

CINCIA Protocolos de Métodos

Calibración del Equipo Milestone DMA-80

Direct Mercury Analyzer

Procedimiento Operativo Estándar

CINCIA – Programa de Mercurio

Nombre Protocolo	:	Calibración del Equipo Milestone DMA-80 Direct Mercury Analyzer
Código Protocolo	:	M-003
Fecha publicación	:	26 de junio de 2020
Autor	:	Claudia M. Vega PhD y Blga. Jessica Pisconte
Contacto	:	vegacm@wfu.edu
Revisado por	:	Carol L. Mitchell PhD. Asesora Científica – CINCIA
Aprobado por	:	César Ascorra Guanira. Director Nacional - CINCIA

1. Resumen del procedimiento

Se realizará la calibración del equipo DMA-80 a través de la lectura de cantidades crecientes de mercurio en un rango de 1 a 1000ng, usando soluciones estándar previamente preparadas a partir de una solución patrón de mercurio 1000 ppm ($\mu\text{g/g}$), obteniendo la curva de calibración que es evaluada posteriormente aplicando una prueba de precisión y exactitud (control de calidad), donde los resultados deben encontrarse dentro de los parámetros aceptables.

2. Introducción

En el Laboratorio de Mercurio y Química Ambiental (LAMQA) se realizan procesos para el análisis de mercurio de diferentes tipos de muestra, en base a ello es necesario contar con un método de análisis que cuente con rigurosos controles de calidad, para demostrar que los datos tienen un grado específico de precisión y confiabilidad.

Presentamos la Guía para la calibración del equipo DMA-80, el cual mostrará el proceso para realizar una curva de calibración y las evaluaciones de calidad.

3. Materiales y equipos

- 01 micropipeta (volumen móvil 100 μ L)
- 01 micropipeta (volumen móvil 100 - 1000 μ L)
- 01 soporte para baquetas
- 04* baquetas de níquel (1 mL)
- 20* baquetas de cuarzo (1.5 mL)
- 01 pinza angulada (manipulación de baquetas)
- 01 par de guantes de nitrilo
- 01 probeta
- 01 frasco de vidrio de 200 mL
- Tubo de centrifugado de 15 mL
- Tubo de centrifugado de 50 mL
- Parafilm
- Sistema de Base de Datos con Software Easy Doc – Milestone
- Analizador Directo de Mercurio (DMA-80 Milestone)
- Balanza analítica (OHAUS)
- Equipo de baño ultrasónico (THORNTON)
-

4. Reactivos y Estándares

- Solución patrón de mercurio 1000 ppm (μ g/g) (100 μ L)
- Ácido nítrico al 10% (aproximadamente 0.5 mL)
- L – Cisteína (0.5 g)

*estas son las cantidades recomendadas, pero si no hay suficientes se puede lavar baquetas en el medio del proceso.

5. Procedimiento Operativo

El procedimiento de calibración seguirá el siguiente flujo:

