



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**CONTRIBUCIÓN DE LA EXACTITUD DE LA ESCALA FOTOMÉTRICA
DEL ESPECTRÓMETRO EN LAS REGIONES ULTRAVIOLETA-VISIBLE
A LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA**

**TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS
DE EDUCACIÓN CONTINUA**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

ANDREA RAMÍREZ DE LA GARZA



MÉXICO, D.F.

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


JURADO ASIGNADO:

Presidente ERNESTINA CERVERA FLORES
Vocal SILVIA DE JESÚS MENDOZA ARELLANO
Secretario MARÍA DE LOS ÁNGELES OLVERA TREVIÑO
1er. Suplente ADOLFO GARCÍA OSUNA
2do. Suplente RAUL LUGO VILLEGAS

Sitio donde se desarrolló el tema:

Unidad de Metrología de la Facultad de Química

Asesor del tema:



María de los Ángeles Olvera Treviño

Sustentante:



Andrea Ramírez de la Garza

¡Gracias!

A mi mamá Linda y a mi mamá Pachis, por haberme dado la gran aventura que se llama vida, por su ejemplo de entereza y lucha que atesoraré eternamente y por su incansable amor: GRACIAS.

A Sandra, mi maestra, mi sabia consejera, mi gran compañera, mi amiga, mi hermana; por estar conmigo siempre: GRACIAS.

A César, Fernando, Carlos y a mi estrellita; su inocencia repleta de pureza, renueva mis esperanzas de que el mundo sí puede ser mejor: GRACIAS.

A Javier, porque todo lo bueno y todo lo mejor de mi vida llegó contigo: GRACIAS.

A mi gran familia, orgulloso semillero de grandes hombres y de mujeres excepcionales: GRACIAS.

A mis amigos y camaradas, interminable lista, afortunada soy de tenerlos a todos y cada uno de ustedes; por estar en todo momento a mi lado: GRACIAS.

A mi querida Facultad de Química, por toda la riqueza académica que brota en cada rincón, en cada pasillo, en cada salón: GRACIAS.

A mis profesores, por hacer de su profesión su pasión y su sacramento: GRACIAS.

Mi reconocimiento a la Profesora María de los Ángeles Olvera, por sus esfuerzos de impulsar una rama fundamental del conocimiento científico, y por su acertada dirección al presente trabajo: GRACIAS.

A mi México Querido, pueblo valiente hasta la victoria siempre, gente que con sus manos trabajadoras, costó mi educación completa, cristalizando así mis sueños y mis metas; y los de muchos otros como yo: GRACIAS.

¡Gracias!

INDICE

	Página
1. Introducción	1
2. Información general sobre el tema	2
Definiciones	3
Generalidades de la técnica de espectrofotometría Ultravioleta-Visible	5
Los componentes principales de un espectrofotómetro	6
Ejemplo de una Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica	6
3. Discusión	14
Propuesta de Validación	14
Determinación del Mensurando	17
Determinación de las Fuentes de Incertidumbre	17
Determinación del Modelo Matemático	17
Determinación de la Ecuación de Incertidumbre combinada	18
Contribución de cada una de las Fuentes a la estimación de la incertidumbre ...	18
Determinación de los Grados de Libertad	19
Determinación del Coeficiente de expansión K	19
Determinación del Valor de la incertidumbre expandida	19
4. Conclusiones	20
5. Bibliografía	22

CONTRIBUCIÓN DE LA EXACTITUD DE LA ESCALA FOTOMÉTRICA DEL ESPECTRÓMETRO EN LAS REGIONES ULTRAVIOLETA-VISIBLE A LA INCERTIDUMBRE DE MEDIDA

1.- INTRODUCCIÓN

Debido a que cada vez mayor número de laboratorios, y algunos organismos gubernamentales regulatorios trabajan bajo los requisitos de la NMX-EC-17025-IMNC-2005, ISO 9001 2000, o algún otro parámetro de Calidad, ha aumentado el nivel de confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios. Otro punto importante, derivado de lo anterior, es el hecho de que se ha buscado que todas las mediciones realizadas siempre estén acompañadas de su respectivo valor de incertidumbre; ésto obliga a cada parte involucrada en dicho proceso de medición a hacer una contribución veraz del cálculo de incertidumbre, ya sea el mismo laboratorio, los proveedores de servicios o materiales, o cualquier otro involucrado; para que el usuario final pueda utilizar esos resultados de manera confiable al realizar su propio cálculo de incertidumbre. El conocimiento del valor de la incertidumbre de una medición permite evaluar de manera adecuada si un resultado cumple con las especificaciones propias del método, cumple sus límites de tolerancia o permite tomar decisiones acerca de la aceptación de un resultado con respecto al cumplimiento de Límites regulatorios. También permite evaluar variaciones en las mediciones entre un lote y otro, y de esta manera implementar mecanismos de mejora continua en los procesos.

En el caso particular de las mediciones realizadas utilizando la técnica de espectroscopia de Ultravioleta-Visible, una de las partes fundamentales de esta técnica es en sí la capacidad de respuesta del espectrofotómetro empleado. Dado que es un instrumento de medición analítica, no aplica como tal una Calibración al instrumento; por esa razón resulta de vital importancia que el laboratorio, como parte de su Sistema de Aseguramiento de la Calidad, implemente un programa periódico de mantenimiento adecuado y verificación de esta capacidad de medición, se recomienda que la evidencia del cumplimiento del programa anterior se presente como un programa de Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica, el cual tiene como fin asegurar que el desempeño del instrumento está de acuerdo a las especificaciones establecidas por el laboratorio y el proveedor, y que también es apropiado para el uso propuesto.

