

Celia Puglisi*, cpuglisi@inti.gov.ar; **Fernando Kornblit⁺**, ferk@inti.gov.ar

* DPNM Departamento de Patrones Nacionales de Medida

+ CEFIS Centro de Investigación y Desarrollo en Física

INTI Instituto Nacional de Tecnología Industrial

CC 157 San Martín (1650) Buenos Aires - Argentina

1. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la incertidumbre de medición en la química analítica ha despertado en los últimos años un marcado interés y ha promovido muchas discusiones. Se acepta en general que, para evaluar si un resultado de análisis es apto para el propósito al cual se lo destinará, es indispensable realizar una estimación de la incertidumbre de medición y compararla con los requerimientos correspondientes. Son conocidos los documentos de referencias en cuanto a la metodología de evaluación de incertidumbres de medición en general (1), y en química analítica en particular (2).

Esta metodología requiere que se identifiquen todas las posibles fuentes de incertidumbre asociadas con el proceso de medición y que se estime su valor, ya sea por medios estadísticos (evaluación de tipo A), o por otros medios (evaluación de tipo B). Posteriormente se combinan estos componentes individuales para obtener las incertidumbres estándar y expandida para el proceso total.

El método usualmente utilizado por los químicos analíticos para calcular incertidumbres hace uso del concepto de "comportamiento global del método", utilizando información del tipo de la precisión o la recuperación, obtenida de la validación del método o por estudios colaborativos (3), (4). Esta metodología, lejos de contraponerse, puede incluirse dentro del alcance de (1) y (2), para modelos de medición adecuados. Sin embargo, el análisis de las distintas fuentes de incertidumbre permite evaluar las etapas del proceso de medición y, por

1.- INTRODUCTION

There is growing recognition of the importance of measurement uncertainty to assuring reliability of chemical analysis. It is generally accepted that in order to demonstrate fitness for purpose of analytical results it is necessary to evaluate the uncertainty of measurement and compare this value with the requirements. The reference documents providing methods for this evaluation are well known, both for general measurements (1) and for chemical measurements (2).

This methodology requires the identification of all possible sources of uncertainty associated to the measurement process and an estimation of their value, either by statistical methods (Type A) or by other means (Type B). Later on the individual components are combined to calculate the standard and expanded uncertainty for the whole process.

The most popular method generally used by analytical chemists to evaluate uncertainty is based on the concept of "global behavior of the method", using information such as precision or recovery, obtained during the method validation or from collaborative studies (3), (4). This method is included in the procedures described in (1) and (2), using the proper measurement model, but the analysis of the different sources of uncertainties allows to identify variables that could have a significant effect on the method performance. In this way, the critical steps can be identify, controlled and improved if possible.

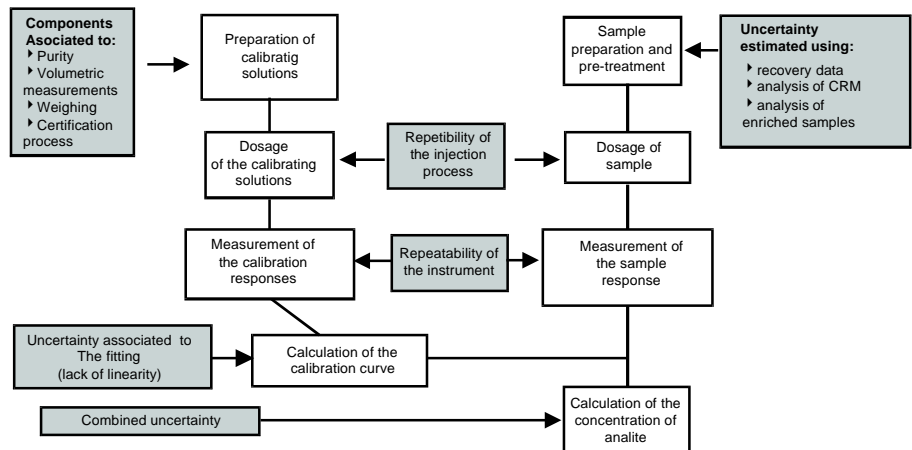
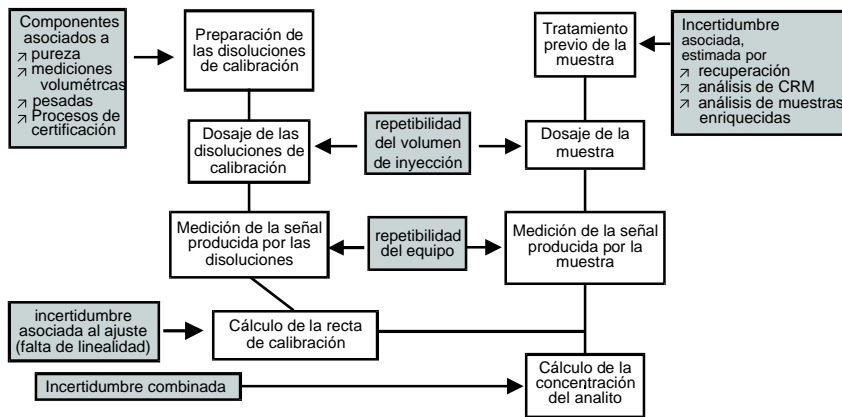
lo tanto, distinguir las que pueden ser críticas, para controlarlas y mejorarlas si fuera posible.

