

GUÍA DE CALIBRACIÓN DE ESPECTROFOTÓMETROS UV-Vis INM/GTM-FR-E/01

Bogotá

Fecha publicación (2019-12-23)

Versión No.1

CONTENIDO

1. OBJETIVO.....	6
2. ALCANCE	6
3. ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS	6
4. DEFINICIONES	7
5. MARCO CONCEPTUAL	8
5.1. Instrumento bajo calibración.....	8
5.1.1. Fuente.....	8
5.1.2. Monocromador	9
5.1.3. Compartimento de muestras	10
5.1.4. Detector.....	11
5.1.5. Lentes y espejos	11
5.2. Método de calibración	11
5.3. Patrones de medición.....	12
5.3.1. Escala fotométrica	12
5.3.2. Escala de longitud de onda	13
5.4. Parámetros instrumentales.....	15
– Tiempo promedio de señal (SAT).....	15
– Intervalo de datos (ID)	15
– Velocidad de barrido.....	16
– Ancho de banda espectral	16
5.5. Pruebas fotométricas.....	18
– Luz extraviada	18
– Estabilidad fotométrica	18
– Ruido fotométrico	19
6. DESCRIPCIÓN DE LA CALIBRACIÓN	20
6.1. Instrumentos auxiliares.....	20
6.2. Condiciones ambientales.....	20
6.3. Proceso calibración	20
6.3.1. Condiciones para la calibración	20

6.3.2.	Actividades previas.....	21
6.3.3.	Calibración de la escala fotométrica	21
6.3.4.	Calibración de la escala de longitud de onda.....	22
6.4.	Tratamiento de datos.....	23
6.5.	Estimación de la incertidumbre de medición.....	23
6.5.1.	Definición del mensurando	23
6.5.2.	Planteamiento del modelo matemático	23
6.5.3.	Identificación de las fuentes de incertidumbre	24
6.5.4.	Incertidumbre estándar.....	25
6.5.5.	Cálculo de coeficientes de sensibilidad	25
6.5.6.	Incertidumbre combinada	25
6.5.7.	Incertidumbre expandida de medición	26
6.6.	Presentación de los resultados.....	26
6.7.	Interpretación de resultados	28
6.8.	Aseguramiento de la validez de los resultados	28
6.8.1.	Control de los resultados.....	29
6.8.2.	Aseguramiento metrológico de patrones	29
6.8.3.	Buenas prácticas.....	29
6.9.	Trazabilidad.....	30
7.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

PRESENTACIÓN

Esta guía es el resultado del trabajo conjunto entre el Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM, miembros de la Red Colombiana de Metrología - RCM (Grupos de Trabajo por Magnitud) y el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia – ONAC con el fin armonizar métodos de calibración y propender por la uniformidad y coherencia en criterios técnicos mínimos a emplear por los laboratorios de calibración y usuarios de estos métodos. Esta guía presenta metodologías reconocidas internacionalmente y se ha elaborado recogiendo el conocimiento y la experiencia de los miembros del equipo de trabajo, de tal forma que pueda ser usada como base para la elaboración de procedimientos e instructivos prácticos por parte de los laboratorios de calibración y ensayo.

En este sentido lo consignado en esta guía se constituye en un referente para:

- a. El Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC.
- b. Los laboratorios de calibración y ensayo que involucren los métodos o criterios técnicos consignados en esta guía.
- c. Los laboratorios internos de las organizaciones o fabricantes que requieran el uso de estos métodos de calibración o criterios técnicos.

EQUIPO DE TRABAJO

Este documento fue elaborado en el espacio del Grupo Técnico por Magnitud de Fotometría y Radiometría de la Red Colombiana de Metrología. Para el desarrollo del documento se contó con la participación del Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM profesional Juliana Serna Saiz, el Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC y los laboratorios de calibración que han desarrollado la magnitud relacionada y que han participado en las reuniones del grupo técnico:

Eurometric Colombia LTDA
Metrilab LTDA
Tecnología y Desarrollo Fenix

REVISIÓN

Mesa de Trabajo Técnico Científica de la Subdirección de Metrología Química y Biomedicina.

1. OBJETIVO

Establecer lineamientos para la calibración de espectrofotómetros ultravioleta visible (UV-Vis) por el método directo, que proporcionen herramientas para la evaluación de la competencia técnica de los laboratorios, con el fin de asegurar que las mediciones sean confiables y trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI).

2. ALCANCE

Esta guía describe las actividades de medición, estimación de incertidumbre y trazabilidad metrológica en la calibración de espectrofotómetros UV-Vis, por el método de comparación directa con Materiales de Referencia Certificados (MRC). Está dirigida a las personas interesadas en el proceso de calibración de estos instrumentos, ya sea como herramienta para la implementación del servicio de calibración (laboratorios acreditados o en busca de acreditación), o como herramienta para los evaluadores de organismos de acreditación, como el ONAC.

3. ABREVIATURAS, SIGLAS Y SÍMBOLOS

A	Absorbancia
E	Estabilidad
IBC	Instrumento Bajo Control
ID	Intervalo de datos
λ	Longitud de onda
LE	Luz extraviada
MRC	Material de Referencia Certificado
ONAC	Organismo Nacional de Acreditación de Colombia
r	Resolución del instrumento
R	Ruido
SAT	Tiempo promedio de señal
SBW	Ancho de banda espectral
SI	Sistema Internacional de Unidades
τ	Transmitancia
UV-Vis	Ultravioleta visible
V_{barrido}	Velocidad de barrido
V_m	Promedio de los valores medidos
V_{MRC}	Valor certificado del MRC

4. DEFINICIONES

Los conceptos presentados a continuación hacen parte del Vocabulario Internacional de Iluminación CIE S 17/R:2011 (1)

- **Radiación electromagnética (17-370):** emisión o transporte de energía en forma de ondas electromagnéticas con los fotones asociados.
- **Longitud de onda $[\lambda]$ (17-1426):** distancia en la dirección de propagación de una onda periódica entre dos puntos sucesivos en los cuales la fase es la misma.
- **Transmitancia regular $[\tau]$ (17-1079):** relación entre la parte transmitida regularmente del flujo (total) transmitido y el flujo incidente.
- **Absorbancia espectral $[A]$ (17-1207):** logaritmo en base 10 del inverso de la transmitancia interna espectral.

$$A(\lambda) = -\log_{10} T(\lambda)$$

Ecuación 1

Los conceptos presentados a continuación se tomaron del Vocabulario Internacional de Metrología (VIM) 3ª Edición, 2012 (2):

- **Magnitud (1.1):** propiedad de un fenómeno, cuerpo o sustancia, que puede expresarse cuantitativamente mediante un número y una referencia.
- **Mensurando (2.3):** magnitud que se desea medir.
- **Error de medición (2.16):** diferencia entre un valor medido de una magnitud y un valor de referencia.
- **Calibración (2.39):** operación que bajo condiciones especificadas establece, en una primera etapa, una relación entre los valores y sus incertidumbres de medición asociadas obtenidas a partir de los patrones de medición, 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 medición a partir de una indicación.
- **Trazabilidad metrológica (2.41):** propiedad de un resultado de medición 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 medición.
- **Verificación (2.44):** aportación de evidencia objetiva de que un elemento dado satisface los requisitos especificados
- **Ajuste de un sistema de medición (3.11):** conjunto de operaciones realizadas sobre un sistema de medición para que proporcione indicaciones prescritas, correspondientes a valores dados de la magnitud a medir.
- **Patrón de medición (5.1):** realización de la definición de una magnitud dada, con un valor determinado y una incertidumbre de medición asociada, tomada como referencia.

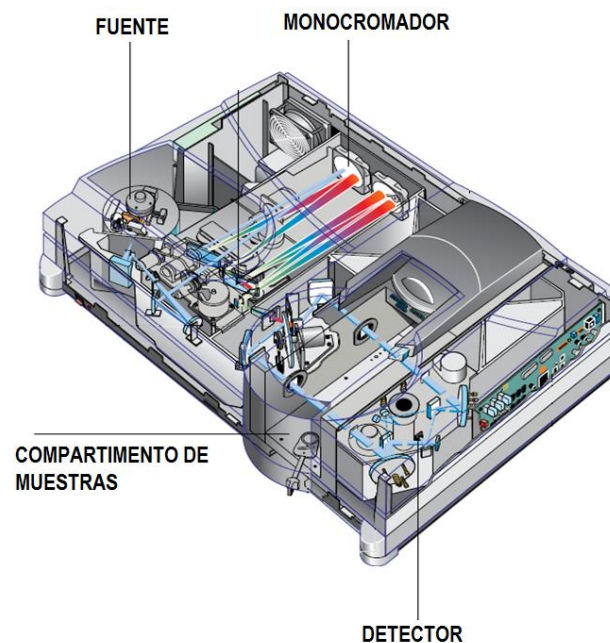
5. MARCO CONCEPTUAL

Los principales conceptos que se utilizan en espectrofotometría UV-Vis y en específicamente en la calibración de los espectrofotómetros UV-vis, se presentan a lo largo de este numeral. En el numeral 5.1 se mencionan las partes principales de estos instrumentos, en el numeral 5.2 se define el método de calibración de estos equipos, en el numeral 5.3 se presentan los patrones que se utilizan durante el procedimiento de calibración, por su parte el numeral 5.4 expone los parámetros instrumentales de la calibración y por último, el numeral 5.6 define las pruebas fotométricas que se realizan a los espectrofotómetros UV-Vis.

