

CONTROL DE CALIDAD EN EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS. EJERCICIOS DE INTERCALIBRACIÓN

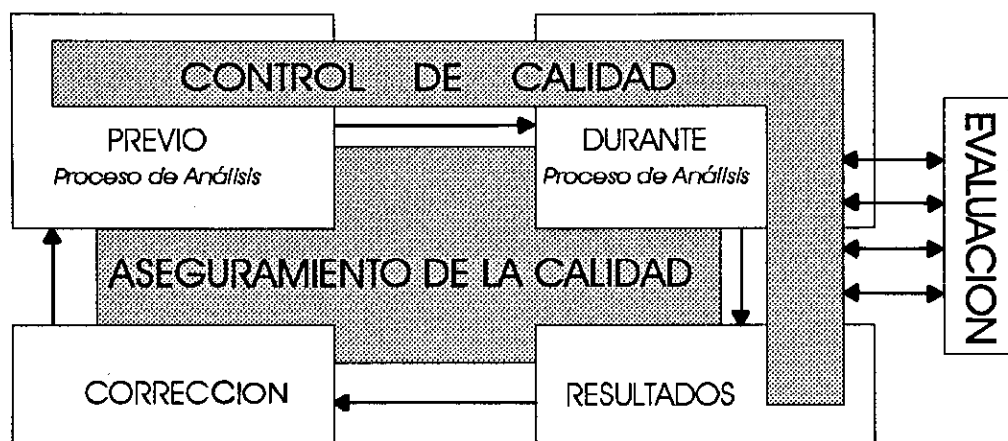
AMADEO R. FERNANDEZ-ALBA

Durante la última década el desarrollo de nuevas técnicas, nuevas metodologías, procesos de automatización, etc. ha permitido a los laboratorios de análisis de residuos de plaguicidas disponer de mayor información cualitativa y cuantitativa, más rápida y más precisa. Sin embargo, estos avances por sí solos no aseguran una mejora acorde de la *calidad* de los resultados, siendo frecuente la aparición de estudios, como son los de Griepink (1), que ponen de manifiesto «discrepancias» entre resultados de diferentes laboratorios, metodologías de análisis etc. La necesidad de una armonización, basada obviamente en la exactitud de las medidas, se acentúa a medida que los objetivos del análisis son cada vez más complejos, los requerimientos en cuanto a rapidez, sensibilidad etc. mayores y su importancia social y económica mayor. Hay, en consecuencia, una consideración creciente en mejorar y/o contrastar la *calidad* de los resultados generados, para que éstos sean reconocidos y aceptados y que sirvan de base firme para la toma correcta de decisiones.

La ISO (International Organization for Standardization) define *Calidad* como: *El conjunto de propiedades y características de un producto, proceso o servicio, que le confieren su aptitud para satisfacer necesidades establecidas o implícitas.* En nuestro caso, el análisis se trata de un servicio que genera una información que se concreta en un resultado. Si bien es cierto que la idea de calidad ligada a un resultado analítico no es en absoluto nueva, generalmente ha estado referida a aspectos parciales del proceso de análisis y con una fuerte componente subjetiva en cuanto a su valoración. En la actualidad se pretende que la calidad sea un atributo cuantificable y un instrumento de comparación, no sólo entendido como *calidad de resultados* sino, de forma general, a todo el proceso o servicio, es decir, *calidad del laboratorio*.

La introducción de la calidad y su gestión como una parte fundamental e independiente en un laboratorio de residuos (*laboratorio de ensayo*) se realiza con la implantación en el laboratorio de un *Sistema de Calidad* regulado por la norma UNE 66501 de 1991 que tiene su correspondiente norma europea EN 45001 de 1989. Esta normativa abarca todos los aspectos que

contribuyen a la calidad como son personal, equipos, reactivos, métodos y procedimientos etc. y que permiten el Aseguramiento de la Calidad -AC- (*Quality Assurance*) del laboratorio de ensayo. Además se requiere un conjunto de técnicas y actividades diferenciadas del trabajo de rutina denominadas Control de Calidad -CC- (*Quality Control*) para que la información analítica proporcionada tenga el nivel de calidad impuesto, Figura 1. Existen pequeñas discrepancias entre los autores en restringir el Control de Calidad estrictamente a actividades de control desarrolladas antes y durante el proceso analítico, y denominar Evaluación de la Calidad (*Quality Assesment*) a los trabajos de confirmación o evaluación de actividades del control, y en especial de los resultados analíticos como resumen de todas las actividades. O bien englobar ambos trabajos, sistemas de control y confirmación, bajo la denominación de *Control de Calidad*.



SISTEMA DE CALIDAD

FIGURA 1
Esquema de la implantación de un Sistema de Calidad.

De forma general, la aplicación de la calidad, o sistema de calidad de un laboratorio analítico se basa en (i) diseño y planificación de actividades (ii) control de aquello que se ha diseñado y establecido a fin de asegurar que se cumple adecuadamente y (iii) evaluación y confirmación de que tanto el diseño, planificación y control han sido adecuados. Es evidente que está implícita una etapa de corrección o modificaciones para la mejora de la calidad objetivo fundamental en todo Sistema de Calidad. Este esquema sólo constaría de dos apartados, si incluimos en las funciones propias del *Control de Calidad* su propia evaluación o confirmación. Esta confirmación del cumplimiento de requisitos relativos a la calidad, supone la evaluación mediante la contrastación sistemática y continuada (en el espacio y en el tiempo) de los trabajos que se realizan en el laboratorio y, de forma especial, señalar aquí, de los resultados analíticos generados.

Por lo tanto sobre el *Control de Calidad* de un laboratorio de análisis de residuos recae la competencia del buen funcionamiento de todo el proceso de análisis planificado para generar así resultados analíticos de calidad suficiente y contrastada y además, la evaluación y confirmación de la calidad de estos resultados. La ISO define *Control de Calidad* como: *Técnicas y actividades de carácter operativo utilizadas para satisfacer los requisitos relativos a la calidad.*

La *evaluación* de la calidad analítica (Figura 2) se puede llevar a cabo en dos niveles, (a) nivel interno y (b) nivel externo, según la efectúe el mismo laboratorio o no.

