



MINISTERIO DE
AGRICULTURA, ALIMENTACION
Y MEDIO AMBIENTE

DIRECCION GENERAL DE LA INDUSTRIA
ALIMENTARIA

SUBDIRECCION GENERAL DE CONTROL Y DE
LABORATORIOS ALIMENTARIOS

Laboratorio Arbitral Agroalimentario

LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA PARA:

ANALISIS DE CONFORMIDAD DE ABONOS CE

(Real Decreto 824/2005 de 8 de julio)

PRODUCTOS FERTILIZANTES NO CONSIDERADOS COMO ABONOS CE

(Orden PRE/630/2011, de 23 de marzo)

SUSTRATOS DE CULTIVO PARA LOS ANALISIS QUIMICOS Y MICROBIOLOGICOS

(Real Decreto 865/2010, de 2 de julio)

COMPARACION DE DOS METODOLOGIAS PARA LA DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL EN ABONOS O FERTILIZANTES

Septiembre 2012



El método comunitario 2.6.1. para la determinación del nitrógeno total en los abonos, descrito en el anexo IV del Reglamento (CE) nº 2003/2003 está basado en la digestión Kjeldahl llevada a cabo en los equipos antiguos de matraces de base esférica y destiladores de vidrio borosilicado.

Actualmente existen en el mercado equipos de digestión y destilación automáticos adecuados para realizar este procedimiento de una forma más rápida y sencilla. La metodología a aplicar es la misma, basándose en la digestión tipo Kjeldahl, únicamente se han modificado las cantidades de reactivos, que son las mas adecuadas para los nuevos equipos.

Por otro lado, la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC), sólo permite que figure en el alcance de acreditación de un procedimiento de ensayo analítico "Norma o Reglamento" cuando se siguen escrupulosamente sus indicaciones, por lo que cualquier leve desviación, implica que la técnica analítica debe incluirse en el alcance como procedimiento interno, como sería el caso de la utilización de estos equipos automáticos.

Por ello, el Laboratorio Arbitral Agroalimentario, como Laboratorio Nacional de Referencia en este ámbito, ha realizado un estudio estadístico basado en los resultados analíticos de los ensayos de intercomparación organizados y coordinados por este Laboratorio durante los años 2007, 2008, 2009 y 2010, en el que se compara los datos analíticos de los laboratorios participantes, diferenciando los que aplican el método oficial y los que utilizan los equipos nuevos automáticos.

De la evaluación estadística realizada, se deduce que los resultados obtenidos por los 2 métodos citados, son "equivalentes", es decir, no existen "diferencias significativas" entre los dos procedimientos aplicados para la determinación del nitrógeno total.

De acuerdo a lo indicado en la Nota Técnica 55 de ENAC "Laboratorios de referencia en el sector agroalimentario: Política sobre participación en el sistema de acreditación", esta comunicación se publica en la página web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, para que pueda ser utilizada por los laboratorios que realizan análisis de abonos en el proceso de su acreditación.



RESUMEN.

En el presente trabajo se pretende presentar un esquema relativamente sencillo y adecuado para demostrar si dos métodos son equivalentes y conducen a resultados equivalentes.

Este estudio consiste en comparar si los resultados obtenidos por el método oficial para determinar el Nitrógeno total en Fertilizantes, basado en la digestión Kjeldahl utilizando matraces y destiladores de vidrio borosilicato, son equivalentes a los obtenidos mediante el empleo de equipos de digestión y destilación automática.

1.- Introducción

El Reglamento (CE) nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de octubre de 2003 relativo a los abonos, establece en su artículo 29 que “Los Estados miembros podrán someter a los abonos con el marcado «abono CE» a medidas oficiales de control, con el fin de comprobar que se ajustan al citado Reglamento”.

