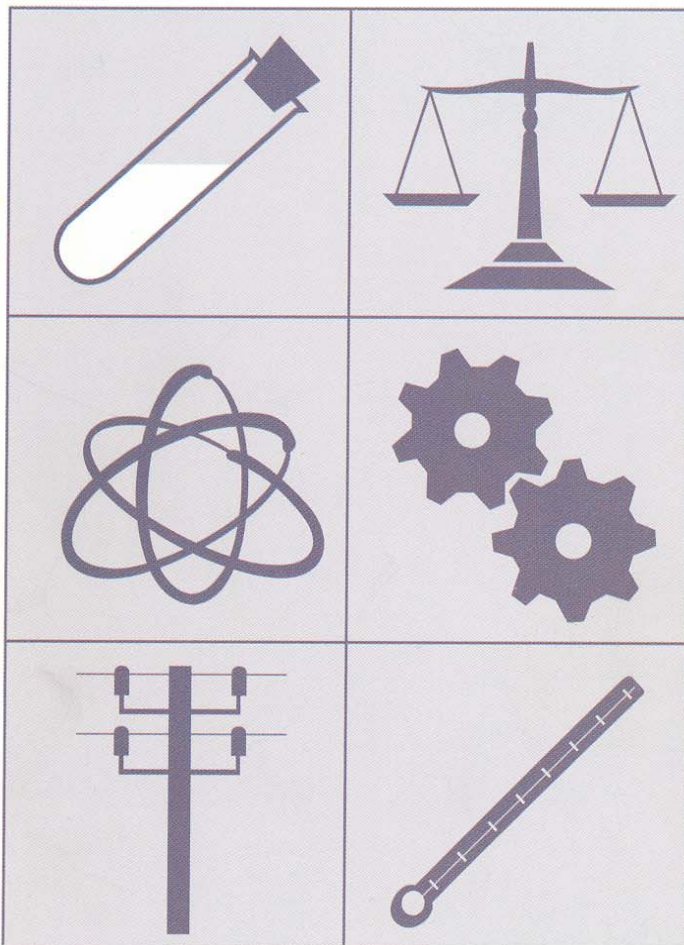


PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN



m 09

PROCEDIMIENTO QU- 001 PARA LA CALIBRACIÓN EQUIPOS DE ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA



Metrología

Este procedimiento ha sido revisado, corregido y actualizado, si ha sido necesario.

La presente edición se emite en formato digital. Hay disponible una edición en papel que se puede adquirir en nuestro departamento de publicaciones.

Este procedimiento de calibración es susceptible de modificación permanente a instancia de cualquier persona o entidad. Las propuestas de modificación se dirigirán por escrito, justificando su necesidad, a cualquiera de las siguientes direcciones:

Correo postal
Centro Español de Metrología
C/ del Alfar, 2,
28760 Tres Cantos, Madrid

Correo electrónico
cem@cem.es



ÍNDICE

	Página
1. OBJETO	4
2. ALCANCE	4
3. DEFINICIONES	5
4. GENERALIDADES	12
4.1. Partes integrantes de los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica	12
4.2. Descripción de las bases de la técnica.....	15
5. DESCRIPCIÓN.....	16
5.1. Equipos y materiales.....	16
5.2. Operaciones previas y puesta en marcha del equipo	19
5.3. Determinación experimental de la curva de calibración	25
5.4. Toma de datos.....	28
5.5. Tratamiento de datos: determinación y estipulación de la curva de calibración	28
6. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CALIBRACIÓN	34
7. REFERENCIAS	40
8. ANEXOS.....	41
Anexo: Ajuste por regresión polinómica.....	41



1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto mostrar un método posible para la calibración de Equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica (E.A.A.) con distintas variantes instrumentales.

2. ALCANCE

El presente procedimiento puede aplicarse para la calibración, para un cierto elemento en unas condiciones experimentales determinadas, de Espectrofotómetros de Absorción Atómica (con sus correspondientes accesorios instrumentales: generadores de hidruros, inyectoros automáticos...), tanto los que verifican la atomización por la acción de una llama o mediante una cámara de grafito. Dicha calibración, por corresponder a un equipo que constituye un sistema instrumental complejo y por tratarse de una técnica espectrofotométrica, se lleva a cabo por interpolación sobre la correspondiente recta de regresión. Por otra parte, hay que tener en cuenta que, para poder aplicar la correspondiente calibración para el desarrollo de la determinación analítica de un elemento, debe efectuarse un tratamiento análogo de los patrones y de las muestras y, además, deben coincidir lo más posible las naturalezas químicas de sus matrices. En algunos casos, con el objeto de obviar el efecto de las posibles interferencias de la matriz de las muestras, se emplea la estrategia de la cuantificación mediante el procedimiento de adición de patrón que se basa en la determinación de la diferencia de absorbancias entre la muestra y alícuotas de la misma fortificadas con concentraciones conocidas del elemento en estudio, determinándose de este modo la relación absorbancia/concentración del analito. Cabe señalar que en el presente procedimiento de calibración únicamente se contempla el caso del establecimiento de la curva de calibración correspondiente al análisis directo de patrones, excluyéndose el tratamiento de la técnica de patrón añadido, dado que está muy vinculada a la propia naturaleza de las muestras objeto de ensayo.



3. DEFINICIONES

Ajuste de un sistema de medida [1] (3.11)

Conjunto de operaciones realizadas sobre un sistema de medida para que proporcione indicaciones prescritas, correspondientes a valores dados de la magnitud a medir.

NOTA 1 Diversos tipos de ajuste de un sistema de medida son: ajuste de cero, ajuste del *offset* (desplazamiento) y ajuste de la amplitud de escala (denominado también ajuste de la ganancia).

NOTA 2 No debe confundirse el ajuste de un sistema de medida con su propia calibración, que es un requisito para el ajuste.

NOTA 3 Después de su ajuste, generalmente un sistema de medida debe ser calibrado nuevamente.

Calibración [1] (2.39)

Operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medida asociadas obtenidas a partir de los patrones de medida, y las correspondientes indicaciones con sus incertidumbres asociadas y, en una segunda etapa, utiliza esta información para establecer una relación que permita obtener un resultado de medida a partir de una indicación.

NOTA 1 Una calibración puede expresarse mediante una declaración, una función de calibración, un diagrama de calibración, una curva de calibración o una tabla de calibración. En algunos casos, puede consistir en una corrección aditiva o multiplicativa de la indicación con su incertidumbre correspondiente.

NOTA 2 Conviene no confundir la calibración con el ajuste de un sistema de medida, a menudo llamado incorrectamente “autocalibración”, ni con una verificación de la calibración.



NOTA 3 Frecuentemente se interpreta que únicamente la primera etapa de esta definición corresponde a la calibración.

Desviación típica experimental [2] (B.2.17)

Para una serie de n mediciones de un mismo mensurando, la magnitud s que caracteriza la dispersión de los resultados, dada por la fórmula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

siendo x_i el resultado de la i -ésima medición y \bar{x} la media aritmética de los n resultados considerados.

NOTAS

1. Considerando la serie de n valores como muestra de una distribución, \bar{x} es un estimador insesgado de la media μ , y s^2 es un estimador insesgado de la varianza σ^2 de dicha distribución.
2. La expresión s/\sqrt{n} es una estimación de la desviación típica de la distribución de \bar{x} y se denomina desviación típica experimental de la media.
3. La desviación típica experimental de la media en ocasiones se denomina, incorrectamente, error de la media.

Ensayo

Operación técnica que consiste en la determinación de una o más características o cualidades de un determinado, producto, material, equipo, organismo, fenómeno físico, proceso o servicio de acuerdo con un procedimiento especificado.

Error de medida [1] (2.16)

Diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.



NOTA 1 El concepto de error de medida puede emplearse:

- a) cuando exista un único valor de referencia, como en el caso de realizar una calibración mediante un patrón cuyo valor medido tenga una incertidumbre de medida despreciable, o cuando se toma un valor convencional, en cuyo caso el error es conocido.
- b) cuando el mensurando se supone representado por un valor verdadero único por un conjunto de valores verdaderos, de amplitud despreciable, en cuyo caso el error es desconocido.

NOTA 2 Conviene no confundir el error de medida con un error en la producción o con un error humano.

Incertidumbre de medida [1] (2.26)

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando, a partir de la información que se utiliza

NOTA 1 La incertidumbre de medida incluye componentes procedentes de efectos sistemáticos, tales como componentes asociadas a correcciones y a valores asignados a patrones, así como la incertidumbre debida a la definición. Algunas veces no se corrigen los efectos sistemáticos estimados y en su lugar se tratan como componentes de incertidumbre.

NOTA 2 El parámetro puede ser, por ejemplo, una desviación típica, en cuyo caso se denomina incertidumbre típica de medida (o un múltiplo de ella), o una semiapertura con una probabilidad de cobertura determinada.