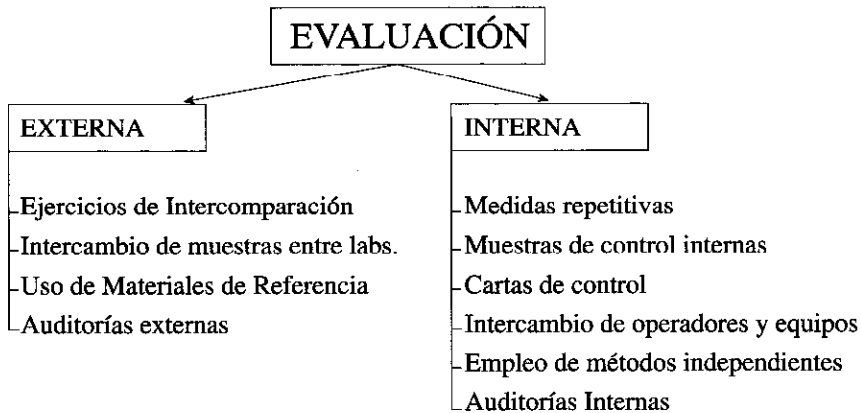


FIGURA 2
Formas de evaluación de la Calidad Analítica.

Existen diferentes procedimientos o «herramientas» para llevar a cabo esta evaluación interna como son:

- Realizar medidas repetitivas sobre una misma muestra
- Usar muestras de control internas o materiales de referencia interno -IRM-, que son muestras típicas de composición y propiedades ya conocidas, con la estabilidad suficiente que se intercalan para su análisis en las muestras de rutina (p.e. una cada 20 muestras analizadas) para supervisar la variación del método utilizado generalmente mediante una representación gráfica.
- Usar cartas de control donde de manera gráfica se representa la variación con el tiempo del valor que se obtiene al medir repetidamente un mismo parámetro.
- Intercambio de operadores y equipos.
- Llevar a cabo medidas por métodos o sistemas independientes recomendados por algún organismo oficial.

- Auditorías internas realizadas por personal del ente del que depende el laboratorio, pero independiente de los responsables del mismo. En este ámbito se inscribe la «Unidad de Garantía de Calidad» de las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Los procedimientos o «herramientas» para llevar a cabo la evaluación externa son:

- Intercambio de muestras entre laboratorios.
- Uso de materiales de referencia que pueden ser Materiales de Referencia Certificados -CRM- si están validados por un organismo competente o Materiales de Referencia Externos -ERM- si no reúne este requisito. Otro término de uso común es, Sustancia Patrón o Estándar, y se aplica a materiales de referencia cuya pureza está garantizada por la firma comercial que los expende.
- Auditorías externas, realizadas por personal ajeno al laboratorio. Tanto de tipo cualitativo, actualmente conocidas como Sistemas de Acreditación, como de tipo cuantitativo, basadas en el uso de Materiales de Referencia -CRM- y también conocidas como Pruebas de Habilidad (*Proficiency Testing*).
- Ejercicios de Intercomparación que se basan en la aceptación por parte de varios laboratorios en llevar a cabo un mismo trabajo analítico bajo la coordinación de una organización. El objetivo de este tipo de Ejercicios puede ser (i) evaluar la calidad del trabajo, *ejercicios de intercalibración* (ii) evaluar un método, ejercicios colaborativos y (iii) certificación de un material, ejercicios de certificación. La misión principal de la organización responsable del ejercicio es la de establecer los objetivos del mismo, participación de los laboratorios y asegurar la calidad y estabilidad de la muestra objeto de estudio, así como de realizar un tratamiento estadístico a los resultados.

Existen dos aspectos en los laboratorios de Residuos de Plaguicidas, que por sus características singulares son objetivos principales en los sistemas de Control de Calidad, estos son:

- Métodos analíticos
- Materiales de Referencia

MÉTODOS ANALÍTICOS

El análisis de residuos de plaguicidas, por sus características en cuanto a número de compuestos a determinar (~200) y requerimientos de tiempo, necesita el empleo de métodos que puedan identificar y medir más de un compuesto en cada análisis, estos métodos son conocidos como multiresiduos -MRMs-. Los métodos multiresiduos suelen incluir grupos de plaguicidas de diferentes propiedades físico-químicas y evidentemente no logran igual calidad de análisis para todos los compuestos que determinan y tienen cada uno de ellos sus propias fuentes de error. Horwitz (2) estima como aceptables las determinaciones en las que se obtengan resultados entre el 70-120% sobre el valor real. El número de métodos MRMs estándar (Standard Methods) u oficiales (Official Methods) que no requieren validación por parte del laboratorio debido a su probada robustez, es muy limitado (Luke, Mills, Leary etc.), por lo que su aplicación se suele llevar a cabo con nume-

rosas modificaciones que cada laboratorio de control realiza para ajustarlos a sus necesidades de compuestos objetivo, matrices o sus posibilidades técnicas. Por otra parte, debido a la frecuente aparición y uso de nuevos plaguicidas, la inclusión de productos de degradación en los límites máximos de residuos -LMR-, y la aparición de nuevas tecnologías, los métodos analíticos en un laboratorio de residuos necesitan ser frecuentemente revisados y modificados. Todo ello hace que los métodos empleados generalmente pertenezcan a la categoría de métodos recogidos en revistas analíticas (*Literature Methods*) o métodos desarrollados por el propio laboratorio (*In House Developed Methods*), y no se disponga de suficiente información sobre la robustez de las metodologías analíticas empleadas. Es evidente, ante esta situación, que la homogeneidad entre laboratorios respecto a metodologías empleadas facilita la comparación, validación y la introducción de mejoras en la calidad analítica.

