

Aplicación de la Quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del Límite de Detección multivariable.

Juan Zuriarrain Ocio

TESIS DE LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

QUIMICA APLICADA

Fecha de Lectura: 16/07/2010

**CAPÍTULO 3
INCERTIDUMBRE EN LOS ESPECTROFOTÓMETROS
MODERNOS**

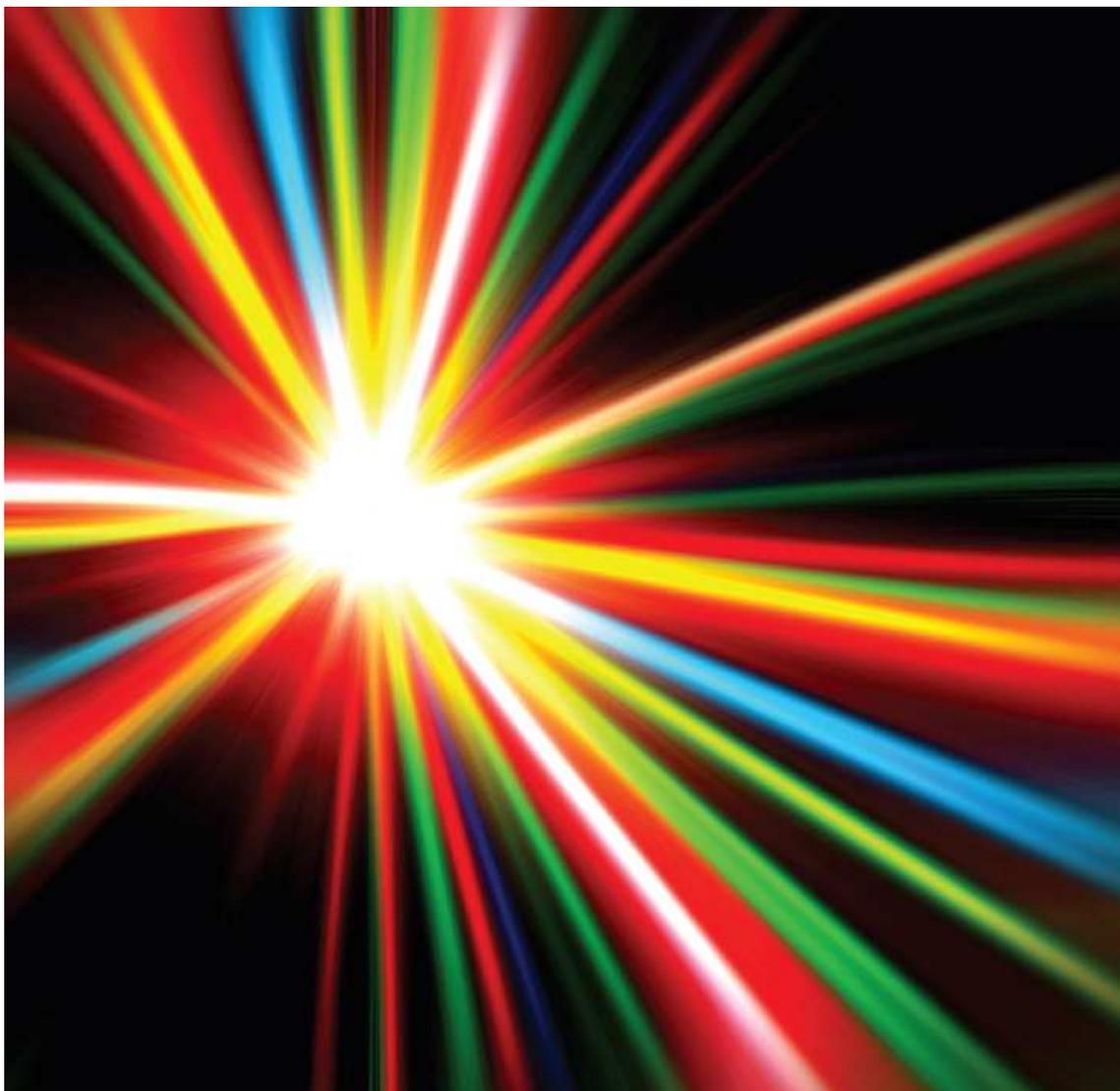


Juan Zuriarrain Ocio, 2010

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

<http://addi.ehu.es/handle/10810/5574>

INCERTIDUMBRE EN LOS ESPECTROFOTÓMETROS MODERNOS:



An up-to-date view of UV–vis molecular absorption instruments and measurements.

1. INTRODUCCION

Actualmente se sigue utilizando la idea desarrollada en los años 70 sobre errores instrumentales en espectrofotometría. El artículo clave en este tema es el escrito por L.D. Rothman, S.R. Crouch y J.D. Ingle Jr. en el año 1975¹. En él se tratan las diferentes vías por las que se origina el ruido espectrofotométrico (antigua expresión para designar la incertidumbre espectrofotométrica) y se dan las ecuaciones para éste.

Sorprendentemente se encontró que la principal causa de la incertidumbre fotométrica (al medir patrones y muestras) es la colocación de la celda de medida. Los autores, por tanto, recomendaron que se debería poner atención en la mejora de la precisión en la colocación de la celda de medida espectrofotométrica. Cuando el operador de la medida tiene especial cuidado, la precisión en la colocación de la celda depende principalmente del diseño del propio porta-celdas, pero estudios que se realizaron tanto con colocación manual como asistida por un módulo mecánico demostraron que siempre que la absorbancia es baja ($Abs.<0.5$) la colocación de la cubeta es el factor limitante de la precisión. En dicho trabajo se mencionaba lo siguiente: *“Continuamente se están dando mejoras en aspectos relacionados con la incertidumbre en la colocación de la cubeta para los espectrofotómetros comerciales, y tales mejoras deberían conducir a la consecución de la máxima precisión inherente a los propios aparatos comerciales”*.

Originalmente las cubetas se ajustaban al portacélulas mediante una especie de láminas metálicas. Por ejemplo, el espectrofotómetro (EU-701 de la casa GCA McPherson Corp.) utilizado en el trabajo citado¹ constaba de un portacubetas de cuatro posiciones con delgadas láminas de hierro incorporadas que actuaban a modo de muelle, y tenía una base de Plexiglas para mantener la cubeta en su posición (**Figura 1.a**). Con el tiempo el diseño de las láminas metálicas se fue haciendo más ancho, y así por ejemplo el portacubetas del Perkin Elmer Lambda 5 llevaba una lámina de hierro más ancha a un ángulo de 45° (**Figura 1.b**). A continuación aparecieron diseños con dos láminas metálicas a 90° que hacían mucho más reproducible la colocación de la cubeta; este tipo de sistemas fueron muy populares durante años (**Figura 1.c** y **Figura 1.d** correspondientes a los espectrofotómetros Shimadzu UV-260 y Perkin Elmer Lambda

¹ L.D. Rothman, S.R. Crouch and J.D. Ingle Jr.; *Theoretical and experimental investigation of factors affecting precision in molecular absorption spectrophotometry*; Anal. Chem. 47 (1975), 1226-1233.

EZ-201 respectivamente). Hoy en día existen sistemas de sujeción más eficientes, como el de la **Figura 1.e** (Hewlett Packard HP 8452A), en el cual, aparte de la lámina metálica a modo de muelle, se incorpora una palanca que asegura la posición de la cubeta; aunque también hay sistemas más sencillos como aquellos en los que la fijación de la cubeta se realiza con tornillos con cabeza de Teflón, situados a 90° (**Figura 1.f**).

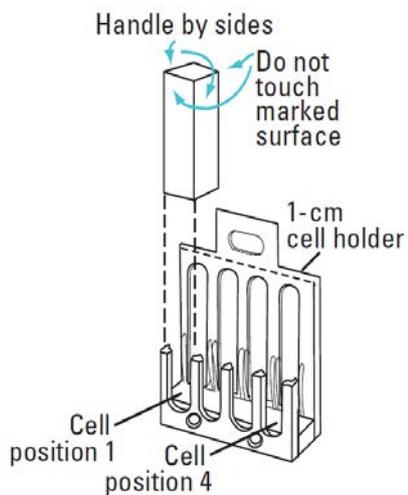
Hoy en día, todavía se considera el citado trabajo de Rothman, Crouch e Ingle como el estudio con más autoridad en este asunto^{2,3,4} y no parece que se hayan realizado nuevos estudios relevantes. De hecho pocos trabajos se pueden encontrar que incluyan datos de incertidumbre para valores de absorbancia menores que 0.1. Por lo tanto hoy en día se asumen los mismos errores, con igual magnitud y con la misma relevancia relativa que entonces.

