1. OBJETIVO

Establecer las directrices que permitan realizar la calificación operacional parcial de los Espectrofotómetros del Laboratorio de Química Analítica del Laboratorio de Tecnólogo Químico sede Facultad de Química.

2. ALCANCE

Espectrofotómetros UV-Vis del laboratorio.

3. RESPONSABILIDADES

3.1. Analistas de Laboratorio (Ejecución).

3.2. Docente (Supervisión).

4. DEFINICIONES

4.1. **Exactitud de longitud de onda:** referido a la escala en la longitud de onda, ésta se define como la desviación de la lectura de una banda de absorción o emisión para una longitud de onda exactamente conocida; esta desviación en la práctica habitual puede causar errores significativos en los resultados cuantitativos y cualitativos en las medidas del espectro UV-Visible y consecuentemente errores en las determinaciones

4.2. **Radiación parásita:** es la radiación que llega al detector debido a longitudes de onda que no fueron seleccionadas por el ancho de banda de longitudes de onda determinados por el monocromador, esta radiación afecta la exactitud fotométrica provocando desviaciones respecto a la ley de Bouguer-Beer. Puede provenir de defectos de fabricación que generan reflexiones de la radicación no provenientes de la muestra, u otros efectos ajenos al analito. Se puede aceptar un cierto límite de esta radiación en un compromiso con la aplicación requerida o las especificaciones de los métodos estándar (por ej. de USP).

4.3. **Exactitud Fotométrica:** exactitud en la escala de la absorbancia, se refiere a la desviación de la lectura para un estándar de calibración con absorbancia específica ($A_{1\,cm}^{1\%}$ o $\mathrm{A}(1\%,\ 1\ \mathrm{cm})$) exactamente conocida, se toma una tolerancia de ± 0,01 respecto a la absorbancia de una disolución de dicromato de potasio. Esta absorbancia específica se define como la señal que se registra al medir una disolución al 1% (m/v) de una sustancia definida, con una celda de exactamente 1 cm de camino óptico (se suelen utilizar cubetas o celdas calibradas).

5. FUNDAMENTO TEÓRICO Y DESCRIPCIÓN.

Este trabajo práctico, se basará en la calificación operacional de los espectrofotómetros, por lo tanto es bueno recordar las partes principales de un equipo de este tipo. Según un diagrama de bloques genérico (Figura 1) podemos reconocer las siguientes partes:

Figura 1. Esquema de un espectrofotómetro

- **Fuente de REM:** Fuente de radiación electromagnética, normalmente una lámpara de radiación policromática. .
- **Monocromador:** ésta parte del instrumento consiste en una serie de piezas (espejos, lentes y rendijas y además hoy en día cuentan con redes de difracción u holográficas). El monocromador o selector de longitud de onda, mediante el elemento dispersivo (red) logra que la radiación policromática pase a ser monocromática (o con un ancho de banda estrecho según el analista selecciones desde una botonera)
- **Cubeta (o celda) con muestra:** cubeta que contiene la solución de la muestra, dependiendo del rango de longitudes de onda de trabajo, debe seleccionarse cuidadosamente el material a utilizar . Normalmente para región UV se utiliza el cuarzo, y para región visible puede utilizarse vidrio óptico o algún polímero (por ejemplo polimetacrilato). El material de la cubeta debe ser lo más "transparente" posible en la región de medida a la radiación.
- **Detector:** el detector transforma las señales analógicas o contínuas en señales eléctricas digitales que pueden ser leídas en un display, actúan como transductores de señal.