5.1. Instrumento bajo calibración

Un espectrofotómetro es un instrumento utilizado para medir la transmitancia/absorbancia de una muestra, en función de la longitud de onda de una radiación electromagnética. En general, un espectrofotómetro está compuesto de 4 partes principales: una fuente, un monocromador, un divisor del haz, un área de muestra y un detector. También cuenta con elementos ópticos como lentes o espejos, que transmiten la luz a lo largo de todo el equipo (3).

Figura 1. Esquema del espectrofotómetro Agilent Technologies Cary 4000*



*Tomado de: https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-7786EN_Cary-4000-5000-6000i-UV-Vis-NIR_Brochure.pdf, 2019-09-27

5.1.1. Fuente

Es la encargada de generar radiación electromagnética. La fuente ideal es aquella que proporcione una intensidad constante para todas las longitudes de onda, con bajo ruido y muy estable (3). Esta

fuentes ideales no existen, sin embargo, existen lámparas que cumplen en gran medida con estas condiciones, estas son:

- La lámpara de deuterio, la cual produce una intensidad adecuada en la región ultravioleta (3). El funcionamiento de esta lámpara se basa en la aplicación de una corriente eléctrica a un gas, de tal manera que origina que las moléculas del gas colisionan con los electrones provocando excitaciones electrónicas, vibracionales y rotacionales, las cuales a su vez generan la iluminación (4). La vida útil de esta lámpara es de aproximadamente 1000 horas (3).
- La lámpara de tungsteno, la cual proporciona una intensidad adecuada en toda la región visible e infrarrojo, este tipo de lámpara tiene muy bajo ruido y poca deriva (3). Su funcionamiento se basa en hacer pasar una corriente eléctrica a lo largo de un filamento de tungsteno, lo cual incrementa su temperatura y produce la emisión de energía. La lámpara de tungsteno tiene una vida útil de aproximadamente 10 000 horas (3).
- La lámpara de arco de xenón, la cual proporciona una intensidad continua a lo largo de todo el espectro ultravioleta-visible. Su funcionamiento se basa en la ionización del xenón, debido a una descarga eléctrica entre dos electrodos de tungsteno. Una desventaja de esta fuente es que posee un mayor ruido comparada con las lámparas de deuterio y tungsteno (3).
- La lámpara de mercurio, la cual tiene el mismo principio de funcionamiento de la lámpara de deuterio, se utiliza para la calibración de la escala de longitud de onda de algunos espectrofotómetros UV-Vis. Esta lámpara

5.1.2. Monocromador

El monocromador está compuesto de 3 partes principales (4):

- Una rendija de entrada, que delimita la cantidad de luz proveniente de la fuente.
- Un dispositivo de dispersión como su nombre lo indica realiza la dispersión de la luz para obtener la longitud de onda deseada.
- Una rendija de salida, por la cual la radiación monocromática es dirigida a la muestra. Esta rendija es la encargada de definir la región de longitud de onda que será detectada y por consiguiente está directamente relacionada con el ancho de banda espectral (ver numeral 5.4).

Como se mencionó anteriormente, el dispositivo de dispersión está encargado de realizar la dispersión de la radiación proveniente de la fuente y de seleccionar la longitud de onda específica a la que se va a realizar la medición. Existen dos tipos:

1. Los prismas son dispositivos económicos y simples, sin embargo, la dispersión resultante es angularmente no lineal y además el ángulo de dispersión depende de la temperatura (3). Es común ver este tipo de dispositivos en espectrofotómetros antiguos.

2. Las redes de difracción están hechas de cristal y su superficie posee hendiduras muy estrechas, (del mismo orden que las longitudes de onda de la luz que se va a dispersar), y tiene un recubrimiento de aluminio, con el fin de hacer la reflectante (3). Estos dispositivos producen una dispersión angular lineal con la longitud de onda y como ventaja, son insensibles a la temperatura (3).

5.1.3. Compartimento de muestras

Las muestras que van a ser analizadas se ubican en esta parte del espectrofotómetro. En general, el porta muestras debe ser oscuro y estar completamente aislado, con el fin de evitar errores en la medición debido a luz extraviada o cualquier otra interferencia. Así mismo, este debe estar alineado con el haz de luz y por consiguiente no debe bloquearlo.

Dependiendo del tipo de espectrofotómetro y de la aplicación que se requiera existen diferentes tipos de porta muestras. Por ejemplo, para los espectrofotómetros de doble haz para muestras sólidas (A) y celdas estándar (B), para espectrofotómetros de haz simple para celdas estándar (C), portaceldas para celdas con diferentes pasos ópticos (D) portaceldas para múltiples muestras (E), La Figura 2 muestra algunos ejemplos:

Figura 2. Ejemplos de porta muestras



* Tomado de: https://www.shimadzu.com/an/molecular_spectro/uv/accessory/liquidsample/liquid4.html, 2019-09-27

** Tomado de: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/840-303400?SID=srch-srp-840-303400#/840-303400?SID=srch-srp-840-303400>, 2019-09-27

5.1.4. Detector

El principio de un detector consiste en convertir una señal de luz en una señal eléctrica. Idealmente, debe suministrar una señal lineal, con bajo ruido, alta sensibilidad y a su vez, amplificarla en varias etapas a lo largo de todo el dispositivo (3).

Existen varias clases de detectores, a continuación se describen algunos de ellos:

- **Fototubo:** este detector cuenta con una superficie fotoemisora en el cátodo, la cual al absorber los fotones que previamente han pasado por la muestra, libera electrones que a su vez son recolectados por el ánodo, generando así un flujo de corriente proporcional a la radiación incidente, la cual finalmente se amplifica.
- **Tubo fotomultiplicador:** al igual que en el detector de fototubo, la superficie fotoemisora del cátodo libera electrones al entrar en contacto con la radiación que sale después de atravesar la muestra. Gracias a un campo eléctrico, estos electrones son atraídos hacia un conjunto de dinodos, los cuales poseen una superficie fotoemisora, con el propósito de multiplicar la cantidad de electrones.
- **Arreglo de diodos:** este detector está compuesto por un conjunto de fotodiodos, con superficie semiconductor, conectados a unos condensadores. Cuando la radiación proveniente de la muestra entra en contacto con esta superficie, se genera un flujo de electrones que descarga los condensadores. La corriente necesaria para cargarlos nuevamente es proporcional al número de fotones detectados por cada fotodiodo (3).

5.1.5. Lentes y espejos

A lo largo de todo el recorrido de luz dentro de espectrofotómetro, se encuentra una serie de lentes y espejos, cuyo propósito es transmitir y enfocar la radiación a través de todas las partes del instrumento.

5.2. Método de calibración

La calibración de un espectrofotómetro UV-Vis, comprende un conjunto de pruebas realizadas con el fin de conocer los errores inherentes que puede presentar el instrumento cuando realiza una medición. Los valores obtenidos en estas mediciones, a condiciones determinadas, se comparan con los valores de los materiales de referencia certificados, utilizados como patrones de medición y finalmente, se estima la incertidumbre asociada a la calibración.

Los espectrofotómetros UV-Vis cuentan con dos escalas, la escala de longitud de onda y la escala fotométrica; para cada una cuenta con su respectivo método de calibración y patrón de medición. Así mismo, existen parámetros instrumentales que afectan los resultados de la calibración y que por lo tanto se deben tener en cuenta.

Los siguientes numerales presentan los temas más importantes del proceso de calibración. El numeral 5.3 describe los patrones que se utilizan para ambas escalas de medición, el numeral 5.4 detalla los

parámetros instrumentales que intervienen durante el proceso de calibración y el numeral 5.5 presenta las pruebas fotométricas que pueden tener un efecto en los resultados de la calibración de la escala fotométrica de los espectrofotómetros UV-Vis.

