

EL LÍMITE DE DETECCIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Ricard Boqué

Grupo de Quimiometría y Cualimetría

Universitat Rovira i Virgili

Tarragona

Introducción

El concepto de límite de detección ha sido y sigue siendo uno de los más conflictivos en el área de la Química Analítica. Las múltiples definiciones propuestas a lo largo de los años, así como la diversidad de metodologías para su cálculo han provocado sin duda esta situación. Recientemente, organizaciones internacionales, como la ISO o la IUPAC, han tratado de consensuar sus definiciones y dar una serie de guías para la estimación de este parámetro de calidad tan importante en análisis químico. En este artículo pretendemos aportar algo de luz sobre el tema y clarificar algunas de las dudas más habituales al respecto.

El concepto de detección

El límite de detección (LDD) se define habitualmente como la cantidad o concentración mínima de sustancia que puede ser detectada *con fiabilidad* por un método analítico determinado. Intuitivamente, el LDD sería la concentración mínima obtenida a partir de la medida de una muestra (que contiene el analito) que seríamos capaces de discriminar de la concentración obtenida a partir de la medida de un blanco, es decir, de una muestra sin analito presente. El primer problema aparece en la palabra fiabilidad, puesto que ésta implica la introducción de la estadística en la propia definición de LDD y en su cálculo posterior.

Falsos positivos y falsos negativos

Vamos a imaginar un determinado método analítico y vamos a situarnos mentalmente en el eje de las concentraciones. Vamos a suponer también que el método analítico tiene una precisión conocida a lo largo de los diferentes niveles de concentración y que los resultados obtenidos con dicho método siguen una distribución normal.

Si analizáramos blancos de muestra con el método, bien seguro obtendríamos una distribución de valores como la que muestra la Figura 1.

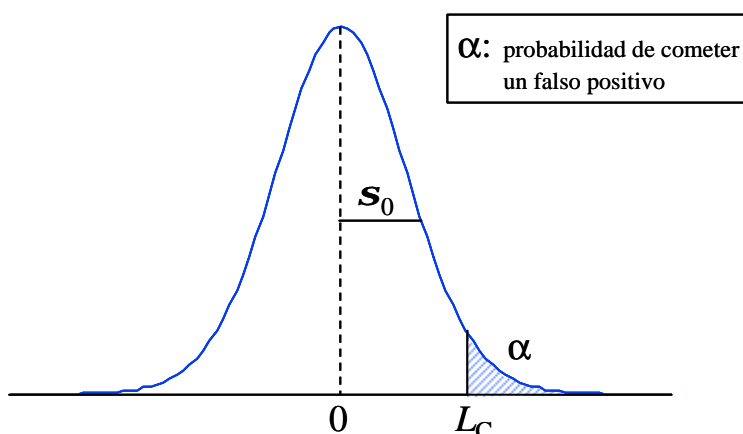


Figura 1. Distribución de valores alrededor de cero y nivel crítico.

Los valores de concentración (en ausencia de un error sistemático) se distribuirían alrededor de cero con una desviación estándar σ_0 . Quiere decir que como resultado de la medida de un blanco, y debido a los errores experimentales del método (reflejados en σ_0) podríamos obtener una concentración que no fuese cero. Como responsables de los resultados generados en el laboratorio, lo que nos gustaría es poder acotar la distribución en algún punto. Dicho punto es el *valor crítico*, L_C , que nos permitirá, una vez medida la muestra, tomar la decisión de si el analito se halla presente o no. Si la concentración obtenida es superior a L_C entonces sin duda no corresponde a un blanco y podemos decir el analito está presente en la muestra. Existe, sin embargo, un riesgo al acotar la distribución en L_C , y es que existe una cierta probabilidad de que el análisis de

un blanco diese como resultado una concentración superior a L_C , con lo que falsamente concluiríamos que el analito está presente. Dicha probabilidad, α , se denomina error de tipo I, error de 1ª especie o, más comúnmente, probabilidad de falso positivo.