MATERIALES DE REFERENCIA

La ISO define Material de Referencia -MR- como *un material o sustancia de una o más propiedades suficientemente homogéneas y bien establecidas para la calibración de un aparato, la verificación de un método de medida o la asignación de valores a materiales*. Este material de referencia será certificado -CRM- cuando una o más propiedades tienen sus valores certificados por procedimientos técnicamente válidos y poseen una certificación y/o trazabilidad expedida por un organismo competente. Su función es, por tanto, de armonización de resultados siendo la forma más sencilla de verificar la exactitud (accuracy) de las medidas y de forma global la evaluación de Control de Calidad.

Las especiales características de las muestras típicas de un laboratorio de residuos de plaguicidas, especialmente en cuanto a estabilidad, hacen que no sea posible en la actualidad adquirir Materiales de Referencia Certificados en alguno de los principales Organismos suministradores como NIST (*National Institute of Standards and Technology. USA*), BCR (*Bureau Community of Reference. CEE*) y, por lo tanto, sólo sea posible el uso de materiales de referencia interno -IRM-, habitualmente denominados muestras de control (*control samples*) o, bien, materiales de referencia externo, de mayor interés si son producto de un ejercicio de intercomparación, por la mejor contrastación de los resultados.

Estos dos aspectos señalados, falta de materiales de referencia certificados -CRM- y a veces insuficiente validación o información sobre la robustez de los métodos multiresiduos empleados, unidos a la necesaria la evaluación de la calidad de un laboratorio de control de residuos, hacen de los Ejercicios de Intercomparación una herramienta imprescindible dentro del sistema Control de Calidad.

Así, es muy numerosa la bibliografía que se recoge sobre este tipo de ejercicios, como lo demuestra la existencia en el Chemical Abstracts de aproximadamente 1000 trabajos en los últimos años sobre esta temática. Si bien en el caso de residuos de plaguicidas en hortalizas el número de trabajos desarrollados es muy escaso. Por lo que se prevee que sea una línea prioritaria de estudio en los próximos años.

Con esta idea, el Grupo de Residuos de la Universidad de Almería, en colaboración con un grupo de laboratorios oficiales integrados en el Plan Nacional de Residuos y la National Food Administration de Suecia, ha llevado a cabo un Ejercicio de Intercalibración de plaguicidas en hortalizas, con las características y resultados que a continuación voy a exponer de forma resumida.

EJERCICIO DE INTERCALIBRACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN HORTALIZAS/1994.

El objetivo de dicho ejercicio ha sido evaluar el buen funcionamiento de un grupo de laboratorios oficiales encargados del control de residuos de plaguicidas, y así como facilitar la detección de posibles errores en sus metodologías analíticas. La organización general del Ejercicio queda reflejada en la figura 3.

Los plaguicidas ensayados en el Ejercicio fueron:

<u>Plaguicidas</u>	<u>Rango de fortificación</u>
Acefato	0,077 - 0,770 mg/kg
Clorpirifos	0,062 - 0,532 mg/kg
Fenitrotion	0,063 - 0,903 mg/kg
Vinclozolina	0,116 - 1,740 mg/kg
Bifentrin	0,033 - 0,251 mg/kg
Endosulfan	0,100 - 1,597 mg/kg

y la matriz:

Pimiento

El Ejercicio constó de dos partes:

1) *Intercalibración de patrones*, en la que participaron todos los laboratorios, que consistió en diluir y analizar por triplicado seis disoluciones concentradas de cada uno de los plaguicidas mencionados. Estas disoluciones fueron enviadas por la organización a cada uno de los laboratorios participantes para su análisis según la metodología habitual de cada laboratorio.

2) *Análisis de seis muestras de pimiento* no tratado, fortificadas con los plaguicidas del ensayo en el rango de concentración antes señalado, en la que participaron siete de los nueve laboratorios anteriores. Los niveles de concentración fueron para cada muestra diferentes y desconocidos tanto en número como en rango de concentración para los participantes.

Las muestras se enviaron trituradas y congeladas. Los envíos se realizaron como se describe en la Figura 4. Para la cuantificación los laboratorios utilizaron las disoluciones de patrones enviada en la primera parte del Ejercicio, común a todos los participantes. Se hizo especial hincapié en el Protocolo del Ejercicio en que las metodologías de análisis se aplicaran de *igual forma* que en los trabajos de rutina de cada laboratorio.

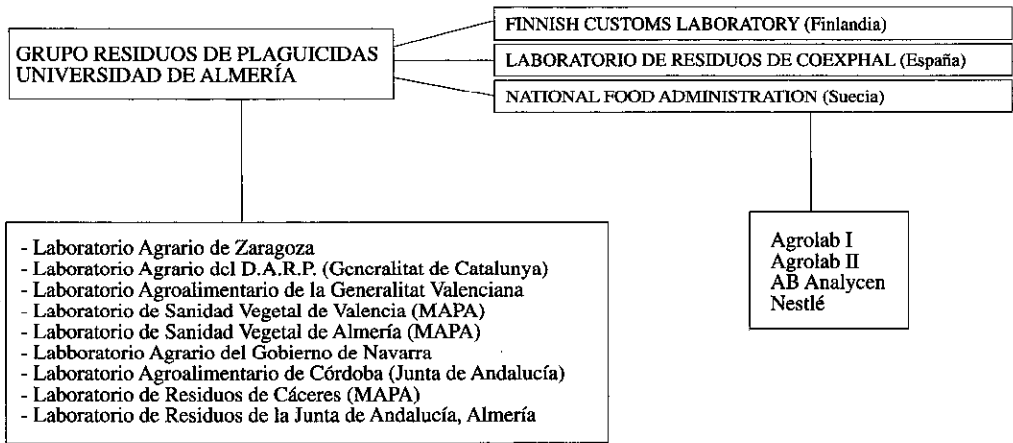


FIGURA 3
Organización general del Ejercicio de Intercalibración.

