

Estimación de la incertidumbre para el análisis de potencia de Insulina Humana Isofana ADN Recombinante por Cromatografía Líquida de Alta Resolución Fase Reversa según USP34 NF29 2011

Uncertainty estimation for the USP34 NF29 2011 analysis of potency Recombinant DNA Isophane Human Insulin from PR-HPLC

JHOLEISA C HERRERA C¹, TATIANA L PATÓ L¹, DUNIA M PÉREZ M², MARÍA T IBARZ H³

RESUMEN

El propósito de una medición es determinar el valor de una magnitud, llamada el mensurando. La imperfección natural de las mediciones, hace imposible conocer con certeza absoluta el valor verdadero de una magnitud, ya que toda medición lleva implícita una incertidumbre, el cual es un parámetro no negativo que caracteriza la dispersión de los valores atribuidos a un mensurando. En la presente investigación se empleó una estrategia diferente al procedimiento "bottom-up" propuesto por la ISO, el cual nos permitió estimar de forma global la incertidumbre, mediante la agrupación de valores determinados durante la verificación del método analítico. El valor obtenido en nuestro estudio fue de 3.46 IU/mL con un 90% de confianza. Observándose como fuente de mayor contribución al cálculo, el efecto de la matriz del medicamento, dependiente del tipo de insulina presente, además de la precisión y trazabilidad del patrón de referencia, los cuales contribuyen en la incertidumbre final de forma similar. En este sentido, nuestros esfuerzos deben dirigirse a la optimización de los procesos de homogeneización, adquisición del patrón de referencia tipo primario, con la finalidad de garantizar a lo largo del tiempo, resultados reproducibles, trazables y confiables.

Palabras clave: Productos biotecnológicos, insulina, formulación, especificación, cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), rango de aceptación, material de referencia certificado (MRC), variabilidad, incertidumbre, trazabilidad.

ABSTRACT

The purpose of measurement is to determine the value of a quantity, called the measurand. The natural imperfection of determining measurements, makes impossible to know with absolute certainty the true value of a magnitude, since all measurement implies an uncertainty, which is a non-negative parameter that characterize the dispersion of the values attributed to a measurand. In this research, we employed a different strategy to the "bottom-up" procedure, proposed by the ISO, which allowed us to calculate globally the uncertainty, by grouping values, determined during the verification of the analytical method. The obtained value in our study was 3.46 IU/mL with 90% confidence. The matrix effect of the drug, depending on the insulin type present inside, was observed as the bigger contribution source to the calculation, as well as the accuracy and traceability of the reference pattern, which contribute in the final uncertainty similarly. Thus, our efforts should be directed to the optimization of the homogenization processes and the acquisition of the primary type reference pattern, in order to ensure over time, reproducible, traceable and reliable results.

Key words: biotechnological products, insulin, formulation, specification, acceptance range, high resolution liquid chromatography, certified reference material, variability, uncertainty, traceability.

¹ Laboratorio de Control de Recombinantes y Terapéuticos.

² Departamento de Control de Recombinantes y Terapéuticos de la División de Control Nacional de Productos Biológicos.

³ Gerencia Sectorial de Registro y Control; Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 0212-219.17.71. jholeisa@gmail.com

INTRODUCCIÓN

La calidad y seguridad de un producto de uso y consumo humano se puede evidenciar cuando el producto es capaz de mantener sus valores determinados de potencia, concentración, pH, esterilidad, entre otros; dentro de los límites especificados. Estos valores no solo son importantes para el fabricante, en el conocimiento de la trazabilidad de los pasos individuales durante la manufactura, sino que también permite reducir la variabilidad del análisis y la trazabilidad extendida hasta el producto cuando son analizados por el Laboratorio de Control de Recombinantes y Terapéuticos (CRT) de la División de Control Nacional de Productos Biológicos, del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel".

La mayoría de los productos biotecnológicos derivados a través de la tecnología de ADN recombinante, poseen metodologías analíticas desarrolladas por el fabricante los cuales requerirán de procesos de implementación y validación por parte del laboratorio CRT, mientras que para aquellos productos como la insulina que ya poseen monografías oficiales, lo apropiado es realizar una verificación del método.

Es importante destacar que las condiciones existentes en el laboratorio relacionadas al personal, reactivos, equipos son diferentes y cualquier factor como la pureza de los solventes, el analista, las condiciones de almacenamiento del producto durante su distribución, pueden o no incidir en los resultados analíticos.