Un proceso de medición típico en la química analítica instrumental puede, por lo general dividirse en dos etapas, una en la cual la muestra se somete a un proceso previo que puede ser de concentración, de disgregación, calcinación, extracción, etc., tendiente a aislar el analito de interés y a separarlo lo mejor posible de la matriz, y otra etapa en la cual la muestra así procesada se somete a la medición en algún equipo previamente calibrado. La calibración involucra el establecimiento de una relación entre la respuesta del instrumento (por lo general lineal) y uno o más valores de referencia. El proceso de medición completo, con los componentes de incertidumbre relacionadas con cada etapa del mismo, puede resumirse en el siguiente esquema:

A typical measurement process in instrumental analytical chemistry can be conveniently described in terms of an isolation stage and a measurement stage. The isolation stage can involve processes like digestion, evaporation, solvent extraction, etc., to separate the analyte from the matrix. The next stage consists of a measurement in an instrument properly calibrated.

The calibration of the instrument requires to establish a relationship (usually linear) between the instrument response when a reference sample is measured.

This process has been summarized in the following diagram:



Los factores mostrados en cuadros grises representan componentes de incertidumbre que afectan a algunas de las variables de entrada que se describen en este trabajo.

A continuación se propone un procedimiento para la evaluación de la incertidumbre en la concentración del analito, combinando adecuadamente todas las contribuciones. En particular, no ha sido hasta ahora suficientemente discutida en la bibliografía la inclusión de las incertidumbres asociadas a las concentraciones de las disoluciones de calibración u otro material de referencia utilizado para calibración, en el modelo matemático utilizado para ajustar la curva de calibración.

Un ejemplo de este tratamiento puede verse en la Norma ISO 6143, recientemente modificada, para el caso de la medición de composición de mezclas de gases por cromatografía gaseosa (5).

En el presente trabajo no serán considerados los componentes asociados al tratamiento previo de la muestra, los cuales deben discutirse para cada caso en particular y validarse para cada método específico.

2. MODELO ASOCIADO A LA MEDICIÓN

Los datos experimentales obtenidos para la confección de la curva de calibración pueden expresarse como:

$$(x_1, y_1), (x_2, y_2), \dots, (x_n, y_n)$$

donde las x_n representan las concentraciones asignadas a los materiales de referencia y las y_n indican las correspondientes respuestas generadas por el equipo o sistema de medición. Considerando el caso de comportamiento lineal, la expresión matemática para la recta de calibración es:

$$y = a + bx$$

This paper proposes a procedure to evaluate the uncertainty in the concentration of the analyte, adequately combining all the contributions.

Up to now, the inclusion of the uncertainties associated to the calibrating solutions or to other reference materials used for calibration of the measuring instrument in the mathematical model used to fit the calibration curve has not been conveniently discussed in the literature.

An example of this calculation can be found in the ISO Standard 6143, recently modified, dealing with the analysis of gas mixtures by gas chromatography (5).

The uncertainty components associated to the isolation stage will not be discussed in this case, as they should be analyzed in each particular case and validated for each particular method.

2.- MATHEMATICAL MODEL ASSOCIATED TO THE MEASUREMENT

The experimental data obtained for the calculation of the calibration curve are:

where x_i designate the concentration assigned to the calibration standards and y_i the corresponding measured responses.

Assuming a linear behavior:

y se obtiene según la estimación usual de cuadrados mínimos, de acuerdo con las siguientes fórmulas:

$$b = \frac{\overline{x \cdot y} - \bar{x} \cdot \bar{y}}{S_x^2}; \quad a = \bar{y} - b\bar{x}; \quad (1)$$

donde el símbolo “ $\bar{}$ ” significa promedio, (por ejemplo, $\overline{x \cdot y} = \sum x_i y_i / n$), y $S_x^2 = \overline{x^2} - (\bar{x})^2$.

Se denominará $e_i = y_i - a - bx_i$ al i-ésimo residuo respecto de la recta. Esto es, a la diferencia, en dirección del eje y , entre el punto (x_i, y_i) y la recta de calibración.

La desviación estándar residual dada por la fórmula siguiente:

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum e_i^2}{n-2}} \quad (2)$$

indica si es correcto el modelo lineal para ajustar a los datos, y a su vez cuantifica (con $n-2$ grados de libertad) la incertidumbre estándar asociada a tal ajuste.

Luego de obtener la recta de calibración, para determinar la concentración de la muestra analizada se mide la misma en forma repetida, por ejemplo m veces ($m \geq 1$), obteniendo respuestas y_{01}, \dots, y_{0m} .

Finalmente, la concentración incógnita (“resultado de la medición”) es calculada como

$$x_0 = \frac{\bar{y}_0 - a}{b} \quad (3)$$

the least square estimates are calculated:

where the symbol “ $\bar{}$ ” means average, (E.g. $\overline{x \cdot y} = \sum x_i y_i / n$) and $S_x^2 = \overline{x^2} - (\bar{x})^2$.

To check whether or not the fitting is correct, the residual at x_i can be calculated: $e_i = y_i - a - bx_i$. This is the amount by which the actual observed value differs from the fitted value. This is the difference, in the direction of the y axis, between the value (x_i, y_i) and the calibration line (the fitted value). The residual standard deviation is given by the following formula:

This value indicates if the postulated linear model to fit the data is correct and at the same time this quantity can be use to evaluate (with $n-2$ degrees of freedom) the standard uncertainty associated to such fitting.

After the calibration curve have been obtained with the above mentioned procedure, the concentration of an unknown sample can be measured getting the responses of the measuring instrument.