Asimismo, en el punto 2 del mismo artículo se especifica “Los Estados miembros velarán por que la toma de muestras y los análisis para realizar los controles oficiales de los abonos CE pertenecientes a los tipos enumerados en el anexo se realicen de acuerdo con los métodos descritos en los Anexos III y IV”

Según el Real Decreto 824/2005 de 8 de julio, sobre productos fertilizantes, designa, en su artículo 31 punto 5 al Laboratorio Arbitral Agroalimentario (LAA) como órgano competente para la realización del análisis de conformidad de los “abonos CE”, previsto en el artículo 29 del Reglamento (CE) Nº 882/2004, y actuará como Laboratorio Nacional de Referencia (LNR), en su caso.

También en la Orden PRE/630/2011 de 23 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II, III, IV y VI del Real Decreto 824/2005, se establece que el LAA actuará como LNR para los abonos nacionales.

Por otra parte, en la Nota Técnica NT-55 elaborada por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) sobre “Laboratorios de Referencia en el sector agroalimentario: política sobre participación en el sistema de acreditación”, y según el artículo 33 del Reglamento (CE) Nº 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, se establecen las funciones y responsabilidades de los laboratorios nacionales de referencia, y se subraya que el papel de estos laboratorios es muy importante en la elaboración y publicación de métodos validados, en su caso, asegurar la disponibilidad de materiales de referencia, organizar ensayos comparativos y colaborar en la formación adecuada y necesaria del personal.

Para la determinación del nitrógeno total en los abonos, el método descrito en el anexo IV del Reglamento (CE) nº 2003/2003 está basado en la digestión Kjeldahl, llevada a cabo en equipos antiguos de matraces de base esférica y destiladores de vidrio borosilicado.



Hoy en día existen en el mercado equipos de digestión y destilación automáticos adecuados para realizar este procedimiento de una forma más rápida y sencilla. La metodología a aplicar sería la misma, con el mismo fundamento, es decir la digestión tipo Kjeldahl, utilizando los mismos reactivos pero modificando las cantidades utilizadas, que son más adecuadas para estos nuevos equipos.

Por otro lado ENAC, solo permite que figure en el alcance de acreditación de un procedimiento de ensayo "Norma o Reglamento" cuando se sigue escrupulosamente su metodología, y cualquier leve desviación implica que la técnica analítica se incluya en el alcance como procedimiento interno.

Ante la necesidad, de realizar los análisis según el método oficial y la obligatoriedad por parte de ENAC de referir como procedimiento interno en el alcance, un método con leves modificaciones a la norma o reglamento, como sería el caso de la utilización de estos equipos semiautomáticos o automáticos, el LAA, como LNR, ha realizado un estudio basado en los resultados analíticos de los ensayos de intercomparación organizados y coordinados por este Laboratorio durante los años 2007, 2008, 2009 y 2010, donde se comparan los datos analíticos de distintos laboratorios aplicando el método oficial y aquellos que utilizan equipos nuevos automáticos, con el fin de demostrar que dichos resultados son "equivalentes", es decir no existen "diferencias significativas" entre los dos procedimientos.

También hay que subrayar que en el Reglamento (CE) N° 1020/2009 de la Comisión de 28 de octubre de 2009, por el que se modifica El Reglamento (CE) nº 2003/2003 relativo a los abonos, en su anexo III hace referencia a la Norma EN 15604 cuando se refiere al método 2.6.1., dando a dicha Norma el carácter de procedimiento oficial.

En esta Norma, en el apartado 6 Aparatos, cuando describe el sistema de destilación indica que también pueden utilizarse aparatos de destilación automáticos y las cantidades de los reactivos empleadas están modificadas.

2.- Materiales y métodos

Con la finalidad de evaluar los resultados de los ensayos de intercomparación se han estudiado los organizados por el LAA llevados a cabo en mayo 2007, enero 2008, enero 2009 y diciembre 2010.