Una vez que el instrumento ha sido calificado, es importante también realizar un programa de validación de métodos, el cual no estaría completo sin su propuesta para el cálculo de la incertidumbre.

2.- INFORMACIÓN GENERAL SOBRE EL TEMA

La prueba de interés para este trabajo es la prueba de medición de la exactitud de la escala fotométrica, la cual consiste en realizar un barrido espectrofotométrico de una disolución de referencia de Dicromato de potasio en ácido sulfúrico 0,01 N (60,06 mg/L) y comparar las lecturas de absorbancias leídas a las Longitudes de onda donde existen los máximos y mínimos característicos del espectro.

Dado que esta prueba es una de las pruebas incluidas dentro de la calificación operacional del instrumento, el laboratorio debe tenerla implementada dentro de su programa de Calificación; o bien, solicitar el servicio de Calificación a un tercero con la competencia técnica para realizarla. Por otra parte, es importante determinar cual es la incertidumbre de cada una de las pruebas, lo cual permite tener los elementos necesarios para tomar decisiones acerca de que si los resultados obtenidos durante el desarrollo de las pruebas cumplen con las tolerancias especificadas para cada método.

A fin de entender adecuadamente los términos utilizados en el presente trabajo, y de entender en que parte de la calificación del instrumento se encuentra la prueba anteriormente mencionada, se incluye una sección de Definiciones, una de generalidades del método de espectrofotometría Ultravioleta-Visible, un ejemplo de una Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica y un ejemplo de la Calificación Operacional de un espectrofotómetro:

Definiciones [1, 2]:

1.- Validación: Es la confirmación por examen y la provisión de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico propuesto [3]. Establece las características de desempeño y limitaciones de un método de medición y la identificación de aquellas influencias que pueden modificar estas características y a que grado lo afectan. La validación de un método involucra varias pruebas, y los resultados obtenidos de algunas de estas pruebas pueden ser utilizados para realizar el cálculo de incertidumbre.

2. Selectividad: La capacidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones de prueba establecidas.

3. Robustez: Es una medida de la capacidad de un método de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas, variaciones en los parámetros del método y proporciona una indicación de su confiabilidad durante su uso normal.

4. Límite de detección: Es la menor concentración del analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones establecidas de la prueba.

5. Límite de cuantificación: Es la concentración más baja del analito que puede determinarse con un nivel de incertidumbre aceptable.

6. Intervalo lineal: Es el intervalo de concentraciones del analito sobre las cuales el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito.

7. Intervalo de trabajo: Es obtenido a través de la medición de muestras con diferente concentración del analito, y seleccionando el intervalo de concentración que proporciona un nivel de incertidumbre aceptable.

Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal. Dentro de éste intervalo lineal de respuesta habrá una relación lineal con la concentración del analito. El intervalo de trabajo se refiere al intervalo de valores de concentración en las disoluciones que se miden realmente y no a la concentración en la muestra original.

8. Repetibilidad: Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones sucesivas del mismo mensurando, con las mediciones realizadas con la aplicación de las mismas condiciones. Eurachem / CITAC [4] la define como *una medida de la Precisión con respecto a mediciones realizadas bajo condiciones de prueba repetibles: Mismo procedimiento de medición; mismo analista; mismo instrumento de medición utilizado en las mismas condiciones; mismo lugar; repetición dentro de un período corto de tiempo.*

9. Reproducibilidad: Proximidad de la concordancia entre los resultados de las mediciones del mismo mensurando, con las mediciones realizadas haciendo variar las condiciones de medición. Es importante especificar cuales son las condiciones que se van a variar. Eurachem / CITAC [4] la define como *una medida de la Precisión con respecto a mediciones realizadas bajo condiciones de prueba reproducibles: mismo método de medición, diferente analista; diferente instrumento de medición; diferente material de referencia; diferente laboratorio; períodos de tiempo prolongado, etc.)*

Los resultados que arrojen las prueba de Repetibilidad y Reproducibilidad pueden ser utilizados para el cálculo de Incertidumbre, de acuerdo al modelo que se establezca [4].

10. Sesgo (En algunos casos evaluados a partir de recuperación) La diferencia entre los resultados de prueba esperados y el valor de referencia aceptado; es el error sistemático total en contraste con el

error aleatorio. Puede existir uno o más componentes del error sistemático que contribuyen al sesgo. Una diferencia sistemática mayor con respecto al valor de referencia aceptado se refleja por un valor de sesgo más grande.

11. Incertidumbre: Parámetro asociado al resultado de una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente ser atribuidos al mensurando.

12. Mensurando: Magnitud particular sujeta a medición. Para mayor claridad en mediciones analíticas, la identificación del mensurando debe ser acompañada por la matriz, el método de prueba y la técnica de medición con que se determina, ya que en muchos casos existen resultados de un mismo mensurando que son diferentes y dependientes del método analítico.

13.- Material de Referencia Certificado (MRC): Material de referencia acompañado de un certificado, en el cuál uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cuál se expresan los valores de la propiedad y en la que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza. El certificado de un MRC debe especificar claramente el valor certificado, la incertidumbre correspondiente con un nivel de confianza declarado. El método utilizado para la determinación del valor certificado, analito al que corresponde el valor certificado, matriz, recomendaciones de uso, limitaciones, fecha de caducidad, entre otros, los valores, incertidumbres, homogeneidad y estabilidad de ambos deben ser determinadas por un laboratorio primario o nacional o un organismo competente aprobado por ellos

14.- Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica: Proceso general que asegura que un instrumento es apropiado para el uso propuesto y que su desempeño está de acuerdo a las especificaciones establecidas por el usuario y el proveedor. Un programa de este tipo consta principalmente de 4 etapas, la Calificación de diseño (**CD**), Calificación de instalación (**CI**), Calificación de operación (**CO**) y Calificación de desempeño (**CF**).