NOTA 3 En general, la incertidumbre de medida incluye numerosas componentes. Algunas pueden calcularse mediante una evaluación tipo A de la incertidumbre de medida, a partir de la distribución estadística de los valores que proceden de las series de mediciones y pueden caracterizarse por desviaciones típicas. Las otras componentes, que pueden calcularse mediante una evaluación tipo B de la incertidumbre de medida, pueden caracterizarse también por desviaciones típicas, evaluadas a partir de funciones de densidad de probabilidad basadas en la experiencia u otra información.



NOTA 4 En general, para una información dada, se sobrentiende que la incertidumbre de medida está asociada a un valor determinado atribuido al mensurando. Por tanto, una modificación de este valor supone una modificación de la incertidumbre asociada.

Material de referencia [1] (5.13)

Material suficientemente homogéneo y estable con respecto a propiedades especificadas, establecido como apto para su uso previsto en una medición o en un examen de propiedades cualitativas

NOTA 1 El examen de una propiedad cualitativa comprende la asignación de un valor a dicha propiedad y de una incertidumbre asociada. Esta incertidumbre no es una incertidumbre de medida.

NOTA 2 Los materiales de referencia con o sin valores asignados pueden servir para controlar la precisión de la medida, mientras que únicamente los materiales con valores asignados pueden utilizarse para la calibración o control de la veracidad.

NOTA 3 Los materiales de referencia comprenden materiales que representan tanto magnitudes como propiedades cualitativas.

EJEMPLO 1 Ejemplos de materiales de referencia que representan magnitudes:

- a) agua de pureza declarada, cuya viscosidad dinámica se emplea para la calibración de viscosímetros.
- b) suero humano sin valor asignado a la concentración de colesterol inherente, utilizado solamente como material para el control de la precisión de la medida.
- c) tejido de pescado con una fracción másica determinada de dioxina, utilizado como calibrador.

EJEMPLO 2 Ejemplos de materiales de referencia que representan propiedades cualitativas:

- a) carta de colores mostrando uno o más colores especificados.
- b) ADN conteniendo una secuencia especificada de nucleótido.
- c) orina conteniendo 19-androstenediona.



NOTA 4 Algunas veces un material de referencia se incorpora a un dispositivo fabricado especialmente.

EJEMPLO 1 Sustancia de punto triple conocido en una célula de punto triple.

EJEMPLO 2 Vidrio de densidad óptica conocida, en un soporte de filtro de transmitancia.

EJEMPLO 3 Esferas de granulometría uniforme montadas en un portamuestras de microscopio.

NOTA 5 Algunos materiales de referencia tienen valores asignados que son metrológicamente trazables a una unidad de medida fuera de un sistema de unidades. Tales materiales incluyen vacunas a las que la Organización Mundial de la Salud ha asignado Unidades Internacionales (UI).

NOTA 6 En una medición dada, un material de referencia puede utilizarse únicamente para calibración o para el aseguramiento de la calidad.

NOTA 7 Dentro de las especificaciones de un material de referencia conviene incluir su trazabilidad, su origen y el proceso seguido (Accred. Qual. Assur.:2006).

NOTA 8 La definición según ISO/REMCO es análoga, pero emplea el término “proceso de medida” para indicar “examen” (ISO 15189:2007, 3.4), el cual cubre tanto una medición de la magnitud como el examen de una propiedad cualitativa.

Material de referencia certificado (MRC) [1] (5.14):

Material de referencia acompañado por la documentación emitida por un organismo autorizado, que proporciona uno o varios valores de propiedades especificadas, con incertidumbres y trazabilidades asociadas, empleando procedimientos válidos.

EJEMPLO Suero humano, con valores asignados a la concentración de colesterol y a la incertidumbre de medida indicados en un certificado,



empleado como calibrador o como material para el control de la veracidad de la medida.

NOTA 1 La “documentación” mencionada se proporciona en forma de “certificado” (véase la Guía ISO 31:2000).

NOTA 2 Procedimientos para la producción y certificación de materiales de referencia certificados pueden encontrarse, por ejemplo, en las Guías ISO 34 e ISO 35.

NOTA 3 En esta definición, el término “incertidumbre” se refiere tanto a la “incertidumbre de la medida” como a la “incertidumbre del valor de la propiedad cualitativa”, tal como su identidad y secuencia. El término “trazabilidad” incluye tanto la “trazabilidad metrológica “del valor de la magnitud como la “trazabilidad del valor de la propiedad cualitativa”.

NOTA 4 Los valores de las magnitudes especificadas de los materiales de referencia certificados requieren una trazabilidad metrológica con una incertidumbre de medida asociada (Accred. Qual. Assur.:2006).

NOTA 5 La definición de ISO/REMCO es análoga (Accred. Qual. Assur.:2006) pero utiliza el calificativo “metrológica” tanto para una magnitud como para una propiedad cualitativa.

Medición [1] (2.1)

Proceso que consiste en obtener experimentalmente uno o varios valores que pueden atribuirse razonablemente a una magnitud.

NOTA 1 Las mediciones no son de aplicación a las propiedades cualitativas.

NOTA 2 La medición supone una comparación de magnitudes, e incluye el conteo de entidades.

NOTA 3 Una medición supone una descripción de la magnitud compatible con el uso previsto de un resultado de medida, un procedimiento de medida y un sistema de medida calibrado conforme a un procedimiento de medida especificado, incluyendo las condiciones de medida.



Resolución de un dispositivo visualizador [1] (4.15)

Mínima diferencia entre indicaciones visualizadas, que puede percibirse de forma significativa.

Trazabilidad metrológica [1] (2.41)

Propiedad de un resultado de medida por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida

NOTA 1 En esta definición, la referencia puede ser la definición de una unidad de medida, mediante una realización práctica, un procedimiento de medida que incluya la unidad de medida cuando se trate de una magnitud no ordinal, o un patrón.

NOTA 2 La trazabilidad metrológica requiere una jerarquía de calibración establecida.

NOTA 3 La especificación de la referencia debe incluir la fecha en la cual se utilizó dicha referencia, junto con cualquier otra información metrológica relevante sobre la referencia, tal como la fecha en que se haya realizado la primera calibración en la jerarquía.

NOTA 4 Para mediciones con más de una magnitud de entrada en el modelo de medición, cada valor de entrada debiera ser metrológicamente trazable y la jerarquía de calibración puede tener forma de estructura ramificada o de red. El esfuerzo realizado para establecer la trazabilidad metrológica de cada valor de entrada debería ser en proporción a su contribución relativa al resultado de la medición.

NOTA 5 La trazabilidad metrológica de un resultado de medida no garantiza por sí misma la adecuación de la incertidumbre de medida a un fin dado, o la ausencia de errores humanos.

NOTA 6 La comparación entre dos patrones de medida puede considerarse como una calibración si ésta se utiliza para comprobar, y si



procede, corregir el valor y la incertidumbre atribuidos a uno de los patrones.

4. GENERALIDADES

Debe tenerse en cuenta que los Espectrofotómetros de Absorción Atómica, equipos objeto del presente procedimiento de calibración, constituyen Sistemas Instrumentales Complejos que constan de múltiples partes las cuales, a menudo, suponen variables operativas alternativas y permiten también el acoplamiento de distintos accesorios (como inyectoros automáticos, dispositivos de generación de hidruros...). Otro aspecto de interés se deriva de la capacidad de aplicación de dicha técnica en la determinación analítica de distintos elementos. Ambas circunstancias, sin soslayar la oportunidad de verificar periódicamente las especificaciones de alguno de los componentes del equipo, implican la necesidad de efectuar calibraciones globales del Sistema Instrumental completo que constituye el Espectrofotómetro de Absorción Atómica, particularizadas para cada elemento en unas condiciones experimentales prefijadas.

En este apartado se describen, además de los fundamentos básicos de la técnica, los elementos integrantes de los Espectrofotómetros de Absorción Atómica.

4.1. Partes integrantes de los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica

Los principales elementos (con las variables operativas correspondientes) son:

4.1.1. Sistema neumático

- Gas combustible (para el caso de atomización por llama), siendo los más comunes:
 - Acetileno
 - Otros gases menos empleados: Hidrógeno, Propano, Butano
- Gas oxidante (para el caso de atomización por llama).



- Aire
- Óxido nítrico
- Gas de purga y enfriamiento (para el caso de atomización electrotérmica):
 - Argón
- Gas de arrastre (para el caso de EAA con cámara de vapor frío):
 - Argón
- Reguladores de presión y caudal de los gases:
 - Mecánicos o electrónicos

4.1.2. Dispositivos de introducción de muestras y/o transferencia de muestras al elemento de atomización

Los usados más frecuentemente son:

- Por aspiración y/o nebulización de las muestras y de los patrones de calibración.
- Inyección manual o automática de las muestras y patrones de calibración en la cámara de atomización.
- Dispositivos para la generación de vapores fríos (para la determinación de mercurio) y para la generación de hidruros (para la determinación de arsénico, selenio, antimonio, estaño,...).
- Inyectores de Flujo Segmentado (FIAS).

