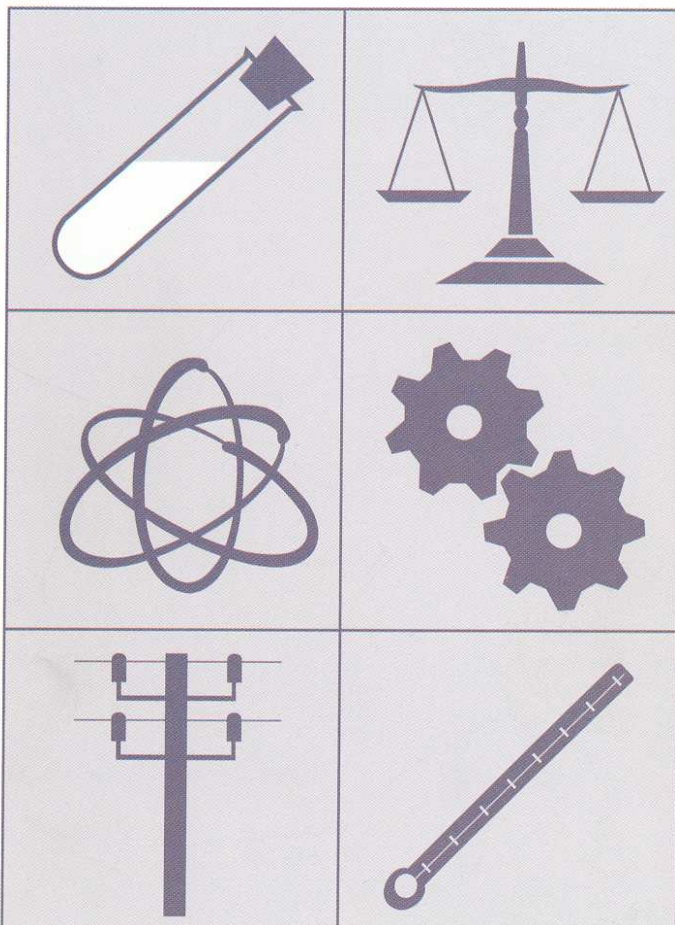


Metrología

PROCEDIMIENTO DE CALIBRACIÓN



PROCEDIMIENTO QU- 005 PARA LA CALIBRACIÓN DE EQUIPOS PARA CROMATOGRAFÍA DE GASES

m̃ 10

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	16
4.1. Abreviaturas	16
4.2. Principios cromatográficos	18
4.3. Calibración.....	20
4.4. Método de recta de calibrado.....	21
4.5. Método del patrón interno con punto único	22
5. DESCRIPCIÓN.....	22
5.1. Equipos y materiales	22
5.2. Operaciones previas	24
5.3. Proceso de calibración	26
5.4. Toma y tratamiento de datos.....	29
6. RESULTADOS	33
6.1. Cálculo de incertidumbres.....	33
6.2. Interpretación de resultados.....	40
7. REFERENCIAS	40
8. ANEXOS.....	41



1. OBJETO

El presente procedimiento tiene por objeto describir posibles métodos para la calibración de equipos de cromatografía de gases, para su uso posterior en determinaciones cuantitativas de analitos.

2. ALCANCE

El presente procedimiento es de aplicación a cromatógrafos de gases para determinaciones cuantitativas y cuya calibración se realice bien mediante el método de patrón interno con punto único, bien mediante una recta de calibración.

Este procedimiento se deberá aplicar exclusivamente a concentraciones comprendidas dentro de un rango de trabajo lineal, que se determinará de antemano a la calibración del equipo.

Este procedimiento es válido tanto para analitos presentes en disoluciones, como para muestras gaseosas que puedan ser inyectadas en un cromatógrafo de gases.

Para la realización de determinados análisis pueden ser necesarias pruebas adicionales de validación.

En este procedimiento no se incluyen 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 [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.

Coeficiente de variación

Relación entre la desviación típica y el valor medio de una magnitud.

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

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, viene 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.



NOTA 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.

NOTA 2 La expresión s/\sqrt{n} es un estimador de la desviación típica de la distribución de \bar{x} y se denomina desviación típica experimental de la media.

NOTA 3 La “desviación típica experimental de la media” en ocasiones se denomina, incorrectamente, error típico de la media.

Detector

Elemento del cromatógrafo que suministra una señal, en general proporcional a la concentración de la especie de interés. Existen diferentes tipos, entre otros:

- Detector de ionización de llama (FID).
- Detector de conductividad térmica (TCD).
- Detector termoiónico (TID).
- Detector de captura de electrones (ECD).
- Detector de emisión atómica (AED).
- Detector de nitrógeno-fósforo (NPD).

Incertidumbre de medida [1] (2.26)

Parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurado, 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 (MR) [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 MR 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 MR comprenden materiales que representan tanto magnitudes como propiedades cualitativas.

EJEMPLO 1 *Ejemplos de MR 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 MR 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 MR 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 MR 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 MR puede utilizarse únicamente para calibración o para el aseguramiento de la calidad.

NOTA 7 Dentro de las especificaciones de un MR 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)

MR 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 MRC 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 MRC 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.

Patrón de medida [1] (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 μg .

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 MR 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 MR.

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 [1] (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”.

Patrón interno [3]

Sustancia añadida a muestras y patrones para compensar las posibles fluctuaciones existentes en la señal obtenida en el análisis de distintas muestras y debidas a magnitudes de influencia (volumen inyectado, temperatura, inyector, etc).

El patrón interno debe ser una sustancia con las siguientes características:

- Debe proporcionar señal en las condiciones cromatográficas en las cuales se va a realizar el ensayo.
- No debe estar presente en MR ni en las muestras sometidas a ensayo, para que la referencia de su señal no sea distorsionada.