5.3. Patrones de medición

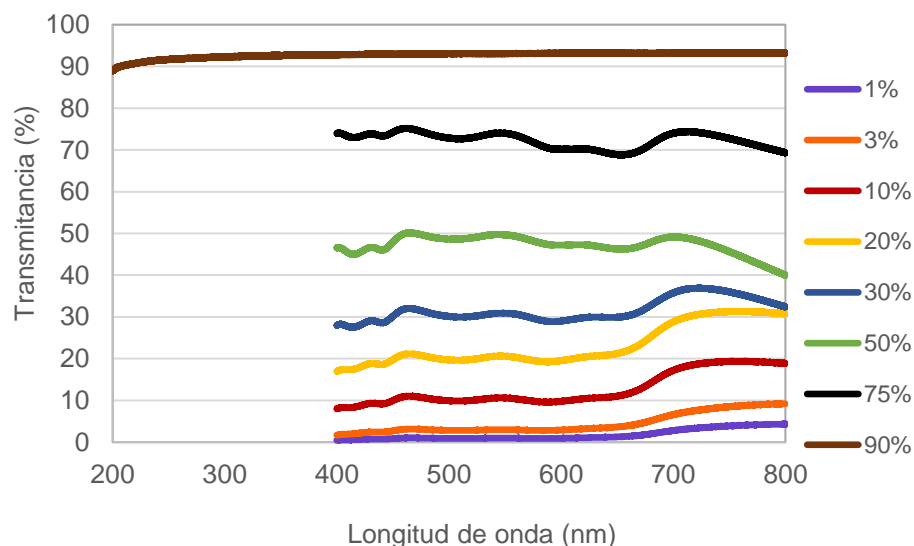
5.3.1. Escala fotométrica

La escala fotométrica hace referencia a la escala de absorbancia o transmitancia del espectrofotómetro. Para la calibración de la misma es necesario contar con patrones que permitan establecer el error fotométrico del instrumento. Se debe tener en cuenta que los espectrofotómetros UV-Vis trabajan tanto en el espectro ultravioleta como en el visible, y por lo tanto cada espectro debe calibrarse. El patrón de medición ideal debe cumplir con las siguientes condiciones (3; 5):

- El material debe ser transparente y estar libre de interferentes en el intervalo de interés del espectro UV-Vis.
- La transmitancia no debe variar significativamente con la temperatura ni con la longitud de onda (ópticamente neutro).
- Debe tener baja reflectancia.
- El patrón de medición no puede ser fluorescente.
- Debe ser estable, homogéneo y libre de esfuerzos residuales.

Los filtros de densidad óptica neutra son materiales que cumplen satisfactoriamente los requisitos del patrón de medición ideal. Estos están hechos de vidrio o de metales sobre cuarzo. La Figura 3 presenta el espectro de absorción de un conjunto de filtros de densidad óptica neutra utilizado para la calibración/verificación de la escala fotométrica.

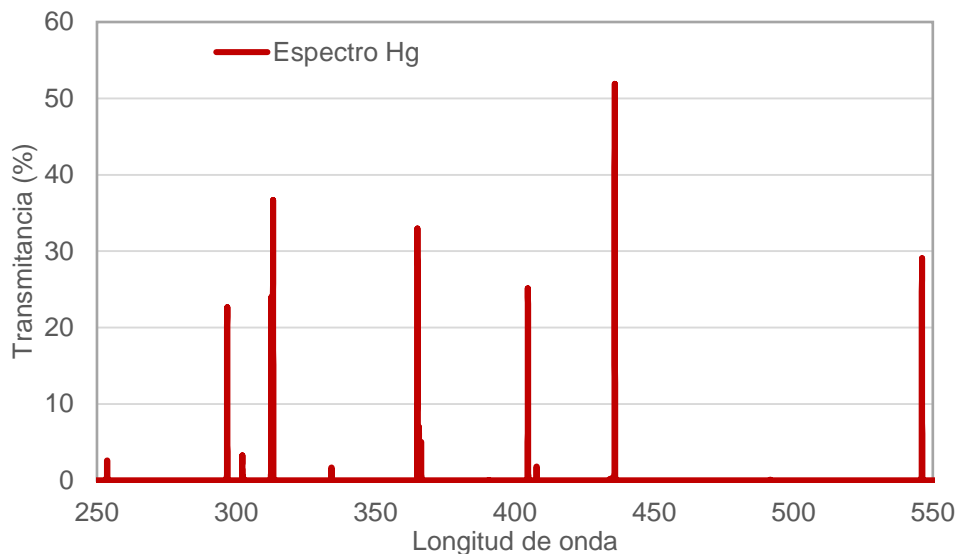
Figura 3. Espectro de un conjunto de filtros de densidad óptica neutra



5.3.2. Escala de longitud de onda

La calibración de la escala de longitud de onda se realiza comparando el valor de longitud de onda dado por el instrumento con el establecido por el patrón de medición, con el fin de determinar el error del espectrofotómetro para esta escala. El patrón de medición ideal para esta escala es aquel que tenga líneas de emisión bien definidas, a lo largo de todo el espectro ultravioleta-visible (3). La mejor representación de patrón de medición ideal son las líneas de emisión de los elementos. La Figura 4 presenta el espectro de emisión del mercurio, producido por una lámpara de descarga, tipo lápiz.

Figura 4. Patrón de medición ideal para la escala de longitud de onda



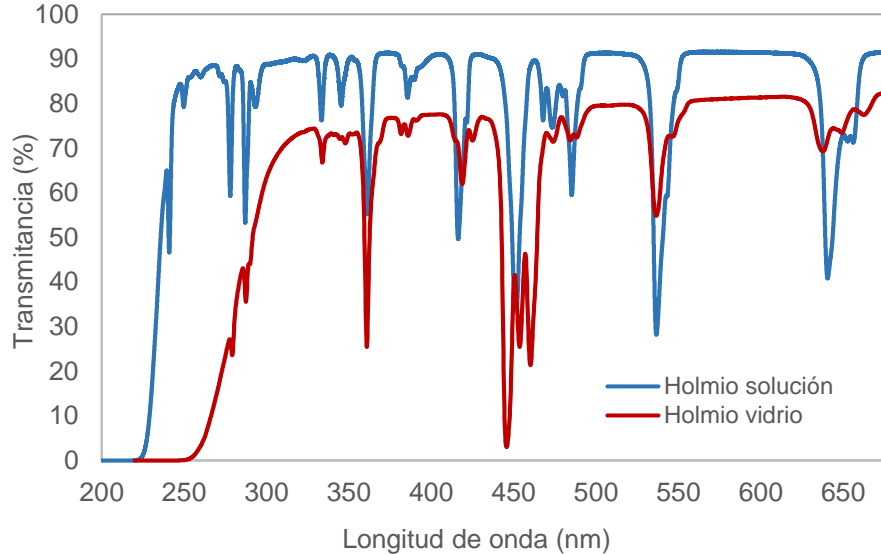
Nota: algunos espectrofotómetros, por sus especificaciones técnicas, no pueden determinar las líneas espectrales de emisión.

Los materiales de referencia certificados que más se ajustan a la descripción de patrón de medición ideal se presentan a continuación:

- **Filtro de óxido de holmio**

Este filtro ha sido ampliamente utilizado para la calibración y verificación de la escala de longitud de onda de los espectrofotómetros UV-Vis. En general, para un ancho de banda espectral de 1 nm el óxido de holmio presenta entre 14 y 16 bandas de absorción en el intervalo de 240 nm a 640 nm, dependiendo de su presentación. Comercialmente, este patrón de medición se puede conseguir como solución en ácido perclórico o como una película de óxido de holmio sobre vidrio. La Figura 5 presenta los espectros de este material en estas dos presentaciones. Es importante mencionar que dependiendo de la presentación, las bandas de absorción varían.

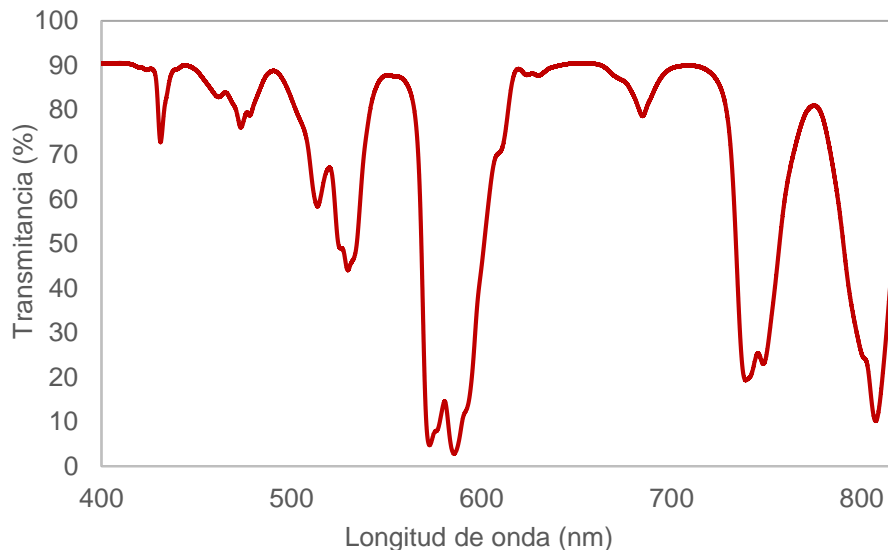
Figura 5. Espectros de óxido de holmio en vidrio y solución a un ancho de banda espectral 1 nm