Es decisión nuestra la elección del valor de α , en función al riesgo que queremos asumir de equivocarnos. Podríamos establecer, por ejemplo, el valor crítico a concentración cero. El riesgo en ese caso de cometer un falso positivo sería del 50% (cualquier valor de concentración por encima de cero sería considerado como debido a la presencia de analito).

Ahora bien, ¿podemos adoptar el valor de L_C de la Figura 1 como el límite de detección de nuestro método analítico? Supongamos que es así y que dicho valor corresponde a una concentración de 2 ppb. En ese preciso momento, el laboratorio está asumiendo que es capaz de detectar analitos en muestra a un nivel de concentración igual o superior a 2 ppb. Imaginemos que un cliente del laboratorio le suministra un lote de muestras con un contenido de 2 ppb de analito. El laboratorio analiza dichas muestras y obtiene una distribución de valores semejante a la mostrada en la Figura 2 (en rojo):

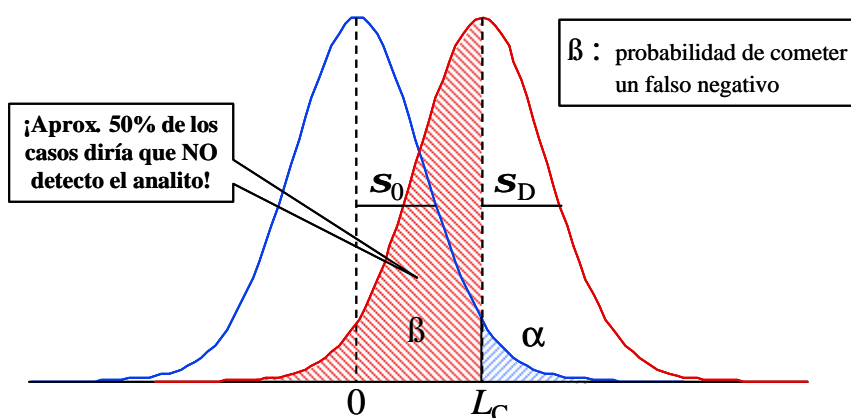


Figura 2. Nivel crítico y límite de detección para una probabilidad α . El riesgo de cometer un falso negativo es del 50%.

Las concentraciones se distribuirían aproximadamente alrededor de 2 ppb, mitad hacia arriba y mitad hacia abajo. ¿Cuál sería la consecuencia? Pues que aproximadamente en la mitad de los casos el laboratorio diría que no hay analito

en la muestra, o que no puede detectarlo, puesto que las concentraciones caen por debajo del valor crítico, L_C . ¿Cómo es posible? ¡El laboratorio había asegurado que es capaz de detectar a un nivel de 2 ppb y ahora, a este nivel de concentración, se equivoca a mitad de las veces! Existe pues un riesgo de concluir erróneamente que el analito no está presente cuando en realidad sí lo está. Dicha probabilidad, β , se denomina error de tipo II, error de 2ª especie o, más comúnmente, probabilidad de falso negativo.

Es nuevamente decisión del laboratorio la elección del valor de β . ¿Podemos permitirnos un 50% de errores? En caso negativo, la única alternativa para reducir el riesgo de falsos negativos es aumentar el límite de detección, como en el ejemplo de la Figura 3.

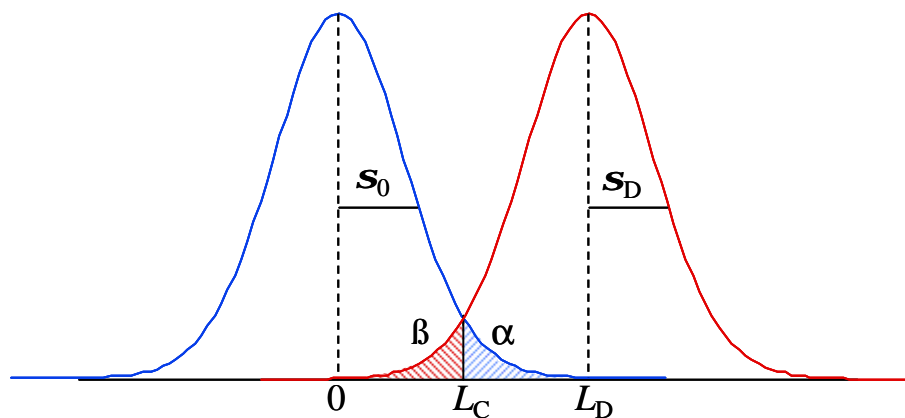


Figura 3. Nivel crítico y límite de detección para $\alpha = \beta$ (pequeños).