- Debe tener una concentración adecuada para poder detectarla sin ningún tipo de dudas.
- La cantidad adicionada debe ser conocida y repetible.
- La relación entre su señal y la del analito deberá seguir un modelo lineal.

Repetibilidad de medida [1] (2.21)

Precisión de medida bajo un conjunto de condiciones de repetibilidad.

Condición de repetibilidad de una medición [1] (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 mismo lugar, así como mediciones repetidas del mismo objeto o de un objeto similar en un periodo corto de tiempo

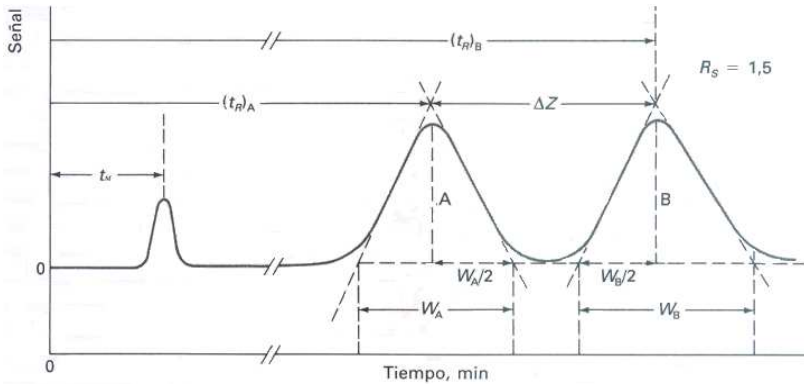
NOTA 1 Una condición de medición es una condición de repetibilidad únicamente respecto a un conjunto dado de condiciones de repetibilidad.

NOTA 2 En química, el término “condición de precisión intra-serie” se utiliza algunas veces para referirse a este concepto.

Resolución de la columna (R_s) [3]

Medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar dos

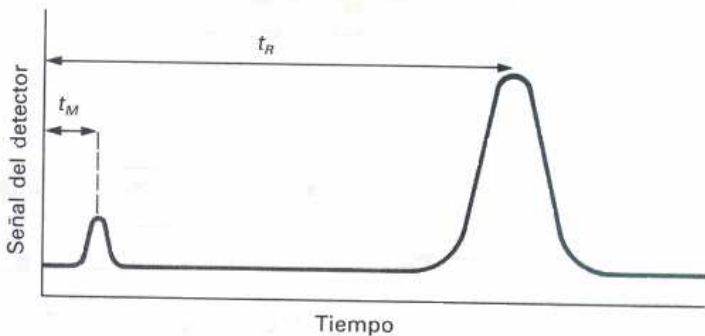
analitos. Se define como:
$$R_s = \frac{2 \cdot [(t_R)_B - (t_R)_A]}{(w_A + w_B)}$$



Con un valor $R_s > 1,5$ se permite la separación completa de dos componentes

Tiempo de retención (t_R) [3]

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.





Tiempo muerto (t_M) [3]

Tiempo necesario para que, por término medio, una molécula de la fase móvil, o una especie que no es retenida, pase a través de la columna y alcance el detector.

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.

NOTA 7 La ILAC considera que los elementos necesarios para confirmar la trazabilidad metrológica son: una cadena de trazabilidad metrológica ininterrumpida a un patrón internacional o a un patrón nacional, una incertidumbre de medida documentada, un procedimiento de medida documentado, una competencia técnica reconocida, la trazabilidad metrológica al SI y los intervalos entre calibraciones (véase ILAC P-10:2002)

NOTA 8 Algunas veces el término abreviado “trazabilidad” se emplea en lugar de “trazabilidad metrológica”, así como para otros conceptos, como trazabilidad de una muestra, de un documento, de un instrumento, de un material, etc., cuando interviene el historial (“traza”) del elemento en cuestión. Por tanto, es preferible utilizar el término completo “trazabilidad petrológica” para evitar confusión.

4. GENERALIDADES

4.1. Abreviaturas y símbolos

A_{am}	Área del analito en la muestra
\bar{A}_{ap}	Promedio de las áreas del analito en el MR
A_{im}	Área del patrón interno en la muestra
\bar{A}_{ip}	Promedio de las áreas del patrón interno en el MR
MR	
C_{am}	Concentración de analito en la muestra



C_{ap}	Concentración de analito en el MR
C_{MR}	Concentración del MR o del MRC (indicada en el certificado)
CV_{ACTUAL}	Coefficiente de variación de la calibración actual realizada con al menos tres repeticiones
$CV_{INICIAL}$	Coefficiente de variación de la prueba realizada con 10 medidas
E_L	Error de lectura producido por la operación de enrase
F_a	Factor de relación de áreas obtenido en la calibración, para el analito a
k	Factor de cobertura
MR	Material de referencia
MRC	Material de referencia certificado
\bar{R}_a	Promedio de la relación (A_{ip} / A_{ap}) de los n cromatogramas realizados
R_{aj}	Relación A_{ip} / A_{ap} , en el cromatograma j
S_R	Desviación típica del factor R
S_{RI}	Desviación típica del factor R , obtenida inicialmente y usada para estimar la incertidumbre de repetibilidad cuando no se realiza un número de repeticiones suficiente
$u(y)$	Incertidumbre típica de la magnitud de salida
$u_i(y)$	Componentes de la incertidumbre típica debidas a las magnitudes de entrada
V_C	Volumen asignado por la clase
V_F	Volumen final de la dilución
V_I	Volumen inicial de la dilución
V_M	Volumen medido
ν_i	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 sustancias estrechamente relacionadas, presentes 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 el caso de la cromatografía de gases es un gas inerte, 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 normalmente es una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte, que se mantiene fija en la 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.