Estas incidencias pueden ser determinadas a través de la estimación de la incertidumbre de una respuesta analítica. Para el caso del ensayo de potencia de la insulina, es necesario identificar todas las fuentes de incertidumbre de los términos de la expresión utilizada para calcularla. En concreto, las fuentes de incertidumbre incluyen todos aquellos procesos que involucren a la muestra, al patrón de referencia y al análisis cromatográfico. Considerando, desde la incertidumbre del volumen del inyectable analizado, el cual dependerá de la tolerancia y de la precisión del material volumétrico empleado. La incertidumbre de la recuperación del proceso de extracción dependiente del análisis cromatográfico, de los pre-tratamientos realizados para extraer a la insulina en forma monomérica bien sea de las muestras enriquecidas o no, a través de la adición del patrón de trabajo. Por último, la incertidumbre debida a los procesos de homo-

geneización de la muestra (formación de una solución a partir de una suspensión), la cual aplica cuando la insulina está presente en forma de cristales en presencia de ligandos fenólicos y zinc como un complejo hexaédrico; de la misma manera que lo hace con pequeños agregados de protamina⁽¹⁾.

Existen muchas contribuciones a la incertidumbre del resultado final y el cálculo individual de cada una de ellas siguiendo el procedimiento "bottom-up" propuesto por la ISO resultaría ciertamente complejo. Sin embargo, es posible agrupar términos y calcular la incertidumbre de forma global, bajo la siguiente expresión (ecuación 1), donde se estima la incertidumbre expandida, a través del producto del factor de cobertura K por la raíz de la incertidumbre combinada, la cual se obtiene a partir de la sumatoria de las incertidumbres estándar de cada proceso determinado durante la verificación del método⁽²⁾:

$$U = k\sqrt{v^2 \text{precisión} + v^2 \text{trazabilidad} + v^2 \text{heterogeneidad} + v^2 \text{otros}}$$

Ecuación 1. Estimación de la incertidumbre de manera global.

Considerando la experiencia citada por el grupo de Rikke Brix y col. (2002)⁽³⁾; quienes describen la importancia del efecto de la variabilidad de los pasos individuales durante la verificación o validación de un método, en la trazabilidad extendida al resultado obtenido durante la evaluación del producto.

Esto permitió identificar los pasos esencialmente importantes, donde es posible especificar límites en relación: variación del análisis, variabilidad en la producción del análisis (ej. Composición final de la fase móvil), pureza de los reactivos o incertidumbre del material de referencia.

Sin embargo, también es necesario considerar la contribución de los excipientes que están presentes en las diferentes formulaciones que existen en el mercado venezolano, que hacen posible obtener diferentes tipos de insulina según su acción, como son: insulina de rápida acción (regular), acción intermedia (NPH y lenta) y de larga acción (ultralenta). Para la insulina regular el vehículo es una solución buffer de pH neutro (7-7.8) clara e incolora, a la cual se agrega m-cresol como preservativo, glicerol y cloruro de zinc como estabilizador. La forma hexaédrica es estabilizada por iones de zinc,

siendo la estructura cuaternaria predominante, además de otras estructuras que incluye a dímeros y tetrámeros. La molécula tiende a agregarse en el vial; el hexámero necesita dividirse para la absorción desde el sitio de inyección subcutáneo. Por esta razón, la insulina regular entra en la circulación alrededor de unos treinta minutos después de la inyección.

La absorción de NPH es retrasada por la protamina, una proteína extraída del núcleo de la esperma de pescado. En el cristal de insulina, la protamina regula la interacción entre dímero y hexámeros. El vehículo es un buffer de pH 6.9-7.5. Fenol y m-cresol son añadidos como preservativos. Los cristales de insulina son insolubles y tienden a precipitar en el fondo del vial. La insulina de larga acción (ultralenta) es una suspensión acuosa de cristales de zinc a pH neutro, de apariencia lechoza; tiene un tiempo de acción después de cuatro horas de aplicación ⁽⁴⁾.

El propósito de nuestra investigación, es obtener los valores de incertidumbre estándar correspondientes a la precisión intermedia, a la verificación de la trazabilidad del material de referencia, a la heterogeneidad de la muestra y a el efecto que puede dar la matriz que compone al producto durante la valoración de insulina, para finalmente calcular la incertidumbre global con un factor de cobertura de un 90% de confianza ($k=1.645$) (Ecuación. 1).