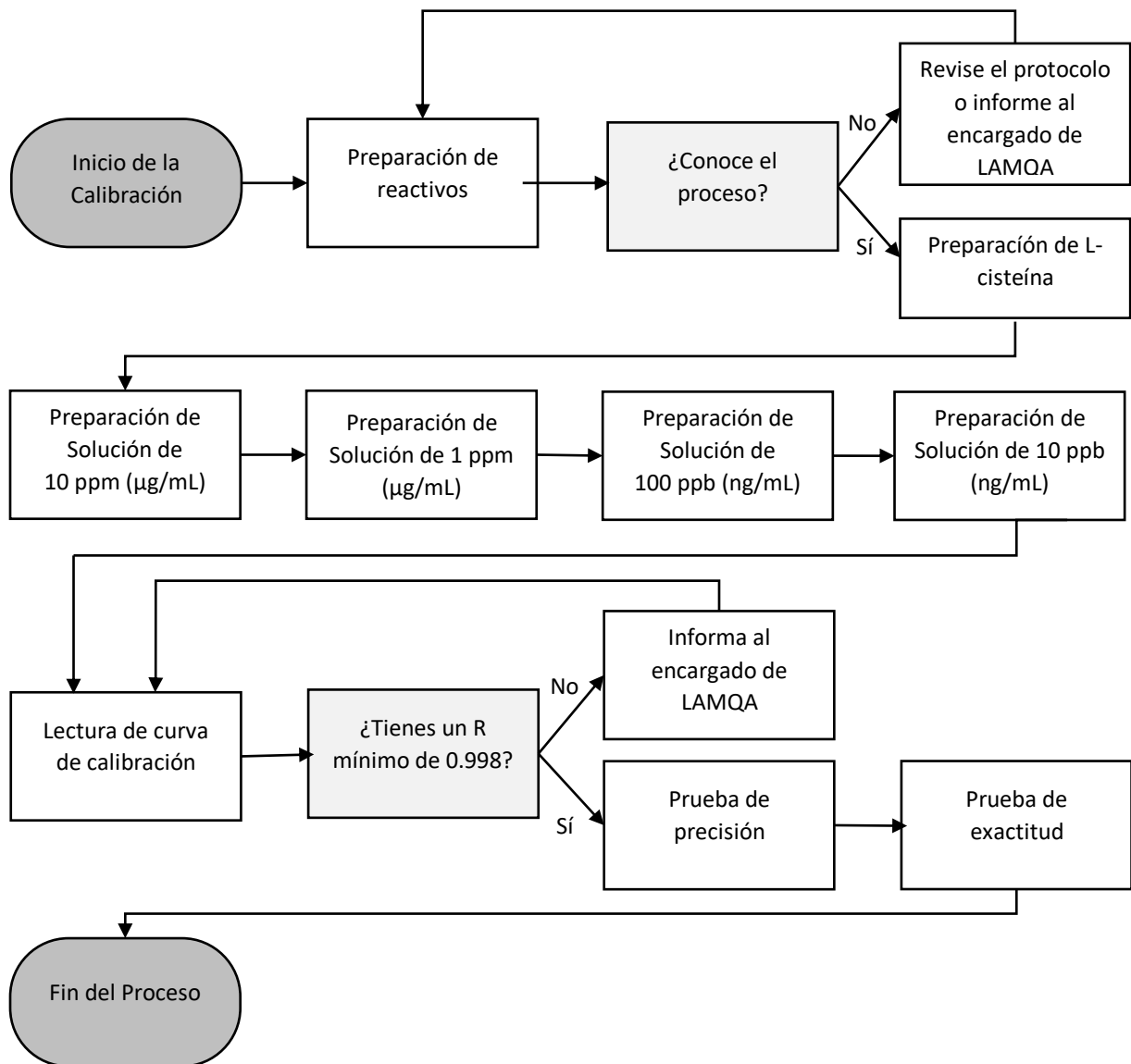


Fig. 1 Diagrama de flujo de la calibración del equipo DMA-80

5.1 Equivalencias

Para realizar los cálculos que requiere la elaboración de la curva de calibración del equipo DMA-80 es necesario conocer o recordar las siguientes equivalencias:

Unidad	Nombre	Equivalencias en masa	Equivalencia entre unidades
Ppm	Partes por millón	1 ppm = 1 µg/g = 1 µg/mL	1 ppm = 1000 ppb
Ppb	Partes por billón	1 ppb = 1 ng/g	1 mL = 1 g 1 mL=1000 µL

5.2 Preparación de L-Cisteína

La L-Cisteína será utilizada para la elaboración de los estándares de calibración y su preparación es la siguiente:

- Poner papel de pesaje y tarar
- Pesar 0.5 g de L-Cisteína usando papel de pesaje
- Colocar los 0.5 g de L-Cisteína en un frasco de vidrio
- Medir 200 mL de agua destilada en una probeta.
- Agregar los 200 mL de agua destilada
- Colocar el frasco de vidrio con la solución de L-Cisteína en el equipo de baño ultrasónico durante 11 minutos o hasta ya no observar material en suspensión en la solución.
- Para guardar la solución preparada, colocar parafilm alrededor de la tapa para conservar el contenido y guardar en la refrigeradora (4-10 °C).

En caso se cuente con un Stock preparado de L-Cisteína, omita este paso.

Nota: Para evitar derramar la solución de L-Cisteína + agua destilada en el frasco de 200 mL, esta puede ser transferida a un tubo de centrifugado de 50 mL, cada vez que realice las diluciones.

