

VALIDACIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NÚMERO DE ONDA POR FT-IR EN PELÍCULAS DE POLIESTIRENO

Raúl Herrera Basurto¹, F. Mercader Trejo², F. Martínez Suárez¹
 Centro Nacional de Metrología – Dirección de Metrología de Materiales

¹División de Materiales Cerámicos, ²División de Materiales Metálicos

Tel.: 01 442 211 05 00, fax: 01 442 211 00 69, correo electrónico: rherrera@cenam.mx

Resumen: Se utilizó la Guía EURACHEM “The Fitness for Purpose of Analytical Methods”¹, para realizar la validación del método empleado en la determinación del número de onda de películas de poliestireno. Las películas de poliestireno son patrones utilizados en la calibración de la escala de número de onda de espectrómetros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR), también son usados para el control de calidad en las determinaciones por FT-IR.

La guía señala que tiene como fin principal la validación de métodos analíticos, sin embargo, con este ejercicio se observó que puede ser aplicada para mensurandos con una naturaleza diferente a la analítica. Algunos parámetros quedaron fuera de la validación debido a la propia naturaleza del mensurando, tales son los casos de recuperación, límites de detección, de cuantificación y lineal. Por el contrario, los parámetros evaluados son sustantivos para la mejora continua, los cuales fueron: confirmación de la identidad, exactitud, precisión (como repetibilidad y reproducibilidad), incertidumbre y pruebas de robustez. El intervalo de trabajo se definió prácticamente al mismo tiempo que el mensurando (mensurando: número de onda, intervalo mediano IR: de 400 a 4000 cm⁻¹).

1. INTRODUCCIÓN

Las películas de poliestireno son utilizadas como patrones de medición para la calibración y/o verificación de la escala de número de onda de espectrómetros infrarrojos. El fundamento para la calibración se basa en la confirmación de la posición espectral de las bandas debidas a la absorción característica de los enlaces de la molécula del poliestireno².

La posición espectral de las bandas de absorción típicas del poliestireno en el mediano IR, se encuentran en la región de 540 a 3083 cm⁻¹. El mensurando es el número de onda ($\bar{\nu}$), el cual se define como el número de ondas por unidad de longitud o el inverso de la longitud de onda (λ)³. En las ecuaciones (1) y (2) se presenta esta relación⁴.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} \quad (1)$$

Considerando el modelo de un oscilador armónico simple se tiene la siguiente ecuación:

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{\kappa}{\mu}} \quad (2)$$

Donde:

$\bar{\nu}$ = posición espectral (número de onda) cm⁻¹

κ = constante de fuerzas (N/m)

μ = masa reducida del par de átomos (kg)

c = velocidad de la luz en el vacío (m/s)

La intención principal de la Guía EURACHEM es proporcionar apoyo a los laboratorios sobre la evaluación de métodos de prueba con el fin de demostrar que éstos son adecuados a su propósito. Los parámetros que deben evaluarse según el documento mencionado son:

- Confirmación de la identidad,
- Selectividad/especificidad,
- Limite de detección,
- Limite de cuantificación,
- Intervalos de trabajo y lineal,
- Recuperación,
- Exactitud/ veracidad,
- Precisión de repetibilidad,
- Precisión de reproducibilidad,
- Robustez.

En este trabajo se pretende dejar un método útil con parámetros totalmente establecidos y que sean la plataforma para el proceso de calibración de películas de poliestireno. Además de evaluar el

grado de aplicación de la metodología propuesta por EURACHEM para la validación de métodos.

2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se diseñaron los experimentos bajo los principios señalados en la Guía EURACHEM "The Fitness for Purpose of Analytical Methods, conjuntamente, con el uso de herramientas estadísticas⁵ para evaluar los siguientes parámetros: confirmación de la identidad, intervalo de trabajo, veracidad, precisión, incertidumbre y robustez. El Material de Referencia Certificado SRM 1921 (patrón de medición) de NIST se empleó para obtener los datos de cada uno de los experimentos, en algunas ocasiones el SRM 1921 se usó como muestra desconocida (confirmación de la identidad, veracidad e incertidumbre) y en otros ejercicios será una muestra de control (reproducibilidad entre analistas).