Naturalmente, surgen por tanto algunas cuestiones a la hora de adquirir un nuevo espectrofotómetro de UV-VIS o simplemente cuando se precisa comprobar su funcionamiento. ¿Se sigue trabajando hoy día con las mismas magnitudes de incertidumbre espectrofotométrica?; ¿han introducido los nuevos portacubetas mejoras sustanciales en la incertidumbre espectrofotométrica?; Además de los detectores típicos (térmicos, fototubos, de tipo fotomultiplicador, etc.) se han desarrollado nuevos y diferentes sistemas de detección, tales como los CCDs (charge coupled devices) o los de diodos en hilera. También han surgido nuevas formas de realizar las medidas, tales como el análisis por inyección en flujo (FIA) o por inyección secuencial (SIA), o la cromatografía de líquidos (LC) y la electroforesis capilar (CE) todos ellos con los sistemas de detección espectrofotométricos. ¿Se pueden aplicar las mismas causas de error a estos nuevos instrumentos y sistemas, y de la misma manera?; ¿Qué componentes de los espectrofotómetros generarán una incertidumbre que sea significativa?. ¿Puede recomendarse algún tipo de medida que oriente acerca de la calidad de un espectrofotómetro?.

² K.L. Ratzlaff and D.F.S. Natusch; *Theoretical assessment of precision in dual wavelength spectrophotometric measurement*; Anal. Chem. 49 (1977), 2170-2176.

³ D.A. Skoog, D.M. West, F.J. Holler and S.R. Crouch, *Fundamentos de Química Analítica*, 8ª ed., Thomson-Paraninfo, Madrid 2005, pp 808-812. (Traducido de la versión inglesa, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 8th ed., Brooks/Cole, 2004)

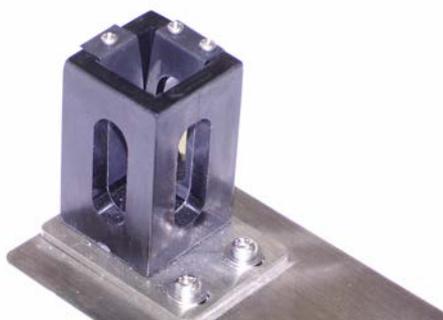
⁴ D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, McGraw hill, Boston, 2000, pp 409-411



(a) McPherson EU-701A



(b) Perkin-Elmer Lambda 5



(c) Shimadzu UV-260



(d) Perkin-Elmer Lambda EZ 201



(e) Hewlett Pacard HP 8452 A



(f) Ocean Optics CUV-UV

Fig 1. Diseño de diferentes tipos de portacubetas.

2. ASPECTOS TEÓRICOS:

Las medidas experimentales están sujetas a la incertidumbre proveniente de diferentes fuentes, tales como son el operador que las realiza, el propio instrumento de medida o las condiciones ambientales. La incertidumbre combinada será por tanto una consecuencia de todas ellas y estará incluida en la señal experimental. Algunos tipos de incertidumbre aumentan conforme lo hace el valor de la señal adquirida mientras que otras no siguen este comportamiento. Esta es probablemente la razón por la que frecuentemente se utiliza la relación señal/ruido (S/N) para expresar incertidumbres, en la que el ruido (N) incluye todo tipo de fuentes. Si es importante conocer el nivel de incertidumbre inherente de un instrumento es debido a que la precisión de las medidas realizadas dependerá de este valor.

Las fuentes de incertidumbre de los espectrofotómetros de UV-VIS son conocidas desde hace ya muchos años¹, todas ellas obedecen la expresión general:

$$\frac{s_C}{C} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434s_T}{T \log T}, \text{ o bien } \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} \frac{s_T}{10^{-Abs}} \quad (1)$$

En el caso de instrumentos sencillos con detectores Johnson o térmicos como termopares, bolómetros o detectores Golay en la región IR, donde predomina el ruido térmico, que no depende de la señal, s_T puede expresarse como:

$$s_T = k_I \quad (2)$$

o bien, según otros autores⁵:

$$s_T = k_1 \sqrt{1+T^2} = k_1 \sqrt{1+10^{-2Abs.}} \quad (2')$$

La **ecuación (2')** se convierte en **(2)** para valores de absorbancia suficientemente altos.

Para instrumentos de más calidad, con detectores tipo fototubo o fotomultiplicador, donde el ruido térmico se hace insignificante comparado con el ruido

⁵ G. Currell, *Analytical Instrumentation. Performance Characteristics and Quality*, Wiley, Chichester, 2000, pp 82-83.

de “disparo” (*shot noise*: fluctuación aleatoria de fondo, de la corriente electrónica que sale de una superficie que emite electrones y que se hace perceptible cuando es amplificada), s_T toma la forma:

$$s_T = k_2 \sqrt{T^2 + T} = k_2 \sqrt{10^{-Abs.} + 10^{-2Abs.}} \quad (3)$$

En el caso de la fluctuación y deriva de la intensidad de la fuente (que normalmente sólo es relevante para instrumental sencillo) y de la incertidumbre asociada a la reproducibilidad en la posición de la cubeta, el valor de s_T viene dado por:

$$s_T = k_3 x T = k_3 10^{-Abs.} \quad (4)$$

Sustituyendo las **ecuaciones (2')**, **(3)** y **(4)** en **(1)** se obtiene la forma general en la que puede expresarse el error relativo, según la fuente original del mismo.

Caso (I): Aparatos sencillos (**ecuación (2')**):

$$DSR_{Abs} (\%) = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0'434}{Abs} k_1 \sqrt{1 + 10^{2Abs}} \quad (5)$$

Que para valores de absorbancia suficientemente altos, se transforma en:

$$DSR_{Abs} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0'434}{Abs} k_1 10^{Abs} \quad (6)$$

Caso (II): Aparatos de calidad (**ecuación (3)**). El error relativo vendrá dado por:

$$DSR_{Abs} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0'434 k_2 \sqrt{1 + 10^{Abs}}}{Abs} \quad (7)$$

Caso (III): Errores asociados a la inestabilidad de la fuente y a la reproducibilidad en la posición de la cubeta (**ecuación (4)**). El error relativo resulta:

$$DSR_{Abs} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0'434 k_3}{Abs} \quad (8)$$

El error fotométrico obedece fundamentalmente al detector. En el caso de las **ecuaciones (5) y (6)** las componentes principales son “*amplifier-redout noise*” (ruido de amplificación de lectura), “*dark current shot*” (corriente oscura) y “*excess noise*” (ruido en exceso); en el caso de la **ecuación (7)** es el “*shot noise in photocurrent*” (tanto para la muestra como para la referencia); y la **ecuación (8)** recoge el ruido debido a la fuente (“*source flicker noise*”) y la componente de la posición de la celda (“*signal flicker noise*”). Una buena explicación, breve pero precisa, de esta parte se encuentra en el manual de texto de G. D. Christian⁶.

Otra fuente de error importante es la debida a la luz parásita (S_L). Se le llama así a toda radiación electromagnética de longitud de onda distinta a la seleccionada por el monocromador, que alcanza el detector y por lo tanto queda registrada por el instrumento. Ésta puede provenir del propio ambiente si el banco óptico no está bien aislado, o bien de dentro del propio espectrofotómetro por difracción de la luz en órdenes superiores no deseados, por reflexión en las paredes de las lentes, filtros, etc., por dispersiones debidas a imperfecciones, suciedad, rayas en los componentes ópticos o por luz difractada por los bordes de las rendijas⁷. Toda esta intensidad de luz “ I_s ” que llega al detector, y por lo tanto es registrada, se añade a la cantidad de luz que ha seguido todo el camino óptico “ I ”.

De este modo la luz parásita (S_L) puede darse por la expresión:

$$S_L = \frac{\text{Luz no deseada}}{\text{Luz deseada}} = \frac{I_s}{I_0} \quad (9)$$

Con lo que S_L se da, por lo tanto, como una magnitud relativa de la señal, I_0 , deseada.

En general, la transmitancia (T) se define como:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (10)$$

Siendo I_0 la intensidad de la referencia.

⁶ G. D. Christian, *Analytical Chemistry*, 6th ed., Wiley, USA, 2004, p.501-502

⁷ Howard A. Strobel and William R. Heineman; *Chemical Instrumentation: A systematic approach 3rd Ed.*; Wiley & Sons, New York (1989), 328-330.