5.3 Preparación de solución de estándares de calibración

Para la preparación de los estándares se harán soluciones con diferente concentración de mercurio: 10 ppb, 100 ppb, 1 ppm (1000 ppb) y 10 ppm. Iniciándose con la solución de 10 ppm que será obtenida diluyendo la solución madre de 1000 ppm. Todas las soluciones deben ser debidamente rotuladas, cerradas con parafilm y almacenadas en refrigerador (4°C) después de su uso.

Nota: Se mantiene un volumen de 10 mL de la solución patrón de 1000 ppm en el refrigerador (en un tubo de centrifugado de 50 mL), separado del frasco original, para evitar la posible pérdida de Hg por abrir repetidas veces el frasco original.

Para iniciar las diluciones debemos tener en cuenta la fórmula del **Factor de dilución**:

$$V_i \times C_i = V_f \times C_f \quad \text{ó} \quad V_i = \frac{V_f \times C_f}{C_i} \quad \text{ó} \quad C_f = \frac{V_i \times C_i}{V_f}$$

Donde:

V_i = Volumen de la solución madre o inicial que se tomó para hacer la dilución.

C_i = Concentración de la solución madre o inicial.

V_f = Volumen de la solución diluida que se preparó o final.

C_f = Concentración de la solución diluida o final.

Todos los volúmenes empleados en la elaboración de las soluciones estándar son pesados con la balanza analítica, y el peso en gramos registrado y usado para el cálculo de la concentración real.

Para el cálculo de la concentración real, usamos el peso y modificamos la fórmula así:

$$C_f = \frac{M_i \times C_i}{M_f}$$

Donde C es la concentración expresada $\mu\text{g/g}$, y M es el peso en gramos (g).

Todos los pesos y cálculos realizados deben ser anotados en el cuaderno de laboratorio, en éste se encuentra el registro histórico de la elaboración de todas las curvas de calibración

5.3.1 Solución de 10 ppm ($\mu\text{g/mL}$):

a) Cálculo del Volumen inicial (V_i):

Para diluir 1000 ppm (solución patrón) a 10 ppm, deberá utilizar la fórmula del factor de dilución y hallar el volumen inicial ("X" mL):

$$\text{"X" mL} = \frac{10 \text{ mL} \times 10 \mu\text{g/mL}}{1000 \mu\text{g/mL}} = 0.1 \text{ mL} = 100 \mu\text{L}$$

b) Proceso de dilución:

- Tomar un tubo de centrifugado de 15 mL, colocarlo en la balanza (utilizando un vaso de precipitación como soporte) y tarar.

- Colocar con la micropipeta el volumen inicial (V_i) **0.1 mL (100 μ L)** de la solución patrón de mercurio de **1000 ppm** y registrar el peso del volumen en el cuaderno.
- Enrasar con L-Cisteína a 10 mL, llevar nuevamente a la balanza, pesar y anotar el peso de la solución (V_f) en el cuaderno. Para enrasar puede utilizar un tubo de centrifugado de 15 mL y llenarlo con la solución de L-Cisteína.
- Obtener la concentración final de la solución estándar

Ejemplo:

$$C_f = \frac{0.1021 \text{ g} \times 1000 \text{ } \mu\text{g/g}}{10.1562 \text{ g}} = 10.0530 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Esta concentración final refleja con mayor exactitud, la concentración real de la solución estándar de 10 μ g/g.

- Luego de hecho el cálculo de la concentración real, debe ser colocado en el tubo, junto con la fecha de elaboración.

Ejemplo: STD 10.0530 ppm ENE/27/2020

- Cerrar y sellar con parafilm.

5.3.2 Solución de 1 ppm (μ g/mL):

a) Cálculo del Volumen inicial (V_i):

Para diluir 10 ppm a 1 ppm, deberá utilizar la fórmula del factor de dilución y hallar el volumen inicial ("X" mL):

$$\text{"X" mL} = \frac{10 \text{ mL} \times 10 \text{ } \mu\text{g/mL}}{100 \text{ } \mu\text{g/mL}} = 1 \text{ mL} = 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

b) Proceso de dilución:

- Tomar un tubo de centrifugado, colocarlo en la balanza (utilizando un vaso de precipitación como soporte) y tarar.
- Colocar con la micropipeta el volumen inicial (V_i) **1 mL (1000 μ L)** de la dilución de **10 ppm**, llevarlo a la balanza, pesar y anotar este peso.
- Enrasar con L-Cisteína a 10 mL, llevar nuevamente a la balanza, pesar y anotar este peso.