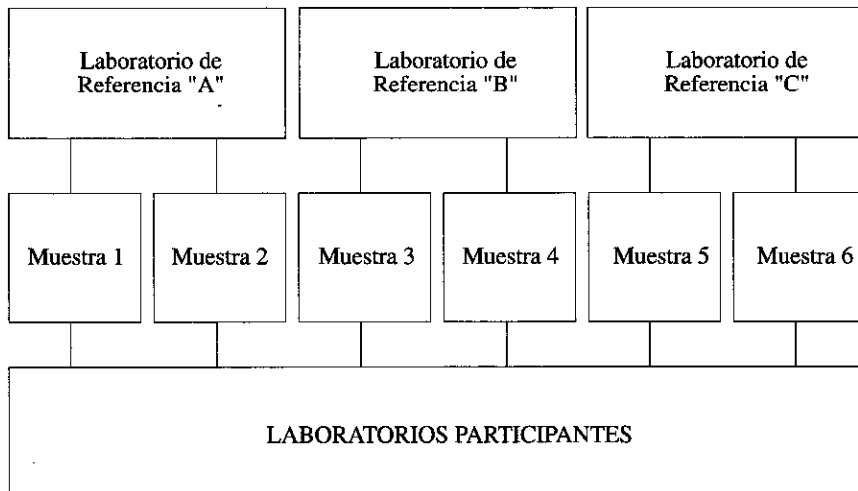


FIGURA 4
Distribución de las muestras entre laboratorios participantes y laboratorios de referencia.

RESULTADOS

Los resultados de la *primera parte* del Ejercicio fueron los siguientes:

Los resultados dados por cada laboratorio para las disoluciones patrón, tuvieron una dispersión de resultados, en torno al valor «objetivo», del orden del 10% y no se observan tendencias marcadas de desviación, excepto en el caso del Acefato donde: primero, la dispersión es muy elevada, rechazándose dos resultados (outliers) por aplicación del test de Cochran (3); y segundo, la tendencia es a dar valores superiores al valor «objetivo». Este hecho está de acuerdo con datos previos sobre la tendencia de este compuesto a descomponerse en disolución y en el sistema cromatográfico. Otro aspecto a señalar es el buen comportamiento del Clorpirifos como patrón analítico, dada su menor dispersión de resultados.

Respecto a los valores medios de cada laboratorio y su repetitividad, se observa un comportamiento adecuado en general en todos los casos, con valores de desviación estándar intralaboratorio que se corresponden con coeficientes de variación -CV- próximos al 5%. Con las características ya señaladas en el caso del Acefato, de grandes desviaciones de los valores medios, y del Clorpirifos mayor proximidad al valor «objetivo». En el caso del Bifentrin se observaron desviaciones estándar considerablemente mayores, motivadas por la baja respuesta de este compuesto en ECD que obliga a trabajar cerca del límite de determinación y es consecuencia incluso en algunos casos de la no detección.

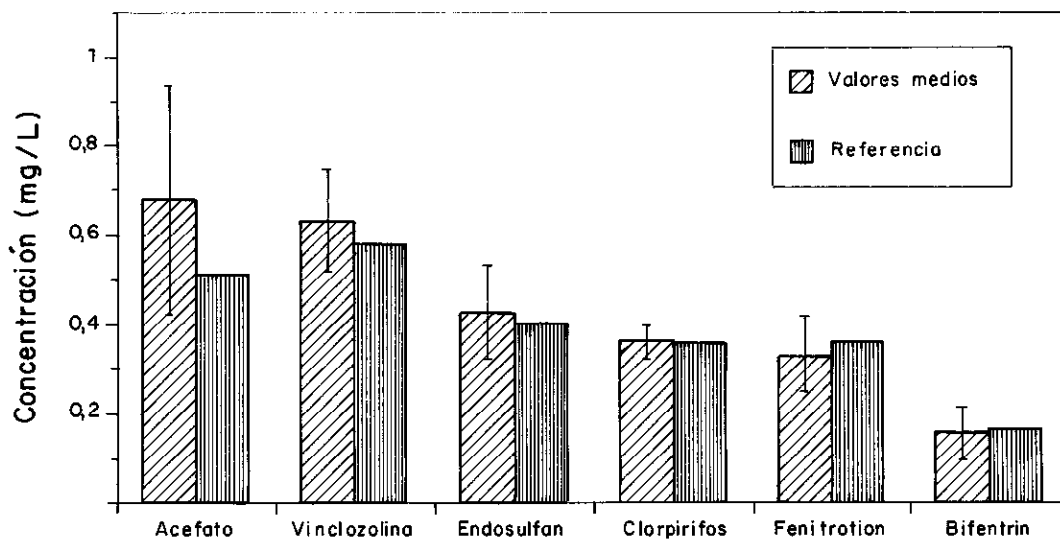


FIGURA 5

Valores medios obtenidos por los laboratorios participantes junto con su desviación relativa estándar, y valores de referencia de las disoluciones patrón.

La media de todos los laboratorios y la desviación estándar interlaboratorio, después de aplicar el test de Cochran como criterio de rechazo de resultados, se representa en la Figura 5. Excepto en el caso del Acefato, la correspondencia de valores medios con los valores «objetivo» es correcta. Las desviaciones estándar que se muestran son elevadas, correspondiéndose con coeficientes de variación próximos o superiores al 20% para todos los casos, excepto para el Clorpirifos, que son menores.

Estos resultados nos permiten realizar una evaluación de la calidad de los laboratorios por aplicación del criterio Z-score (4) escogiendo como valor de desviación aceptable en esta primera parte del Ejercicio del 10% sobre el valor de referencia u «objetivo». Los valores absolutos de Z-score, Figura 6, obtenidos por cada laboratorio son rechazables ($Z > 3$), o cuestionables ($3 > Z > 2$) de forma general para el Acefato, el Fenitrotrion en 3 laboratorios y Bifentrin, Endosulfan y Vinclozolina en 2. Solo un laboratorio presentó valores de Z-score menores de 3 para todos los plaguicidas.

