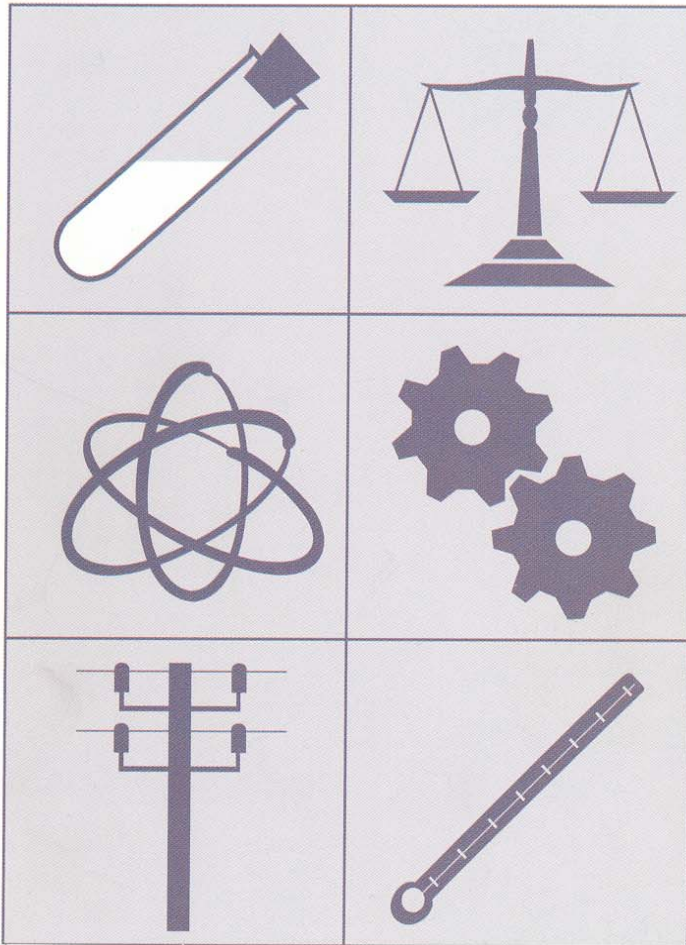


Metrología

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN



PROCEDIMIENTO QU- 004 PARA LA CALIBRACIÓN EQUIPOS DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)



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	4
4. GENERALIDADES	15
4.1. Abreviaturas	15
4.2. Principios cromatográficos	17
4.3. Calibración	20
4.4. Método de la interpolación entre dos puntos	21
5. DESCRIPCIÓN	22
5.1. Equipos y materiales	23
5.2. Operaciones previas	24
5.3. Proceso de calibración	27
5.4. Toma y tratamiento de datos	29
6. RESULTADOS	31
6.1. Cálculo de incertidumbres	31
6.2. Interpretación de resultados	39
7. REFERENCIAS	42
8. ANEXOS	42
Anexo. Ejemplo numérico	43



1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir uno de los posibles métodos para la calibración de Equipos de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC), para su uso posterior en determinaciones cuantitativas, de analitos.

2. ALCANCE

El presente procedimiento es de aplicación a cromatógrafos de líquidos, usados para la realización de determinaciones cuantitativas y cuya calibración se realice mediante el método de interpolación entre dos puntos.

Este procedimiento se deberá aplicar exclusivamente a concentraciones comprendidas dentro de un rango de trabajo lineal.

Este procedimiento solo es válido para analitos presentes en disoluciones que puedan ser inyectadas en un cromatógrafo de líquidos.

Para la realización de determinados análisis puede ser necesarias pruebas adicionales de validación que garanticen que no existe influencia de la matriz en la determinación.

No se incluyen en este procedimiento otras operaciones necesarias para confirmar el correcto funcionamiento del equipo y que en algunos casos van unidas al tipo de detector empleado (verificación instrumental).

3. DEFINICIONES

Calibración [3] (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.

Coeficiente de Variación

Relación entre la desviación típica y el valor absoluto esperado:

$$CV = \frac{s}{x}$$

Desviación típica experimental [1] (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.

Detector

Elemento del cromatógrafo que suministra una señal, en general, proporcional a la concentración de la especie de interés (analito); existen diferentes tipos:

- Detectores de Absorbancia Ultravioleta con monocromadores.
- Detectores de Absorbancia en el infrarrojo.
- Detectores de Fluorescencia.
- Detectores de Índice de Refracción.
- Detectores de Dispersión de Luz.
- Detectores Electroquímicos.
- Detectores por Espectrometría de Masas.

Incertidumbre de medida [3] (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 [3] (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 metrologicamente 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) [3] (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.

Matriz

Conjunto de sustancias que acompañan a un analito en una muestra concreta. Se caracteriza por un nombre que indica el tipo de producto (ej. vino, leche, etc.).

Patrón de medida [3] (5.1)

Realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medida asociada, tomada como referencia.

EJEMPLO 1 Patrón de masa de 1 kg, con una incertidumbre típica asociada de 3 μ g.

EJEMPLO 2 Resistencia patrón de 100 Ω , con una incertidumbre típica asociada de 1 $\mu\Omega$.

EJEMPLO 3 Patrón de frecuencia de cesio, con una incertidumbre típica relativa asociada de 2×10^{-15} .

EJEMPLO 4 Electrodo de referencia de hidrógeno, con un valor asignado de 7,072 y una incertidumbre típica asociada de 0,006.



EJEMPLO 5 Serie de soluciones de referencia, de cortisol en suero humano, que tienen un valor certificado con una incertidumbre de medida.

EJEMPLO 6 Materiales de referencia con valores e incertidumbres de medida asociadas, para la concentración de masa de diez proteínas diferentes.

NOTA 1 La “realización de la definición de una magnitud dada” puede establecerse mediante un sistema de medida, una medida materializada o un material de referencia.

NOTA 2 Un patrón se utiliza frecuentemente como referencia para obtener valores medidos e incertidumbres de medida asociadas para otras magnitudes de la misma naturaleza, estableciendo así la trazabilidad metrológica, mediante calibración de otros patrones, instrumentos o sistemas de medida.

NOTA 3 El término “realización” se emplea aquí en su sentido más general. Se refiere a tres procedimientos de realización, El primero, la realización *stricto sensu*, es la realización física de la unidad a partir de su definición. El segundo, denominado “reproducción”, consiste, no en realizar la unidad a partir de su definición, sino en construir un patrón altamente reproducible basado en un fenómeno físico, por ejemplo el empleo de láseres estabilizados en frecuencia para construir un patrón del metro, el empleo del efecto Josephson para el volt o el efecto Hall cuántico para el ohm. El tercer procedimiento consiste en adoptar una medida materializada como patrón. Es el caso del patrón de 1 kg.