If the number of measured replicates is m ($m \geq 1$), and the obtained responses are y_{01}, \dots, y_{0m} , the concentration of the sample (result of the measurement) can be calculated as

Como a y b se obtienen de la ec.(1), debe entenderse que los datos de entrada para el cálculo de x_0 son $x_1, \dots, x_n, y_1, \dots, y_n, y_{01}, \dots, y_{0m}$.

Por lo tanto, para evaluar la incertidumbre de x_0 , deberán tenerse en cuenta, por un lado, las incertidumbres (estándar) individuales asociadas a cada uno de los componentes de entrada: $u(x_1), \dots, u(x_n), u(y_1), \dots, u(y_n), u(y_{01}), \dots, u(y_{0m})$, así como también las correlaciones entre ellos. Por otro lado deben considerarse los coeficientes de sensibilidad (1) asociados a cada una de estas contribuciones, a fin de combinarlas. La expresión matemática de estos coeficientes de sensibilidad se encuentra en el ítem 3.

Se suponen de aquí en adelante las siguientes hipótesis para el modelo:

(a) Las componentes de incertidumbre $u(y_1), \dots, u(y_n)$, asociadas a los valores de y obtenidos como respuesta del instrumento para la confección de la recta de calibración son consideradas todas del mismo orden y se designan como u_y . En caso de que esta suposición no se cumpla, la recta de calibración debería obtenerse por el método de cuadrados mínimos ponderados.

(b) Las componentes de incertidumbre $u(y_{01}), \dots, u(y_{0m})$, asociados a las respuestas del equipo de medición al medir la muestra incógnita, son consideradas todas del mismo orden y se designan como u_{0y} .

(c) No hay correlaciones entre los componentes de incertidumbres asociadas a las respuestas y e y_0 .

(d) No hay correlaciones entre las incertidumbres asociadas a las respuestas y e y_0 y a las variables x .

Se supone que los componentes de incertidumbre asociados a los diferentes valores de x no serán siempre del mismo orden.

Existen situaciones en las que las incertidumbres asociadas a los materiales de referencia utilizados para la calibración $u(x_i)$ son función de las concentraciones x_i . Asimismo, pueden existir correlaciones entre las incertidumbres de las disoluciones de calibración, debido, por ejemplo,

The parameters a y b can be calculated using eq.(1), and the data used to calculate x_0 are $x_1, \dots, x_n, y_1, \dots, y_n, y_{01}, \dots, y_{0m}$.

To evaluate the uncertainty associated to x_0 , two aspects should be taken into consideration:

-The individual standard uncertainties associated to each set of experimental values $u(x_1), \dots, u(x_n), u(y_1), \dots, u(y_n), u(y_{01}), \dots, u(y_{0m})$,

- The correlation between them

In order to combine these individual contributions, the sensitivity coefficients must be considered and calculated (see item 3).

From here on, the following assumptions will be made:

(a) The components of uncertainty $u(y_1), \dots, u(y_n)$, associated to the y values obtained for the calibration line are considered of the same order (a value u_y , common to all of them). In case this assumption is not valid, the calibration line should be calculated using another model, for instance a weighted least square fitting.

(b) The components of uncertainty $u(y_{01}), \dots, u(y_{0m})$, associated to the responses obtained during the measurement of the sample are also considered of the same order (a value u_{0y} , common to all of them).

(c) There is no correlation among the uncertainty components assigned to the responses values (y and y_0 values).

(d) There is no correlation among the components of uncertainty associated with y, y_0 and x .

The components of the uncertainty associated with the quantities x_i are not necessarily of the same order.

In some cases the uncertainty values $u(x_i)$ associated to the concentration x_i of the calibration solutions can be proportional to the concentration, that is to say, the value of the

al uso de un mismo material de referencia que se diluye sucesivamente o por el uso de un mismo material volumétrico para preparar diferentes disoluciones de referencia. Llamaremos r_{ij} al coeficiente de correlación entre x_i y x_j .

Aceptando las hipótesis anteriores, la expresión general para la incertidumbre de x_o puede escribirse así:

uncertainty associated with very diluted solutions could be bigger than the corresponding value of the concentrated solution. In some other cases a correlation could exist between them and a correlation coefficient, r_{ij} , should be used to indicate the degree of correlation between x_i and x_j .

Taking into account the above considerations, the uncertainty in the measured concentration x_o can be calculated using the following equation:

$$u^2(x_o) = \sum_{j=1}^m \left(\frac{\partial x_o}{\partial y_{oj}} \right)^2 u_{y_{oj}}^2 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial x_o}{\partial y_i} \right)^2 u_{y_i}^2 + \sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial x_o}{\partial x_i} \right)^2 u^2(x_i) + 2 \sum_{i < j} \text{corr}(x_i, x_j) \left(\frac{\partial^2 x_o}{\partial x_i \partial x_j} \right) u(x_i) u(x_j) \quad (4)$$

3. COEFICIENTES DE SENSIBILIDAD

Se calculan, de acuerdo a la ref. (1), como las derivadas parciales del resultado de medición, x_o respecto de cada uno de los componentes de entrada, obteniéndose:

3.- SENSITIVITY COEFFICIENTS

According to (1) they can be expressed as:

$$\frac{\partial b}{\partial y_i} = \frac{x_i - \bar{x}}{n S_x^2} \quad \frac{\partial a}{\partial y_i} = \frac{1}{n} \left[1 - \frac{\bar{x} (x_i - \bar{x})}{S_x^2} \right] \quad (5)$$