Se puede trabajar midiendo la magnitud Absorbancia o %Transmitancia, recordar las relaciones de estas magnitudes ya vistas en el curso anterior (Figura 2)

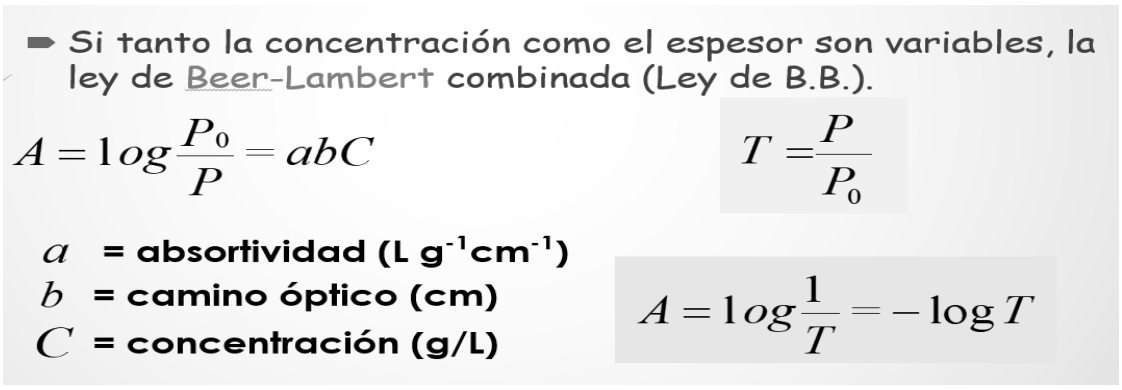

Figura 2. Ley de Bouguer-Beer

El detector medirá la diferencia de potencia del haz de radiación luego de comparar con una referencia (generalmente realizada con el disolvente) antes y después de atravesar la muestra que contiene el

analito de interés. Para asegurar los resultados analíticos del laboratorio, este tipo de equipo requiere controles de su desempeño mediante una calificación completa.

Los ensayos que normalmente se realizan para la calificación de un espectrofotómetro UV-visible son:

- Exactitud de longitud de onda,
- Exactitud fotométrica,
- Ruido,
- Radiación parásita.

Para realizar la verificación de la **exactitud de longitud de onda** se puede realizar utilizando la o ls propias fuentes de radiación que tiene el equipo. Esta fuente de radiación emite r a longitudes de onda definidas dependiendo de su construcción y el elemento que contengan (deuterio, tungsteno, xenón) Cada elemento tendrá longitudes de onda características según las transiciones electrónicas que se den al estar energizadas. La manera más práctica y simple es utilizar las líneas de emisión de la lámpara de deuterio (si el instrumento la tiene) o xenón del propio instrumento, es la medida de la longitud de onda de una disolución de óxido de holmio exactamente preparada o comprada con un certificado de análisis o el uso de un filtro sólido de este elemento también acompañado de un certificado.Esta operación puede hacerse mediante la ayuda del software del equipo.

Para el caso del estudio de la **radiación parásita** (también denominada luz difusa), se sabe que la existencia de este fenómeno causas desviaciones significativas en la linealidad de las respuestas, sobre todo a absorbancias mayores a 1,0, este es el principal motivo por el cual cuando se trabaja con un espectrofotómetro se elige un rango de absorbancias entre 0 y 1,0, es un rango donde la luz difusa no se espera que tenga una presencia significativa Las especificaciones sobre cuando se pasa o no un test de radiación parásita son variables, depende del marco en el que se esté trabajando en el laboratorio, las especificaciones para una determinada aplicación y las posibilidades del equipo disponibles según lo que declara el fabricante.

Se deben estudiar las hojas de especificación de cada equipo con atención. Para este caso se revisarán las hojas de los equipos disponibles en el laboratorio del curso. Esta especificación a veces se da en la magnitud Absorbancia y otras veces en %T máximo admitido, por lo cual es importante manejar ambas formas de expresión fluidamente.

En la Figura 3 puede ver un ejemplo de cómo afecta la linealidad de una calibración (desviación a la Ley de Bourguer y Beer según efecto de radiación parásita, expresada como %T.