Además, en algunos equipos se emplean:

- Inyectores para muestras sólidas.
- Diluidores automáticos de muestras y/o patrones de calibración.

4.1.3. Cámara y fuente de atomización (por llama o electrotérmica)



- Mechero con llama aire-acetilénica.
- Mechero con llama óxido nitroso-acetilénica.
- Cámara de grafito, que incorpora:
 - Tubo de grafito (con o sin plataforma L'Vov)
 - Sistema de calentamiento (longitudinal o transversal)
 - Circuito de gas inerte de purga y enfriamiento
 - Circuito de refrigeración con agua

4.1.4. Sistema óptico

- Fuentes de energía radiante y modulada (generalmente ubicadas en un portalámparas múltiple), siendo susceptible el control de su intensidad y energía.
 - Lámparas de cátodo hueco (monoelementales)
 - Lámparas de descarga sin electrodos (multielementales).
- Rendija regulable en anchura (en algunos equipos también en altura).
- Selector de longitud de onda.
- Monocromador.
- otomultiplicador.
- Corrector de la radiación de fondo:
 - Lámpara de deuterio.
 - Efecto Zeeman.
- Cámara para vapor frío.

4.1.5. Gestión de la señal medida

- Amplificador logarítmico (para convertir la transmitancia medida en absorbancia).



- Convertidor analógico/digital.
- Dispositivo de amortiguación del ruido de fondo.

4.1.6. Registro de datos

- Registrador gráfico de tipo potenciométrico.
- Sistema informatizado:
 - Integrado en el equipo.
 - Externo (soportado en un PC).

4.2. Descripción de las bases de la técnica

4.2.1. Fundamento

La Espectrofotometría de Absorción Atómica se basa en la absorción selectiva de radiación luminosa a una longitud de onda determinada por parte de los átomos (o iones simples) en estado gaseoso de los distintos elementos susceptibles de análisis mediante la citada técnica. Dado que la absorción atómica se rige teóricamente por la ley de Beer-Lambert que expresa la proporcionalidad directa entre la absorbancia y la concentración del analito (tanto en la disolución de muestra a ensayar como en los patrones de calibración), es posible el establecimiento de curvas (o rectas) de calibración que representen estadísticamente la correspondiente relación absorbancia/concentración del elemento objeto de análisis. En el siguiente apartado se ofrecen una serie de consideraciones y criterios para el desarrollo de las actividades de la presente calibración.

4.2.2. Consideraciones generales sobre la calibración de los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica

Dada la complejidad y multiplicidad de las partes integrantes de los Espectrofotómetros de Absorción Atómica, equipos cuya calibración constituye el objeto de este documento, y ante la imposibilidad



práctica por parte de los usuarios de efectuar calibraciones por separado de los distintos componentes, en el presente procedimiento se plantea la oportunidad de efectuar una calibración global del equipo basada en la determinación y verificación de la función de respuesta (denominada recta o curva de calibración) individualizada para cada elemento susceptible de medida por el equipo en unas condiciones de trabajo determinadas. A partir del tratamiento estadístico de los datos de la calibración se establecerá el criterio para la determinación de los intervalos de confianza y para el cálculo de la incertidumbre asociada a las medidas de cuantificación a llevar a cabo.

NOTA

Cabe comentar que en la redacción del presente procedimiento se ha procurado generalizar las operaciones y cálculos para que se abarquen al máximo todas las variantes operativas de la presente técnica analítica.

5. DESCRIPCIÓN

En el presente apartado se describen las consideraciones a tener en cuenta sobre los equipos y también de los materiales y reactivos involucrados en las actividades de calibración de Espectrofotómetros de Absorción Atómica y las operaciones a llevar a cabo para la realización de dichas actividades.

5.1. Equipos y materiales

Las buenas prácticas analíticas y los requisitos de las normativas concernientes a los sistemas de aseguramiento de la calidad analítica (como por ejemplo ISO 17025) establecen como criterio general que todos equipos de medición y ensayo utilizados en el laboratorio, deberán calibrarse antes de su puesta en servicio y posteriormente, cuando sea necesario de acuerdo con el programa de calibración establecido (sin excluir la necesidad u oportunidad de la calibración en cada uso) y, además, deben estar sometidos a un adecuado mantenimiento preventivo. En consecuencia, el laboratorio deberá disponer de un plan y un programa estrictos tanto por lo que se refiere a las operaciones de calibración como a las de mantenimiento



de los equipos. Además, habrá de disponer de los registros de calibración (así como de los de verificación, mantenimiento preventivo y mantenimiento correctivo) convenientes que permitan asegurar la trazabilidad de las medidas realizadas con dichos equipos.

Por lo que se refiere a los materiales de referencia empleados en el desarrollo de las calibraciones (véase al respecto la definición en el apartado 3 del presente procedimiento), deberá asegurarse su trazabilidad respecto a patrones nacionales o internacionales, o bien deberá ponerse de manifiesto satisfactoriamente la exactitud e incertidumbre de la concentración de los analitos de interés en los patrones correspondientes, en base al contraste de respuestas en relación con patrones de reconocida solvencia o a partir de la participación de ejercicios de intercomparación entre laboratorios.

Respecto los materiales de referencia para la calibración de Espectrofotómetros de Absorción Atómica debe indicarse que en la actualidad son asequibles en distintas fuentes patrones (mono o multielementales) con la suficiente trazabilidad. Cabe señalar, por otra parte, que la concentración de dichos patrones suele ser elevada (típicamente de 1000 mg/L) y que, por tanto, el usuario deberá efectuar diluciones de los mismos para poderlos emplear en las correspondientes calibraciones del equipo, debiéndose extremar en dicho paso las precauciones tanto materiales (empleando materiales volumétricos y/o gravimétricos calibrados, utilizando agua y reactivos exentos de impurezas...) como operativas (encargando dicha actividad a personal cualificado).

Los equipos y materiales necesarios para la realización de la calibración de los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica se presentan en el listado siguiente:

- Espectrofotómetro de AA.
- Equipos auxiliares (inyector automático, generador de hidruros...).
- Fuente de radiación apropiada (lámpara del elemento objeto de la calibración).



- Gases necesarios:
 - Para sistemas de atomización por llama: acetileno + aire (u óxido nítrico).
 - Para sistemas de atomización electrotérmica: argón.

- Sistema de aporte de muestra:
 - Manual.
 - Automática.
 - Inyector de flujo segmentado (FIAS).
 - Generador químico de vapores.

- Sistema de atomización:
 - Por llama acetileno y aire (o acetileno y óxido nítrico).
 - Electrotérmica.
 - ◆ Tubos de grafito para atomización electrotérmica.

- Equipos volumétricos necesarios, calibrados.

- Materiales de referencia:
 - Distintas disoluciones (siempre en número superior a 3, y más conveniente ≥ 5) de un material de referencia certificado conteniendo concentraciones conocidas del elemento en un medio apropiado (por ejemplo disolución acuosa de ácido nítrico M mol/L). Las concentraciones de dichas disoluciones abarcarán lo más extensamente posible el rango lineal de determinación del elemento.

- Reactivos:
 - Agua doblemente desionizada (exenta de metales).
 - Ácidos (exentos de metales).
 - Modificadores de matriz (como: nitrato de lantano, nitrato de paladio, nitrato de magnesio...).
 - Reactivos para la generación química de vapores (como: tetrahidruro de boro y sodio, cloruro de estaño (II)...).



- Manual/es de instrucciones o procedimiento/s de uso y mantenimiento de los equipos, sus partes y/o accesorios.

- Otros materiales auxiliares:
 - Material volumétrico:
 - ◆ Matraces de clase A.
 - ◆ Pipetas de clase A.
 - ◆ Microjeringas.
 - Cápsulas o viales portamuestras.
 - Recipientes.
 - Balanza analítica.
 - Sistemas de filtración.
 - Reactivos.

5.2. Operaciones previas y puesta en marcha del equipo

Antes de iniciar la calibración se realizarán las siguientes operaciones previas:

5.2.1. Con el objeto que la persona que realice la calibración esté familiarizada con el manejo del equipo, se comprobará la disponibilidad del manual de instrucciones del fabricante y, si lo hubiera, del procedimiento de uso y/o mantenimiento del mismo.

