

PROPUESTA DE UNA METODOLOGÍA PARA LA DETERMINACIÓN DEL LIMITE DE DETECCIÓN: CASO DE DETECTOR DE MASAS PARA EL CLOROTALONIL.

Jairo González García*
Carlos Mario Parra Mesa
René Ramiro Romero R.

RESUMEN

La determinación del límite de detección tal como aparece usualmente en la literatura se establece mediante un ejercicio estadístico sencillo cuyo valor rara vez se alcanza en la realidad.

Por esta razón se diseñó un método para establecer un **límite de detección práctico, LDP**, que corresponda a la mínima concentración del analito a la cual la probabilidad de reconocimiento, $S = 2R$, sea de por lo menos 0.90.

Se elaboró un diseño metodológico para obtenerlo, con un mínimo de inversión de tiempo de parte del analista. Se presenta a través de un ejemplo y adicionalmente se muestra su bondad frente a los inalcanzables valores obtenidos por el tradicional uso de la desviación estándar de una serie de mediciones del analito a concentraciones cercanas a cero y luego multiplicar la desviación estándar obtenida por un *t student* para una prueba de una sola cola para $n-1$ grados de libertad ($LDM = S_m (t_{0.99})$).

ABSTRACT

As it usually found in the literature, the Lower Detection Limit for an analytical method is obtained by means of a simple statistical exercise whose value is seldom attained in practice.

For this reason a method was designed for achieving a **Practical Lower Detection Limit** for the lowest concentration of the analite that could be detected, $S = 2 R$, with a probability of, at least, 0.90.

* Centro de Investigaciones Ambientales y de Ingeniería, Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia.

A methodological design was formulated to get a Practical Lower Detection Limit that is not time consuming for the analyst. It is presented using an example and, additionally its benefits are discussed versus the unattainable values that are obtained by the traditional use of the standard deviation of a series of measurements of the analite at concentrations near zero which is then multiplied by the *t student* for a one tailed test for $n-1$ degrees of freedom ($LDL = S_m (t_{0.99})$).

Palabras claves: Límite de detección del método (estimado) - Límite de detección práctico del método - Rango de respuesta lineal - Sensibilidad - Cromatografía de Gases/Detector de Masas, CG/MS

INTRODUCCION

En la determinación de residuos de pesticidas es necesario establecer previamente cuáles son los límites de detección y el rango de respuesta lineal del detector para el plaguicida que se va a analizar. La determinación de estos valores es importante para poder establecer con mayor seguridad el límite de cuantificación del método.

En este artículo se presenta una propuesta metodológica para la determinación del límite de detección del instrumento para el plaguicida Clorotalonil, sin pérdida de generalidad pues el procedimiento es aplicable a cualquier par instrumento-detector y para cualquier plaguicida.

La confiabilidad estadística que respalda el procedimiento bien compensa el mayor trabajo experimental, pero quizás más importante aún, es la necesidad de contar con una estimación confiable del límite de detección del instrumento para el uso que de éste se hace posteriormente en la determinación del rango lineal de respuesta del detector y del límite de detección del método.

Ilustramos detalladamente el proceso seguido para establecer el límite de detección del sistema GC/MS para el Clorotalonil con el ánimo de presentar todos los pasos para aquellas personas que se inician en estas actividades.

Los resultados experimentales nos permiten establecer las concentraciones a las cuales el instrumento permite obtener resultados válidos.

La sensibilidad es usualmente definida como:

$$S = 2R$$

En donde **S** es la altura de la señal y **R** la del ruido. Por consiguiente, la determinación de un límite de detección debe hacerse a concentraciones que superen la sensibilidad del instrumento/detector.

