

Higiene y Sanidad Ambiental, **12** (3): 882-888 (2012)

Validación de métodos analíticos. Implementación al análisis rutinario

ANALYTICAL METHOD VALIDATION. IMPLEMENTATION TO THE ANALYSIS ROUTINE

David GALÁN MADRUGA, Rosalía FERNÁNDEZ PATIER, Andrés DÍAZ ESTEBAN

Área de Contaminación Atmosférica. Centro Nacional de Sanidad Ambiental. Instituto de Salud Carlos III. Madrid (España). Telf. +34 91 822 35 07. Fax: +34 91 509 79 27. Correo-e: david.galan@isciii.es

RESUMEN

El presente artículo pretende llevar a cabo la validación del método analítico para la determinación de muestras de ión nitrito en aire ambiente, así como de la posterior aplicación del proceso de validación para el análisis de muestras problema. Las muestras de ión nitrito fueron analizadas en laboratorio mediante espectrofotometría ultravioleta-visible. Las muestras fueron recolectadas en la fase de exposición en aire ambiente y fueron cuantificadas a partir de una curva de calibración derivada del análisis de disoluciones patrón de nitrito. Se han determinado como parámetros de validación: Exactitud y precisión, límite de detección y cuantificación e incertidumbre analítica. Se han evaluado como criterios de aceptación la linealidad y la desviación de la pendiente de la curva de calibrado. Finalizada la fase de validación se han obtenidos los siguientes valores: 96,30 % para la eficiencia de extracción, 8,21 % y 3,28 % como exactitud y precisión, respectivamente, 0,078 $\mu\text{g NO}_2^-/\text{ml}$ y 0,162 $\mu\text{g NO}_2^-/\text{ml}$ como límite de detección y cuantificación, respectivamente, 9,415 % como incertidumbre analítica. En igual medida, se establecieron como criterios de aceptación: Valores de 97,23 % como linealidad de la curva de calibrado y 0,0009 como desviación de la pendiente de la curva de calibrado. Este estudio se centra en la relación entre la validación del método analítico y su aplicación en análisis rutinario.

Palabras clave: Proceso de validación, criterios de aceptación, análisis rutinario.

ABSTRACT

This paper aims to carry out the validation of the analytical method for the determination of samples of nitrite ion in ambient air, as well as the subsequent implementation of the validation process to the analysis of unknown samples. Samples of nitrite ion were analyzed in laboratory by Ultraviolet-Visible spectrophotometry. The samples were collected during the phase of exposure in ambient air and they were quantified from the calibration curve of standard solutions of nitrite. As validation parameters were determined the accuracy and precision, detection and quantification limit, analytical uncertainty. As acceptance criteria were evaluated the linearity and slope standard deviation of the calibration curve. Once the validation process an extraction efficiency value of 96.30 % was obtained. Accuracy and precision values of 8.21% and 3.28% were obtained. LOD and LOQ values of 0.078 $\mu\text{g/ml}$ and 0.162 $\mu\text{g/ml}$ were found. Analytical uncertainty value of 9.42 % was obtained. Linearity value of 97.23 % was found and slope standard deviation value of 0.0009 was found. Acceptation criteria values of 97.27 % and 0.0009 were established as linearity and slope standard deviation of the calibration curve, respectably. This study focuses on the relationship between the analytical method validation and its application to the routine analysis.

Keywords: Validation process, acceptance criteria, analysis routine.

INTRODUCCIÓN

El proceso de validación de un método analítico se realiza para establecer pruebas documentales,¹ que demuestren científicamente, que dicho método posee características adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas,² siendo necesario la determinación de las fuentes de variabilidad, de errores del proceso analítico, no sólo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.³

Actualmente, los laboratorios de ensayo deben demostrar que sus métodos analíticos proporcionan resultados fiables y adecuados para su finalidad.⁴ En igual medida, la Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005,⁵ establece la necesidad de validar los métodos analíticos por parte de los laboratorios de ensayo. El proceso de validación debe estar documentado con datos de laboratorio, siendo por tanto necesario el uso de la estadística, que permita el tratamiento y análisis de los mismos.

