hígado mediante cromatografía líquida (HPLC). En primer lugar, se han identificado las numerosas fuentes de incertidumbre presentes en la determinación. Posteriormente, la incertidumbre

se ha calculado globalmente agrupando dichas fuentes de incertidumbre en únicamente cuatro componentes. La ventaja de utilizar esta estrategia global es que el cálculo de la incertidumbre resulta más sencillo. Además, requiere poco trabajo adicional ya que se aprovecha la información obtenida durante el proceso de validación del método.

### **Referencias bibliográficas**

Community Bureau of Reference (BCR). Certified reference material BCR-649. Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM), Geel (Belgium), 2000.

BIPM,IEC,IFCC,ISO,IUPAC,IUPAP,OIML, Guide to the expression of uncertainty in measurement, ISO, Ginebra,1993

EURACHEM/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement, EURACHEM/CITAC Guide, 2<sup>nd</sup> Edition, 2000. <http://www.eurachem.bam.de/>

Alicia Maroto, Ricard Boqué, Jordi Riu, F. Xavier Rius, “Incertidumbre y precisión” Técnicas de Laboratorio, 266 (2001) 834-837.

Alicia Maroto, Ricard Boqué, Jordi Riu, F. Xavier Rius “Estrategias para el cálculo de la Incertidumbre” Técnicas de Laboratorio 270 (2002) 223-227.

Alicia Maroto, Jordi Riu, Ricard Boqué, F. Xavier Rius, “Estimating uncertainties using information from the validation process” Analytica Chimica Acta 391 (1999) 173-185

Los autores agradecen todos los comentarios relacionados con los contenidos de este artículo. Pueden dirigirse, mediante mensaje electrónico, a la dirección: [quimio@quimica.urv.es](mailto:quimio@quimica.urv.es). Una versión en soporte electrónico de este artículo e información adicional puede encontrarse en <http://www.quimica.urv.es/quimio>