15.- Calificación de diseño (**CD**): Cubre todos los procedimientos previos a la instalación del sistema en el ambiente seleccionado. La CD define las especificaciones operacionales y funcionales del instrumento y detalla las decisiones deliberadas en la selección del proveedor.

16.- Calificación de instalación (**CI**): Cubre todos los procedimientos relacionados a la instalación del instrumento en el ambiente seleccionado. La CI establece que el instrumento se recibió como se diseñó y se especificó, que este instrumento fue adecuadamente instalado en el ambiente seleccionado, y que este ambiente es apropiado para la operación y uso del instrumento.

17.- Calificación de operación **(CO)**: Es el proceso en donde se demuestra que un instrumento funcionará de acuerdo a su especificación operacional en el ambiente seleccionado.

18.- Calificación de desempeño **(CF)**: Es definida como el proceso en donde se demuestra que un instrumento se desempeña consistentemente de acuerdo a una especificación apropiada para su uso rutinario.

19.- Trazabilidad: Propiedad del resultado de una medición o de un patrón, tal que esta pueda ser relacionada con referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones teniendo todas ellas incertidumbres determinadas.

20. Patrón: Medida materializada, instrumento de medición, material de referencia o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad o uno o más valores de una magnitud para servir de referencia.

Generalidades de la técnica de espectrofotometría Ultravioleta-Visible:

La espectrofotometría ultravioleta -visible se fundamenta [5] en medir la radiación monocromática absorbida por un elemento ó molécula causante de excitación y desplazamiento de electrones a orbitales de energía mayor, estas transiciones ocurren en la región del espectro que es de utilidad experimental (alrededor de 200 a 700 nm) en la que tiene lugar la formación de bandas anchas de absorción.

Por lo general, los espectrofotómetros comerciales de Ultravioleta-Visible consideran que los intervalos de longitudes de onda consideradas para la técnica de espectrofotometría de Ultravioleta-Visible son:

De 175 ó 200 a 400 nm de longitud de onda de la radiación generada por lámpara de deuterio para la región de ultravioleta.

De 400 a 1100 nm de longitud de onda de la radiación generada por lámpara de tungsteno para la región del visible.

La ley fundamental en la que se basan los métodos espectrofotométricos es la de Bouguer-Beer, Lambert y Beer y establece que la relación entre la intensidad de la luz transmitida o energía radiante y la energía radiante incidente es una función del espesor de la celda a través del medio absorbente, y que la cantidad de energía electromagnética monocromática absorbida por un elemento es directamente proporcional a la concentración de la(s) especie(s) que absorbe(n) y a la longitud de la trayectoria de la muestra para un conjunto de condiciones instrumentales establecidas.

Los componentes principales de un espectrofotómetro:

Fuente de energía: Lámpara de Deuterio (Uv) y/o Tungsteno-Halógeno (Visible)

Monocromador: Rejilla de dispersión, espejos y filtros

Compartimiento de muestra: celda (de un haz o de doble haz)

Detector: Fotodiodos

Amplificador y registrador y/o computadora

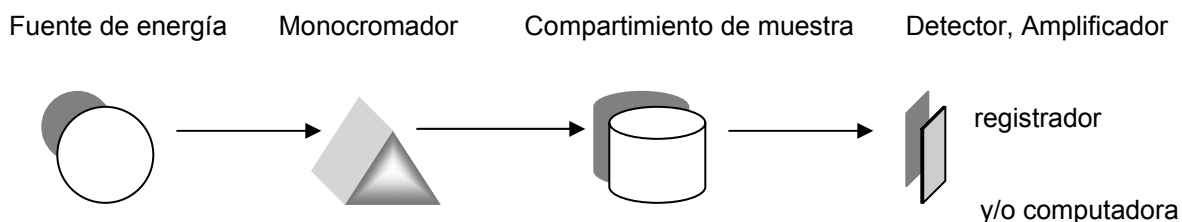


Figura 1. Esquema de los componentes principales de un Espectrofotómetro UV-Visible

Ejemplo de una Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica

La selección de un instrumento de medición se inicia definiendo las características metrológicas requeridas para obtener mediciones confiables, de acuerdo al uso propuesto, se selecciona entonces al instrumento de medición, que cumpla con las características deseadas, mediante la comparación de estas características metrológicas y las declaraciones del fabricante, esta comparación puede realizarse mediante el programa de Calificación de Equipos e Instrumentos de Medición Analítica del laboratorio (CEIMA) [17].

Un ejemplo de los requisitos que deben cumplir los instrumentos, y en cual de las 4 etapas de calificación deben ser evaluados, es el siguiente [6]:

Tabla 1. Ejemplo de Calificación de Espectrofotómetro Uv-Vis.

ESPECIFICACIÓN FUNCIONAL	CD	CI	CO	CF
Intervalo de longitud de onda (175 - 3200) nm	X	X	X	
Ancho de banda (0,05 - 5,0) nm	X	X		
Alcance Fotométrico en absorbancia (α) de 6,0	X	X		
Reproducibilidad Fotométrica en un intervalo de absorbancia (α) 0,0004 - 1	X	X		
Exactitud fotométrica en un intervalo de absorbancia (α) de 0,003 - 1 y 0,002 - 0,5	X	X	X	X
Reproducibilidad de longitud de onda 0,02 nm	X	X	X	X
Exactitud en longitud de onda 0,15 nm	X	X	X	
Luz espurea 0,00008 % T a 220 nm	X	X	X	X
Ruido 0,000050 a RMS a 500 nm.	X	X		
Estabilidad fotométrica 0,0002 /h después de 1 h.	X	X	X	X
Instalación eléctrica (127 \pm 10) V; Máx. VA 300	X	X	X	
Fuentes de energía lámpara de tungsteno y deuterio	X	X	X	
Compartimiento y/o introducción de muestra	X		X	

Un fabricante de espectrofotómetros de Ultravioleta-Visible, recomienda el cumplimiento de las siguientes especificaciones durante el desarrollo de las pruebas de una calificación Operacional [7, 17]. Ver tabla 2.