- Obtener la concentración final:

Ejemplo:

$$C_f = \frac{1.0078 \text{ g} \times 10.0530 \text{ } \mu\text{g/g}}{10.0595 \text{ g}} = 1.0071 \text{ } \mu\text{g/g}$$

Esta concentración final refleja con mayor exactitud la concentración real del estándar diluido de 10 $\mu\text{g/g}$.

- Luego de hecho el cálculo de la concentración real, debe ser colocado en el tubo, junto con la fecha de elaboración.

Ejemplo: STD 1.0071 ppm ENE/27/2020

- Cerrar y sellar con Parafilm.

5.3.3 Solución de 100 ppb (ng/mL):

a) Cálculo del Volumen inicial (Vi):

Para diluir 1 ppm a 100 ppb, deberá utilizar la fórmula del factor de dilución y hallar el volumen inicial ("X" mL):

$$\text{"X" mL} = \frac{10 \text{ mL} \times 0.1 \text{ } \mu\text{g/mL}}{1 \text{ } \mu\text{g/mL}} = 1 \text{ mL} = 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

b) Proceso de dilución:

- Tomar un tubo de centrifugado, colocarlo en la balanza (utilizando un vaso de precipitación como soporte) y tarar.
- Coger el tubo de centrifugado y colocar con la micropipeta el volumen inicial (Vi) **1 mL (1000 μL) de la dilución de 1 ppm**, llevarlo a la balanza, pesar y anotar este peso.
- Enrasar con L-Cisteína a 10 mL, llevar nuevamente a la balanza, pesar y anotar el peso.
- Obtener la concentración final:

$$C_f = \frac{1.0063 \text{ g} \times 1.0071 \text{ } \mu\text{g/g}}{10.0143 \text{ g}} = 0.1012 \text{ } \mu\text{g/g} \text{ ó } 101.1998 \text{ ppb}$$

- Luego de hecho el cálculo de la concentración real, debe ser colocado en el tubo, junto con la fecha de elaboración:

Ejemplo: STD 101.1998 ppb ENE/27/2020

- Cerrar y sellar con parafilm

5.3.4 Solución de 10 ppb (ng/mL):

a) Cálculo del Volumen inicial (Vi):

Para diluir 100 ppb a 10 ppb, deberá utilizar la fórmula del factor de dilución y hallar el volumen inicial ("X" mL):

$$\text{"X" mL} = \frac{10 \text{ mL} \times 0.01 \text{ } \mu\text{g/mL}}{0.1 \text{ } \mu\text{g/mL}} = 1 \text{ mL} = 1000 \text{ } \mu\text{L}$$

b) Proceso de dilución:

- Tomar un tubo de centrifugado, colocarlo en la balanza (utilizando un vaso de precipitación como soporte) y tarar.
- Coger el tubo de centrifugado y colocar con la micropipeta el volumen inicial (V1) **1mL (1000 µl) de la dilución de 100 ppb**, llevarlo a la balanza, pesar y anotar el peso.
- Enrasar con L-Cisteína a 10 mL, llevar nuevamente a la balanza, pesar y anotar este peso.
- Obtener la concentración final:

$$C_f = \frac{1.0163 \text{ g} \times 101.1998 \text{ } \mu\text{g/g}}{10.0343 \text{ g}} = 10.2498 \text{ } \mu\text{g/g}$$

- Luego de hecho el cálculo de la concentración real, debe ser colocado en el tubo, junto con la fecha de elaboración:

Ejemplo: STD 10.2598 ppb ENE/27/2020

- Cerrar y sellar con parafilm


Finalmente, en el registro histórico en el cuaderno de laboratorio escribiremos:

Preparación de estándar líquido de Hg con cisteína desde una concentración madre de 1000 ppm hasta 10 ppb	
10 ppm ->	$0.1021 \text{ g} \times 1000 \text{ ppm} / 10.1562 \text{ g} = 10.0530 \text{ ppm}$
1 ppm ->	$1.0078 \text{ g} \times 10.0530 \text{ ppm} / 10.0595 \text{ g} = 1.0071 \text{ ppm}$
100 ppb ->	$1.0063 \text{ g} \times 1.0071 \text{ ppm} / 10.0143 \text{ g} = 0.1012 \text{ ppm}$
	101.1998 ppb
10 ppb ->	$1.0163 \text{ g} \times 101.1998 \text{ ppb} / 10.0343 \text{ g} = 10.2498 \text{ ppb}$

IMPORTANTE: Guarde los estándares preparados en el refrigerador a una temperatura entre 5 y 10 °C.