Así, la validación de un método es la herramienta útil para dar cumplimiento a la exigencia de asegurar la calidad del resultado final.^{6,7}

Para mostrar de forma práctica el desarrollo de un proceso de validación para un método analítico y su posterior aplicabilidad al análisis rutinario de muestras problema, se muestra el proceso de validación para la determinación de ión nitrito por espectrofotometría ultravioleta – visible (UV-VIS) a partir de la reacción Griess-Saltzman. Las muestras analizadas, ión nitrito, fueron captadas en aire ambiente a partir del dióxido de nitrógeno ambiental, utilizando para ello muestreadores pasivos. Así, el dióxido de nitrógeno es captado en una disolución de trietanolamina (TEA),⁸⁻¹¹ siendo el producto de la reacción, entre el dióxido de nitrógeno y TEA, un TEA-N-óxido. Se ha demostrado que la eficiencia en la reducción del dióxido de nitrógeno por trietanolamina depende de la hidratación de la misma.¹² La conversión del dióxido de nitrógeno a ión nitrito es 1:1.

Posteriormente, el ión nitrito es extraído en laboratorio y analizado por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda de 540 nm, mediante una reacción colorimétrica, reacción Griess-Saltzman.¹³⁻¹⁷

En la reacción colorimétrica, el ión nitrito procedente del dióxido de nitrógeno ambiental, da lugar a la formación de una sal de diazonio, por reacción con el ácido fosfórico y sulfanilamida, dando lugar a complejo de color rojo-violeta.¹⁸ La cantidad de ión nitrito existente en la muestra es obtenida por referencia a una curva de calibrado derivada del análisis de soluciones patrón de nitrito.^{19,20}

Durante el proceso de validación del método analítico, se calcularon, por un lado, parámetros de validación (exactitud, precisión, límite de detección, límite de cuantificación, rango de medida e incertidumbre),²¹ y por otro lado, se calcularon criterios de aceptación para la curva de calibrado (linealidad de la curva de calibrado y desviación típica de la pen-

diente), para su posterior aplicación al análisis de muestras problema.

MATERIAL Y MÉTODOS

Instrumentación y reactivos

Para la realización del estudio aquí presentado se ha utilizado la siguiente instrumentación y reactivos:

Instrumentación

Espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible Varian, Cary 4.

Muestreadores pasivos Radiello para dióxido de nitrógeno.

Baño de ultrasonidos Branson 8200.

Reactivos

Sulfanilamida (Merk nº 11799).

N-(1-naftil) etilendiamina biclorada. NEDA (Merk nº 6237).

Ácido fosfórico concentrado (Merk nº 1.00573).

Nitrito sódico (Merk 60116862).

Agua milliRo.

Preparación de disoluciones

Preparación del reactivo Griess-Saltzman

Para preparar el reactivo Griess-Saltzman se procedió del siguiente modo: Por un lado, se pesaron 20 g de sulfanilamida, se diluyeron en 200 ml de agua milliRo en una botella de 1 litro, y se añadieron 50 ml de ácido fosfórico concentrado. Por otro lado, se pesaron 0,070 g de NEDA y se añadieron a la botella, enrasando hasta 1 litro con agua milliRo. Se almacenó en nevera.

Preparación de la disolución patrón de nitrito

Para preparar la disolución patrón de nitrito se procedió del siguiente modo: Se pesaron 1,5 g de nitrito sódico (desecado previamente en un desecador durante un periodo mínimo de 10 horas), y se diluyeron hasta 1 litro con agua de calidad analítica adecuada. La concentración de la disolución resultante fue de 1000 µg de ión nitrito por mililitro de disolución. El producto se trasvasó a una botella de vidrio. Se almacenó en nevera.

Realización de la curva de calibración

Las muestras de ión nitrito fueron cuantificadas frente a patrones de nitrito sódico.

Para la realización de la curva de calibrado se procedió del siguiente modo. A partir de la disolución patrón de nitrito se prepararon alcuotas de 100 µl, 300 µl, 400 µl, 600 µl, 700 µl, 900 µl, 1000 µl, 1300 µl y 1400 µl, respectivamente, y se diluyeron a 50 ml con agua milliRo, obteniéndose 9 patrones de concentraciones 2 µg/ml, 6 µg/ml, 8 µg/ml, 12 µg/ml, 14 µg/ml, 18 µg/ml, 20 µg/ml, 26 µg/ml y 28 µg/ml, respectivamente.

Captación del ión nitrito en fase de exposición a la atmósfera ambiente

Como se ha comentado anteriormente, la muestra a analizar, ión nitrito, se ha captado a partir del dióxido de nitrógeno existente en la atmósfera ambiente empleando para ello muestreadores pasivos.