Tabla 2. Especificaciones de la Calificación Operacional (CO) del espectrofotómetro de UV-Visible

Prueba	Especificaciones	Observaciones
Resolución	> 1,6	Tolueno en hexano, relación de absorbancias a 269 y 266 nm
Luz extraviada	<1,0 %	A 200 nm, solución de KCL al 1,2% y un blanco de aire, 5 segundos de tiempo de integración.
	<0,05%	A 220 nm, solución de 10 g/L de NaI y un blanco de aire, 5 segundos de tiempo de integración.
	<0,03%	A 340 nm, solución de 50 g/L de NaNO ₃ y un blanco de aire, 5 segundos de tiempo de integración.
Exactitud de longitud de onda	< \pm 0,5 nm	Con Material de Referencia NIST 2034, pico mínimo de transmitancia, la incertidumbre (\pm 1 nm).

Prueba	Especificaciones	Observaciones
Reproducibilidad de Longitud de Onda	$< \pm 0,02$ nm	Diez mediciones consecutivas con material de referencia NIST 2034, 0,5 segundos de tiempo de integración.
Exactitud Fotométrica	$< \pm 0,005$ UA	Disolución de Dicromato de Potasio en H₂SO₄ 0,01 N, a 235, 257, 313, 350 nm; y un blanco de H₂SO₄ 0,01 N, 0,5 segundos de tiempo de integración.
	$< \pm 0,005$ UA	Material de referencia NIST 930e a una UA, a 440,0; 465,0; 546,1; 590,0 y 635,0 la incertidumbre expandida reportada en el certificado debe considerarse en la especificación, 0,5 segundos de tiempo de integración.
Ruido fotométrico	$< 0,0002$ UA rms	Sesenta mediciones consecutivas de aire (o UA y 500 nm), 0,5 segundos de tiempo de integración. Calcular $\sqrt{(\sum(X-x)^2/n)}$, donde X es el promedio de las lecturas, x son las mediciones individuales y n es el número de datos.
Estabilidad Fotométrica	$< 0,001$ UA/h	Después de una hora de calentamiento previo, mediciones de aire a temperatura ambiente constante (0 UA y 340 nm) cada 60 segundos durante una hora, 5 segundos de tiempo de integración. Las diferencias entre las lecturas máximas y mínimas son comparadas con la especificación.
Línea Base	$< 0,001$ UA rms	Mediciones de aire a 0 UA, 340 nm y 0,5 segundos de tiempo de integración.

Donde UA= Unidades de Absorbancia

Como se ve en la tabla anterior, una parte de la calificación Operacional es la verificación de la escala fotométrica, y para realizar esta verificación se utiliza un Material de Referencia Certificado.

Idealmente, el Material de Referencia debería tener una relación de absorbancias constantes en todo el intervalo de longitudes de onda de la región Ultravioleta-Visible; por ejemplo, un espectro de absorción de un Material de Referencia ideal debería presentar valores de absorbancias constantes máximos (no mayores a 0,8 UA) o mínimos, a una longitud de onda de 250, 350, 450, 550 y 750 nm; pero en la práctica, dicho Material de Referencia no existe, por lo que se elige el que se recomiende en los requerimientos regulatorios o gubernamentales. En caso de que el organismo regulatorio recomiende varios materiales, entonces la selección se haría con base en el tipo de análisis a ser desarrollados en el instrumento, y dado que la mayoría de los análisis farmacéuticos son medidos en la región del Ultravioleta, es muy frecuente que el Material de Referencia para verificar la escala fotométrica sea la disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico, en concentración de 60,06 mg/L.

El espectro de absorción característico de una disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico es:

