

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL



FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICAS Y AMBIENTALES

**PROYECTO DE TITULACIÓN**

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE:

**“MAGÍSTER EN GESTIÓN INTEGRAL DE LABORATORIOS DE QUÍMICA”**

**TEMA:**

< VALIDACIÓN DEL MÉTODO N 4500-NO<sub>2</sub>-B PARA LA DETERMINACIÓN DE  
NITRITOS EN LAS MATRICES AGUA NATURAL Y RESIDUAL >

**AUTOR:**

DANIELA LILIANA GUTIÉRREZ SARMIENTO

Guayaquil - Ecuador

2024

## Resumen

El ion nitrito es una sustancia inorgánica que puede estar presente de forma natural o por contaminación en el agua. Es potencialmente peligroso para la salud, afectando fundamentalmente a los lactantes. El objetivo de este trabajo es realizar la validación del método colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B para la determinación de nitritos en las matrices agua natural y residual. Este proyecto forma parte del cumplimiento de uno de los requisitos establecidos en la NTE ISO/IEC: 17025-2018 para que el laboratorio de Saneamiento de ETAPA EP pueda obtener un alcance a su acreditación en este parámetro. Para el desarrollo de esta validación, se tomó como referencia los procedimientos analíticos del laboratorio de Saneamiento de ETAPA EP, los Métodos Estándar edición 24 para el análisis de aguas y la Guía EURACHEM para la validación y determinación de la incertidumbre en métodos analíticos. Se evaluaron ocho parámetros de desempeño, cuyos resultados fueron, Selectividad / Especificidad, el método es selectivo y específico para la determinación de Nitritos, LD= 0,04 mg/l, LC= 0,05 mg/l,  $r^2= 0,999$ , exactitud= 98-102%, Precisión: Repetibilidad=  $CV_r$  o  $RSD \leq 2\%$  en todos los niveles; Reproducibilidad=  $CV_R$  o  $RSD$  nivel bajo 0,05 mg/l  $\leq 12,5\%$  y demas niveles  $\leq 2\%$ ; incertidumbre=  $\leq 10\%$  en todos los niveles. Los valores obtenidos cumplieron con los objetivos establecidos, por lo que se puede concluir que el método es confiable y preciso para la determinación de nitritos en la matriz agua natural y agua residual.

Palabras claves: Validación, Nitritos, matriz agua natural y residual, parámetros de desempeño.

## ABSTRACT

The nitrite ion is an inorganic substance that can be present naturally or due to contamination in water. It is potentially dangerous for health, mainly affecting infants. The objective of this work is to validate the colorimetric method N 4500-NO<sub>2</sub>-B for the determination of nitrites in natural water and wastewater matrices. This project is part of the fulfillment of one of the requirements established in the NTE ISO/IEC: 17025-2018 so that the ETAPA EP Sanitation laboratory can obtain a scope for its accreditation in this parameter. For the development of this verification, the analytical procedures of the ETAPA EP Sanitation laboratory, the Standard Methods 24<sup>th</sup> Edition for water analysis and the EURACHEM Guide for the validation and determination of uncertainty in analytical methods were taken as reference. Eight performance parameters were evaluated, the results of which were Selectivity/Specificity, the method is selective and specific for the determination of Nitrites, LD= 0.038 mg/l, LC= 0.042 mg/l,  $r^2= 0.999$ , accuracy= 98-102 %, Precision: Repeatability=  $CV_r$  or  $RSD \leq 2\%$  at all levels; Reproducibility =  $CV_R$  or  $RSD$  low level  $0.05 \text{ mg/l} \leq 12.5\%$  and other levels  $\leq 2\%$ ; uncertainty=  $\leq 10\%$  at all levels. The values obtained met the established objectives, so it can be concluded that the method is reliable and accurate for the determination of nitrites in the natural water and wastewater matrix.

**Keywords:** Validation, Nitrites, natural water matrix, wastewater matrix, performance parameters.

## DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía

A Santiago, mi esposo, mi compañero de vida, por su apoyo, paciencia y comprensión en este reto académico. Este logro es nuestro, somos el mejor equipo.

A mis hijos Santiago José y Sara Galilea que son mi todo, un regalo de Dios. Con su paciencia y con esa chispa de energía me inspiran a cumplir este sueño.

A mis amados padres Ricardo y Marcia por su apoyo incondicional, por ser parte fundamental en este caminar.

A mi tía querida Emmalucía mi inspiración de amor y sabiduría, sé que desde el cielo me acompaña en todo momento.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por todas sus bendiciones.

A la Dra. Carmen Montiel por su profesionalismo, experiencia y sabiduría para poder concluir exitosamente con este proyecto.

A la empresa ETAPA EP, a mis compañeros de trabajo María José, Mayte, Wilmer y Andrés por su apoyo en la realización de este trabajo.

## **DECLARACIÓN EXPRESA**

La responsabilidad por los hechos y doctrinas expuestas en este Proyecto de Titulación me corresponde exclusivamente y ha sido desarrollado respetando derechos intelectuales de terceros conforme las citas que constan en el documento, cuyas fuentes se incorporan en las referencias o bibliografías. Consecuentemente este trabajo es de mi total autoría. El patrimonio intelectual del mismo corresponde exclusivamente a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance del Trabajo de Titulación referido.

---

BQF. Daniela Liliana Gutiérrez Sarmiento

## **TRIBUNAL DE GRADUACIÓN**

---

Ph.D. Joel Vielma Puente  
**PRESIDENTE**

---

MBA. Carmen Montiel Izquierdo  
**TUTOR**

---

Ph.D. César Araque Molina  
**DOCENTE EVALUADOR**

## ABREVIATURAS O SIGLAS

ANOVA	Análisis de simple varianza
PTAR	Planta de Tratamiento de Agua Residual
CV	Coefficiente de Variación
S	Desviación estándar
Sr	Desviación estándar por repetibilidad
SR	Desviación estándar por reproducibilidad
U	Incertidumbre
U	Incertidumbre expandida
K	Factor de cobertura
ISO/IEC 17025: 2018	Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración
ETAPA EP	Empresa Pública Municipal de Telecomunicaciones, Agua Potable, Saneamiento y Gestión Ambiental del cantón Cuenca.
LD	Límite de Detección
LC	Límite de Cuantificación
DCM	Diferencias cuadráticas medias
UV/VIS	Ultravioleta/visible
R	Coefficiente de correlación
r <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
M	Pendiente
B	Intercepto
Sm	Desviación estándar de la pendiente
Sb	Desviación estándar del intercepto
Sres	Desviación estándar de residuales
F	Valor del estadístico F
g.l.	Grados de libertad
MRC	Material de referencia certificado

## TABLA DE CONTENIDO

### Contenido

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Descripción del problema.....	2
1.3 Objetivos .....	3
1.3.1 Objetivo General.....	3
1.3.2 Objetivos Específicos .....	3
1.4 Hipótesis .....	3
1.5 Alcance .....	3
CAPÍTULO 2.....	4
2. MARCO TEÓRICO .....	4
2.1 Nitritos.....	4
2.2 Métodos para la determinación de nitritos .....	5
2.3 Validación del método analítico .....	5
2.3.1 Objetivos de validación.....	5
2.3.2 Proceso de validación .....	5
2.3.3 Parámetros de desempeño .....	6
2.3.4 Elección del parámetro de validación para la determinación de nitritos 10	
2.3.5 Matrices de análisis .....	10
2.3.6 Normativas y Directrices .....	10
CAPÍTULO 3.....	11
3. METODOLOGÍA .....	11
3.1 Tipo de Investigación .....	11
3.2 Diseño de la Investigación .....	11
3.3 Diseño experimental .....	11
3.3.1 Recolección de Datos.....	11
3.3.2 Métodos y Técnicas.....	11
3.4 Método Colorimétrico N 4500-NO <sub>2</sub> -B .....	12
3.4.1 Determinación de parámetros de evaluación .....	13

3.4.2	Equipos y Materiales .....	15
3.4.3	Preparación de Reactivos: .....	16
3.4.4	Preparación de la Curva de Calibración .....	16
3.4.5	Procesamiento de las muestras .....	16
3.4.6	Almacenamiento y preservación de las muestras .....	17
3.4.7	Interferencias.....	17
3.6	Análisis Estadístico .....	17
3.6.1	Incertidumbre.....	18
	CAPÍTULO 4.....	20
4.	RESULTADOS.....	20
4.1	Diseño de un procedimiento específico de ensayo .....	20
4.2	Evaluación de los criterios de calidad .....	20
4.3	Resultados obtenidos y emisión de la declaración de validación del método. 30	
4.4	Declaración de validación del método.....	31
	CAPÍTULO 5.....	32
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	32
6.	REFERENCIAS .....	33
	ANEXOS Y APÉNDICES.....	36
	Anexo 1. Procedimiento Específico de Ensayo Nitritos.....	36
	Anexo 2. Cálculo de Selectividad/ Especificidad.....	42
	Anexo 3. Cálculo de Linealidad/ Función Respuesta .....	43
	Anexo 4. Cálculo del Efecto Matriz .....	45
	Anexo 5. Cálculo de Veracidad.....	46
	Anexo 6. Cálculo de Precisión / ANOVA.....	48
	Anexo 8. Cálculo de la Incertidumbre .....	53
	Anexo 9. Declaración del Método Validado .....	59
	Anexo 10. Fotografías.....	60
	Apéndice A. Certificado del Estándar primario de Nitritos.....	62
	Apéndice B. Certificado de los Materiales de Referencia empleados .....	67

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de formación del nitrito .....	4
Figura 2. Diagrama de Flujo del proceso de validación de Nitritos en matriz de agua natural y residual Fuente: Autor .....	12
Figura 3. Diagrama Causa - Efecto para determinación de la Incertidumbre del método .....	18
Figura 4. Análisis del Efecto Matriz .....	23

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 1. Análisis simple de la varianza ANOVA .....	8
Tabla 2. Curva de calibración.....	16
Tabla 3. Herramientas estadísticas para el cálculo de los parámetros de desempeño .....	17
Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de cada factor que intervienen la incertidumbre .....	19
Tabla 5. Determinación de Selectividad / Especificidad .....	21
Tabla 6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación.....	21
Tabla 7. Absorbancias de las curvas de calibración .....	22
Tabla 8. Estimación lineal de las curvas de calibración .....	22
Tabla 9. Límites de los parámetros de la curva de calibración.....	23
Tabla 10. Prueba t de las curvas para la determinación del efecto matriz .....	24
Tabla 11. Evaluación de la veracidad del método de estudio .....	24
Tabla 12. Análisis de la Varianza del Nivel Bajo 0,05 mg/l .....	25
Tabla 13. Análisis de la Varianza del Nivel Intermedio 0,2 mg/l.....	25
Tabla 14. Análisis de la Varianza del Nivel Alto 0,6 mg/l .....	25

Tabla 15. Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de la varianza en los niveles bajo, intermedio y alto de la matriz de agua natural.....	25
Tabla 16. Análisis de la Varianza del Nivel Bajo 1mg/l .....	26
Tabla 17. Análisis de la Varianza del Nivel Intermedio 2 mg/l.....	26
Tabla 18. Análisis de la Varianza del Nivel Alto 4 mg/l .....	26
Tabla 19. Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de la varianza en los niveles bajo, intermedio y alto de la matriz de agua residual .....	26
Tabla 20. Análisis de muestras en condiciones normales.....	27
Tabla 21. Análisis de las muestras aplicando las variables .....	27
Tabla 22. Cálculo de la Incertidumbre en Nivel Bajo 0,05 mg/l de matriz de agua natural.....	28
Tabla 23. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Intermedio 0,2 mg/l de matriz de agua natural .....	28
Tabla 24. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Alto 0,4 mg/l de matriz de agua natural.....	28
Tabla 25. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Bajo 1 mg/l de matriz de agua residual .....	29
Tabla 26. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Intermedio 2 mg/l de matriz de agua residual .....	29
Tabla 27. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Alto 4 mg/l de matriz de agua residual .....	30
Tabla 28. Resultados obtenidos de la validación del método N 4500 NO <sub>2</sub> -B .....	30

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Antecedentes

El ion nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) es un compuesto inorgánico formado molecularmente por nitrógeno y oxígeno. Forma parte del ciclo del nitrógeno ya que por acción bacteriana en la naturaleza se convierte en nitrato. El nitrito es comúnmente utilizado en la industria como conservante alimentario en el curado de carnes, para la fabricación de explosivos y también usado como inhibidor de la corrosión en sistemas de suministro de agua [1]. Los nitritos son consecuencia de un estado de oxidación intermedia en la reducción del nitrato existente o de la oxidación incompleta del amoníaco, esta reducción u oxidación puede suceder en plantas de tratamiento de agua residual, en aguas naturales o en sistemas de distribución de agua.[2]

La ingesta de nitritos puede producir consecuencias para la salud humana, en específico la presencia de este compuesto en el agua potable puede provocar metahemoglobinemia (concentraciones mayores o iguales a 3 mg/l). Esta enfermedad se manifiesta con mayor frecuencia en bebés de hasta 6 meses de edad, provocando disminución de la capacidad de transporte de oxígeno de los glóbulos rojos. Esto desencadena la disminución del suministro de oxígeno a los órganos y tejidos en todo el cuerpo, causando daños significativos e incluso la muerte[3].

Para su análisis se han empleado métodos muy diversos, como colorimétricos basados en la reacción redox del yoduro [4]. No obstante, en la actualidad los métodos basados en espectrofotometría son los más frecuentes. La espectrofotometría permite determinar los nitritos mediante la formación de productos coloreados ante la adición de diversos reactivos, o mediante el uso de luz UV visible [5]. Para la determinación de pequeñas concentraciones se ha empleado un mecanismo de diazotización que permite detectar un límite bajo de hasta 0,053  $\mu\text{g/l}$  [6]. Con respecto al agua residual, la normativa nacional no establece un límite máximo para su descarga, sin embargo, este parámetro es importante para el diseño de plantas de tratamiento y una vez depuradas, para verificar que el cuerpo receptor no altere su calidad de acuerdo con el uso establecido [7].

La validación del parámetro nitritos en matriz agua natural y residual es importante para asegurar la precisión y la exactitud de los resultados de las mediciones. Cuando se implementa un nuevo método en un laboratorio acreditado ante el ente certificador, éste debe ser soportado con suficientes datos de laboratorio a través de varios ensayos obteniendo así una validación bien documentada [8].

## 1.2 Descripción del problema

El nitrito es un ion de origen natural que forma parte del ciclo del nitrógeno, nutriente vital tanto para plantas y animales. Los nitritos pueden encontrarse en la naturaleza en forma de sales de ácido nítrico y en procesos de oxidación de la materia orgánica [9]. En el agua, el nitrito puede estar presente en forma natural como consecuencia de la oxidación del amoníaco, resultado de la reducción del ion nitrato o por descomposición natural microbiana de materiales nitrogenados, tales como las proteínas presentes en plantas y animales. Otras fuentes no naturales del ion nitrito son las originadas por el uso de fertilizantes nitrogenados y desechos municipales e industriales [10].

Los nitritos son poco estables, se oxidan o reducen fácilmente, presentándose así en bajas concentraciones en los cuerpos de agua. El principal mecanismo de toxicidad de los nitritos es la oxidación del ion ferroso a ion férrico, lo que puede producir metahemoglobinemia y por ende efectos cardiovasculares y respiratorios [3]. En el caso de las aguas residuales, la presencia de nitritos puede indicar contaminación por materia orgánica e inorgánica, lo que representa un riesgo para la salud pública y el medio ambiente. La detección y posterior eliminación de los nitritos de las aguas residuales es importante para prevenir la contaminación de los cuerpos de agua cercanos y evitar los riesgos para la salud pública [11]. Uno de los métodos de análisis de nitrito en agua es el método colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B propuesto en los Métodos Estándar de análisis en su edición 24 [2]. Esta técnica es comúnmente utilizada en diferentes laboratorios dentro del país [12].

Es esencial conocer la concentración de nitritos en programas de control de la contaminación de cuerpos de agua. La Empresa Pública Municipal de Telecomunicaciones, Agua Potable y Saneamiento de Cuenca – ETAPA EP, brinda el servicio de análisis de este parámetro a través de su Laboratorio de Saneamiento. Éste garantiza su competencia técnica mediante el mantenimiento y mejora de su sistema de calidad, en conformidad con la norma NTE INEN-ISO/IEC:17025:2018. Sin embargo, se ha observado que ciertos parámetros de análisis, incluyendo el de nitritos, están fuera del alcance de acreditación actual. Por ende, esta investigación tiene como objeto ampliar la acreditación mediante la validación del parámetro nitritos para matrices de agua natural y residual. Esto se realiza con el propósito de asegurar resultados consistentes en términos de precisión y exactitud, lo cual permitirá considerar opciones apropiadas tanto para la conservación de las fuentes de agua natural como para el control de la contaminación existente.

En este contexto, es necesario determinar ¿cuál es la metodología por conseguir para la validación e implementación de un método analítico que permita determinar el contenido de nitritos en aguas residuales y naturales en el cantón Cuenca para los siguientes años?

### **1.3 Objetivos**

#### **1.3.1 Objetivo General**

Validar el método de análisis de nitritos N 4500-NO<sub>2</sub>-B según los requisitos de desempeño establecidos en los “Métodos Estándar” para evaluación de la concentración de nitritos en matrices de agua natural y residual

#### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Diseñar un procedimiento específico de ensayo.
- Ejecutar los ensayos para evaluar el desempeño del método: selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, veracidad, robustez, precisión e incertidumbre.
- Evaluar los resultados obtenidos y emisión de la declaración de validación del método.

### **1.4 Hipótesis**

Se espera que la validación del parámetro de Nitritos en matrices de agua natural y residual mediante el método colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B en un laboratorio de análisis químico exhiba resultados con un nivel de confianza del 95%, cumpliendo así con los parámetros de desempeño establecidos para la validación.

### **1.5 Alcance**

La validación del parámetro de Nitritos en matrices de agua Natural y Residual se llevará a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Saneamiento de la empresa ETAPA EP ubicado en la ciudad de Cuenca. Este proceso se extenderá por un período de 4 meses, con el objetivo de ampliar el conjunto de parámetros acreditados en dicho laboratorio. A través de esta investigación, se busca verificar que el método colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B cumpla con los rigurosos parámetros de desempeño analítico, garantizando así la confiabilidad de los resultados obtenidos.

# CAPÍTULO 2

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Nitritos

Los nitritos son compuestos químicos inorgánicos, en su estructura química contienen un átomo de Nitrógeno (N) unido a dos átomos de oxígeno (O), la disposición geométrica de los átomos es lineal y el ion lleva una carga negativa.

Los nitritos forman parte del ciclo del nitrógeno, mediante el proceso de nitrificación y por acción de las bacterias nitrificantes como son las amonificantes y las nitrosantes, convierten el amoniaco ( $NH_3$ ) en nitritos ( $NO_2^-$ ) y luego en nitratos ( $NO_3^-$ ) [13], como se esquematiza en la Figura 1.