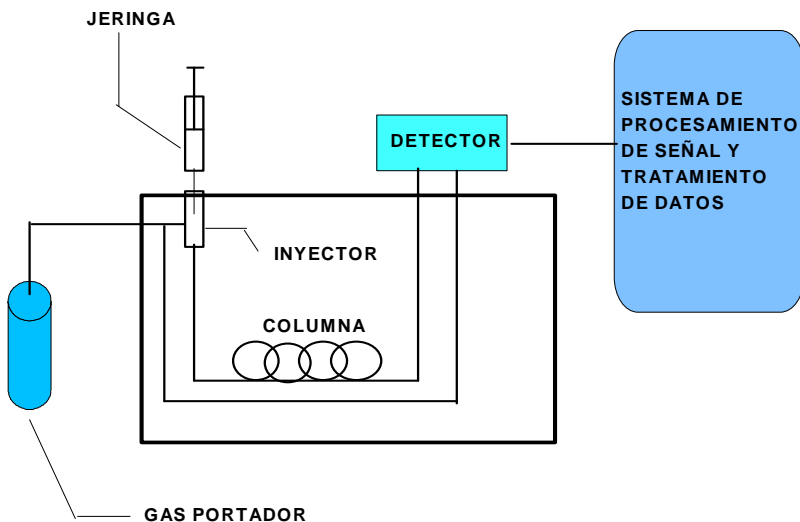
Aquellos componentes que son retenidos con fuerza por la fase estacionaria se mueven lentamente a través de la columna, debido al flujo de la fase móvil; por el contrario, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria, se mueven con rapidez.

Los componentes principales de un cromatógrafo de gases son:

- Gases portadores.
- Sistemas de inyección de la muestra.
- Columnas y hornos.
- Detectores.
- Sistema de procesamiento de la señal y tratamiento de datos.

El detector aprecia la presencia de vapor de la especie a analizar que sale por la columna y mide, o bien el cambio en alguna propiedad mayoritaria del gas (como por ejemplo, la conductividad térmica) o bien una propiedad única de la especie a analizar (como por ejemplo, el contenido en carbono).

A continuación se indica un esquema básico de los elementos que componen un cromatógrafo de gases:



La cromatografía se puede emplear para la identificación cualitativa y para la determinación cuantitativa de las especies separadas. 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 o diluciones del analito de concentración conocida.



Pueden utilizarse ambos, aunque en general es más fiable el área. La decisión será tomada por el usuario en función de las pruebas de puesta a punto.

La cualitativa no tiene calibración y además dependería mucho del tipo de detector, por lo que al no formar parte del procedimiento y complicar su comprensión, se ha optado por no incluirla.

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 (MR) y obtener la relación entre respuesta y concentración. Esta operación se denomina Calibración Indirecta.

Una vez obtenida la relación, se utiliza ésta para calcular los valores de nuestra sustancia en muestras reales similares a los MR.

Este tipo de calibración reúne unas determinadas características:

- a. No es única para el equipo, sino que se realiza por parámetro (sustancia).
- 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 y no de forma rutinaria, el



empleo de MR especiales (de matriz similar a las muestras).

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

- Función de calibrado (habitualmente lineal: recta de calibrado).
- Función de calibrado.
- Método de adiciones.
- Patrón interno con recta.
- Patrón interno con punto único.

A continuación se describen los dos métodos más utilizados.

4.4. Método de la recta de calibrado

La forma de calibración típica en cromatografía de gases cuantitativa, usada siempre que las condiciones lo permitan, es la recta de calibrado. Esto es debido a que es un método fiable, rápido y relativamente sencillo.

Implica la preparación de una serie de disoluciones de MR de composición parecida a la de la muestra. A continuación se introducen por inyección en el cromatógrafo de gases los MR y si fuera de interés también la muestra, siguiendo el orden creciente de concentración de analito preferentemente.

Una vez hecho el análisis de las especies, se obtienen los cromatogramas de los MR y se representan las alturas o áreas de pico en función de la concentración. La representación gráfica de los datos debería originar una línea recta que pasara por el origen de coordenadas. Más adelante se hallará la concentración del analito de la muestra a determinar a partir de su área.

Este método requiere que la recalibración sea frecuente.



4.5. Método del patrón interno con punto único

En cromatografía cuantitativa los resultados más fiables se consiguen mediante el uso de patrones internos, debido a que con este método, se evitan las incertidumbres que se producen en la inyección de la muestra.

En este método, se introduce en cada MR y en la muestra una cantidad exactamente medida de una sustancia patrón interno. Se procede al análisis mediante el cromatógrafo, y la relación de las áreas del analito y del patrón interno se utiliza como parámetro analítico (respuesta) para relacionarla con la concentración del analito.

La suposición utilizada para la determinación analítica de las muestras (ensayo) es por tanto:

$$C_{am} = \frac{A_{am}}{A_{im}} \cdot F_a$$

El objeto de la calibración es precisamente determinar el factor F_a , para cada uno de los analitos de interés.

5. DESCRIPCIÓN

A continuación se indican, de una forma general, las consideraciones a tener en cuenta sobre los equipos, los MR y los reactivos que participan en las actividades de calibración de cromatógrafos de gases, así como las operaciones necesarias, para llevar a cabo dicha actividad.

5.1. Equipos y materiales

- Cromatógrafo de gases.