Al aumentar el LDD el laboratorio se protege contra los falsos negativos. Imaginemos que ahora el LDD = 4 ppb. Claramente, si un cliente envía muestras conteniendo 4 ppb de analito, el laboratorio ahora corre un riesgo mucho menor de asegurar que el analito no está presente cuando en realidad sí lo está y a una concentración de 4 ppb.

Definición moderna del límite de detección

En una definición más reciente, la ISO [ISO, 1997] introduce el término general 'concentración neta mínima detectable' (equivalente al límite de detección), como

la concentración (o cantidad) neta verdadera de analito en el material sujeto a análisis que conducirá, con una probabilidad $(1-\beta)$, a la conclusión de que la concentración (o cantidad) de analito en el material analizado es mayor que la de un blanco. La IUPAC [IUPAC, 1995], en un documento preliminar, proporcionaba una definición similar y adoptaba el término 'valor (verdadero) mínimo detectable', como equivalente al límite de detección.

De acuerdo con las definiciones de la ISO y la IUPAC, el LDD es un parámetro del método analítico definido *a priori*, porque se fija *antes* de que se realice la medida. El LDD es pues esencialmente diferente a la decisión sobre si se detecta un analito o no, puesto que dicha decisión se toma una vez se conoce el resultado de la medida. En otras palabras: *a posteriori*.

Expresiones para el cálculo del valor crítico y del límite de detección

La decisión de si un determinado analito está presente o no en una muestra se basa en la comparación de la concentración predicha del analito con el *nivel crítico*, L_C , que se define como:

$$L_C = z_{1-\alpha} \sigma_0 \quad (1)$$

donde $z_{1-\alpha}$ es el valor de la distribución normal de una cola para α y σ_0 es la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito no está presente en la muestra. L_C se define para marcar un valor mínimo a partir del cual una concentración predicha se considera causada por el analito. De esta forma, existe un riesgo α de cometer un error de tipo I (o falso positivo). Sin embargo, si queremos mantener un riesgo (llamado β) pequeño de cometer un falso negativo, el LDD del método, L_D , debe ser mayor. Así pues, tomando en consideración ambas probabilidades de error:

$$L_D = z_{1-\alpha} \sigma_0 + z_{1-\beta} \sigma_D \quad (2)$$

donde $z_{1-\beta}$ es el valor de la distribución normal de una cola para β y s_D es la desviación estándar de la concentración neta cuando el analito está presente en la muestra al nivel del LDD. En las ecuaciones (1) y (2) se ha asumido que las concentraciones siguen una distribución normal con varianza conocida. Tomando como valores por defecto para $\alpha = \beta = 0.05$, y asumiendo que la varianza es constante entre $c = 0$ y $c = L_D$, la ecuación (2) se transforma en:

$$L_D = 3.3\sigma_0 \quad (3)$$

Si no se conocen las varianzas y deben estimarse a partir de análisis replicados, entonces los valores de σ_0 y σ_D en (1) y (2) deben ser reemplazados por sus correspondientes estimaciones, s_0 y s_D . De la misma forma, los valores de z , basados en distribuciones normales deben ser reemplazados por los correspondientes valores t de una distribución t -Student con v grados de libertad. Tomando $\alpha = \beta$ las expresiones para L_C y L_D (asumiendo varianza constante) son:

$$L_C = t_{1-\alpha, v} s_0 \quad (4)$$

$$L_D \approx 2t_{1-\alpha, v} s_0 \quad (5)$$

La ecuación (5) es una aproximación que tiende al valor verdadero de L_D a medida que el número de grados de libertad aumenta. Cuando el número de replicados en la estimación de s_0 es pequeño, el término $2t_{1-\alpha, v}$ debe ser corregido por los grados de libertad [Currie, 1997].