Extracción del ión nitrito en laboratorio

Finalizada la fase de captación, el ión nitrito es extraído en laboratorio, con 6,5 ml de agua milliRo en baño de ultrasonidos durante un periodo de tiempo de 30 minutos.²²

Análisis del ión nitrito en laboratorio

Una vez extraído el ión nitrito, se tomaron 100 µl de la disolución extraída, y se trasladaron a un tubo de ensayo. Se añadieron 3 ml del reactivo Griess-Saltzman, y se dejaron estabilizar durante un tiempo de 30 minutos.

A continuación, se leyeron las absorbancias de las muestras problema, ión nitrito, a una longitud de onda de 540 nm, frente a agua destilada, obteniéndose las concentraciones de ión nitrito, en microgramos por mililitro de muestra (µg NO₂⁻/ml muestra). El total de microgramos muestra (µg NO₂⁻ muestra) se calculó multiplicando µg NO₂⁻/ml muestra por el volumen de extracción (6,5 ml).

Parámetros de validación

Los parámetros de validación han sido calculados a partir de la realización de 10 curvas de calibrado en 10 días diferentes.

Eficiencia de extracción

La eficacia de extracción fue determinada mediante 2 extracciones sucesivas para un total de 20 muestras.

Exactitud y precisión

Para el cálculo de la exactitud y precisión, se prepararon 3 disoluciones hijas a concentraciones de 10 µg/ml, 20 µg/ml y 25 µg/ml, respectivamente, a partir de una disolución madre diferente a la disolución patrón de nitrito (disolución de nitrito sódico: 999,5 mg/l). A continuación, se añadieron en tubos de vidrio alícuotas de 100 µl de cada disolución hija, para un total de 3 alícuotas por cada una de ellas. Posteriormente, se hicieron reaccionar con el reactivo Griess-Saltzman, y se leyeron, en sentido creciente de concentración, a 540 nm, frente a una curva patrón. Se analizaron 3 alícuotas para cada día de análisis, del total de 10 días, obteniéndose un total de 30 alícuotas para el cálculo de exactitud y precisión.

La exactitud ha sido calculada según la siguiente expresión:^{23,24}

$$Ex = \frac{VR - VO}{VR} \cdot 100$$

donde:

Ex: exactitud.

VR: valor de referencia (en este caso µg/ml de la disolución hija).

VO: valor observado (en este caso µg/ml obtenidos en el análisis).

La precisión ha sido calculada según la siguiente expresión:²⁵

$$CV = \frac{d_t}{X} \cdot 100$$

donde:

CV: coeficiente de variación.

d_t: desviación típica.

X: promedio de las muestras observadas.

Límite de detección

El límite de detección, *LD*, ha sido calculado según el método IUPAC, que relaciona la concentración que da una señal equivalente a la respuesta de un blanco (muestra que no presenta el analito que se quiere determinar), más tres desviaciones típicas.²⁶

$$LD = X_{MB} + 3 \cdot d_t$$

donde:

X_{MB}: valor promedio de 10 masas analíticas de blanco.

Límite de cuantificación

El límite de cuantificación, *LC*, ha sido calculado según el método IUPAC, que relaciona la concentración que da una señal equivalente a la respuesta de un blanco más diez desviaciones típicas.²⁷

$$LC = X_{MB} + 10 \cdot d_t$$

Incertidumbre del método analítico

La incertidumbre es un parámetro asociado al resultado de una medida que caracteriza la dispersión de la misma.²⁸⁻³⁰ La incertidumbre del método analítico, *I_{met}*, se ha calculado a partir de la siguiente expresión:

$$I_{met}^2 = I_{eq}^2 + I_{cal}^2 + I_{ext}^2$$

donde:

I_{eq} es la incertidumbre correspondiente a la resolución del equipo.

I_{cal} es la incertidumbre correspondiente a la calibración.

I_{ext} es la incertidumbre correspondiente a la eficiencia de extracción.

A su vez, la incertidumbre de calibración fue calculada a partir de la siguiente expresión:

$$I^2_{cal} = I^2_{MR} + I^2_{exac} + I^2_{prec} + I^2_{lin}$$

donde:

I_{MR} es la incertidumbre correspondiente al material de referencia.

I_{exac} es la incertidumbre correspondiente a la exactitud del método analítico.

I_{prec} es la incertidumbre correspondiente a la precisión del método analítico.