– **Filtro de didimio**

Los filtros de didimio se utilizan para la calibración y verificación de la escala de longitud de onda en la región visible (400 nm a 760 nm). Dependiendo del ancho de banda espectral al cual se realice la medición, presenta entre 11 y 15 bandas de absorción. La Figura 6 presenta un espectro de este tipo de filtros

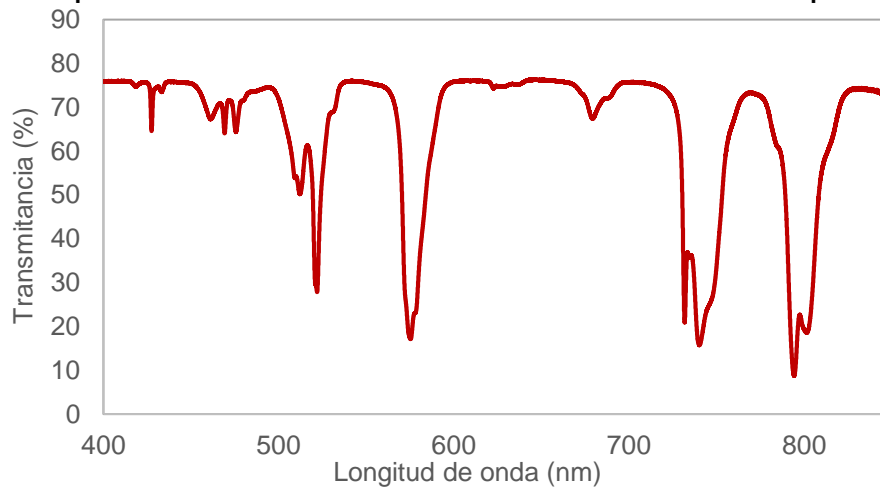
Figura 6. Espectro de un filtro de didimio a un ancho de banda espectral de 1 nm



– **Filtro de óxido de neodimio**

El filtro de óxido de neodimio se utiliza para la calibración de la escala de longitud de onda en la región visible, en el intervalo de 575 nm a 865 nm (Ver Figura 7). Este filtro presenta entre 5 y 7 bandas de absorción, dependiendo del ancho de banda espectral al cual se realice la medición.

Figura 7. Espectro de un filtro de óxido de neodimio a un ancho de banda espectral de 1 nm



5.4. Parámetros instrumentales

Los parámetros instrumentales del IBC hacen parte del conjunto de condiciones a las cuales se va a realizar la calibración. La combinación de ellos proporcionará un resultado de medición específico, y es por esto que se recomienda que la calibración se lleve a cabo a las mismas condiciones en las que el dueño del IBC realice sus mediciones. Existen espectrofotómetros que tienen fijos algunos de estos parámetros y por lo tanto, el operador no puede realizar ningún cambio; sin embargo, ciertos espectrofotómetros permiten variarlos y en este caso es indispensable tenerlos en cuenta a la hora de realizar el procedimiento de calibración. A continuación se presenta una descripción de los parámetros instrumentales que se deben tener en cuenta a la hora de realizar un servicio de calibración:

– **Tiempo promedio de señal (SAT)**

Es el tiempo durante el cual el instrumento va a recolectar datos en una medición. Este parámetro está dado en unidades de segundo (s).

– **Intervalo de datos (ID)**

El intervalo de datos hace referencia a cada cuantos nanómetros el instrumento recolectará datos. Este parámetro está directamente relacionado con la resolución del instrumento y se da en unidades de nanómetros (nm).

– **Velocidad de barrido**

Este parámetro hace referencia a la velocidad a la cual el instrumento va a realizar un barrido del espectro en la escala de longitud de onda, para un intervalo definido. La velocidad de barrido está definida por los dos parámetros anteriores y se expresa en unidades de (nm/min):

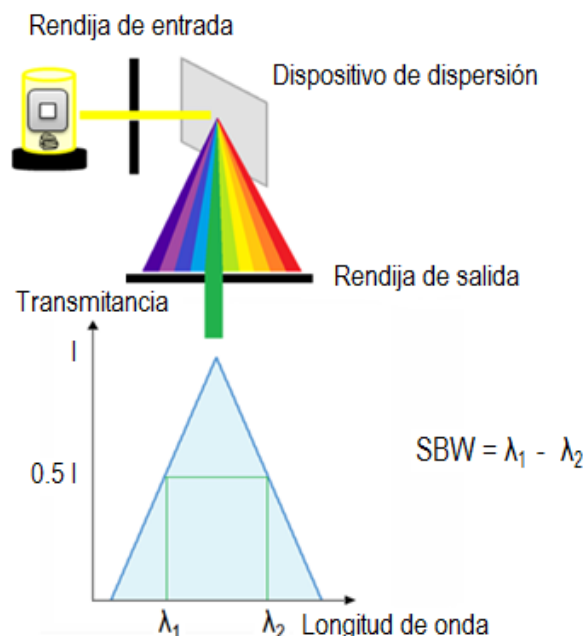
$$V_{\text{barrido}} = \frac{ID}{SAT} * 60 \quad \text{Ecuación 2}$$

Entre mayor sea la velocidad de barrido el tiempo de una medición será menor, sin embargo, el intervalo de datos (parámetro estrechamente relacionado con la resolución) será mayor, lo cual influye directamente en la incertidumbre asociada a la medición.

– **Ancho de banda espectral**

El ancho de banda espectral (SBW, por sus siglas en inglés) está definido como el intervalo de longitud de onda, a la mitad de la intensidad máxima de la banda de luz que sale del monocromador (ver Figura 8). Este parámetro es clave para lograr obtener espectros con mejor exactitud, ya que entre más grande sea el ancho de banda espectral, mayor cantidad de radiación saldrá del monocromador y por lo tanto el instrumento no podrá resolver las bandas de absorción. Así mismo, el SBW influye tanto la relación señal/ruido como la resolución del instrumento. Con un SBW alto la muestra será irradiada con varias longitudes de onda, reduciendo la habilidad del equipo de distinguir las bandas, mientras que con un SBW bajo el equipo podrá diferenciar de mejor manera las bandas cercanas pero reducirá la cantidad de luz que alcanza el detector lo que genera mayor ruido (3; 6).

Figura 8. Esquema del ancho de banda espectral



La Figura 9 presenta un el espectro del óxido de holmio medido a 3 diferentes anchos de banda espectral 1 nm, 2 nm y 4 nm, como se puede observar a medida que el SBW es más mayor se pierde la definición de las bandas de absorción y en algunas de estas puede darse un corrimiento del valor de la longitud de onda.

Figura 9. A. Espectros del óxido de holmio a 3 anchos de banda espectrales 1 nm, 2 nm y 4 nm

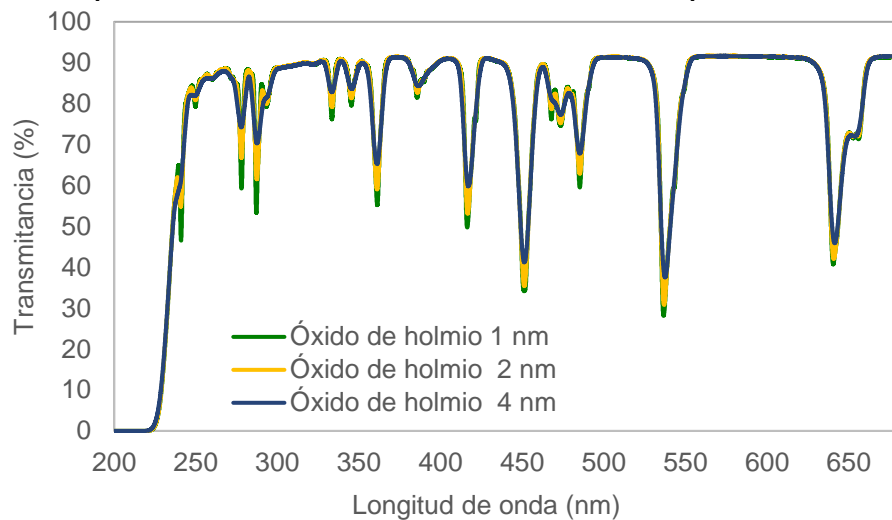
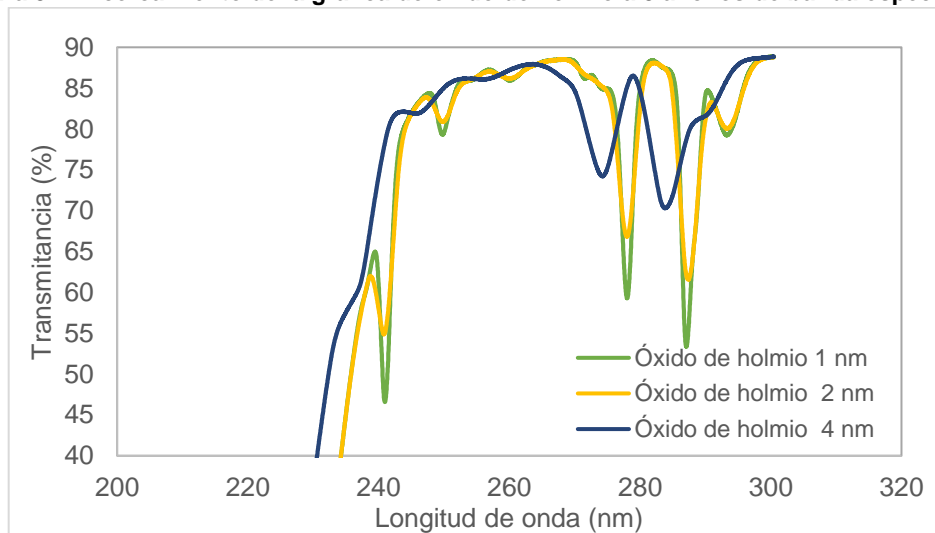