Y por lo tanto, de la ec. (2) se obtiene el coeficiente relacionado con las variables y_i

Considering equation (3) the sensitivity coefficients related to the variables y_i can be expressed as

$$\frac{\partial x_o}{\partial y_i} = \frac{1}{nb} \left[\frac{(x_i - \bar{x})(\bar{x} - x_o)}{S_x^2} - 1 \right] \quad (6)$$

Sumando los cuadrados de todas estas derivadas parciales, y eliminando términos de suma nula, se obtiene la siguiente expresión, que será reemplazada en la ec. (4):

Adding the square of all the partial derivatives and eliminating the terms with null value, the following expression is obtained, which will be substituted into equation (4) yielding the following formula

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial x_o}{\partial y_i} \right)^2 = \frac{1}{nb^2} \left[1 + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{S_x^2} \right] \quad (7)$$

A continuación se calculan los coeficientes asociados a los componentes de entrada x_i en forma similar (fórmula aproximada):

In a similar way, the coefficients associated with the other components of the entry data x_i can be calculated using the simplified formula:

$$\frac{\partial b}{\partial x_i} = -\frac{b(x_i - \bar{x})}{n S_x^2} \quad \frac{\partial a}{\partial x_i} = -\frac{b}{n} \left[1 + \frac{\bar{x}(x_i - \bar{x})}{S_x^2} \right] \quad (8)$$

Y por lo tanto:

And then

$$\frac{\partial x_o}{\partial x_i} = \frac{1}{n} \left[1 + \frac{(x_i - \bar{x})(\bar{x} - x_o)}{S_x^2} \right] \quad (9)$$

Además, similarmente a la ec. (7):

Using an expression similar to equation (7)

$$\sum_{i=1}^n \left(\frac{\partial x_o}{\partial x_i} \right)^2 = \frac{1}{n} \left[1 + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{S_x^2} \right] \quad (10)$$

Por último, los coeficientes asociados a y_{i0} serán:

And the coefficients associated with y_{i0} will be

$$\frac{\partial x_o}{\partial y_{oi}} = \frac{1}{mb} \quad (11)$$

De donde se deduce una fórmula similar a las ec. (7) y (10), la cual será reemplazada en la ec. (4)

An expression similar to equations (7) and (10) can now be written and substitute into equation (4)

$$\sum_{j=1}^m \left(\frac{\partial x_o}{\partial y_{oj}} \right)^2 = \frac{1}{mb^2} \quad (12)$$

Reemplazando los coeficientes de sensibilidad encontrados de acuerdo a las ec. (7), (9) y (12) en la ecuación (4), se obtiene:

Substituting the sensitivity coefficients calculated in equations (7), (9) and (12) into equation (4) the following expression is obtained:

$$\begin{aligned} u^2(x_o) = & \frac{1}{mb^2} u_{y_o}^2 + \frac{1}{nb^2} \left[1 + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{S_x^2} \right] u_y^2 + \\ & + \frac{1}{n^2} \sum_{i=1}^n \left[1 - \frac{(x_i - \bar{x})(\bar{x} - x_o)}{S_x^2} \right]^2 u^2(x_i) + \\ & + 2 \sum_{i < j} r_{ij} \left[1 - \frac{(x_i - \bar{x})(\bar{x} - x_o)}{S_x^2} \right] \left[1 - \frac{(x_j - \bar{x})(\bar{x} - x_o)}{S_x^2} \right] u(x_i) u(x_j) \end{aligned} \quad (13)$$

4. ANÁLISIS DE CASOS

A partir de aquí, a los efectos simplificar el cálculo de $u(x_o)$, pueden distinguirse diferentes casos, de acuerdo a consideraciones sobre las componentes de incertidumbre asociados a los valores de la variable x .

Analizando resultados experimentales, pueden considerarse en al menos 4 casos diferentes.

4.1. Caso I

Las incertidumbres asociadas a la concentración de los materiales de referencia utilizados para la calibración $u(x_i)$ son despreciables comparados con u_y y u_{y_o} , y estos últimos son considerados del mismo orden.

4. CASE ANALYSIS

Analyzing experimental results obtained performing chemical measurements in different instruments that require a calibration, different cases can be considered, taking into consideration the uncertainty values associated with the calibration standards (x values)

4.1. Case I

The uncertainties associated to the concentration of the calibration standards, $u(x_i)$ are negligible compared to u_y and u_{y_o} . The uncertainties in the x values are considered of the same order and are estimated statistically, by means of the residual standard deviation (equation 2) of the calibration line. Substituting in equation (13) and eliminating non significant terms, the following expression is obtained

$$u^2(x_o) = \frac{s_e^2}{b^2} \left[\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right]$$

De aquí se deduce el intervalo de incertidumbre expandida $(1-\alpha)$ para x_o , llamado, en los textos estadísticos “intervalo de predicción” (ver ref.3 y 4 por ejemplo)

The interval of expanded uncertainty $(1-\alpha)$ for x_o also known as prediction interval can be deduce from this expression

$$x_o = \frac{\bar{y}_o - a}{b} \pm t_{n-2, \alpha/2} \cdot \frac{s_e}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2}} \quad (14)$$

Este procedimiento es el único considerado habitualmente en la bibliografía estadística y aplicado al cálculo de incertidumbres en este tipo de mediciones (ref.8 y 9) Sin embargo, debemos advertir que el alcance de su aplicación está limitado al cumplimiento de las hipótesis mencionadas al comienzo de este punto, las cuales no siempre pueden considerarse válidas.