Los resultados de la *segunda parte* del Ejercicio fueron los siguientes:

Se observa una dispersión alrededor del valor de fortificación en todas las muestras analizadas, con tendencias claras en algunos laboratorios como es el caso de lab. 04 a dar resultados superiores en los organofosforados o del lab. 01 a dar resultados inferiores de forma general. De la misma manera que ocurre con los patrones, en el caso del Acefato la dispersión de valores es considerablemente mayor.

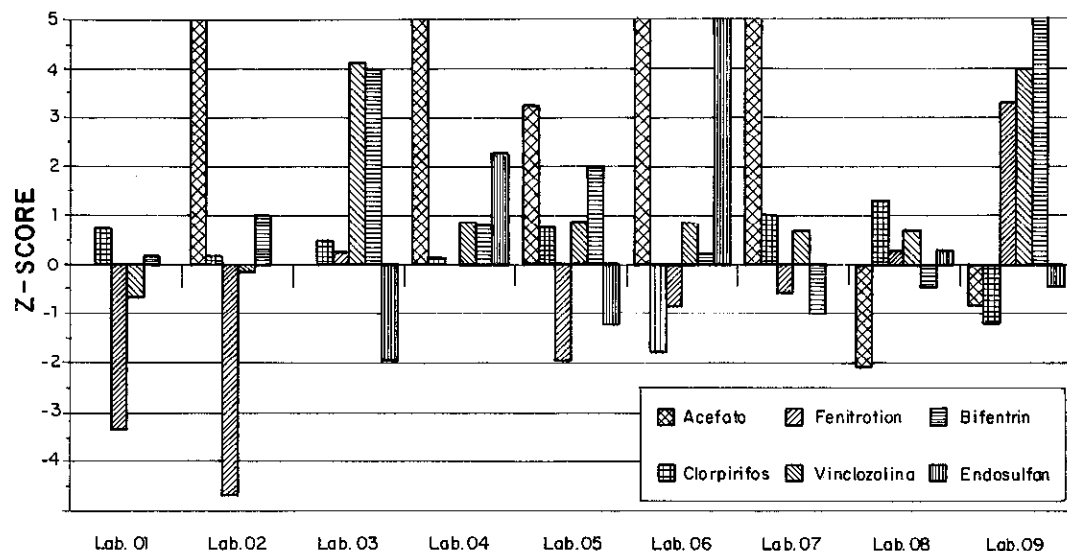


FIGURA 6

Valores de Z-score obtenidos por cada laboratorio en el análisis de las disoluciones patrón.

La media de los valores de concentración de todos los laboratorios por muestra, después de aplicar el test de Cochran como criterio de rechazo de resultados, se representa en la Figura 7A para el caso del Endosulfan junto con el valor de fortificación y el valor dado por los laboratorios de referencia. Se observa en todos los casos una muy buena correspondencia entre los valores medios dados por los laboratorios participantes, los valores de referencia y los valores de fortificación excepto en el caso del Acefato (Figura 7B), donde las diferencias de las medias con el valor de fortificación son mayores.

Los coeficientes de variación -CV %- medios intralaboratorio para cada laboratorio y plaguicida, están comprendidos de forma general entre el 5 y 15% excepto en el caso del Bifentrin y Acefato (Figura 8), que presentan algunos valores superiores. Los valores de coeficientes de variación interlaboratorio para cada plaguicida y muestra (Figura 9) están comprendidos entre el 30 y 50 % de forma general, observándose en el Acefato valores incluso superiores.

Estos resultados nos permiten realizar una evaluación de la calidad de los laboratorios en el análisis de muestras por aplicación del criterio Z-score, escogiendo como valor de desviación aceptable en esta segunda parte del Ejercicio el 30% sobre el valor de fortificación. Encontramos valores de Z-score superiores a 3 en los análisis de Acefato (Figura 10), Bifentrin y Fenitron. No obstante, estos valores superiores a 3 sólo se dan de forma aislada en algún laboratorio o muestra, excepto en el caso del Acefato donde dos laboratorios obtienen valores $Z > 3$ en todas o la mayoría de las muestras. Destaca el caso del Clorpirifos con valores de Z iguales o menores de 2 en todos los casos (Figura 11).

Debido a las especiales características, en cuanto a la aplicación de sistemas de calidad, homogeneidad de métodos analíticos, patrones e instrumentación, que presentan los laboratorios coordinados o contratados por la NFA (National Food Administration) de Suecia, llevamos a cabo un estudio comparativo entre los resultados obtenidos por los laboratorios participantes, y los determinados por un grupo de 4 laboratorios contratados por esta Administración (ver Figura 3), sobre dos de las muestras del Ejercicio.

Los valores medios dados por cada grupo de laboratorios (Figura 12A) para cada muestra y plaguicida están en buena concordancia de forma general, en todos los casos. Sin embargo, los coeficientes de variación interlaboratorio de cada grupo de laboratorios (Figura 12B) presentan grandes diferencias, siendo del orden del 20 % para los laboratorios de la NFA y del 35% en el caso de los laboratorios integrados en el Plan Nacional de residuos. Es de destacar el caso del Acefato, en el que los coeficientes de variación son muy superiores para el grupo de laboratorios españoles que para el grupo de laboratorios suecos.