NOTA 4 La incertidumbre típica asociada a un patrón es siempre una componente de la incertidumbre típica combinada (véase la Guía ISO/IEC 98-3:2008, 2.3.4) de un resultado de medida obtenido utilizando el patrón. Esta componente suele ser pequeña comparada con otras componentes de la incertidumbre típica combinada.

NOTA 5 El valor de la magnitud y de su incertidumbre de medida deben determinarse en el momento en que se utiliza el patrón.



NOTA 6 Varias magnitudes de la misma naturaleza o de naturalezas diferentes pueden realizarse mediante un único dispositivo, denominado también patrón.

NOTA 7 En el idioma inglés, algunas veces se utiliza la palabra “embodiment” (materialización) en vez de “realization”.

NOTA 8 En ciencia y tecnología, el vocablo inglés “standard” se usa con dos significados distintos: como una norma, especificación, recomendación técnica o documento escrito similar, y como un patrón de medida (en el idioma francés “étalon”). Este vocabulario se refiere únicamente al segundo significado.

NOTA 9 El término “patrón” se utiliza a veces para designar otras herramientas metrológicas, por ejemplo un “programa de medida patrón” (*software patrón*). (Véase ISO 5436-2).

Patrón de medida de trabajo [3] (5.7)

Patrón utilizado habitualmente para calibrar o verificar instrumentos o sistemas de medida

NOTA 1 Un patrón de trabajo se calibra habitualmente con relación a un patrón de referencia.

NOTA 2 Un patrón de trabajo utilizado en verificación se designa también como “patrón de verificación” o “patrón de control”.

Repetibilidad de medida [3] (2.21)

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Condición de repetibilidad de una medición [3] (2.20)

Condición de medición, dentro de un conjunto de condiciones que incluye el mismo procedimiento de medida, los mismos operadores, el mismo sistema de medida, las mismas condiciones de operación y el

Tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector. Sirve para diferenciar analitos.

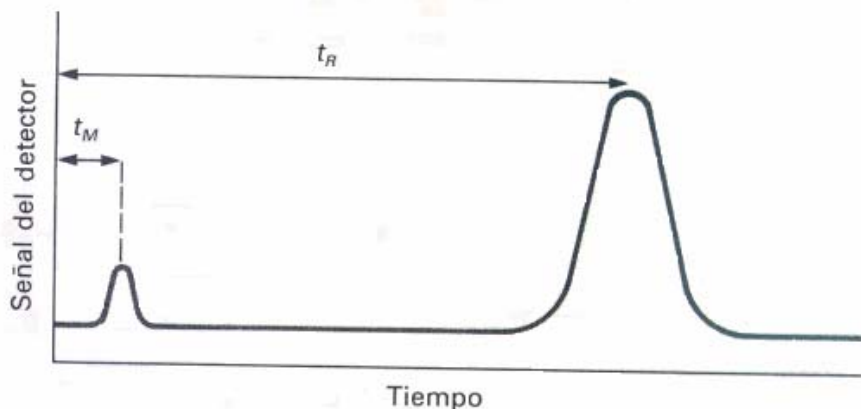


Figura 2. Tiempo de retención.

Trazabilidad metrológica [3] (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

4.1. Abreviaturas

- b Ordenada en el Origen.
- C_{MR} Concentración del Material de Referencia Certificado (valor del Certificado).
- CV_{MAX} Coeficiente de Variación máximo.
- $CV_{y,l}$ Coeficiente de Variación de la prueba realizada con 10 medidas, para el patrón 1.
- $CV_{y,2}$ Coeficiente de Variación de la prueba realizada con 10 medidas, para el patrón 2.



- E_L Error de lectura producido por la operación de enrase.
- HPLC Cromatógrafos de Líquidos de Alta Resolución.
- m Pendiente.
- R_s Resolución de la columna.
- s_{y_1} Desviación típica de la señal del patrón 1.
- s_{y_2} Desviación típica de la señal del patrón 2.
- $s_{y_1,l}$ Desviación típica de la señal del patrón 1, obtenida inicialmente y usada para estimar la incertidumbre de repetibilidad cuando no se realiza un número de repeticiones suficiente.
- $s_{y_2,l}$ Desviación típica de la señal del patrón 1, obtenida inicialmente y usada para estimar la incertidumbre de repetibilidad cuando no se realiza un número de repeticiones suficiente.
- V_C Volumen asignado por la clase.
- V_{F1} Volumen Final de la Dilución para el patrón 1.
- V_{F2} Volumen Final de la Dilución para el patrón 2.
- V_{I1} Volumen Inicial de la Dilución para el patrón 1.
- V_{I2} Volumen Inicial de la Dilución para el patrón 2.
- V_M Volumen medido.
- x_m Concentración del analito en la muestra.



- x_1 Concentración del patrón 1.
- x_2 Concentración del patrón 2.
- y_m Respuesta del analito en la muestra.
- y_1 Respuesta del equipo correspondiente al patrón 1.
- $y_{1_{ACT}}$ Respuesta del equipo en el momento de la calibración, para el patrón 1.
- y_2 Respuesta del equipo correspondiente al patrón 2.
- $y_{2_{ACT}}$ Respuesta del equipo en el momento de la calibración, para el patrón 2.
- U_j Grados de libertad de cada componente.
- ν_{ef} Grados efectivos de libertad de la magnitud de salida.

4.2. Principios Cromatográficos

La cromatografía agrupa un conjunto importante y diverso de métodos, que permite separar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas, lo que en muchas ocasiones resulta imposible por otros medios.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve en una *fase móvil*, que en este caso (HPLC) es un líquido, y cuya única función es transportar el analito a través de la columna. Esta fase móvil se hace pasar a través de una *fase estacionaria* inmisible, que es una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte, que se mantiene fija sobre una columna. Las dos fases se eligen de tal forma, que los componentes de la



muestra se distribuyen de modo distinto entre la fase móvil y la estacionaria.

Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente a través de la columna, debido al flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez.

Las características principales de esta técnica son su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas exactas, su idoneidad para la separación de especies no volátiles o termolábiles y su gran aplicabilidad.

Existen diferentes tipos de cromatografía de líquidos:

- * Cromatografía de Reparto.
- * Cromatografía de Adsorción.
- * Cromatografía Iónica.
- * Cromatografía de Exclusión por Tamaños o en Geles.