Todos los experimentos fueron realizados con un espectrómetro de infrarrojo con transformada de Fourier marca Nicolet modelo Magna 750.

Las condiciones ambientales se encontraron dentro de los siguientes intervalos $T = 22 \pm 2$ °C, %H = 45 ± 10 %. La cámara principal se mantuvo con una atmósfera controlada de gas N_2 (grado cromatográfico).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Confirmación de la identidad

Para evaluar este parámetro se tomaron los valores certificados de las 13 bandas de absorción del patrón como referencias, las cuales cubren la región espectral de 545 a 3082 cm^{-1} . Posteriormente el patrón se midió como una muestra desconocida y se compararon los resultados de los valores obtenidos por dos algoritmos que calculan los mínimos de transmitancia de las bandas (COG y OMNIC) contra los valores certificados. De esta manera se comparó la posición de cada banda con las del patrón. En la tabla 1, se reportan estos valores. La columna U, es el valor de la incertidumbre para cada banda de referencia.

3.2 Intervalo de trabajo

El diseño de los FT-IR permite seleccionar tres componentes principales y que nos dan el intervalo en el cual van a trabajar: fuente de emisión, divisor de haz y detector. Teóricamente⁶, una fuente de emisión que corresponde a un cuerpo negro con una temperatura de filamento de 2500 K cubre prácticamente la región del infrarrojo de 7500 a 400 cm^{-1} .

Tabla 1. Comparación de los valores obtenidos con los valores certificados para cada banda de absorción.

$V_{\text{certificado}}$ (cm^{-1})	U (cm^{-1})	V_{COG} (cm^{-1})	V_{OMNIC} (cm^{-1})
545.48	12.29	540.04	539.76
842.08	1.22	842.03	842.26
906.82	0.49	906.71	906.72
1028.35	0.27	1028.50	1028.22
1069.20	0.46	1069.29	1069.41
1154.64	0.54	1154.57	1154.58
1583.13	0.06	1583.06	1583.05
1601.35	0.07	1601.33	1601.29
2850.13	1.84	2849.59	2849.44
3001.40	0.12	3001.23	3001.18
3026.42	0.61	3025.96	3025.67
3060.03	0.14	3059.96	3059.93
3082.19	0.12	3082.18	3082.18

El intervalo de trabajo se confirmó al evaluar que el instrumento es capaz de realizar mediciones confiables dentro del intervalo de 540 a 3082 cm^{-1} , a través de la medición del patrón y se comparó con las líneas reportadas por IUPAC⁷ dentro de este intervalo junto con las del certificado y se determinó que el intervalo de trabajo es apropiado para el propósito que se pretendió.

3.3 Exactitud

En el certificado del patrón se declara un criterio para determinar si existe sesgo². El criterio señala que si Δ_v (diferencia absoluta) $> \Delta_c$ (incertidumbre asociada a la diferencia absoluta), entonces la diferencia es mayor que la que puede ser explicada por una oportunidad o chance y la escala de número de onda del instrumento deberá ser corregida al SRM1921. Sin embargo, si la situación es contraria, la escala del espectrómetro es exacta y no es necesaria ninguna corrección. La ecuación (4), nos señala la forma de estimar Δ_c , y la ecuación (5) para calcular Δ_v . En la columna "criterio" de la tabla 2 aparecerá un 1 si el criterio no se cumple;

$$\Delta_c = (t_{n-1}, 0.95) \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) + U \quad (4)$$

$$\Delta_v = |\bar{x} - v_c| \quad (5)$$

\bar{x} = media del laboratorio

v_c = valor certificado.

s = desviación estándar de la muestra

n = número de mediciones.

U = incertidumbre de la banda.
 t = valor crítico de la t para una distribución t de student de dos colas con n-1 grados de libertad para un 95% de intervalo de confianza

El material de referencia fue analizado tres veces al día durante tres días, por lo que n = 9, y se utilizaron los valores certificados para realizar y probar las hipótesis, y cálculos⁴ correspondientes. Si existe alguna banda que no cumpla con el criterio declarado en el certificado, el mismo certificado señala como forma de corrección, realizar un ajuste por el método de mínimos cuadrados.