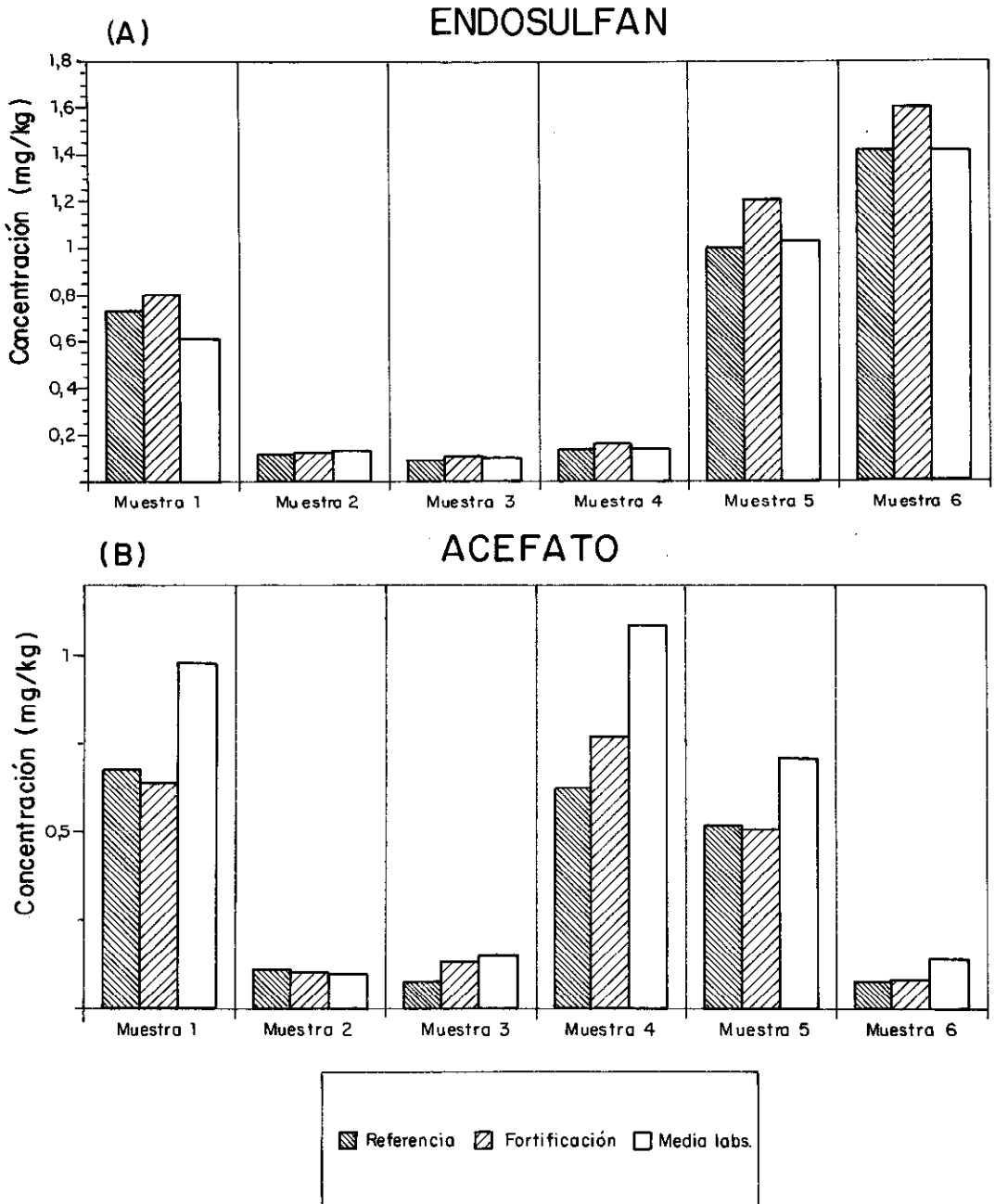


FIGURA 7

Media de los laboratorios participantes, nivel de fortificación y nivel determinado por los laboratorios de referencia para endosulfan y acefato en las seis muestras de pimienta analizadas.

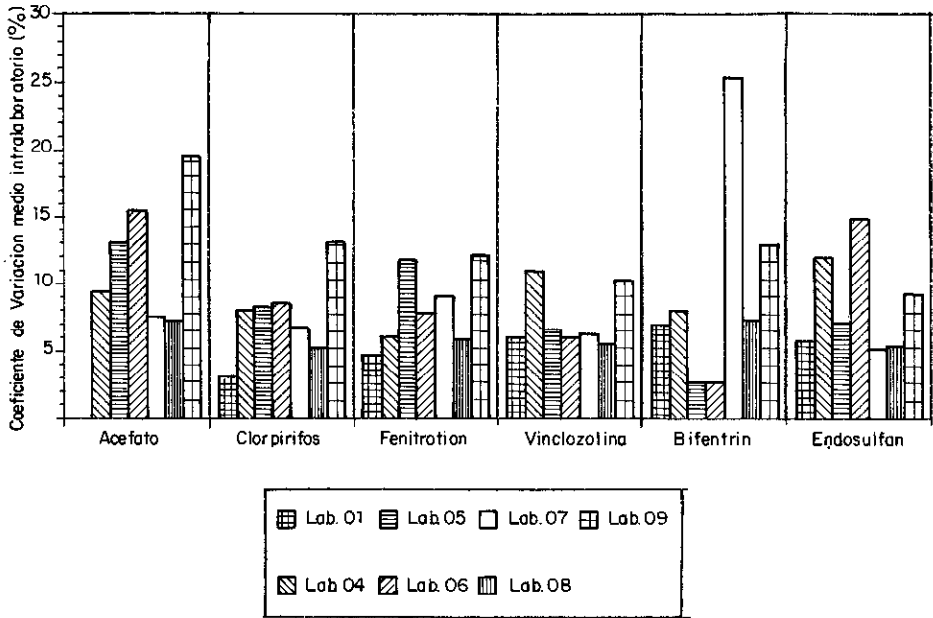


FIGURA 8
Coefficientes de Variación medios intralaboratorios para cada plaguicida en las seis muestras analizadas.