En presencia de la luz parásita, la transmitancia aparente ($T_{Ap.}$):

$$T_{Ap.} = \frac{I + I_s}{I_0 + I_s} \quad (11)$$

Por tanto, el error producido en la Transmitancia, debido a la presencia de la luz parásita, puede ponerse como:

$$s_T = T_{Ap.} - T = \frac{S_L(1-T)}{1 + S_L} \quad (12)$$

Y como, en general, la luz parásita es $\ll 1$:

$$s_T = S_L (1-T) \quad (13)$$

Llevando esta expresión a la **Ecuación 1**, se obtendrá la expresión de la incertidumbre espectrofotométrica debida a la presencia de luz parásita:

$$DSR_{Abs} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0'434_3}{Abs} \frac{S_L(1-10^{-Abs.})}{10^{-Abs.}} \quad (14)$$

Para cada caso en particular, el error global provendrá de las aportaciones que sean relevantes, y teniendo en cuenta que la forma aditiva del error aleatorio es la varianza:

$$DSR_{Abs} = \sqrt{\sum_i (DSR_{Abs})^2} \quad (15)$$

donde i , en la **ecuación (15)**, se extiende a las diferentes formas dadas por las **ecuaciones (5)-(8) y (14)**. La **Figura 2** muestra la representación teórica de las curvas de error, donde a todas las constantes se les ha dado, arbitrariamente, el valor 0.001. Estas representaciones dan una idea de la forma de las curvas que puede esperarse, pero, lógicamente, el valor numérico de DSR_{Abs} , y con él la posición de la curva, dependerá de los valores de k_1 , k_2 , k_3 y S_L .

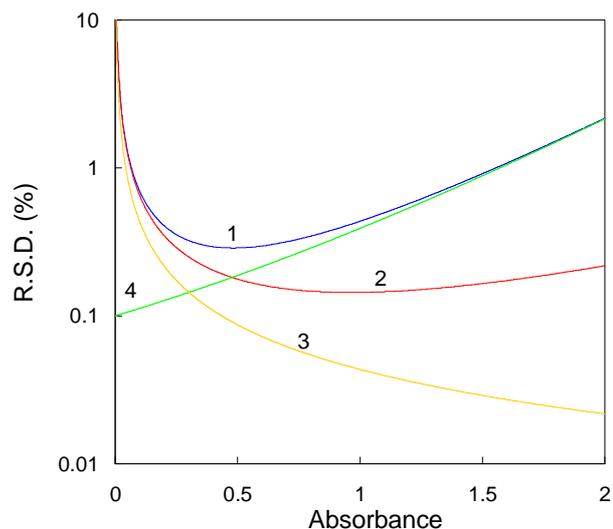


Fig. 2: Representación teórica del error relativo en la medida de absorbancia como función de la misma. 1, **Ecuación (5)**; 2, **ecuación (7)**; 3, **ecuación (8)**; 4, **ecuación (14)**. Para los efectos suma hay que tener en cuenta la **ecuación (15)**. $k_1 = k_2 = k_3 = S_L = 0.001$.

En conjunto, por lo tanto, habrá que esperar que para cada aparato se obtengan curvas resultantes de las combinaciones de las **ecuaciones (5)** y **(7)**, a las que habrá que sumar (**ecuación (15)**) el efecto que tenga la incertidumbre en la reproducibilidad de la posición de la cubeta (**ecuación (8)**) cuando se hagan las medidas y la presencia de luz parásita **ecuación (14)**.

A modo de resumen se incluyen todas las ecuaciones en la siguiente tabla.

Tabla 1. Expresiones para los distintos casos de incertidumbre espectrofotométrica, y su efecto en la incertidumbre relativa expresada como absorbancia. Los símbolos s_{Abs} , s_T y s_C representan la correspondiente desviación estándar de la absorbancia, transmitancia y concentración (incertidumbres estándar).

Fuente de incertidumbre espectrofotométrica	Expresión	Incertidumbre Relativa en la Absorbancia
Expresión general para el error fotométrico.	$\frac{s_C}{C} = \frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{T \log T} s_T$ (1)	$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} \frac{s_T}{10^{-Abs}}$ (1)
Detectores térmicos	$s_T = k_1 \sqrt{1 + 10^{-2Abs}}^a$ (2')	$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} k_1 \sqrt{1 + 10^{2Abs}}^b$ (5)
Detectores fotónicos.	$s_T = k_2 \sqrt{10^{-Abs} + 10^{-2Abs}}$ (3)	$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} k_2 \sqrt{1 + 10^{Abs}}$ (7)
Colocación de la celda y fluctuaciones de la fuente.	$s_T = k_3 10^{-Abs}$ (4)	$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} k_3$ (8)
Luz Parásita	$s_T = \frac{S_L(1-T)}{1+S_L}$ (12)	$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} \frac{S_L(1-10^{-Abs})}{10^{-Abs}}$ (14)
Error fotométrico global.		$\frac{s_{Abs}}{Abs} = \sqrt{\sum_i \left(\frac{s_{Abs}}{Abs} \right)_i^2}$ (15)

^a Algunas veces la expresión propuesta es (2) $s_T = k_1$. Ambas expresiones se vuelven similares para valores altos de absorbancia.

^b Cuando $s_T = k_1$, la ecuación (5) se convierte en: (6) $\frac{s_{Abs}}{Abs} = \frac{0.434}{Abs} k_1 10^{Abs}$

Los valores de k_1 y k_2 pueden calcularse experimentalmente realizando repetidas medidas sobre una misma disolución a una o a varias longitudes de onda sin sacar la cubeta del portacélulas. Si el proceso se repite para diferentes concentraciones de absorbente se obtendrán diferentes valores experimentales que deberán situarse en una curva de error tipo a las de la **Figura 2**. El valor de k_3 puede calcularse siguiendo un proceso similar, pero sacando la cubeta del portacélulas y volviéndola a meter para cada medida. Del efecto global puede calcularse k_3 si previamente se conoce k_1 y/o k_2 . El valor de S_L generalmente viene dado por el fabricante, y comprende valores entre 0.05% y 0.4% dependiendo del aparato en cuestión y la longitud de onda a la que se mida; no obstante puede comprobarse experimentalmente usando la **ecuación (14)**, aunque la experiencia propia indica que los valores dados por el fabricante se ajustan a la realidad.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos:

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad analítica. Se emplearon sin ningún tipo de purificación previa, y se trabajó utilizando siempre agua bidestilada.

Se prepararon disoluciones stock 2.5×10^{-2} mol L⁻¹ de ferroina en agua y de dicromato potásico 10^{-2} mol L⁻¹ en ácido sulfúrico 5×10^{-3} mol L⁻¹. A partir de estas disoluciones se prepararon diariamente otras más diluidas según las necesidades: ferroina entre 8×10^{-8} y 9.5×10^{-5} mol L⁻¹ con agua y dicromato potásico entre 4×10^{-7} y 6×10^{-4} mol L⁻¹ con sulfúrico 5×10^{-3} mol L⁻¹.

3.2. Instrumentación y procesado de datos:

Espectrofotómetro de diodos Hewlett-Packard 8452. Dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) Ocean Optics: USB2000 dotado de rendija de entrada de 25 μ m, dos USB4000 de los cuales uno no tenía rendija de entrada y otro con una rendija de 25 μ m; Y un espectrofotómetro de alto rendimiento y con dispositivo de refrigeración QE65000 sin rendija de entrada; Todos ellos de Ocean Optics. Todas las fibras ópticas utilizadas con los CCDs estaban solarizadas para poder trabajar en la zona UV (λ , 200-350 nm), los diámetros de las fibras estaban comprendidos entre 100 y 600 μ m. Como fuente de luz UV-VIS para los dispositivos CCDs se utilizó la DT-MINI-2-GS.

Para las medidas realizadas en flujo, se empleó un sistema de inyección secuencial, con un módulo multijeringas 4S con jeringas de 10 ml Hamilton y uno de válvulas de selección de 8 puertos VA 2 SW (Crison, Alella, Barcelona). Todo el sistema se controlaba por ordenador con el programa Autoanalysis (Sciware, Palma de Mallorca, Spain). Se puede ver un esquema del montaje en la **Figura 3**, en la que se intentan seguir las recomendaciones proporcionadas por la I.U.P.A.C en cuanto a la descripción de los sistemas de flujo⁸.

⁸ E. A. G. Zagatto, J.F. Van Staden, N. Maniasso, R.I. Stefan and G.D. Marshall; *Information essential for characterizing a flow-based analytical system*; Pure Appl. Chem., 2002, 74, 585-592.