5.2.2. Aunque, dadas las características constructivas y funcionales de los Espectrofotómetros de Absorción Atómica, las condiciones ambientales (si no son extremas) no afectan en principio al funcionamiento de dichos equipos y, por ende, al resultado de la calibración, dicho proceso deberá procurar realizarse manteniendo una temperatura ambiente comprendida entre 15 °C y 30 °C que es el margen normal de tolerancia en el que, según los fabricantes, los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica mantienen sus especificaciones.

NOTA

En el planteamiento del presente procedimiento puede considerarse que la temperatura no ejerce una influencia significativa sobre el resultado de la calibración. Sin embargo, cuando figuren operaciones



de pesada y/o dilución, la temperatura puede contribuir de forma apreciable en la incertidumbre del resultado correspondiente.

5.2.3. Se comprobará que el Espectrofotómetro de Absorción Atómica y los accesorios correspondientes estén conectados a una base de enchufe que incluya un conductor de protección o toma de tierra.

Para la realización de la calibración previamente habrá que efectuar una serie de operaciones, tales como:

5.2.4. Especificación de las condiciones experimentales:

Deberán especificarse directamente o comprobar que están perfectamente especificados los aspectos (listados a continuación), y mediante referencias cruzadas a:

- Manual/es de instrucciones (o uso) del equipo, sus partes y/o accesorios.
- Procedimiento normalizado de trabajo concerniente al ensayo al que aplica la calibración correspondiente.
- Otros documentos (normas, referencias bibliográficas con solvencia técnica reconocida...).

Siendo los aspectos:

- Elemento.
- Longitud de onda.
- Amplitud de radiación.
- Modo de trabajo (absorción o emisión).
- Tipo de tratamiento y/o sistema de transferencia de muestras.
- Naturaleza, pureza y caudales de los gases.
- Tipo de mechero (en función del comburente).
- Naturaleza y composición de los patrones de calibración.
- Naturaleza y pureza de los modificadores de matriz (si aplica).



- Concentración (y modo de preparación) de las disoluciones de los modificadores de matriz.
- Naturaleza y pureza de los reactivos de generación química de vapores (si aplica).
- Concentración (y modo de preparación) de las disoluciones de los modificadores de matriz.
- Condiciones de la introducción de muestras y otros reactivos o modificadores (si aplica).
- Programa de atomización (si ésta es electrotérmica), programa de generación química de vapores (si aplica)...
- Modo de recogida y tratamiento de datos de las medidas.
- Criterio de aceptación del resultado de la calibración.
- Criterios auxiliares sobre frecuencia de ensayos de blancos, repeticiones, muestras de control...

NOTA

Téngase en cuenta que muchas de las especificaciones y condiciones que se indican en los apartados siguientes estarán descritas en los Manual/es de instrucciones o procedimiento/s de uso y mantenimiento de los equipos, sus partes y/o accesorios y/o también en los procedimientos de ensayo correspondientes, normas...

NOTA

Téngase en cuenta, como se ha comentado anteriormente, que cuando se aplica el resultado de la calibración en la cuantificación de muestras reales, para poder garantizar la efectividad operativa, tanto los patrones de calibración como las muestras (o sus extractos finales) han de presentar una matriz lo más coincidente posible y también han de haber sido sometidos al mismo tipo de tratamiento de atomización y/o manipulación. Dadas las numerosas variantes posibles, en el presente procedimiento no se contempla el aspecto relativo al tratamiento de las muestras y materiales de referencia, circunscribiéndose al caso de la calibración por análisis directo de patrones.

5.2.5. Comprobar la disponibilidad de la lámpara del elemento correspondiente.

5.2.6. Comprobar la disponibilidad y vigencia de los materiales de referencia apropiados, cuyas características de trazabilidad (origen,



concentración, incertidumbre, caducidad,...) deben estar bien determinadas y reflejadas en los correspondientes certificados (los cuales han de ser accesibles al operador). También debe disponerse de reactivos y agua exentos de los eventuales elementos susceptibles de interferir con la calibración a efectuar.

5.2.7. Comprobar la disponibilidad de todo el material volumétrico necesario para preparar las diluciones de los patrones a utilizar en la calibración (recomendándose para ello el uso de material volumétrico de Clase A) y, además, debe disponerse de la seguridad que dicho material presenta el suficiente grado de limpieza (por ejemplo lavado previamente con una disolución de ácido nítrico 0,1 mol/L) para evitar posibles interferencias espurias que pudieran desvirtuar la calibración.

5.2.8. Comprobar en los indicadores de presión de las botellas de los gases correspondientes (combustible, oxidante o purga) que existen suficientes reservas de cada uno de los que deban utilizarse con el equipo para llevar a cabo la presente calibración y análisis de la posterior secuencia de muestras.

5.2.9. Comprobar que se hallan efectivamente instalados y conectados correctamente los dispositivos de tratamiento de muestras y de atomización (por ejemplo la presencia del mechero de llama correspondiente, el generador de hidruros...) que sean necesarios para la determinación del elemento objeto de estudio en las condiciones prefijadas en el apartado 5.2.4. y que figuran en el manual de instrucciones (o uso) del equipo, sus partes y/o accesorios u otro documento donde figuren especificaciones u otra información de interés.

NOTA

En caso concreto de trabajo mediante atomización por llama, comprobar específicamente que el mechero instalado corresponde al tipo de llama apropiado (aire-acetilénica u óxido nitroso-acetilénica).

NOTA

En caso de trabajo mediante atomización electrotérmica, para realizar la calibración, se recomienda comprobar visualmente la ausencia de envejecimiento (o deterioro) del tubo de grafito.



Una vez realizadas las comprobaciones indicadas anteriormente se procederá a la puesta en marcha el equipo

NOTA

En el presente apartado se describen las operaciones como si fueran a realizarse de modo manual pero debe considerarse que en los modernos Espectrofotómetros de Absorción Atómica varias (o todas) de las operaciones que se describen a continuación pueden realizarse automáticamente mediante la ejecución de rutinas del programa de gestión y control del equipo. Téngase en cuenta también que, en muchos de los equipos actuales, se realizan automáticamente una serie de comprobaciones iniciales sobre las prestaciones de los distintos componentes significativos y, en caso de resultar insuficientes, a veces no es posible continuar con la secuencia analítica hasta la resolución del problema causante de la anomalía operativa detectada. Además, en algunos casos, los programas correspondientes disponen de utilidades que verifican la optimización de las distintas condiciones de trabajo.

NOTA MUY IMPORTANTE

El analista deberá conocer perfectamente todos los factores de riesgo asociados tanto al uso del equipo como a la manipulación de gases, reactivos, patrones y muestras y comprobar que se aplican todas las medidas de seguridad e higiene pertinentes.

5.2.10. Conectar a la red el equipo, sus partes y/o accesorios y dejar transcurrir unos 15-30 minutos para permitir un calentamiento homogéneo de las partes electrónicas.

5.2.11. Conectar la aspiración del extractor de aire ambiente (normalmente estará instalado en conexión con una campana).

5.2.12. Seleccionar la lámpara del elemento correspondiente, ubicarla en la posición de trabajo y comprobar, siguiendo las instrucciones del fabricante, su correcto alineamiento físico.

NOTA

En los equipos más modernos esta operación se realiza de forma automática.



5.2.13. Seleccionar la intensidad media de corriente de la lámpara tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo u otro documento donde figuren especificaciones o información de interés.

5.2.14. Ajustar las presiones apropiadas en los manorreductores de las botellas de gases (y, si ha lugar, en los puestos de gases intermedios)

5.2.15. Ajustar (o programar) los caudales de los gases a las condiciones de trabajo adecuadas al elemento objeto de la calibración, teniendo en cuenta las características específicas de la fuente de atomización tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo.

5.2.16. Encender la llama, si se trabaja en dicho modo de atomización tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo.

5.2.17. Seleccionar la anchura de rendija adecuada tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo u otro documento donde figure dicha especificación.

5.2.18. Seleccionar la longitud de onda correspondiente tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo, tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo u otro documento donde figure dicha especificación.

5.2.19. Ajustar la ganancia tal que el indicador esté situado en la parte central de la escala de medida de dicha magnitud, tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo.

5.2.20. Tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo, efectuar un ajuste fino de la longitud de onda para obtener la máxima indicación del dispositivo de medición de la energía, teniendo en cuenta que, si se sobrepasa el límite superior del intervalo admisible de trabajo, deberá graduarse convenientemente la ganancia.

5.2.21. Tal como se describe en el manual de instrucciones (o uso) del equipo, verificar el correcto alineamiento óptico de la lámpara,



disminuyendo el nivel de la ganancia, si fuera preciso, hasta situarlo en la zona óptima de trabajo.

5.3. Determinación experimental de la curva de calibración

5.3.1. Seleccionar el modo en que deba efectuarse la medición de la señal por parte del equipo (bien sea por alturas o por integración de áreas). Fijar también el valor apropiado del tiempo de medida de dicha señal.