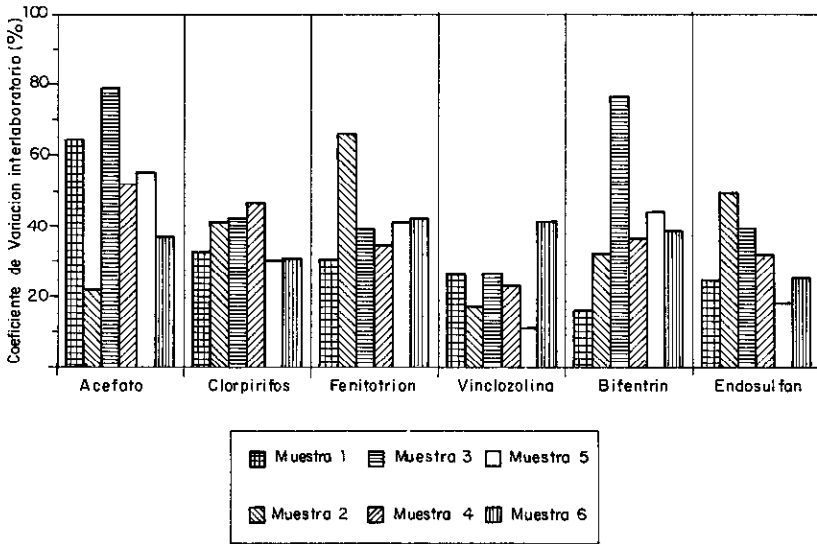


FIGURA 9
Coefficientes de Variación interlaboratorios para cada plaguicida en cada una de las muestras.

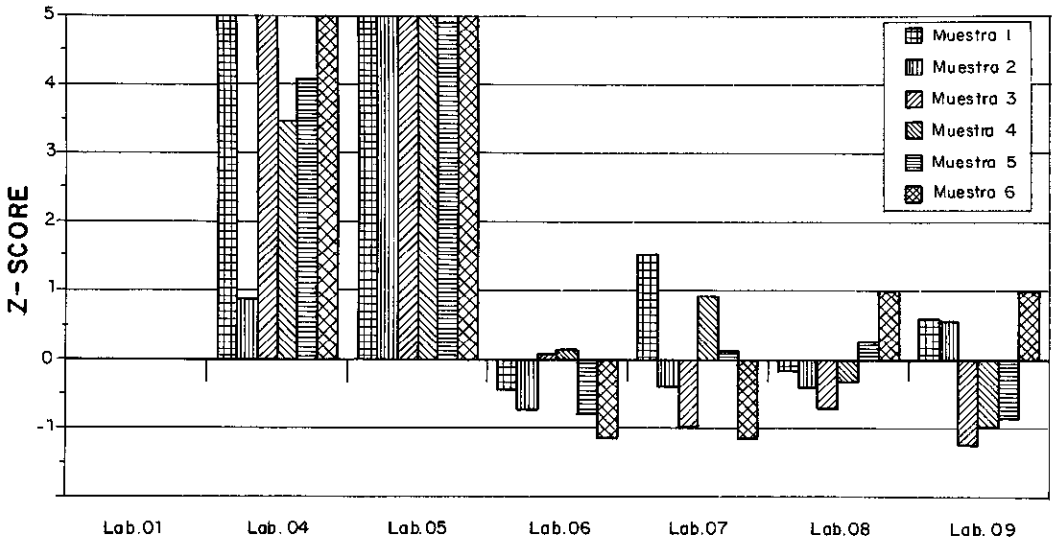


FIGURA 10
Valor de Z-score obtenido por cada laboratorio en el análisis de acefato en cada uno de las muestras.

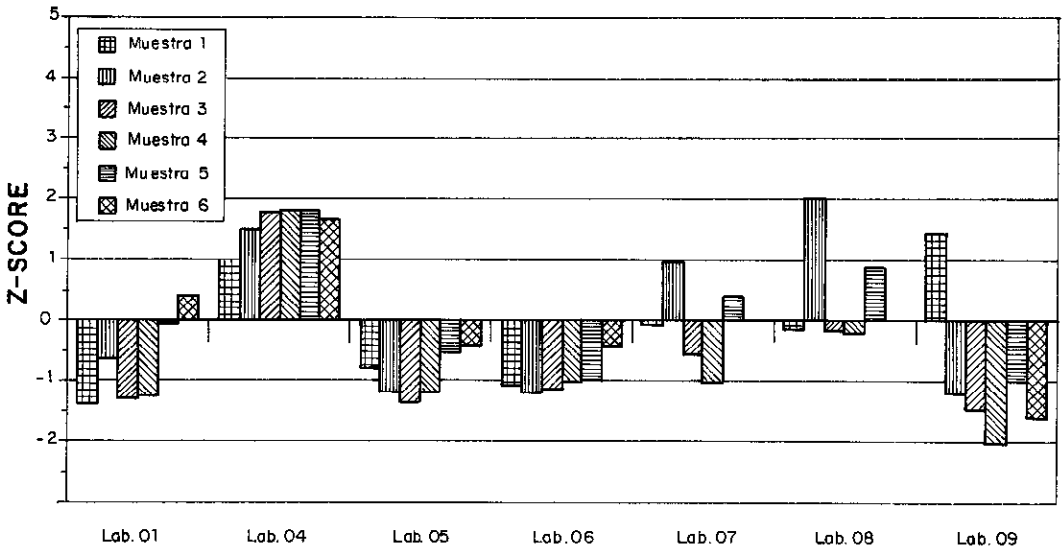


FIGURA 11
Valor de Z-score obtenido por cada laboratorio en el análisis de clorpirifos en cada uno de las muestras.