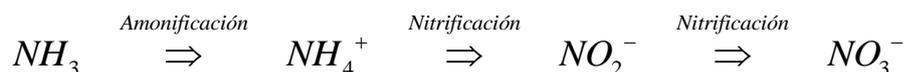


Figura 1. Ciclo de formación del nitrito

Por su solubilidad, los nitritos pueden fácilmente llegar a las fuentes de agua por vertimientos de uso agrícola, industriales urbanas o por procesos de escorrentía. Los nitritos pueden encontrarse en los efluentes de las plantas de tratamiento de agua residual que han sufrido tratamiento biológico. La concentración de nitritos en el agua almacenada a temperaturas superiores a los 40°C puede aumentar debido a una acción bacteriana. [14]

La presencia de nitritos en el agua da indicios para ser considerada sospechosa de contaminación fecal, para interpretar de una manera correcta se debe contemplar otros parámetros como la concentración de nitratos, amoniaco, nitrógeno orgánico y el análisis bacteriológico.

Desde el punto de vista toxicológico, el consumo de alimentos o agua con un alto contenido de nitritos puede producir la enfermedad llamada metahemoglobinemia o síndrome del bebé azul[15]. Esta afecta a lactantes menores de 6 meses, esta intoxicación es debido a que el estómago del lactante contiene poca acidez gástrica permitiendo de este modo el desarrollo de gérmenes reductores, los nitritos así formados pasan a la circulación general y son responsables de la disminución de la capacidad de absorción de oxígeno por parte de la sangre hasta provocar asfixia interna [16].

## 2.2 Métodos para la determinación de nitritos

La determinación de Nitritos en agua se puede realizar mediante diversas técnicas analíticas, como métodos colorimétricos, espectrofotometría, cromatografía iónica y métodos electroquímicos. La elección del método dependerá de algunos factores como la sensibilidad requerida, precisión, complejidad de la muestra y los recursos disponibles. Actualmente, los laboratorios utilizan métodos rápidos, precisos y económicos, siendo uno de ellos el método colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B de los Métodos Estándar de la Asociación Americana de Obras Hidráulicas (AWWA, por sus siglas en inglés) para el examen de agua natural y agua residual, el cual será usado en este estudio de validación [17].

## 2.3 Validación del método analítico

La validación es un proceso sistemático fundamental que garantiza la idoneidad de un método analítico para su uso previsto, asegurando así la confiabilidad de los resultados obtenidos. Este proceso, esencial tanto en la investigación como en la industria, juega un papel crucial al asegurar la confiabilidad y precisión de los resultados analíticos, fundamentales para la toma de decisiones [18].

### 2.3.1 Objetivos de validación

Los objetivos de validación son establecidos durante la fase de planificación inicial y deben estar estrechamente vinculados a diversos aspectos, incluyendo requisitos del usuario, regulaciones, legislación y las demandas del mercado. Así mismo, deben alinearse con los valores preestablecidos por el método analítico y ajustarse según el tipo de método o la concentración del analito objeto de validación.

### 2.3.2 Proceso de validación

El proceso de validación sigue una serie de pasos estructurados de acuerdo con la guía EURACHEM [8]:

- Necesidad de determinar el analito: Inicialmente definido por el jefe de laboratorio, se establece la necesidad específica de determinar el analito en cuestión.-
- Elección del Método: Se realiza una revisión exhaustiva de los métodos disponibles para seleccionar el más apropiado.
- Análisis previo al procedimiento: Considerando las concentraciones deseadas en el laboratorio, se elige el rango de trabajo adecuado.
- Puesta a Punto del Método: Afinar detalles para la validación implica ajustar la curva de calibración, realizar ajustes a las variables del método, verificar la calibración de equipos e instrumentos, utilizar material de referencia certificado (MRC) para validar la ejecución correcta del método, y corregir procesos erróneos, errores en el uso de instrumentos, lecturas y preparaciones de reactivos.
- Parámetros de Validación: Se determinan los parámetros críticos necesarios para una validación efectiva del método.

- Diseño Experimental: Se planifican los ensayos necesarios y se establece un análisis estadístico para obtener los parámetros de validación.
- Ejecución de Ensayos Diseñados: Relacionado directamente con el diseño experimental, esta etapa implica la realización de los ensayos previamente planificados.
- Análisis de Datos: Se lleva a cabo un análisis estadístico de los datos obtenidos durante la ejecución de los ensayos.
- Declaración del Método Validado: Tras completar el proceso de validación, se emite una declaración formal confirmando que el método ha sido validado con éxito.
- Registro de Datos: Se guarda de manera diligente toda la información y registros pertinentes para respaldar la validación del método.

### 2.3.3 Parámetros de desempeño

Los parámetros de desempeño necesarios para garantizar el correcto funcionamiento del método han sido tomados de la metodología de la Guía EURACHEM [8].

#### 2.3.3.1 Especificidad/ Selectividad

La selectividad permite determinar un analito específico en presencia de otros componentes que se encuentren en la muestra, bajo condiciones establecidas. La especificidad garantiza que el método sea capaz de identificar el analito de interés de manera selectiva y sin interferencias de otros componentes.

#### 2.3.3.2 Límite de Detección (LD)

El límite de detección hace referencia al nivel más bajo de concentración de analito que puede ser detectado a partir de una muestra sin el analito presente o que contiene bajas concentraciones de este; pero no necesariamente cuantificado por el método analítico. También, se define como la concentración del analito correspondiente a la media del blanco de muestra, más 3 veces la desviación estándar de la media del blanco.

$$LD = XB + 3SD$$

- XB: Valor promedio de las señales del blanco.
- SD: Desviación estándar de las lecturas.

#### 2.3.3.3 Límite de Cuantificación (LC)

Indica la concentración más baja de analito que puede ser cuantificada con precisión y exactitud por el método analítico. También, se define como la concentración del analito que corresponde a la media del blanco de muestra más 10 veces la desviación estándar de la media del blanco.

$$LC = XB + 10SD$$

- XB: Valor promedio de las señales del blanco,
- SD: Desviación estándar de las lecturas.

#### 2.3.3.4 *Linealidad/ Función Respuesta*

Es la relación matemática entre la concentración del analito y la respuesta del método, en un rango determinado. Para su determinación se prepara una curva de calibración con estándares del analito de concentración conocida y se realiza una regresión lineal de los datos obtenidos. Luego se aplica la fórmula de la ecuación de la recta para determinar el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), si este valor se acerca más a uno, la curva de calibración realizada tendrá mejor linealidad.

Ecuación de la recta:

$$y = mx + b$$

- y: señal medida
- m: pendiente
- b: señal del instrumento para el blanco.
- $R^2$ : Coeficiente de determinación.

#### 2.3.3.5 *Intervalo de Trabajo*

Es el intervalo de concentraciones que el método puede medir de manera precisa y confiable.

#### 2.3.3.6 *Exactitud*

Es una expresión de proximidad de los resultados obtenidos por el método y el valor de referencia aceptado para la misma. Para su determinación se recomienda realizar mínimo tres ensayos en días diferentes, con tres repeticiones cada día, de esta manera se obtiene la media de la concentración y se calcula el porcentaje de recuperación.

$$\% \text{Recuperación} = \frac{\text{valor obtenido}}{\text{valor real}} \times 100$$

#### 2.3.3.7 *Precisión*

En la precisión se evalúa la Repetibilidad y la Reproducibilidad. Se expresa como la desviación estándar de una serie de mediciones.

##### 2.3.3.7.1 *Repetibilidad ( $S_r$ )*

Cuando el método se desarrolla bajo las mismas condiciones, por un mismo analista usando la misma muestra, el mismo método, en el mismo equipo, en el mismo laboratorio y en un periodo corto de tiempo. Puede calcularse como la precisión dentro del grupo.

$$S_r = \sqrt{DCM_W}$$

- $DCM_W$  = Diferencias cuadráticas medidas dentro del grupo (Whithin).

### 2.3.3.7.2 Reproducibilidad (SR)

Es una medida de la variabilidad de los resultados cuando se usa el mismo método, las mismas muestras, pero en diferentes laboratorios, con diferentes analistas o en diferentes días [19]

$$S_R = \sqrt{S_R^2 + S_L^2}$$

$$S_L^2 = \frac{DCM_B - DCM_W}{p}$$

- $DCM_B$  = Diferencias cuadráticas medidas entre grupos (Between)
- $p$  = Número de lecturas que se realizan cada día para cada nivel (ANOVA)

Las diferencias cuadráticas medias (DCM) se calculan por el ANOVA, utilizando las formulaciones descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Análisis simple de la varianza ANOVA

Origen de la varianza	Grados de libertad	Suma de cuadráticas (SDC)	Diferencias Cuadráticas Medias
Entre grupos (Between)	$k - 1$	$SDC_B = \sum_{i=1}^k p (\bar{x}_i - \bar{x})^2$	$DCM_B = \frac{SDC_B}{k - 1}$
Dentro del grupo (Within)	$n - k$	$SDC_W = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^p (\bar{x}_{ij} - \bar{x}_i)^2$	$DCM_W = \frac{SDC_W}{n - k}$
Total	$n - 1$	$SDC_T = SDC_B + SDC_W$	$DCM_T = \frac{SDC_T}{n - 1}$

### 2.3.3.8 Robustez

La robustez es la capacidad que posee un método analítico para permanecer inalterado por pequeñas variaciones en el procedimiento, lo que permite identificar las etapas que pueden afectar al resultado final. La determinación de la robustez se puede realizar mediante pruebas estadísticas para establecer si las variaciones que se producen son estadísticamente significativas. Se considera que un método es robusto cuando se demuestra que no varía durante el uso normal.

### 2.3.3.9 Incertidumbre

La Incertidumbre es una evaluación cuantitativa que indica cuán lejos podría estar el valor verdadero de la magnitud de medida. Para dicha evaluación se consideran diferentes fuentes de error y variabilidad en el proceso analítico.

#### 2.3.3.9.1 Fuentes de Incertidumbre

La identificación y cuantificación de las fuentes de incertidumbre es esencial para realizar una evaluación precisa de la incertidumbre asociada a una medición. Entre las diversas fuentes en las que puede originarse incertidumbre están la precisión y resolución de los instrumentos de medición utilizados, calibración de equipos, condiciones ambientales, mano de obra, variabilidad en la preparación de las muestras.

#### 2.3.3.9.2 Incertidumbre de Tipo A

Esta incertidumbre se evalúa por métodos estadísticos de la desviación de repetibilidad y reproducibilidad. En algunos casos se pueden utilizar otros métodos estadísticos, como el método de mínimos cuadrados o el análisis de la varianza [19].

#### 2.3.3.9.3 Incertidumbre de Tipo B

Esta incertidumbre se cuantifica por información externa proveniente de calibraciones, especificaciones del fabricante, o estimaciones basadas en la experiencia. La incertidumbre tipo B se puede encontrar en distribución normal, rectangular y triangular y antes de combinarse se debe normalizar a incertidumbre estándar[19].

#### 2.3.3.9.4 Incertidumbre Combinada ( $\mu_c$ )

Es la sumatoria de la raíz cuadrada de la incertidumbre tipo A y tipo B, esto puede realizarse por métodos estadísticos como la ley de la propagación de la incertidumbre[19].

$$\mu_c = \sqrt{\mu_a^2 + \mu_b^2}$$

#### 2.3.3.9.5 Incertidumbre Expandida (U)

Se obtiene multiplicando la incertidumbre combinada por el factor de cobertura k, el cual es normalmente 2 para una confianza del 95% según una distribución normal [20].

$$U = \mu_c \times k, \text{ factor de cobertura } k = 2(95\% \text{ confianza})$$

### **2.3.4 Elección del parámetro de validación para la determinación de nitritos**

Para la elección de este parámetro a validar se considera la documentación disponible y la experiencia del Laboratorio de Sanitaria en el análisis de Nitritos, considerando lo que textualmente indica la norma NTE INEN ISO/IEC 17025:2018 (inciso 5.4.5.3 Nota 1) “la validación incluye la especificación de los requisitos, la determinación de las características de los métodos, una verificación de que los requisitos pueden satisfacerse utilizando el método, y una declaración sobre la validez” [21].

### **2.3.5 Matrices de análisis**

La matriz de la muestra es el conjunto de todos aquellos compuestos químicos que acompañan al analito en la muestra. En este caso se han considerado dos tipos de matrices, si bien es cierto corresponde a agua, pero su composición resulta ser muy heterogénea. Se ha utilizado una muestra de agua natural y una de agua residual.

#### *2.3.5.1 Matriz de Agua Natural*

El agua natural es el agua que se encuentra en la naturaleza es su estado original, puede ser de tipo superficial o subterránea, abarca diversas fuentes como ríos, lagos o embalses. Su calidad puede variar por factores naturales y antropogénicos como la erosión del suelo, agricultura, ganadería, la industria y la urbanización, pueden introducir contaminantes en las fuentes de agua, alterando su composición[22].

#### *2.3.5.2 Matriz de Agua Residual*

El agua residual es esencialmente el agua suministrada a la comunidad después que ha sido usada en diferentes aplicaciones y que ahora contiene compuestos que la convierten en inadecuada para la mayoría de los usos sin un tratamiento. El agua residual puede acumularse y volverse séptica generando molestias y olores nauseabundos debido a la descomposición de la materia orgánica. Además, el agua residual contiene nutrientes que estimulan el crecimiento de plantas acuáticas y puede contener además compuestos tóxicos que potencialmente pueden ser mutagénicos y cancerígenos[23].

### **2.3.6 Normativas y Directrices**

Existen normativas y regulaciones estrictas para el tratamiento y descarga de aguas. En Ecuador se considera la normativa nacional establecida en el Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente (TULSMA) [7], la cual establece que la concentración máxima de nitritos de agua natural para consumo humano, para preservación de la vida acuática, riego agrícola y para uso pecuario no podrá ser mayor a 0,2 mg/l.

# CAPÍTULO 3

## 3. METODOLOGÍA

### 3.1 Tipo de Investigación

En este trabajo el tipo de investigación es experimental y documental; experimental porque se recolectaron datos del método (datos primarios), y de tipo documental porque se usan fuentes confiables como normas internacionales, libros y reglamentos nacionales que hacen referencia a los parámetros de desempeño establecidos para comprobar que el método cumple con el propósito establecido.

### 3.2 Diseño de la Investigación

El diseño metodológico que se planteó es analítico porque se procedió a determinar un valor de manera experimental mediante un método previamente establecido. Es de tipo prospectivo ya que se recolectaron los datos conforme se desarrolló el método y de tipo longitudinal ya que existen dos momentos de medición que permite diferenciar la causa del efecto.

Las variables por considerar son, variable independiente es la concentración de la muestra, la misma que se graficará en el eje x, y la variable dependiente es la respuesta que nos da el equipo a dicha concentración de la muestra y se graficará en el eje y.

### 3.3 Diseño experimental

#### 3.3.1 Recolección de Datos

Se realizaron cinco campañas de monitoreo tanto para las matrices de agua natural y residual. Los puntos de muestreo para el agua natural fueron en la cabecera de del Río Tarqui, el mismo inicia en un ecosistema de páramo y atraviesa en su recorrido la ciudad de Cuenca (UTM WGS84 17S, 704167m E; 9661431m S). Mientras que para el agua residual fue en el afluente a la PTAR Ucubamba (Planta de Tratamiento de Agua Residual) la cual recibe la mayor parte del agua residual de esta ciudad.

#### 3.3.2 Métodos y Técnicas

El análisis experimental se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio de Saneamiento de ETAPA EP, en la ciudad de Cuenca.

El monitoreo consistió en recolectar muestras con un volumen de 4 litros siguiendo la Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN-ISO 5667-3, Primera Edición 2014-01 Calidad del Agua. Muestreo. Parte 1: Guía para el Diseño de los Programas de Muestreo y Técnicas de Muestreo. (ISO 5667-1:2006, IDT) y Parte 3: Conservación y Manipulación de las Muestras de Agua (ISO 5667-3:2012, IDT) [24] . Estas

muestras fueron llevadas al laboratorio para ser procesadas dentro de las 24 horas siguientes. Con el objetivo de obtener una muestra con una concentración intermedia de nitritos se fortificó una muestra en cada campaña, a partir del agua natural y del agua residual. Por lo tanto, se obtuvieron 6 muestras para análisis en cada una de las campañas.

El análisis fue ejecutado por 5 técnicos con el fin de determinar la repetibilidad y reproducibilidad que genera el análisis. El método para la determinación de nitritos en agua es el método colorimétrico N 4500 NO<sub>2</sub>-B del Estándar Métodos Edición 24; por espectrofotometría [2].

### 3.4 Método Colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B

El método se basa en la reacción de diazotización, en la cual los nitritos en condiciones ácidas con sulfanilamida y N-(1-naftil)-etilendiamina forman un diazo compuesto de color púrpura rojizo, la absorbancia del colorante rojo formado se mide espectrofotométricamente a una longitud de onda de 543 nm. La concentración de nitritos presentes en la muestra es proporcional a la intensidad del color [18].

#### Diagrama de Flujo del proceso de validación de Nitritos en Matriz Agua Natural y Residual

En la Figura 2 se detalla la determinación de parámetros de evaluación para la validación del Método Colorimétrico N 4500-NO<sub>2</sub>-B.

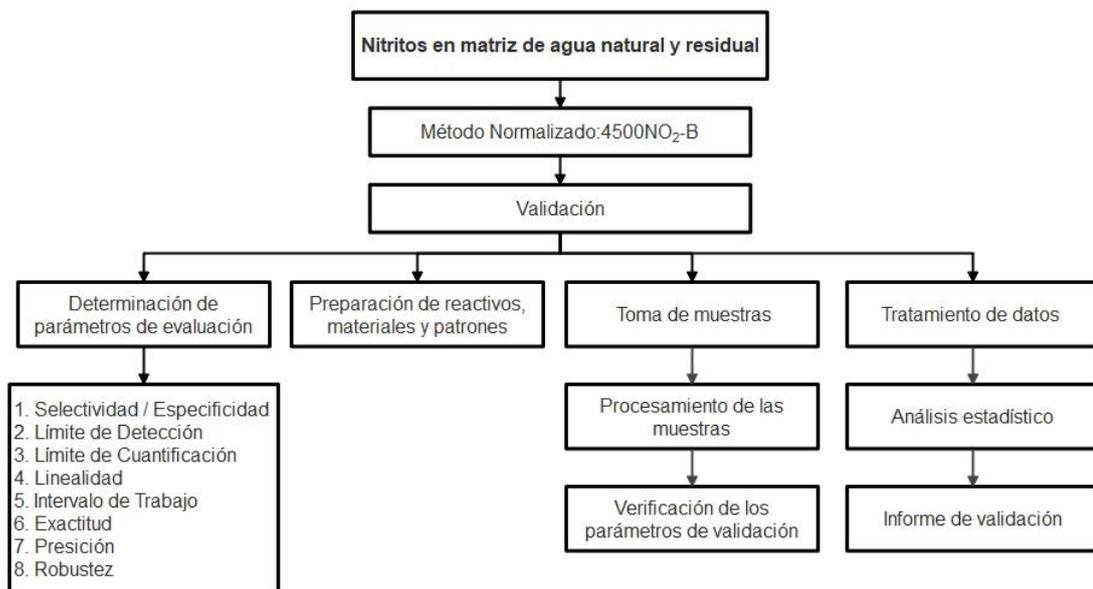


Figura 2. Diagrama de Flujo del proceso de validación de Nitritos en matriz de agua natural y residual  
Fuente: Autor

### 3.4.1 Determinación de parámetros de evaluación

#### 3.4.1.1 Selectividad / Especificidad

**Procedimiento:**

- Analizar muestras con adición de una solución de concentración conocida de NO<sub>2</sub>.
- Analizar muestras con adición de una solución de concentración conocida de Hierro.