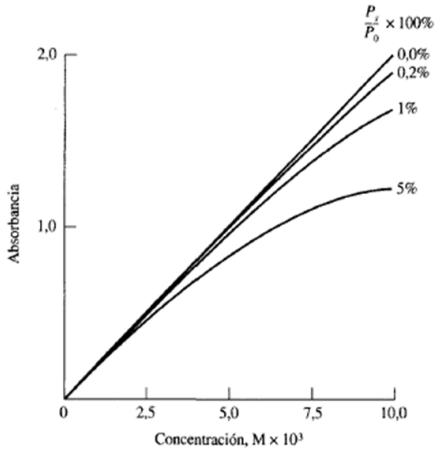

Figura 3. Efecto de la radiación parásita en el cumplimiento de la Ley de Bouguer-Beer

Para evaluar la **exactitud fotométrica**, sabemos que en un rango definido de concentraciones de disoluciones podemos tener respuestas lineales y medidas fotométricas reproducibles, la exactitud fotométrica es muy importante en las medidas exactas la absortividad que es usado para caracterizar el analito y para asegurar que los datos de transmitancia y absorbancia sean comparables entre diferentes espectrofotómetros.

6. PROCEDIMIENTO

El laboratorio cuenta con cuatro espectrofotómetros marca Thermo Scientific, modelo Genesys 10 S UV Visible Scanning. Estos equipos se pueden adquirir junto a un kit de calificación que el proveedor ofrece. Discutir con el docente la hoja de especificaciones del equipo según el modelo.

Es posible trabajar con el kit disponible, el cual consiste en una serie de filtros para diferentes operaciones de calificación. Se discutirá en clase el uso de los mismos y la información provista en el manual del fabricante.

Para todo el proceso debe encenderse el equipo 30 minutos antes de comenzar las operaciones para su estabilización. Realizar esta operación ni bien se ingresa al laboratorio.

Cada subgrupo seleccionará un equipo para trabajar (ver forma de codificar el equipo, el número de serie por ejemplo es característico de cada equipo y es único para el mismo)

Antes de comenzar familiarizarse con el instrumento, ver como és el compartimiento de muestras, que posiciones tiene y a qué refiere cada uno (fueron utilizados en el curso anterior pero conviene recordarlo).

6.1. ENSAYO DE EXACTITUD DE LONGITUD DE ONDA.

El equipo permite verificar la exactitud de longitud de onda de dos maneras, de forma interna y de forma externa, ésta última se realiza con estándares. Para todos los casos se debe haber dejado estabilizar al instrumento por el tiempo establecido.

Exactitud de longitud de onda interna.

a) Presionar el interruptor "Test", en donde se desplegará el menú de "Tipos de Análisis" y seleccionar el modo "Verificación de Funcionamiento".
b) Selecciona el modo "Exactitud L.O. (Interna).
c) Se despliega el menú en donde aparecen tres longitudes de onda con su tolerancia en nm, está tres longitudes de onda corresponden a los máximos de la lámpara de Xenón (con la cual trabaja en equipo).
d) Presionar el interruptor de "Iniciar Análisis".
e) Registrar el resultado para cada longitud de onda, en el formulario correspondiente para su posterior discusión y diagnóstico.

Exactitud de longitud de onda con estándares.

a) Presionar el interruptor "Test", en donde se desplegará el menú de "Tipos de Análisis" y seleccionar el modo "Verificación de Funcionamiento".
b) Selecciona el modo "Exactitud L.O. (Estándares).
c) Colocar el estándar de longitud de onda identificado con la letra "**λ**" en la posición correspondiente.
d) Se despliega el menú en donde se deben completar los campos con las longitudes de onda esperadas, según los valores del certificado de análisis con la tolerancia respectiva.
e) Presionar el interruptor de "Iniciar Análisis".
f) Registrar el resultado para cada longitud de onda, en el formulario correspondiente.