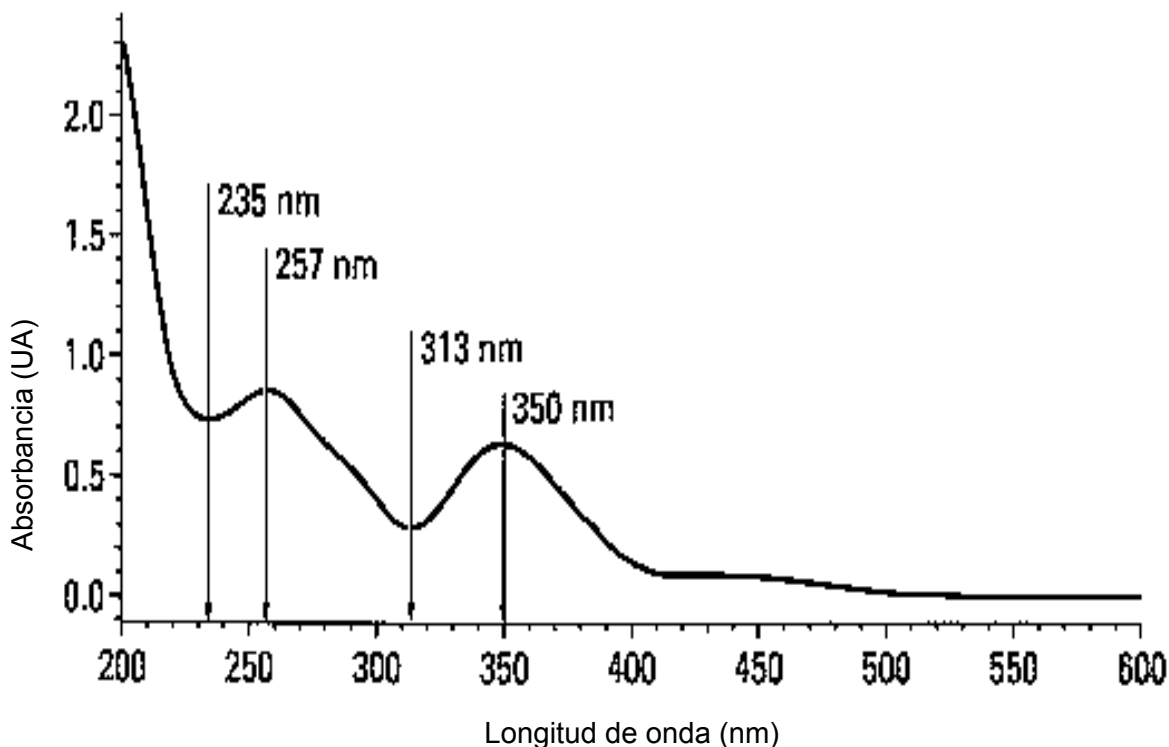


Figura 2. Espectro de Dicromato de Potasio

La Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM [8] , recomienda el uso de una Solución de Referencia (SR) de Dicromato de Potasio que contenga exactamente 60,06 mg en 1000 mL de una solución 0,005 molar de ácido sulfúrico, y hace referencia a los valores de absorbancias, tolerancias, y coeficientes de extinción específicas (E 1% 1cm) propios de la prueba. Ver Tabla 3.

Tabla 3. Valores exactos de absorbancia y extinción específica, leídos en una celda de 1 cm (FEUM).

Longitud de Onda λ	Absorbancia	Tolerancia aceptada	E 1% 1cm
235 nm (Mínimo)	0,748	0,740 – 0,756	124.54
257 nm (Máximo)	0,865	0,856 – 0,874	144.02
313 nm (Mínimo)	0,292	0,289 – 0,295	48,62
350 nm (Máximo)	0,640	0,634 – 0,644	106,5

La Farmacopea Europea, European Pharmacopoeia (EP) [9] recomienda para la *verificación de absorbancia* el uso de una solución de Referencia (R) de Dicromato de Potasio, y hace referencia a los valores exactos de E 1% 1cm y sus tolerancias máximas permitidas. Ver tabla 4.

Tabla 4. Valores exactos de E 1% 1cm (EP).

Longitud de Onda λ	E 1% 1cm	Tolerancia aceptada
235 nm (Mínimo)	124,5	122,9 – 126,2
257 nm (Máximo)	144,0	142,4 – 145,7
313 nm (Mínimo)	48,6	47,0 – 50,3
350 nm (Máximo)	106,6	104,9 – 108,2

La Farmacopea de los Estados Unidos, United States Pharmacopoeia (USP) [10], no es tan específica como las referencias anteriores, y tan solo hace una referencia a publicaciones del National Institute of Standard and Technology (NIST) de Estados Unidos, del cual los Materiales más importantes para esta verificación se describen en la Tabla 5.

Tabla 5. Descripción de los principales Materiales de Referencia SRM (USP)

Material de Referencia SRM No.	Tipo	Descripción NIST
930	Filtros de vidrio de densidad neutra	Para verificación y calibración de escalas de Absorbancia y Transmitancia, en la región Visible
935	Dicromato de Potasio sólido para la preparación de a solución de prueba	Para verificación y calibración de escalas de Absorbancia en la región Ultravioleta.
2031	Metal en cuarzo	Para verificación y calibración de escalas de Absorbancia y Transmitancia, en la región Ultravioleta – Visible.

Por su parte NIST también comercializa un Material de Referencia, SRM No. 1935, al cual le ha asignado valores exactos de absorbancias, y sus tolerancias máximas permitidas. Ver Tabla 6.

Tabla 6. Valores de Absorbancias y tolerancias del Material de Referencia SRM No. 1935.

Longitud de Onda λ	Absorbancia y Tolerancia aceptada
235 nm (Mínimo)	0,749 \pm 0.005 UA
257 nm (Máximo)	0,871 \pm 0.005 UA
313 nm (Mínimo)	0,291 \pm 0.005 UA
350 nm (Máximo)	0,646 \pm 0.005 UA

Estos valores de absorbancia podrían cambiar ligeramente, según el lote del SRM, sin embargo, los niveles de tolerancia no sufren modificación alguna.

El American Standard Testing Methods ASTM, ha publicado algunos métodos de prueba para la medición de parámetros clave de desempeño de espectrofotómetros Ultravioleta- Visible; en los que hace referencia a los Materiales de Referencia NIST SRM 930, 2031 o 935 [11, 12, 13] .

Entre los materiales referidos anteriormente, hay una serie de ventajas y desventajas, que habría que considerarse antes de su aplicación. Ver Tabla 7.

Tabla 7. Resumen de los materiales de referencia mayormente recomendados y sus observaciones

Material de referencia	Ventajas	Desventajas
Vidrio de Densidad Neutra	Su espectro presenta un perfil muy constante en la región visible.	No apto para la región Ultravioleta. No es absolutamente estable, por lo que requiere calibraciones constantes y periódicas.
Metal en Cuarzo	Su espectro presenta un perfil muy constante en la región Ultravioleta y Visible.	Frecuentemente presenta errores de interreflexión. Sensible a la temperatura. No es absolutamente estable, por lo que requiere calibraciones constantes y periódicas.
Dicromato de Potasio en ácido sulfúrico o perclórico	Espectro con máximos a 257 y 350 nm, y mínimos a 235 y 313 nm; muy bien definidos.	No apto para la región visible. Muy sensible al pH. Como es un agente oxidante muy poderoso, puede ser muy inestable.
Mezcla de sales de cobalto y níquel	Espectro con máximos a 302, 395, 512 y 678 nm. Cubre las regiones Ultravioleta y visible.	Debido a que las bandas son muy angostas, la exactitud en la longitud de onda puede afectar los resultados.