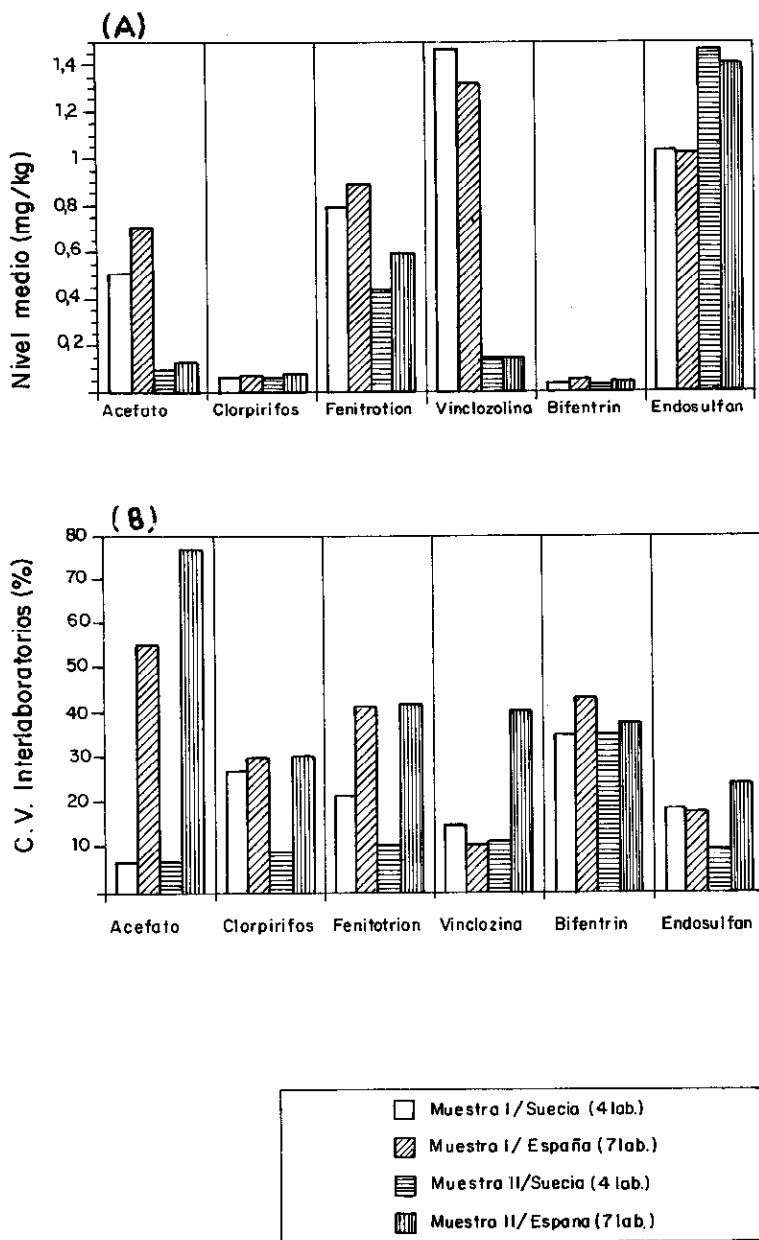


FIGURA 12

Niveles medios (A) y coeficientes de variación interlaboratorios (B) obtenidos por los laboratorios españoles participantes y un grupo de cuatro laboratorios suecos en el análisis de dos de las muestras del ejercicio.

CONCLUSIONES

El presente Ejercicio ha permitido:

1. Demostrar la necesidad de llevar a cabo este tipo de Ejercicios con el fin de evaluar los sistemas de Control de Calidad de los laboratorios así como detectar diferentes errores sistemáticos introducidos en las metodologías analíticas para su corrección (degradación de patrones, pérdidas etc.).

2. Detectar qué plaguicidas son más problemáticos en su análisis indicando sobre qué analitos deben centrarse los controles de calidad.

3. Valorar el control calidad sobre los patrones analíticos empleados en cada laboratorio y como consecuencia el sistema de calibración. Aportando la utilidad que supone el trabajo con disoluciones de patrones analíticos comunes.

4. En general los resultados obtenidos por los laboratorios participantes indican una adecuada evaluación de los mismos. No obstante es preciso destacar la gran diferencia existente entre los coeficientes de variación intra e interlaboratorio, que es necesario corregir. Esta corrección requiere una mejor adecuación de los Sistemas de Calidad de cada laboratorio junto con la realización de nuevos ejercicios que permitan evaluar la proximidad, en cuanto a coeficientes de variación, alcanzada.

5. Los resultados de este Ejercicio permiten valorar las ventajas que puede suponer la homogenización de metodologías analíticas, patrones y equipos utilizados, especialmente en grupos de laboratorios con objetivos muy próximos. Si bien, esta homogenización evidentemente no puede sustituir un adecuado sistema de calidad si lo facilita y simplifica y además permite un mejor intercambio de soluciones a problemas comunes lo que asegura la corrección rápida de posibles deficiencias.

Aunque somos conscientes de las dificultades que tal homogenización implica en la actualidad, debido a la dispersión y existencia de diferentes organismos competentes, un modelo a seguir podría ser la NFA de Suecia donde un sistema de calidad implementado con una gran homogenización de métodos, equipos y patrones consigue aproximar de forma notable sus coeficientes de variación intra e interlaboratorio. Esta vía por lo que supone de sencillez, puede permitir a los laboratorios de residuos de plaguicidas trabajar en mayor medida en otras áreas de gran interés dentro de estos laboratorios como desarrollo de nuevas y mejores metodologías, inclusión de nuevos compuestos etc.

AGRADECIMIENTOS

El Ejercicio de Intercalibración descrito fue financiado por la Comisión Internacional de Ciencia y Tecnología (CICYT) a través de la Acción Especial ALI94-1219-E y el Proyecto ALI93-0589.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- (1) **B. Griepink**, Certified reference materials (CRM's) for the quality of measurement, *Fresenius J. Anal. Chem.* , 337 (1990) 812.
- (2) **W. Horwitz, L.R. Kamps and K.W. Boyer**, Quality Assurance in the analysis of foods for trace constituents, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 63 (1980) 6.
- (3) **J.N. Miller** Outliers in experimental data and their treatment, *Analyst* 118 (1993) 455.
- (4) **Analytical Methods Committee**, Proficiency testing of Analytical Laboratories: Organization and statistical Assesment, *Analyst* 117 (1992) 97.