This procedure is usually found in most of the publications dealing with statistics applied to uncertainty calculations in this type of measurements (7,8).

It is important to point out that this model can only be applied if the assumptions mentioned above are valid, which not always holds.

4.2. Caso II

La situación es similar a la del caso 1 pero ahora la componente u_{y0} asociada a la repetibilidad del sistema al momento de medir la muestra incógnita, no puede considerarse del mismo orden que la componente asociada a la recta de calibración, u_y . Por lo tanto, el primero debe evaluarse independientemente, por ejemplo a partir de la desviación estándar s_0 de las respuestas repetidas generadas por la muestra, siempre que el número de repeticiones m sea suficiente. La incertidumbre estándar de x_0 se calcula entonces como:

$$u^2(x_0) = \frac{1}{b^2} \left[\frac{s_0^2}{m} + \frac{s_e^2}{n} + \frac{s_e^2 (x_0 - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right]$$

y los grados de libertad efectivos $v\text{-eff}$ para la obtención del intervalo de predicción se calculan a partir de la fórmula de Welch-Satterthwaite (G.2.b en ref. 1), teniendo en cuenta que $v(s_e) = n-2$, y $v(s_0) = m-1$. El intervalo de predicción entonces resulta:

$$x_0 = \frac{\bar{y}_0 - a}{b} \pm t_{v\text{-eff}, \alpha/2} \cdot \frac{1}{b} \sqrt{\frac{s_0^2}{m} + \frac{s_e^2}{n} + \frac{s_e^2 (x_0 - \bar{x})^2}{nS_x^2}} \quad (15)$$

Existen situaciones reales en las cuales el cumplimiento de la hipótesis $u_y = u_{y0}$ resulta muy poco verosímil. De todos modos, para verificarlo en una situación de medición particular, puede realizarse un test F de igualdad de varianzas, basado en el cociente:

$$F = \frac{s_e^2}{s_0^2}$$

con $n-2$ grados de libertad en el numerador, y $m-1$ grados de libertad en el denominador. En los casos en que la igualdad de varianzas sea rechazada, debiera utilizarse la expresión (15) en lugar de la (14).

4.2. Case II

The situation is similar to case 1 but now the component u_{y0} associated to the repeatability of the measurement system when the unknown sample is measured is significantly different than the one associated to the measurement of the variables involved in the calculation of the calibration line, u_y . For this reason, the first one must be evaluated independently, for instance from the standard deviation s_0 of the responses generated by the unknown sample, provided the number of replicates m is large enough.

The standard uncertainty associated to x_0 is then calculated as:

and the effective degrees of freedom $v\text{-eff}$ necessary to obtain the prediction interval can be calculated using the Welch-Satterthwaite formula (G.2.b en ref. [1]), taking into consideration that $v(s_e) = n-2$, and $v(s_0) = m-1$. The interval of prediction can be written as:

There are many experimental situations in which the assumption of $u_y = u_{y0}$ does not apply. Anyway, to check this assumption, a test of equality of variances F can be applied, based on the ratio

with $n-2$ degrees of freedom for the numerator and $m-1$ degrees of freedom for the denominator. For those cases in which the variances are not equal, eq. (15) should be used instead of eq. (14).

4.3. Caso III

A diferencia de los casos anteriores, las incertidumbres asociados a las concentraciones de los materiales de referencia, $u(x_i)$, son considerados significativos. Además, se suponen no correlacionados entre sí y todos del mismo orden. Es posible entonces asignarles un valor global $u(x_i) = u_x$, que puede ser obtenido del certificado del material de referencia o bien teniendo en cuenta el proceso de preparación, como en el caso de prepararse las disoluciones de calibración por dilución de algún material de referencia (Evaluación de Tipo B).

Para los componentes asociados a y y a y_0 , valen las mismas consideraciones que en los casos anteriores. En función de estas hipótesis, y a partir de la ec. (13), se obtiene:

$$u^2(x_o) = \frac{u_y^2}{b^2} \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right] + u_x^2 \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right] + \frac{u_{oy}^2}{mb^2} =$$

$$= \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right] (u_y^2 + b^2 u_x^2) + \frac{u_{oy}^2}{mb^2} \quad (16)$$

No hay una forma única para evaluar el componente de incertidumbre $u_y^2 + b^2 u_x^2$.

A continuación se mostrará por qué es razonable estimarlo estadísticamente, a partir de la desviación estándar residual s_e .

Puede interpretarse el residuo e_i como la suma de dos componentes independientes, o bien dos “causas por las cuales el punto experimental (x_i, y_i) no se encuentra exactamente sobre la recta de regresión $y = a + bx$ ”.

a) Uno de estas componentes es el desvío e_{i-x} causado por la incertidumbre asociada a los materiales referencia x . Este desvío afecta al punto (x_i, y_i) en dirección “horizontal” y es cuantificado por su incertidumbre estándar u_x . Dado que b es la pendiente de la recta de regresión, be_{i-x} representa el desvío equivalente en dirección “vertical”. [Fig. 1].

4.3. Case III

In this case the uncertainty of the values assigned to the reference materials that have been used for calibration, $u(x_i)$, are not negligible. Furthermore, they are not correlated and all of them are assumed to be of the same magnitude. A global value $u(x_i) = u_x$, can then be assigned to all of them, obtained for instance from the certified value. In case calibration solutions have been used, prepared by dilution in the same laboratory, the uncertainty can be calculated following the steps of the preparation procedure.