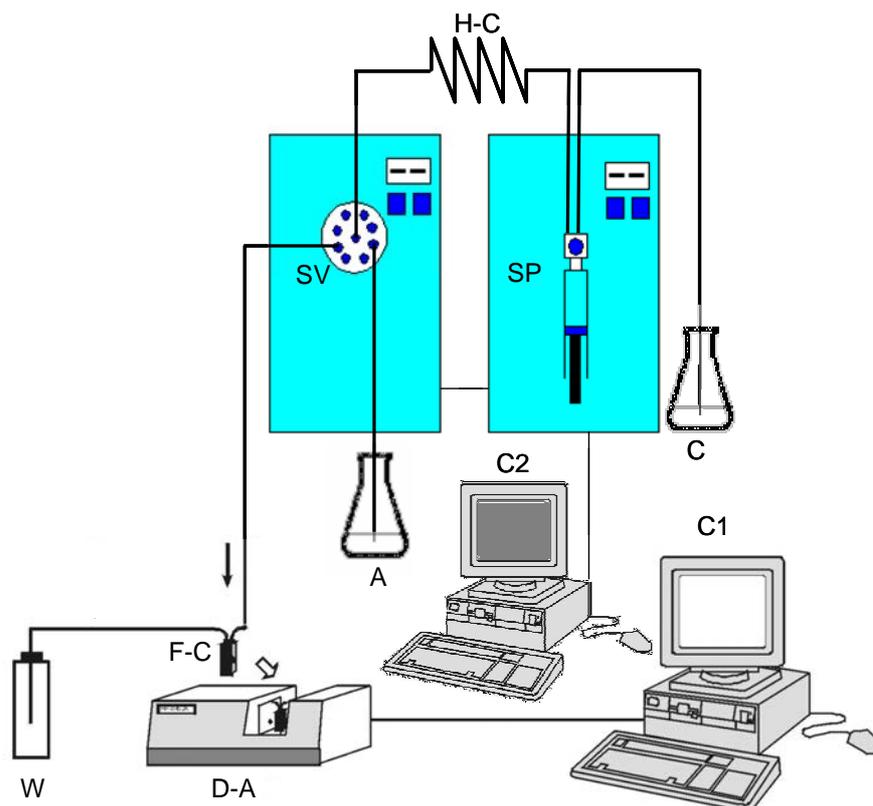


Fig 3. Esquema de los componentes del sistema de inyección secuencial (SI). Todos los tubos son de Teflón y de diámetro interno de 0.8 mm excepto el tubo de carga del portador que era de 1.5 mm. A, absorbente (ferroína); C, portador (agua); C1 y C2, ordenadores; D-A, detector de diodos; F-C, cubeta de flujo; H-C, bucle de carga; S-P, bomba de pistón; S-V, válvula de selección de 8 puertos; W, desecho.

El valor de la desviación estándar para cualquier absorbancia se calcula a partir de las aproximadamente 20 medidas realizadas en cada caso a la longitud de onda seleccionada. Los ajustes de las curvas por mínimos cuadrados se realizaron mediante el programa “Table Curve 2D versión 5.0.1”. El valor del coeficiente de correlación en los ajustes de las curvas estuvo siempre entre 0.85 y 0.95.

3.3. Procedimientos:

3.3.1. Medidas manuales (en “batch”):

Para calcular la desviación estándar relativa RSD_{Abs} asociada a cualquier medida de absorbancia, se adquirieron unos 20 espectros completos de los absorbentes durante 3 ó 4 minutos (uno cada 10 segundos) para el caso del detector de diodos y para los de acoplamiento de carga (CCDs). Cuando la cubeta no se mueve del portacélulas, el mejor modo de retirar la disolución de ella fue por succión mediante el uso de una bomba peristáltica. Se utilizaron micropipetas para verter de nuevo

disolución en el interior de la cubeta, evitando siempre el uso de cuentagotas (el material de goma puede fácilmente contener impurezas que dan interferencias al medir valores de absorbancia bajos). En todos los casos se homogeneizó la cubeta tres veces con la nueva disolución y para cada sesión de 20 adquisiciones se midió previamente la disolución de blanco (agua o sulfúrico 5×10^{-3} M).

Antes de cada sesión la cubetas se limpiaban con mezcla crómica, se aclaraban con agua bidestilada y se dejaban secar. Cada vez que la cubeta se retira del portacélulas, se recomienda el uso de tejido para lentes para no ensuciar las paredes de la célula con la grasa de los dedos. Siempre que fuese necesario, las superficies de las cubetas se limpiaron con tejido para lentes impregnado en metanol.

Cuando se utilizó el detector de diodos, el tiempo de integración se fijó en 1 s (0.1 s de adquisición x 10 medidas realizadas y promediadas), mientras que para los CCDs el tiempo de integración se fijaba de tal forma que al colocar una cubeta con disolución de blanco en su interior la intensidad de la luz proveniente de la fuente fuese lo máxima posible sin llegar a saturar el detector; Después, para que las medidas fuesen lo más parecidas posible a las realizadas con el espectrofotómetro de diodos, se promediaban tantos espectros como fuesen necesarios para que el producto entre el tiempo de integración y el número de promediados fuese aproximadamente 1 s.

La anchura de banda para el detector de diodos es de 2 nm, mientras que para los distintos espectrofotómetros CCD se consiguen diferentes valores de resolución óptica (FWHM⁹) dependiendo de las diferentes configuraciones adoptadas; es decir, el tipo de CCD con o sin rendija y el diámetro de fibra utilizado¹⁰.

⁹ La resolución óptica designada con el término en Inglés Full-Width Half-Maximum (FWHM) se utiliza para describir la anchura de una distribución. Cuanto mayor sea el valor de la resolución óptica se encuentra una peor resolución espectral. La resolución óptica de una fuente monocromática dependerá de la densidad de líneas de la red de difracción (en mm^{-1}) y de la anchura de la óptica de entrada (bien sea la rendija de entrada o la fibra óptica). De este modo la resolución mejorará con un aumento de la densidad de líneas de la red de difracción y empeorará a medida que se aumenta la anchura de la rendija de entrada o bien el diámetro de la fibra óptica utilizada en caso de ausencia de rendija. La resolución óptica aproximada puede obtenerse utilizando la siguiente fórmula:

Resolución Óptica = Dispersión x Resolución en píxeles.

- **Dispersión** = Rango Espectral del Enrejado/Número de Píxeles en cada variedad de CCD.
- **Resolución en píxeles**: Depende de la variedad de CCD y de del diámetro de fibra o rendija de entrada.

¹⁰ *Optical resolution*; <http://www.oceanoptics.com/technical/opticalresolution.asp>; (visto en 2010).

La longitud de onda utilizada para la ferroina fue 514 nm y para el dicromato fue 350 nm¹¹ ($\epsilon_{350} = 3,150 \text{ mol}^{-1} \text{ L cm}^{-1}$). La deriva en la línea base (Abs. = 0) fue siempre nula durante el tiempo que se toma para la adquisición de cada serie de unas 20 medidas correspondientes a la misma disolución. Esto se comprobó utilizando longitudes de onda a las que los absorbentes no mostraban ningún tipo de absorción.

Los estudios realizados están relacionados fundamentalmente con la incertidumbre espectrofotométrica, pero también se hace referencia a la influencia de ciertos parámetros de la configuración de los espectrofotómetros CCD, como el tiempo de integración, el promediado de espectros, la presencia o ausencia de rendija de entrada etc.

3.3.2. *Medidas en flujo por inyección secuencial (SI).*

Se tomó un volumen de 450 μl de ferroina $1.25 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a través de uno de los puertos de la válvula de selección. Una vez almacenado en el bucle de carga (ver **Figura 3**), se inyectan diferentes volúmenes (controlados por software), cambiando el sentido del émbolo, a un caudal de 7.5 ml min^{-1} , de tal forma que el pico se detenga cada vez en un punto diferente (**Figura 4**). Una vez que el flujo se detiene se dejan 5 segundos para que se estabilice, antes de comenzar a adquirir las 20 medidas consecutivas con el detector de diodos, de la misma forma que se hacía de forma manual, pero en este caso, el intervalo entre cada medida era solo de 5s. para evitar la posible dispersión.

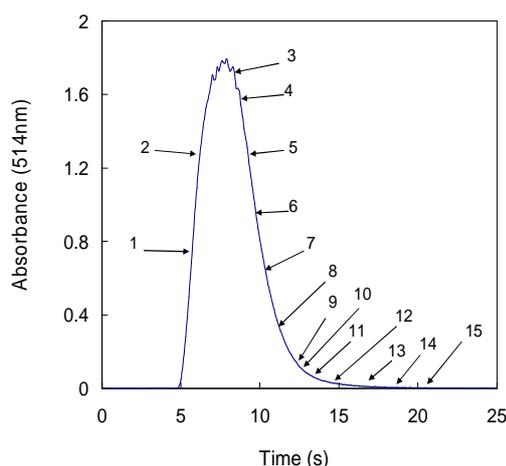


Fig.4: Perfil FIA utilizado para calcular el error de la medida instrumental. Las flechas indican los diferentes puntos en los que el flujo se detiene para hacer 20 medidas consecutivas de absorbancia. Los puntos 1 y 2, no se utilizaron en ninguno de los casos. Con cada inyección, el flujo solo se detiene una vez en cada uno de los puntos señalados.