MATERIALES Y METODOS

• Reactivos

Para el ensayo de potencia HPLC se emplea como muestras insulina de acción rápida, insulina NPH e insulina humana isófona bifásica, obtenidas por tecnología ADN recombinante; agua calidad Milli-Q, sulfato de sodio anhidro (min 99%) para análisis, ácido fosfórico al 85%, acetonitrilo grado HPLC, etanolamina al 99% y ácido clorhídrico 9,6 N grado reactivo.

• Instrumental

Cromatógrafo Líquido de Alta Resolución: equipo HPLC Agilent serie 1100 acoplada a una computadora Hewlett- Packard HP PC x 86 Family 6 model 8 Step-pieng 10 AT/AT compatible con sistema Microsoft Windows 2000 126.520 KB de RAM. Columna: Zorbax 300SB-C18 5 μ m 4.6 x 150 mm; detección UV (214 nm)

Ensayo: USP 34 NF29 2011

Fase móvil: Disolver 28.4 g de sulfato de sodio anhidro en 1.000 mL de agua MilliQ, medir con la ayuda de una pipeta 2.7 mL de ácido fosfórico, transferir a la solución, y si fuera necesario ajustar con etanolamina a un pH= 2.3. Preparar una mezcla de la solución anteriormente mencionada y acetonitrilo (74:26). Entibiar el acetonitrilo a una temperatura de 20° o más para evitar precipitación en la solución.

• Preparación del estándar

En el ensayo se empleó un material de referencia secundario (98.8 IU/mL correspondiente a 3.4284 mg puros de insulina humana/mL) Intervalo 99.7%-100.3% con un 95% de confianza. Se diluyó hasta obtener una concentración final de ~1,5 mg/mL en ácido clorhídrico 0,01 N.

• Preparación de la solución de aptitud del sistema

Diluir el material de referencia secundario hasta obtener una concentración de aproximadamente 1,5 mg de insulina en 1,0 mL de ácido clorhídrico 0,01 N. Dejar en reposo a temperatura ambiente, durante no menos de tres días para obtener una solución que contenga no menos de 5% de desamido insulina A-21.

• Preparación de la muestras

Se realizó un pool con las muestra según el tipo de insulina a analizar; luego se agregó 2.5 μ L de ácido clorhídrico 9.6 N por cada mililitro de un volumen exactamente medido. Para finalmente medir 2 mL de la solución resultante, y transferir a un matraz aforado de 5 mL, diluir y enrazar con ácido clorhídrico 0.01 N en 5 mL.

• Calculo de potencia

En unidades USP de insulina humana por mL de Inyección, a través de la fórmula:

$$(CD) \left(\frac{\sum ru}{\sum rs} \right)$$

Donde:

C: es la concentración, en unidades USP de insulina humana por mL, del material de referencia Insulina Humana USP en la preparación de la solución estándar.

D: es el factor de dilución.

$\sum ru$: sumatoria de las áreas de los picos de insulina y de insulina desamido A-21 obtenidas de los cromatogramas de la muestra.

$\sum rs$: sumatoria de las áreas de los picos de insulina y de insulina desamido A-21 obtenidas de los cromatogramas de la solución estándar.

• Método

El propósito de la presente investigación es determinar la incertidumbre de la respuesta analítica del ensayo de potencia por HPLC-PR, de acuerdo a lo establecido en las monografías de insulina humana ADN recombinante, insulina humana isófona ADN recombinante e insulina humana isófona bifásica ADN recombinante de la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP34 NF29 2011⁽⁵⁾. A través del parámetro de precisión empleado durante la verificación del método. Es importante destacar que los analistas poseen la experiencia con el análisis de HPLC y con la interpretación de los requerimientos de la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP34 NF29 2011.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, debe verificarse la trazabilidad y exactitud de la potencia de insulina expresada en el Material de Referencia Certificado (MRC). En este caso se utilizó un MRC, cuya potencia declarada de insulina humana ADN recombinante es de $98,8 \pm 0,3$ IU/mL (correspondiente a 3,4284 mg puros de insulina humana/mL) con un 95% de confianza; lo que indica que la incertidumbre se había calculado utilizando un factor de cobertura de $k=1,96$.