2.1. Las muestras estudiadas son:

Marzo 2007

Muestra A: mineral 12-10-17 con nitrógeno ureico y amoniacal

Muestra B: órgano-mineral 10-4-6

Laboratorios participantes: 21

Noviembre 2007

Muestra A. Mineral 20-7-7 con nitrógeno nítrico y amoniacal

Muestra C: orgánico

Laboratorios participantes: 20



Octubre 2008

Muestra A: mineral 18-6-6 con nitrógeno amoniacal

Muestra B: órgano-mineral 6-16-6

Laboratorios participantes: 24

Diciembre 2010

Muestra A: mineral 7-16-7

Muestra C: órgano-mineral 5-7-17

Laboratorios participantes: 24

Datos aportados para el nitrógeno total por los laboratorios son:

- 13 por el método semiautomático
- 5 por el oficial.

2.2 Método estadístico

A. Comparación del valor medio de ambos procedimientos.

Para comparar dos series de resultados efectuados sobre muestras distintas por dos procedimientos diferentes puede efectuarse inicialmente un análisis de regresión, representando en el eje de abscisas los resultados medios obtenidos en los ensayos en las muestras, aplicando el método oficial (R (CE) 2003/2003) y en ordenadas los valores correspondiente a la aplicación del método semiautomático, obteniendo la ecuación de la recta de regresión de tipo lineal:

$$y = a + bx \quad (1)$$

Donde:

a = ordenada en el origen

b = pendiente de la curva

Si los dos métodos conducen a resultados iguales se debería obtener una recta de regresión que pase por el origen formando un ángulo de 45°, es decir si son equivalentes los puntos experimentales caen en una recta de pendiente igual a **uno (b=1)** y ordenada en el origen igual a **cero (a = 0)**.

La recta de regresión y sus parámetros se calcularon aplicando el programa GraphPad InStat.

B. Comparación de las varianzas de ambos procedimientos

Aplicando un test de Fischer (prueba F o análisis de la varianza) se compara la varianza obtenida al aplicar el método oficial (R (CE) 2003/2003) y la obtenida con el otro procedimiento para estudiar si son iguales o existen diferencias significativas entre ambas a un nivel de significación $\alpha = 0.05$. Si las varianzas son iguales los dos procedimientos son iguales de precisos.



$$F^{**} = \frac{S_{of.}^2}{S_{sem}^2} \quad (2)$$

**** F (n₁-1, n₂-1, α = 0.05)**

Siendo:

S²_{of} = varianza del método oficial

S²_{sem.} = varianza del método semiautomático

n₁ y n₂ = n^o de muestras estudiadas

Previamente hemos obtenido la desviación estándar media para cada procedimiento, teniendo en cuenta las obtenidas para todas las muestra de todos los ensayos estudiados, calculándola como:

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{\sum S_i^2}{n}} \quad (3)$$

Siendo S₁ las desviaciones estándar de cada muestra

Elevando al cuadrado estas desviaciones obtenemos las varianzas de cada procedimiento. (S²_{of} y S²_{sem})

Si el valor experimental obtenido para la prueba F es inferior al valor tabulado no existen diferencias significativas entre ambas varianzas, esas diferencias son debidas al azar y los dos métodos son iguales de preciso.

Al mismo tiempo también se puede hacer una estimación de la precisión a partir de la representación gráfica de los límites de tolerancia de la recta de regresión. Si la hipérbola es estrecha la precisión de ambos métodos es semejante.

C. Obtención Limite de Repetibilidad (r) y Limite de Reproducibilidad (R)

Sabemos que la precisión es el grado de concordancia entre los resultados de mediciones obtenidos independientemente bajo condiciones establecidas. Se mide habitualmente en términos de la desviación estándar entre resultados.

La repetibilidad mide la variabilidad intralaboratorio y la reproducibilidad mide la variabilidad total entre laboratorios.

$$S_R^2 = S_r^2 + S_L^2 \quad (4)$$

$$r = 2.83 S_r$$

$$R = 2.83 S_R$$



Se pueden expresar estos parámetros en términos relativos (coeficientes de variación)

$$RSD_r\% = \frac{100 S_r}{\bar{X}} \quad (5)$$

$$RSD_R\% = \frac{100 S_R}{\bar{X}} \quad (6)$$

Se calculan estos parámetros para ambos procedimientos siguiendo el método de cálculo establecido en la Norma UNE-ISO 5725.