En la Figura 1 se muestra la manera de establecer los valores de **S** y **R** a partir de un cromatograma de una solución de Clorotalonil de 0.005 mg/mL. Para establecer el valor del ruido, se trazan líneas paralelas a la base que

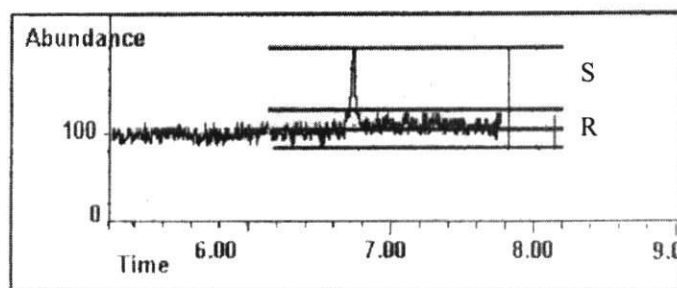


Figura 1 Forma de establecer los valores de señal y ruido a concentraciones cercanas al límite de detección

pasen por las crestas más altas y por los valles más bajos alrededor del pico de interés. A partir de la línea media entre las dos paralelas, se traza la altura del pico. Los valores de S y R se miden usualmente en milímetros.

Más recientemente, se está empleando un término relacionado con la sensibilidad y que se denomina Mínimo de Detectabilidad, definido como la concentración o flujo de masa del componente de una muestra en la fase móvil que da una señal del detector igual al doble del nivel del ruido. Se puede calcular a partir de la sensibilidad medida (S) y el ruido (R):

$$D = 2R/S$$

En donde D es la detectabilidad mínima, expresada bien como la concentración o como la masa de la sustancia de interés en la fase móvil que es registrada por el detector(1). Tanto la sensibilidad como la detectabilidad mínima deben ser determinadas para la misma sustancia.

EL LIMITE PRÁCTICO DE DETECCIÓN

Hay varias formas de establecer el límite de detección del método. Una de ellas hace la determinación siguiendo la metodología propuesta en la publicación de la EPA (2) la cual permite obtener un **límite estimado** de detección que en la práctica casi nunca corresponde con el que se determine para el instrumento y las condiciones de laboratorio a las cuales se trabaja. Por estas razones es necesario en cada caso establecer un valor experimental de ese límite.

Se ha diseñado un método para la determinación de ese valor lo más aproximado posible a un

valor real confiable y estadísticamente respaldado y que al mismo tiempo no exige un esfuerzo grande para el analista.

Se establece como límite práctico o experimental de detección, LPD, la mínima concentración del analito a la cual la probabilidad de reconocimiento, $S=2R$, sea de por lo menos 0.90.

En esta definición se hace un reconocimiento de la incertidumbre en la detección de concentraciones muy bajas y se constituye entonces en el norte de la metodología para el hallazgo del valor experimental del límite de detección.

Es importante señalar que el valor de 0.90 fue escogido por conveniencia, mirando estos dos aspectos: un valor superior a él llevaría a la determinación de un LPD de concentración más alta de lo deseado, mientras que uno menor, implicaría seleccionar una concentración donde la incertidumbre en el reconocimiento de la señal se incrementaría, restándole entonces valor práctico.

METODOLOGÍA

Para cada concentración ensayada se procede a efectuar el siguiente contraste de hipótesis:

$$H_0 : P = 0.90 \text{ vs } H_a : P < 0.90$$

Con **P** como la probabilidad de obtener una señal para una concentración del analito que sea igual o mayor que dos veces la del ruido. La decisión de aceptar **H₀: P= 0.90** significa que la concentración ensayada es una candidata a ser el valor de mínima lectura buscada, pero hay que

Tabla 1. Plan de Decision

Etapa	No. de Ensayos, n_i	No. de Ensayos acumulados, N_i	No. de aceptación, A_i	No. de rechazo, R_i
1	4	4	0	3
2	3	7	2	4
3	2	9	3	5
4	1	10	4	5

explorar la posibilidad de que exista una concentración menor a ella. Se prepara entonces una solución de concentración menor con la cual se procede a realizar un contraste igual al planteado arriba.

En caso de que se rechace H_0 en favor de H_a : $P < 0.90$, significa que la concentración de mínima lectura es superior a la probada y por consiguiente se adopta como el límite inferior experimental de detección, la concentración mínima a la cual la hipótesis nula (H_0), no fue rechazada.