El MRC se analizó diez veces en el laboratorio CRT en condiciones intermedias siguiendo el protocolo del método analítico. Los resultados obtenidos (expresados en UI/mL de Insulina) se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1
Resultados de análisis del MRC

Análisis	Resultado
1	98,8000
2	99,2670
3	99,3704
4	98,9076
5	99,0323
6	99,6343
7	99,6100
8	99,5151
9	99,7060
10	99,7543
Promedio	99,3597
s (desviación estándar)	0,35
RSD (desviación estándar relativa)	0,35

Para verificar la probabilidad de que los dos promedios (calculado vs declarado en el certificado) pertenezcan a un mismo conjunto de datos, se realizó un test *t-Student*:

$$t_{cal} = \frac{|\bar{X}_{MRC} - \bar{X}_{método}|}{\sqrt{\left(\frac{U_{MRC}}{k}\right)^2 + \left(\frac{s_i}{\sqrt{n}}\right)^2}} = \frac{|98,8 - 99,36|}{\sqrt{\left(\frac{0,30}{1,96}\right)^2 + \left(\frac{0,35}{\sqrt{10}}\right)^2}} = 2,98$$

Donde el X_{MRC} es la concentración certificada de insulina humana ADN recombinante, U_{MRC} es la incertidumbre asociada a dicha concentración y n es el número de veces que se analizó el MRC con el método analítico (en este caso, $n=10$). El valor de t calculado, t_{cal} , debe compararse con el valor de t tabulado de dos colas para 9 grados de libertad y un nivel de significación α (en este ejemplo $\alpha = 10\%$).

El valor de t tabulado es 3,25 mayor al t calculado, lo que indica que no existe diferencias significativas, que pertenecen a un mismo conjunto de datos y por lo tanto, los resultados proporcionados por el método son trazables al valor certificado del MRC.

Una vez verificada la trazabilidad del MRC, se puede trasladar dicha trazabilidad a los resultados obtenidos.

dos al analizar las muestras de rutina de insulina humana ADN recombinante. Para ello, es necesario que las muestras analizadas en la rutina sean similares al MRC empleado, en términos de concentración y de matriz.

En este sentido, es conveniente que el método esté bajo condiciones controladas de aseguramiento de la calidad para poder garantizar a lo largo del tiempo que los resultados siguen siendo trazables. Debido a que es primera vez que nos encontramos verificando la metodología con el empleo de un material de referencia, tipo patrón secundario, en forma de suspensión, se trabajó con un rango del 90% de confianza.

Cálculo de los diferentes componentes de incertidumbre

Cada uno de los diferentes términos de incertidumbre de la ecuación 1 propuesta, se pueden obtener a partir de la información suministrada durante la verificación del método.

1. Incertidumbre debida a la precisión

La incertidumbre debida a la precisión corresponde a la precisión intermedia del método analítico, determinada entre condiciones de repetibilidad y reproducibilidad, por tanto, un parámetro muy importante ya que nos da una idea de la variabilidad que pueden tener los resultados dentro de un laboratorio.

La precisión intermedia del método puede obtenerse a partir del análisis del MRC.

$$u_{\text{precisión}} = \frac{s_i}{\sqrt{N}} = \frac{0,35}{\sqrt{1}} = 0,35 \text{ UI / mL}$$

Donde S_i es la desviación estándar de los 10 resultados obtenidos al analizar el MRC y N es el número de veces que se analiza la muestra de rutina en condiciones intermedias (normalmente, $N=1$).

2. Incertidumbre debida al proceso de verificación de la trazabilidad

Se calcula tomando en cuenta la incertidumbre de la referencia y la precisión intermedia del método.

$$u_{\text{trazabilidad}} = \sqrt{\left(\frac{U_{\text{MRC}}}{k}\right)^2 + \left(\frac{S_i}{\sqrt{n}}\right)^2} = \sqrt{\left(\frac{0,3}{1,96}\right)^2 + \left(\frac{0,35}{\sqrt{10}}\right)^2} = 0,19 \text{ UI / mL}$$

El primer término de la expresión corresponde al cuadrado de la incertidumbre estándar del MRC dividida por el factor de cobertura k igual a 1,96, ya que se describe en el certificado del material de referencia, que la incertidumbre fue calculada con un 95% de confianza y el segundo término corresponde a la incertidumbre asociada al valor medio obtenido al analizar 10 veces el MRC.