5.3.2. Seleccionar una opción de presentación de los datos de las respuestas del equipo que corresponda a (o incluya) la información sobre los valores de las absorbancias medidas.

5.3.3. En caso de trabajo con Espectrofotómetros de Absorción Atómica con Cámara de Grafito, programar los parámetros de las distintas etapas del ciclo analítico, además de otras condiciones operativas específicas.

NOTA

En este paso deberá seleccionarse también el orden de los patrones, blancos y de las muestras, se escogerá si se efectuarán repeticiones, la eventual adición automática de modificadores de matriz, la intercalación de patrones de control de calidad y/o blancos entre la secuencia de muestras de ensayo, la activación del dispositivo de corrección de fondo...

5.3.4. Para comprobar el buen funcionamiento del equipo y la limpieza de sus partes se analizará un patrón del blanco, constituido por una alícuota del mismo disolvente que el resto de los patrones de calibración conteniendo, además, los mismos reactivos que presentarán las muestras (o sus extractos) y los patrones de calibración. Posteriormente, según se describe en 5.3.7, se efectuará la correspondiente corrección del cero.

NOTA

En los equipos más modernos se memoriza la señal relativa al ensayo del blanco y dicha corrección se efectúa automáticamente.



5.3.5. Comprobar el correcto funcionamiento tanto de la aspiración como del drenaje (en caso de trabajo con atomización por llama) o bien de la correcta introducción de la muestra en el tubo de grafito (cuando se emplee la opción de atomización electrotérmica).

NOTA

Téngase en cuenta que deberán extremarse las precauciones de limpieza de la cámara de atomización, bien sea manteniendo constantemente la aspiración durante los lapsos entre las lecturas de los distintos patrones de calibración (para el caso de atomización por llama) o, con el fin de eliminar el efecto memoria en caso de atomización electrotérmica, realizando análisis periódicos de blancos intercalados entre la secuencia de dichos patrones.

5.3.6. Para verificar el correcto funcionamiento del equipo se analizará un patrón cuya concentración sea intermedia respecto el intervalo de calibración del elemento en estudio y cuya absorbancia, en las condiciones de trabajo óptimas, sea conocida (a menudo dicho valor está indicado en las instrucciones del equipo o bien el operador lo conocerá por propia experiencia). En caso de no obtenerse la absorbancia prevista, procédase al reajuste de la posición del mechero y, eventualmente, a una nueva comprobación y/o ajuste de la energía y de la ganancia.

NOTA

En los manuales de los equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica suele incluirse información precisa sobre la realización de la verificación comentada más arriba. Cabe señalar que a menudo dicha operación se realiza en base a la denominada concentración característica (o masa característica) que corresponde a la concentración (o masa) del analito que proporciona una absorbancia determinada (generalmente se fija dicho valor en 0,004 4 u.a.).

5.3.7. Analizar un nuevo blanco y ajustar el cero.

5.3.8. A continuación, sin variar ya las condiciones experimentales prefijadas en las etapas previas, se determina la función de respuesta del equipo para el elemento dado. Así, se analizará el primer patrón de calibración, obteniéndose la absorbancia (hasta lectura estable en caso



de emplearse atomización por llama), cuyo dato se almacenará en el correspondiente sistema de registro. Téngase en cuenta que la lectura del patrón a veces se realiza de forma múltiple. Al respecto deberá disponerse de un registro de los pares experimentales absorbancia/concentración y posteriormente, de forma automática (en los equipos que están dotados de un sistema de gestión de datos) o bien mediante la realización de dicho cálculo aparte, se determinarán los promedios correspondientes.

NOTA

Es recomendable efectuar una lectura múltiple de la absorbancia de cada patrón (por ejemplo x3) y determinar el promedio de las absorbancias medidas.

5.3.9. La operación descrita en el punto anterior irá repitiéndose con el resto de los patrones (como mínimo 3, siendo más aconsejable de 5 a 7) del elemento objeto de la calibración, abarcando todo el rango correspondiente a dicho elemento.

5.3.10. Una vez realizadas las mediciones experimentales, se determinarán, mediante un método de ajuste estadístico tal como se describe posteriormente, los parámetros de la curva de calibración incluyendo los intervalos de confianza de la misma (véase al respecto los distintos epígrafes del apartado 5.5 del presente procedimiento donde se exponen los detalles específicos de dicho ajuste).

5.3.11. Dado que durante las operaciones de preparación y puesta en marcha se realizan distintos ajustes (descritos en los apartados anteriores), la calibración para cada elemento deberá realizarse previamente a cada sesión de análisis y, además, siempre que se realice algún ajuste suplementario o cuando los resultados del programa de control de calidad analítica (normalmente planteado en base a la intercalación entre muestras de blancos, duplicados y/o muestras de control) lo requiera.



5.4. Toma de datos

En relación a los procesos de calibración de equipos, para garantizar la trazabilidad de las medidas realizadas con los mismos, resulta necesario registrar y evaluar las actividades llevadas a cabo, además de los resultados obtenidos. Para ello es conveniente disponer de formatos de registro (de tipo manual o en base informatizada) donde, como mínimo, se registrarán los siguientes datos:

- Elemento objeto de la calibración.
- Absorbancias y/o concentraciones.
- Cálculos concernientes al ajuste de la recta de calibración.
- Cálculos concernientes a la incertidumbre asociada a la calibración.
- Validación de la calibración.
- Fecha.
- Hora.
- Analista.

Además es conveniente registrar cualquier otro dato secundario (incluidas las condiciones ambientales) o circunstancial que permita asegurar la trazabilidad de todo el proceso

5.5. Tratamiento de datos: determinación y estipulación de la curva de calibración

La calibración de un equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica para un elemento determinado, en unas condiciones experimentales dadas, constituye un ejemplo típico de calibración indirecta, por la cual la señal proporcionada por el equipo (absorbancia) tiene una naturaleza distinta a la concerniente al elemento en el patrón (concentración). Por



tanto, el objeto de la calibración consistirá en la determinación de la función magnitud del patrón/respuesta del equipo. Cabe señalar, por otra parte, que la aplicabilidad de la ley de Beer-Lambert para la presente técnica analítica, indica que la relación expresada por la función absorbancia/concentración será lineal, no obstante, hay que tener en cuenta que, dadas las influencias de distintos factores (tanto instrumentales como operativos), la distribución más representativa de los pares absorbancia/concentración obtenidos en el proceso de calibración deberá determinarse mediante ajustes estadísticos más o menos convencionales.

Dado que la función de calibración (que relaciona las absorbancias medidas por el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica con las concentraciones del analito en los distintos patrones de calibración) puede expresarse como una curva de la cuál el tramo que incluye el intervalo de menores concentraciones por encima del límite de cuantificación suele ser de tipo rectilíneo y puesto que la calibración puede realizarse contemplando solamente el tramo de linealidad estricta (tramo recto representativo de una recta de regresión de absorbancias respecto concentraciones) o en un rango más amplio (ajuste curvilíneo por una regresión de tipo polinómico, cuyos grados generalmente estarán comprendidos entre 2 y 4), en el presente apartado se considerarán y se compararán ambas situaciones, teniendo en cuenta que, para simplificar, se considerará que las varianzas resultan ser constantes a lo largo de la curva de calibración correspondiente.

NOTA

Cabe señalar que el planteamiento que se presenta a continuación está basado en el ajuste y tratamiento de la función de calibración mediante métodos de regresión. Dada la anterior premisa, en sentido estricto debería verificarse que, por una parte, las absorbancias medidas en el Espectrofotómetro de Absorción Atómica son directamente proporcionales a la concentración de los patrones de calibración (a lo largo del rango considerado) y, por otra, que las incertidumbres concernientes a las concentraciones del elemento en dichos patrones son significativamente menores que el error cometido en la medición de las variables dependientes (absorbancias) y en consecuencia despreciables frente a éstas. Por tanto, la metodología que se expone a continuación (que resulta ser la más utilizada) supone meramente una aproximación a la situación real.



5.5.1. Estimación de los parámetros de la recta de calibración

Introducción

Sea la recta de regresión calculada por la expresión:

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

Donde:

x: concentraciones de los patrones de calibración empleados.

y: lecturas de absorbancias (corregidas para el blanco).

a: ordenada en el origen de la recta de calibración.

b: pendiente de la recta de calibración.