Exactitud de longitud de onda con estándares. (Modo Barrido).

a) Presionar el interruptor "Test", en donde se desplegará el menú de "Tipos de Análisis" y seleccionar el modo "Modo Barrido".
b) Selecciona el modo de medición (Transmitancia).
c) Setear L.O. de inicio en 350 nm y L.O. final en 850 nm. (Valores sugeridos por protocolo del fabricante)
d) Setear el "Data Interval" en 0.5 nm. (Sugerido por protocolo del fabricante).
e) Verificar la ausencia de celdas de medición en el rack, presionar "Medir línea de base".
f) Colocar la celda del estándar de longitud de onda identificado con la letra "**λ**" en la posición correspondiente.
g) Presionar el interruptor de "Iniciar Análisis".

h) Registrar el resultado para cada longitud de onda, en el formulario correspondiente en campo de observaciones; identificar los máximos de transmitancia con el modo "Matemático" del software del equipo.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

Según resultado arrojado por el equipo, registrar el mismo en el formulario correspondiente a los registros.

6.2. ENSAYO DE EXACTITUD FOTOMÉTRICA.

Se realizará la exactitud fotométrica según establece el software del equipo y también verificando con un filtro estándar en modo transmitancia, cambiando la longitud de onda. Para todos los casos se debe haber dejado estabilizar al instrumento por el tiempo establecido.

a) Presionar el interruptor "Test", en donde se desplegará el menú de "Tipos de Análisis" y seleccionar el modo "Verificación de Funcionamiento".
b) Selecciona el modo "Exactitud Fotométrica".
c) Colocar los filtros de estándares identificados por los valores de transmitancia 3%, 10%, 30% y 50%, en los lugares correspondientes de las celdas.
d) Presionar el interruptor de "Agregar nm" y elegir la longitud de onda de 590 nm (Ver certificado en el formulario de registros).
e) Ingresar los valores de transmitancia esperada para la longitud de onda elegida y la tolerancia especificada en el certificado.
f) Presionar "Iniciar Análisis".
g) Registrar el resultado emitido por el equipo.

Verificación de la exactitud fotométrica cambiando la longitud de onda para un mismo filtro estándar.

a) Presionar el interruptor "Test", seleccionar "ATC Básica", este es un modo de medida de absorbancia y transmitancia.
b) Cambiar a modo transmitancia.
c) Presionar "Medir blanco".
d) Elegir un filtro estándar cualquiera para la verificación y colocarlo en el lugar correspondiente para su medición.
e) En el display del equipo, se obtiene la medida de forma directa.
f) Verificar el valor de transmitancia informado por el equipo y compararlo con el valor certificado para cada longitud de onda certificada.
g) Registrar el resultado correspondiente.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

Se acepta si se cumple con las tolerancias establecidas por el certificado.

6.3. ENSAYO DE RADIACIÓN PARÁSITA.

a) Luego de estabilizado el instrumento.
b) Presionar el interruptor "Test", en donde se desplegará el menú de "Tipos de Análisis" y seleccionar el modo "Verificación de Funcionamiento".
c) Selecciona el modo "Exactitud Fotométrica".
d) Colocar según establece el equipo, los filtros estándares de "SRE220" en la posición 1 y "SRE400" en la posición 3.
e) Presionar "Iniciar Análisis".
f) Registrar el resultado en el formulario correspondiente a los registros.

CRITERIO DE ACEPTACIÓN.

Se acepta si se cumple con las tolerancias establecidas por el certificado.

7. REGISTROS.

FO3-25.v1 - Calificación de Espectrofotómetro.

8. REFERENCIAS.

Genesys 10 Spectrophotometers – Operator´s Manual – Thermo Electron Corporation
https://knowledge1.thermofisher.com/Molecular_Spectroscopy/Ultraviolet-Visible_and_Visible_(UV-Vis_and_Vis)_Spectrophotometry/GENESYS/GENESYS_User_Guides/269-251700_-_Rev_A_-_GENESYS_10S_Vis_User_Guide

9. ANEXOS.

9.1. Hoja de especificaciones técnicas del espectrofotómetro utilizado.
9.2. "SPECTRONIC Standards Kit."

10. MODIFICACIONES.

No aplica.