3. Incertidumbre debida a la heterogeneidad de la muestra

Para calcular la incertidumbre de la heterogeneidad, se realizó la homogeneización de 6 alícuotas de 2 mL, extraídas del pool de una muestra en suspensión (Insulina humana isófona ADN recombinante NPH) con ácido clorhídrico HCL 9,6 N. Luego cada alícuota se llevó hasta volumen 5 mL con HCL 0,01 N y se analizaron como indica el procedimiento analítico.

Cada una de las 6 determinaciones se analizó en condiciones de repetibilidad. Obteniéndose los siguientes resultados (tabla 2):

Tabla 2
Resultados de las 6 determinaciones de Insulina Humana Isófona ADN recombinante Homogeneizadas

Determinación	Resultado
1	100,67
2	101,43
3	100,99
4	102,06
5	101,67
6	101,66
Promedio	101,41
s (desviación estándar)	0,49
RSD (desviación estándar relativa)	0,49

La incertidumbre de la heterogeneidad corresponde a la desviación estándar de los resultados obtenidos al analizar las 6 determinaciones de la muestra:

$$u_{\text{heterogeneidad}} = \sqrt{S^2_{\text{determinaciones}}} = 0,49 \text{ UI / mL}$$

4. Incertidumbre debida a otros términos

En este caso se evaluó la posible interferencia de la matriz en los resultados finales, ya que según sea el tipo de acción de la insulina, esta tendrá agregados que permitan el efecto y la liberación de la insulina en el tiempo, por tanto nosotros consideramos de gran utilidad analizar bajo el mismo método a la insulina humana ADN recombinante (insulina regular) y a la Insulina humana isófona bifásica ADN recombinante (insulina 70/30); considerándose a los excipientes un término más de incertidumbre.

La incertidumbre debido a otros términos, es el resultado de la estimación de la incertidumbre estándar para una muestra seleccionada al azar de insulina R e insulina 70/30, en condiciones de repetibilidad. Para el caso de efecto de la protamina en el tiempo la misma muestra anteriormente analizada de insulina 70/30 se analizó al transcurrir 6 horas después de acidificar a las muestras en el proceso de homogeneización (Tabla 3).

Tabla 3

Resultados de la estimación de la incertidumbre según la matriz de la muestra

	Incertidumbre (UI/mL)
Muestras Insulina R	0,11
Muestra Insulina 70/30	0,23
Muestra Insulina 70/30 efecto de la protamina en el tiempo	1,99

5. Cálculo de la incertidumbre final

La incertidumbre final de los resultados se obtiene a través del producto del factor de cobertura K por la raíz de la incertidumbre combinada, tal como lo muestra la ecuación 1. La incertidumbre final, se ha calculado empleando un factor de cobertura $k = 1,645$. Por tanto, hay aproximadamente un 90% de confianza de que la potencia verdadera de la insulina humana ADN recombinante, esté contenida dentro del intervalo de la potencia resultante de la muestra más o menos la incertidumbre asociada, U . Por tanto el valor de Incertidumbre global es:

$$U = 1,645 \sqrt{(0,35)^2 + (0,19)^2 + (0,49)^2 + (0,11)^2 + (0,23)^2 + (1,99)^2} = 3,46 \text{ UI / mL}$$

La Fig. 1 muestra cómo contribuye cada uno de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total. Se observa que la incertidumbre debida al efecto de liberación de los monómeros de insulina por parte de la interacción con la protamina, en muestras de insulina humana isófona bifásica, genera mayor contribución a medida que pasa el tiempo durante la homogeneidad de la muestra hasta el momento de analizar en el HPLC, seguido a la asociada con la heterogeneidad de la muestra, ambas depende del efecto de la matriz de las muestras.

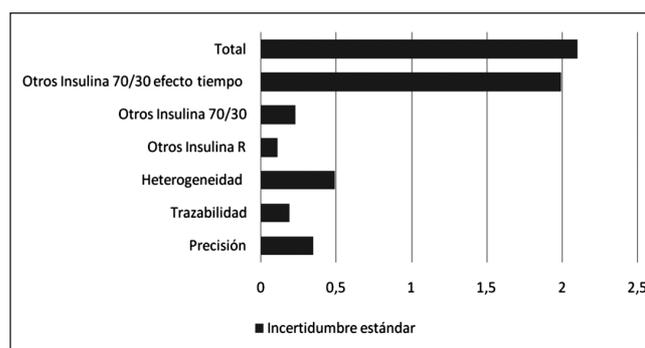


Figura 1. Contribución de los componentes de incertidumbre a la incertidumbre total. Todos los términos de incertidumbre están expresados como incertidumbre estándar, u.