- Equipos auxiliares (columnas, detectores, inyectoros automáticos, etc.), utilizados junto con el cromatógrafo y característicos del analito a determinar.
- Gases apropiados (deberán ser gases químicamente inertes como helio, argón, nitrógeno, dióxido de carbono e hidrógeno).
- Material volumétrico calibrado:
 - * Pipetas clase A.
 - * Micropipetas con repetibilidad y exactitud suficiente, al menos 2 % de cada una de ellas.
 - * Matraces aforados clase A.
 - * Microjeringas (si el cromatógrafo de gases 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 MR del analito o el patrón interno deben ser pesados).
- Sistema para la preparación de diluciones gaseosas de analito, en su caso.
- Disolvente o diluyente adecuado al parámetro a ensayar, libre de impurezas que puedan afectar a la respuesta del equipo en los tiempos de retención del analito y en su caso del patrón interno (generalmente pureza cromatográfica).
- MR de concentración conocida del analito a determinar. Dicha concentración debe encontrarse en el rango en el que se espera determinar las muestras.



NOTA: Disoluciones de concentración adecuada pueden ser preparadas a partir de un MRC de concentración superior, por diluciones adecuadas utilizando el material volumétrico descrito o el sistema de dilución adecuado.

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

- Patrón interno de concentración conocida y libre de impurezas.
- Cápsulas, viales portamuestras o cualquier otro sistema adecuado para la contención de MR y muestras.
- 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, la calibración se realizará siempre en el laboratorio, y no requiere en general condiciones ambientales particulares, pudiendo desarrollarse entre 18 °C y 28 °C.

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

NOTA: Determinados detectores o inyectores pueden requerir un control más severo de las variaciones de temperatura.

5.2.2. Elaboración de MR, en su caso

Se realizarán a partir del MRC haciendo las diluciones que sean necesarias para que la concentración se encuentre incluida en el rango de determinación. En su caso, antes de realizar el enrase final



se adiciona el patrón interno. Las diluciones se prepararán justo antes de realizar la calibración.

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

Se asegurará que el MRC se encuentra a temperatura ambiente o a la temperatura del laboratorio. En caso contrario, deberá atemperarse durante un periodo de tiempo que se estime oportuno.

NOTA 1 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.

En el caso de uso de patrón interno, éste se adicionará a los MR en la concentración y volumen apropiados, teniendo en cuenta que:

1º. La concentración final en MR será tal que la respuesta (señal del detector) sea similar para el patrón interno y para el analito de interés.

2º. El volumen adicionado podrá ser medido con una incertidumbre mejor del 1%.

NOTA 2 Aunque dicho volumen no afecta a la incertidumbre del factor de calibración F , sí influye en la incertidumbre de medida del analito durante el ensayo.

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:

- Apertura de las conexiones de los gases (helio, hidrógeno, etc.), indicados para el ensayo a realizar, y regulación de los mismos.
- Encendido del equipo y del software correspondiente.



- Encendido del detector FID en su caso. En el caso de uso de otro detector, se encenderá automáticamente con el equipo.
- Esperar el tiempo preciso para la estabilización del equipo.
- Ante cualquier duda, consultar el manual de instrucciones del equipo.

Una vez realizados todos estos pasos, se puede comenzar con la secuencia del análisis en el cromatógrafo de gases.

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

5.3. Proceso de calibración

A continuación se detalla un proceso de calibración tipo, pero dependiendo del equipo que se utilice puede cambiar el orden de cada una de las etapas. En caso de duda, consultar el manual de instrucciones.

Es importante que todas las medidas se realicen en el intervalo de respuesta lineal del analito.

5.3.1. Selección de los parámetros instrumentales

Normalmente se realiza mediante el software del equipo, aunque en algunos modelos se comprueban o introducen a través de los botones del propio cromatógrafo las condiciones de trabajo, como son: temperatura del inyector, temperatura del detector, columna, rampas de temperatura, etc.

Estos parámetros dependen del tipo de equipamiento con que esté dotado el cromatógrafo (detector, columnas, inyector, etc.) y del tipo de análisis a realizar. También hay que considerar la naturaleza del analito y la matriz.



Se debe hacer un estudio previo para la selección de estos parámetros, así como numerosas pruebas.

5.3.2. Fijación de las condiciones de procesamiento de la señal

- Selección del tipo de respuesta: área o altura.
- Selección de la atenuación u otros parámetros dependiendo del tipo de equipo y de lo indicado en el Manual de uso.
- Selección del modo de integración, en el caso de que el tipo de respuesta seleccionada sea área, así como el intervalo o ventana de tiempos de integración.
- Selección del umbral mínimo para considerar la existencia de señal, y proceder a integración.

5.3.3. Acondicionamiento

Se procede a acondicionar el equipo y su limpieza, mediante el análisis de un blanco con el diluyente utilizado para la realización de los MR.

5.3.4. Comprobación de la señal del blanco

Una vez realizado el blanco, debemos comprobar la ausencia de señal de analito en el cromatograma, o bien que esta sea inferior a un valor de referencia preestablecido.

De no ser así, deberemos repetir el análisis del blanco hasta la obtención de un valor de referencia adecuado.

Además se debe comprobar que la línea base del cromatograma sea adecuada.



5.3.5. Análisis de los MR

A continuación se analizan los MR, que tendrán una concentración próxima al rango que se desea medir. Como primera aproximación se puede estimar que el rango cubierto por un MR de concentración C_{MR} incluye las concentraciones comprendidas entre $0,8 \times C_{MR}$ y $1,2 \times C_{MR}$.

NOTA: Si se desea realizar una evaluación más exhaustiva del intervalo, será necesario realizar pruebas complementarias de linealidad.

Si fuera de interés, las muestras se analizarían durante el proceso de calibración, por ejemplo intercalándolas entre los MR según el orden creciente de concentración.

Para el análisis tanto de MR como de muestras, se realizarán tantas réplicas como esté estipulado en el laboratorio. En el caso de utilizar un único MR, siempre que sea posible se realizarán 10 repeticiones.