La estimación de a y b se obtiene en base a forzar que sea mínima la suma de los cuadrados de las desviaciones ($y_i - y_i'$) entre los valores experimentales y_i y las ordenadas correspondientes y_i' de la recta de regresión calculada. Si p es el número de magnitudes de referencia (patrones de concentración distinta) y n_i el número de resultados (absorbancias medidas por el equipo) para una determinada magnitud i ($i=1,2,\dots,p$), dichos resultados se designan por $y_{i\alpha}$ ($\alpha=1,2,\dots,n_i$). Por lo tanto, el número total de pares concentración/absorbancia ($x_i, y_{i\alpha}$) será:

$$N = \sum n_i \quad (2)$$

La pendiente b será de la forma:

$$b = \frac{W_{1y}}{W_{11}} \quad (3)$$

Donde los residuales W_{1y} y W_{11} , respectivamente, son:

$$W_{1y} = \sum_i \sum_{\alpha} (x_i - \bar{x})(y_{i\alpha} - \bar{y}) = \sum_i \sum_{\alpha} x_i y_{i\alpha} - \frac{(\sum_i n_i x_i)(\sum_i \sum_{\alpha} y_{i\alpha})}{N} \quad (4)$$



$$W_{11} = \sum_i n_i (x_i - \bar{x})^2 = \sum n_i x_i^2 - \frac{(\sum n_i x_i)^2}{N} \quad (5)$$

NOTA

Aunque en el presente desarrollo teórico del tratamiento del ajuste de regresión de la función de calibración se considera el caso general de que las mediciones de cada patrón pueden ser múltiples, éstas expresiones (y las siguientes), obviamente, se simplifican notablemente cuando $n_i = 1$.

Las medias aritméticas de x_i e $y_{i\alpha}$ se calculan, respectivamente, a partir de:

$$\bar{x} = \frac{\sum n_i x_i}{N} \quad (6)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_i \sum_{\alpha} y_{i\alpha}}{N} \quad (7)$$

Y, por otra parte, la ordenada en el origen de la recta de calibración se calcula a partir de la aplicación de la siguiente expresión:

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{1}{N} \left[\sum_i \sum_{\alpha} y_{i\alpha} - b \sum n_i x_i \right] \quad (8)$$

La estimación de la varianza de los residuos (también denominada varianza residual) puede realizarse en base al cuadrado de la desviación típica:

$$s^2 = \frac{Q}{N-2} \quad (9)$$

Donde N es el número total de mediciones realizadas en el transcurso de la calibración, mientras Q expresa la dispersión de los puntos experimentales alrededor de la recta de regresión calculada. Dicho parámetro, a nivel práctico, se determina mediante la siguiente expresión:

$$Q = W_{yy} - b^2 W_{11} = W_{yy} - \frac{(W_{1y})^2}{W_{11}} \quad (10)$$

Siendo, por otra parte, el residual W_{yy}:

$$W_{yy} = \sum_i \sum_\alpha (y_{i\alpha} - \bar{y})^2 = \sum_i \sum_\alpha y_{i\alpha}^2 - \frac{\left(\sum_i \sum_\alpha y_{i\alpha} \right)^2}{N} \quad (11)$$

En este punto cabe considerar que la pendiente de la recta de regresión presenta una varianza igual a:

$$\sigma_b^2 = \frac{\sigma^2}{W_{11}} \quad (12)$$

Cabe considerar que σ_b^2 , en ausencia de datos proporcionados por la experiencia a largo plazo, será reemplazable en la fórmula anterior por el valor calculado del cuadrado de la desviación típica s_b^2 (según 9). Así, el valor de la varianza de la pendiente de la recta de calibración podrá calcularse por:

$$s_b^2 = \frac{s^2}{W_{11}} = \frac{s^2}{\sum_i n_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (13)$$



Por otra parte, la varianza de la ordenada en el origen a de la recta y la covarianza de a y b (pendiente), respectivamente, **serán**:

$$\sigma_a^2 = \sigma_y^2 + \bar{x}^2 \sigma_b^2 = \sigma^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{W_{11}} \right] \quad (14)$$

$$\text{Cov}(a, b) = -\bar{x}^2 \sigma_b^2 = -\frac{\bar{x} \sigma^2}{W_{11}} \quad (15)$$

5.5.2. Determinación de los intervalos de confianza de la recta de calibración

En el caso en que la varianza sea constante respecto el dominio de las abscisas (concentraciones).

NOTA. Téngase en cuenta que la premisa de que la varianza será constante (respecto al dominio de abscisas) a lo largo de la recta de calibración. En sentido estricto, dejará de cumplirse normalmente para niveles de concentración próximos al límite de cuantificación y para niveles próximos al extremo superior del rango lineal. Por lo tanto, deberán extremarse las precauciones para la definición de un rango lineal útil de trabajo.

NOTA Cabe tener en cuenta que distintos programas de estadística y hojas de cálculo de uso común permiten el cálculo de los distintos parámetros significativos y los intervalos de confianza de la recta de regresión. Es importante señalar que el operador deberá estar familiarizado con el uso de dichos programas y establecer alguna estrategia para la validación de las hojas de cálculo correspondientes. A continuación se expone el método, paso a paso, para la determinación de dichos intervalos.

A partir de la aplicación de distintas fórmulas del apartado 5.5.1 se determinan, con $N-2$ grados de libertad, los siguientes parámetros:

$$\bar{x}, b, \sum n_i (x_i - \bar{x})^2 \text{ y también } s^2$$



El intervalo de confianza del resultado de una medida experimental de la absorbancia, m_0 (que en este caso se considera constante) que corresponde a una concentración x_0 , calculada mediante la recta de regresión, dependerá de la estimación de s_{tot} que se calcula a partir de la expresión:

$$s_{tot} = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{n_0} + \frac{1}{N} + \frac{(x_0 - \bar{x})^2}{\sum n_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (16)$$

Donde n_0 es el número de ensayos que han proporcionado la medida (absorbancia en el presente caso) y el resto de parámetros se ha definido anteriormente en el apartado 5.5.1.

La expresión del intervalo de confianza de la medida con un nivel de confianza $(1 - \alpha)$ es de la forma:

$$x_0 \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}} s_{tot} \quad (7)$$

Donde:

x_0 : valor de x calculado a partir de la recta de calibración.

t : se obtiene de la tabla del test de Student, para un nivel de confianza del 95 %, con $N-2$ grados de libertad.

6. CÁLCULO DE LA INCERTIDUMBRE ASOCIADA A LA CALIBRACIÓN

Hay que tener en cuenta que las fuentes principales de incertidumbre que se presentan en la calibración de un equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica son:

- Variaciones aleatorias de las medidas experimentales concernientes tanto a los patrones como a las muestras.
- Errores aleatorios en la asignación de la concentración de los patrones empleados en la obtención de la curva de calibración.



- Errores sistemáticos asignables tanto a la concentración de los patrones como a las medidas experimentales.
- Desviaciones apreciables de la linealidad correspondiente.

En relación a los cuatro factores enumerados, debe destacar que el que posee mayor significación es el primero de ellos. Así, la determinación de la incertidumbre asociada al cálculo de las concentraciones mediante interpolación sobre la curva de calibración (ajustada según una recta de regresión), considerando como principal factor de contribución la variabilidad aleatoria de las medidas experimentales, se efectúa tal como se describe a continuación.

Sea la recta de calibración:

$$y = a x + b$$

Sobre la base de lo expuesto en el párrafo anterior, la varianza S_x puede estimarse mediante la siguiente expresión:

$$S_x = \frac{S^2}{b^2} \quad (18)$$

donde b es la pendiente de la recta de regresión (que se calculará a partir de las fórmulas 3-5 de 5.5.1) y S^2 es la varianza de los valores de y respecto a la recta de regresión que puede calcularse según:

$$S^2 = \sum \frac{(y_i - y)^2}{N - 2} \quad (19)$$

Representando $y_i - y$ el residual de la $i^{\text{ésima}}$ medida efectuada en el desarrollo de la calibración

$u_{(c_0)}$ que corresponde a la contribución de la calibración a la incertidumbre global del proceso analítico, puede calcularse (según las referencias 5 y 7) por aplicación de la siguiente expresión:



$$u_{(c_o)} = \frac{s}{b} \sqrt{\frac{1}{p} + \frac{1}{n} + \frac{(c_o - \bar{c})^2}{W_{11}}} \quad (20)$$

donde:

s = Véase la fórmula 21 (expuesta a continuación).

b = Pendiente de la recta de calibración.

p = nº de medidas de la muestra cuya concentración ha sido C_o .

n = nº de medidas realizadas para la calibración.

C_o = valor de concentración determinado en la muestra.

\bar{c} = Valor promedio de la concentración de los patrones empleados en la calibración.

i = Indicativo del nº de patrón de calibración.

j = Indicativo del nº de medidas para la realización de la curva de calibración.