6. Lectura de Curva de calibración

Con los estándares preparados podemos iniciar la curva de calibración:

- El primer paso para crear una curva de calibración es crear una carpeta nueva donde los puntos de la curva serán almacenados.
- Busque la pestaña "Calibr." y presione el ícono  para crear un archivo nuevo (Fig.2).

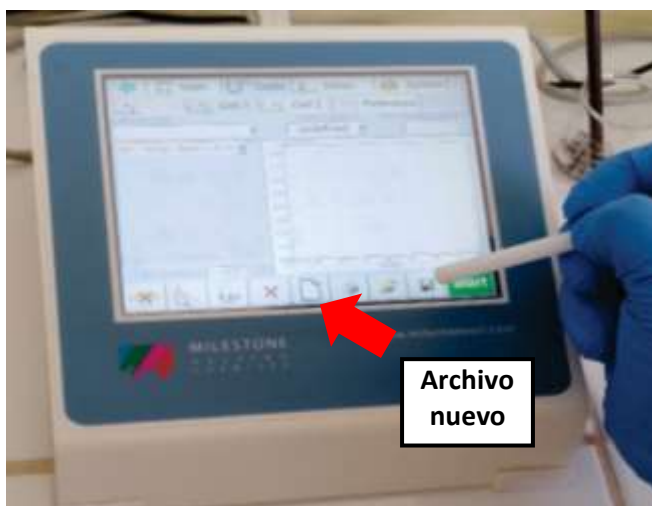



Fig. 2 Pantalla principal para crear Curva de Calibración

- En la siguiente pantalla colocar el nombre del nuevo archivo con el siguiente esquema: **MES_DIA_AÑO**. (Ejemplo: DIC_16_2019) y presione  para guardar (Fig.3).