Tabla 2. Resultados de prueba de exactitud para cada pico de absorción mediante la prueba t. t = 2.306

\bar{x} (cm ⁻¹)	s (cm ⁻¹)	Vc (cm ⁻¹)	U (cm ⁻¹)	Δv	Δc	criterio
539.7	0.037	545.48	12.29	5.79	12.32	0
842.1	0.017	842.08	1.22	0.04	1.23	0
906.7	0.005	906.82	0.49	0.08	0.49	0
1028.5	0.002	1028.35	0.27	0.17	0.27	0
1069.3	0.008	1069.2	0.46	0.09	0.47	0
1154.7	0.005	1154.64	0.54	0.05	0.54	0
1583.2	0.013	1583.13	0.06	0.08	0.07	1
1601.3	0.005	1601.35	0.07	0.02	0.07	0
2849.6	0.011	2850.13	1.84	0.53	1.85	0
3001.4	0.032	3001.4	0.12	0.03	0.14	0
3026.0	0.005	3026.42	0.61	0.47	0.61	0
3060.0	0.005	3060.03	0.14	0.03	0.14	0
3082.1	0.004	3082.19	0.12	0.06	0.12	0

De la tabla 2 se observa que la banda de 1583.21 cm⁻¹, no cumple con el criterio señalado en el certificado, por lo que, se realizó el ajuste con el método de mínimos cuadrados correspondiente. En la figura 1, se observa la curva obtenida con el valor corregido para la banda 1583.2 cm⁻¹. Podemos concluir que no se observa un sesgo significativo en la mayoría de las bandas, excepto para la banda de 1583.13 cm⁻¹, donde se encontró una variación que no se puede explicar, pero que se corrigió de acuerdo con lo declarado en el certificado, como se observa en la figura 2.

Tabla 3. Valor corregido para la banda que no cumple con el criterio

No. Banda	Valor obtenido (cm ⁻¹)	Valor corregido (cm ⁻¹)
7	1583.21	1583.04

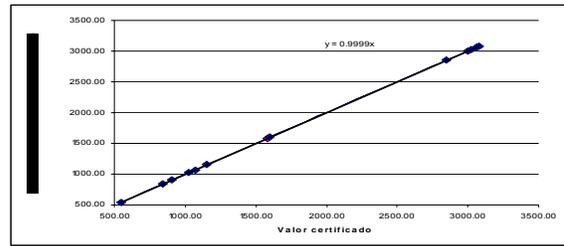


Figura 1. Corrección del valor (banda 7) que no cumple con el criterio de aceptación.

3.4 Precisión

La precisión se evaluó en función de la repetibilidad y la reproducibilidad.

La evaluación de la repetibilidad consistió en probar si existe diferencia significativa entre un grupo de mediciones realizadas inmediatamente después a otro grupo de mediciones, tratando de desprestigiar el efecto del tiempo y se asume que son condiciones idénticas de medición.

La repetibilidad se probó a través del uso de la prueba F. La hipótesis que se prueba es Ho: s₁ = s₂. Si F_{calc} > F_{crit}, se rechaza Ho. En tabla 4, se observan los resultados obtenidos para la evaluación de la repetibilidad.

De la tabla 4, se puede observar que al 95% de confianza las bandas identificadas como 2, 7, 8 y 11, no son repetibles.

La reproducibilidad tuvo como condiciones de medición las siguientes: que un grupo de mediciones se realizaron por dos analistas en tiempos diferentes.

Tabla 4. Valores para la repetibilidad de cada pico de absorción mediante la prueba F.

No. de Banda de absorción	S ₁ ²	S ₂ ²	F calc	Ho F crit = 3.28
1	0.00399	0.00078	0.19	0
2	0.00123	0.00416	3.39	1
3	0.00004	0.00	0.10	0
4	0.00000	0.00	0.69	0
5	0.00043	0.00003	0.07	0
6	0.00003	0.00006	2.18	0
7	0.00001	0.00005	3.97	1
8	0.00001	0.00008	11.48	1
9	0.00027	0.00004	0.17	0
10	0.00024	0.00007	0.28	0
11	0.00000	0.00005	16.44	1
12	0.00006	0.00008	1.42	0
13	0.00026	0.00018	0.68	0

La reproducibilidad se probó usando también una prueba F, con la misma hipótesis. En la tabla 5, se reportan los valores obtenidos para este parámetro.