Se elige cada tipo a utilizar en función de las características químicas del analito a determinar.

Los componentes principales de un cromatógrafo de líquidos son:

- Líquidos portadores y sistemas para el tratamiento de los disolventes.
- Sistemas de bombeo.
- Sistema de Inyección de la Muestra.
- Columnas.
- Detectores.

- Sistema de procesamiento de señal y tratamiento de datos.

A continuación se indica un esquema básico de los instrumentos que componen un cromatógrafo de líquidos:

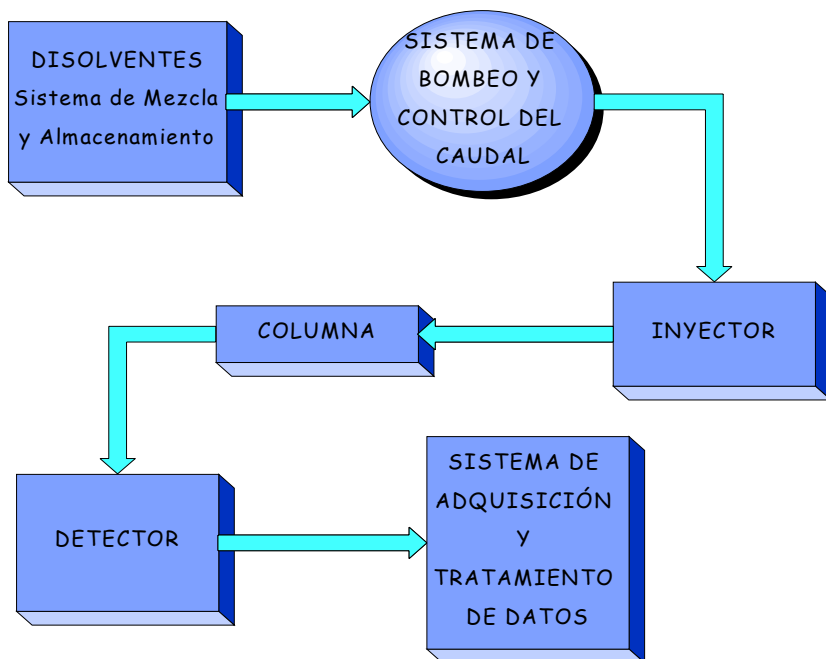


Figura 3. Esquema básico de los instrumentos que componen un cromatógrafo de líquidos

La cromatografía se puede emplear para la identificación cualitativa (que no es objeto de este procedimiento) y para la determinación cuantitativa de los analitos separados. La cromatografía en columna cuantitativa se basa en la comparación de la altura, o del área, del pico del analito con la producida por una o más disoluciones del analito de concentración conocida.



NOTA:

Se entiende por especie la sustancia o ión de interés que puede ser separada en la columna y detectada por el detector elegido. En general en HPLC siempre se utiliza como magnitud el área de la señal.

4.3. Calibración

La característica principal en estos equipos es la medida de una magnitud física que es transformada en una señal eléctrica y registrada en el sistema de registro y tratamiento de datos. Esta señal en unas condiciones determinadas (temperatura, tiempos de retención, etc.), se puede relacionar con un parámetro químico (concentración, etc.) de una especie determinada.

Debido a esto, en estos equipos se realiza una operación consistente en obtener la respuesta dada por el equipo al medir una serie de muestras de valor conocido (Material de Referencia Certificado) y obtener la relación entre respuesta y concentración; esta operación es una calibración a la que se denominará **Calibración Indirecta**.

Este tipo de calibración reúne unas determinadas características:

- a. No es única para el equipo, sino que se realiza por parámetro.
- b. Requiere evaluar si la relación obtenida es satisfactoria para el uso previsto del equipo.
- c. Al verse afectada por otros factores puede requerir, en determinadas ocasiones no de forma rutinaria, el empleo de materiales de referencia especiales (de matriz similar a las muestras)

Entre los diferentes tipos de calibraciones indirectas que son posibles realizar, se pueden citar:

- Interpolación entre dos puntos.



- Recta de Calibrado.
- Función de Calibrado.
- Método de Adiciones.
- Estándar Interno con recta.
- Estándar Interno con punto único.

En este procedimiento se ha optado por elegir el método de interpolación entre dos puntos.

4.4. Método de la interpolación entre dos puntos

Este método para el análisis cromatográfico cuantitativo implica la utilización de dos disoluciones de Materiales de Referencia Certificados (patrones).

A continuación se obtienen los cromatogramas de los patrones y se representan las alturas o áreas de pico en función de la concentración.

La selección de la señal frente a la que se representa la concentración (áreas o alturas), se determina a partir de las características de ambas:

- * Altura de pico

Medida desde la base hasta la parte superior. Es un parámetro fácilmente medible, pero tiene como inconveniente que es muy sensible a las variaciones de una serie de parámetros, entre los que están: velocidad de la fase móvil, velocidad de inyección, etc.

- * Área de pico



Su medida es más complicada, pero con los equipos dotados de integradores electrónicos se puede obtener resultados muy reproducibles. Depende en menor medida de los parámetros que afectaban a las alturas de pico, aunque dependiendo del tipo de detector pueden producirse desviaciones. Dependerá de la reproducibilidad y linealidad del inyector, y de las del detector.

La representación de los datos de cada patrón debería originar una línea recta. Siendo cada uno de los patrones un punto de la misma:

$$y_1 = m \cdot x_1 + b$$

$$y_2 = m \cdot x_2 + b$$

siempre que la relación respuesta/concentración se mantenga en el intervalo definido entre las concentraciones x_1 y x_2 .

A partir de esta suposición se pueden calcular los valores de m y b , partiendo de los valores de los parámetros experimentales (y_1, y_2, x_1, x_2).

Conocidas la pendiente (m) y la ordenada en el origen (b) a partir de los valores de la señal obtenidos para los patrones (sistema de ecuaciones anterior), del valor de señal obtenido en el análisis de la muestra (y_m), se podrá obtener su concentración como:

$$x_m = \frac{y_m - b}{m}$$

5. DESCRIPCIÓN

A continuación se indican, de una forma general, las consideraciones a tener en cuenta sobre los equipos, los Materiales de Referencia y los reactivos que participan en las actividades de calibración de



Cromatógrafos de Líquidos, así como las operaciones necesarias, para llevar a cabo dicha actividad.