Como se puede observar, las ecuaciones para el cálculo de L_C y L_D son bastante simples. La dificultad mayor proviene de la estimación de σ_0 .

La medida del blanco

Ya se ha mencionado que la decisión de si un determinado analito está presente o no en una muestra se basa en la comparación con el valor crítico. Como en cualquier otra situación, este proceso de comparación implica errores experimentales (en la medida del blanco y en la de la muestra analizada). Dichos errores asumimos que son aleatorios y que siguen una distribución normal. Al nivel de concentración cero, la desviación estándar de la concentración (neta) se expresa de forma general como:

$$s_0 = s_B f \quad (6)$$

σ_B es la desviación estándar del blanco y $f = \sqrt{1/m + 1/n}$, donde m y n son el número de replicados sobre la muestra analizada y sobre el blanco, respectivamente. $\phi = 1$ ($\sigma_0 = \sigma_B$) en el caso especial cuando $m=1$ y n es elevado. En un experimento pareado, es decir, cuando la concentración neta se calcula como la concentración en la muestra menos el blanco, entonces $f = \sqrt{2}$. Si no se conoce σ_B , entonces debe reemplazarse por la estimación correspondiente, s_B , en la Eq. (6). Para obtener una estimación fiable del LDD, se sugiere realizar un mínimo de 10 determinaciones sobre el blanco. Deben especificarse claramente las condiciones de precisión (repetibilidad, precisión intermedia) en las que se analiza el blanco.

Alternativas para el cálculo del límite de detección

La recta de calibrado del método analítico utilizada para cuantificar también se puede utilizar para calcular el LDD, siempre que se haya construido en un intervalo de concentraciones restringido y próximo al LDD esperado. En el caso que $\alpha = \beta$ las expresiones para L_C y L_D (asumiendo varianza constante) son equivalentes a (4) y (5), con s_0 :

$$s_0 = \frac{s_{y/x}}{b_1} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{N} + \frac{\bar{x}^2}{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}} \quad (7)$$

donde:

$s_{y/x}$: es la desviación estándar de los residuales de la recta de calibrado

b_1 : es la pendiente de la recta de calibrado

N : es el número de patrones de calibrado

x_i : es cada una de las concentraciones de los patrones de calibrado

\bar{x} : es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado.

En métodos cromatográficos de análisis, en los que el pico correspondiente al analito debe ser distinguido de la línea de base cromatográfica, el LDD puede calcularse midiendo el ruido del cromatograma de diversos (normalmente tres) blancos de muestra que han sido sometidos a todo el proceso analítico.

Finalmente, y de forma general, es recomendable que cuando se reporte el límite de detección de un determinado método de análisis se especifique la aproximación utilizada para su cálculo.

Conclusiones

Cuando un método analítico se utiliza para análisis de trazas o en casos (p.e. análisis alimentario, farmacéutico, antidopaje,...) donde la legislación requiere la ausencia de ciertos analitos, el límite de detección debe estimarse de forma rigurosa, tal como se describe en el documento de la IUPAC (IUPAC 1995). Su cálculo debe contemplar la totalidad del proceso analítico y considerar las probabilidades α y β de tomar decisiones falsas. En este artículo hemos tratado de contribuir a dicho rigor

Referencias bibliográficas

- ISO 11843-1. *Capability of detection. Part 1: Terms and definitions*. ISO, Genève, 1997.
- IUPAC. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods including Detection and Quantification Capabilities, *Pure & Appl. Chem.*, 67 (1995) 1699-1723.
- L.A. Currie, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 37 (1997) 151-181.

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. Una versión en soporte electrónico de este artículo e información suplementaria puede encontrarse en:

<http://www.quimica.urv.es/quimio>