Tabla 5. Prueba F para la reproducibilidad.

No. Banda de absorción	S ² analista1	S ² analista 2	F calc	Ho Fcrit = 3.28
1	0.0014	0.0018	1.24	0
2	0.0020	0.0003	0.16	0
3	4.9E-05	1.9E-05	0.39	0
4	2.E-05	6.4E-06	0.32	0
5	0.00014	5.9E-05	0.41	0
6	3.5E-05	8.8E-06	0.25	0
7	5.9E-05	2.8E-05	0.48	0
8	5.7E-05	2.2E-05	0.38	0
9	0.00019	8.6E-06	0.05	0
10	0.0003	0.00013	0.44	0
11	3.1E-05	1.3E-05	0.43	0
12	5.5E-05	3.E-05	0.56	0
13	0.00012	5.5E-05	0.45	0

La prueba de reproducibilidad (tabla 5) indicó que no hay diferencia significativa entre los analistas.

3.6 Robustez

Las pruebas de robustez se enfocaron en los efectos ocasionados por la resolución y por los algoritmos para calcular la posición espectral. Se realizaron experimentos a resoluciones de 0.5, 1, 4 y 8 cm⁻¹. Los algoritmos usados en esta prueba son COG y OMNIC. Se realizaron 9 mediciones para cada una de las resoluciones y se estimó la posición espectral para cada banda, con cada algoritmo. Se usó el patrón SRM 1921.

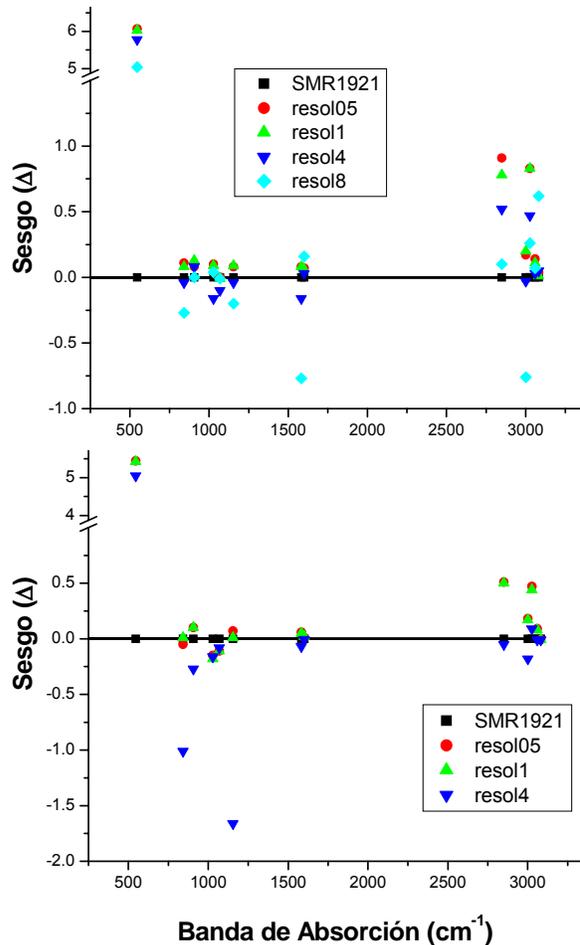


Figura 2. La gráfica superior, representa los valores obtenidos a diferentes resoluciones con el algoritmo COG. La figura inferior, es la gráfica de los valores obtenidos con OMNIC.

En las gráficas, las mediciones que están más cercanas a la línea continua son las que tiene un menor sesgo. Las mediciones que presentaron estas características corresponde a las realizadas con una resolución de 4 cm⁻¹ y con el algoritmo COG. Al mismo tiempo, se realizaron ejercicios para evaluar la precisión y se obtuvieron resultados similares.

3.7 Incertidumbre

Para este parámetro se describe el modelo con la siguiente ecuación::

$$\bar{\nu} = \frac{1}{\lambda} * f_{r\&R} * f_{\Delta} * f_{resol} * f_{algoritmo} \quad (6)$$

El esquema de la figura 3, se presentan las fuentes de incertidumbre de nuestro proceso.