Concerning the components associated to y and y_0 , the considerations mentioned in the previous cases hold. Taking into account the previous considerations, from eq. (13) can be obtained:

There is not a unique procedure to evaluate the component of uncertainty $u_y^2 + b^2 u_x^2$.

It will be shown that it is reasonable to estimate this component using the residual standard deviation s_e .

The residual e_i can be considered as the addition of two independent components, or in another words, two different reasons why the experimental point (x_i, y_i) is not exactly located on the line defined by the equation $y = a + bx$.

a) One of such components is the deviation e_{i-x} arising from the uncertainty in the reference materials x . This deviation affects the position of the point (x_i, y_i) in the horizontal direction in a certain amount related to the standard uncertainty u_x . Since b is the slope of the fitted line, be_{i-x} represents the equivalent deviation in the vertical direction. [Fig.1].

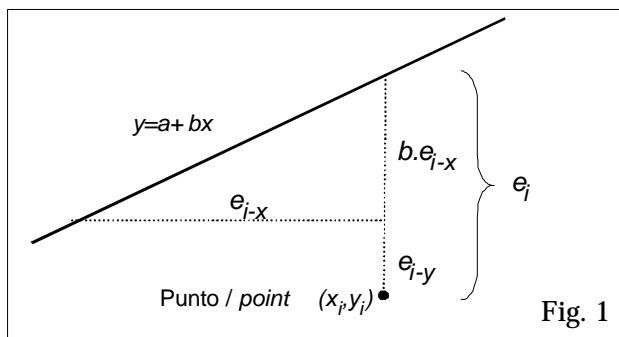


Fig. 1

b) Por otro lado, el desvío e_{i-y} asociado a la incertidumbre que afecta a las respuestas del instrumento (punto experimental y_i) en dirección "vertical", es cuantificado por la incertidumbre estándar u_y .

Entonces, cada uno de los residuos puede escribirse $e_i = be_{i-x} + e_{i-y}$ y, como ambas componentes son no correlacionadas, $u_y^2 + b^2u_x^2$ es la varianza de e_i , la cual puede ser estimada por la varianza muestral S_e^2 . Por lo tanto, en esta situación, aún pueden utilizarse las ecuaciones (14) o (15) para estimar el intervalo de predicción.

Sin embargo, cuando el número de puntos de la recta de calibración no es grande, la estimación estadística es poco confiable. Son pocas las aplicaciones de laboratorio donde n supere a 5, y por lo tanto los grados de libertad de tal estimación superen a 3. Como método alternativo para calcular el componente $u_y^2 + b^2u_x^2$ a partir de la ec. (16), es posible evaluar u_x , por el proceso de certificación como se mencionó mas arriba (Tipo B) y combinar este valor con una estimación para u_y , basada en información previa sobre el equipo o sistema de medición.

Si se comprobó que la linealidad del sistema es buena, el componente u_y sólo puede ser asociado a la falta de repetibilidad. En tal caso, este componente podría ser estimado estadísticamente a partir de mediciones repetidas de la respuesta del instrumento.

Por último la estimación así obtenida de $u_y^2 + b^2u_x^2$ Puede ser comparada con S_e^2 , a modo de verificación.

b) On the other side, the deviation e_{i-y} arising from the uncertainty of the response y_i in the vertical direction is the standard uncertainty u_y .

Each one of the residues can then be written as $e_i = be_{i-x} + e_{i-y}$ and, considering that both contributions are not correlated, $u_y^2 + b^2u_x^2$ is the variance of e_i , and can be estimated as the sample variance S_e^2 . In this case, eq.(14) or (15) can still be used to estimate the prediction interval.

If the number of calibration points to be used to fit the linear function are not enough, the statistical evaluation is not reliable. As a general rule, the laboratories are using only a few points to fit the calibration line, usually between 3 to 5. As an alternative method for calculating $u_y^2 + b^2u_x^2$ from eq. (16), u_x can be obtained from the reference material certificate and this value can be combined to obtain u_y , based on previous information about the measuring system.

If the linear behavior of the instrument is established in the working range, the uncertainty u_y is only depending on the repeatability and it can be evaluated from replicate measurements of the same reference material

As a verification, the estimation of $u_y^2 + b^2u_x^2$ thus obtained can be compared to S_e^2 .

4.4. Caso IV

Similar al anterior, pero donde cada material de referencia es medido más de una vez. Si se utilizan I materiales de referencia para determinar la recta de calibración, midiendo cada una de ellas J veces, se tienen en total $n = I \cdot J$ puntos experimentales, de acuerdo al siguiente diseño, similar al descrito en el punto 1.5. de la ref. 3:

$$\begin{array}{cccc} (x_1, y_{11}) & (x_1, y_{12}) & \dots & (x_1, y_{1J}) \\ (x_2, y_{21}) & (x_2, y_{22}) & \dots & (x_2, y_{2J}) \\ \dots & \dots & \dots & \dots \\ (x_I, y_{I1}) & (x_I, y_{I2}) & \dots & (x_I, y_{IJ}) \end{array} \quad (17)$$

No se debería aplicar la solución anterior a esta situación, puesto que las incertidumbres asociadas a los valores de \mathbf{x} están altamente correlacionadas (coeficientes de correlación cercanos a 1 para datos de la misma fila de la expresión 17).