**Objetivo:**

- Es selectivo cuando no existen interferencias y cuando en una mezcla se identifica de forma única el analito de interés.
- Es específico cuando al analizar la muestra con el analito adicionado de no interés, no se obtiene señal por el método.

**Aplicación:**

Día 1:

- Se analizó una muestra de agua natural para determinar el contenido de Nitritos. Esta muestra se fortificó con 0,4 mg/l de patrón de nitritos analizándose 10 veces y a las mismas muestras se añadió 0,4 mg/l Hierro.

#### 3.4.1.2 Límite de Detección

**Procedimiento:** Establecer el nivel más bajo de detección del método. Cuantificar el nivel de nitritos en una muestra en concentración baja o sin la presencia de nitritos, calcular la desviación estándar.

**Objetivo:** El Límite de detección se debe recuperar al menos el 50%.

**Aplicación:** Día 2: Se seleccionó una muestra de agua con bajo contenido de nitritos para el estudio del blanco. Se analizó 10 veces, se obtuvo los resultados y se calculó promedio y desviación estándar.

#### 3.4.1.3 Límite de Cuantificación

**Procedimiento:** Establecer el nivel más bajo de cuantificación del método. Cuantificar el nivel de nitritos en una muestra en concentración baja, calcular la desviación estándar.

**Objetivo:** En el límite de cuantificación se debe recuperar al menos el 70% de la muestra fortificada al nivel más bajo de la curva de calibración.

**Aplicación:** Día 2: A una muestra con bajo contenido de nitritos se fortificó al nivel de 0,05 mg/l de forma que se puedan cuantificar los valores máximos permitidos

por el TULSMA. Se realizó 10 réplicas y se evaluó la recuperación > al 70% de la muestra.

#### 3.4.1.4 *Linealidad / Función Respuesta*

**Procedimiento:** Construir una gráfica en función de la concentración (eje x) con la media aritmética de las réplicas (eje y)

**Objetivo:** Realizar una curva de calibración de al menos de 5 puntos con un  $R^2 \geq 0,995$ . La linealidad se confirma por evaluación visual de la recta obtenida.

**Aplicación:** Día 3 al Día 7: Se analizó la curva de calibración previo al estudio de exactitud y precisión.

6 curvas de calibración en concentraciones de 0,05; 0,1; 0,4; 0,6; 0,8; y 1 mg/l  
Se evaluó el  $R^2$ .

#### 3.4.1.5 *Intervalo de Trabajo*

**Procedimiento:** Realizar mediciones en diferentes rangos de control.

**Objetivo** El rango de trabajo se obtiene a partir de los resultados del Límite de Cuantificación y del nivel más alto de la curva de calibración, con una recuperación mínima del 98% en todo el rango.

**Aplicación:** Día 3 al día 7: Se analizó 25 réplicas de muestras que contengan nitritos por cada nivel de concentración (Nivel alto, medio y bajo) tanto para agua natural como para agua residual.

#### 3.4.1.6 *Exactitud*

**Procedimiento:** Analizar dos MRC por 5 días.

**Objetivo:** Evaluación de la recuperación: 98-102%

**Aplicación:** Día 3 al día 7: se realizó 5 lecturas por día de los MRC: WS (water supply) y WP (water pollution). Se evaluó la exactitud.

#### 3.4.1.7 *Precisión: Repetibilidad (Sr) / Reproducibilidad (SR):*

**Procedimiento:** Mediante el ANOVA evaluar la precisión expresada como repetibilidad y reproducibilidad en tres niveles, alto, intermedio y bajo, para la matriz agua natural y para la matriz agua residual. Luego, calcular el promedio de las concentraciones, desviación estándar, porcentaje de coeficiente de variación, F calculado y F crítico.

**Objetivo:** Evaluación del coeficiente de variación de repetibilidad  $CV_r \leq 2\%$  en todos los niveles y el coeficiente de variación de reproducibilidad  $CV_R$  en el nivel bajo  $\leq 12,5\%$ , nivel intermedio y alto  $\leq 2\%$ . Si F calculado es  $< F$  crítico no existen diferencias significativas.

**Aplicación:** Día 3 al Día 7: Agua Natural y Agua Residual. Se realizó:

Nivel Bajo: 5 réplicas durante 5 días.

Nivel Medio: 5 réplicas durante 5 días.

Nivel Alto: 5 réplicas durante 5 días.

#### 3.4.1.8 Robustez

**Procedimiento:** Modificar factores que tiene efecto significativo en el método con variaciones controladas.

**Objetivo:** Establecer si los cambios controlados afectan el método. El CV en las muestras con los cambios realizados debe ser  $\leq$  al 2% ( $CV_r$  objetivo de repetibilidad).

**Aplicación:** Se analizó 4 réplicas con 7 variables, las cuales se realizó:

Cambios controlados:

1. Cambio en filtro empleado para la eliminación de posibles interferencias por uno de 0,7  $\mu\text{m}$ .
2. Cambio en filtro empleado para la eliminación de posibles interferencias por uno de 1,5  $\mu\text{m}$ ;
3. Cambio en el pH de las muestras a 4,5.
4. Cambio en el pH de las muestras a 9,5;
5. Volumen de reactivo de color empleando 1,5 ml
6. Volumen de reactivo de color empleando 2,5 ml;
7. Variaciones en el tiempo de la medición fotométrica, 130 minutos después de agregar el reactivo de color.

### 3.4.2 Equipos y Materiales

#### 3.4.2.1 Materiales

- Espectrofotómetro Thermo Fisher Scientific, modelo Genesis 10 VIS
- Cubetas de cuarzo de 1cm
- Filtro de membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro
- Bomba de vacío
- Balones Volumétricos
- Pipetas volumétricas
- Tubos Nessler
- Frascos para conservación de soluciones

#### 3.4.2.2 Reactivos

- Patrón de Nitritos 1000 ug/ml, marca Inorganic Ventures
- Reactivo de Color:
- Ácido Fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) al 85%

- Sulfanilamida
- Diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina

### 3.4.3 Preparación de Reactivos:

- **Solución Intermedia de Nitrito 50 mg/l:** Medir 25ml de patrón comercial de nitrito y aforar a 500 ml con agua destilada.
- **Solución Estándar de Nitrito 5mg/l:** Medir 20ml de la solución intermedia de nitrito y aforar a 200 ml con agua destilada.
- **Reactivo de Color:** A 800ml de agua destilada añadir 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% y 10g de sulfanilamida, luego de disolver añadir 1g de diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina, y diluir con H<sub>2</sub>O a 1 L. Esta solución es estable por un mes en refrigeración y frasco ámbar. Descartar la solución si presenta precipitación o coloración oscura[2].

### 3.4.4 Preparación de la Curva de Calibración

Se midió la solución estándar de nitrito, los volúmenes que se indican en la Tabla 2, se diluyó a 50ml y se procedió como en el caso de las muestras.

Tabla 2. Curva de calibración

Volumen de solución estándar de nitrito (5 mg/ l)	Concentración (mg/ l) NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Volumen de Aforo (ml)
0,5	0,05	50
1	0,1	50
4	0,4	50
6	0,6	50
8	0,8	50
10	1,0	50

Con las absorbancias y las concentraciones de los patrones se graficó la concentración en las abscisas y la absorbancia en las ordenadas, de este gráfico se obtuvo la ecuación de la curva y el coeficiente de determinación aplicando el método de regresión lineal.

### 3.4.5 Procesamiento de las muestras

- Las muestras antes de ser analizadas se deben filtrar utilizando un filtro de membrana de 0,45 µm de poro para eliminar la cantidad de sólidos en suspensión que pudieran estar presentes, así como la turbidez
- Ajustar el pH de las muestras entre 5 y 9 unidades de pH, para el efecto utilizar soluciones de HCl 1N o NH<sub>4</sub>OH hasta conseguir las medidas indicadas.
- En un Nessler medir 50 ml de muestra previamente ajustada el pH.
- Añadir 2ml del reactivo de color a los 50 ml de muestra y mezclar.
- Entre 10 minutos y 2 horas se puede dar la lectura de las absorbancias den el espectrofotómetro.

- Leer las absorbancias del blanco, de los patrones y de las muestras a una longitud de onda de 543 nm [2].

### 3.4.6 Almacenamiento y preservación de las muestras

La determinación de nitritos se debe realizar inmediatamente en muestras recientes para evitar la conversión bacteriana de  $\text{NO}_2^-$  en  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_3$ . No debe utilizarse ácido en la conservación de muestras que se van a analizar. Almacenar las muestras en refrigeración a  $4^\circ\text{C}$  o a  $-20^\circ\text{C}$  por un período máximo de 1 a 2 días.[2]

### 3.4.7 Interferencias

No debe existir iones coloreados que interfieran con el color de la reacción. En caso de que la muestra contenga sólidos en suspensión se debe filtrar a través de un filtro de membrana de  $0,45\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Pueden producir interferencias en el análisis los siguientes iones:  $\text{Sb}_3^+$ ,  $\text{Au}_3^+$ ,  $\text{Bi}_3^+$ ,  $\text{Fe}_3^+$ ,  $\text{Pb}_2^+$ ,  $\text{Hg}_2^+$ ,  $\text{Ag}^+$ , cloroplatinato ( $\text{PtCl}_6^{2-}$ ) y metavanadato ( $\text{VO}_3^{2-}$ ) debido a que precipitan durante la prueba. El ion cúprico puede dar resultados bajos por catalizar la descomposición de la sal de diazonio. [2]

## 3.6 Análisis Estadístico

El tratamiento estadístico de datos es fundamental para demostrar que los resultados son idóneos para el método de estudio. Las herramientas estadísticas que se emplearon para los parámetros de desempeño se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Herramientas estadísticas para el cálculo de los parámetros de desempeño

Parámetro	Herramienta Estadística
Selectividad / Especificidad	$\% \text{Recuperación} = \frac{x}{x_{\text{Ref}}} * 100\%$
$LD = XB + 3SD$	
Límite de Detección	<ul style="list-style-type: none"> <li>- XB: Valor promedio de las señales del blanco</li> <li>- SD: Desviación estándar de las lecturas.</li> </ul>
$LD = XB + 10SD$	
Límite de Cuantificación	<ul style="list-style-type: none"> <li>- XB: Valor promedio de las señales del blanco</li> <li>- SD: Desviación estándar de las lecturas.</li> </ul>
Media aritmética de cada concentración.	
Linealidad / Función Respuesta	$x = \frac{\sum_{xi=1}^{xi=n} xi}{n}$
Pendiente	$y = mx + b$
	- y: señal medida

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- m: pendiente</li> <li>- b: señal del instrumento para el blanco.</li> </ul>
Exactitud	$\% \text{Recuperación} = \frac{x}{x_{\text{Ref}}} * 100\%$
	ANOVA de una sola vía: nivel de confianza 95%
	Desviación estándar
	STD: $\sqrt{\sigma}$
Precisión:	Media aritmética:
Repetibilidad / Reproducibilidad	$x = \frac{\sum_{xi=1}^{xi=n} xi}{n}$
	Desviación estándar relativa %
	$\text{RSD}\% = \frac{SD}{x} * 100\%$
Robustez	$\% \text{CV} = \frac{\text{media}}{\text{Desvest}} * 100\%$

### 3.6.1 Incertidumbre

Para la identificación de los factores de incertidumbre se emplea el diagrama causa – efecto presentado en la Figura 3.

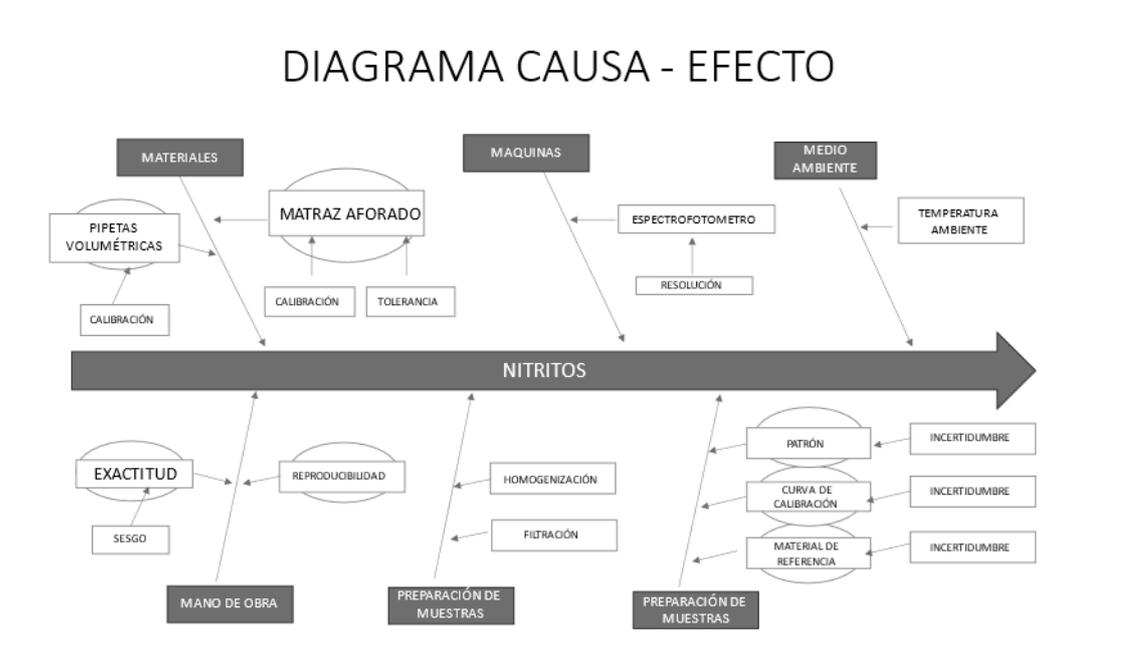


Figura 3. Diagrama Causa - Efecto para determinación de la Incertidumbre del método

En la Tabla 4 se presentan las formulaciones utilizadas para el cálculos de las contribuciones de la incertidumbre de este método.

Tabla 4. Fórmulas para el cálculo de cada factor que intervienen la incertidumbre

<b>Factor</b>	<b>Tipo</b>	<b>Distribución</b>	<b>Fórmula</b>
Materiales	B	Normal	Agrupados alrededor de la media $U/k$ U: Incertidumbre expandida K: Factor de cobertura Nivel de confianza 95% ( $Rango/2$ )
		Rectangular	Tolerancia (T) $T/\sqrt{3}$ Resolución (R) $R/\sqrt{3}$
Mano de Obra	A	N/A	ANOVA de una vía: Análisis de varianza
Método (Preparación de Muestras)	A	N/A	ANOVA de una vía: Análisis de varianza Agrupados alrededor de la media, (Incertidumbre expandida: U y K: Factor de cobertura) $U/k$
		N/A	Nivel de confianza 95% ( $Rango/2$ )
	B	Triangular	$Rango/\sqrt{6}$

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS

#### 4.1 Diseño de un procedimiento específico de ensayo

El diseño del procedimiento específico de ensayo está basado en los requerimientos de la NTE INEN-ISO/IEC 17025:2018, literal 7.2.1.2 (8.3)

El procedimiento describe de forma detallada la secuencia de actividades establecidas para la realización del ensayo de nitritos por el método colorimétrico, incluidas las descritas en la norma de referencia y otras que son propias del laboratorio de saneamiento. El procedimiento detallado se encuentra en el Anexo 1.

En la descripción del método se detallan las medidas de seguridad, materiales, reactivos y equipos utilizados para la realización del ensayo, preparación de reactivos, preparación de curva de calibración, cálculos, tratamiento de los resultados, criterios de aceptación y rechazo, almacenamiento y preservación de muestras

El procedimiento final, con base a los resultados de la validación incluye el intervalo de trabajo, criterios para aceptación y rechazo en el aseguramiento de resultados.

En las referencias se incluyen los documentos utilizados en la elaboración del procedimiento.

#### 4.2 Evaluación de los criterios de calidad

El parámetro Nitritos fue validado por el método N 4500 NO<sub>2</sub>-B, se evaluaron los parámetros de selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, precisión, veracidad, robustez y cálculo de la incertidumbre.

Los resultados obtenidos para cada parámetro de desempeño se encuentran a continuación:

##### 4.2.1 Selectividad/Especificidad

Bajo las condiciones del método, se realizó el análisis de una muestra para evaluar posibles interferencias y a su vez la concentración de la misma, el resultado fue satisfactorio, se obtuvo un bajo contenido del analito (0,089 mg/l de NO<sub>2</sub>), luego a esta muestra se fortificó por diez veces con 0,4 mg/l de patrón de nitritos y se obtuvo una recuperación promedio del 99,5%, como se muestra en la Tabla 5, considerando de esta manera su selectividad y para la determinación de la especificidad, a la misma muestra se le añadió 0,4 mg/l de patrón de Hierro por diez veces obteniéndose valores negativos, ya que el hierro es uno de los principales interferentes, por lo que se puede concluir que el método aplicado es el indicado

para la determinación de nitritos. En el Anexo 2 se muestra el cálculo completo de Selectividad/Especificidad.

Tabla 5. Determinación de Selectividad / Especificidad

Tipo	Muestra	Promedio (absorbancia)	Promedio (concentración)	Promedio Valor	% Recuperación
Selectividad	Muestra de Nitritos en baja concentración + 0,4mg/l NO <sub>2</sub>	0,457	0,487	0,398	99,5
Especificidad	Muestra con de 0,4 mg/l Fe	-0,062	-0,078	----	---

#### 4.2.2 Límite de Detección (LD) y Límite de Cuantificación (LC)

Se analizaron 10 muestras con bajo contenido del analito, obteniéndose resultados de absorbancia y concentración presentados en la Tabla 6. Con estos datos obtenidos se calculó el límite de detección teórico y el límite de cuantificación teórico a partir de la desviación estándar del blanco.