En la tabla 6, se describen cada uno de los factores y se resume la contribución de cada uno de ellos en la determinación de la posición de la banda correspondiente a 545.48 cm⁻¹. El factor por la incertidumbre del patrón está incluido en el factor por sesgo, lo cual, es recomendado en el propio certificado del patrón SRM 1921. Este mismo ejercicio se realizó para todas las bandas. La figura 3, indica la contribución de cada una de las fuentes de incertidumbre.

El factor por r&R, es estimado con un análisis de varianza de un factor, donde se incluye la aportación en conjunto de ambas variables.

El factor por sesgo, es estimado con el uso de la ecuación (4), la cual, es propuesta en el certificado del patrón de medición e incluye la incertidumbre correspondiente para cada línea. Este factor es el

de mayor influencia en nuestra medición. El componente mayor de este factor corresponde directamente de la incertidumbre del patrón. De tal manera que un patrón de medición con mayor calidad, puede disminuir nuestra incertidumbre de forma proporcional.

El factor por resolución, es asumido como una incertidumbre tipo B, asociada a una distribución rectangular. La resolución empleada es de 4 cm⁻¹, ver estudios de robustez.

El factor por algoritmo, se realizó por la diferencia absoluta entre los valores obtenidos por los algoritmos COG y OMNIC.

Finalmente en la figura 4, se observa la contribución de cada una de las fuentes de incertidumbre y en la tabla 7, se reporta el valor obtenido con la incertidumbre expandida estimada.

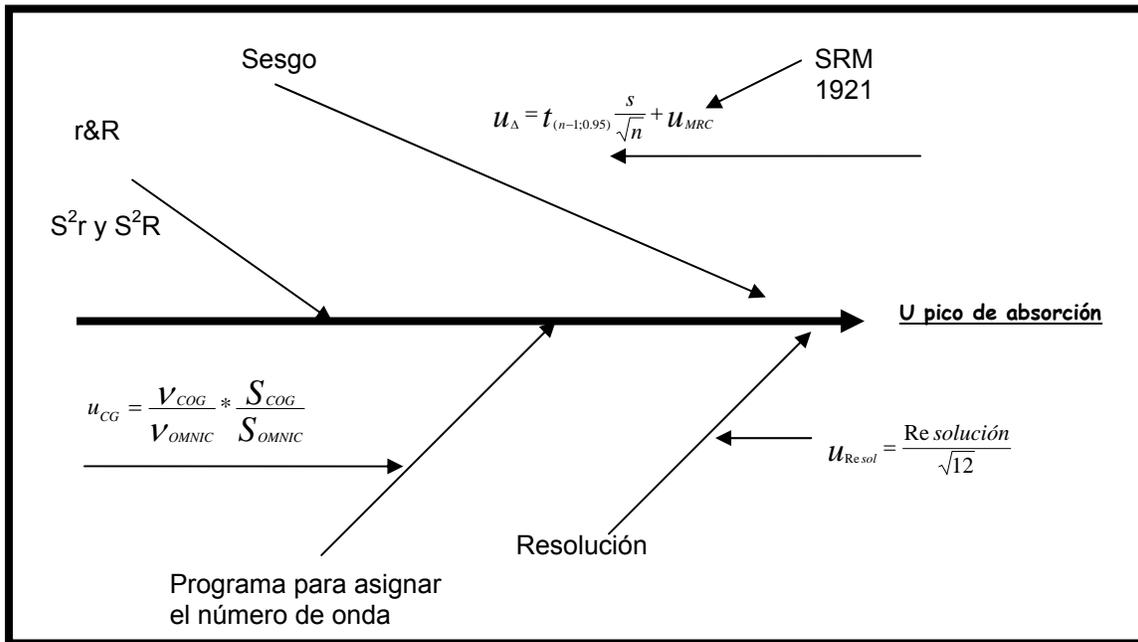


Figura 3. Diagrama causa – efecto de las fuentes de incertidumbre.