Para evaluar, en una situación particular, si existen diferencias significativas entre series de mediciones de muestras diferentes, es posible realizar un Análisis de Varianza (ANOVA) con los $I \cdot J$ residuos de la recta de calibración. En el ejemplo H5 de la referencia 1, para una situación de medición totalmente diferente a la tratada aquí, se propone la realización de un ANOVA, previo al cálculo de incertidumbre, como herramienta para seleccionar el procedimiento de cálculo adecuado.

Si el Análisis de la Varianza no revela diferencias significativas entre residuos correspondientes a grupos de respuestas diferentes, se puede dar por válida la aplicación de alguno de los casos anteriores. En cambio, si se revelan diferencias significativas, la aplicación de cualquiera de ellos subestimaría la incertidumbre del resultado.

4.4. Case IV

This case is similar to the previous one but now each reference material is measured more than once. Considering that I reference materials have been used to generate the calibration line and each one has been measured J times, a total of $n = I \cdot J$ experimental values are obtained, according to the following pattern, similar to the one described in the paragraph 1.5. of ref. 3:

The previous treatment does not apply here because in this case the uncertainties associated to the \mathbf{x} values are correlated with a correlation coefficient close to 1 for all the data of the same row.

To evaluate if the differences between series of measurements of different samples are significant, an ANOVA (Analysis of Variance) test can be applied to the $I \cdot J$ residues of the calibration line.

An ANOVA test before the uncertainty analysis is proposed in example H5 of reference 1. This proposal is applied to a totally different measurement situation but it is suggested as a tool to select an appropriate computing procedure.

If this test does not show significant differences among the residues arising from the measurement of different reference materials, some of the previous treatments can be applied. If instead significant differences are found, the consequence could be an underestimation of the uncertainty in the result.

The following figures are showing the plot of residues obtained during the determination of Cu by atomic absorption spectrometry. Both measurements have been performed using the

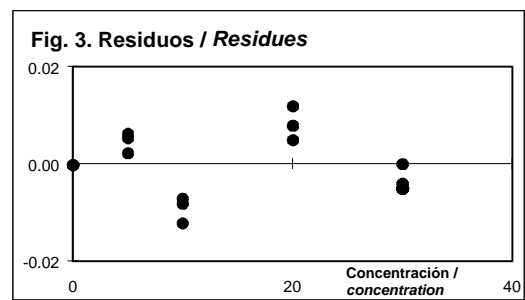
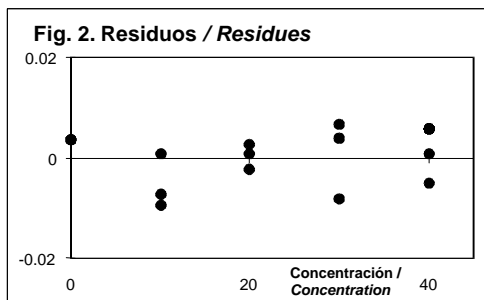
Las dos figuras siguientes muestran gráficos de residuos corresponden a determinaciones típicas de trazas de Cu por espectrometría de absorción atómica con llama. Ambos análisis fueron realizados con el mismo procedimiento y equipo, y en el mismo laboratorio. En el ensayo correspondiente a la figura 2, se prepararon 15 disoluciones, de 5 concentraciones diferentes (triplicados preparados para cada una de las concentraciones). En el ejemplo de la figura 3, en cambio, se prepararon sólo 5 disoluciones y se midió cada una de ellas por triplicado.

En el último caso, el ANOVA arrojó diferencias significativas. Sin embargo, puede ocurrir también, en un ensayo en particular, que el segundo esquema de medición genere residuos que no revelen diferencias significativas entre concentraciones diferentes. Tales situaciones pueden tratarse por alguno de los procedimientos anteriores

same instrument , the same method and in the same laboratory.

The residues of fig. 2 have been obtained when the calibration curve was calculated using 15 different calibration solutions of 5 different concentrations. (3 for each concentration). In the example of fig. 3, 5 solutions have been prepared and each one of them measured three times.

In this last example, the ANOVA test shows significant differences.



Cuando existan diferencias significativas, en cambio, deberán agregarse a la ecuación 16 los términos referentes a las correlaciones cruzadas entre componentes asociadas a valores de x de la misma fila de la matriz de la expresión 17. Si se asigna un valor 1 a estos coeficientes de correlación (peor caso posible), y se efectúan los cálculos adecuados, se obtiene finalmente la fórmula:

When such result is obtained, the cross correlation terms should be added to eq. 16, taking account of the correlation associated to x values belonging to the same row of matrix 17. Assigning a value of 1 (worst situation) to the correlation coefficients and performing the required calculations, the following formula is obtained:

$$\begin{aligned}
 u^2(x_o) &= \frac{u_y^2}{b^2} \left[\frac{1}{n} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{nS_x^2} \right] + u_x^2 \left[\frac{1}{I} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{IS_x^2} \right] + \frac{u_{oy}^2}{mb^2} = \\
 &= \frac{1}{b^2} \left[\frac{1}{I} + \frac{(x_o - \bar{x})^2}{IS_x^2} \right] \left(\frac{u_y^2}{J} + b^2 u_x^2 \right) + \frac{u_{oy}^2}{mb^2}
 \end{aligned}
 \tag{18}$$

Nótese que u_y^2/J no es otra cosa que la varianza de cada uno de los I promedios $\bar{y}_i = \sum_j y_{ij} / J$. Por lo tanto, la última fórmula es equivalente a la (16) si se trabaja directamente con las respuestas promedios de cada grupo. Esto es, con los siguientes datos de entrada:

$$(x_1, \bar{y}_1), (x_2, \bar{y}_2), \dots, (x_I, \bar{y}_I)$$

En forma similar al caso anterior, el componente $u_y^2/J + b^2 u_x^2$ de (18) puede ser estimado estadísticamente por

$$s_{\bar{e}}^2 = \frac{\sum \bar{e}_i^2}{I}$$

Donde $\bar{e}_i = \bar{y}_i - a - bx_i$.