3.- Resultados

En la tabla 1 se presentan los resultados de los valores medios de las muestras analizadas en los ensayos de intercomparación de los años del 2007 al 2010 por los diferentes laboratorios, agrupándolos en función del procedimiento analítico empleado, así como el valor asignado a cada muestra en el ensayo (media de los resultados una vez eliminados los anómalos).

Aunque en el informe del ensayo queda reflejada la metodología aplicada por laboratorio, se ha vuelto a preguntar previamente a la elaboración de este documento a cada laboratorio, que indicaran exactamente el método empleado.

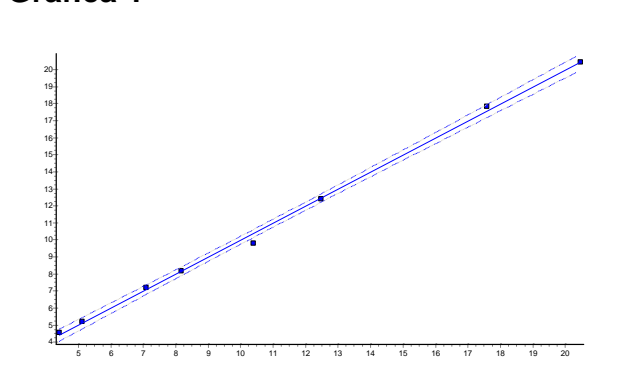
Tabla 1

Año		Asignado ensayo %	Oficial %	Semiautomático %
2007	Muestra A	$V_R = 12.45$	12.48	12.42
	Muestra B	$V_R = 9.78$	10.39	9.80
2008	Muestra A	$V_R = 20.43$	20.47	20.44
	Muestra C	$V_R = 8.11$	8.17	8.17
2009	Muestra A	$V_R = 17.85$	17.59	17.83
	Muestra B	$V_R = 4.54$	4.41	4.56
2010	Muestra A	$V_R = 7.18$	7.09	7.19
	Muestra C	$V_R = 5.17$	5.11	5.21



En la grafica 1 se representa la recta de regresión representando en el eje de abscisas los resultados medios obtenidos en los ensayos en las muestra aplicando el método oficial (R(CE) 2003/2003) y en ordenadas los valores correspondiente a la aplicación del método semiautomático.

Grafica 1



Datos de la recta de regresión:

Pendiente

$$b = 0.9982$$
$$S_b = 0.01768$$

Intervalo de confianza del 95% de la pendiente

$$0.9550 < b < 1.041$$

Ordenada en el origen

$$a = 0.007645$$
$$S_a = 0.2124$$

Intervalo de confianza del 95% de la ordenada en el origen

$$-0.5121 < a < 0.5274$$

Coefficiente de correlación 0.9991.

Ecuación de la recta:

$$y = 0.0076 + 0.9982 x$$

Como puede observarse la recta tiene pendiente y ordenada en el origen cuyos intervalos de confianza incluyen la unidad y el cero, respectivamente y con un coeficiente de correlación prácticamente igual a uno.



Ello demuestra que los datos obtenidos por los dos procedimientos son iguales sin que aparezcan errores sistemáticos ni proporcionales.

También observamos que la hipérbola indicativa de los intervalos de confianza es estrecha indicando semejanza en precisión.

En la tabla 2 se indican las varianzas de cada muestra y cada procedimiento así como el valor asignado en el ensayo de intercomparación.