I_{lin} es la incertidumbre correspondiente a la linealidad.

Crterios de aceptación

Como criterios de aceptación se han calculado la linealidad y la desviación de la pendiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En las condiciones de operación mencionadas anteriormente, para la determinación de los parámetros de validación, se han obtenido los siguientes valores estadísticos.

Eficiencia de extracción

El valor promedio para la eficiencia de captación fue 96,3 % con una desviación típica de 1,6 % (Tabla 1).

Tabla 1. Valores de eficiencia de extracción (%).

1ª Extracción µg NO ₂ ⁻	2ª Extracción µg NO ₂ ⁻	Eficiencia de extracción (%)
67,9	1,9	97,3
89,6	4,8	94,7
69,0	1,9	97,2
83,3	1,0	98,8
57,4	1,5	97,5
84,8	4,7	94,4
50,3	1,7	96,6
39,0	1,8	95,3
35,9	1,2	96,5
35,8	1,8	95,0
73,6	2,1	97,1
86,9	3,5	96,0
31,3	0,5	98,3
30,8	0,9	97,2
69,1	5,0	92,8
69,0	1,9	97,2
83,3	1,0	98,8
57,4	1,5	97,5
84,8	4,7	94,4
50,3	1,7	96,6

Exactitud y precisión

Del total de muestras analizadas para el cálculo de exactitud y precisión, los valores máximos, para los diferentes niveles de concentración fueron los expuestos en la Tabla 2.

Como valores de exactitud y precisión del método analítico se tomaron los valores más desfavorables, siendo éstos: 8,21 % como valor de exactitud y 3,28 % como valor de precisión.

Puede observarse como el valor de la exactitud analítica aumenta conforme el valor de referencia se aproxima a cero, ocurriendo de forma similar en el caso de la precisión.

Tabla 2. Valores máximos de exactitud y precisión para los diferentes patrones. Validación analítica

	Exactitud	Precisión
10 µg / ml	8,21 %	3,28 %
20 µg / ml	6,80 %	2,38 %
25 µg / ml	5,54 %	2,08 %

Límite de detección y cuantificación

En la Tabla 3 se muestran los valores de la masa de los blancos para cada día de análisis.

El promedio de la masa de los blancos fue 0,042 µg NO₂⁻/ml ± 0,012 µg NO₂⁻/ml, siendo el valor del límite de detección de 0,078 µg NO₂⁻/ml. Igualmente, el valor del límite de cuantificación fue 0,162 µg NO₂⁻/ml.

Rango de medida

El rango de medida fue de 0 µg/ml a 28 µg/ml.

Tabla 3. Valores de blancos de dilución.

Día de análisis	µg NO ₂ ⁻ / ml (blanco)
1	0,060
2	0,062
3	0,038
4	0,048
5	0,039
6	0,030
7	0,030
8	0,031
9	0,040
10	0,037

Tabla 4. Valor de la incertidumbre del método.
Validación analítica.

<i>Incertidumbre del método analítico (%)</i>			
I_{met}	9,415	I^2_{met}	88,645
<i>Incertidumbre del equipo¹ (%)</i>			
I_{eq}	0,000	I^2_{eq}	0,000
<i>Incertidumbre de calibración (%)</i>			
I_{cal}	9,278	I^2_{cal}	86,085
<i>Exactitud del método (%)</i>		I^2_{exac}	67,404
<i>Precisión del método (%)</i>		I^2_{prec}	10,758
<i>Linealidad² (%)</i>		I^2_{lin}	7,673
<i>Material de Referencia³ (%)</i>		I^2_{MR}	0,250
<i>Incertidumbre de extracción (%)</i>			
I_{ext}	9,278	I^2_{ext}	2,560

¹ Incertidumbre de Tipo B (Distribución rectangular). Calculado a partir de la resolución del equipo.

² Calculado a partir de la diferencia entre la linealidad perfecta (100 %) y el valor de la linealidad del método (97,23 %).

³ El material de referencia utilizado tiene una incertidumbre del 0,5 %.

Incertidumbre del método analítico

Los resultados de las incertidumbres que contribuyen a la incertidumbre del método analítico se muestran en Tabla 4.

El valor de la incertidumbre del método analítico fue de 9,415 %.

Tabla 5. Valores de la linealidad de la recta y de la desviación típica de la pendiente. Validación analítica.