Tabla 6. Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Número de Repeticiones	Absorbancia	Concentración mg/l
1	0,035	0,035
2	0,036	0,036
3	0,035	0,035
4	0,036	0,036
5	0,036	0,036
6	0,036	0,036
7	0,036	0,036
8	0,036	0,036
9	0,036	0,036
10	0,037	0,037
Media (x)	0,0359	0,036
Desviación estándar (S)	---	0,001
Límite de Detección Teórico	---	0,038
Límite de Cuantificación Teórico	---	0,042

Los valores que se muestran en la Tabla 6, indican que el límite de detección teórico es 0,038 mg/l, encontrándose muy por debajo del primer punto de concentración de la curva, el cual corresponde a 0,05 mg/l, demostrando de esta manera que el valor obtenido es la concentración mínima de analito que puede detectarse.

Para el cálculo del Límite de cuantificación se analizaron 10 veces una muestra con bajo contenido del analito y se fortificó con 0,05 mg/l de nitrito.

En la Tabla 7. se observan los resultados de absorbancia y concentración. Con los datos de concentración obtenidos se calculó el promedio (0,05 mg/l) y la recuperación (100,65%). Por lo tanto, se cumple la recuperación ya que es >70%.

Tabla 7. Límite de Cuantificación

Número de Repeticiones	Absorbancia	Concentración mg/l
1	0,053	0,050
2	0,052	0,049
3	0,054	0,052
4	0,053	0,051
5	0,052	0,051
6	0,054	0,049
7	0,053	0,050
8	0,053	0,050
9	0,052	0,049
10	0,053	0,052
Promedio	0,0529	0,050
Recuperación (%)	---	100,65

#### 4.2.3 Linealidad / Función Respuesta

En la Tabla 8 se presentan las curvas de calibración realizadas para el estándar de nitritos en el rango de 0,05 mg/l a 1 mg/l. La linealidad del método se determinó al evaluar en cada una de las curvas el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), la pendiente (m) y el intercepto, obteniéndose los resultados presentados en la Tabla 9.

Tabla 8. Absorbancias de las curvas de calibración

Concentración (mg/l)	Absorbancias						Promedio
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6	
0	0,008	0,01	0,011	0,011	0,011	0,01	0,010
0,05	0,055	0,057	0,055	0,056	0,056	0,057	0,056
0,1	0,101	0,103	0,103	0,103	0,106	0,104	0,103
0,4	0,376	0,378	0,372	0,374	0,372	0,373	0,374
0,6	0,568	0,561	0,570	0,561	0,554	0,557	0,562
0,8	0,740	0,736	0,742	0,723	0,742	0,736	0,737
1,0	0,926	0,923	0,914	0,914	0,912	0,911	0,917

Tabla 9. Estimación lineal de las curvas de calibración

Variable	Estimación Lineal					
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4	Curva 5	Curva 6
Pendiente (m)	0,9179	0,9106	0,9097	0,8998	0,9039	0,9022
Intercepto (a)	0,0094	0,0117	0,0119	0,0125	0,0123	0,0123
Desviación estándar de la pendiente (Sb)	0,00414	0,00270	0,00710	0,00607	0,00414	0,00274
Desviación estándar del intercepto (Sa)	0,00231	0,0150	0,00396	0,00338	0,00230	0,00153

<b>Coefficiente de determinación (r<sup>2</sup>)</b>	0,9999	1	0,9997	0,9998	0,9999	1
<b>Error de estimación de Y (Sy, x)</b>	0,00399	0,00260	0,00685	0,00585	0,00399	0,00264

Se recopilan los datos de cada curva individual y se realiza un promedio considerando las respectivas absorbancias de los 6 días. El valor obtenido del coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>) es superior a 0,995; por lo tanto, atestiguan linealidad del método. Es decir, existe correlación entre la concentración y la señal analítica, comprobándose así que la linealidad obtenida es aceptable. En el Anexo 3 se indica el cálculo a detalle las 6 curvas de calibración

En la Tabla 10 se establece límites para cada uno de los parámetros que conforman la curva de calibración como parte del aseguramiento de resultados en los ensayos de rutina siendo:

Tabla 10. Límites de los parámetros de la curva de calibración

Parámetro	Promedio	Límite superior	Límite inferior
Pendiente (m)	0,9073	0,9179	0,8998
Intercepto (a)	0,0117	0,0123	0,0094
Coefficiente de determinación (R <sup>2</sup> )	0,9999	1	0,9997

#### 4.2.4 Efecto Matriz

El estudio del efecto matriz se realiza comparando la curva estándar con una curva con adición de estándares de concentración conocida, para lo cual a una muestra con bajo contenido de nitritos se adicionó iguales concentraciones a los puntos de la curva de calibración estándar, obteniéndose los resultados presentados en la Figura 4. Las curvas con sus respectivas absorbancias se encuentran en el Anexo 4.

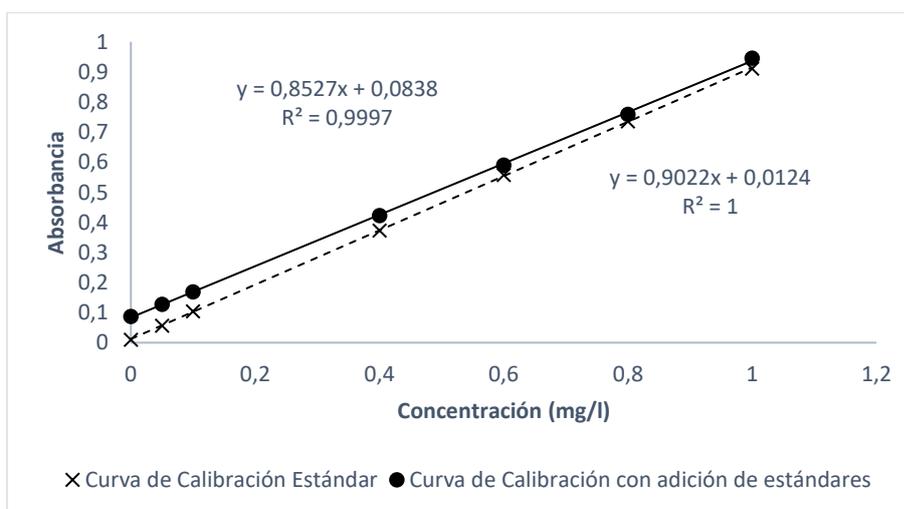


Figura 4. Análisis del Efecto Matriz

Las curvas de regresión tanto del estándar como de la muestra fortificada son paralelas con un nivel de confianza del 95%; por lo tanto, no existe efecto matriz. Con la prueba *t* presentada en la Tabla 11 se compara las dos pendientes tanto de la curva estándar como de la curva adicionada y se demuestra que el *F* calculado es menor al *F* tabulado.

Tabla 11. Prueba *t* de las curvas para la determinación del efecto matriz

Variables	Estimación Lineal de la curva estándar	Estimación lineal de la curva con adición
m	0,902	0,853
sm	0,00275	0,00630
r <sup>2</sup>	1,00	1,00
F	107760,84	18332,73
b	0,0124	0,0838
sb	0,00153	0,00351
s res	0,00265	0,00607
g.l	5	5
F calculado parcial	0,814	0,727
F calculado	1,119	
F tabulado	5,050	

#### 4.2.5 Veracidad

Los valores de recuperación obtenidos tanto para MRC en agua natural como para agua residual se muestran en la Tabla 12 y el cálculo correspondiente se presenta en el Anexo 5. Se comparó el valor promedio obtenido con el valor de referencia para el MRC, el porcentaje de recuperación obtenido cumple con el criterio de aceptación propuesto, es decir se encuentra dentro del intervalo de confianza de 98 al 102%.

Tabla 12. Evaluación de la veracidad del método de estudio

MRC	Valor Real (mg/l)	Valor Obtenido (mg/l)	Recuperación (%)
Agua Natural	0,497	0,505	101,57
Agua Residual	0,503	0,506	100,62

#### 4.2.6 Precisión

El cálculo del análisis de varianza ANOVA permitió obtener estimaciones de repetibilidad y reproducibilidad, para evaluar la existencia o ausencia de diferencias significativas. Los cálculos correspondientes se presentan en el Anexo 6.

##### 4.2.6.1 Determinación de precisión en la Matriz Agua Natural

En las tablas 13, 14, 15 y 16 del análisis de la matriz agua natural se muestran los tres niveles trabajados en cinco días diferentes. Las muestras fueron procesadas y se realizó el cálculo de la concentración de cada muestra. A su vez se calculó el promedio de la concentración, desviación estándar, suma de diferencias

cuadráticas entre grupos ( $SDC_B$ ), suma de diferencias cuadráticas dentro del grupo ( $SDC_W$ ), repetibilidad y reproducibilidad y el coeficiente de variación.

Tabla 13. Análisis de la Varianza del Nivel Bajo 0,05 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	9,14E-07	2,29E-07					
Dentro del grupo	20	1,27E-05	6,34E-07	0,000796	0,000796	-8,11E-08	0,361	2,87
Total	24	1,36E-05						

Tabla 14. Análisis de la Varianza del Nivel Intermedio 0,2 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	3,42E-05	8,54E-06					
Dentro del grupo	20	6,19E-05	3,09E-06	0,00176	0,00205	1,089E-06	2,760	2,866
Total	24	9,60E-05						

Tabla 15. Análisis de la Varianza del Nivel Alto 0,6 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	1,27E-04	3,18E-05	0,00492	0,00507	1,52E-06	1,31	2,87
Dentro del grupo	20	4,85E-04	2,42E-05					
Total	24	6,12E-04	2,54E-05					

Tabla 16. Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de la varianza en los niveles bajo, intermedio y alto de la matriz de agua natural

Parámetros estadísticos	Solución		
	0,05 mg/l	0,2 mg/l	0,6 mg/l
Media General	0,0498	0,200	0,595
S	0,000753	0,00200	0,00505
CV = RSD	0,0151	0,0100	0,00849
%CVr=	1,60	0,878	0,828
%CVR=	1,60	1,02	0,853
% Recuperación	99,6	100	99,1

En todos los niveles de concentración trabajados se puede demostrar que no existe diferencias estadísticamente significativas con diferentes analistas, ya que el F calculado es menor que el F crítico, demostrando de esta manera que el método es preciso.

El coeficiente de variación obtenido en cada nivel de trabajo cumple con el criterio de aceptación establecido, es decir, menor o igual al 12,5% para el nivel bajo y menor o igual al 2% para el nivel intermedio y alto.

#### 4.2.6.2 Determinación de precisión en la Matriz Agua Residual

En las tablas 17, 18, 19 y 20 de la matriz agua residual se muestran los tres niveles trabajados en cinco días diferentes. Las muestras fueron procesadas y se realizó el cálculo de la concentración de cada muestra, a su vez se calculó el promedio de la concentración, desviación estándar, suma de diferencias cuadráticas entre grupos (SDCB), suma de diferencias cuadráticas dentro del grupo (SDCW), repetibilidad y reproducibilidad, coeficiente de variación.

Tabla 17. Análisis de la Varianza del Nivel Bajo 1 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	3,14E-04	7,85E-05					
Dentro del grupo	20	5,56E-04	2,78E-05	0,00527	0,00616	0,0000101	2,82	2,87
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>8,71E-04</b>						

Tabla 18. Análisis de la Varianza del Nivel Intermedio 2 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	5,95E-04	1,49E-04					
Dentro del grupo	20	1,07E-03	5,36E-05	0,00732	0,00852	0,000019	2,77	2,87
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>1,67E-03</b>						

Tabla 19. Análisis de la Varianza del Nivel Alto 4 mg/l

Origen de la varianza	g.l.	SDC	DCM	Sr	SR	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	1,31E-03	3,27E-04					
Dentro del grupo	20	5,12E-03	2,56E-04	0,0160	0,0164	1,43E-05	1,28	2,87
<b>Total</b>	<b>24</b>	<b>6,43E-03</b>						

Tabla 20. Parámetros estadísticos obtenidos del análisis de la varianza en los niveles bajo, intermedio y alto de la matriz de agua residual

Parámetros estadísticos	Solución		
	1,0 mg/l	2,0 mg/l	4 mg/l
Media general	1,00552	2,00493	4,003
S	0,00602	0,00834	0,0164
CV = RSD	0,00599	0,00416	0,004
%CVr=	0,525	0,36532	0,400
%CVR=	0,613	0,42512	0,411
% Recuperación	101	100	100

En todos los niveles de concentración trabajados se puede demostrar que no existe diferencias estadísticamente significativas con diferentes analistas, ya que el F calculado es menor que el F crítico, demostrando de esta manera que el método es preciso.

El coeficiente de variación obtenido en cada nivel de trabajo cumple con el criterio de aceptación establecido  $\leq 2\%$ .

#### 4.2.7 Robustez

La robustez se evaluó con variaciones diferentes al método habitual, se realizó la variación con la porosidad del filtro empleado para la eliminación de posibles interferencias de los filtros usados de 0,7  $\mu\text{m}$  y 1,5  $\mu\text{m}$ ; variación del pH de las muestras con pH de 4,5 y 9,5; variación del volumen de reactivo de color empleando 1,5 ml y 2,5 ml; variaciones en el tiempo de la medición fotométrica, 130 minutos después de agregar el reactivo de color. En la Tabla 21 se presentan los análisis de las muestras, mientras que en la Tabla 22 los resultados con las variables indicadas anteriormente.

Tabla 21. Análisis de muestras en condiciones normales

Muestra	Valores en condiciones Normales				S	Media	CV
1	0,806	0,806	0,804	0,805	0,00096	0,805	0,119
2	0,803	0,802	0,806	0,800	0,00250	0,803	0,311
3	0,805	0,801	0,802	0,804	0,00183	0,803	0,227
4	0,804	0,801	0,801	0,805	0,00206	0,803	0,257
5	0,805	0,806	0,807	0,807	0,00096	0,806	0,119
6	0,803	0,8	0,804	0,801	0,00183	0,802	0,228
7	0,803	0,805	0,807	0,807	0,00191	0,806	0,238

Tabla 22. Análisis de las muestras aplicando las variables

Variables Modificadas	Valores del análisis de las variables modificadas				S	Media	CV	CV variables. < CV objetivo	Comparación
Filtro 0,7 $\mu\text{m}$	0,785	0,79	0,788	0,793	0,00337	0,789	0,427	<2%	*
Filtro 1,7 $\mu\text{m}$	0,794	0,787	0,793	0,789	0,00330	0,791	0,418	<2%	*
pH 4,5	0,793	0,79	0,792	0,79	0,00150	0,791	0,190	<2%	*
pH 9,5	0,804	0,809	0,802	0,803	0,00311	0,805	0,386	<2%	*
Volumen de reactivo 1,5 ml	0,82	0,825	0,823	0,821	0,00222	0,822	0,270	<2%	*
Volumen de reactivo 2,5 ml	0,791	0,797	0,793	0,795	0,00258	0,794	0,325	<2%	*
Tiempo de reacción 130 min	0,875	0,873	0,877	0,876	0,00171	0,875	0,195	<2%	*

\* No sensible a la variable

Comparando los valores obtenidos del CV de las variables modificadas con el CV de las variables obtenidas del método en condiciones normales con lo planteado en los objetivos que es  $\leq 2\%$  son variables no sensibles. Los resultados de las variables modificadas a pesar de ser  $\leq 2\%$  del objetivo, comparando con las variables sin modificar es decir las obtenidas del método en condiciones normales presentan una variación mayor, por lo tanto, son variables que deben ser controladas, el método debe conservar las características propuestas en la metodología, por lo que se sugiere mantener un control exhaustivo en la realización de este.

#### 4.2.8 Incertidumbre

Para el cálculo de la Incertidumbre se consideró todas las fuentes que influyen durante la verificación del método. Se realizó el cálculo de la incertidumbre combinada ( $\mu_c$ ), luego se calculó la incertidumbre expandida (U) la cual se multiplica por el factor de cobertura ( $K= 2$ ). El cálculo de la incertidumbre de cada Nivel con sus respectivas contribuciones se encuentra en el Anexo 7.

##### 4.2.8.1 Incertidumbre en la Matriz Agua Natural

En las tablas 23, 24 y 25 se presentan los resultados de las incertidumbres combinadas y de la incertidumbre expandida para cada nivel de la matriz de agua natural. Se obtienen resultados de incertidumbre menores al 10% en cada nivel, lo cual asegura confiabilidad del método.

Tabla 23. Cálculo de la Incertidumbre en Nivel Bajo 0,05 mg/l de matriz de agua natural

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
FR	1	1,083E-05	1,083E-05	1,17E-10
SOL.CONCENT	1	0,00200	0,00200	0,00000400
PIPETA 1ml	1	0,00211	0,00211	0,00000444
R	0,05	0,000796	0,0160	0,000256
SESGO	1	0,0306	0,0306	0,000938
TOTAL				0,00120
uNitritos				0,0347
uNitritos%				3,47
U				k x uc
U%				6,93
U mg/l				0,000347

Tabla 24. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Intermedio 0,2 mg/l de matriz de agua natural

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
FR	1	9,71E-06	9,71E-06	9,44E-11
SOL.CONCENT	1	0,00200	0,00200	4,00E-06
PIPETA 2ml	2	0,00325	0,00162	2,64E-06
R	0,200	0,00205	0,0102	0,000104
SESGO	1	0,0306	0,0306	0,000938
TOTAL				0,00105
uNitritos				0,0324
uNitritos%				3,24
U				k x uc
U%				6,48
U mg/l				0,0130

Tabla 25. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Alto 0,4 mg/l de matriz de agua natural

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
-------------	-----------	----------------------------------	---	-------------

FR	1	9,46E-06	9,46E-06	8,95E-11
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 5 ml	5	7,88E-03	1,58E-03	2,49E-06
PIPETA 1 ml	1	2,11E-03	2,11E-03	4,44E-06
R	0,595	5,07E-03	8,53E-03	7,28E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,00102
uNitritos				0,0320
uNitritos%				3,20
U				k x uc
U%				6,39
U mg/l				0,0384

#### 4.2.8.2 Incertidumbre en la Matriz Agua Residual

En las tablas 26, 27 y 28 se presentan los resultados de las incertidumbres combinadas y de la incertidumbre expandida para cada nivel de la matriz de agua residual. Se obtienen resultados de incertidumbre menores al 10% en cada nivel, lo cual asegura confiabilidad del método.