5.3.6. Comprobación de cromatogramas

Se realizará una comprobación confirmando:

- a) La aparición de los 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.



5.3.7. Desviaciones al tratamiento general

En el caso de que no sea posible la realización de 10 repeticiones de un MR, se seguirá la siguiente metodología:

- a) Realización de pruebas iniciales que determinen la desviación típica de repetibilidad de áreas (10 repeticiones) obtención del coeficiente de variación inicial

$$CV_{INICIAL}$$

Se realizará siguiendo el mismo esquema anterior pero en la validación.

- b) Realización de la calibración con solo tres réplicas, y obtención del coeficiente de variación actual

$$CV_{ACTUAL}$$

- c) Comprobación de la compatibilidad estadística de los coeficientes de variación obtenida en la prueba inicial y en la calibración actual.

$$CV_{ACTUAL} \leq 2 \times CV_{INICIAL} \quad (1)$$

En caso contrario se deberá proceder a una calibración con 10 repeticiones.

NOTA Para el uso diario del equipo no se requerirá la realización de la calibración sino la verificación con una única repetición y que la concentración obtenida cumpla una tolerancia establecida respecto al valor teórico.

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).
- Balanza y micropipetas utilizados para la elaboración de MR y patrones internos, en su caso.
- MR utilizados y lotes de MRC y patrones internos, en su caso.
- Respuestas obtenidas.
- Fecha de análisis.
- 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).

Si se realiza la integración manual de los cromatogramas, se deben registrar los parámetros de integración tales como:

- Sensibilidad de la pendiente, SS (Slope Sensibility).



- Anchura de pico, PW (Peak Width), establece la mínima anchura de pico a mitad de altura.
- Área mínima, AR (Area Reject), establece el mínimo área que el software va a tener en consideración.
- Altura mínima, HR (High Reject), establece la altura mínima que el software va a tener en consideración.
- Detección de colas y artefactos, SD (Shoulder Detection).

NOTA: La nomenclatura de estos parámetros puede variar dependiendo del software utilizado.

Es importante señalar que durante la integración manual lo ideal es obtener una serie de parámetros que se adecuen a todo el rango de señales obtenidas. Serán estos parámetros los que se utilicen para integrar la totalidad de los picos.

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

5.4.2. Tratamiento de los datos

El método de calibración mediante la utilización de patrón interno, es un caso de calibración indirecta donde se relaciona la respuesta del equipo frente a la concentración de un MR.

Para poder aplicar el método de calibración mediante el uso de un patrón interno, es necesario que:

- El pico del patrón interno este bien separado de los picos de los demás componentes de la muestra y MR ($R_s > 1,5$).
- El pico del patrón interno aparezca cerca del pico del analito a cuantificar.



Con los datos obtenidos se calculará el factor F_a que se utilizará posteriormente para la cuantificación de nuestro compuesto.

$$F_a = \frac{\overline{A}_{ip}}{A_{ap}} \cdot C_{ap} \quad (2)$$

Para realizar dicho cálculo y evitar los efectos de correlación producidos al obtener los valores de A_{ap} y A_{ip} en un mismo experimento, se sustituye el término $\frac{\overline{A}_{ip}}{A_{ap}}$ por \overline{R}_a , de donde:

$$F_a = \overline{R}_a \cdot C_{ap} \quad (3)$$

Por lo que se realizarán las siguientes operaciones:

1ª. Se calcula para cada analito en cada cromatograma la relación R_{a_i} :

$$R_{a_i} = \frac{A_{ip_i}}{A_{ap_i}} \quad (4)$$

2ª. Se calculan el promedio y la desviación típica para el conjunto de repeticiones de un analito:

$$\overline{R}_a = \frac{\sum_{j=1}^n R_{a_j}}{n} \quad (5)$$

$$S_R = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^n (R_{a_j} - \overline{R}_a)^2}{n-1}} \quad (6)$$

3ª. Se obtiene F_a como producto de \overline{R}_a y de la concentración C_{ap} , que a su vez viene dada por dilución del MRC:



$$C_{ap} = C_{MR} \cdot \frac{V_I}{V_F} \quad (7)$$

Posteriormente, se podrán obtener los resultados de las muestras a partir de sus áreas.

6. RESULTADOS

6.1. Cálculo de incertidumbres

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

- Variaciones en los resultados de las medidas experimentales de áreas.
- Incertidumbre en la concentración de MR y MRC.
- Variaciones en la concentración final de MR y patrones internos, en su caso, debido a equipos y operadores.

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

En el caso de calibración con patrón interno, el modelo matemático viene definido por una función del tipo $F_a = f(\bar{A}_{ip}, \bar{A}_{ap}, C_{MR}, V_I, V_F)$, donde F_a representa la magnitud de salida y \bar{A}_{ip} , \bar{A}_{ap} , C_{MR} , V_I y V_F las magnitudes de entrada.

A partir de la expresión (2) y teniendo en cuenta que en general un MR se prepara por dilución de un MRC, y que deseamos eliminar la correlación existente entre \bar{A}_{ip} y \bar{A}_{ap} :



$$F_a = \bar{R}_a \cdot C_{MR} \cdot \frac{V_I}{V_F} \quad (8)$$

6.1.1. Ley de la propagación de la incertidumbre

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

$$u_{F_a}^2 = u_{\bar{R}_a}^2 \cdot \left(\frac{C_{MR} \cdot V_I}{V_F} \right)^2 + u_{C_{MR}}^2 \cdot \left(\frac{\bar{R}_a \cdot V_I}{V_F} \right)^2 + u_{V_I}^2 \cdot \left(\frac{\bar{R}_a \cdot C_{MR}}{V_F} \right)^2 + u_{V_F}^2 \cdot \left(\frac{\bar{R}_a \cdot C_{MR} \cdot V_I}{V_F^2} \right)^2 \quad (9)$$

6.1.2. Cálculo de las componentes de la incertidumbre

a) *Incertidumbre del factor \bar{R}_a*

Se estima como el promedio de una serie de resultados (n).