5.1. Equipos y Materiales

- Cromatógrafo de Líquidos
- Equipos auxiliares (columnas, detectores, inyector automático, etc.), utilizados junto con el cromatógrafo y característicos del analito a determinar.
- Mezclas de disolventes adecuados, para utilizarlos como fase móvil, con calidad cromatográfica. Si es necesario utilizar agua deberá ser de calidad ultrapura o químicamente pura.
- Material Volumétrico calibrado:
 - * Pipetas clase A.
 - * Micropipetas con repetibilidad y exactitud suficiente al menos 2 % de ambas.
 - * Matraces Aforados clase A.
 - * Microjeringas (si el cromatógrafo de líquidos carece de inyector automático). Deberán definirse volumen y características de exactitud y precisión
 - * Balanza analítica, con una resolución de 0,1 mg (sólo si los materiales de referencia o los patrones utilizados en la interpolación deben ser pesados).
- Disolvente, adecuado al parámetro a ensayar, libre de impurezas que puedan afectar a la respuesta del equipo en los tiempos de retención del analito y patrones (generalmente



pureza cromatográfica), para realizar las diluciones de los patrones si fuera necesario.

- Soluciones de un Material de Referencia Certificado de una concentración conocida del analito a determinar. Dicha concentración debe incluir el rango en el que se esperan determinar las muestras. La separación entre ellas debe ser tal que se mantenga la linealidad de la recta. Como criterio aproximado se podría indicar que la relación entre ellas no sea mayor de 10.

NOTA:

La disolución de concentración adecuada puede ser preparada a partir de un material de referencia de concentración superior, por diluciones adecuadas utilizando el material volumétrico descrito.

La disolución puede contener solo un analito o una mezcla de varios.

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

5.2. Operaciones previas

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

5.2.1. Control de condiciones ambientales

Dadas las características constructivas y funcionales del equipo, esta calibración se realizará siempre en el laboratorio, y no requiere en general condiciones ambientales particulares, pudiendo desarrollarse en el intervalo comprendido entre 18 °C y 28 °C.

En todo caso deberán consultarse las condiciones indicadas en el manual de uso del equipo.

NOTA:



Determinados detectores pueden requerir un control de las variaciones de temperatura más severas.

5.2.2. Elaboración de patrones de calibración

Se realizarán a partir del Material de Referencia Certificado, haciendo las diluciones que sean necesarias para que la concentración se encuentre incluida en el rango de determinación. Las diluciones se prepararán justo antes de realizar la calibración. Estas disoluciones podrán estar preparadas previamente, si el laboratorio posee evidencias que demuestran que la concentración preparada no varía con el tiempo de almacenamiento.

Se deberá confirmar que el material de referencia cumple los requisitos de trazabilidad adecuados y definidos, y que su periodo de caducidad no ha sido sobrepasado.

Se asegurará que el material de referencia se encuentra a temperatura ambiente. En el caso de conservación en nevera, se atemperará antes de usarlo por un periodo de al menos 2 horas.

NOTA:

Si los compuestos son volátiles no se esperará a atemperar y todas las preparaciones se realizarán por pesada, para minimizar posibles errores por volatilización del compuesto de interés.

5.2.3. Puesta en marcha del equipo

Deberán tenerse en cuenta las indicaciones del fabricante. En general y para la puesta en marcha del equipo se seguirán los siguientes pasos:

- a. Apertura de las botellas de los gases (helio, hidrógeno, etc.), indicados en el ensayo a realizar.
- b. Encendido del equipo y del software.



- c. Apertura de los manómetros de presión de los gases, y regulación.
- d. Estabilización durante un periodo de 20 minutos a 30 minutos.
- e. Conectar o comprobar los detectores ultravioleta, fluorescencia, etc.
- f. Colocación de la columna adecuada para el ensayo, si anteriormente no estaba colocada.
- g. Selección de la temperatura del horno de columnas.
- h. Comprobación del circuito neumático.
- i. Estabilización de todo el sistema durante 15 minutos.
- j. Bombear agua por todo el sistema hasta eliminar totalmente cualquier residuo de materia orgánica.
- k. Bombear 200 ml de agua de calidad HPLC con un caudal de 5 ml/min.
- l. Pasar finalmente de 30 ml a 50 ml de metanol, acetonitrilo o disolvente apropiado.
- m. Regulación del gas portador (helio, etc.).
- n. Comprobar la presión de la columna.
- o. Inyectar un patrón de calibración, calcular el área y altura de pico y compararlo con los obtenidos en días anteriores (opcional, para confirmar el correcto estado del detector antes de su uso).

NOTA:

Algunos pasos pueden ser eliminados si el equipo permanece en marcha habitualmente



Si surgiera cualquier cuestión, consultar el manual del equipo o la ayuda del software, o bien ponerse en contacto con el servicio técnico del equipo.

Una vez realizados estos pasos se puede comenzar la secuencia de análisis en el cromatógrafo de líquidos.

Las condiciones de trabajo durante la calibración, deben ser las mismas que las que posteriormente se utilizarán en las medidas de las muestras sometidas al ensayo para el cual se está calibrando el equipo.

5.3. Proceso de calibración

5.3.1. Selección de los parámetros instrumentales

Mediante comprobación de las condiciones de trabajo (temperatura del inyector, temperatura de la columna, parámetros del detector empleado -longitud de onda, temperatura, etc.-, caudal bombeado, volumen de inyección, velocidad de flujo), así como las condiciones reflejadas en el software del equipo.

5.3.2. Fijación de las condiciones de procesamiento de la señal

- Selección del tipo de respuesta: área o altura.
- Selección del modo de integración.
- Selección del umbral mínimo para considerar la existencia de señal y proceder a integración.

5.3.3. Acondicionamiento del equipo

Mediante el análisis de un blanco, constituido por una alícuota del disolvente utilizado para la realización de los patrones.



5.3.4. Comprobación de la ausencia de señal

Después del análisis del blanco. La ausencia de señal en la práctica consiste en el establecimiento por parte del laboratorio de un intervalo de tolerancia.

En caso contrario repetición del análisis, hasta la obtención de un valor de referencia adecuado.

5.3.5. Realización del análisis

A continuación se analiza cada una de las dos disoluciones patrón (Material de Referencia Certificado).

NOTA:

El rango de concentraciones de estas disoluciones fijará el rango de determinación de la concentración del analito.