Figura 9 B. Acercamiento de la gráfica de óxido de holmio a 3 anchos de banda espectrales.

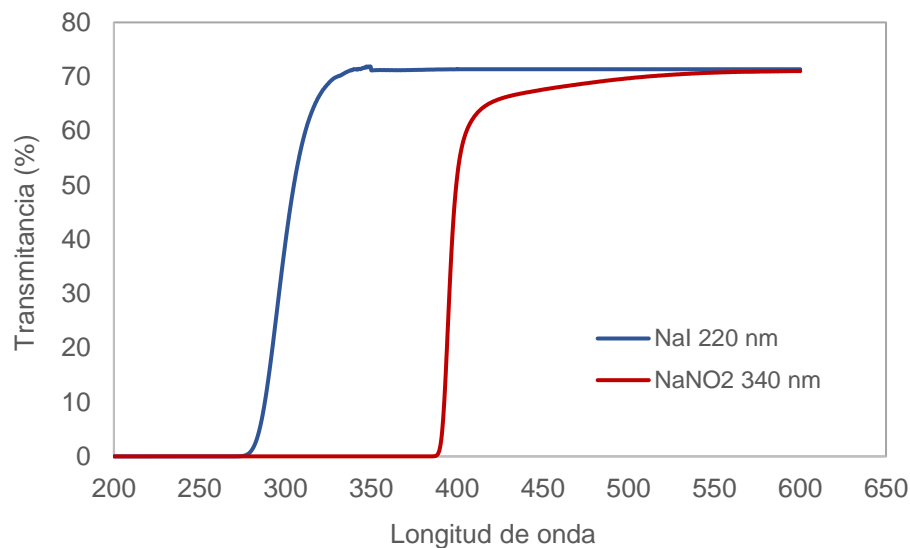


5.5. Pruebas fotométricas

– Luz extraviada

La luz extraviada es toda aquella radiación electromagnética indeseada que llega al detector y por lo tanto da lugar a indicaciones incorrectas. Puede ser heterocromática o isocromática, la primera se origina en el sistema óptico del instrumento y proviene de una longitud de onda diferente a la transmitida desde el monocromador. La segunda se origina en el compartimento de muestras y llega al detector sin haber atravesado la muestra (5; 7). Es importante minimizar este efecto ya que entre mayor sea la cantidad de luz extraviada que llega al detector menor será la linealidad del método de medición. La luz extraviada se determina por medio del uso de filtros que absorben, a una longitud de onda específica, toda la radiación proveniente de la fuente. En general, la medición se realiza a la longitud de onda definida, estableciendo cuánta radiación alcanza a llegar al detector (3; 7). La Figura 10 presenta el espectro de 2 de los materiales utilizados como filtros para la determinación de la luz extraviada, nitrito de sodio y yoduro de sodio.

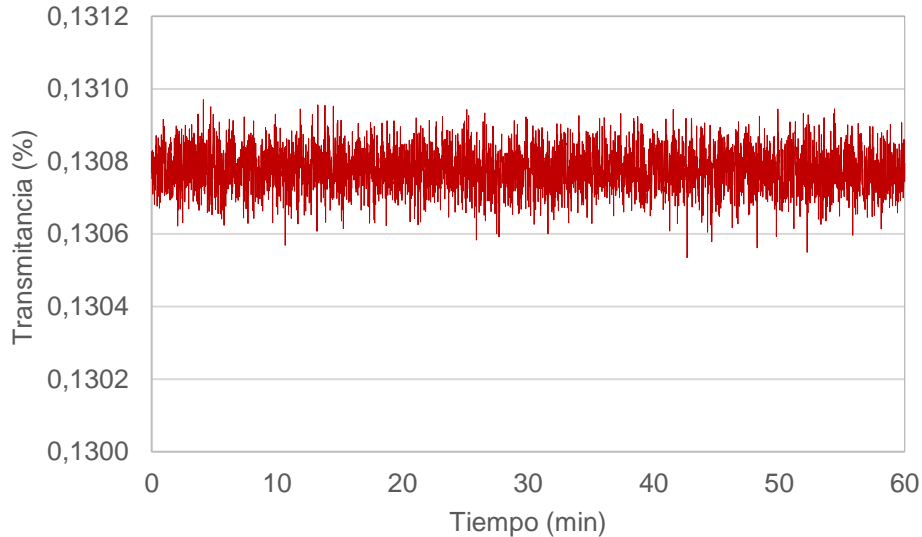
Figura 10. Espectro de dos materiales utilizados para la determinación de la luz extraviada



– Estabilidad fotométrica

La estabilidad fotométrica es una medida de qué tan estable la respuesta del espectrofotómetro en un periodo de tiempo, generalmente 1 hora o más. El objetivo es determinar la variación de la respuesta fotométrica por medio de la diferencia entre el valor máximo y el mínimo de transmitancia/absorbancia (8) (ver Figura 11). La estabilidad se determina a una longitud de onda específica por medio de filtros de densidad óptica neutra.

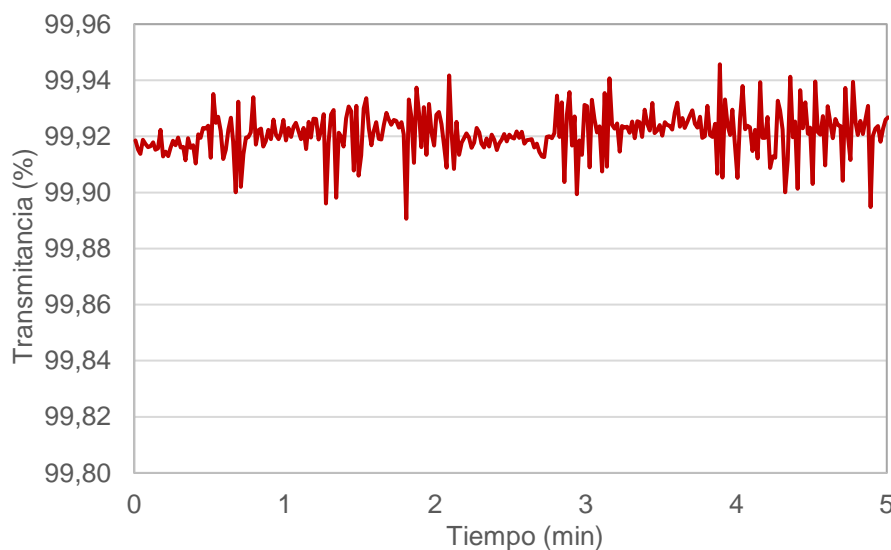
Figura 11. Prueba de estabilidad espectrofotómetro UV-Vis Cary 4000 a 225 nm con un SBW 2 nm



– **Ruido fotométrico**

El nivel de ruido es una indicación de la estabilidad de la medición. Se determina como la variación de la respuesta del instrumento en un periodo determinado de tiempo, a una longitud de onda específica. El ruido afecta directamente la precisión de las mediciones y los límites de detección del instrumento (6). La Figura 12 presenta un ejemplo de una medición del ruido.

Figura 12. Prueba de ruido espectrofotómetro UV-Vis Cary 4000 a 750 nm con un SBW de 2 nm



6. DESCRIPCIÓN DE LA CALIBRACIÓN

La calibración de un espectrofotómetro UV-Vis contempla varios aspectos, los cuales se presentan en los siguientes numerales así: los numerales 6.1 y 6.2 presentan los instrumentos auxiliares que se deben utilizar durante la calibración y las recomendaciones generales a tener en cuenta con relación a las condiciones ambientales durante la calibración; los numerales 6.3 y 6.7 describen las etapas de la calibración, el tratamiento de los datos; la estimación de la incertidumbre de medición, la presentación y la interpretación de los resultados, respectivamente; los numerales 6.8 y 6.9 establecen los lineamientos y recomendaciones para el aseguramiento de la validez de los resultados y las consideraciones para declarar la trazabilidad metrológica de las mediciones hechas durante la calibración.