Día de análisis	Desviación de la pendiente	Linealidad de la recta
1	0,00082	97,76 %
2	0,00090	97,52 %
3	0,00068	98,06 %
4	0,00043	98,81 %
5	0,00077	97,81 %
6	0,00070	98,02 %
7	0,00088	97,72 %
8	0,00064	98,21 %
9	0,00047	98,71 %
10	0,00075	97,98 %

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos para los criterios de aceptación, para cada curva de calibrado realizada.

El valor resultante, para linealidad de la recta, corresponde con el promedio de los diferentes valores obtenidos menos dos veces su desviación típica.

El valor resultante, para la desviación de la pendiente, corresponde con el valor máximo obtenido.

De esta manera se obtuvo un valor de 97,23 %, para la linealidad de la recta, y un valor de 0,0009, para la desviación típica de la pendiente.

Aplicación del proceso de validación al análisis rutinario de muestras problema

Una vez validado el método analítico, se procedió a optimizar el mismo para el posterior análisis rutinario de muestras problema de ión nitrito.

Previo al análisis de muestras problema, se realizó una curva de calibrado, puesto que las muestras problema ambientales de ión nitrito son cuantificadas a partir de una curva de calibrado de patrones de ión nitrito. Para la realización de dicha curva, se tomaron 3 concentraciones patrón y un blanco de laboratorio, en lugar de 9 concentraciones patrón utilizadas durante el proceso de validación del método.

Para aceptar la curva de calibrado realizada para cuantificar las muestras problema, éstas deben presentar un valor de linealidad de la recta superior a 97,23 %, y un valor de desviación estándar de la pendiente inferior a 0,0009.

El uso de estos criterios para la aceptación o no de la curva de calibrado, empleada para la cuantificación de las muestras problema, sirve de punto de unión entre el proceso de validación de un método analítico y el posterior análisis rutinario de muestras problema.

CONCLUSIONES

Para dar respuesta a la necesidad, por parte de los laboratorios de ensayo, de asegurar la calidad del resultado final, se ha procedido a validar un método analítico para el análisis y cuantificación de muestras ambientales de ión nitrito.

Los datos estadísticos de los diferentes parámetros de validación han servido para documentar la validación del método, dando así respuesta a la necesidad del aseguramiento de la calidad de los datos.

En igual medida, el cálculo de criterios de aceptación para la curva de calibrado, realizados durante la fase de validación del método analítico, otorga aplicabilidad al posterior análisis de muestras problema.

BIBLIOGRAFÍA

1. Matkovic, S.; Valle, G.; Galle, M. and Briand, L. Desarrollo y validación del análisis cuantitativo de Ibuprofeno en comprimidos por espectroscopia