¹¹ C. Burgess and T. Frost, *Standards and best practice in absorption spectrometry*, Blackwell Science, Oxford (1999), p. 54.

Cada inyección se utiliza únicamente para un punto, por lo que sólo se adquiere un set de 20 medidas por bolo de inyección, correspondientes a un valor de absorbancia. Se probó a realizar todas las medidas con una única inyección, pero se encontraron efectos adicionales distintos a la propia incertidumbre de la medida, probablemente debidos a la dispersión extra provocada al iniciar y cerrar el flujo.

3.3.3. *Obtención de datos simulados*

Los datos simulados de absorbancia que se utilizan se obtuvieron de un modelo de espectrofotómetro virtual e interactivo (Figura 5) disponible gratuitamente¹², ejecutado bajo el entorno de OpenOffice¹³. El modelo permite cambiar varias de las condiciones experimentales (longitud de onda, anchura de la rendija, cantidad de luz parásita, etc), así como la posibilidad de incluir o no distintos tipos de ruidos (dependiente o independiente de la señal). Esta aplicación se ha modificado, dentro de lo permitido, con la idea de conseguir un mayor número de valores (concentración), y también para que la relevancia del ruido sea mayor.

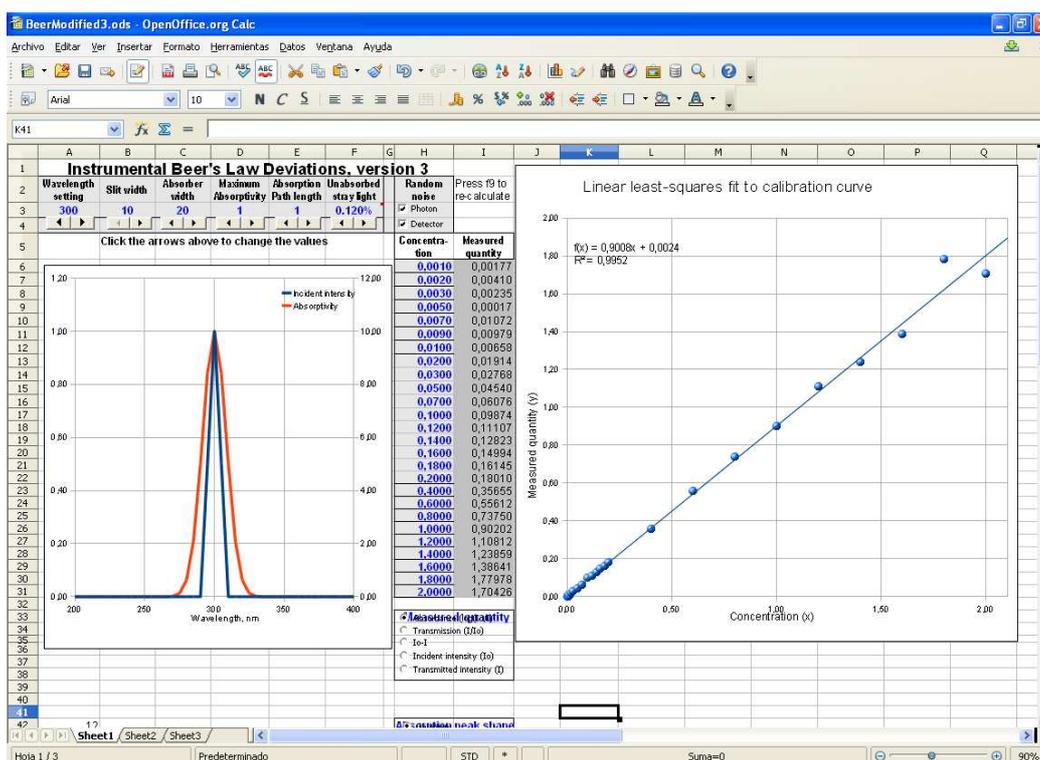


Fig.5: Hoja de cálculo que simula la obtención de datos de un espectrofotómetro. Las casillas en azul son los parámetros de entrada, los cuales pueden variarse insertándolos manualmente o bien mediante las flechas desplazadoras. En la hoja (Sheet2) del "libro" se encuentra otra hoja de cálculo con todas las fórmulas que se utilizan para la obtención en este caso de los valores de Absorbancia.

¹² Thomas C. O'Haver, *Interactive Computer Models for Analytical Chemistry Instruction*; <http://www.wam.umd.edu/~toh/models> (página revisada en 2010).

¹³ Sun Microsystems, Inc; <http://es.openoffice.org>; (página revisada en 2010).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

4.1. Luz parasita

Como ya se mencionó, la luz parasita es aquella que alcanza el detector, pero que no ha pasado a través de la muestra, o bien que pasando a través de ella es de diferente longitud de onda que la propia de medida. El efecto más importante lo causa aquella que no atraviesa la muestra y por tanto no es absorbida por el analito de interés. Este efecto conduce a una curvatura de la recta analítica que se hace más visible a valores de absorbancia altos, tal y como se puede observar en la **Figura 6.a** obtenida mediante datos simulados (**Figura 5**) y por tanto para todo el siguiente estudio de error sólo se tomarán aquellos valores de absorbancia en los que la luz parásita no afecte el cumplimiento de la ley de Beer.

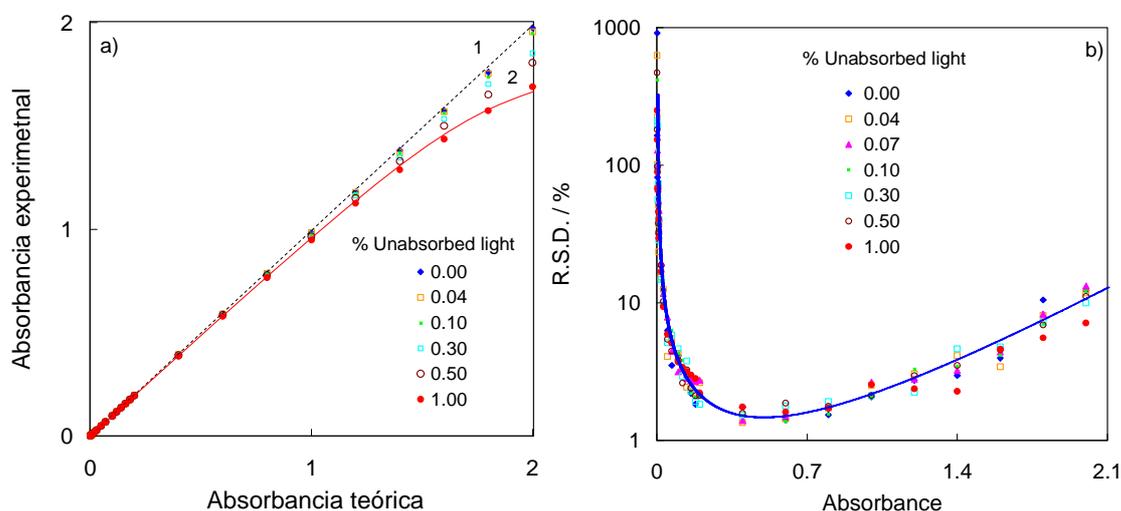


Fig. 6: a) Desviación de la ley de Beer debido a la presencia de luz parásita; la curva (1) corresponde a la idealidad (sin luz parásita), mientras que la 2 corresponde a la presencia de luz parásita. b) Efecto producido por la luz parásita. Los valores de absorbancia se obtuvieron a partir de datos simulados. Cada una de las series corresponde a un valor de S_L , tal y como se aprecia en la misma representación. La curva trazada, corresponde a la regresión no lineal por ajuste por mínimos cuadrados de todos los puntos a la **ecuación (15)**, como suma de las **ecuaciones (5) y (7)**.

La **Figura 6.b** muestra la curva de error a diferentes valores de absorbancia, junto con las incertidumbres experimentales calculadas para distintos valores de luz parásita expresada en porcentaje de luz no absorbida¹⁴; se ve que la magnitud de la luz parásita no hace variar, prácticamente, la curva de error, y la curva de regresión no lineal se ajusta muy bien para los puntos (simulados) obtenidos. Se ha comprobado que

¹⁴ Thomas C. O'Haver, *Instrumental Deviation from Beer's Law*; <http://terpconnect.umd.edu/~toh/models/BeersLaw.html/> (página revisada en 2010).

cuando existen otras fuentes de incertidumbre, la influencia de la luz parásita en la incertidumbre espectrofotométrica, es inapreciable y no se considerará obtener su valor de aquí en adelante.