W_{11} = Residual (calculado según la fórmula 5 de 5.5.1).

$$s = \frac{\sqrt{\sum_{j=1}^n [A_j - (a + bc_j)]^2}}{n - 2} \quad (21)$$

donde:

A_j = j ésima medida de la absorbancia del j ésimo patrón de calibración

a = Ordenada en el origen (calculada según la fórmula 6 de 5.5.1)

NOTA

Hay que tener en cuenta que la expresión anterior coincide con la expuesta en la fórmula 16 del apartado 5.5.2

Otra forma de abordar el cálculo de $u_{(c_o)}$ consiste en considerar que los resultados se obtienen por interpolación sobre la recta de calibración $y = bx + a$, cuyos parámetros se han calculado según las expresiones de 5.5.1. De la ecuación de la recta se despeja la variable x , quedando:



$$x = \frac{y - b}{a} \quad (22)$$

$u_{(c_0)}$ puede determinarse a partir de la siguiente expresión general:

$$u_{c_0} = \sqrt{\left(\frac{\delta x}{\delta y}\right)^2 u_y^2 + \left(\frac{\delta x}{\delta a}\right)^2 u_a^2 + \left(\frac{\delta x}{\delta b}\right)^2 u_b^2} \quad (23)$$

quedando la expresión de cálculo de $u_{(c_0)}$:

$$u_{c_0} = \sqrt{\frac{u_y^2}{b^2} + \frac{u_a^2}{b^2} + \frac{(y - a)^2}{b^4} u_b^2} \quad (24)$$

donde:

$$u_y = w \frac{S_y}{\sqrt{n}} \quad (25)$$

$$u_b = w \frac{S_b}{n} \quad (26)$$

$$u_a = w \frac{S_a}{n} \quad (27)$$

S_a puede calcularse como:

$$s_a = \sqrt{\frac{W_{yy} - b^2 W_{11}}{N - 2}} \cdot \sqrt{\frac{1}{N - \frac{(\sum x_i)^2}{\sum x_i^2}}} \quad (28)$$



obteniéndose los factores multiplicativos w (que figuran en las expresiones anteriores) a partir de la Tabla siguiente:

Nº de mediciones	w
2	7.0
3	2.3
4	1.7
5	1.4
6	1.3
7	1.3
8	1.2
9	1.2
10 (o más)	1

**Tabla I. Valores de w (factor multiplicador)
en función del número de lecturas realizadas**

NOTA

Hasta aquí se han excluido las contribuciones derivadas de la dilución de patrones madre para obtener las disoluciones con las que se efectúa la calibración, derivas de respuesta del equipo (téngase en cuenta que se ha indicado el requisito de una calibración por sesión analítica) y otras contribuciones menores.

Para el cálculo de la incertidumbre combinada en relación a un ensayo que culmina con la determinación de un elemento en un extracto de una muestra mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica, deberán tenerse en cuenta distintos componentes como:

- Incertidumbres asociadas al muestreo y pretratamiento de muestras (incluyendo el acondicionamiento, la homogeneización y el submuestreo correspondiente.).
- Incertidumbre asociada al tratamiento de muestras (incluyendo extracción, digestión, diluciones,...).



NOTA Debe tenerse en cuenta que la metodología para determinar dichas incertidumbres, cuyo cálculo se aparta del objeto del presente procedimiento, deberá detallarse en otros procedimientos "ad-hoc".

A partir de las incertidumbres individuales cuya contribución sea significativa en cada caso se calculará la incertidumbre estándar del resultado. Así, si r es el resultado final de un elemento dado (sobre la muestra), determinado a partir del análisis mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica de un extracto proveniente de la muestra (cuya concentración c_o se ha obtenido a partir de la interpolación en la correspondiente calibración), dicha incertidumbre $u_{(r)}$ puede calcularse combinando, según los procedimientos habituales, la incertidumbre $u_{(c_o)}$ con las de los factores asociables a las operaciones realizadas sobre la muestra (y sus fracciones, o fracciones, o subfracciones) que contribuyan significativamente a la incertidumbre del resultado final.

Para abordar la combinación de $u_{(c_o)}$ (calculada según 20, 21 o 24) con otras contribuciones (de tipo B) que eventualmente pudieran ser significativas se procederá a calcular $u_{(r)}$:

$$u_r = \sqrt{u_{c_o}^2 + \sum_{l=1}^q u_l^2} \quad (29)$$

donde el término $\sum_{l=1}^q u_l^2$ representa la contribución de las incertidumbres de tipo B (tales como las de los patrones, operaciones del tratamiento de muestras...).

La incertidumbre expandida $U_{(r)}$ del resultado correspondiente se calculará multiplicando la incertidumbre calculada $u_{(r)}$ (según la expresión 29, expuesta anteriormente) por un factor k de cobertura (por ejemplo $k=2$, para un nivel de confianza del 95 %).

El resultado final se presentará como:

$$r \pm U(r) \text{ (unidades)}$$

para un factor de cobertura $k=2$ (o con un nivel de confianza del 95 %).



7. REFERENCIAS

- [1] Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 3ª edición en español 2008.
- [2] Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida. CEM. Segunda edición en español, 2000.
- [3] Guía EA-4/02. Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration. Diciembre 1999. EA.
- [4] M. Neully et CETAMA. Modélisation et estimation des erreurs de mesure (2^e Ed.). Lavoisier, 1998.
- [5] Pritchard E. Quality in Analytical Chemistry Laboratory. ACOL-J.Wiley, 1995.
- [6] Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement (2nd. Ed.). Eurachem/CITAC Guide (2000).
- [7] B. Weltz y M. Sperling. Atomic Absorption Spectrometry. Ed. Wiley-VCH. Weinheim, 1999.
- [8] J.C. Miller y J.N. Miller. Estadística para Química Analítica. Ed. 2. Addison-Wesley Iberoamericana, 1993.
- [9] J. Mandel. The Statistical Analysis of Experimental Data. Dover Publishers, 1984.
- [10] G. Kateman y L. Buydens. Quality Control in Analytical Chemistry. Wiley-Interscience Eds., 1993.

Otros documentos complementarios

- [11] Manual/es de instrucciones (o de uso) del equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica, de sus partes y/o accesorios.
- [12] Procedimientos de ensayo a los que aplica la calibración de equipos de Espectrofotometría de Absorción Atómica.
- [13] Otros procedimientos de calibración.



8. ANEXOS

Se describe en un anexo el “ajuste por regresión polinómica”.

ANEXO: Ajuste por regresión polinómica

Introducción

Este anexo trata sobre la estrategia de tratamiento de los datos experimentales de calibración y abarca el caso del ajuste mediante la recta de regresión, discutido anteriormente. Téngase en cuenta que, a menudo, las funciones de calibración en Espectrofotometría de Absorción Atómica presentan un tramo correspondiente al intervalo de concentraciones desde el límite de cuantificación hasta el límite de respuesta lineal que puede ajustarse por una recta, mientras que, a partir de dicho límite, la función de calibración se ajusta por una curva. Otra estrategia alternativa, utilizada muy frecuentemente, se deriva de la posibilidad de realizar un ajuste global mediante una única curva polinómica (de grado 2, 3, 4...), tal como se describe a continuación. Por último, y ya fuera del objetivo del presente documento, también cabe indicar la posibilidad de subdividir la curva de calibración en tramos ajustables por distintas funciones polinómicas (usualmente, a efectos prácticos, con grados comprendidos entre 1 y 3)

En relación al ajuste de una curva de calibración mediante una ecuación polinómica, en primer lugar se plantea la ecuación correspondiente:

$$y = a + bx + cx^2 + dx^3 + \dots \quad (30)$$

Donde b , c , d son los coeficientes de regresión de la curva calculada.

Debe considerarse que la ordenada en el origen a de la curva se obtiene a partir de los datos c , d , ..., de tal modo que:

$$a = \frac{1}{N} \left[\sum_i \sum_{\alpha} y_{i\alpha} - b \sum_i n_i x_i - c \sum_i n_i x_i^2 \dots \right] = \frac{10^{-\gamma}}{N} \left[\sum_i \sum_{\alpha} z_{i\alpha} - b_k \sum_i n_i t_i - c_k \sum_i n_i t_i^2 \dots \right] \quad (31)$$



Cabe tener en cuenta que, como se aprecia en las anteriores expresiones, se ha efectuado un cambio de variables tal que $z_{i\alpha} = 10^{\gamma} y_{i\alpha}$ y $t_i = 10^{\beta} x_i$

Los correspondientes coeficientes de regresión de los ajustes polinómicos se calculan a partir de aproximaciones sucesivas. Así, se calcula en primer lugar la pendiente b_1 y la suma de los cuadrados de los residuos (Q_1) concernientes a una relación teóricamente lineal de primer grado (recta), después se considera el ajuste mediante un polinomio de segundo grado, determinándose los coeficientes b_2 y c_2 (términos de primer y segundo grado de la ecuación de dicho tipo ajuste) y además la suma de los cuadrados de los residuales Q_2 , verificándose un test de Snedecor-Fisher para comprobar la significación del ajuste correspondiente a la ecuación de segundo grado. En caso que el del test realizado para la ecuación de segundo grado sea positivo se repite la operación para ajustes polinómicos sucesivos de grado 3 y 4.