5.3.6. Comprobación del cromatograma

Confirmando:

- a) La aparición de picos en los tiempos de retención esperados.
- b) La resolución de la columna entre picos es siempre superior a 1,5.
- c) La forma de los picos es adecuada, no presentando colas o artefactos (desviaciones de la forma gaussiana del pico).
- d) Si la integración se realiza automáticamente, la ventana seleccionada ha sido adecuada y los criterios establecidos se han respetado.
- e) En caso de integración manual proceder a la realización de la misma.



Anotación de los datos requeridos (apartado 5.4).

5.3.7. Repetición del análisis

Repetición del análisis de las disoluciones patrón el número de veces estipulado, para ello realizar los pasos indicados en 5.3.5. y 5.3.6. En general es aconsejable realizar 10 repeticiones.

5.3.8. Obtención de la pendiente y ordenada en el origen

A partir de las ecuaciones (3) y (4) del apartado 5.4., se calculará la pendiente y la ordenada en el origen.

5.4. Toma y tratamiento de datos

5.4.1. Toma de datos

Para garantizar la trazabilidad de las medidas realizadas durante la calibración, es necesario registrar y evaluar las actividades llevadas a cabo, además de los resultados obtenidos.

Para ello es conveniente disponer de formatos de registros adecuados (registros manuales o informáticos), donde como mínimo deberán registrarse los siguientes datos:

- Parámetro objeto de la calibración (analito).
- Equipo a calibrar (cromatógrafo).
- Equipos (balanza) y material volumétrico (si se trata de material individual -micropipetas-) utilizados para la elaboración de los patrones y estándares internos.
- Lotes de los Materiales de Referencia Certificados.



- Respuestas obtenidas del equipo, durante el análisis de los patrones y cálculos realizados con ellas para la determinación de la pendiente y ordenada en el origen.
- Fecha.
- Analista.
- Se deben conservar todos los cromatogramas obtenidos o al menos:
 - * Condiciones Instrumentales.
 - * Respuestas del equipo.
 - * Tiempos de Retención.
 - * Sistemas de Integración e intervalo de tiempos usado en cada pico –ventana de integración- (en el caso de integración por áreas).

Además se deberá registrar cualquier otro dato que se considere necesario para asegurar la trazabilidad y reproducibilidad del proceso.

5.4.2. Tratamiento de datos

El método de calibración mediante la utilización de la interpolación entre dos puntos, es un caso de calibración indirecta, donde se relaciona la respuesta del equipo frente a la concentración de una serie de muestras/patrones.

Con los datos obtenidos se calculará la pendiente y la ordenada en el origen que se utilizará posteriormente para la cuantificación del compuesto.

$$y_1 = m \cdot x_1 + b \quad (1)$$



$$y_2 = m \cdot x_2 + b \quad (2)$$

$$m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1} \quad (3)$$

$$b = \frac{x_2 \cdot y_1 - x_1 \cdot y_2}{x_2 - x_1} \quad (4)$$

Las concentraciones de los patrones se obtienen a partir de las del Material de Referencia Certificado mediante diluciones, utilizando las siguientes expresiones:

$$x_1 = C_{MR} \cdot \frac{V_{i_1}}{V_{F_1}} \quad (5)$$

$$x_2 = C_{MR} \cdot \frac{V_{i_2}}{V_{F_2}} \quad (6)$$

6. RESULTADOS

6.1. Cálculo de Incertidumbre

Para realizar el cálculo de incertidumbre en la calibración del cromatógrafo de líquidos, hay que tener en cuenta cuales son las principales fuentes de error durante la calibración. Algunas de ellas se indican a continuación:

- Variaciones de los resultados de las medidas experimentales de áreas o alturas.
- Incertidumbre en la concentración, debidos a la variabilidad de los operadores en el enrase.
- Incertidumbre de la concentración del Material de Referencia.



- Incertidumbre debida a la diferencia de los volúmenes de las distintas unidades del material volumétrico utilizadas.

NOTA:

Pueden ser otras si se realizan pesadas.

La asignación y expresión de incertidumbres se realizará siguiendo los criterios de la Guía para la expresión de la Incertidumbre [1] y de la Guía EA-4/02 [2].

En nuestro caso las magnitudes de entrada y salida serán:

Magnitud de Salida

$$\hookrightarrow m = f(y_2, y_1, V_{F2}, V_{F1}, C_{MR}, V_{I2}, V_{I1})$$

\hookrightarrow **Magnitudes de Entrada**

Magnitud de Salida

$$\hookrightarrow b = g(y_2, y_1, V_{F2}, V_{F1}, V_{I2}, V_{I1})$$

\hookrightarrow **Magnitudes de Entrada**

A partir de las expresiones (3) y (4) y suponiendo que los patrones se preparan por dilución de un único Material de Referencia Certificado (caso habitual), sustituyendo los términos se obtiene:

$$m = \frac{(y_2 - y_1) \cdot V_{F_2} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \quad (7)$$

$$b = \frac{V_{I_2} \cdot V_{F_1} \cdot y_1 - V_{I_1} \cdot V_{F_2} \cdot y_2}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \quad (8)$$

6.1.1. Ley de la propagación de las incertidumbres

Aplicando la ley de propagación de las incertidumbres, teniendo en cuenta que todas las magnitudes que quedan en la fórmula son independientes y no están correlacionadas:

$$\begin{aligned}
 u_m^2 = & u_{y_2}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_2} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \right)^2 + u_{y_1}^2 \cdot \left(\frac{-V_{F_2} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \right)^2 + \\
 & + u_{V_{F_2}}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_1}^2 \cdot V_{I_2} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + u_{V_{F_1}}^2 \cdot \left(\frac{-V_{F_2}^2 \cdot V_{I_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + \\
 & + u_{C_{MR}}^2 \cdot \left(\frac{-(y_2 - y_1) \cdot V_{F_2} \cdot V_{F_1}}{C_{MR}^2 \cdot (V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \right)^2 + u_{V_{I_2}}^2 \cdot \left(\frac{-V_{F_1}^2 \cdot V_{F_2} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + \\
 & + u_{V_{I_1}}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_2}^2 \cdot V_{F_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{I_2} V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2
 \end{aligned} \tag{9}$$

$$\begin{aligned}
 u_b^2 = & u_{V_{I_2}}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_1} \cdot V_{F_2} \cdot V_{I_1} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + u_{V_{F_1}}^2 \cdot \left(\frac{V_{I_1} \cdot V_{I_2} \cdot V_{F_2} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + \\
 & + u_{y_1}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_1} \cdot V_{I_2}}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \right)^2 + u_{V_{I_1}}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_1} \cdot V_{F_2} \cdot V_{I_2} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + \\
 & + u_{V_{F_2}}^2 \cdot \left(\frac{V_{I_1} \cdot V_{I_2} \cdot V_{F_1} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})^2} \right)^2 + u_{y_2}^2 \cdot \left(\frac{V_{F_2} \cdot V_{I_1}}{(V_{I_2} \cdot V_{F_1} - V_{I_1} \cdot V_{F_2})} \right)^2
 \end{aligned} \tag{10}$$