4.2. Incertidumbre para espectrofotómetros de diodos:

A continuación, se muestran repetidos espectros de una misma disolución de dicromato adquiridos según el procedimiento descrito anteriormente para el caso de un espectrofotómetro de diodos, tanto en el caso en el que la cubeta permanece en el portacélulas (**Figura 7.a**) como cuando se retira entre cada adquisición (**Figura 7.b**).

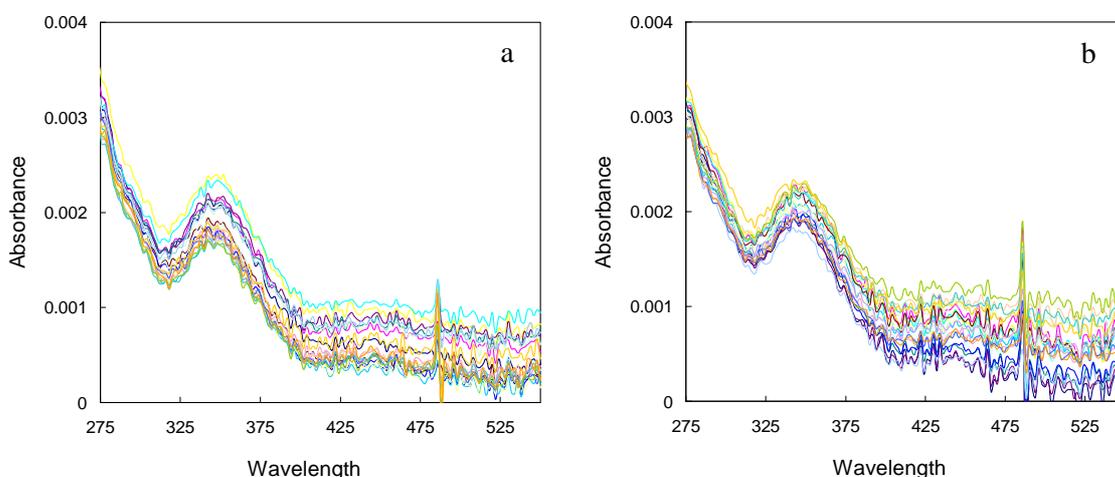


Fig 7: Espectros repetidos de una disolución de dicromato 4.74×10^{-7} M en H_2SO_4 5×10^{-3} M, **a**) sin sacar la cubeta del portacélulas y **b**) sacando la cubeta entre cada adquisición. Espectrofotómetro de diodos HP 8452. Tiempo de integración, 1 s.

La incertidumbre relativa ($\text{RSD}_{\text{Abs.}}$) encontrada para las distintas concentraciones de dicromato y por tanto para distintos valores de absorbancia se representa en la **Figura 8** en función de la absorbancia. Siempre que la cubeta permanezca en el portacubetas (puntos huecos en la **Figura 8**) el comportamiento de la incertidumbre queda bien explicado por la **ecuación (7)** (ruido de disparo), tanto para la zona de absorbancias bajas (**Figura 8.a**) como para la de altas (**Figura 8.b**).

Se realizó el ajuste (regresión no lineal por mínimos cuadrados) de los puntos huecos de la **Figura 8**. La curva obtenida aparece también en la **Figura 8** como “*curva I*” y del análisis por regresión se puede obtener el valor del parámetro k_2 :

$$k_2 = 3.0 \times 10^{-4}; s = 0.2 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.91) \quad (16)$$

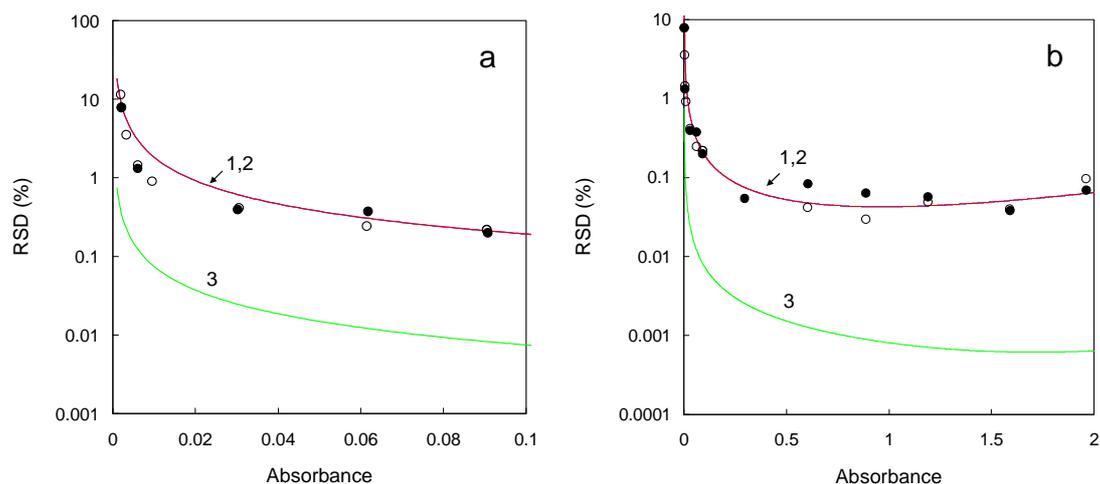


Fig. 8: Espectrofotómetro de Diodos. Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia, tanto cuando la cubeta permanece en el portacélulas (\circ), como cuando se saca en cada adquisición de la medida (\bullet). **1**, Línea de regresión de los puntos huecos. **2**, Línea de regresión de los puntos llenos. **3**, Línea teórica que representa el error debido a la colocación de la cubeta, y que se deduce de las líneas **1** y **2** haciendo uso de la **ecuación (15)**. **(a)** Zona de absorbancias bajas. **(b)** Intervalo completo de absorbancias.

Este es el procedimiento general con el que se calculan las constantes de incertidumbre en cada caso. Obviamente, y teniendo en cuenta la **ecuación (7)**, también podría obtenerse el valor de k_2 utilizando el valor de la señal a una única longitud de onda (20 medidas consecutivas) para una sola concentración de absorbente. Se hizo de este modo para una concentración de dicromato de $3.47 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ obteniendo el valor de k_2 a diferentes longitudes de onda. Los resultados encontrados se presentan en la **Figura 9**, en la que se observa que el valor de k_2 oscila de forma aleatoria entre 2 y $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Estos resultados coinciden con el valor hallado anteriormente (**ecuación (16)**), sobre todo teniendo en cuenta que todos los valores en la **Figura 9** provienen de datos de absorbancia inferiores a 0.002 .

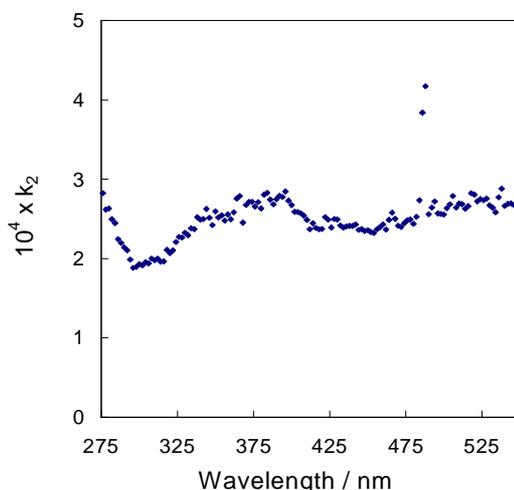


Fig.9: Valores de k_2 en función de la longitud de onda para la concentración de dicromato más baja usada de la **Figura 8**. Dicromato $3.47 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Cuando el procedimiento que se sigue es el de retirar la cubeta entre cada adquisición, se obtuvieron los resultados que se representan como puntos llenos en la **Figura 8**. Estos puntos deberían poder ser ajustados a la **ecuación (15)**, en la que se incluirían dos términos, uno proveniente de la **ecuación (7)** (ruido de disparo) y el otro de la **ecuación (8)** (colocación de la cubeta):

$$\left(\frac{S_{Abs}}{Abs}\right)_{combinado}^2 = \left(\frac{S_{Abs}}{Abs}\right)_{ruido\ de\ disparo}^2 + \left(\frac{S_{Abs}}{Abs}\right)_{colocación\ de\ celda}^2 \quad (17)$$