El contraste de hipótesis para cada concentración se realiza mediante el siguiente plan de decisión:

Donde,

n_i , número de inyecciones en la etapa i a la concentración seleccionada.

N_i , número acumulado de inyecciones en la etapa i

A_i , señala el número de lecturas acumuladas que dan un área por debajo de la sensibilidad escogida para aceptar la hipótesis nula en la etapa i .

R_i , señala el número de lecturas acumuladas que dan un área por debajo de la sen-

sibilidad escogida para rechazar la hipótesis nula en la etapa i .

Explicación del Plan de Decisión.

El esquema presentado del plan es conocido en control de calidad (3) con el nombre de "Muestreo múltiple para la aceptación". Se observa en el plan que pueden requerirse hasta cuatro etapas para decidir sobre la aceptación de la hipótesis nula, H_0 : $P = 0.90$.

En la primera etapa se hacen cuatro inyecciones iguales del analito a una misma concentración. Si ninguna de ellas presenta una señal por debajo del límite de sensibilidad, se procede a aceptar la hipótesis nula; si de las cuatro, al menos tres presentaron señales por debajo de ese límite, entonces, se rechaza la hipótesis nula. Pero si una o dos mostraron ese resultado, se debe pasar a una segunda etapa en la cual se hacen tres inyecciones idénticas, lo que da un acumulado de siete (ver cuadro del Plan).

En la segunda etapa, se procede así: si el acumulado de señales por debajo del límite es a lo sumo dos, se acepta la hipótesis nula. Si el acumulado es de por lo menos cuatro, se la rechaza; pero si es de tres, se procede a dos inyeccio-

Tabla 2. Relación s/r por concentración.

CONCENTRACION $\mu\text{G/ML}$	0.060	0.030	0.015	0.010	0.005	0.0025
ENSAYO No.	RELACION S/R					
1	E +	E +	E +	5.5	2.4	E -
2	E +	E +	E +	5.2	2.0	E -
3	E +	E +	E +	4.9	2.0	E -
4	E +	E +	E +	5.2	2.0	E -

nes adicionales en una tercera etapa, lo cual daría un acumulado de nueve y se procede de manera similar. Si en esta etapa hay indecisión (cuando el acumulado es de cuatro señales por

debajo del límite), se hace una inyección adicional en una cuarta etapa en la que ya se presentará una decisión sobre la hipótesis nula.

Características Estadísticas del Plan

Bajo los supuestos de que la hipótesis nula es verdad, que la probabilidad P de una señal por encima del límite de sensibilidad es constante en cada inyección y de que hay independencia entre los resultados de éstas, se encuentra que el nivel de significación, α , del contraste de hipótesis planteado es de 0.0059.

Este nivel de significación implica que la prueba está diseñada para favorecer la aceptación de $H_0: P=0.90$, desde la primera etapa. Esto tiene la ventaja derivada de la aceptación de tal hipótesis de poder proceder a evaluar los resultados utilizando una concentración menor del analito.

Desde luego que ha de encontrarse una concentración donde la hipótesis nula se rechace en favor de $H_a: P < 0.90$ y será un rechazo altamente significativo, por lo que es casi totalmente seguro que el límite de detección está por encima de la última concentración probada.

Puesto que el propósito es hallar un límite de detección próximo a su valor real, se considera entonces como una estimación adecuada la menor concentración donde la hipótesis nula no fue rechazada.

Por otra parte, si α es tan pequeño, la probabilidad, β , de aceptar H_0 siendo falsa, se torna importante. Esto significa, en caso de cometer tal error, que equivocadamente se procede a hacer

inyecciones del analito con una concentración menor con la que es muy poco probable que se cometa un error similar. De esta forma se tomaría como límite de detección un valor por debajo del real, pero al igual que se dijo antes, el propósito es encontrar una estimación experimental próxima al valor real del límite de detección que corresponda a unos criterios estadísticos aceptables y que representen ahorro de tiempo y esfuerzos al analista.