6.1. Instrumentos auxiliares

Las condiciones ambientales se deben registrar y monitorear durante el proceso de calibración del espectrofotómetro, por lo tanto se hace necesario contar con los siguientes instrumentos auxiliares:

- Termómetro, utilizado para la medición de la temperatura del ambiente del laboratorio en el cual se realice la calibración.
- Higrómetro, utilizado para la medición de la humedad relativa del ambiente del laboratorio en el cual se realice la calibración.

6.2. Condiciones ambientales

El desempeño del IBC puede verse afectado por las condiciones ambientales, es por esto que es necesario tener en cuenta las recomendaciones dadas por el fabricante del espectrofotómetro, con relación a las condiciones óptimas de operación del instrumento.

Así mismo, se deben considerar las condiciones ambientales óptimas para manipulación de los materiales de referencia certificados, evitando siempre que pueda ocurrir condensación de agua sobre la superficie de los mismos.

6.3. Proceso calibración

La calibración de un espectrofotómetro UV-Vis se realiza por el método de medición directa, el cual consiste en establecer la diferencia entre el resultado medido por el instrumento bajo calibración y el valor certificado del patrón de medición, para cada una de sus escalas, en otras palabras el error del instrumento. Este proceso comprende un conjunto de actividades que deben realizarse sistemáticamente para asegurar la calidad de los resultados. En este sentido, es necesario que el laboratorio de calibración tenga en cuenta los lineamientos que se describen a continuación.

6.3.1. Condiciones para la calibración

La calibración de un espectrofotómetro UV-Vis debe llevarse a cabo en sitio. A continuación se presentan algunas consideraciones a tener en cuenta para el correcto desarrollo del servicio:

- El IBC debe estar limpio en su exterior, sin golpes, daños y/o grietas.
- El compartimento de muestras debe estar completamente limpio.
- Todos los botones y cierres mecánicos del instrumento deben encontrarse en buen estado.
- Las conexiones eléctricas del equipo deben estar limpias, libres de polvo, en buen estado, no debe presentar desgaste o añadiduras y debe estar correctamente conectado a la línea de electricidad.
- El IBC debe contar con todos los accesorios y cables de conexión.
- El laboratorio debe estar esté libre de polvo, vapores ácidos y orgánicos, lejos de toda posible fuente de vibración o de corrosión.
- El laboratorio cuente con controles de temperatura y humedad.
- El IBC debe estar ubicado en una superficie lo suficientemente robusta para asegurar su integridad.
- El IBC debe estar ubicado lejos de la exposición directa a la luz solar.
- El IBC debe contar con su respectivo manual, especificaciones técnicas o el instructivo de manejo.
- Identificar y relacionar en el certificado de calibración el serial del instrumento bajo calibración.

6.3.2. Actividades previas

El laboratorio de calibración debe tener en cuenta, previo a la calibración, las siguientes actividades:

1. Definir, para cada una de las escalas, los Materiales de Referencia Certificados (MRC) a utilizar, teniendo en cuenta las especificaciones del instrumento bajo calibración, así como los requerimientos específicos del dueño del espectrofotómetro, registrados en un documento acordado por ambas partes, por ejemplo la cotización del servicio. De presentarse algún desvío, se debe acordar con este las nuevas condiciones de calibración y se debe dejar el respectivo registro.
2. Asegurar que el portaceldas del espectrofotómetro es compatible con la forma y tamaño de los patrones de medición.
3. Realizar la recepción oficial del instrumento revisando que éste funcione correctamente (custodia).
4. Realizar un reconocimiento general del instrumento bajo calibración, su operación y su configuración básica (ubicación de las partes principales).
5. Asegurar que las condiciones ambientales del laboratorio son apropiadas para el uso de los Materiales de Referencia Certificados (patrones) y del espectrofotómetro.

6.3.3. Calibración de la escala fotométrica

La calibración de la escala fotométrica se debe realizar de acuerdo con los siguientes lineamientos:

1. Registrar las condiciones ambientales (temperatura y humedad) del laboratorio en el que se está realizando la calibración.

Nota: si las condiciones ambientales no se encuentran dentro de los límites establecidos por el laboratorio se debe detener la calibración.

2. Configurar en el espectrofotómetro los parámetros instrumentales tales como: ancho de banda espectral, longitud de onda, tiempo promedio de señal e intervalo de datos, teniendo en cuenta las especificaciones propias del espectrofotómetro y las necesidades del cliente.

Nota: el espectrofotómetro se debe calibrar a las longitudes de onda a las cuales los filtros de densidad óptica neutra están calibrados.

3. Realizar el cero de la medición con aire como referencia.
4. Ubicar el MRC en el compartimento de muestras. Para el caso de los espectrofotómetros de doble haz, la referencia es el aire.
5. Realizar el número total de mediciones, de acuerdo con el procedimiento establecido por el laboratorio de calibración. Realizar el cero entre cada medición.
6. Obtener y registrar los valores de transmitancia o absorbancia
7. De ser necesario, el laboratorio debe determinar si variables como ruido, luz extraviada o estabilidad están afectando los resultados, y en tal caso incluirla(s) como fuente de incertidumbre.
8. Registrar las condiciones ambientales.
9. Realizar el tratamiento de datos, de acuerdo con los lineamientos de numeral 6.4
10. Estimar la incertidumbre de la medición de acuerdo con el procedimiento dado en el numeral 6.5.

6.3.4. Calibración de la escala de longitud de onda

La calibración de la escala de longitud debe realizarse teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

1. Registrar las condiciones ambientales (temperatura y humedad) del laboratorio en el que se está realizando la calibración.

Nota: si las condiciones ambientales no se encuentran dentro de los límites establecidos por el laboratorio que va a realizar calibración, se debe detener la calibración.

2. Configurar los parámetros instrumentales tales como: ancho de banda espectral, tiempo promedio de señal, intervalo de datos, intervalo de medición y velocidad de barrido, teniendo en cuenta las especificaciones propias del espectrofotómetro.

Nota: algunos espectrofotómetros no permiten variar ciertos parámetros. Siempre concertar con el cliente las especificaciones a las cuales se realiza la calibración.

3. Realizar el cero de la medición.

Nota: dado que en la mayoría de los casos, la calibración de la escala de longitud de onda se realiza por barridos espectrales, el blanco se debe hacer como una línea base, en la cual el instrumento realiza la medición en todas las longitudes de onda programadas en el intervalo de medición.

Nota: la línea base se realiza a las mismas condiciones de la medición del MRC con el compartimento de muestras vacío.

4. Ubicar el MRC en el compartimento de muestras. Para el caso de los espectrofotómetros de doble haz, la referencia es contra aire.
5. Realizar el número total de mediciones, de acuerdo con el procedimiento establecido por el laboratorio de calibración. Se recomienda hacer mínimo 7 réplicas.
Nota: El laboratorio puede establecer, de acuerdo a su presupuesto de incertidumbre, una menor cantidad de réplicas, considerando su Capacidad de Medición y Calibración.
6. Obtener y registrar las longitudes de onda.
7. Registrar las condiciones ambientales.
8. Realizar el tratamiento de datos.
9. Estimar la incertidumbre de la medición.

6.4. Tratamiento de datos

Para el tratamiento de los datos obtenidos durante la calibración, se debe tener en cuenta las siguientes consideraciones:

- Se debe calcular el promedio y la desviación estándar de todas las mediciones realizadas por punto de calibración.
- Calcular el valor del error por cada punto de la calibración, para esto tener en cuenta los valores certificados de los patrones de medición.
- Estimar la incertidumbre de la medición, de acuerdo a los lineamientos dados en el numeral 6.5.

6.5. Estimación de la incertidumbre de medición

La estimación de la incertidumbre asociada a la calibración de los espectrofotómetros UV-Vis se realiza con base en los lineamientos presentados en la Guía para la estimación de la incertidumbre GUM (9). Los pasos para la estimación se presentan en los siguientes numerales:

6.5.1. Definición del mensurando

Como se mencionó en el numeral 5.2, el método de calibración de los espectrofotómetros UV-Vis es el método de medición directa. En este sentido, tanto en la escala de longitud de onda como en la escala fotométrica, el mensurando está definido como el error de medición.