Al realizar tal ajuste y fijando k_2 de acuerdo con el valor previamente hallado sin sacar la cubeta del portacélulas, **ecuación (16)**, se encontró para k_3 (**ecuación (8)**) el valor:

$$k_3 = 0.2 \times 10^{-4}; s = 5 \times 10^{-4}; r^2 = 0.95 \quad (18)$$

Deber tenerse en cuenta que dada la forma matemática de las **ecuaciones (7)** y **(8)**, el efecto de los cuadrados de la **ecuación (9)** hace prácticamente insignificante la **ecuación (8)** en el efecto combinado. Esto puede observarse en la **Figura 2**, en la que la influencia de k_3 en los efectos combinados, cuando $k_1 = k_2 = k_3$, es muy pequeña. La excepción se da cuando k_3 es mucho mayor que k_2 ; en estas condiciones el término correspondiente a la colocación de la cubeta llega a ser la expresión limitante de la incertidumbre. El bajo valor obtenido para k_3 (menos del 10% de k_2 en este caso, **ecuaciones (16)** y **(18)**) significa que el efecto producido por la colocación de la cubeta en el efecto combinado, es insignificante. Esta es la razón por la que el ajuste de los puntos (**Figura 8**) tanto cuando se saca la cubeta de su posición entre medidas (**curva 2**) como cuando no se hace (**curva 1**), sea prácticamente el mismo. Como consecuencia puede decirse que, al menos para los casos considerados, el ruido de disparo es la forma limitante de la incertidumbre y que el efecto de la colocación de la cubeta, incluso para absorbancias bajas, es despreciable. Esto es contrario a lo que se ha asumido durante los últimos treinta años. Por otra parte, los valores típicos que se dan en la literatura³ para k_2 (alrededor de 0.003) son casi un orden de magnitud mayor que los encontrados en esta memoria.

En otro experimento (**Anexo III-2**) se midieron repetidamente disoluciones del absorbente ferroina en la región del visible (λ_{\max} , 514 nm) (**Anexo III-1**). Igualmente se ajustaron los puntos experimentales a las **ecuaciones (7) y (8)** y los valores que se obtuvieron para las constantes fueron los siguientes:

$$k_2 = 2.3 \times 10^{-4}; s = 0.1 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.98) \quad (19)$$

$$k_3 = 2.0 \times 10^{-4}; s = 0.6 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.88) \quad (20)$$

En este caso los valores encontrados tanto para k_2 (2.3×10^{-4}) como para k_3 (2.0×10^{-4}) son muy similares, pero incluso en este caso, el efecto de la colocación de la cubeta tiene muy poca relevancia práctica de acuerdo con las consideraciones mencionadas anteriormente.

En las especificaciones del espectrofotómetro¹⁵ se puede encontrar el siguiente dato:

$$\text{Noise (0 A.U.; 60 x 0.5 s measurements)} < 0.0002 \text{ AU r.m.s. (500 nm)}$$

Se puede comprobar si los datos que se han hallado experimentalmente se ajustan a las especificaciones que nos da el fabricante, sustituyendo este valor en la **ecuación (7)**. De este modo se obtiene:

$$s_{Abs.} = 0.0002 > 0.434 k_2 \sqrt{1 + 10^0}$$

es decir, $k_2(Abs = 0) < 3.3 \times 10^{-4}$

Lo que quiere decir que los valores encontrados ($k_2 = 3.0 \times 10^{-4}$ y 2.3×10^{-4}) se encuentran dentro de los límites marcados por el fabricante. Obviamente, la deducción experimental del valor de k_2 puede utilizarse como forma de comprobación del funcionamiento del espectrofotómetro.

Los resultados encontrados hasta ahora se obtuvieron utilizando un portacubetas nuevo. Sin embargo, alguno de estos resultados cambió completamente cuando se utilizó un portacubetas con diez años de antigüedad, todavía útil, pero en cierta manera

¹⁵ Hewlett Packard; *HP 8452A Diode-Array Spectrophotometer Handbook*; Hewlett Packard Company, Waldbronn (FRG), chap. I.

deteriorado por el mismo uso. Cuando la cubeta no se retira entre cada adquisición (puntos huecos en **Figura 10**), la **ecuación (7)** explica perfectamente los resultados experimentales encontrados, y la regresión no lineal por mínimos cuadrados nos permite encontrar un valor de k_2 similar al encontrado previamente (**ecuaciones (16)** y **(19)**); al fin y al cabo se trata del mismo espectrofotómetro. Sin embargo cuando se retira la cubeta entre cada adquisición (puntos llenos en **Figura 10**), la incertidumbre combinada que se encuentra se explica mejor con la **ecuación (17)**, en la que el término correspondiente a la colocación de la cubeta tiene una magnitud relevante.

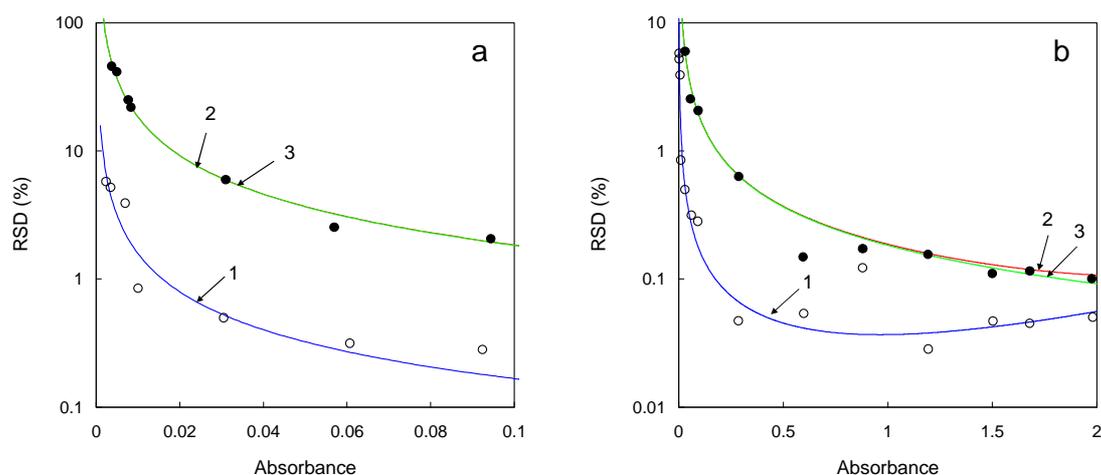


Fig.10: Espectrofotómetro de Diodos con portacubetas usado. Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia, tanto para cuando la cubeta permanece en el portacélulas (○), como cuando se saca en cada adquisición de la medida (●). **1**, Línea de regresión de los puntos huecos. **2**, Línea de regresión de los puntos llenos. **3**, Línea que representa el error debido a la colocación de la cubeta, y que se deduce de las líneas **1** y **2**. **(a)** Zona de absorbancias bajas. **(b)** Zona de absorbancias altas.

Los valores que se obtienen para las constantes son:

$$k_2 = 2.6 \times 10^{-4}; s = 0.2 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.92) \quad (21)$$

$$k_3 = 42.3 \times 10^{-4}; s = 1.0 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.99) \quad (22)$$

El valor obtenido para k_3 (42×10^{-4}) es un orden de magnitud mayor que el que se encontró al utilizar el portacubetas nuevo, lo que demuestra la gran importancia que tiene el buen estado del portacélulas; sin embargo, el valor de k_3 todavía es claramente menor que los valores típicos que se dan en la literatura para este efecto (0.013 para espectrofotómetros de alta calidad)^{1,3}.

Se han realizado estudios comparables en la Universidad de Zaragoza¹⁶ para el caso de espectrofotómetros con sistema de detección por fotomultiplicador, y muestran comportamientos similares para el *ruido de disparo*, la imprecisión de la posición de la cubeta o el deterioro del portacélulas por el uso continuado. Se utilizó un Perkin Elmer Lambda 5 (antiguo, elevada calidad y muy usado) y un Perkin Elmer Lambda EZ201 (moderno, sencillo y poco usado) y obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2. Valores experimentales para las constantes que regulan la incertidumbre en espectrofotómetros con fotomultiplicador.

Espectrofotómetro	Absorbente	$10^4 \times k_2$	$10^4 \times k_3$
Perkin Elmer Lambda 5	Dicromato	7.6 (0.3)	12.4 (0.2)
	Ferroina	4.5 (0.2)	27 (1)
Perkin Elmer EZ 201	Dicromato	7.2 (0.1)	4.5 (0.7)
	Ferroina	7.7 (0.4)	Despreciable

Los valores encontrados para el *ruido de disparo* son aproximadamente el doble de los hallados para el espectrofotómetro de diodos, pero aun y todo son mucho menores que los que cita la literatura ($k_2 = 0.003$)³.