- Por tanto su incertidumbre se calculará según una estimación tipo A en función de la desviación típica experimental de la media:

$$u_{\bar{R}_a}^2 = \frac{s_R^2}{n} \quad (10)$$

$$s_R^2 = \frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (R_{aj} - \bar{R}_a)^2 \quad (11)$$



- Si el número de repeticiones $n < 10$, pero se dispone de un valor de S_{RI} obtenido inicialmente para 10 medidas, se calculará:

$$u_{Rn}^2 = \frac{S_{RI}^2}{n} \quad (12)$$

- 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 no influye.

NOTA: R no es una característica previa que deba ser evaluada, ya que se trata de una calibración indirecta, por lo que no se ha tenido en cuenta otros términos como deriva, etc.

b) *Incertidumbre de la concentración del MR*

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

$$u_{C_{MR}} = \frac{U_{C_{MR}}}{k} \quad (13)$$

NOTA 1 En caso de que no se utilizase el valor certificado del MRC, habría que sumar a la incertidumbre expandida al final la corrección no realizada.

NOTA 2 En general, la deriva del MRC debería haber sido evaluada e incluida en la incertidumbre declarada (según la 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 $\sqrt{3}$.



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

c) *Componentes de la incertidumbre de volumen.*

Su cálculo dependerá de cómo 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 establecida para el material volumétrico (o cualquier otra establecida por el laboratorio) y que se usen habitualmente realizando una sola medida:

$$V_M = V_C + E_L \quad (14)$$

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

Se aplica tanto a V_I como a V_F .

De donde:

$$u_{V_M}^2 = u_{V_C}^2 + u_{E_L}^2 \quad (15)$$

Las componentes posibles a considerar para el cálculo de la incertidumbre de volumen:

- Incertidumbre del valor asignado por la clase

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:

$$u_{V_C} = \frac{\text{Tolerancia}}{\sqrt{3}} \quad (16)$$



- Incertidumbre de 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:

$$u_{E_L} = \frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}} \quad (17)$$

Donde E_{MAX} es el error máximo, respecto al valor nominal, obtenido en el laboratorio.

- No se tienen en cuenta otras componentes tales como:
 - * Deriva ya que en general para el material volumétrico usado en condiciones normales (sin líquidos agresivos, ni cambios de temperaturas) se considera despreciable frente a las debidas a la tolerancia.
 - * Variación de volumen por 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

La incertidumbre combinada obtenida en la ecuación (9) se multiplicaría por un factor $k = 2$, para obtener la incertidumbre expandida (se considera que la incertidumbre combinada corresponde a una distribución normal, por lo que este factor supone una probabilidad de cobertura del 95,45 %). En el Anexo I se presenta un ejemplo de cálculo de incertidumbres.



NOTA: Esto será cierto en general, ya que la mayor parte de las contribuciones a la incertidumbre combinada son de tipo B y se puede asumir que se cumplen las condiciones del Teorema Central del Límite, y que, por lo tanto, la incertidumbre combinada sigue una distribución normal, si no fuera así se deberían calcular los grados efectivos de libertad según lo indicado en [2] o realizar un cálculo alternativo de incertidumbres utilizando el método de Monte Carlo [5].

Magnitud	Estimación	Incertidumbre Típica	Coefficiente de Sensibilidad
\bar{R}	Promedio de n repeticiones $\bar{A}_{ip}/\bar{A}_{ap}$	$\frac{s_R}{\sqrt{n}}$ (1)	$C_{MR} \cdot \frac{V_I}{V_F}$
C_{MR}	Valor certificado	$\frac{U}{k}$	$\frac{\bar{R} \cdot V_I}{V_F}$
V_{IC}	Volumen nominal	$\frac{ToI}{\sqrt{3}}$	$\frac{\bar{R} \cdot C_{MR}}{V_F}$
E_{LI}	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{\bar{R} \cdot C_{MR}}{V_F}$
V_{FC}	Volumen nominal	$\frac{ToI}{\sqrt{3}}$	$\frac{\bar{R} \cdot C_{MR} \cdot V_I}{V_F^2}$
E_{LF}	0	$\frac{E_{MAX}}{\sqrt{3}}$	$\frac{\bar{R} \cdot C_{MR} \cdot V_I}{V_F^2}$

Tabla1 : Cálculo de la incertidumbre expandida

(1) s_R será la desviación típica de R si se han realizado 10 repeticiones o la obtenida inicialmente si solo se han realizado 3 repeticiones y ambas s son compatibles.

6.1.4. Cálculo de incertidumbres en la calibración mediante función de análisis

El problema del ajuste de puntos experimentales a relaciones funcionales consiste en encontrar el valor de ciertos parámetros libres (constantes del ajuste) de la función de ajuste, de manera que ésta



sea la que mejor represente los puntos medidos según algún criterio dado. El más utilizado es el de mínimos cuadrados, que parte de la hipótesis de que el error de la variable independiente es nulo.

En el caso de calibración de un cromatógrafo, el uso de mínimos cuadrados simplificados no es aconsejable, ya que existe incertidumbre tanto en las variables de entrada (señal de lectura del equipo de medida) como en la salida (concentración): Cuando esto sucede es conveniente emplear el llamado criterio de Deming, este criterio es el recomendado en la Norma UNE-EN ISO 6143 [6] donde se encontrará una explicación detallada del mismo, por lo que no se considera procedente repetirlo en este procedimiento. En los párrafos siguientes se incluye un resumen muy breve del procedimiento descrito en [5].