6.5.2. Planteamiento del modelo matemático

El modelo matemático que representa el error está definido como la diferencia entre el valor medido y el valor de referencia. Para la escala de longitud de onda está definido por la siguiente ecuación:

$$\text{Error}_{\lambda} = (V_m - V_{\text{MRC}}) + A \quad \text{Ecuación 3}$$

Para la calibración de la escala fotométrica, el modelo matemático es descrito en la Ecuación 4.

$$\text{Error}_{T/A} = (V_m - V_{MRC}) B + C + D + E \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde las variables A, B, C, D y E corresponden a los aportes a la incertidumbre de las fuentes consideradas; estas son descritas en el numeral 6.5.3. El valor de cada una de estas equivale a 0.

6.5.3. Identificación de las fuentes de incertidumbre

Las fuentes de incertidumbre asociadas a la calibración de los espectrofotómetros UV-Vis se presentan a continuación:

Para la escala de longitud de onda, el error va a ser función de:

$$\text{Error}_{\lambda} = f(V_m, V_{MRC}, R) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde:

V_m , Valor medido (repetibilidad de las mediciones)

V_{MRC} , Valor del patrón de medición (incertidumbre del MRC)

R, Resolución del instrumento (A)

Para la escala fotométrica, el error va a ser función de:

$$\text{Error}_{T/A} = f(V_m, V_{MRC}, R, r, E, LE) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde:

V_m , valor medido (repetibilidad de las mediciones)

V_{MRC} , valor del patrón de medición (incertidumbre del MRC)

R, resolución del instrumento (B)

E, estabilidad (C)

r, ruido (D)

LE, luz extraviada (E)

Tabla 1. Fuentes de incertidumbre para cada uno de los mensurandos de calibración

Escala	Mensurando	Fuentes de incertidumbre
Longitud de onda	Error en longitud de onda	Material de referencia (V_{MRC}) Repetibilidad (V_m) Resolución (A)
Fotométrica	Error en transmitancia/absorbancia	Material de referencia (V_{MRC}) Repetibilidad (V_m) Resolución(B) Estabilidad (C) Ruido (D) Luz extraviada (E)

6.5.4. Incertidumbre estándar

La incertidumbre estándar para cada una de las fuentes se evalúa de acuerdo a las ecuaciones dadas en la Tabla 2.

Tabla 2 Ecuaciones para calcular la incertidumbre estándar para cada una de las fuentes de aporte

Fuente de incertidumbre	Tipo de evaluación	Ecuación
Resolución	Tipo B	$u_{\text{Resolución}} = \frac{\text{Resolución}}{\sqrt{12}}$
Material de referencia	Tipo B	$u_{\text{MRC}} = \frac{U_{\text{MRC}}}{\text{Factor de cobertura}}$
Repetibilidad	Tipo A	$u_{\text{Repetibilidad}} = \frac{\text{desviación estándar}}{\sqrt{\text{número de réplicas}}}$
Estabilidad	Tipo B	$u_{\text{Estabilidad}} = \frac{T_{\text{máx}} - T_{\text{mín}}}{\sqrt{12}}$
Ruido	Tipo B	$u_{\text{Ruido}} = \frac{T_{\text{máx}} - T_{\text{mín}}}{\sqrt{12}}$
Luz extraviada	Tipo B	$u_{\text{LE}} = \frac{\text{Luz extraviada}}{\sqrt{3}}$

6.5.5. Cálculo de coeficientes de sensibilidad

Los coeficientes de sensibilidad se obtienen derivando el modelo matemático en función de cada una de las variables asociadas. Para esto se emplea la siguiente ecuación general:

$$C_i = \frac{\Delta \text{Error}_{\lambda, T/A}}{\Delta \text{variable}} = \frac{\delta \text{Error}_{\lambda, T/A}}{\delta \text{variable}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Nota: las variables son cada una de las definidas en la Tabla 1.

6.5.6. Incertidumbre combinada

La expresión general para estimar la incertidumbre estándar combinada consiste en una suma lineal de términos que representan las variaciones de cada estimación de entrada, como se presenta a continuación para cada uno de los mensurandos.

- Escala de longitud de onda

$$u_{c, \lambda} = \sqrt{c_{\text{Resolución}}^2 u_{\text{Resolución}}^2 + c_{\text{Repetibilidad}}^2 u_{\text{Repetibilidad}}^2 + c_{\text{MRC}}^2 u_{\text{MRC}}^2} \quad \text{Ecuación 8}$$

- Escala fotométrica

$$u_{c,t} = \sqrt{c_{Rep}^2 u_{Rep}^2 + c_{Res}^2 u_{Res}^2 + c_{MRC}^2 u_{MRC}^2 + c_{Est}^2 u_{Est}^2 + c_{Ruido}^2 u_{Ruido}^2 + c_{LE}^2 u_{LE}^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

6.5.7. Incertidumbre expandida de medición

Teniendo en cuenta que la distribución estadística que mejor define el conjunto de datos es la distribución t-Student, se debe calcular el coeficiente t-Student con el cual se estima la incertidumbre expandida con un nivel de confianza de 95%. Para calcular el coeficiente t-Student, se calculan primero los grados efectivos de libertad con base en la ecuación de Welch-Satterthwaite, presentada a continuación:

$$v_{eff} = \frac{u(y)^4}{\sum_{i=1}^n \frac{u_i(y)^4}{v_i}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Donde:

- u(y), incertidumbre combinada para las n fuentes
- u_i(y), incertidumbre estándar para la fuente i
- v_i, grados de libertad para la fuente i
- v_{eff}, grados de libertad efectivos (coeficiente de t-Student)

Con el número de grados de libertad efectivos, mirar en tablas de distribución t el valor respectivo. Este corresponderá al valor del factor de cobertura con el que se calcula la incertidumbre expandida.

La incertidumbre expandida se estima mediante la siguiente expresión:

$$U = k \cdot u_c \quad \text{Ecuación 11}$$

Donde:

- U, incertidumbre expandida
- k, factor de cobertura o factor t-Student
- u_c, incertidumbre combinada

6.6. Presentación de los resultados

El certificado o informe de calibración debe cumplir con los requisitos indicados en ISO/IEC 17025:2017. Los resultados se deben presentar de manera exacta, clara, inequívoca y objetiva. Se debe incluir toda información necesaria para la interpretación de los resultados de medición y una descripción del método utilizado (10). El laboratorio debe consultar el numeral 7.8 de la norma con el fin de conocer los requisitos para la elaboración de los certificados.

En este sentido, se recomienda que el laboratorio incluya dentro del certificado por lo menos la siguiente información:

1. **Descripción del instrumento:** en esta sección describir la marca, modelo y número de serie o identificación inequívoca del IBC
2. **Método de calibración:** en esta sección describir el método utilizado durante la calibración, hacer mención al procedimiento del laboratorio correspondiente, especificar el número de repeticiones, relacionar los MRC utilizados en cada escala y los parámetros instrumentales a los cuales fue calibrado el espectrofotómetro.
3. **Condiciones ambientales:** en esta sección especificar el intervalo de humedad y temperatura durante la calibración.
Nota: Cuando se reporten las unidades se debe tener en cuenta la resolución de los instrumentos utilizados para la medición.
4. **Resultados de la calibración:** en esta sección especificar, por cada longitud de onda, el valor promedio de las mediciones, el valor del material de referencia certificado, el error y la incertidumbre asociada. Para la escala de longitud de onda, las unidades a reportar son nanómetros (nm) y al igual, el número de cifras decimales debe coincidir con la resolución del IBC. La Tabla 3 presenta un ejemplo para esta escala.

Tabla 3. Ejemplo de presentación de resultados para la escala de longitud de onda

λ (nm)	Valor Medido (nm)	Valor MRC (nm)	Error (nm)	U (nm)
1	278.94	279.28	-0.34	0.30
2	287.23	287.58	-0.35	0.30
3	333.30	333.92	-0.62	0.30
4	347.41	347.99	-0.58	0.34
5	360.51	360.88	-0.37	0.30
6	381.65	381.67	-0.02	0.31
7	385.78	385.80	-0.02	0.31
8	418.63	418.72	-0.09	0.31
9	424.89	425.07	-0.18	0.33
10	445.42	445.64	-0.22	0.30
11	453.03	453.58	-0.55	0.30
12	459.61	460.15	-0.54	0.30
13	473.48	474.01	-0.53	0.33
14	483.66	484.27	-0.61	0.31
15	536.06	536.39	-0.33	0.30
16	637.07	637.58	-0.51	0.32

Para el caso de la escala fotométrica, el laboratorio puede presentar los resultados en unidades de transmitancia (%) o en unidades de absorbancia (adimensional). El número de cifras decimales debe coincidir con la resolución del IBC. En la Tabla 4 se puede observar un ejemplo de presentación de resultados para esta escala.