6.1.2. Cálculo de las componentes de la incertidumbre

a. Incertidumbre de la respuesta

La respuesta (y_1 e y_2) ha sido estimada como media de una serie de resultados (n).

a.1. Su incertidumbre se calculará según una estimación de tipo A, en función de la desviación típica experimental:



$$u_{y_1}^2 = \frac{s_{y_1}^2}{n} \quad (11)$$

$$u_{y_2}^2 = \frac{s_{y_2}^2}{n} \quad (12)$$

$$s_{y_1}^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (y_{1j} - \bar{y}_1)^2 \quad (13)$$

$$s_{y_2}^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (y_{2j} - \bar{y}_2)^2 \quad (14)$$

a.2. Si el número de repeticiones n , ha sido pequeño (menor que 10 e incluso 1), pero se dispone de un valor de $s_{y_{1,l}}$ y $s_{y_{2,l}}$ obtenido inicialmente para 10 medidas, se realizará una estimación de las incertidumbres basándose en el siguiente esquema: se calcularán los coeficientes de variación de cada patrón:

$$CV_{y_{1,l}} = \frac{s_{y_{1,l}}}{y_1} \quad (15)$$

$$CV_{y_{2,l}} = \frac{s_{y_{2,l}}}{y_2} \quad (16)$$

Y se obtendrá el máximo de los dos (CV_{MAX}), calculándose a continuación:

$$u_{y_1}^2 = \frac{CV_{MAX}^2 \cdot y_{1,ACT}^2}{n} \quad (17)$$

$$u_{y_2}^2 = \frac{CV_{MAX}^2 \cdot y_{2,ACT}^2}{n} \quad (18)$$



- a.3. El laboratorio deberá evaluar que los coeficientes de repetibilidad de la señal obtenidos inicialmente se mantienen con el paso del tiempo, repitiendo periódicamente las mismas pruebas de análisis de patrones.

No se ha tenido en cuenta la resolución de la integración de la señal porque en general la variabilidad de la señal es mucho mayor que la resolución y por tanto esta no influye. No se ha tenido en cuenta la deriva de la señal entre dos medidas, debido a que se realizan consecutivamente.

NOTA:

El laboratorio debe seleccionar condiciones instrumentales y rangos de concentración que garanticen que la variabilidad de la señal es mucho mayor que la resolución, esto se consigue con seguridad, en la práctica, a partir de señales superiores a 1000.

Otras posibles contribuciones no se han tenido en cuenta al tratarse de una calibración indirecta, que no da como resultado un valor de corrección igual en todos los laboratorios, sino una relación que es la existente en este momento y para este equipo.

El laboratorio deberá evaluar que los coeficientes de repetibilidad de la señal obtenidos inicialmente se mantienen con el paso del tiempo, repitiendo periódicamente las mismas pruebas de análisis de patrones.

- b. Incertidumbre de la Concentración del Material de Referencia Certificado

Será la obtenida del certificado del Material de Referencia, teniendo en cuenta el factor de cobertura k que lo acompaña:

$$u_{C_{MR}} = \frac{U_{C_{MR}}}{k} \quad (19)$$



NOTA:

1. En caso de que no se utilizase el valor certificado del MRC, además habría que sumar a la incertidumbre expandida al final la corrección no realizada.
2. El general, la deriva del MRC debería haber sido evaluada e incluida en la incertidumbre declarada (según normativa internacional).

En caso de que se albergaran dudas, sería necesario estimar un límite máximo de variación entre el valor actual y el certificado y dividirlo por $\sqrt{3}$, combinando cuadráticamente este valor con U_{CMR}/k para obtener u_{CMR} .

3. En general las incertidumbres debidas a la influencia de la temperatura en la densidad de la disolución se considerarán despreciables.

c. Incertidumbre de volumen

Su cálculo dependerá de como se hayan controlado los equipos utilizados.

En el caso de que se hayan verificado comprobando que sus marcas de enrase cumplen las tolerancias de clase establecidas para el material volumétrico (o cualquier otra establecida por el laboratorio) y que se usen habitualmente realizando una sola medida.

$$V_M = V_C + E_L \quad (20)$$

NOTA:

La verificación consiste en comprobar que el error más la incertidumbre es menor que la tolerancia.

Se aplica a los dos patrones, tanto al volumen inicial (V_{I1} , V_{I2}) como al final (V_{F1} , V_{F2}).

De donde:

$$u_{V_M}^2 = u_{V_C}^2 + u_{E_L}^2 \quad (21)$$



c.1. Incertidumbre del volumen de cada unidad

Se considera que cualquier unidad que haya sido comprobada cumple el intervalo de clase en cualquier momento de su vida útil, por lo que se tomará la tolerancia de la clase como un intervalo máximo, y aplicando la distribución rectangular:

$$u_{V_c} = \frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}} \quad (22)$$

c.2. Incertidumbre del error de lectura

Se realizarán experimentos en el propio laboratorio para establecer un error máximo de enrase en las condiciones de uso, y se calculará la incertidumbre aplicando una distribución rectangular, de anchura $\pm E_{MAX}$, y de valor central 0:

$$u_{E_l} = \frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}} \quad (23)$$

c.3. No se tendrán en cuenta otras componentes como:

- Deriva, ya que en general para el material volumétrico usado en condiciones normales (sin líquidos agresivos, ni cambios de temperatura), se considera despreciable frente a las debidas a las diferencias entre unidades.
- Variación del volumen por la temperatura: se ha despreciado este término teniendo en cuenta su escasa influencia (del orden de 10^{-4} del volumen medido) respecto del resto de los términos.



6.1.3. Cálculo de la incertidumbre expandida

De acuerdo a lo indicado en las ecuaciones (9) y (10), se calculará la incertidumbre típica de la pendiente (u_m) y de la ordenada en el origen (u_b).