3.- DISCUSIÓN

En esta sección se presentan las propuestas para realizar la validación de la prueba de medición de la exactitud de la escala fotométrica, utilizando como Material de Referencia una disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico, trazable a un patrón de alta calidad metrológica.

De acuerdo a lo establecido anteriormente, una propuesta de validación para la prueba de Exactitud Fotométrica sería la siguiente:

Propuesta de Validación:

1. Selectividad: Para validar este punto es muy importante trabajar con reactivos de alta pureza, ya que la presencia de otros componentes que absorban a longitudes de onda cercanas a las características de la disolución del Dicromato de Potasio, pueden provocar interferencias en las lecturas. Otro punto crítico es asegurarse que la solución tiene un pH ácido, pues el equilibrio de las especies formadas (Cromato / Dicromato) influye significativamente en las longitudes de onda de máxima absorbancia [6]. Ver Tabla 8.

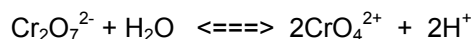


Tabla 8. Influencia del pH en las longitudes de onda de máxima absorbancia

Dicromato de Potasio disuelto en:	λ máx1 (nm)	λ máx2 (nm)
Solución ácida (pH 2,0) 60,06 mg/L	257	350
Solución alcalina (pH 9,0) 60,06 mg/L	274	371

2. Robustez: Una manera de evaluar la Robustez es mediante la realización de una prueba de Rugosidad, que consta de la realización de repetidas pruebas variando un solo parámetro cada vez. Como ejemplo, ver la propuesta en la tabla 9.

Tabla 9. Prueba de Rugosidad para la prueba de Exactitud de la Escala Fotométrica

FACTOR	CONDICIÓN NORMAL	CODICIÓN ALTERNA
Concentración del Material de Referencia Certificado (MRC)	MRC Disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico trazable a NIST, de concentración 60,06 mg/L	MR preparado a partir de una sal de pureza mayor a 99.5 % de Dicromato de Potasio, variando la concentración \pm 1%.
Material de la celda	Celda de Cuarzo	Celda de Policarbonato

FACTOR	CONDICIÓN NORMAL	CONDICIÓN ALTERNA
Temperatura de la cámara de prueba (celda)	22 °C ± 1 °C	Variaciones de ± 5 °C en la tolerancia, hasta un máximo de ± 10 °C

La elección de las pruebas obedece a las situaciones más comunes que se podrían dar al momento de la prueba, de ahí el interés de conocer el impacto que puede tener el variar alguna de las condiciones normales de prueba. Los resultados obtenidos de la prueba proporcionan información muy importante del comportamiento del método y de cuales son los aspectos críticos. Si las diferencias encontradas son significativas, sería necesario realizar un estudio más detallado, a fin de encontrar los límites que permitan trabajar con la reproducibilidad requerida por el método.

3. Límite de detección y Límite de cuantificación: Para esta prueba no son aplicables, puesto que no se están haciendo mediciones a nivel Trazas y los valores de absorbancia de interés se encuentran muy por arriba de lo que podría ser un límite de este tipo, por otra parte, para este trabajo, la determinación de estos límites carece de interés, ya que no tienen relevancia directa sobre el cálculo de incertidumbre.

4. Intervalo lineal e intervalo de trabajo: Para esta prueba en específico, no es necesario determinarlo, ya que se trabaja con una disolución a la misma concentración todas las veces, bajo un intervalo de longitudes de onda ya establecidos por el método.

5. Repetibilidad: La Repetibilidad se puede evaluar realizando la prueba siempre bajo las mismas condiciones y en un período de tiempo corto entre cada medición. Un mínimo de 10 mediciones es recomendable para un cálculo adecuado de Repetibilidad.

6.- Reproducibilidad: La Reproducibilidad puede ser evaluada realizando la prueba bajo las mismas condiciones, pero con un operador diferente cada vez, esto se puede realizar en caso de que exista más de un operador técnicamente competente para realizar la prueba; en caso contrario, puede evaluarse la reproducibilidad con el mismo operador realizando la prueba bajo las mismas condiciones, pero durante varios días. Un mínimo de 10 mediciones es recomendable para un cálculo adecuado de Reproducibilidad.

Repetibilidad y Reproducibilidad pueden ser evaluadas mediante la participación en una prueba de Intercomparación.

Aunque no existen antecedentes para esta prueba en específico, hay un antecedente en la realización de una prueba de Intercomparación de Filtros para la evaluación de la escala de Longitud de Onda y la escala Fotométrica [14] con la participación del Centro Nacional de Metrología (CENAM) de México; el National Research Council (NRC) de Canadá; el Instituto de Metrología (INMETRO) de Brasil y el National Institute of Standard and Technology (NIST) de Estados Unidos. En este estudio se presenta todo el tratamiento estadístico de repetibilidad, reproducibilidad y cálculo de incertidumbre de los resultados de las pruebas emitidas por los organismos participantes.

Los resultados obtenidos fueron tales, que las entidades organizadoras concluyeron que los resultados presentados por los participantes eran representativos de la prueba.

7.- Sesgo: Se determina como el error, calculando la diferencia entre el valor verdadero (el valor certificado) y el valor medido.