Tabla 4. Ejemplo de presentación de resultados para la escala fotométrica

λ (nm)	Transmitancia (%)				Absorbancia			
	Valor medido	Valor MRC	Error	U	Valor medido	Valor MRC	Error	U
440.0	2.434	2.422	0.012	0.016	1.6137	1.6158	-0.0021	0.0029
465.0	3.156	3.132	0.024	0.015	1.5008	1.5042	-0.0033	0.0021
546.1	3.070	3.009	0.061	0.020	1.5128	1.5216	-0.0088	0.0028
590.0	2.893	2.804	0.089	0.022	1.5386	1.5522	-0.0136	0.0032
635.0	3.494	3.396	0.098	0.024	1.4567	1.4690	-0.0123	0.0030
650.0	3.755	3.646	0.109	0.034	1.4253	1.4382	-0.0128	0.0039
700.0	6.742	6.594	0.148	0.025	1.1712	1.1809	-0.0097	0.0016
750.0	8.599	8.493	0.106	0.074	1.0656	1.0709	-0.0054	0.0037

- Incertidumbre de medición:** en esta sección especificar el factor de cobertura, el nivel de confianza y la función de densidad de probabilidad del mensurando.
- Trazabilidad metrológica:** realizar una declaración de la trazabilidad metrológica al SI, especificando las unidades y la identificación de los materiales de referencia certificados utilizados. Si el laboratorio lo considera necesario puede incluir las incertidumbres del patrón de medición. Mayor información se proporciona en el numeral 6.8.
Nota: un ejemplo de declaración de trazabilidad metrológica es: “Este certificado documenta la trazabilidad metrológica al Sistema Internacional de Unidades, para el mensurando de longitud de onda, expresado en nanómetros (nm), a través de los patrones de medición con código de identificación XXXX y certificado de calibración número XXXX, calibrado por”
- A lo largo de todo el documento el laboratorio debe ser consistente con el separador decimal, y si lo considera necesario, especificarlo al cliente.

6.7. Interpretación de resultados

De acuerdo con la definición de calibración, la segunda etapa de este proceso consiste en utilizar la información obtenida durante este proceso, es decir los errores del instrumento, para establecer una relación que permita obtener un resultado de medición a partir de una indicación, lo que significa corregir los errores del instrumento cuando se están haciendo mediciones de rutina. La interpretación de los resultados la realiza el cliente, pero es un valor agregado, por parte del laboratorio de calibración, brindar asistencia al usuario sobre el correcto uso del certificado.

6.8. Aseguramiento de la validez de los resultados

Con el fin de asegurar la validez de los resultados obtenidos en las mediciones que se realizan durante el proceso de calibración, el laboratorio debe realizar un control efectivo de los datos e implementar buenas prácticas de medición.

6.8.1. Control de los resultados

De acuerdo con lo establecido por la norma NTC-ISO/IEC 17025:2017, para asegurar la validez de los resultados, el laboratorio debe:

- Registrar los datos obtenidos de la calibración de tal forma que se evidencien tendencias.
- Realizar los cálculos intermedios hacer sin redondeo. Solo el resultado final se presenta redondeado.
- Cuando sea posible, utilizar esquemas de verificación. En este caso, el laboratorio puede contar con un espectrofotómetro, utilizándolo para realizar las verificaciones a los filtros patrones, por medio de cartas de control.
- Participar en comparaciones interlaboratorio.
- Realizar una revisión de los resultados informados, por ejemplo, utilizando hojas de cálculo o softwares previamente validados.

6.8.2. Aseguramiento metrológico de patrones

Los Materiales de Referencia Certificados utilizados como patrones en la calibración de los espectrofotómetros UV-Vis deben contar con esquema para el aseguramiento metrológico. Lo anterior se resume en:

- Contar con un programa de mantenimiento, verificación y calibración de los Materiales de Referencia Certificados utilizados como patrones en la calibración del espectrofotómetro UV-Vis.
- Realizar verificaciones periódicas de los MRC, idealmente por medio de gráficos de control, de manera tal que se puedan evidenciar posibles desviaciones a los valores de transmitancia/absorbancia o longitud de onda, reportados en el certificado de calibración de los mismos.
- Establecer la periodicidad de calibración de los MRC, teniendo en cuenta información proporcionada por los gráficos de control, por recomendaciones del fabricante, entre otros.

6.8.3. Buenas prácticas

A continuación, se describen algunas de las prácticas que se recomiendan seguir durante el proceso de calibración de espectrofotómetros UV-Vis.

Instrumento bajo calibración

- Realizar una inspección visual al instrumento bajo calibración, evidenciando su buen estado, limpieza y correcto desempeño. El compartimento de muestra debe encontrarse limpio.
- Realizar la transferencia de la cadena de custodia del instrumento
- Idealmente, estar acompañado del responsable del instrumento.
- Dejar estabilizar la fuente del espectrofotómetro, se recomienda 1 hora.

Condiciones ambientales

- Mantener registro de las condiciones ambientales.
- Suspender la calibración si las condiciones ambientales del laboratorio no cumplen con las condiciones de uso del instrumento o de los MRC.

Patrones (MRC)

- Asegurar, previo a la calibración, que los filtros se encuentran limpios y en buen estado.
- Manipular en todo momento los filtros con guantes libres de polvo y fibras.
- Los filtros deben ubicarse en el mismo sentido en el cual fueron calibrados.
- Durante los tiempos muertos guardar los filtros en sus respectivos estuches.
- Si los filtros presentan algo de polvo en su superficie, es posible soplarlos con aire seco o una pera de aire.
- De ser estrictamente necesario limpiar el filtro, se debe utilizar acetona grado óptico o alcohol isopropílico, empapando un papel óptico con estas sustancias y pasando suavemente sobre la superficie el filtro en una sola dirección, evitando rayarlo o romperlo. Este procedimiento aplica para celdas de cuarzo o filtros de vidrio a los cuales habría que sacar de la montura, de ser posible.

6.9. Trazabilidad

El laboratorio debe asegurar que los Materiales de Referencia Certificados, utilizados en la calibración, cuenten con trazabilidad metrológica al Sistema Internacional de Unidades (SI). Por lo anterior, el laboratorio debe conservar los siguientes registros:

- Certificado de calibración de los MRC emitido por un laboratorio acreditado, en el cual se garantice su incertidumbre y trazabilidad metrológica al SI.
- Carta de trazabilidad metrológica en la que se evidencie claramente la cadena ininterrumpida de calibraciones y por cada eslabón, se haga referencia al procedimiento de medición utilizado para la calibración, la incertidumbre asociada y el instrumento bajo calibración.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Comité Internacional de Iluminación.** ILV: Vocabulario Internacional de Iluminación. s.l. : CIE Standards, 2011. Vol. CIE S 017/E:2011.
2. **International Bureau of Weights and Measures.** International vocabulary of metrology - Basic and general concepts and associated terms (VIM). 2012. Vol. 3 Edición, JCGM 200:2012.
3. **Tony Owen , Agilent Technologies.** *Fundamentos de la espectroscopía UV-VIS Moderna, Conceptos Básicos.* s.l. : Agilent Technologies, 2000.

4. **O, Arquímedes Ruíz.** *Métodos y pruebas para la caracterización del espectrofotómetros del cenam.* Querétaro - México : Publicación Técnica CENAM, 2002.
5. **National Bureau of Standards.** *Glass Filters as a Standar Reference Material for Spectrophotometry, Selection, Preparation, Certification, and Use of SRM 930 AND srm 1930.* Gaithersburg, MD : NBS Special Publication, 1994. 260-116.
6. **Agilent Technologies, Inc.** *Agilent Cary WinUV Help.* [Agilent Cary WinUV Help includes Microsoft Internet Explorer technology under license.] Santa Clara, California : s.n., 2012. Versión 5.0.0.4.
7. **Clare, John F.** *Calibration of UV -Vis Spectrophotometers for chemical analysis.* Wellington, New Zealand : Practitioner´s report, 2005. Measurement Standards Laboratory of New Zealand.
8. **Jorge Chacón S, Sandra M. Rodriguez.** *Caracterización de un espectrofotómetro Ultravioleta Visible para ser utilizado en la certificación de materiales de referencia.* s.l. : Primer Simposio Nacional "Metrología UCR 2002", 2002.
9. **International Bureau of Weights and Measures.** *Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement.* 2008. Vol. 1 Edición , JCGM 100.
10. **Organización Internacional de Estandarización, ISO.** ISO/IEC 17025, Requisitos Generales para la Competencia de los Laboratorios de Ensayo y Calibración. 2017.

Instituto Nacional de Metrología de Colombia - INM
Subdirección de Metrología Química y Biomedicina, Red Colombiana de Metrología.
Av. Cra 50 No 26-55 Int. 2 CAN - Bogotá, D.C. Colombia
Conmutador: (571) 254 22 22
E-mail: contacto@inm.gov.co
www.inm.gov.co
www.rcm.gov.co

Organismo Nacional de Acreditación de Colombia - ONAC
Av. Calle 26 # 57 – 83, Torre 8, Oficina 1001 - Bogotá, D.C. Colombia
PBX: +571 742 7592
E-mail: onac@onac.org.co
www.onac.org.co