Para calcular la incertidumbre expandida, se deberá evaluar el número de grados de libertad de cada una de las componentes con el fin de conocer el factor de cobertura k utilizado, para calcular la incertidumbre expandida que corresponde a la probabilidad de cobertura de aproximadamente el 95 %:

$$U_m = u_m \cdot k \quad (24)$$

El valor de k dependerá de los grados de libertad efectivos de u_m , que dependen a su vez de los grados de libertad de las demás componentes, según la expresión:

$$v_{ef} = \frac{u^4(y)}{\sum_{i=1}^N \frac{u_i^4(y)}{v_i}} \quad (25)$$

Los grados efectivos de cada componente dependen del sistema de estimación establecido.

- Señal (y) ha sido obtenido a partir de la desviación típica de una distribución normal estimada a partir de 10 repeticiones, obtenida en el momento o inicialmente.
- Concentración de material de referencia (C_{MR}) importada de un certificado, que dispone de su k correspondiente.

A partir del k del certificado se pueden conocer los grados de libertad efectivos según la tabla 1:



V_{ef}	1	2	3	4	5	6	7	8	10	20	50	∞
k	13,97	4,53	3,31	2,87	2,65	2,52	2,43	2,37	2,28	2,13	2,05	2,00

Tabla 1

- Componentes de volumen: Han sido obtenidos de distribuciones rectangulares. Si estas se han obtenido asegurando que con un alto límite de fiabilidad los límites de variación establecidos no se sobrepasan, se considera que los grados de libertad son infinitos.

NOTA:

En condiciones habituales donde el k del Material de Referencia Certificado es 2, el documento EA-4/02 [2] en su apartado 5 permite el uso de $k = 2$ para el cálculo de la incertidumbre de m y de b , siempre que se cumplan condiciones de normalidad y fiabilidad, que suponen que haya más de tres magnitudes con una contribución similar, y que las contribuciones de tipo A hayan sido evaluadas con al menos 10 repeticiones.

6.2. Interpretación de resultados

Si la calibración se realiza en el mismo momento que los análisis, podría (opcionalmente) evaluarse mediante el establecimiento de tolerancias para los términos U_m/m y U_b/m , que influyen en la incertidumbre de medida de la muestra. Dichas tolerancias dependerán de los valores de incertidumbre que desee el laboratorio.

En caso contrario deberá evaluarse si la relación entre la pendiente y la ordenada en el origen actual y la precedente ha superado una tolerancia especificada (seleccionada por el laboratorio) y debe estudiarse su influencia en los resultados anteriores, debido a la pérdida o aumento de sensibilidad de equipo.

En general se aconseja que la calibración se realice en cada uso.



PENDIENTE (m)

Magnitud	Estimación	Incertidumbre Típica	Coefficiente de Sensibilidad	Grados de Libertad
y_2	Media de 10 o n repeticiones	$\frac{CV \cdot y_{2ACT}}{\sqrt{n}}$	$\frac{V_{F_5} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})}$	9
y_1	Media de 10 o n repeticiones	$\frac{CV \cdot y_{1ACT}}{\sqrt{n}}$	$\frac{-V_{F_5} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})}$	9
$V_{C_{F_2}}$	Volumen Nominal	$\frac{Tolerancia}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{F_1}^2 \cdot V_{L_2} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$E_{L_{F_2}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{F_1}^2 \cdot V_{L_2} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$V_{C_{F_1}}$	Volumen Nominal	$\frac{Tolerancia}{\sqrt{3}}$	$\frac{-V_{F_5}^2 \cdot V_{L_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$E_{L_{F_1}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{-V_{F_5}^2 \cdot V_{L_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
C_{MR}	Valor Certificado	$\frac{U}{k}$	$\frac{-(y_2 - y_1) \cdot V_{F_5} \cdot V_{F_1}}{C_{MR}^2 \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})}$	Correspondiente a k
$V_{C_{L_2}}$	Volumen Nominal	$\frac{Tolerancia}{\sqrt{3}}$	$\frac{-V_{F_1}^2 \cdot V_{F_5} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$E_{L_{L_2}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{-V_{F_1}^2 \cdot V_{F_5} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$V_{C_{L_1}}$	Volumen Nominal	$\frac{Tolerancia}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{F_5}^2 \cdot V_{F_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞
$E_{L_{L_1}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{F_5}^2 \cdot V_{F_1} \cdot (y_2 - y_1)}{C_{MR} \cdot (V_{L_2} \cdot V_{F_1} - V_{L_1} \cdot V_{F_5})^2}$	∞

Tabla 2



ORDENADA EN EL ORIGEN (b)

Magnitud	Estimación	Incertidumbre Típica	Coefficiente de Sensibilidad	Grados de Libertad
V_{C_2}	Volumen Nominal	$\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{\bar{F}} \cdot V_{\bar{F}_2} \cdot V_{L_1} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
E_{L_2}	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{\bar{F}_1} \cdot V_{\bar{F}_2} \cdot V_{L_1} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
$V_{C_{F_1}}$	Volumen Nominal	$\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{L_1} \cdot V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
$E_{L_{F_1}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{L_1} \cdot V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} \cdot (y_2 - y_1)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
y_1	Media de 10 o n repeticiones	$\frac{CV \cdot y_{1,act}}{\sqrt{n}}$	$\frac{V_{\bar{F}_1} \cdot V_{L_2}}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})}$	9
V_{C_h}	Volumen Nominal	$\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{\bar{F}_1} \cdot V_{\bar{F}_2} \cdot V_{L_1} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
E_{L_h}	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{\bar{F}_1} \cdot V_{\bar{F}_2} \cdot V_{L_1} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
$V_{C_{F_2}}$	Volumen Nominal	$\frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{L_1} \cdot V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
$E_{L_{F_2}}$	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{V_{L_1} \cdot V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} \cdot (y_1 - y_2)}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})^2}$	∞
y_2	Media de 10 o n repeticiones	$\frac{CV \cdot y_{2,act}}{\sqrt{n}}$	$\frac{V_{\bar{F}_1} \cdot V_{L_2}}{(V_{L_2} \cdot V_{\bar{F}_1} - V_{L_1} \cdot V_{\bar{F}_2})}$	9

Tabla 3



7. REFERENCIAS

- [1] Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida. CEM. Segunda edición en español, 2000.
- [2] Guía EA-4/02. Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration. Edición 2. EA. 1999.
- [3] Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 3ª edición en español 2008.
- [4] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. Principios de análisis Instrumental. Quinta Edición. McGraw-Hill, 2000.

8. ANEXOS

En este capítulo se recoge en un anexo un ejemplo numérico detallado.