Tabla 26. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Bajo 1 mg/l de matriz de agua residual

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
FR	1	1,30E-05	1,30E-05	1,69E-10
SOL.CONCENT	1	0,00200	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 10 ml	10	0,0148	1,48E-03	2,20E-06
PIPETA 25 ml	25	0,0347	1,39E-03	1,93E-06
R	1,00552	0,00616	6,13E-03	3,75E-05
SESGO	1	0,0306	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000983
uNitritos				0,0314
uNitritos%				3,14
U				k x uc
U%				6,27
U mg/l				0,0627

Tabla 27. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Intermedio 2 mg/l de matriz de agua residual

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
FR	1	2,69E-05	2,69E-05	7,25E-10
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 20 ml	20	2,82E-02	1,41E-03	1,99E-06
PIPETA 10 ml	10	1,48E-02	1,48E-03	2,20E-06
R	2	8,52E-03	4,25E-03	1,81E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000964
uNitritos				0,0310
uNitritos%				3,10
U				k x uc
U%				6,21

U mg/l 0,124

Tabla 28. Cálculo de la incertidumbre en Nivel Alto 4 mg/l de matriz de agua residual

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar ( $u_x$ )	Incertidumbre estándar relativa ( $u_x/x$ )	$(u_x/x)^2$
FR	1	5,81E-05	5,81E-05	3,37E-09
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 40 ml	40	5,83E-02	1,46E-03	2,13E-06
PIPETA 5 ml	5	7,88E-03	1,58E-03	2,49E-06
R	4	1,64E-02	4,11E-03	1,69E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000963
uNitritos				0,0310
uNitritos%				3,10
U				k x uc
U%				6,21
U mg/l				0,248

### 4.3 Resultados obtenidos y emisión de la declaración de validación del método.

Una vez finalizada la verificación del método analítico, en la Tabla 29 se muestra el cumplimiento de los objetivos:

Tabla 29. Resultados obtenidos de la validación del método N 4500 NO<sub>2</sub>-B

Parámetro	Criterio de Aceptación	Resultado	Cumplimiento
Selectividad / Especificidad	No debe presentar interferencias con otros analitos	El método es específico y selectivo para el analito	Cumple
Límite de Detección	3SD	0,04 mg/l	Cumple
Límite de Cuantificación	10SD	0,05 mg/l	Cumple
Linealidad / Función Respuesta	Coefficiente de determinación R <sup>2</sup> ≥ 0,995	r <sup>2</sup> ≥ 0,999	Cumple
Intervalo de Trabajo	0,05 a 4 mg NO <sub>2</sub> -N/l	0,05 a 4 mg NO <sub>2</sub> -N/l	Cumple
Exactitud	98-102%	WS: 101,57% WP: 100,62%	Cumple
Precisión	Repetibilidad Sr CV <sub>r</sub> o RSD ≤ 2% en todos los niveles	<b>Agua Natural</b> Nivel Bajo: 1,60% Nivel Intermedio: 0,88 % Nivel Alto:0,82%	Cumple
		<b>Agua Residual</b> Nivel Bajo: 0,53% Nivel Intermedio: 0,37 % Nivel Alto:0,40%	
	Reproducibilidad SR CV <sub>R</sub> o RSD Nivel Bajo 0,05 mg/l ≤ 12,5% Demás niveles ≤ 2%	<b>Agua Natural</b> Nivel Bajo:1,60% Nivel Intermedio: 1,02% Nivel Alto:0,85%	Cumple

		<b>Agua Residual</b> Nivel Bajo: 0,61% Nivel Intermedio: 0,43 % Nivel Alto:0,41%	
		<b>Agua Natural</b> Nivel bajo: 6,93% (0,000347 mg/l) Nivel intermedio 6,48% (0,0130 mg/l) Nivel alto 6,39% (0,0384 mg/l)	
Incertidumbre		<b>Agua Residual</b> Nivel bajo: 6,27% (0,0627 mg/l) Nivel intermedio 6,21% (0,124 mg/l) Nivel alto 6,21% (0,248 mg/l).	Cumple
Robustez	Variaciones en el tiempo de la medición fotométrica: - 130 minutos después de agregar el reactivo de color. Variación del filtro empleado para la eliminación de posibles interferencias: - Filtros de fibra de vidrio; porosidad fina de 0,7 y 1,5 µm. - Variación del volumen de reactivo de color: 1,5 y 2,5 ml. - Variación del pH de las muestras: 4,5 y 9,5.	Cumple	Cumple

#### 4.4 Declaración de validación del método

Luego de los ensayos y pruebas estadísticas realizadas se da por concluido y se declara el método validado. Anexo 8

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones

Se validó el método de análisis N 4500-NO<sub>2</sub><sup>-</sup>B para el análisis de nitritos en matrices de agua natural y residual, en el Laboratorio de Saneamiento de la empresa ETAPA EP de la ciudad de Cuenca. Esto permitió desarrollar el procedimiento específico de ensayo basado en los requerimientos de la NTE INEN-ISO/IEC 17025:2018, literal 7.2.1.2 (8.3), cumpliendo con el objetivo propuesto.

Se realizó los ensayos para la evaluación de los parámetros de: selectividad/especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, veracidad, robustez, precisión e incertidumbre; en las matrices de agua natural y residual. Con estos resultados se evidencia el cumplimiento de los criterios estadísticos establecidos, demostrando que el método empleado para la determinación de nitritos es repetible, reproducible y preciso, lo cual, asegura confiabilidad del método.

Con los datos obtenidos y los cálculos estadísticos efectuados se generó la “declaración de la validación del método”, con el fin de dejar evidencia que demuestre el cumplimiento de los requisitos de desempeño, que servirán como soporte para los trámites respectivos de ampliación del alcance de acreditación del Laboratorio de Saneamiento de ETAPA EP en este parámetro.

#### 5.2 Recomendaciones

En el estudio de la robustez al ser el método muy sensible a la modificación de las variables, se recomienda que se debe cumplir a cabalidad cada punto del procedimiento establecido para el análisis de nitritos. Para futuros análisis se pueden aplicar otras variantes de acuerdo con las condiciones de cada laboratorio.

La matriz de agua natural utilizada proviene de una fuente con buena calidad ya que la actividad agropecuaria en esta zona es muy escasa. Se recomienda analizar una matriz de agua natural en una zona agropecuaria cuya calidad pueda estar afectada y en donde el efecto matriz sea más significativo.

El análisis en la matriz de agua residual fue realizado en el efluente de una PTAR de un sistema de lagunaje. Con el mismo criterio anterior se recomienda analizar en el afluente de la PTAR con el objetivo de evidenciar interferencias por las características propias de la misma.

## 6. REFERENCIAS

- [1] J. D. Bolaños-Alfaro, G. Cordero-Castro, y G. Segura-Araya, “Determinación de nitritos, nitratos, sulfatos y fosfatos en agua potable como indicadores de contaminación ocasionada por el hombre, en dos cantones de Alajuela (Costa Rica)”, *Revista Tecnología en Marcha*, vol. 30, núm. 4, p. 15, dic. 2017, doi: 10.18845/tm.v30i4.3408.
- [2] American Water Works Association, Water Environment Federation, y American Public Health Association, *Standard Methods For the Examination of Water and Wastewater*, 24rd ed. 2023.
- [3] Organización Mundial de la Salud, *Guías para la calidad del agua de consumo humano*, 4th ed. Ginebra, 2011.
- [4] F. Polat, “Development of a simple analytical method for the determination of nitrite in waters using redox reaction and smartphone”, *Analytical Sciences*, vol. 38, núm. 9, 2022, doi: 10.1007/s44211-022-00146-y.
- [5] E. Styani, E. S. Lestari, I. Widiana, y M. Ramadhan, “Making and Testing Sample Control on Determination of Nitrite Content in Water and Wastewater by Using UV-Visible Spectrophotometer”, *Journal of Environmental Engineering and Waste Management*, vol. 4, núm. 1, 2019, doi: 10.33021/jenv.v4i1.653.
- [6] O. El hani, A. Karrat, K. Digua, y A. Amine, “Development of a simplified spectrophotometric method for nitrite determination in water samples”, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, vol. 267, 2022, doi: 10.1016/j.saa.2021.120574.
- [7] Ministerio del Ambiente, “NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES: RECURSO AGUA”, en *Texto Unificado de Legislación Secundaria*, 2015, pp. 13–22.
- [8] Eurolab España., P. P. Morillas, y colaboradores, *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos: Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*, 1ra. ed. 2016. Consultado: el 17 de enero de 2024. [En línea]. Disponible en: [www.eurachem.org](http://www.eurachem.org)
- [9] J. Pacheco Ávila, R. Pat Canul, y A. Cabrera Sansores, “Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos”, *Ingeniería*, vol. 6, núm. 3, pp. 73–81, 2002.
- [10] J. Camargo y A. Alonso, “Contaminación por nitrógeno inorgánico en los ecosistemas acuáticos: problemas medioambientales, criterios de calidad del agua, e implicaciones del cambio climático”, *Ecosistemas*, vol. 16, núm. 2, pp. 98–110, 2007.

- [11] G. Pauta *et al.*, “Evaluación de la calidad del agua de los ríos de la ciudad de Cuenca, Ecuador”, *MASKANA*, vol. 10, núm. 2, pp. 76–88, dic. 2019, doi: 10.18537/mskn.10.02.08.
- [12] SAE, “Servicio de Acreditación Ecuatoriano”, 2023. Consultado: el 17 de noviembre de 2023. [En línea]. Disponible en: <https://www.acreditacion.gob.ec/>
- [13] G. Pauta Calle, *Manual de Teoría y Prácticas de Análisis de Aguas*, 1a ed., vol. 1. 1998.
- [14] R. Calderon, “Evaluación de la comunidad de macro invertebrados bentónicos y la calidad fisicoquímica del agua en la parte alta de la quebrada El Carracá, del municipio de Los Santos”, Universidad Industrial de Santander, Santander, 2004.
- [15] Organización Mundial de la Salud, “Nitrate and Nitrite in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality”, Ginebra, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://www.who.int/publications/guidelines/>
- [16] J. Basulto, M. Manera, E. Baladia, y J. Basulto, “Revisión Ingesta dietética de nitratos en bebés y niños españoles y riesgo de metahemoglobinemia”, *Rev. Pediatr. Aten. Primaria*, pp. 65–69, nov. 2013.
- [17] E. Cabrera Molina, L. Hernández Garciadiego, H. Gómez Ruíz, y Ma. del P. Cañizares Macías, “Determinación de nitratos y nitritos en agua. Comparación de costos entre un método de flujo continuo y un método estándar”, *Revista de la Sociedad Química de México*, vol. 47, núm. 1, pp. 88–92, 2003.
- [18] M. A. DOSAL y M. VILLANUEVA, *Curvas de Calibración en los métodos analíticos*. México D.F.: Facultad de Química, UNAM, 2008.
- [19] EURACHEM - Co-Operation on International Traceability in Analytical Chemistry, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 3rd. 2012.
- [20] J. N. Miller y J. C. Miller, *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Cuarta Edición. Madrid, 2002.
- [21] Servicio Ecuatoriano de Normailización, *Norma Técnica Eucatoriana NTE INEN-ISO/IEC 17025: Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (ISO/IEC 17025:2017, IDT)*, 3ra. ed. Quito, 2018.
- [22] L. Canter, *Manual de Evaluación de Impacto Ambiental: Técnicas para la elaboración de estudios de impacto*, 2da ed. Madrid: McGraw Hill / Interamericana de España, S.A.U., 1998.

- [23] Metcalf & Eddy AECOM, *Wastewater Engineering - Treatment and Resource Recovery*, 5ta ed., vol. I. New York, 2014.
- [24] Servicio Ecuatoriano de Normalización, “NTE INEN-ISO 5667-3, Primera Edición 2014-01 Calidad del Agua. Muestreo.”, Quito.

# ANEXOS Y APÉNDICES

## Anexo 1. Procedimiento Específico de Ensayo Nitritos

EDICIÓN	FECHA	PAGINAS AFECTADAS	CAUSA
1	Enero 2024	TODAS	PRIMERA EDICIÓN

## INDICE

1. OBJETO
2. ALCANCE
  - 2.1 Intervalo de trabajo
  - 2.2 Almacenamiento y preservación de muestras
  - 2.3 Manejo de Muestras
3. REFERENCIAS
  - 3.1 Documentos utilizados en la elaboración
  - 3.2 Documentos a utilizar conjuntamente
4. GENERAL
5. DESCRIPCION
  - 5.1 Equipos y Materiales
  - 5.2 Preparación
    - 5.2.1 Preparación de Reactivos
    - 5.2.2 Preparación de la curva de calibración
    - 5.2.3 Condiciones Ambientales
  - 5.3 Realización
  - 5.4 Tratamiento de resultados
    - 5.4.1 Criterios de aceptación y rechazo
  - 5.5 Medidas de seguridad
- 6 ANEXOS
  - Anexo 1

## 1. OBJETO

El objeto del presente procedimiento es definir la sistemática establecida para la realización del ensayo de Nitritos por el método colorimétrico.

## 2. ALCANCE

Esta metodología de ensayo es aplicable en muestras de aguas residuales y aguas naturales.

**2.1 Intervalo de Trabajo.** - El método es aplicable en el rango de 0,05 a 4 mg/l mediante diluciones

### 2.2 Almacenamiento y preservación de las muestras

Para la determinación de Nitritos no usar conservación ácida, se recomienda realizar rápidamente en muestras frescas para evitar conversión bacteriana. Se puede almacenar las muestras en refrigeración a 4°C (+/- 2°C) o a -20 °C por un período máximo de 1 a 2 días.

### 2.3 Manejo de las Muestras

Referirse al capítulo 18 (Manejo de Objetos de ensayo) del Manual de la Calidad.

## 3. REFERENCIAS

### 3.1 Documentos utilizados en la elaboración

- Standard Method for the Examination of Water and Wastewater 24 Edition año 2023 (N 4500NO<sub>2</sub>- B)
- Manual de Procedimientos Generales PG/LS/01
- Procedimientos Generales PG/LS/06

### 3.2 Documentos a utilizar conjuntamente

Instructivo de uso del espectrofotómetro.

## 4. GENERAL

El nitrito NO<sub>2</sub>-se determina mediante la formación de un colorante azoico púrpura rojizo producido a pH 2 a 2,5 mediante el acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorhidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorhidrato de NED).

## 5. DESCRIPCION

### 5.1 Equipos y Materiales

- Espectrofotómetro EI 135
- Bomba de vacío EI 132
- Plato agitador EI 113
- Matraces Erlenmeyer
- Tubos Nesslerers
- Pipetas volumétricas

- Balones volumétricos
- Frascos para conservación de soluciones

**Reactivos:**

- Patrón de Nitrito de Sodio
- Sulfanilamida  $4\text{NH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$  (Tomate 16.4)
- N-naftil etilendiamina  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2$  (Tomate 1.28)
- Ácido fosfórico  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Tomate 1.5)

**5.2 Preparación**

**5.2.1 Preparación de Reactivos**

- **Solución Intermedia de Nitrito 50 mg/l:** Medir 25ml de patrón comercial de nitrito y aforar a 500 ml con agua destilada.
- **Solución Estándar de Nitrito 5mg/l:** Medir 20ml de la solución intermedia de nitrito y aforar a 200 ml con agua destilada.

**5.2.2 Preparación de la Curva de Calibración**

Medir de la solución estándar de nitrito los volúmenes que se indican en la siguiente tabla, diluir a 50 ml. y proceder como en el caso de las muestras

ml de solución estándar de nitrito (5 mg/ l)	Concentración mg/ l $\text{NO}_2^-$	Volumen de Aforo (ml)
0,5	0,05	50
1	0,1	50
4	0,4	50
6	0,6	50
8	0,8	50
10	1,0	50

Con las absorbancias y las concentraciones de los patrones se graficará la concentración en las abscisas y la absorbancia en las ordenadas, de este gráfico se obtendrá la ecuación de la curva y el coeficiente de determinación aplicando el método de regresión lineal.

**5.2.3 Condiciones Ambientales. - No Aplica**

**5.3 Realización**

**Tratamiento de las muestras:**

- Las muestras antes de ser analizadas se deben filtrar utilizando un filtro de membrana de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro para eliminar la cantidad de sólidos en suspensión que pudieran estar presentes, así como la turbidez

- Ajustar el pH de las muestras entre 5 y 9 unidades de pH, para el efecto utilizar soluciones de HCl 1N o NH<sub>4</sub>OH hasta conseguir las medidas indicadas.
- En un nessler medir 50 ml de muestra previamente ajustada el pH.
- Añadir 2ml del reactivo de color a los 50 ml de muestra y mezclar.
- Entre 10 minutos y 2 horas se puede dar la lectura de las absorbancias den el espectrofotómetro.
- Encerar el equipo con agua destilada.
- Leer las absorbancias del blanco, de los patrones y de las muestras a una longitud de onda de 543 nm.

#### **5.4 Tratamiento de los Resultados. -**

Las concentraciones de nitritos se determinarán en función de la curva de calibración. Los resultados de todas las determinaciones se documentarán tres cifras significativas.

##### **5.4.1 Criterios de Aceptación y Rechazo. -**

Se aceptará un  $R^2 \geq 0.995$  de la curva de calibración efectuada para el análisis y se correrá junto con las muestras un patrón de concentración conocida; se considera aceptado, caso contrario se procede a rechazar todos los ensayos realizados dentro del lote.

#### **5.5 Medidas de Seguridad.**

Se recomienda utilizar guantes, mandil, pera de succión y zapatos apropiados.