8.- Incertidumbre [15, 16, 17]: Una propuesta de cálculo de incertidumbre para la prueba de Exactitud de la Escala Fotométrica consiste en los siguientes pasos:

- I) Determinación del Mensurando
- II) Determinación de las Fuentes de Incertidumbre
- III) Determinación del Modelo Matemático
- IV) Determinación de la Ecuación de Incertidumbre combinada
- V) Contribución de cada una de las Fuentes a la estimación de la incertidumbre
- VI) Determinación de los Grados de Libertad
- VII) Determinación del Coeficiente de expansión K
- VIII) Determinación del Valor de la incertidumbre expandida

A continuación se muestra de manera desarrollada, paso por paso, un ejemplo de la determinación de la incertidumbre para la Prueba de Exactitud de la Escala Fotométrica:

I) Determinación del Mensurando: Determinación de Valores de absorbancias a las longitudes de onda donde el espectro de la disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico tiene sus absorbancias máximas y mínimas características.

II) Determinación de las fuentes de Incertidumbre:

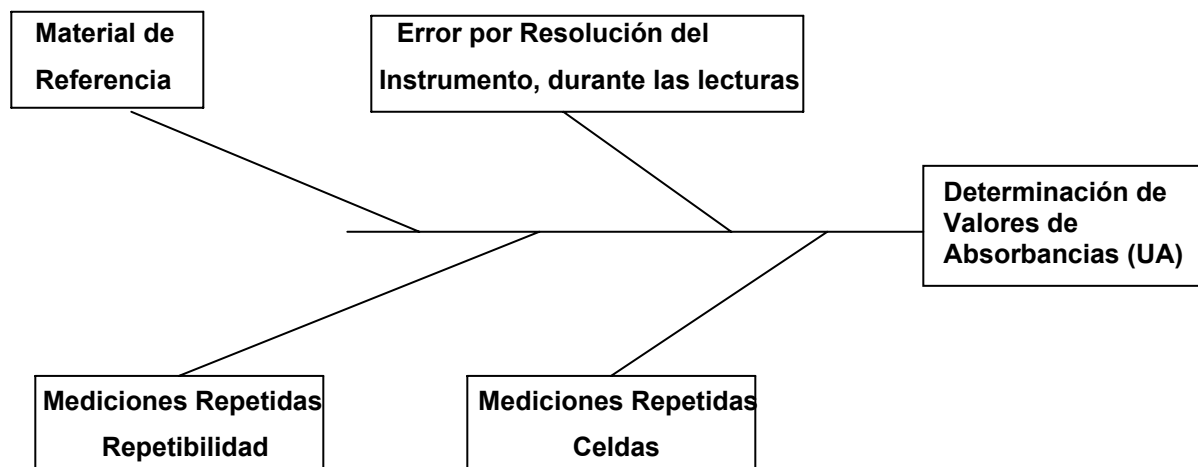


Figura 3. Fuentes de Incertidumbre.

Una vez establecidas las fuentes de incertidumbre, se procede a desarrollar el modelo matemático de la medición.

III) Modelo Matemático:

$$\text{Abs} = (Lp_i - V_{MRi}) + f(\sigma) + f(\sigma C)$$

Donde:

Lp_i = Lectura de la Disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico Material de Referencia Certificado, en unidades de Absorbancia, a la longitud de onda i .

V_{MRi} = Valor certificado de la disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico, en unidades de Absorbancia, a la longitud de onda i .

$f(\sigma)$ = Error por repetibilidad

$f(\sigma_C)$ = Error asociado a la celda

IV) Ecuación de Incertidumbre combinada:

Según la ley de la propagación de los errores o propagación de las incertidumbres, la ecuación es:

$$U_c = \sqrt{\left(\frac{\partial Abs}{\partial L_{p_i}} u L_{p_i}\right)^2 + \left(\frac{\partial Abs}{\partial V_{MRi}} u V_{MRi}\right)^2 + \left(\frac{\partial Abs}{\partial f(\sigma)} u f(\sigma)\right)^2 + \left(\frac{\partial Abs}{\partial f(\sigma_C)} u f(\sigma_C)\right)^2}$$

Ecuación 1. Incertidumbre combinada

V) Contribución de cada una de las Fuentes a la estimación de la incertidumbre.

Fuente de Incertidumbre	Coficiente de Sensibilidad	Valor del coeficiente de Sensibilidad	Incertidumbre de cada componente	Valor de Incertidumbre de cada componente
Error por resolución del Instrumento a la longitud de onda i .	$\frac{\partial Abs}{\partial L_{p_i}}$	1	$u L_{p_i}$	$\frac{\epsilon}{\sqrt{3}}$
Material de Referencia a la longitud de onda i .	$\frac{\partial Abs}{\partial V_{MRi}}$	-1	$u V_{MRi}$	$\frac{U V_{MRi}}{K}$
Error por repetibilidad	$\frac{\partial Abs}{\partial f(\sigma)}$	1	$u f(\sigma)$	$\frac{\sigma_{(n-1)}}{\sqrt{n}}$
Error asociado a la celda	$\frac{\partial Abs}{\partial f(\sigma_C)}$	1	$u f(\sigma_C)$	$\frac{\sigma_C_{(n-1)}}{\sqrt{n}}$

VI) Grados de Libertad:

$$v_{efc} = \frac{Uc^4}{\sum (\partial f / \partial x)^4 / v_i}$$

Donde v_{efc} son los Grados de Libertad efectivos.

Asumiendo un modelo de Distribución Normal, los grados de libertad igual a ∞

VII) Coeficiente de expansión K:

$$K = t(v_{efc})$$

Donde t es el valor de la t de Student a 95 % de confianza, para v_{efc} Grados de Libertad.

Para un nivel de confianza de 94.45 %, y v_{efc} igual a ∞ Grados de Libertad; el valor de K se asume igual a 2,00.