ANEXO Ejemplo Numérico

Se procederá a realizar la calibración de un cromatógrafo de líquidos mediante el método de la interpolación entre dos puntos, para obtener los valores de la pendiente (m) y la ordenada en el origen (b):

$$m = \frac{(y_2 - y_1) \cdot V_{F_2} \cdot V_{F_1}}{C_{MR} \cdot (V_{l_2} \cdot V_{F_1} - V_{l_1} \cdot V_{F_2})} \quad b = \frac{V_{l_2} \cdot V_{F_1} \cdot y_1 - V_{l_1} \cdot V_{F_2} \cdot y_2}{(V_{l_2} \cdot V_{F_1} - V_{l_1} \cdot V_{F_2})}$$

Los valores de concentraciones de los patrones, que establecen el rango donde se podrán medir las muestras son 0,1 mg/l y 0,5 mg/l.

En este caso se considera que se pueden realizar 10 repeticiones:

Nº REP.	y ₁	y ₂
1	166 817	509 491
2	172 379	502 127
3	168 728	495 892
4	171 356	500 314
5	166 426	506 328
6	169 414	504 123
7	169 426	499 326
8	167 625	501 318
9	169 425	504 325
10	170 214	506 318
MEDIA (\bar{y})	169 181	502 956,2
DESVIACIÓN TÍPICA (s_y)	1 885,725	3 972,728
COEFICIENTE DE VARIACIÓN INICIAL (CV)	0,011 46 (*)	0,007 898

(*) El coeficiente de variación así marcado, corresponde al máximo (CV_{MAX}) de entre los dos patrones.



Todo ello corresponde a la aplicación de las siguientes fórmulas:

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^n y_j}{n} \quad s_y = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (y_j - \bar{y})^2} \quad CV_l = \frac{s_y}{\bar{y}}$$

Posteriormente se obtienen los valores de y_1 e y_2 actuales, como media de tres repeticiones:

	y_{1ACT}	y_{2ACT}
Rep. 1	189 889	498 862
Rep. 2	191 260	499 254
Rep. 3	190 126	497 762
MEDIA	190 425	498 626
CV	0,003 8	0,001 55

Dado que los coeficientes de variación (CV) son menores que los del primer día, se sustituyen por la $CV_{MAX} = 0,011 46$

De donde:

$$U_{y_1} = \frac{190425 \cdot 0,01146}{\sqrt{3}}$$

$$U_{y_2} = \frac{498626 \cdot 0,01146}{\sqrt{3}}$$

MATERIAL DE REFERENCIA

- Concentración Inicial (C_{MR}) 10 mg/l
- Incertidumbre 0,2 mg/l
- Factor de cobertura (k) 2



DILUCIÓN

	VALOR NOMINAL (ml)	CLASE (ml)	ENRASE (ml)
VOLUMEN INICIAL 1	1	0,005	0,01
VOLUMEN FINAL 1	100	0,08	0,5
VOLUMEN INICIAL 2	5	0,01	0,05
VOLUMEN FINAL 2	100	0,08	0,5

Con los datos recogidos hasta el momento se completarán las tablas 2 y 3 indicadas en el apartado 6.1.3. del presente procedimiento. Sustituyendo los términos indicados por valores numéricos:

PENDIENTE (m)

MAGNITUD	ESTIMACIÓN	$U_{TÍPICA}$	COEFICIENTE DE SENSIBILIDAD	CONTRIBUCIÓN TÍPICA	GRADOS DE LIBERTAD
y_2	502 956,2	1 256,29	2,5	3 140,72	9
y_1	169 181	596 318	-2,5	-1 490,80	9
$V_{C_{F_2}}$	100	0,046	10 430,475	481,76	∞
$E_{L_{F_2}}$	0	0,289	10 430,475	3 011,02	∞
$V_{C_{F_1}}$	100	0,046	-2 086,095	-96,36	∞
$E_{L_{F_1}}$	0	0,289	-2 086,095	-602,20	∞
C_{MR}	10	0,1	-83 443,8	8 344,4	∞
V_{C_2}	5	0,006	-208 609,5	-1 204,41	∞
E_{L_2}	0	0,029	-208 609,5	-6 022,03	∞
V_{C_1}	1	0,003	208 609,5	602,20	∞
E_{L_1}	0	0,006	208 609,5	1 204,41	∞



Se tendrá en cuenta que dado que el factor de cobertura del Material de Referencia es $k = 2$, y lo indicado la nota del apartado 6.1.3., el factor de cobertura utilizado será 2, obteniéndose los siguientes datos finales de la calibración del cromatógrafo de líquidos:

PENDIENTE (m)

VALOR (m)	834 438
INCERTIDUMBRE COMBINADA (u_m)	11 441,78
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (U_m)	22 883,56

ORDENADA EN EL ORIGEN (b)

MAGNITUD	ESTIMACIÓN	$U_{TÍPICA}$	COEFICIENTE DE SENSIBILIDAD	CONTRIBUCIÓN TÍPICA	GRADOS DE LIBERTAD
V_{C_2}	5	0,006	20 860,95	120,44	∞
E_{L_2}	0	0,028	20 860,95	602,20	∞
V_{C_F}	100	0,046	1 043,05	48,176	∞
E_{L_F}	0	0,289	1 043,05	301,10	∞
y_1	169 181	596,32	1,25	745,398	9
V_{C_1}	1	0,003	-104 304,75	-301,10	∞
E_{L_1}	0	0,006	-104 304,75	-602,10	∞
V_{C_2}	100	0,046	-1 043,05	-48,176	∞
E_{L_2}	0	0,289	-1 043,05	-301,10	∞
y_2	502 956,2	1 256,29	0,25	314,07	9



Se tendrá en cuenta que dado que el factor de cobertura del Material de Referencia es $k = 2$, y lo indicado la nota del apartado 6.1.3., el factor de cobertura utilizado será 2.

NOTA:

Si se calculan los grados de libertad se obtiene un valor de 79 que corresponde a un valor de $k = 2,00$.

Se obtienen los siguientes datos finales de la calibración del cromatógrafo de líquidos:

ORDENADA EN EL ORIGEN (b)

VALOR (b)	85 737,2
INCERTIDUMBRE TÍPICA COMBINADA (u_b)	1 292,55
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (U_b)	2 585,10

La incertidumbre expandida de medida se ha obtenido multiplicando la incertidumbre típica de medición por el factor de cobertura $k = 2$ que, para una distribución normal, corresponde a una probabilidad de cobertura de aproximadamente del 95 %.