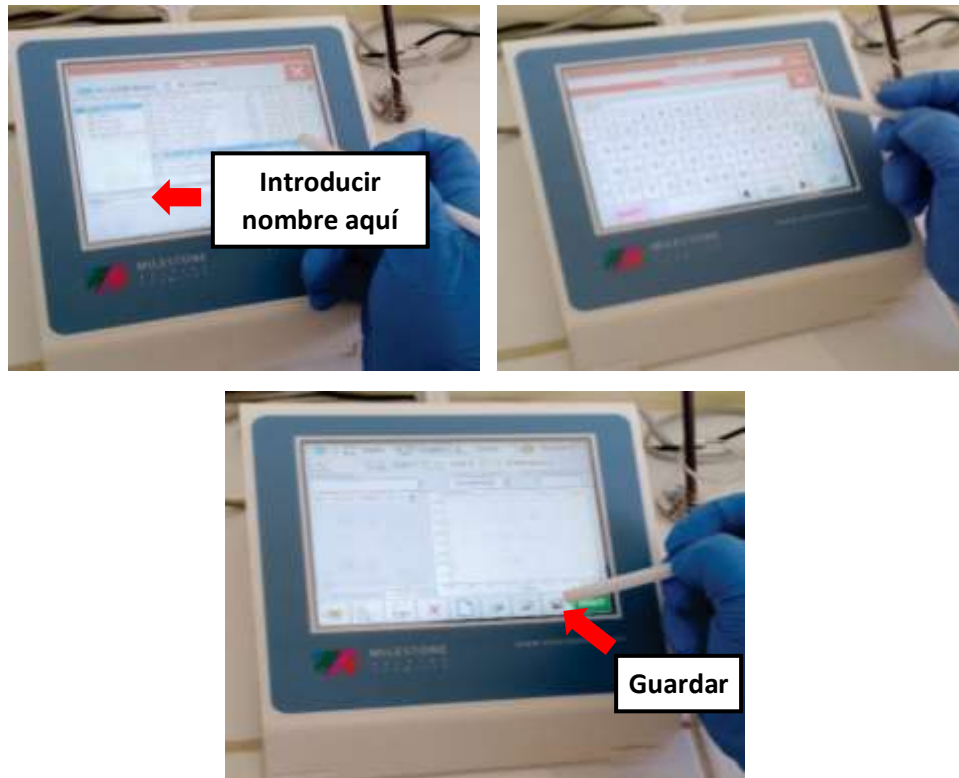


Fig. 3 Secuencia para creación de un nuevo archivo de calibración

- Volverá automáticamente al archivo “**Calibraciones**” en el data de trabajo donde se encontraba, añade una fila con el esquema: **MES/DIA/AÑO/NEW_CAL** colocar 0.1g en peso (Blanco), este paso permitirá identificar el inicio de la curva de calibración en el DMA (Fig.4).



Fig. 4 Pantalla indicando la fila de inicio de la curva de calibración

- Realizar los cálculos para cada punto de la curva de calibración, utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Hg (ng)} = \text{concentración de Hg en la solución de estándar (ng/g)} \times \text{peso de la muestra (g)}$$

Donde:

El peso de la muestra será el volumen de la solución que va a ser pipeteado y debe ser transformado a μl .

- Con los datos calculados, iniciar a cargar los estándares en el DMA tal como se detalla en el cuadro siguiente:

Nombre del punto en la curva del DMA	Nanogramos	Concentración de solución estándar	Volumen de estándar
STD_0	0 ng	Sólo L-Cisteína	100 μl
STD_1	1 ng	10 ppb	100 μl
STD_2	2 ng	10 ppb	200 μl
STD_5	5 ng	100 ppb	50 μl
STD_10	10 ng	100 ppb	100 μl
STD_20	20 ng	100 ppb	200 μl
STD_50	50 ng	1000 ppb (1 ppm)	50 μl
STD_100	100 ng	1000 ppb (1 ppm)	100 μl
STD_200	200 ng	1000 ppb (1 ppm)	200 μl
STD_500	500 ng	10 000 ppb (10 ppm)	50 μl
STD_1000	1000 ng	10 000 ppb (10 ppm)	100 μl

- Luego de cargar cada estándar, debe indicar en la columna **“State”** el símbolo **C** (esto indicará que es un punto en la curva de calibración), colocar la concentración del estándar que va a ser colocado en la **columna de concentración y peso**, vea el ejemplo para 0 ng (STD_0) (Fig.5):



Fig. 5 Pantalla de análisis indicando los datos a llenar para 0 ng de Hg

- Luego ir a la pestaña “Links” y en la columna “Cal file” seleccionar el nombre de la nueva curva de calibración que creamos previamente: **DIC_16_2019** (Fig.6).