Para un analito especificado y un sistema de medida previsto, incluyendo las condiciones de funcionamiento adecuadas, la función de calibración $y = F(x)$, es una función matemática que expresa aproximadamente las respuestas medidas y_1, y_2, \dots, y_n , con relación al contenido conocido de los MR x_1, x_2, \dots, x_n . A la inversa, la función de análisis, $x = G(y)$, expresa de forma aproximada el contenido del analito x_1, x_2, \dots, x_n con relación a las correspondientes respuestas medidas y_1, y_2, \dots, y_n .

Para cada punto de calibración (x_i, y_i) , se determina un punto de ajuste (\hat{x}_i, \hat{y}_i) , tal que la suma correspondiente de las diferencias al cuadrado, ponderadas por la inversa de los cuadrados de las incertidumbres asociadas sea mínima, es decir, se minimiza la siguiente función:

$$S = \sum_{i=1}^n \left[\frac{|\hat{x}_i - x_i|^2}{u^2(x_i)} + \frac{|\hat{y}_i - y_i|^2}{u^2(y_i)} \right] \quad (18)$$



Las funciones de análisis recomendadas en [6] son lineales, polinomios de segundo o tercer orden, funciones potenciales y funciones exponenciales. Dependiendo de la función elegida variará el número de patrones necesarios para determinarla: tres para funciones lineales; cinco para potenciales, exponenciales y polinomios de segundo orden y siete para polinomios de tercer orden. En el Anexo II se presentan un ejemplo de ajuste lineal (recta de calibrado).

6.2. Interpretación de resultados

Si la calibración se realiza en el mismo momento que los análisis no se requiere ninguna interpretación adicional.

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

7. REFERENCIAS

- [1] Vocabulario Internacional de Metrología. Conceptos fundamentales y generales, y términos asociados (VIM). 3ª edición en español, 2008. CEM.
- [2] Guía para la Expresión de la Incertidumbre de Medida. Tercera edición en español, 2009. CEM.
- [3] D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman. Principios de análisis Instrumental. Quinta Edición. McGraw-Hill, 2000.
- [4] Guía EA-4/02. Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration. Diciembre 1999. EA.
- [5] Evaluación de datos de medición –Suplemento 1 de la “Guía para la expresión de la incertidumbre de medida”–



Propagación de distribuciones aplicando el método de Monte Carlo. 1ª edición en español, 2010. CEM.

- [6] UNE-EN ISO 6143: 2007 Análisis de Gas. Métodos de comparación para determinar y comprobar la composición de mezclas de gas para calibración.

8. ANEXOS

ANEXO I Ejemplo numérico de calibración con patrón interno.

ANEXO II Ejemplo numérico de calibración con recta de calibrado y determinación analítica de una muestra.

ANEXO I: EJEMPLO NUMÉRICO DE CALIBRACIÓN CON PATRÓN INTERNO

Se procederá a realizar la calibración de un cromatógrafo de gases mediante patrón interno. El fin de la calibración es obtener el valor del Factor F , a partir de la expresión $F_a = \bar{R}_a \cdot C_{ap}$,

$$\text{donde } \bar{R}_a = \frac{\bar{A}_{ip}}{A_{ap}}$$

Para el posterior cálculo de incertidumbre es necesario realizar una serie de repeticiones de las medidas de las áreas del patrón interno en el MR (A_{ip}) y de las áreas del analito en el MR (A_{ap}). Si la obtención del cromatograma tiene una larga duración y no es posible realizar las 10 repeticiones necesarias para obtener \bar{R}_a , se procederá según lo indicado en el apartado 5.3.7., es decir, se tienen en cuenta 10 repeticiones iniciales con los siguientes resultados:



Nº REPETICIÓN	A_{ip_j}	A_{ap_j}	R_{a_j}
1	325 000	375 236	0,866 121 59
2	322 348	382 326	0,843 123 41
3	323 600	378 248	0,855 523 36
4	326 432	379 226	0,860 784 86
5	320 415	377 943	0,747 786 57
6	328 126	374 527	0,876 107 73
7	329 132	372 326	0,883 988 76
8	325 436	374 228	0,869 619 59
9	322 895	380 636	0,848 303 89
10	324 376	375 425	0,864 023 44
			\bar{R}_a 0,861 538 32
			s_R 0,013 118 67
			$CV_{INICIAL}$ 1,522 703 41

Tabla 2: Resultados iniciales

$$\bar{R}_a = \frac{\sum_{j=1}^n R_{aj}}{n} \quad s_R = \sqrt{\frac{1}{n-1} \cdot \sum_{j=1}^n (R_{aj} - \bar{R}_a)^2}$$

$$CV_{INICIAL} = \frac{s_R}{\bar{R}_a} \cdot 100$$

Posteriormente, en el momento de los análisis, se realizan tres repeticiones, obteniéndose los siguientes datos:



Nº Repetición	A_{ip_i} (ACTUAL)	A_{ap} (ACTUAL)	R_{a_i} (ACTUAL)
1	315 428	364 226	0,866 022 74
2	317 226	360 182	0,880 738 07
3	314 629	366 438	0,858 614 55
			\bar{R}_a 0,868 458 46
			S_R 0,011 261 08
			CV_{ACTUAL} 1,296 675 09

Tabla 3: Datos y resultados al realizar las tres repeticiones

Se deberá comprobar que:

$$CV_{ACTUAL} \leq 2 \times CV_{INICIAL}$$

$$1,296 675 09 \leq 2 \times 1,522 703 41$$

Como se cumple, se sigue con los demás pasos de la calibración:

Para determinar la concentración del analito en el MR, se parte de un MRC al que se le realiza una dilución. La expresión y los datos a tener en cuenta son:

$$C_{ap} = C_{MR} \cdot \frac{V_I}{V_F}$$



MATERIAL DE REFERENCIA

- Concentración Inicial (MRC) 1 000 $\mu\text{mol/mol}$ (certificado)
- Incertidumbre 10 $\mu\text{mol/mol}$
- Factor de cobertura (k) 2
- Deriva: se considera incluida en la incertidumbre debido a la indicación del fabricante de que ha incluido factores de estabilidad.