## **6 ANEXO**

Se incluye el diagrama de la técnica analítica

## ANEXO

### MARCHA ANALITICA PARA MUESTRAS Y PATRONES

Medir 5ml del patrón comercial de 1000mg/l aforar a 100 ml para obtener un patrón de 50mg/l



Medir 10ml del patrón 50mg/l aforar a 100mL para obtener un patrón de 5mg/l



Preparar la curva de calibración



Adicionar 2ml de reactivo de color en los patrones

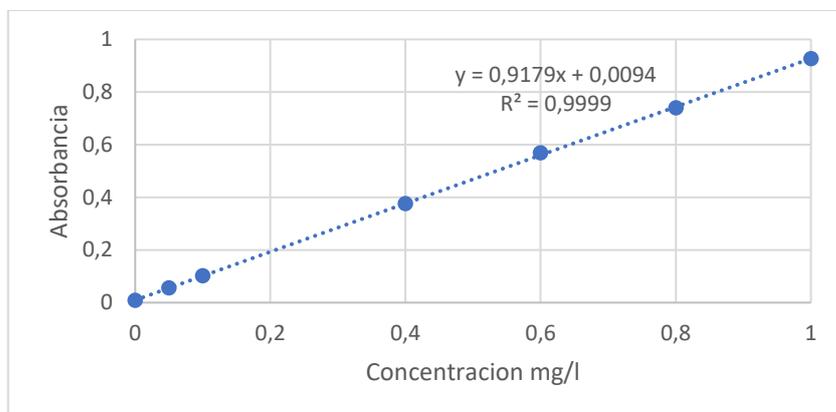


Medir 50 ml de las muestras filtradas, adicionar 2 ml de reactivo de color



Esperar el desarrollo de color (10 min a 2 horas) y leer la absorbancia a 543nm

## Anexo 2. Cálculo de Selectividad/ Especificidad



Selectividad	Absorbancia	Concentración	Valor mg/l	%Recuperación
Muestra	0,091	0,089		
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,456	0,487	0,398	99,4
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,459	0,490	0,401	100,2
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,457	0,488	0,399	99,7
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,454	0,484	0,395	98,9
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,458	0,489	0,400	100,0
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,456	0,487	0,398	99,4
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,457	0,488	0,399	99,7
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,459	0,490	0,401	100,2
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,454	0,48	0,395	98,9
Muestra + 0,4mg/l NO2	0,455	0,49	0,397	99,1
Promedio	0,457	0,487	0,398	99,5

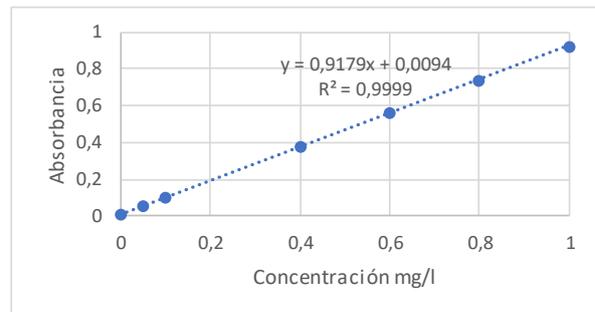
Especificidad	Absorbancia	Concentración
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,065	-0,081
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,062	-0,078
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,060	-0,076
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,066	-0,082
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,063	-0,079
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,062	-0,078
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,060	-0,076
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,060	-0,076
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,061	-0,077
Muestra + 0,4mg/l NO2+0,4 mgl Fe	-0,060	-0,076
Promedio	-0,062	-0,078

## Anexo 3. Cálculo de Linealidad/ Función Respuesta

### Curvas de Calibración

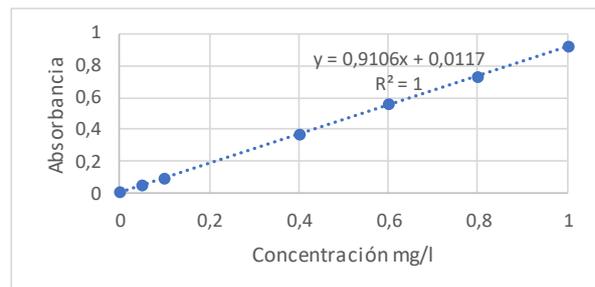
#### Curva 1

Patrones	Abs	Conc
0	0,008	-0,00152522
0,05	0,055	0,04967861
0,1	0,101	0,09979301
0,4	0,376	0,39938991
0,6	0,568	0,60856302
0,8	0,740	0,79594727
1	0,926	0,99858372



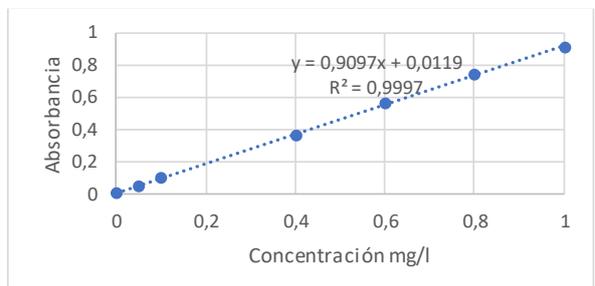
#### Curva 2

Patrones	Abs	Conc
0	0,01	-0,0018669
0,05	0,057	0,04974742
0,1	0,103	0,10026356
0,4	0,378	0,40226224
0,6	0,561	0,60322864
0,8	0,736	0,79540962
1	0,923	1,00076872



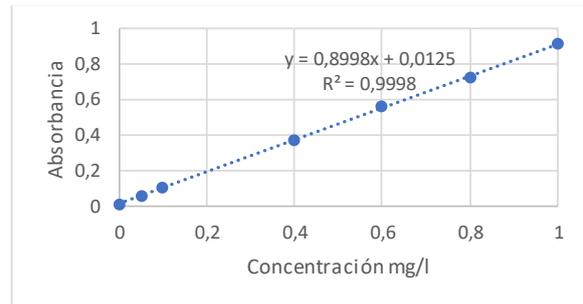
#### Curva 3

Patrones	Abs	Conc
0	0,011	-0,00098934
0,05	0,055	0,04737826
0,1	0,103	0,1001429
0,4	0,372	0,39584478
0,6	0,57	0,61349896
0,8	0,742	0,80257228
1	0,914	0,9916456



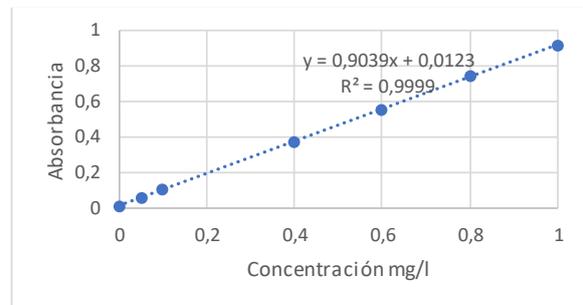
### Curva 4

Patrones	Abs	Conc
0	0,011	-0,00166704
0,05	0,056	0,04834408
0,1	0,103	0,10057791
0,4	0,374	0,40175595
0,6	0,561	0,60957991
0,8	0,723	0,78961992
1	0,914	1,00188931



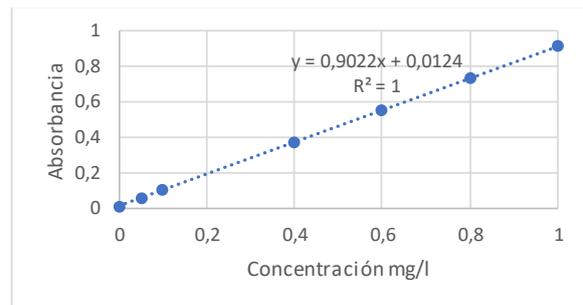
### Curva 5

Patrones	Abs	Conc
0	0,011	-0,00143821
0,05	0,056	0,04834606
0,1	0,106	0,10366191
0,4	0,372	0,39794225
0,6	0,554	0,59929196
0,8	0,742	0,80727957
1	0,912	0,99535347



### Curva 6

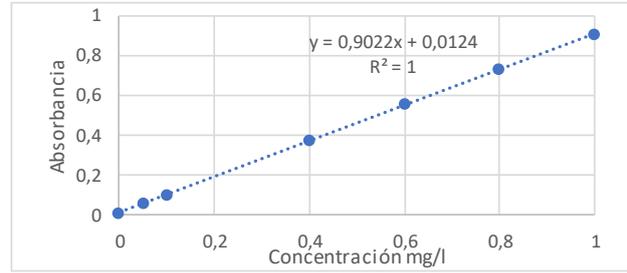
Patrones	Abs	Conc
0	0,01	-0,00266016
0,05	0,057	0,04943472
0,1	0,104	0,10152959
0,4	0,373	0,39968965
0,6	0,557	0,60363556
0,8	0,736	0,80203946
1	0,911	0,99600975



## Anexo 4. Cálculo del Efecto Matriz

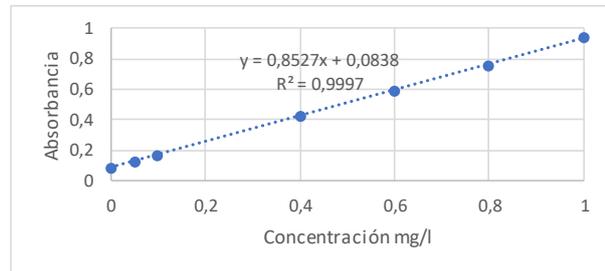
### Curva Estándar

Patrones	Abs	Conc
0	0,01	-0,002660164
0,05	0,057	0,049434715
0,1	0,104	0,101529594
0,4	0,373	0,399689648
0,6	0,557	0,603635558
0,8	0,736	0,802039459
1	0,911	0,996009754



### Fortificados en cada punto de la curva de calibración

Puntos de la Curva	Absorbancia	Concentración
0	0,087	0,003752785
0,05	0,128	0,051835347
0,1	0,169	0,099917908
0,4	0,423	0,397795239
0,6	0,59	0,59364372
0,8	0,759	0,791837692
1	0,946	1,011141081



## Anexo 5. Cálculo de Veracidad

OBSERVAC	MR WS					0,497 mg/l
	1	2	3	4	5	
1	0,504	0,503	0,504	0,504	0,508	
2	0,504	0,506	0,510	0,506	0,506	
3	0,502	0,506	0,505	0,501	0,504	
4	0,506	0,501	0,506	0,503	0,506	
5	0,505	0,501	0,510	0,505	0,504	

DÍAS	MEDIA Li	DÍAS		(Lij - Li)^2	0,00E+00	1,03E-05	4,66E-08	4,68E-06	
		(Li - L)^2	5(Li - L)^2						
Día 1	0,504	3,35E-07	1,68E-06	4,85E-08	0,00E+00	1,03E-05	4,66E-08	4,68E-06	
Día 2	0,503	1,88E-06	9,41E-06	4,85E-08	4,79E-06	1,03E-05	5,63E-06	0,00E+00	
Día 3	0,507	3,65E-06	1,83E-05	5,86E-06	4,79E-06	4,56E-06	9,13E-06	1,17E-06	
Día 4	0,504	5,14E-07	2,57E-06	3,93E-06	4,79E-06	1,14E-06	7,45E-07	0,00E+00	
Día 5	0,506	5,72E-07	2,86E-06	7,75E-07	4,79E-06	1,03E-05	1,68E-06	1,17E-06	
		SDCB =		3,48E-05			SDCW =		9,06E-05
MEDIA GENERAL	0,505								
Des. Stand	0,00229								

Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL^2	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	3,48E-05	8,69E-06	0,00213	0,00232	8,33E-07	1,92	2,87
Dentro del grupo	20	9,06E-05	4,53E-06					
Total	24	1,25E-04	5,2218E-06					

CV = RSD	0,00453	%CVr	0,422	%CVR	0,459
% Recuperación	102				

OBSERVAC	MR WP					0,503	mg/l
	1	2	3	4	5		
1	0,506	0,508	0,511	0,504	0,504		
2	0,510	0,505	0,505	0,500	0,509		
3	0,510	0,503	0,506	0,509	0,501		
4	0,508	0,503	0,509	0,512	0,501		
5	0,508	0,506	0,506	0,506	0,503		

DÍAS	MEDIA Li	DÍAS				8,09E-06	1,48E-05	3,77E-06	4,19E-07
		(Li - L) <sup>2</sup>	5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>				
Día 1	0,508	5,40E-06	2,70E-05	4,85E-06	8,09E-06	1,48E-05	3,77E-06	4,19E-07	
Día 2	0,505	1,25E-06	6,26E-06	1,21E-06	1,91E-07	6,57E-06	3,92E-05	2,46E-05	
Día 3	0,507	1,12E-06	5,61E-06	1,21E-06	2,34E-06	2,24E-06	5,63E-06	6,71E-06	
Día 4	0,506	2,64E-08	1,32E-07	0,00E+00	2,34E-06	2,92E-06	3,15E-05	6,71E-06	
Día 5	0,504	5,89E-06	2,95E-05	0,00E+00	4,31E-07	2,24E-06	4,66E-08	1,86E-07	
		SDCB = 6,85E-05					SDCW = 1,68E-04		
MEDIA GENERAL	0,506								
Des. Stand	0,00314								

Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	6,85E-05	1,71E-05	0,00290	0,00319	1,74E-06	2,04	2,87
Dentro del grupo	20	1,68E-04	8,41E-06					
Total	24	2,37E-04						

CV = RSD      0,00620                      %CVr      0,573                      %CVR      0,630

% Recuperación      101

## Anexo 6. Cálculo de Precisión / ANOVA

MATRIZ AGUA NATURAL NIVEL BAJO								
OBSERVAC	DÍAS					0,05 mg/l		
	1	2	3	4	5			
1	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05			
2	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05			
3	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05			
4	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05			
5	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05			

TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
DÍAS	MEDIA Li	DÍAS						
		(Li - L)^2	5(Li - L)^2	(Lij - Li)^2				
Día 1	0,0500	2,82E-08	1,41E-07	4,36E-07	4,31E-07	1,82E-07	1,86E-07	1,17E-06
Día 2	0,0497	2,22E-08	1,11E-07	1,94E-07	1,91E-07	4,11E-07	1,86E-07	0
Día 3	0,0496	6,40E-08	3,20E-07	1,94E-07	4,31E-07	1,82E-07	4,19E-07	1,17E-06
Día 4	0,0501	6,77E-08	3,39E-07	4,36E-07	1,91E-07	1,82E-07	1,86E-07	4,68E-06
Día 5	0,0498	6,92E-10	3,46E-09	1,94E-07	1,91E-07	4,11E-07	4,19E-07	0
		SDCB =	9,14E-07				SDCW =	1,268E-05
MEDIA GENERAL	0,0498							
Des. Stand	0,000753							

ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL^2	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	9,14E-07	2,29E-07	0,000796	0,000796	-8,11E-08	0,361	2,87
Dentro del grupo	20	1,27E-05	6,34E-07					
Total	24	1,36E-05						

MATRIZ AGUA NATURAL NIVEL INTERMEDIO						0,2 mg/l		
OBSERVAC	DÍAS							
	1	2	3	4	5			
1	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20			
2	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20			
3	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20			
4	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20			
5	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20			

TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
	MEDIA Li	DÍAS						
		(Li - L) <sup>2</sup>	5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>				
Día 1	0,199	2,54E-06	1,27E-05	2,37E-06	2,34E-06	7,30E-07	7,45E-07	3,00E-06
Día 2	0,199	4,42E-07	2,21E-06	4,36E-07	3,06E-06	1,17E-05	3,77E-06	1,87E-07
Día 3	0,200	6,12E-08	3,06E-07	1,94E-07	2,34E-06	5,52E-06	1,68E-06	1,87E-07
Día 4	0,202	3,32E-06	1,66E-05	3,10E-06	1,91E-07	3,70E-06	4,66E-08	4,22E-07
Día 5	0,201	4,65E-07	2,33E-06	1,94E-07	3,06E-06	8,94E-06	1,68E-06	2,30E-06
		SDCB = 3,42E-05					SDCW = 6,19E-05	
MEDIA GENERAL	0,200							
Des. Stand	0,00200							

ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	3,42E-05	8,54E-06	0,00176	0,00205	1,0889E-06	2,760	2,866
Dentro del grupo	20	6,19E-05	3,09E-06					
Total	24	9,60E-05						

MATRIZ AGUA NATURAL NIVEL ALTO									
OBSERVAC	DÍAS					0,6 mg/l			
	1	2	3	4	5				
1	0,59	0,60	0,59	0,59	0,59				
2	0,59	0,59	0,59	0,59	0,59				
3	0,60	0,59	0,59	0,59	0,60				
4	0,60	0,59	0,60	0,59	0,61				
5	0,59	0,60	0,60	0,60	0,61				
TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA									
	DÍAS								
	MEDIA Li	(Li - L) <sup>2</sup>	5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>					
Día 1	0,595	1,99E-09	9,94E-09	6,98E-06	2,32E-05	8,94E-06	1,05E-05	1,08E-04	
Día 2	0,593	1,99E-06	9,97E-06	2,37E-06	8,09E-06	1,65E-05	1,16E-06	6,76E-05	
Día 3	0,592	5,71E-06	2,85E-05	8,19E-06	1,55E-05	8,94E-06	1,23E-32	2,27E-05	
Día 4	0,595	1,24E-07	6,21E-07	3,10E-06	4,31E-07	3,08E-05	1,23E-32	4,80E-05	
Día 5	0,599	1,76E-05	8,81E-05	1,94E-07	6,89E-06	2,01E-05	1,86E-05	4,80E-05	
		SDCB = 1,27E-04					SDCW = 4,85E-04		
MEDIA GENERAL	0,595								
Des. Stand	0,00505								
ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA									
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado	
Entre grupos	4	1,27E-04	3,18E-05	0,00492	0,00507	1,5168E-06	1,31	2,87	
Dentro del grupo	20	4,85E-04	2,42E-05						
Total	24	6,12E-04	2,54961E-05						

MATRIZ AGUA RESIDUAL NIVEL BAJO										
OBSERVAC	DÍAS					1,0	mg/l			
	1	2	3	4	5					
1	1,01	1,00	1,01	1,01	1,00					
2	1,00	1,01	1,00	1,01	1,01					
3	1,02	1,00	1,01	1,01	1,00					
4	1,00	1,00	1,00	1,02	1,01					
5	1,01	1,00	1,01	1,01	0,99					
TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA										
	MEDIA Li	DÍAS			5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>				
		(Li - L) <sup>2</sup>								
Día 1	1,00649	9,53E-07	4,76E-06	1,94E-07	0,00E+00	1,82E-07	1,19E-05	1,52E-05		
Día 2	1,00186	1,34E-05	6,69E-05	2,35E-05	4,31E-05	6,57E-06	1,68E-06	8,26E-05		
Día 3	1,00639	7,64E-07	3,82E-06	1,12E-04	4,79E-06	2,92E-06	7,45E-07	3,00E-06		
Día 4	1,0112	3,25E-05	1,63E-04	2,35E-05	1,91E-05	6,57E-06	2,68E-05	4,80E-05		
Día 5	1,00162	1,52E-05	7,58E-05	1,94E-07	0,00E+00	1,48E-05	1,68E-06	0,000107921		
		SDCB = 0,000314					SDCW = 0,000556			
MEDIA GENERAL	1,00552									
Des. Stand	0,00602									

ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	3,14E-04	7,85E-05					
Dentro del grupo	20	5,56E-04	2,78E-05	0,00527	0,00616	0,0000101	2,82	2,87
Total	24	8,71E-04						

MATRIZ AGUA RESIDUAL NIVEL INTERMEDIO										
OBSERVAC	DÍAS					2,0	mg/l			
	1	2	3	4	5					
1	2,01	2,01	2,01	2,01	2,01					
2	2,00	1,99	2,00	1,99	2,01					
3	2,01	1,99	2,01	2,00	2,02					
4	2,00	2,00	2,01	2,01	2,01					
5	2,01	2,00	2,00	2,01	2,01					
TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA										
	MEDIA Li	DÍAS			5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>				
		(Li - L) <sup>2</sup>								
Día 1	2,00771	7,72E-06	3,86E-05	4,36E-05	1,20E-04	4,56E-06	4,66E-06	4,68E-06		
Día 2	2,00	7,86E-05	3,93E-04	9,81E-05	1,20E-04	1,03E-05	1,97E-04	1,05E-05		
Día 3	2,00551	3,45E-07	1,73E-06	1,21E-06	2,99E-05	5,59E-05	1,05E-05	5,74E-05		
Día 4	2,00475	3,22E-08	1,61E-07	1,94E-05	2,99E-05	4,56E-06	5,70E-05	1,05E-05		
Día 5	2,0106	3,22E-05	1,61E-04	4,36E-05	0,00E+00	7,30E-05	5,70E-05	1,05391E-05		
		SDCB = 5,95E-04					SDCW = 1,07E-03			
MEDIA GENERAL	2,00493									
Des. Stand	0,00834									

ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	5,95E-04	1,49E-04					
Dentro del grupo	20	1,07E-03	5,36E-05	0,00732	0,00852	0,0000190	2,77	2,87
Total	24	1,67E-03						