VIII) Valor de la incertidumbre expandida:

$$U = Uc (K)$$

Es de vital importancia que la incertidumbre expandida sea expresada en las mismas unidades que el mensurando.

4.- CONCLUSIONES

Es importante, para el cumplimiento de los requisitos de la NMX-EC-17025-IMNC-2005 y asegurar la confiabilidad de las mediciones, que los laboratorios tengan implementado un programa de Aseguramiento de la Calidad, que incluya una Calificación periódica de sus instrumentos de medición.

Esta verificación debe incluir, al menos, la calificación de Instalación, la calificación de Operación y la calificación de Desempeño. La calificación de Diseño la realiza el proveedor, en conjunto con el usuario, cuando así lo acuerden ambos. La calificación de instalación se realiza una sola ocasión, en el momento en que se instala el instrumento en el sitio de trabajo; si el instrumento es removido de su lugar, será necesario realizar de nuevo una calificación de instalación. Las calificaciones de Operación y de Desempeño serán realizadas con la periodicidad que establezca el laboratorio o la que recomiende el fabricante. Si existiera alguna condición que pusiera en duda la estabilidad del equipo; como un mantenimiento, mayor con cambio de partes que afecten la medición (lámparas, detector), modificación de diseño o un tiempo prolongado en desuso; también será necesario recalificarlo.

Dentro de la calificación de operación se realizan, entre otras pruebas, la verificación de la escala fotométrica. Existen varios materiales de referencia para tal fin, los cuales tienen sus intervalos de aplicación ya bien definidos, así como algunas ventajas y desventajas que son de vital importancia conocer. Una manera de realizar la prueba es mediante el uso de un Material de Referencia en disolución de Dicromato de Potasio / Ácido Sulfúrico, la cual se prefiere por evaluar la región ultravioleta, donde se realizan la mayoría de los análisis para la industria farmacéutica, una de las industrias que mayormente utilizan los espectrofotómetros ultravioleta-visible para su trabajo diario.

El uso de un Material de Referencia Certificado, trazable a algún Patrón de alta calidad metrológica, permite asegurar un buen desarrollo de la prueba de Estabilidad Fotométrica, pues los límites de aceptación son muy pequeños (no mayor a 0,005 UA de diferencia), y con cualquier desviación en los resultados de las pruebas se corre el riesgo de dejar fuera de especificaciones al instrumento.

Al establecer un plan de validación para la prueba de Estabilidad Fotométrica, se puede obtener información importante acerca del comportamiento del método de prueba, y además los datos obtenidos pueden ser utilizados para el cálculo de incertidumbre.

El valor de incertidumbre de una medición nos permite tomar decisiones, por ejemplo, si los resultados obtenidos en la prueba de la exactitud de la escala fotométrica cumple sin problemas con las tolerancias especificadas en las referencias, se puede asumir que el instrumento tiene un

funcionamiento adecuado en el parámetro que se está evaluando. En caso contrario, se debe solicitar de inmediato su revisión por un técnico especializado.

Un valor representativo de la incertidumbre de la medición, depende en gran medida, de un adecuado planteamiento de las fuentes de incertidumbre y su contribución a la estimación de la misma.

5.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- "NMX-Z-055-IMNC-1996 Metrología – Vocabulario de términos fundamentales y generales, equivalente al documento International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology, BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP, OIML", 1993.
- 2.- "Vocabulario Internacional de términos fundamentales y generales de metrología" CNM-MMM-PT-001, Publicación Técnica del CENAM, 3ª. Ed. México, Agosto 1997.
- 3.- "NMX-EC-17025-IMNC-2000 Requisitos Generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y de calibración".
- 4.- Eurachem / CITAC "Guide to quality in analytical chemistry". 2002.
- 5.- Morrison y Boyd, "Química Orgánica" pag 567-568, 5a Ed. Editorial Addison Wesley Longman, México. 1998.
- 6.- "Fundamentals of UV-Visible Spectroscopy", Agilent Technologies, Germany; 2000, pag 69-71
- 7.- "Agilent 8453E UV-Visible Spectroscopy System; Service Manual"; Waldbronn, Germany; 2001.
- 8.- Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 5a Edición, pag 151-153, México, 1988.
9. European Pharmacopoeia (EP), 3rd Ed. Strasbourg, France, 1996.
10. United Status Pharmacopoeia (USP) XII, Sección 831, pg 1710-1712, 1990.
11. ASTM E 925-02 "Standard Practice for Monitoring the Calibration of Ultraviolet-Visible Spectrophotometers whose Spectral Slit Width does not Exceed 2 nm", Vol 03.06, 2006.
- 12.- ASTM E 958-93 "Standard Practice for Measuring Practical Spectral Bandwidth of Ultraviolet-Visible Spectrophotometers", Vol 03-06, pag. 877, 2000.
13. ASTM E 275-93 "Standard Practice for Describing and Measuring Performance Of Ultraviolet, Visible and Near Infrared Spectrophotometers", Vol 03-06, pag. 798, 2000.

14.- Memorias: "INTERAMERICAN METROLOGY SYSTEM (SIM 2.2) Intercomparison of wavelength scale and photometric scale of spectrophotometry laboratories CENAM, NRC, INMETRO, NIST"; Mayo 2000.

15.- "Guidelines for evaluating and expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results" NIST Technical Note 1297. 1994.

16. Eurachem-Citac "Guide Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement" 2nd. Edition, 2000.

17.-. "Guía para estimar la incertidumbre de la medición", Publicación Técnica del CENAM 1ª. Ed. México, Mayo 2000.

18.- "Calificación de Equipos de Instrumentos Analíticos", DI-2-PTC-620-RAT-001-004, Publicación Técnica del CENAM, México, abril del 2004.