DILUCIÓN

	Valor nominal (ml)	Clase (ml)	Enrase (ml)
V_I	1	0,005	0,01
V_F	100	0,08	0,5

Tabla 4: Datos

Con los datos recogidos hasta el momento se completará la Tabla 1, indicada en el apartado 6.1.3. del presente procedimiento. Sustituyendo los términos indicados por valores numéricos se obtendrá:

MAGNITUD	ESTIMACIÓN	INCERTIDUMBRE TÍPICA	COEFICIENTE DE SENSIBILIDAD	CONTRIBUCIÓN TÍPICA
\bar{R}	0,868 458 46	0,006 501 59	10	0,065 015 9
C_{MR}	1 000	5	0,008 684 58	0,043 422 92
V_{IC}	1	0,002 886 75	8,684 584 57	0,025 070 24
E_{LI}	0	0,005 773 5	8,684 584 57	0,050 140 47
V_{FC}	100	0,046 188 02	0,086 845 85	0,004 011 24
E_{LF}	0	0,288 675 13	0,086 845 85	0,025 070 24

Tabla 5: Resultados parciales



Teniendo en cuenta que el factor de cobertura del MRC es $k = 2$, y lo indicado en la nota del apartado 6.1.3., el factor de cobertura a utilizar para el cálculo de la incertidumbre expandida será 2.

Por tanto, se obtienen los siguientes resultados de la calibración del cromatógrafo de gases:

VALOR (F_A)	8,68 $\mu\text{mol/mol}$
INCERTIDUMBRE TÍPICA (u_{F_A})	0,10 $\mu\text{mol/mol}$
INCERTIDUMBRE EXPANDIDA (U_{F_A})	0,20 $\mu\text{mol/mol}$

Tabla 6: Resultados en ($\mu\text{mol/mol}$)

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 el 95 %. La incertidumbre típica de medida se ha determinado conforme a las guías [2] y [4].

ANEXO II: EJEMPLO NUMÉRICO DE CALIBRACIÓN CON RECTA DE CALIBRADO Y DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE UNA MUESTRA

En este ejemplo se describe la calibración de un cromatógrafo de gases por recta de calibrado mediante el programa informático descrito en [6], y la determinación analítica de una muestra gaseosa de monóxido de carbono (CO) de concentración nominal 5 000 $\mu\text{mol/mol}$ en gas complementario nitrógeno (N_2).

Los MR necesarios para la calibración consisten en tres mezclas gaseosas certificadas de CO en N_2 de composición e incertidumbre, para $k = 1$:



- MR 1: $(4\,014 \pm 0,26) \mu\text{mol/mol}$
- MR 2: $(5\,002 \pm 0,78) \mu\text{mol/mol}$
- MR 3: $(6\,058 \pm 0,36) \mu\text{mol/mol}$

Se analizan en la misma secuencia los tres MR y la muestra, según el orden creciente de concentración y con seis réplicas en cada caso. La secuencia es precedida por una inyección de blanco (N_2) y se concluye con otra inyección de blanco con finalidad de limpieza.

Se procede al tratamiento de los datos obtenidos. Para ello en primer lugar se integran manualmente las áreas de los cromatogramas y se calcula el promedio y en este caso, dos veces la desviación típica de las respuestas obtenidas para cada mezcla.

	MR 1	Muestra	MR 2	MR 3
Área 1	6 148,359 9	7 307,550 3	7 649,422 4	9 270,223 6
Área 2	6 145,585 0	7 306,697 2	7 644,031 3	9 270,520 5
Área 3	6 144,831 5	7 308,637 7	7 648,957 0	9 276,229 5
Área 4	6 147,733 9	7 304,364 8	7 645,865 2	9 271,098 6
Área 5	6 149,690 4	7 303,803 2	7 645,983 9	9 271,577 2
Área 6	6 147,926 8	7 303,269 0	7 649,902 8	9 275,358 4
\bar{A}	6 147,354 6	7 305,720 4	7 647,360 4	9 272, 358 4
$2 \times s$	3,626 1	4,412 4	4,773 1	5,215 0

Tabla 7: Tratamiento de datos y resultados cálculo del promedio

De acuerdo con [6], el número de MR utilizados permite la determinación de una función de análisis lineal, utilizando el método de regresión recomendado en la Norma y obteniéndose los siguientes parámetros con expresión de la incertidumbre, en su caso, para $k = 2$:

Ordenada en el origen: $(-7,415\,4 \pm 19,524\,0)$

Pendiente: $(0,654\,41 \pm 0,002\,64)$



Covarianza entre la ordenada en el origen y la pendiente: -0,012 68

Suma de los residuos de las desviaciones cuadráticas: 3,279 3, indicador de un ajuste aceptable. La compatibilidad de la línea de regresión con los datos de calibración es aceptable y por tanto el modelo de función lineal puede utilizarse para determinar el contenido de analito de la muestra:

CO (4 773,5 ± 6,7) $\mu\text{mol/mol}$ para $k = 2$.