Este último procedimiento de cálculo, fue utilizado en la ref.5.

5. CONCLUSIONES

Es evidente que los casos precedentes no abarcan todas las situaciones posibles de medición que requieren la confección de rectas de calibración en laboratorios analíticos.

Un caso no tratado aquí es aquél en que las incertidumbres en las x no pueden ser consideradas despreciables y no son todas del mismo orden, sino, por ejemplo, funciones de la concentración de la solución de referencia.

En otras situaciones, la hipótesis de incertidumbre estándar constante, u_y , para todos los puntos de la recta de calibración, no es razonable. En otros casos es necesario recurrir a modelos de regresión no lineales. Cada uno de estos casos puede ser analizado en forma similar a la expuesta y la ecuación (13) puede servir de punto de partida.

Por lo antedicho, este enfoque es el inicio de una serie de trabajos de aplicación a diferentes

It is important to notice that the value u_y^2/J is the variance of each of the I average $\bar{y}_i = \sum_j y_{ij} / J$. Taking this in consideration, this formula is equivalent to eq. (16) when the average of the responses are used. This is to say that the entry data are:

The expression $u_y^2/J + b^2 u_x^2$ from eq. (18) can be estimated statistically by

Where $\bar{e}_i = \bar{y}_i - a - bx_i$.

This procedure has been described in ref. 5.

5. CONCLUSIONS

It is evident that the above mentioned cases are not including all the possible situations that could appear in the chemical laboratory when a calibration curve is calculated from experimental data collected in different instruments and using different reference materials

As an example that has not been discussed here, we can mention a measurement in which the uncertainty of the reference materials are not negligible and not all of them are comparable (same order of magnitude)

There are also experimental situations in which the standard uncertainty, u_y for all the calibration points cannot be considered constant or other situations in which non linear regression models should be used.

Each one of this cases should be analyzed individually and the eq. (13) can be used as the basic expression.

problemas. Creemos que el analista debe, en la validación de un método de ensayo, o aún en el análisis cotidiano, confirmar qué hipótesis de las mencionadas pueden razonablemente cumplirse y, en función de ellas, elegir el procedimiento de cálculo adecuado.

6. REFERENCIAS

- 1.- Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML) 2da. Ed., 1993. ISBN 92-67-101889.
2. Quantifying uncertainty in analytical measurement, EURACHEM/CITAC Guide, 2nd. edition.
3. Uncertainty of measurement: Implications of its use in Analytical Science, Analytical Methods Committee, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, Piccadilly, London. Analyst, Sept. 1995, vol 120, pg 2303
4. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation, S.L.R. Ellison, V.J. Barwick, Analyst, June 1988, Vol. 123 pg. 1387.
5. Gas Analysis - Determination of the composition of calibration gas mixtures. Norma ISO 6143.
6. Drapper, N.R. Smith, H., Applied Regression Analysis, J. Wiley & Sons 1st. ed., 1966
7. Anderson. Practical Statistics for Analytical Chemistry, Van Nostrand Reinhold Co., N.Y.
8. Synek, V, Subrt, P. Marecek, J. Uncertainty of mercury determinations in biological materials using an atomic absorption spectrometer AMA 254. AccredQualAssur (2000) 5: 58-66
9. Norma ISO 8466-1: 1990. Water quality Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.

According to the above discussion, this approach is the starting point for the analysis of different experimental conditions and measurement methods to which this calculation scheme can be applied and adapted.

The analytical laboratory should decide which working hypothesis are applicable in the measurements under consideration and decide which calculation procedure is adequate.

6. REFERENCES

- 1.- Guide to the Expression of Uncertainty in Measurements (BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML) 2da. Ed., 1993. ISBN 92-67-101889.
2. Quantifying uncertainty in analytical measurement, EURACHEM/CITAC Guide, 2nd. Edition.
3. Uncertainty of measurement: Implications of its use in Analytical Science, Analytical Methods Committee, The Royal Society of Chemistry, Burlington House, Piccadilly, London. Analyst, Sept. 1995, vol 120, pg 2303
4. Using validation data for ISO measurement uncertainty estimation, S.L.R. Ellison, V.J. Barwick, Analyst, June 1988, Vol. 123 pg. 1387.
5. Gas Analysis - Determination of the composition of calibration gas mixtures. Norma ISO 6143.
6. Drapper, N.R. Smith, H., Applied Regression Analysis, J. Wiley & Sons 1st. ed., 1966
7. Anderson. Practical Statistics for Analytical Chemistry, Van Nostrand Reinhold Co., N.Y.
8. Synek, V, Subrt, P. Marecek, J. Uncertainty of mercury determinations in biological materials using an atomic absorption spectrometer AMA 254. AccredQualAssur(2000) 5: 58-66
9. Norma ISO 8466-1: 1990. Water quality Calibration and evaluation of analytical methods and estimation of performance characteristics. Part 1: Statistical evaluation of the linear calibration function.