Por otra parte, se puede observar que las incertidumbres asociadas a la precisión y a la trazabilidad contribuyen a la incertidumbre final en menor intensidad, debido a que son estimadas a partir del MRC empleado en el estudio.

En este sentido, debemos optimizar el proceso de homogeneización de la muestra, debido a que los péptidos de protamina agregados en la formulación, protegen a la insulina de la co-precipitación a pH neutro, formando un precipitado blanco amorfo, producto de la interacción entre las cargas negativas de la insulina y los cationes de la protamina, los cuales gradualmente se van transformando en cristales tetragonales; que prolongan la acción de la insulina.

Durante el análisis cuando son acidificadas las muestras el complejo insulina-protamina es disociado y disuelto. Pero a medida que pasa el tiempo, durante la permanencia de las muestras a 25 °C en el carrusel del automuestreador del HPLC, se van formando productos tales cuales: insulina unida la protamina y dímeros de insulina unidos de forma covalente, los cuales pueden

afectar los resultados de la potencia de la insulina⁽⁶⁾. Por lo que debemos considerar el tiempo que transcurre una vez homogeneizada las muestras y el resultado de integración del pico cromatográfico obtenido durante el análisis, ya que el tiempo no solo incide en lo anteriormente expuesto, sino que también contribuye a la formación del principal producto de degradación (insulina desamido A-21).

Otra posibilidad para disminuir la incertidumbre final según la precisión y trazabilidad de los resultados, es hacer uso del material de referencia primario.

CONCLUSIÓN

En la presente investigación, se describió como realizamos el cálculo de incertidumbre en un análisis cromatográfico; identificando en primer lugar las numerosas fuentes de incertidumbre^(7,8), que están presentes en el proceso para la determinación de la potencia de insulina humana ADN recombinante. Posteriormente se calculó globalmente la incertidumbre, agrupando las fuentes de incertidumbre en cuatro componentes principales. La ventaja de dicha estrategia es que el cálculo se hace más sencillo, debido a que se aprovecha la información obtenida durante el proceso de verificación del método, según la monografía oficial de insulina humana ADN recombinante de la Farmacopea de los Estados Unidos de América USP34 NF29 2011.

El valor obtenido en nuestro estudio fue de 3.46 UI/mL con un 90% de confianza. Observándose como fuente de mayor contribución al cálculo, el efecto de la matriz del medicamento, dependiente del tipo de insulina presente y la heterogeneidad de la muestra. Mientras

que en menor grado, se encuentran la precisión del método y la trazabilidad del patrón de referencia. Por lo tanto, nuestros esfuerzos deben dirigirse a la optimización de los procesos de homogeneización, adquisición del patrón de referencia tipo primario, con la finalidad de garantizar a lo largo del tiempo, resultados reproducibles, trazables y confiables.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- (1) Yip CM, Brader ML, Frank BH, DeFelippis MR, Ward MD. Structural Studies of a Crystalline Insulin Analog Complex with Protamine by Atomic Force Microscopy. *Biophys J.* (2000). 78(1). p. 466-73.
- (2) Alicia Maroto. Cálculo de incertidumbre en medidas químicas: análisis cromatográfico. (2012). <http://www.quimica.urv.es/quimio>. (consultado 3 de Julio de 2012).
- (3) Brix R, Spliid H, Hansen SH, Sorensen E. From experimental design to uncertainty estimation for the European Pharmacopoeia HPLC analysis of human insulin. *Analyst.* (2002). 127(12). p. 1676-81.
- (4) Gualandi-Signorini AM, Giorgi G. Insulin formulations- a review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* (2001). 5(3). p. 73-83.
- (5) Monografía: Insulina, Inyección. (2011). USP34/NF 26. p. 3464-3469.
- (6) Hvass A, Skelbaek-Pedersen B. Determination of protamine peptides in insulin drug products using reversed phase high performance liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* (2005). 37(3). p. 551-7.
- (7) BIPM, IEC, FCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML, Guide to the expression of uncertainty in measurement, ISO, Ginebra (1993).
- (8) EURACHEM/CITAC, Quantifying uncertainty in analytical measurement, EURACHEM/CITAC Guide, 2 ed. (2000). Disponible en: <http://www.eurachem.bam.de/>. (consultado 3 de Julio de 2012).