MATRIZ AGUA RESIDUAL NIVEL ALTO									
OBSERVAC	DÍAS					4	mg/l		
	1	2	3	4	5				
1	3,98	4,02	4,02	4,02	3,99				
2	4,01	3,99	4,00	4,02	3,98				
3	3,96	3,99	4,03	4,01	4,01				
4	4,02	3,98	4,02	4,00	3,99				
5	4,00	4,00	3,99	3,99	4,01				

TABLA PARA ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA									
DÍAS	MEDIA Li	DÍAS							
		(Li - L) <sup>2</sup>	5(Li - L) <sup>2</sup>	(Lij - Li) <sup>2</sup>					
Día 1	3,99	8,97E-05	4,48E-04	7,75E-05	6,89E-04	1,82E-05	1,68E-04	4,22E-05	
Día 2	4,00	1,75E-05	8,73E-05	1,74E-04	4,31E-05	4,11E-05	1,68E-04	3,00E-04	
Día 3	4,0110	6,66E-05	3,33E-04	9,50E-04	4,31E-05	2,24E-04	4,66E-06	2,30E-04	
Día 4	4,0117	7,72E-05	3,86E-04	5,86E-04	3,06E-04	1,82E-05	7,45E-05	4,22E-05	
Día 5	4,000	1,09E-05	5,44E-05	4,85E-06	1,91E-05	2,92E-04	3,77E-04	2,30E-04	
		SDCB =		1,31E-03			SDCW =		5,12E-03
MEDIA GENERAL	4,00287								
Des. Stand	0,0164								

ANALISIS SIMPLE DE LA VARIANZA								
Origen de la varianza	Grados de libertad (v)	Sumas de diferencias cuadráticas (SDC)	Diferencias cuadráticas medias (DCM = SDC/v) (varianzas)	Repetibilidad (Sr)	Reproducibilidad (SR)	SL <sup>2</sup>	F calculado	F tabulado
Entre grupos	4	1,31E-03	3,27E-04	0,0160	0,0164	1,43E-05	1,28	2,87
Dentro del grupo	20	5,12E-03	2,56E-04					
Total	24	6,43E-03						

## Anexo 8. Cálculo de la Incertidumbre

### Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua natural en Nivel Bajo 0,05mg/l

Función de respuesta (recta/curva de calibración),  $\mu(FR)$

m,b	930	-0,278
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sl	0,999	12,6

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual

sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

Co 0,0498

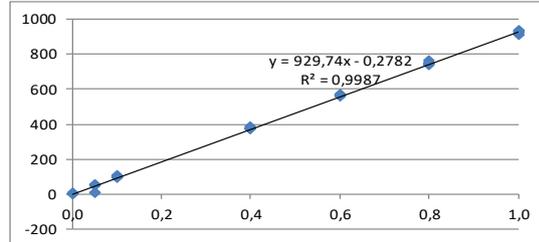
C~ 0,421

p= 25

n= 35

$$IER_{FR} =$$

1,083E-05



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibración
Co	Concentr. Leída de la muestra
C~	Concent. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 1ml	R	0,000796 mg/l
Vcal	0,00205 mL	uR	0,000796 mg/l
uT	0,000485 mL		
uV=	0,00211 mL		

Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO2:  $\mu C$

ucert.cal	4
U <sub>calibración</sub> (k=2)	2
Concentración Sol. NC	1000 mg/l
uSol.Conc=	0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	1,083E-05	1,083E-05	1,17E-10
SOL.CONCENT	1	0,00200	0,00200	0,00000400
PIPETA 1ml	1	0,00211	0,00211	0,00000444
R	0,05	0,000796	0,0160	0,000256
SESGO	1	0,0306	0,0306	0,000938

TOTAL	0,00120
uNitritos=	0,0347
uNitritos=	3,47 %
U=	k x uc
U=	6,93 %

100%	0,005 mg/L
6,93	X
	0,000347 mg/L

## Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua natural en Nivel Intermedio 0,20 mg/l

Función de respuesta (recta/curva de calibración),  $\mu(FR)$

m,b	930	-0,278
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sL	0,999	12,6

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual

sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

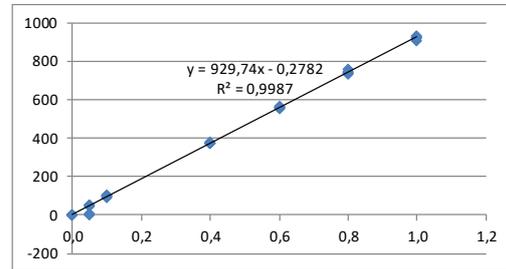
Co 0,200

C~ 0,421

p= 25

n= 35

$$IER_{FR} = 9,71E-06$$



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibración
Co	Concentr. Leida de la muestra
C~	Concent. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 2ml	R	0,00205 mg/l
Vcal	0,00310 mL	uR	0,00205 mg/l
uT	0,000970 mL		
uV=	0,00325 mL		

Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO<sub>2</sub>:  $\mu C$

ucert.cal	4
U <sub>calibración</sub> (k=2)	2
Concentración Sol. NO <sub>3</sub> :	1000 mg/l
uSol.Conc=	0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	9,71E-06	9,71E-06	9,44E-11
SOL.CONCENT	1	0,00200	0,00200	4,00E-06
PIPETA 2ml	2	0,00325	0,00162	2,64E-06
R	0,200	0,00205	0,0102	0,000104
SESGO	1	0,0306	0,0306	0,000938
<b>TOTAL</b>				0,00105
<b>uNitritos=</b>				0,0324
<b>uNitritos=</b>				3,24 %
<b>U=</b>				k x uc
<b>U=</b>				6,48 %

100% 0,2 mg/L  
 X  
 6,48 0,0130 mg/L

## Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua natural en Nivel Alto 0,60mg/l

Función de respuesta (recta/curva de calibración),  $\mu(FR)$

m,b	930	-0,28
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sL	1,00	12,58

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual

sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

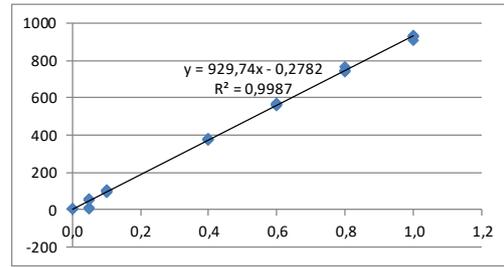
Co 0,595

C~ 0,421

p= 25

n= 35

$$IER_{FR} = 9,46E-06$$



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibracion
Co	Concentr. Leida de la muestra
C~	Concent. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 5 ml	Vm	Pipeta 1ml	R	0,00507 mg/l
Vcal	0,00750 mL	Vcal	0,00205 mL	uR	0,00507 mg/l
uT	0,00242 mL	uT	0,000485 mL		
uV=	0,00788 mL	uV=	0,00211 mL		

Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO2:  $\mu C$

ucert.cal 4

U<sub>calibración</sub> (k=2) 2

Concentración Sol. NO3: 1000 mg/l

uSol.Conc= 0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	9,46E-06	9,46E-06	8,95E-11
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 5 ml	5	7,88E-03	1,58E-03	2,49E-06
PIPETA 1 ml	1	2,11E-03	2,11E-03	4,44E-06
R	0,595	5,07E-03	8,53E-03	7,28E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
<b>TOTAL</b>				0,00102
<b>uNitritos=</b>				0,0320
<b>uNitritos=</b>				3,20 %
<b>U=</b>				k x uc
<b>U=</b>				6,39 %

100% 0,60 mg/L  
6,39 X  
0,0384 mg/L

## Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua residual en Nivel Bajo 1mg/l

### Función de respuesta (recta/curva de calibración), $\mu(FR)$

m,b	930	-0,28
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sL	1,00	12,58

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual

sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

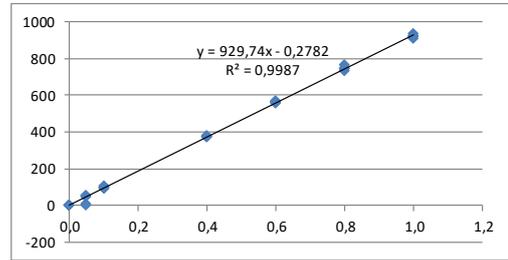
Co 1,00552

C~ 0,421

p= 25

n= 35

$IER_{FR} =$  1,30E-05



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibración
Co	Concentr. Leída de la muestra
C~	Concent. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

### Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 10 ml	Vm	Pipeta 25 ml	R	0,00616 mg/l
Vcal	0,0140 mL	Vcal	0,0325 mL	uR	0,00616 mg/l
uT	0,00485 mL	uT	0,0121 mL		
uV=	0,0148 mL	uV=	0,0347 mL		

### Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO<sub>2</sub>: $\mu C$

ucert.cal	4
U <sub>calibración</sub> (k=2)	2
Concentración Sol. NC	1000 mg/l
uSol.Conc=	0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	1,30E-05	1,30E-05	1,69E-10
SOL.CONCENT	1	0,00200	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 10 ml	10	0,0148	1,48E-03	2,20E-06
PIPETA 25 ml	25	0,0347	1,39E-03	1,93E-06
R	1,00552	0,00616	6,13E-03	3,75E-05
SESGO	1	0,0306	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000983
uNitritos=				0,0314
uNitritos=				3,14 %
U=				k x uc
U=				6,27 %

100% 1,00 mg/L  
6,27 X  
0,0627 mg/L

## Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua residual en Nivel Intermedio 2 mg/l

Función de respuesta (recta/curva de calibración),  $\mu(FR)$

m,b	930	-0,28
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sL	1,00	12,58

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual

sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

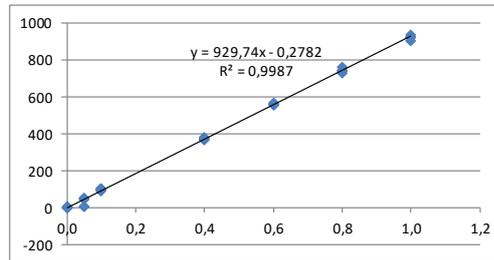
Co 2,005

C~ 0,421

p= 25

n= 35

$$IER_{FR} = 2,69E-05$$



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibración
Co	Concentr. Leida de la muestra
C~	Concent. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 20 ml	Vm	Pipeta 10 ml	R	0,00852 mg/l
Vcal	0,0265 mL	Vcal	0,0140 mL	uR	0,00852 mg/l
uT	0,00970 mL	uT	0,00485 mL		
uV=	0,0282 mL	uV=	0,0148 mL		

Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO2:  $\mu C$

ucert.cal	4
U <sub>calibración</sub> (k=2)	2
Concentración Sol. NC	1000 mg/l
uSol.Conc=	0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	2,69E-05	2,69E-05	7,25E-10
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 20 ml	20	2,82E-02	1,41E-03	1,99E-06
PIPETA 10 ml	10	1,48E-02	1,48E-03	2,20E-06
R	2	8,52E-03	4,25E-03	1,81E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000964
uNitritos=				0,0310
uNitritos=				3,10 %
U=				k x uc
U=				6,21 %

100% 2,00 mg/L  
 6,21 X  
 0,124 mg/L

## Cálculo de la Incertidumbre de la matriz de agua residual en Nivel Alto 4 mg/l

Función de respuesta (recta/curva de calibración),  $\mu(FR)$

m,b	930	-0,28
sm,sLo	5,84	3,25
r2,sL	1,00	12,58

$$\mu_{FR} = \frac{sL}{m} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(C_0 - \bar{C})^2}{S_{xx}}}$$

Desviación estandar residual  
sL= 0,0321

$$S_{xx} = \sum_{j=1}^n (C_j - \bar{C})^2$$

Sxx 4,65

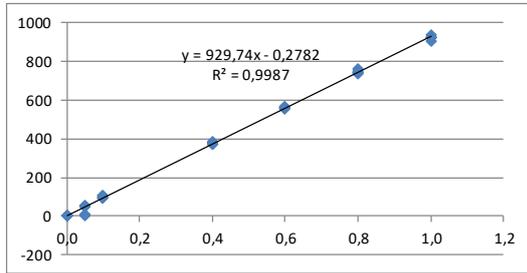
Co 4,00

C~ 0,421

p= 25

n= 35

$IER_{FR} =$  5,81E-05



sL	Desviación estandar residual
m	pendiente
p	# lecturas para determinar Co
n	# lecturas para calibración
Co	Concentr. Leida de la muestra
C~	Concentr. Prom. patrones curva Cal
Sxx	Σ de cuadrados de los residuales de las conc. Obtenidas
Cj	# medidas para obtener la curva de calibración

Contribución a la Incertidumbre por el material volumétrico empleado para realizar las diluciones

Vm	Pipeta 40 ml	Vm	Pipeta 5 ml	R	0,0164 mg/l
Vcal	0,0550 mL	Vcal	0,00750 mL	uR	0,0164 mg/l
uT	0,0194 mL	uT	0,00242 mL		
uV=	0,0583 mL	uV=	0,00788 mL		

Contribución a la Incertidumbre debida a la solución concentrada de NO2:  $\mu C$

ucert.cal	4
Ucalibración (k=2)	2
Concentración Sol. NC	1000 mg/l
uSol.Conc=	0,00200

DESCRIPCIÓN	Valor (x)	Incertidumbre estándar (u <sub>x</sub> )	Incertidumbre estándar relativa (u <sub>x</sub> /x)	(u <sub>x</sub> /x) <sup>2</sup>
FR	1	5,81E-05	5,81E-05	3,37E-09
SOL.CONCENT	1	2,00E-03	2,00E-03	4,00E-06
PIPETA 40 ml	40	5,83E-02	1,46E-03	2,13E-06
PIPETA 5 ml	5	7,88E-03	1,58E-03	2,49E-06
R	4	1,64E-02	4,11E-03	1,69E-05
SESGO	1	3,06E-02	3,06E-02	9,38E-04
TOTAL				0,000963
uNitritos=				0,0310
uNitritos=				3,10 %
U=				k x uc
U=				6,21 %

100% 4 mg/L  
6,21 X  
0,248 mg/L

## Anexo 9. Declaración del Método Validado

Método analítico: PEE/LS/FQ/09

CUANTITATIVO	<input checked="" type="checkbox"/>	<b>Analito: NITRITOS</b> <b>Unidades: mg/l</b> <b>Matriz: AGUA NATURALES, AGUAS RESIDUALES</b>
CUALITATIVO	<input type="checkbox"/>	
DE IDENTIFICACIÓN	<input type="checkbox"/>	

FUNCIÓN DE RESPUESTA	INSTRUMENTAL	DEL MÉTODO
m	0,0117	N/A
S <sub>m</sub>	0,00115	N/A
b	0,907	N/A
S <sub>b</sub>	0,002	N/A
r <sup>2</sup>	0,999	N/A

### PRECISIÓN, EXACTITUD, INCERTIDUMBRE

Nivel: Concentración	Repetibilidad		Reproducibilidad		Exactitud % Recup.	U Expand %U (k= 2)
	Sr	%CVr	SR	%CVR		
0,05 mg/l	0,000796	1,60	0,000796	1,60	99,6	6,93 %
0,2 mg/l	0,00176	0,879	0,00205	1,0218	100	6,48 %
0,6 mg/l	0,00492	0,828	0,00507	0,853	99,1	6,39 %
0,497 m/l	0,00212	0,421	0,00231	0,458	102	6,20%
1,0 mg/l	0,00527	0,525	0,00616	0,613	101	6,27%
2,0 mg/l	0,00732	0,365	0,00852	0,425	100	6,21%
4,0 mg/l	0,0160	0,399	0,0164	0,410	100	6,21%
0,503 mg/l	0,00289	0,572	0,00318	0,629	101	5,04%

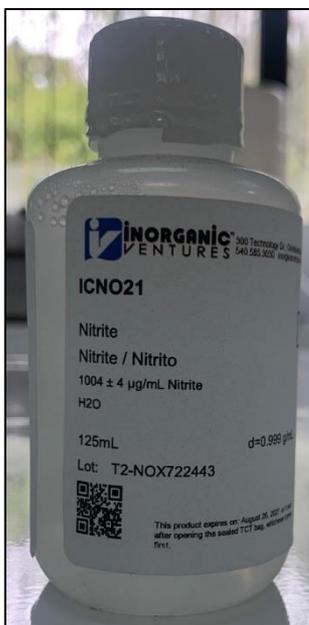
LÍMITE DE DETECCIÓN (L.D.)	0,04
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN (L.C.)	0,05
<b>SELECTIVIDAD / ESPECIFICIDAD</b>	
INTERFERENCIAS CONOCIDAS: Color y Solidos Suspendidos	
TIPO DE INTERFERENCIA: Dilución y Filtración	
CORRECCIÓN:	

**INTERVALO DE TRABAJO VALIDADO: 0,05 – 1 mg/l**

### CRITERIOS DE ACEPTACIÓN / RECHAZO:

Se cumplen los objetivos de validación, por lo que se declara el método como VALIDADO.

## Anexo 10. Fotografías



Fotografía 1. Estándar Primario de Nitritos



Fotografía 2. Material de Referencia Nitritos



Fotografía 3. Curvas de Calibración de Nitritos



*Fotografía 4. Filtración de muestras para el análisis de nitritos*

# Apéndice A. Certificado del Estándar primario de Nitritos



## Certificate of Analysis

300 Technology Drive  
Christiansburg, VA 24073 USA  
inorganicventures.com

P: 800-669-6799/540-585-3030  
F: 540-585-3012  
info@inorganicventures.com

### 1.0 ACCREDITATION / REGISTRATION

**INORGANIC VENTURES** is accredited to ISO 17034, "General Requirements for the Competence of Reference Material Producers" and ISO/IEC 17025, "General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories". Inorganic Ventures is also an ISO 9001 registered manufacturer (QSR Certificate Number QSR-1034).



### 2.0 PRODUCT DESCRIPTION

Product Code: Single Analyte Ion Chromatography Solution  
Catalog Number: ICNO21  
Lot Number: T2-NOX722443  
Matrix: H2O  
Value / Analyte(s): 1 000 µg/mL ea:  
Nitrite  
Starting Material: Sodium nitrite  
Starting Material Lot#: 1574  
Starting Material Purity: 99.5500%

### 3.0 CERTIFIED VALUES AND UNCERTAINTIES

**Certified Value:** 1004 ± 4 µg/mL  
**Density:** 0.999 g/mL (measured at 20 ± 4 °C)

#### Assay Information:

**Assay Method #1**      **1005 ± 3 µg/mL**  
IC Assay NIST SRM Lot Number: traceable to 40h

**Assay Method #2**      **1001 ± 4 µg/mL**  
Calculated NIST SRM Lot Number: See Sec. 4.2

- The Calculated Value is a value calculated from the weight of a starting material that has been certified directly vs. a National Institute of Standards and Technology (NIST) SRM/RM. See Sec 4.2 for balance traceability.