NOTA

Al final de la exposición del tratamiento que sigue a continuación sobre el ajuste de la función de calibración mediante una ecuación de segundo grado se presenta el criterio de selección de la ecuación que proporciona un ajuste óptimo de dicha función.

A continuación se expone, a título de ejemplo, la metodología para la determinación de los coeficientes de regresión para el caso de un ajuste con una curva de regresión de segundo grado:

$$y = a + bx + cx^2 \quad (32)$$

Se procederá, como se ha indicado anteriormente, por aproximaciones sucesivas. Si b_1 es la pendiente de la teórica recta de regresión (obtenida como primera aproximación) cuya ecuación puede escribirse como:

$$z = a_1 + b_1 t \quad (33)$$

Habiéndose efectuado un cambio de variables como el comentado anteriormente ($z_{i\alpha} = 10^{\gamma} y_{i\alpha}$ y $t_i = 10^{\beta} x_i$) se calculan, respectivamente, los residuales y parámetros siguientes mediante la aplicación de las expresiones:



$$W_{11} = \sum_i n_i (x_i - \bar{x})^2 = \sum_i n_i x_i^2 - \frac{1}{N} (\sum_i n_i x_i)^2 \quad (34)$$

$$w_{11} = \sum_i n_i (t_i - \bar{t})^2 = 10^{2\beta} W_{11} \quad (35)$$

$$w_{jy} = \sum_i \sum_\alpha t_i^j z_{i\alpha} - \frac{1}{N} \left(\sum_i n_i t_i^j \right) \left(\sum_i \sum_\alpha z_{i\alpha} \right) \quad (36)$$

$$w_{jj} = \sum_i n_i t_i^{2j} - \frac{1}{N} (\sum_i n_i t_i^j)^2 \quad (37)$$

Una vez calculados w_{11} , w_{12} , w_{22} , w_{1y} , w_{2y} y w_{yy} , a partir de la aplicación de las fórmulas anteriores, se determina la pendiente b_1 y Q_1 , siendo:

$$w_{jy'} = \sum_i n_i t_i^{j+j'} - \frac{1}{N} (\sum_i n_i t_i^j) (\sum_i n_i t_i^{j'}) \quad (38)$$

$$Q_1 = w_{yy} - b_1^2 w_{11} \quad (39)$$

$$b_1 = \frac{w_{1y}}{w_{11}} \quad (40)$$

Si se considera ahora el caso del ajuste de la función de calibración mediante la ecuación de 2º grado del tipo:

$$z = a_2 + b_2 t + c_2 t^2 \quad (41)$$

Se calcula, a partir de la siguiente fórmula, el coeficiente de regresión para b_2 , el término de primer grado de dicha ecuación:

$$b_2 = b_1 - \frac{c_2 w_{12}}{w_{11}} \quad (42)$$

A continuación se calcula el determinante D_2 mediante:



$$D_2 = w_{11}w_{22} - w_{12}^2 \quad (43)$$

También se calculan c_2 (término de grado 2 en la expresión de la curva de regresión), Q'_2 , Q_2 y ν_2 :

$$c_2 = \frac{w_{11}w_{2y} - w_{12}w_{1y}}{D_2} \quad (44)$$

$$Q'_2 = \frac{c_2^2 D_2}{w_{11}} \quad (45)$$

$$Q_2 = Q_1 - Q'_2 \quad (46)$$

$$\nu_2 = N-3 \quad (47)$$

Determinándose la varianza s_2^2 como sigue:

$$s_2^2 = \frac{Q_2}{\nu_2} \quad (48)$$

En este punto puede plantearse la realización de un test de verificación de la corrección del ajuste efectuado mediante el polinomio de 2º grado. Para ello se calcula la función discriminante de dicho test, F_2 :

$$F_2 = \frac{Q'_2}{s_2^2} \quad (49)$$

Para poder decidir si se acepta el ajuste de la curva de calibración con el polinomio de grado 2, se compara el valor de F_2 calculado por aplicación de la fórmula anterior con el valor de $F_{0,99}(1; \nu_2)$ de la Tabla de Snedecor-Fisher. Si el valor de F_2 supera al del límite de confianza del test, entonces se infiere significación del mismo y se acepta el correspondiente ajuste polinómico de grado 2 realizado.

A continuación, revertiendo el cambio de variables introducido anteriormente, se determinan los coeficientes de la curva de regresión



inicial. Así, a se calcula mediante la fórmula anterior 8.2, mientras los coeficientes b y c se obtienen a partir de las siguientes expresiones:

$$b = 10^{\beta-\gamma} b_2 \quad (50)$$

$$c = 10^{2\beta-\gamma} c_2 \quad (51)$$

Por otra parte, también puede caracterizarse la incertidumbre en un punto de la curva de calibración. Así, la incertidumbre de las medidas de la calibración proyectan sobre b_2 y c_2 varianzas estimables según:

$$s_{b_2}^2 = \frac{W_{22} S_2^2}{D_2} \quad (52)$$

$$s_{c_2}^2 = \frac{W_{11} S_2^2}{D_2} \quad (53)$$

La covarianza de dichos errores se determina por:

$$\text{Cov}(b_2, c_2) = \frac{W_{12} S_2^2}{D_2} \quad (54)$$

La misma estrategia puede seguirse para el caso de ajustes de regresiones polinómicas de grado superior aunque normalmente, para evitar cálculos muy complicados, no suelen aplicarse más que hasta el caso de polinomios de grado 4.

NOTA

Para estipular el tipo de ajuste más representativo de una función de calibración se escogerá aquel que tenga mayor grado entre los que proporcionen resultados con significación estadística en base al test de Snedecor-Fisher.

También puede determinarse la incertidumbre en un punto de una curva de calibración estipulada a partir de una regresión polinómica de grado 2,



expresada a través de una estimación de la varianza. Dicho cálculo podrá realizarse a partir de:

$$s_{z_0}^2 = \frac{S_k^2}{N} + \sum_{j=1}^k \delta_j^2 s_j^2 + 2 \sum_j \sum_{j'} \delta_j \delta_{j'} s_{jj'} \quad (55)$$

$$s_{y_0}^2 = 10^{-2\gamma} s_{z_0}^2 \quad (56)$$

Con $N-k-1$ grados de libertad

Para el caso del polinomio de grado 2 se determinan los siguientes parámetros estadísticos:

$$\delta_1 = 10^{\beta} (x_0 - \bar{x}) \quad (57)$$

$$\delta_2 = 10^{2\beta} \left[x_0^2 - \frac{\sum n_i x_i^2}{N} \right] \quad (58)$$

y la varianza:

$$s_{y_0}^2 = 10^{-2\gamma} s_2^2 \left[\frac{1}{N} + \frac{w_{22} \delta_1^2 + w_{11} \delta_2^2 - 2w_{12} \delta_1 \delta_2}{D_2} \right] \quad (59)$$

Intervalos de confianza de la curva de regresión (en el caso en que la varianza sea constante)

A continuación, a título de ejemplo, se expondrá el procedimiento para la determinación del intervalo de confianza (supuesto éste constante) de una curva de calibración ajustada a una ecuación de grado 3.

Sea la curva ajustada por la expresión:

$$y = f(t) = a + bt + ct^2 + dt^3 \quad (60)$$



(Habiéndose ya realizado el cambio de variable correspondiente entre t y x [donde $t = 10^{2\beta}x$])

Téngase en cuenta que previamente se habrán determinado, respectivamente, s^2 , β , γ , y ν (n° de grados de libertad) y suponiendo que se han realizado n_0 mediciones que han proporcionado una lectura promedio de y_0 .

Se calcula t_0 (para y_0) a partir interpolación sobre la curva de calibración y a continuación se determina también $s'_{y_0}{}^2$ mediante la aplicación de la expresión (56).

A continuación se calcula la desviación típica s_{tot} mediante:

$$s_{tot} = \frac{1}{f'(t_0)} \sqrt{\frac{s_2}{n_0} + s'_{y_0}{}^2} \quad (61)$$

Para un nivel de probabilidad del 95 %, el intervalo de confianza (supuesto constante) de la concentración (en términos de t) se estimará a partir de:

$$t_0 \pm t_{0,975} s_{tot} \quad (62)$$

Restituyendo el cambio de variable de t a x , teniendo en cuenta la relación entre t y x (que es función de β), se obtendrá el valor real de la concentración medida, así como el intervalo de confianza correspondiente.

NOTA

Para el cálculo de la incertidumbre asociada a la determinación analítica correspondiente podrán aplicarse criterios homólogos a los expuestos en el apartado 6 anterior.