- infrarroja. *Acta Farm. Bonaerense.* 2004; 23 (4), pp. 527-532.
2. Sardiñas Peña, O. and Hernández Peñalver, M.T. Aseguramiento de la calidad en un laboratorio acreditado. *Rev. Cubana Hig. Y Epidemiol.* 2002; 40 (1), pp. 16-19.
 3. Westgard, J.; mercapide, L.; Sáez, A.; Porras, A.; Martínez, O.; Amaya, E.; Iturriza, M.; Mendoza, E.; Brambila, E. and Terrés, A. Cómo garantizar la calidad analítica. *Rev. Mex. Patol. Clin.* 2010; 57 (4), pp. 179-189.
 4. Anthony B. Bioanalytical Quality Assurance: Concepts and Concerns. *Qual. Assur. J.* 2006; 10, 101-106
 5. Norma UNE-EN ISO/IEC 17025:2005. "Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración".
 6. Díaz M., Hernández I., Martínez M., Victoria M^a., Gómez L., Louro G., Morena Y. and González E. Validación de Técnicas Analíticas utilizadas en el Control de Calidad. *Rev. Cubana Farm.* 1998; 32(2), 106-12
 7. Rodríguez-Benavides, G. and Blanco Sáenz, R. Aseguramiento de la calidad analítica y norma ISO 17025 en laboratorios clínicos y químicos. *Rev. Costarric. Cienc. Méd.* Junio 2001; 22, (1-2), pp. 83-97.
 8. Sickles J.E., Grohse P.M., Hodson L.L., Salmons C.A., Cox K.W., Turner A.R. and Estes E.D. Development of a method for the sampling and analysis of sulfur dioxide and nitrogen dioxide from ambient air. *Anal. Chem.* 1990; 62 338-346
 9. Ferm M., and Svanberg P.A. Cost-efficient techniques for urban and background measurements of SO₂ and NO₂. *Atmos. Environ.* 1998; 32, 1377-1381
 10. Heal M.R., O'Donoghue M.A., and Cape J.N. Overestimation of urban nitrogen dioxide by passive diffusion tubes: a comparative exposure and model study. *Atmos. Environ.* 1999; 33, 513-524
 11. Krochmal D. and Görski L. Determination of nitrogen dioxide in ambient air by use of a passive sampling technique and triethanolamine as absorbent. *Environ. Sci. Technol.* 1991; 25, 531-535
 12. Moschandreas D.J., Relwani S.M. and Taylor K.C. A laboratory evaluation of a nitrogen dioxide personal sampling device. *Atmos. Environ.* 1990; 24A (11), 2807-2811
 13. Dutton S. J., Hannigan M. P. and Miller S. L. Indoor pollutant levels from the use unveted natural gas fireplaces in Boulder, Colorado. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 2001; 51, 1654- 1661
 14. Nash T. An efficient absorbing reagent for nitrogen dioxide. *Atmos. Environ.* 1970; 4, 661-665
 15. Shaw J. T. The measurement of nitrogen dioxide in the air. *Atmos. Environ.* 1967; 1, 81-85
 16. Hagenbjörk-Gustafsson A., Lindahl, R. and Levin, J.O. Validation of the diffusive sampler "Willems badge" for nitrogen dioxide determinations in occupational environments. *International Conference Measuring Air Pollutants by Diffusive Sampling.* Abstrac book 2001; 66
 17. Hagenbjörk-Gustafsson A., Forsberg B., Hestvik G., Karlsson D., Wahlberg S. and Sandström T. Measurements of indoor and outdoor nitrogen dioxide concentrations using a diffusive sampler. *Analyst.* 1996; 121, 1261-1264
 18. Saltzman B.E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in the atmosphere. *Analytical Chemistry.* 1954; 26, 1949-1955
 19. Preparation of Calibration Curves. European Association of National Metrology Institutes. EURAMET LGC/VAM/2003/032. 2003
 20. Danzer K., Otto M. and Currie L.A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry. Part 2. Multispecies Calibration (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* 2004; 76(6), 1215 – 1225
 21. Guide: The Expression of Uncertainty in Qualitative Testing. European Association of National Metrology Institutes. EURAMET LGC/VAM/2003/048. 2003
 22. Kirby C., Fox M. and Waterhouse J. Reliability of nitrogen dioxide passive diffusion tubes for ambient measurement: in situ properties of the triethanolamina absorbent. *J. Environ. Monit.* 2000; 307-312
 23. Rauf M. A. and Hanan A. Quality Assurance Considerations in Chemical Analysis. *Qual. Assur. J.* 2009; 12, 16-21
 24. Duymovich, C., Acheme, R., Sesini, S. and Mazziotta, D. Espectrofotómetros y fotocolorímetros. Guía práctica de actuación. *Acta Bioquim Clín Latinoam.* 2005; 39(4), 529-539.
 25. BIPM. Evaluation of measurement data – Guide to the expression of uncertainty in measurement, First Ed. 2008
 26. Delange, D.M., Canavaciolo, V.L.G., Pérez, R.S. and Velázquez, C. Validación de un nuevo método analítico por CG con una columna capilar para la determinación de alcoholes de alto peso molecular en policosanol ingrediente activo. *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2008; 37(1), 62-68.
 27. Daza, C., Cabrera, Y., Martínez, J.A. and Rojas, J.H. Validation of an analytical methodology by gas chromatography for the assay of barbiturates in blood samples, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2008; 37(1), 5-17.
 28. Possanizi, M., Di Palo, Vincenzo, Gigliucci, P., Scianò, M.C.T. and Cecinato, A. Determination of phase-distributed PAH in Rome ambient air by denuder/GC-MS method. *Atmos. Environ.* 2004; 38, 1727-1734

29. Guía para la expresión de la incertidumbre de medida. Ministerio de Fomento. Centro Español de Metrología. 1998, junio
30. Zorzi P., Barbizzi S., Belli M., Ciceri G., Fajgeli A., Moore D., Sansone U. and Van Der Perk M. Terminology in soil sampling. *Pure appl. Chem.* 2005; 77(5), 827-841