The following equations are used in the calculation of the certified value and the uncertainty. Reported uncertainties represent expanded uncertainties expressed at approximately the 95% confidence level using a coverage factor of k = 2.

#### Characterization of CRM/RM by Two or More Methods

Certified Value,  $X_{\text{CRM/RM}}$ , where two or more methods of characterization are used is the weighted mean of the results:

$$X_{\text{CRM/RM}} = \sum (w_i) (X_i)$$

$X_i$  = mean of Assay Method  $i$  with standard uncertainty  $u_{\text{char } i}$

$w_i$  = the weighting factors for each method calculated using the inverse square of the variance:

$$w_i = (1/u_{\text{char } i}^2) / (\sum 1/(u_{\text{char } i}^2))$$

$$\text{CRM/RM Expanded Uncertainty } (\pm) = U_{\text{CRM/RM}} = k (u_{\text{char}}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{Its}}^2 + u_{\text{ts}}^2)^{1/2}$$

$k$  = coverage factor = 2

$u_{\text{char}} = (\sum (w_i)^2 (u_{\text{char } i}^2))^{1/2}$  where  $u_{\text{char } i}$  are the errors from each characterization method

$u_{\text{bb}}$  = bottle to bottle homogeneity standard uncertainty

$u_{\text{Its}}$  = long term stability standard uncertainty (storage)

$u_{\text{ts}}$  = transport stability standard uncertainty

#### Characterization of CRM/RM by One Method

Certified Value,  $X_{\text{CRM/RM}}$ , where one method of characterization is used is the mean of individual results:

$$X_{\text{CRM/RM}} = (X_a) / (u_{\text{char } a})$$

$X_a$  = mean of Assay Method A with

$u_{\text{char } a}$  = the standard uncertainty of characterization Method A

$$\text{CRM/RM Expanded Uncertainty } (\pm) = U_{\text{CRM/RM}} = k (u_{\text{char } a}^2 + u_{\text{bb}}^2 + u_{\text{Its}}^2 + u_{\text{ts}}^2)^{1/2}$$

$k$  = coverage factor = 2

$u_{\text{char } a}$  = the errors from characterization

$u_{\text{bb}}$  = bottle to bottle homogeneity standard uncertainty

$u_{\text{Its}}$  = long term stability standard uncertainty (storage)

$u_{\text{ts}}$  = transport stability standard uncertainty

### 4.0 TRACEABILITY TO NIST

- This product is traceable to NIST via an unbroken chain of comparisons. The uncertainties for each certified value are reported, taking into account the SRM/RM uncertainty error and the measurement, weighing and volume dilution errors. In rare cases where no NIST SRM/RM are available, the term 'in-house std.' is specified.

#### 4.1 Thermometer Calibration

- All thermometers are NIST traceable through thermometers that are calibrated by an accredited calibration laboratory.

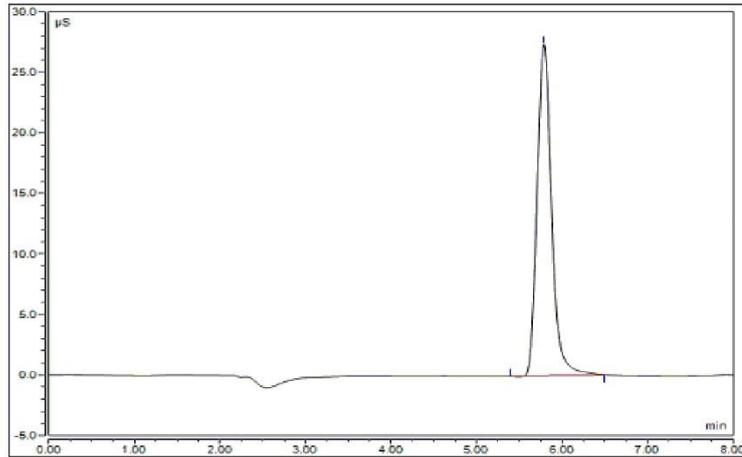
#### 4.2 Balance Calibration

- All analytical balances are calibrated by an accredited calibration laboratory and procedure. The weights used for testing are annually compared to master weights and are traceable to NIST.

#### 4.3 Glassware Calibration

- An in-house procedure is used to calibrate all Class A glassware used in the manufacturing and quality control of CRM/RMs.

### 5.0 CHROMATOGRAM



**Thermo Easion Ion Chromatograph**

<b>Analytical Column:</b>	IonPac AS22 4 x 250 mm	<b>Eluent:</b>	4.5mM Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> /1.4mM NaHCO <sub>3</sub>
<b>Guard Column:</b>	IonPac AG22 4 x 50 mm	<b>Eluent Flow Rate:</b>	1.2 mL/min
<b>Anion Self Regen Suppressor/ Chemical Suppression:</b>	ACRS 500 4 mm/36mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	<b>Column Temp:</b>	20°C
<b>Cation Self Regen Suppressor/ Chemical Suppression:</b>	N/A	<b>Cell Temp:</b>	35°C
<b>Suppressor Current/ Chemical Suppressant:</b>	N/A	<b>Scale X-Axis:</b>	minutes
		<b>Scale Y-Axis:</b>	30 μS/cm
		<b>Concentration:</b>	20 μg/g

**6.0 INTENDED USE**

- For the calibration of analytical instruments and validation of analytical methods as appropriate.

**7.0 INSTRUCTIONS FOR THE CORRECT USE OF THIS REFERENCE MATERIAL**

**7.1 Storage and Handling Recommendations**

- Store between approximately 4° - 30° C while in sealed TCT bag.

- While stored in the sealed TCT bag, transpiration of this CRM/RM is negligible. After opening the sealed TCT bag transpiration of the CRM/RM will occur, resulting in a gradual increase in the analyte concentration(s). It is the responsibility of the user to account for this effect. When the bottle is weighed both before and after being placed in storage, the mass difference observed will be a measure of transpiration mass loss.

- After opening the sealed TCT bag, keep cap tightly sealed when not in use and store between 4° - 24° C to minimize the effects of transpiration. Use at 20° ± 4° C to minimize volumetric dilution error when using the reported density. Do not pipette from the container. Do not return removed aliquots to container.

- For more information, visit [www.inorganicventures.com/TCT](http://www.inorganicventures.com/TCT)

## **8.0 HAZARDOUS INFORMATION**

- Please refer to the Safety Data Sheet for information regarding this CRM/RM.

## **9.0 HOMOGENEITY**

- This solution was mixed according to an in-house procedure and is guaranteed to be homogeneous. Homogeneity data indicate that the end user should take a minimum sample size of 0.2 mL to assure homogeneity.

## **10.0 QUALITY STANDARD DOCUMENTATION**

### **10.1 ISO 9001 Quality Management System Registration**

- QSR Certificate Number QSR-1034

### **10.2 ISO/IEC 17025 "General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories"**

- Chemical Testing - Accredited / A2LA Certificate Number 883.01

### **10.3 ISO 17034 "General Requirements for the Competence of Reference Material Producers"**

- Reference Material Producer - Accredited / A2LA Certificate Number 883.02

Inorganic Ventures, 300 Technology Drive, Christiansburg, Va. 24073, USA; Telephone: 800.669.6799; 540.585.3030; Fax: 540.585.3012; [inorganicventures.com](http://inorganicventures.com); [info@inorganicventures.com](mailto:info@inorganicventures.com)

## **11.0 CERTIFICATION, LOT EXPIRATION AND PERIOD OF VALIDITY**

### **11.1 Certification Issue Date**

August 26, 2022

- The certification is valid within the measurement uncertainty specified provided the CRM/RM is stored and handled in accordance with instructions given in Sec 7.1. This certification is nullified if instructions in Sec 7.1 are not followed or if the CRM/RM is damaged, contaminated, or otherwise modified.

### **11.2 Lot Expiration Date**

- **August 26, 2027**

- The date after which this CRM/RM should not be used.

- The lot expiration date reflects the period of time that the stability of a CRM/RM can be supported by long term stability studies conducted on properly stored and handled CRM/RMs. Lot expiration is limited primarily by transpiration (loss of water from the solution) and infrequently by chemical stability.

**11.3 Period of Validity**

- Sealed TCT Bag Open Date: \_\_\_\_\_

- This CRM/RM should not be used longer than one year (or six months in the case of a 30 mL bottle) from the date of opening the aluminized bag or after the date given in Sec. 11.2, whichever comes first. This is contingent upon the CRM/RM being stored and handled in accordance with the instructions given in Sec. 7.1.

**12.0 NAMES AND SIGNATURES OF CERTIFYING OFFICERS**

**Certificate Prepared By:**

Uyen Truong  
Supervisor, Product Documentation



**Certificate Approved By:**

Thomas Kozikowski  
Manager, Quality Control



**Certifying Officer:**

Paul Gaines  
Chairman / Senior Technical Director



# Apéndice B. Certificado de los Materiales de Referencia empleados



**ERA**  
A Waters Company

**Certified Reference Material**

▪ **Certificate of Analysis** ▪

---

**Product:** WatR™ Pollution Nitrite  
**Catalog Number:** 770  
**Lot No.** P339-770  
**Certificate Issue Date:** June 05, 2023  
**Expiration Date:** February 24, 2026  
**Revision Number:** Original

*Product use instructions are included as part of the certification packet and are paginated separately from this Certificate of Analysis. Please reference the product use instructions for catalog #770 revision 090119.*

**CERTIFICATION**

Parameter	Certified Value <sup>1</sup>	Uncertainty <sup>2</sup>	QC Performance Acceptance Limits <sup>3</sup>	PT Performance Acceptance Limits <sup>4</sup>
	mg/L	%	mg/L	mg/L
Nitrite as N	0.503	4.23	0.449 - 0.558	0.369 - 0.633

**ANALYTICAL VERIFICATION**

Parameter	Certified Value <sup>1</sup>	Proficiency Testing Study			NIST Traceability	
		Mean	Recovery <sup>5</sup>	n	SRM Number <sup>6</sup>	Recovery
	mg/L	mg/L	%			%
Nitrite as N	0.503	0.507	101	145	-	-

---

16341 Table Mountain Pkwy ▪ Golden, CO 80403 ▪ T: 800.372.0122 ▪ 303.431.8454 ▪ [www.eraqc.com](http://www.eraqc.com)

Page 1 of 2 Lot: P339-770

## Certified Reference Material

# ▪ Certificate of Analysis ▪

1. The **Certified Values** are the actual gravimetric/volumetric "made-to" concentrations confirmed by ERA analytical verification. The certified values are monitored and purchasers will be notified of any significant changes resulting in recertification or withdrawal of this certified reference material during the period of validity of this certificate.
2. The **Uncertainty** represents an expanded uncertainty and approximates a 95% confidence interval. The uncertainty is based on the characterization, homogeneity and stability characteristics of the product, multiplied by a coverage factor ( $k=2$ ). The uncertainty applies to the product as supplied and does not take into account any required or optional dilution and/or preparations the laboratory may perform while using this product. The formula used to calculate the expanded uncertainty is:  
$$U_{\text{expanded}} = k * \text{SQRT}((U_{\text{char}})^2 + (U_{\text{homogen}})^2 + (U_{\text{ULTS}})^2 + (U_{\text{USTS}})^2 + (U_{\text{URSS}})^2)$$

Where:

  - $U_{\text{expanded}}$  – Expanded uncertainty.
  - $k$  – Coverage factor.
  - $U_{\text{char}}$  – Combined standard uncertainty of the manufacturing and/or analytical verification assessment.
  - $U_{\text{homogen}}$  – Standard uncertainty of the homogeneity assessment.
  - $U_{\text{ULTS}}$  – Standard uncertainty associated with long-term stability.
  - $U_{\text{USTS}}$  – Standard uncertainty associated with short-term (transport) stability.
  - $U_{\text{URSS}}$  – Standard uncertainty associated with repeated sampling of the product (where permitted by product use instructions).
3. The **QC Performance Acceptance Limits (QC PALS™)** are based on actual historical data collected in ERA's Proficiency Testing program. The QC PALS™ reflect any inherent biases in the methods used to establish the limits and closely approximate a 95% confidence interval of the performance that experienced laboratories should achieve using accepted environmental methods. Use the QC PALS™ to realistically evaluate your performance against your peers.
4. The **PT Performance Acceptance Limits (PT PALS™)** are calculated using the regression equations and fixed acceptance criteria specified in the NELAC proficiency testing requirements. Use the PT PALS™ when analyzing this certified reference material alongside USEPA and NELAC compliant PT study materials. Please note that many PT study acceptance limits are concentration dependent (some non-linearly) and therefore, the acceptance limits of this certified reference material and any PT study material may differ relative to their difference in concentrations.
5. The **PT Performance Data** include the mean value, percent recovery and number of data points reported by laboratories in our Proficiency Testing study compared to the Certified Values. In the event this lot was not used in a proficiency testing scheme, the data displayed was generated internally by ERA.
6. Where NIST Standard Reference Materials (SRMs) are available, each analyte has been analytically traced to the NIST SRM listed. **Analytical Traceability Recovery (%) = [(% recovery ERA certified reference material)/(% recovery NIST SRM)]\*100**  
The traceability data shown were compiled by analyzing this ERA certified reference material and/or its associated stock solution(s) against the applicable NIST SRMs.
7. **Metrological Traceability.** This certified reference material is metrologically traceable to NIST mass reference materials through an unbroken chain of comparisons.
8. For additional information on this product such as intended use, storage information, instructions for use, minimum sample size, and safety information, please refer to the Product Use Instructions provided.

**If you have any questions or need technical assistance, please call ERA technical assistance at 1-800-372-0122 or send an email to [era\\_info@waters.com](mailto:era_info@waters.com).**

**This Certificate of Analysis is authorized by Waters ERA, Quality and Technical departments.**



Page 2 of 2 Lot: P339-770

16341 Table Mountain Pkwy • Golden, CO 80403 • T: 800.372.0122 • 303.431.8454 • [www.eraqc.com](http://www.eraqc.com)



A Waters Company

Certified Reference Material

# ▪ Certificate of Analysis ▪

**Product:** WatR™ Supply Nitrite  
**Catalog Number:** 695  
**Lot No.:** S321-695  
**Certificate Issue Date:** June 30, 2023  
**Expiration Date:** February 24, 2026  
**Revision Number:** Original

*Product use instructions are included as part of the certification packet and are paginated separately from this Certificate of Analysis. Please reference the product use instructions for catalog #695 revision 090119.*

### CERTIFICATION

Parameter	Certified Value <sup>1</sup>	Uncertainty <sup>2</sup>	QC Performance Acceptance Limits <sup>3</sup>	PT Performance Acceptance Limits <sup>4</sup>
	mg/L	%	mg/L	mg/L
Nitrite as N	0.497	5.27	0.442 - 0.552	0.422 - 0.572

### ANALYTICAL VERIFICATION

Parameter	Certified Value <sup>1</sup>	Proficiency Testing Study			NIST Traceability	
		Mean	Recovery <sup>5</sup>	n	SRM Number <sup>6</sup>	Recovery
	mg/L	mg/L	%			%
Nitrite as N	0.497	0.499	100	134	-	-

Page 1 of 2 Lot: S321-695

16341 Table Mountain Pkwy ▪ Golden, CO 80403 ▪ T: 800.372.0122 ▪ 303.431.8454 ▪ [www.eraqc.com](http://www.eraqc.com)

## Certified Reference Material

# ▪ Certificate of Analysis ▪

1. The **Certified Values** are the actual gravimetric/volumetric "made-to" concentrations confirmed by ERA analytical verification. The certified values are monitored and purchasers will be notified of any significant changes resulting in recertification or withdrawal of this certified reference material during the period of validity of this certificate.

2. The **Uncertainty** represents an expanded uncertainty and approximates a 95% confidence interval. The uncertainty is based on the characterization, homogeneity and stability characteristics of the product, multiplied by a coverage factor ( $k=2$ ). The uncertainty applies to the product as supplied and does not take into account any required or optional dilution and/or preparations the laboratory may perform while using this product. The formula used to calculate the expanded uncertainty is:

$$U_{\text{expanded}} = k \cdot \text{SQRT}((U_{\text{char}})^2 + (U_{\text{homogen}})^2 + (U_{\text{LTS}})^2 + (U_{\text{STS}})^2 + (U_{\text{RSS}})^2)$$

Where:

$U_{\text{expanded}}$  = Expanded uncertainty.

$k$  = Coverage factor.

$U_{\text{char}}$  = Combined standard uncertainty of the manufacturing and/or analytical verification assessment.

$U_{\text{homogen}}$  = Standard uncertainty of the homogeneity assessment.

$U_{\text{LTS}}$  = Standard uncertainty associated with long-term stability.

$U_{\text{STS}}$  = Standard uncertainty associated with short-term (transport) stability.

$U_{\text{RSS}}$  = Standard uncertainty associated with repeated sampling of the product (where permitted by product use instructions).

3. The **QC Performance Acceptance Limits (QC PALs™)** are based on actual historical data collected in ERA's Proficiency Testing program. The QC PALs™ reflect any inherent biases in the methods used to establish the limits and closely approximate a 95% confidence interval of the performance that experienced laboratories should achieve using accepted environmental methods. Use the QC PALs™ to realistically evaluate your performance against your peers.

4. The **PT Performance Acceptance Limits (PT PALs™)** are calculated using the regression equations and fixed acceptance criteria specified in the NELAC proficiency testing requirements. Use the PT PALs™ when analyzing this certified reference material alongside USEPA and NELAC compliant PT study materials. Please note that many PT study acceptance limits are concentration dependent (some non-linearly) and therefore, the acceptance limits of this certified reference material and any PT study material may differ relative to their difference in concentrations.

5. The **PT Performance Data** include the mean value, percent recovery and number of data points reported by laboratories in our Proficiency Testing study compared to the Certified Values. In the event this lot was not used in a proficiency testing scheme, the data displayed was generated internally by ERA.

6. Where NIST Standard Reference Materials (SRMs) are available, each analyte has been analytically traced to the NIST SRM listed. **Analytical Traceability Recovery (%)** = [(% recovery ERA certified reference material)/(% recovery NIST SRM)]\*100  
The traceability data shown were compiled by analyzing this ERA certified reference material and/or its associated stock solution(s) against the applicable NIST SRMs.

7. **Metrological Traceability.** This certified reference material is metrologically traceable to NIST mass reference materials through an unbroken chain of comparisons.

8. For additional information on this product such as intended use, storage information, instructions for use, minimum sample size, and safety information, please refer to the Product Use Instructions provided.

**If you have any questions or need technical assistance, please call ERA technical assistance at 1-800-372-0122 or send an email to [era\\_info@waters.com](mailto:era_info@waters.com).**

**This Certificate of Analysis is authorized by Waters ERA, Quality and Technical departments.**



Page 2 of 2 Lot: S321-695

16341 Table Mountain Pkwy ▪ Golden, CO 80403 ▪ T: 800.372.0122 ▪ 303.431.8454 ▪ [www.eraqc.com](http://www.eraqc.com)