Aplicación del plan a un caso práctico

Este plan se ha venido empleando en los análisis de residuos de plaguicidas en los laboratorios del Centro de Investigaciones Ambientales de la Universidad de Antioquia. Ilustramos su aplicación al caso del Clorotalonil.

$E^+ =$ Evidencia positiva ($S/R \gg 5.0$)

$E^- =$ Evidencia negativa ($S/R \ll 2.0$).

La Figura 2 corresponde a un cromatograma de una solución de Clorotalonil de 0.005 mg/mL en el cual el pico correspondiente al pesticida se señala con una flecha. Los picos de "artefactos" a la derecha no se consideraron como ruido y por consiguiente no se incluyeron en el establecimiento de los valores de S y R .

De acuerdo a la metodología planteada arriba, empleando un Cromatógrafo Hewlett-Pakcard GCD Series con detector de masas

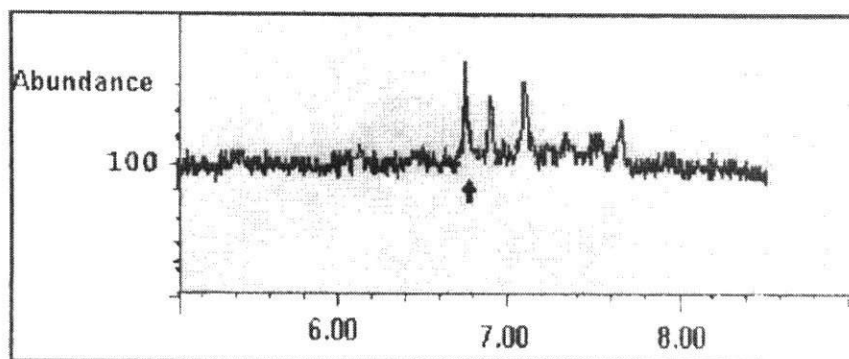


Figura 2 Cromatograma en el límite de detección. El pico del analito se señala con una flecha

en el método SIM (Selected Ion Mass) con muestreador automático, se estableció entonces como **límite práctico de detección para el Clorotalonil la concentración de 0.005 mg/ml.**

Un mayor refinamiento del método podría darse si a partir de la concentración de 0.005 mg/mL, se probara otra intermedia entre ella y la rechazada, es decir, menor que 0.005, pero mayor de 0.0025 mg/ml. Este mayor refinamiento podría justificarse cuando se esté trabajando con ultra trazas difíciles de concentrar a valores mayores. En nuestro caso a la menor concentración ensayada, se empezaron a observar picos extraños, "artefactos", que podrían atribuirse a varias causas tales como sangrado de la columna HP-5 a descomposición del Clorotalonil a las condiciones cromatográficas empleadas o a la aparición de impurezas, entre otras razones.

CONCLUSIONES:

Se ha diseñado un plan que permite, sin mayor esfuerzo y de manera confiable, establecer los límites inferiores de detección del instrumento para el análisis de residuos de plaguicidas.

Se justifica el mayor esfuerzo que implica la determinación de un límite real de detección del instrumento, por cuando nos da una base cierta para establecer el límite de cuantificación del mismo y el valor más bajo de las concentraciones del rango lineal de respuesta del detector. Es decir, que para establecer el límite de detección del método, debemos partir de las concentraciones halladas para el límite de detección del instrumento evitando así la utilización de concentraciones que no serían detectables por el par instrumento-detector.

BIBLIOGRAFIA

- EPA, "Calculations of Precision Bias and Detection Limit for Chemical and Physical Measurements", 1984
- ETTRE, L.S. "Nomenclature for Chromatography (IUPAC recommendations 1993), ChromBook, Merck, 2nd Edition, 1997.
- MONTGOMERY, C.D. "Introducción al Control Estadístico de la Calidad", Grupo Editorial Iberoamericano, 1991.