ANEXOS:

A) Hoja de especificaciones técnicas del espectrofotómetro utilizado

Appendix A - Specifications

Specifications

Table 1 Specifications for GENESYS 10 spectrophotometers[1]

	GENESYS 10 Vis	GENESYS 10 UV	GENESYS 10 UV Scanning
Spectral Bandwidth	5nm	5nm	
Optical System	Single-beam, grating-based, single detector	Split-beam, grating-based, dual detectors	
Lamp Source; Lifetime	Tungsten-halogen; 1000 hours typical	Xenon; 5 years typical	
Wavelength:			
Range	325 - 1100nm	190 - 1100nm	
Accuracy	± 1.0nm		
Repeatability	± 0.5nm		
Display	320 x 240 pixel backlit LCD, 3.8" x 2.8"		
Photometric:			
Range	0.3 - 125%T; -0.1 - 3.0A; 0 - 9999C		
Readout	Absorbance, Transmittance, Concentration		
Accuracy[2]	0.5% ***OR*** 0.005A whichever is greater up to 2A		
Noise	≤ 1mA at 0A; ≤ 2mA at 2A, peak-to-peak		
Drift	≤ 2mA/hour after warmup	≤ 1mA/hour	
Stray Light[3]	≤ 0.1%T at 340 and 400nm	≤ 0.1%T at 220, 340 and 400nm	
Standard Interface	Bi-directional RS232C		Bi-directional RS232C; parallel output in PCL format
Cell Holder	1-position OR automatic 6-position cell holder		
Keyboard	Membrane keypad		
Software	Absorbance/Transmittance/Concentration, Standard Curve, Absorbance Ratio, Absorbance Difference, Kinetics, Survey Scan, 3-Point Net, Multiwavelength, Performance Validation		As G10 UV but with full-range scanning Scanning speed: 200-1000nm/min Sampling interval: 1, 2, 3, 5nm
Test Storage	Up to 40 sets of test parameters		
Languages	Software and Printout: English, French, German, Spanish, Italian (user selectable) Operator's Manual: English, French, German, Spanish, Italian		
Printer (optional)	40-column internal graphics		40-column internal graphics; external HP PCL printer

[1] These specifications are valid only after a 30-minute warm-up period (Vis unit only) and when the required environmental conditions (see below) are met.
[2] Measured using NIST 930D filters
[3] 220nm, 340nm and 400nm measurements with SPECTRONIC Standards (#333150)

A-1 GENESYS 10 Operator's Manual

B) SPECTRONIC Standards Kit. CERTIFICADO DE CALIBRACIÓN

SPECTRONIC Standards 2 SN: SA1321 Calibration Data Summary Date 22 Dec 2016

Filter ID	SA1321-1	SA1321-2	SA1321-3	SA1321-4
Nominal	50%T / 0.3 A	30%T / 0.5 A	10%T / 1.0 A	3%T / 1.5 A
Uncertainty	± 0.0026 A	± 0.0026 A	± 0.0031 A	± 0.0061 A
440.0 nm	45.2 / 0.345	27.2 / 0.565	7.4 / 1.128	2.2 / 1.656
465.0 nm	50.9 / 0.294	33.6 / 0.474	9.3 / 1.032	3.1 / 1.513
546.1 nm	51.4 / 0.289	34.5 / 0.463	9.0 / 1.045	2.9 / 1.532
590.0 nm	49.6 / 0.304	31.6 / 0.500	8.1 / 1.094	2.5 / 1.606
635.0 nm	49.7 / 0.304	31.2 / 0.506	9.6 / 1.018	3.2 / 1.494

SA1321-5
Uncertainty ± 0.5 nm
Calibrated λ. 1nm SBW
399.0 nm
524.3 nm
781.2 nm