Tabla 6. Valores e incertidumbre utilizados en la estimación de la banda 545.48 cm⁻¹

Símbolo	Fuente de incertidumbre	Valor	u(x _i)	Unidades	u(x)/x	C _i	C _i *u(x _i)
v	Número de onda	540.04	12.39	cm-1	0.02	1	12.39
f _{r&R}	Factor de repetibilidad y reproducibilidad	1	0.05		0.05	537.74	27.84
f _Δ	Factor por sesgo	1	12.32	-	12.32	540.03	6653.99
f _{resol}	Factor por resolución	1	1.15	-	1.15	540.04	623.58
f _{alg}	Factor por algoritmo	1	0.71	-	0.71	534.92	385.01

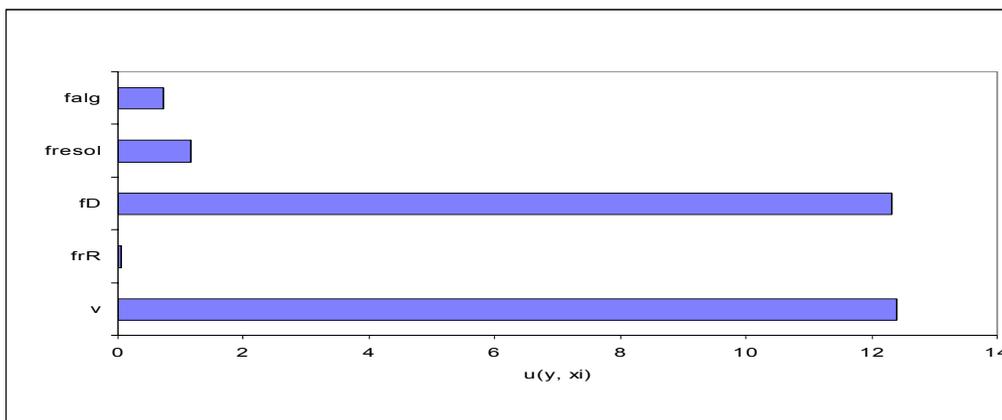


Figura 4 Fuentes de incertidumbre involucradas en la determinación del número de onda para la banda 545.48 cm^{-1} .

Tabla 7. Incertidumbre expandida

Mensurando	Valor	$u(x_i)$	$U(k=2)$
Número de onda (cm^{-1})	540.04	12.39	24.79

4 CONCLUSIONES

- Se probó que la metodología desarrollada para la validación de métodos analíticos señalada en la referencia [1], puede ser muy útil y aplicable parcialmente para mensurandos distintos al fin principal de dicha guía. Al mismo tiempo, es un ejemplo práctico de la utilidad de un Material de Referencia Certificado en la validación de un proceso de medición.
- La validación del método permite tener un conocimiento completo del proceso de medición. Además de hacer evaluaciones de parámetros importantes que tienen influencia en nuestras mediciones (resolución, repetibilidad, algoritmo) y que deberán ser considerados con más detalle en los procesos de certificación, calibración o caracterización.
- En este ejercicio se detectó que una de las influencias mayores en los valores de la calibración de bandas características de absorción es función de la calidad del patrón empleado en la calibración, ya que el factor de sesgo (incluye la incertidumbre de la banda) es el de mayor impacto.
- Adicionalmente con los estudios de robustez se tiene información del impacto de la resolución y calidad del algoritmo usado, por lo que, en breve se desarrollarán proyectos para mejorar el desempeño de estos parámetros.

REFERENCIAS

[1]EURACHEM, The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics (1998), disponible en <http://www.eurachem.ul.pt/guides/valid.pdf>

[2] D.Gupta, Lan Wang, Leonard M. Hanssen, and col, Polystyrene Film for Calibrating the wavelength Scale of Infrared Spectrophotometers – SRM 1921, Nist Special Publication 260-122, 1995.

[3] ASTM E 131-91a “Terminology relating to molecular spectroscopy”

[4] N.B. Colthup, L.H. Daly, S.E. Wiberley, Introduction to Infrared and Raman Spectroscopy, 3^a Edition, 1990.

[5] N.J. Miller y J.C. Miller, Estadística y Quimiometría para química Analítica, Pearson Educación, S.A., Madrid 2002.

[6] “Universidad Pablo de Olavide”, Sevilla España “Curso de ciencias Ambientales 2005/06 “Práctica 2 Análisis de contaminantes mediante espectrofotometría infrarroja”, disponible en http://www.upo.es/depa/webdex/quimfis/CA/Practica_2.pdf

[7] Tables of Wavenumber for the calibration of infrared spectrophotometers. Second Edition, Ed. A.R.H.Cole, IUPAC, Pergamon Press, 1977.