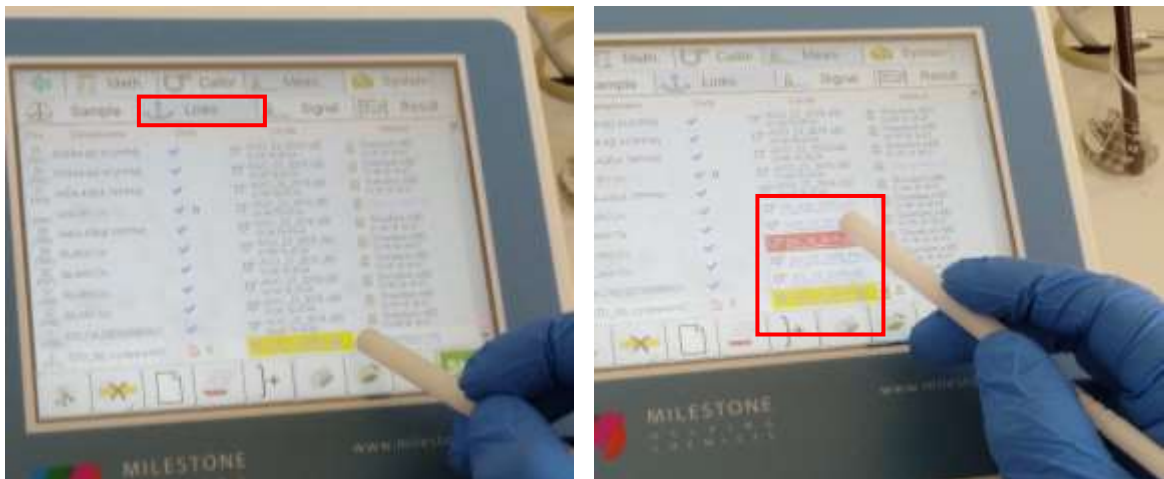


Fig. 6 Secuencia para elegir el archivo de calibración

IMPORTANTE: Luego de la lectura de cada punto de la curva **debe guardarse inmediatamente el resultado** ya que a diferencia de cuando se realizan análisis, los resultados de los puntos no se guardan automáticamente corriendo el riesgo de perderlos en caso se diera una interrupción de energía.

Luego de finalizar la curva de calibración, debemos presionar la pestaña “Calibr.”, en esta pestaña se mostrará la curva de calibración para cada célula, debemos escoger el método (lineal, cuadrática) en el cual el coeficiente de correlación (R), se aproxime lo más cerca a uno. Es importante tomar en cuenta, que el R de la curva de calibración idealmente tiene que ser como mínimo 0.998, si el R es menor a este valor, debe consultarse al encargado para ver si es necesario leer nuevamente alguno de los puntos (Fig.7).



Fig. 7 Pantalla para la elección del método aproximado para la curva de calibración creada.

Al finalizar la curva, es importante guardar toda la información y es necesario realizar un ciclo de limpieza ya que el último punto es de 1000 ng, para ello deberá leer intercaladamente un blanco seguido de una baqueta con 100 μ L de ácido nítrico al 10% realizando esa secuencia 2 o 3 veces. Es importante realizar la limpieza del equipo antes de la evaluación de los controles de calidad para evitar contaminación y efecto de memoria en la lectura.

7. Control de Calidad/Garantía de Calidad

Luego de realizada la curva de calibración, es necesario realizar un control que nos permita tener la certeza que la nueva curva se encuentra dentro de un parámetro aceptable, permitiéndonos asegurar que los resultados entregados son confiables. Para ello, realizaremos las siguientes pruebas de parámetros de validación:

7.1 Prueba de Precisión

La precisión mide cuán cerca están los resultados unos de otros por mediciones replicadas en condiciones específicas y generalmente se expresa por medidas como la desviación estándar que describe la dispersión de los resultados de los patrones calibrados (ISO ,1994 citado en Mayta, 2017).

La evaluación de precisión consistirá en leer 5 veces 10 ng de Hg, el cual, para ser aceptable, el coeficiente de variación RSD debe ser menos al 3%, la absorbancia de los 10ng deberá estar en un rango de altura de pico (height) de: 0.46-0.55.

7.2 Prueba de Exactitud

La exactitud corresponde a la proximidad entre el resultado de una medición (valor observado) y el valor verdadero del analito (valor esperado). La exactitud de un método es una expresión de cuan cerca está la media de un conjunto de resultados del valor verdadero (ISO ,1994 citado en Mayta, 2017).

Para realizar la prueba de exactitud se analizan materiales de referencia y evalúa la recuperación utilizando la fórmula:

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Valor observado}}{\text{Valor esperado}} \times 100 \%$$

Donde el porcentaje de recuperación deberá encontrarse en un rango del 90 -110 %.

Los materiales de referencia seleccionados deberán presentar diferentes rangos de concentración, para poder evaluar los diferentes rangos de la curva deberán ser leídos por lo menos 2 materiales de referencia con el objetivo de testar las 2 células cuyos rangos son: **Célula 1:** <20 ng de Hg, y la **Célula 2:** >20 ng de Hg.

Nota: Si alguno de los resultados de control de calidad no esta dentro de los parámetros aceptables, debe notificarse al encargado del laboratorio para ver siguientes pasos.

Bibliografía

Mayta A, Supo K. 2017. Optimización del tiempo de digestión de soluciones cianuradas para determinar elementos pesados por el método de arrastre de vapor frío [tesis de grado]. [Arequipa (AQ)]: Universidad de San Agustín.