Tabla 2

Año		Asignado ensayo %	Oficial%	Semiautomático%
2007	Muestra A	$S_R = 0.240$	0.330	0.204
	Muestra B	$S_R = 0.769$	0.770	0.613
2008	Muestra A	$S_R = 0.181$	0.157	0.157
	Muestra C	$S_R = 0.45$	0.309	0.322
2009	Muestra A	$S_R = 0.405$	0.417	0.217
	Muestra B	$S_R = 0.160$	0.236	0.124
2010	Muestra A	$S_R = 0.156$	0.156	0.118
	Muestra C	$S_R = 0.077$	0.115	0.092

En la tabla 3 se presenta la varianza de cada procedimiento calculada de acuerdo a la ecuación (3)

Tabla 3

S^2_{of}	S^2_{sem}
0.369	0.281



Si la compararemos entre sí con la prueba F, obtenemos que:

$$F^{**} = S^2_{of} / S^2_{sem.} = 1.315$$

**** F(7,7, $\alpha = 0.05$)**

F tabulada = 3.5

No existen diferencias significativas entre las varianzas de ambas metodologías, y tienen precisiones semejantes.

En las tablas 4 y 5 se presentan los parámetros de repetibilidad (r), reproducibilidad (R), RSD_r % y RSD_R %, calculados de acuerdo a la Norma ISO 5725 para el método oficial y el semiautomático, en aquellos casos con más de 5 laboratorios.

Tabla 4

Año		r_{ofi}	R_{ofi}	RSD_r % y RSD_R %	
2007	Muestra A	0.091	0.93	0.261	2.66
2009	Muestra A	0.499	1.269	1.01	2.56
	Muestra B	0.512	0.837	4.14	6.77
2010	Muestra A	0.24	0.51	1.21	2.58

Tabla 5

Año		r_{sem}	R_{sem}	RSD_r % y RSD_R %	
2007	Muestra A	0.62	0.856	1.78	2.46
2009	Muestra A	0.463	0.766	0.93	1.54
	Muestra B	0.175	0.389	1.38	3.05
2010	Muestra A	0.671	0.748	3.33	3.72



Si comparamos las reproducibilidades obtenidas para ambas metodologías, con las tolerancias permitidas por la legislación comunitaria y nacional con respecto al valor reflejado en la etiqueta para este nutriente (1.1 %) que sería la máxima diferencia permitida entre dos resultados entre distintos laboratorios, observamos que salvo en la muestra A del año 2009 y para el método oficial, todas las demás están por debajo de ese valor.

4. Conclusiones

Con los datos estudiados en este trabajo sobre los resultados obtenidos en los ensayos de intercomparación organizados por el LAA, con el fin de comparar el método oficial 2.6.1. y la utilización de los equipos automáticos, se demuestra que:

- 1.- No existen diferencias significativas en el valor medio obtenido por los dos procedimientos, es decir conducen a los mismos resultados.
- 2.- La precisión de ambas metodologías son semejantes.
- 3.- La reproducibilidad obtenida por los dos procedimientos están de acuerdo al rango permitido por la tolerancia.
- 4.- La utilización de los equipos automáticos conduce a resultados “equivalentes” al método oficial.

Este esquema relativamente sencillo nos parece adecuado para demostrar que los dos métodos son equivalentes y puede servir de ejemplo para otros procedimientos.

5. Bibliografía

Reglamento (CE) nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 2003 *relativo a los abonos*

Real Decreto 824/2005 de 8 de julio, *sobre productos fertilizantes*.

Orden PRE/630/2011 de 23 de marzo, *por la se modifican los Anexos, II,II,IV,V,VI del Real Decreto 824/2005, de 8 de julio, sobre productos fertilizantes*.

NT-55 *sobre laboratorios de referencia de la UE y nacionales dentro del sistema de acreditación de laboratorios agroalimentarios*.

Reglamento (CE) Nº 882/2004, del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 *sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales*.



Ensayo de intercomparación de Fertilizantes, mayo 2007. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Ensayo de intercomparación de Fertilizantes, enero 2008. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Ensayo de intercomparación de Fertilizantes, enero 2009. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

Ensayo de intercomparación de Fertilizantes, diciembre 2010. Ministerio de Medio Ambiente, Medio Rural y Marino.

Norma UNE ISO 5725-1. *Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición*, septiembre 1998.