La incertidumbre debida a la colocación de la cubeta proporciona resultados similares a los obtenidos anteriormente. Para el *Lambda 5* (muy usado), el valor de k_3 fue suficientemente alto como para que el efecto de la colocación de cubeta fuese la parte más importante de la incertidumbre, al menos cuando la absorbancia era suficientemente baja (~0.25 para dicromato; ~1.5 para ferroina). Sin embargo en el caso del *Lambda EZ201* (muy poco usado) el valor de k_3 fue lo suficientemente bajo como para hacer despreciable el efecto de la colocación de la cubeta. En general, la mayor diferencia (en lo que a incertidumbre se refiere) entre ambos espectrofotómetros no es la calidad intrínseca del aparato, sino el estado y condición de sus portacubetas, de la misma forma que en el de diodos.

¹⁶ Javier Galbán, Susana de Marcos e Isabel Sanz; Grupo de Biosensores Analíticos del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Zaragoza.

4.3. Incertidumbre para sistemas en flujo:

En general, los sistemas de flujo (HPLC, electroforesis capilar, etc.) suelen estar equipados con detectores de UV-visible, por lo que cabe esperar que la incertidumbre debida al detector sea similar a la que se encuentra en estos espectrofotómetros. Sin embargo a veces uno se puede encontrar con que los métodos cromatográficos presentan límites de detección menores que los métodos espectroscópicos equivalentes, lo que es sorprendente dado que se produce ensanchamiento de banda de la muestra a lo largo del sistema cromatográfico (inyección, columna, detector, etc.). Es cierto que en estos casos no existe el efecto de la incertidumbre en la colocación de la cubeta, pero no es seguro que esta mejora compense el inconveniente ya citado. En la literatura se pueden encontrar señales de absorción cromatográficas muy bajas que incluyen una incertidumbre sorprendentemente baja^{17,18,19}. En esas condiciones pueden esperarse límites de detección muy bajos, pero este tipo de señales no son las más comunes en los laboratorios. Se hizo, hace ya bastantes años, un estudio cooperativo sobre la precisión de las medidas en cromatografía de líquidos para relaciones de señal/ruido bajas²⁰, pero el estudio no resuelve las cuestiones planteadas.

Simulando un sistema cromatográfico, se empleó un sistema en flujo por inyección secuencial (SI) utilizando como detector el mismo espectrofotómetro de diodos anteriormente analizado. Los resultados encontrados se comparan con los encontrados por el grupo de trabajo de la Universidad de Zaragoza¹⁶ para un equipo de HPLC con detector de diodos.

¹⁷ G. J. M. Bruin, G. Stegeman, A. C. Van Astan, X. Xu, J. C. Kraak and H. Poppe; *Optimization and evaluation of the performance of arrangements for UV detection in high-resolution separations using fused-silica capillaries*; J. Chromatogr. A, 559 (1991), 163-181.

¹⁸ R. W. Jones, P. Jandik; *Various approaches to analysis of difficult sample matrices of anions using capillary ion electrophoresis*; J. Chromatogr. A, 608 (1992), 385-393.

¹⁹ E. Salhi and U. Von Gunten; *Simultaneous determination of bromide, bromate and nitrite in low $\mu\text{g l}^{-1}$ levels by ion chromatography without sample pretreatment*; Water Research, 33 (1999), 3239-3244.

²⁰ R. E. Pauls, R. W. McCoy, E. R. Ziegel, G. T. Fritz, D. M. Marmion and D. L. Krieger; *Results of a cooperative study on the precision of liquid chromatographic measurements at low signal-to-noise ratios*; J. Chromatogr. Sci., 26 (1988), 489-493.

4.3.1. Inyección Secuencial (SI):

Siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para este apartado, se inyectaron 70 μl de ferroina. El perfil de la ferroina cuando alcanza el detector es similar al mostrado en la Figura 4, y los puntos utilizados para la medida son similares a los allí usados. La zona de inicio del pico (puntos 1 y 2) no se tomó en cuenta a la hora de adquirir señales y realizar los cálculos, dado que al ser la zona con una mayor pendiente se producen grandes errores. Los resultados experimentales hallados se representan en la Figura 11.a del mismo modo que en los estudios realizados anteriormente. El detector sigue siendo el mismo espectrofotómetro de diodos, por lo que también se representa el resultado obtenido en el estudio independiente del mismo, cuando se utilizó ferroina como absorbente.

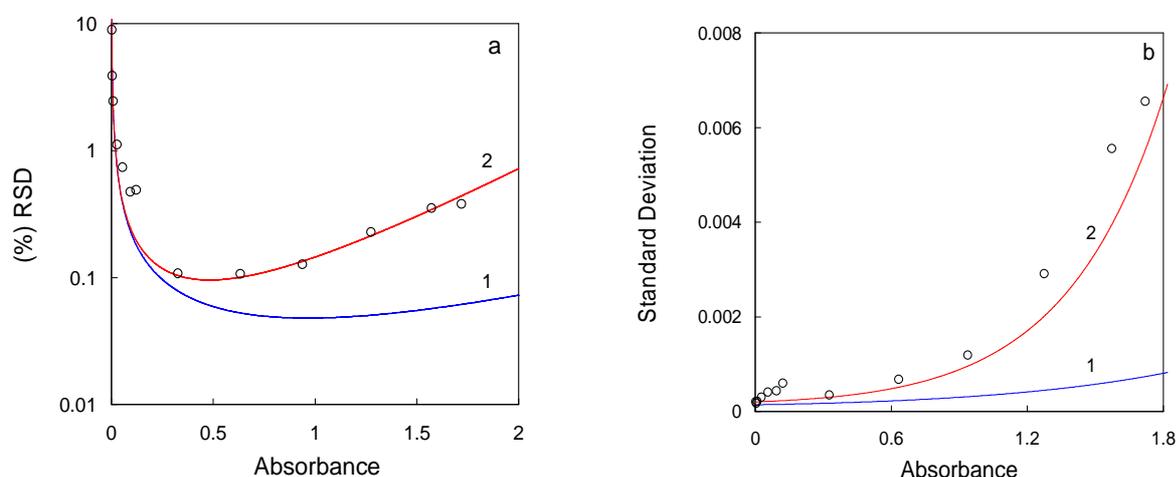


Fig.11: (○) Puntos experimentales cuando se utiliza ferroina como especie absorbente y se lleva al detector (espectrofotómetro de diodos) mediante un sistema de inyección secuencial (SI). 1) Curva de incertidumbre simulada correspondiente al efecto exclusivo del detector (“Shot noise”). 2) Curva de incertidumbre simulada correspondiente al efecto combinado del detector con el sistema SI. a) Representación logarítmica de la desviación estándar relativa de la absorbancia frente a la absorbancia; b) Representación de la desviación estándar absoluta de la absorbancia frente a la absorbancia.

Las diferencias entre los dos conjuntos de datos deberán ser atribuidas únicamente al sistema de flujo empleado (inyección, tubos, celda de flujo...etc.) ya que, como se vio, el detector está exclusivamente afectado por el llamado ruido de disparo ($k_2 = 2.3 \times 10^{-4}$). Teniendo en cuenta la **ecuación (9)**, la incertidumbre experimental (combinada) debería obedecer la siguiente expresión.

$$\left(\frac{S_{Abs.}}{Abs.}\right)_{Combinada}^2 = \left(\frac{S_{Abs.}}{Abs.}\right)_{Sistema SI}^2 + \left(\frac{S_{Abs.}}{Abs.}\right)_{Detector}^2 \quad (23)$$

La incertidumbre asociada al proceso de inyección, al sistema de tubos, la celda de flujo, etc. es independiente de la luz absorbida (o transmitida) por la muestra, por lo que el término correspondiente al “*Sistema SI*” debería obedecer la **ecuación (5)**. Por otro lado el término referente al “*Detector*” corresponde con el valor obtenido anteriormente. Utilizando este valor de k_2 obtenido para el detector de diodos en el caso de la ferroina (**Ecuación (3)**), se puede calcular el valor de k_1 deducido de la ecuación (23) por regresión no lineal. De este modo:

$$k_1 (\text{Sistema SI}) = 2.4 \times 10^{-4}; s = 0.1 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.99) \quad (24)$$

Usando los valores de k_1 y k_2 , se puede trazar la curva simulada correspondiente a la incertidumbre combinada observando que hay una buena concordancia con los puntos experimentales (Figura 11). La forma en la que la desviación estándar absoluta se mantiene constante en la zona de absorbancias bajas y después aumenta para las absorbancias más altas (Figura 11.b), confirma el efecto independiente de la intensidad de la señal que alcanza el detector.

Como los valores de k_1 y k_2 son muy similares, la incertidumbre introducida por el propio sistema de inyección secuencial (inyección, tubos, cubeta de flujo...etc.) no puede ser desestimada, y dado que al realizar la medida manualmente el efecto de la colocación de la cubeta no era relevante (valor de k_3 despreciable), puede concluirse que la incertidumbre combinada es significativamente mayor en este sistema de flujo que la obtenida cuando la medida se realiza de forma manual. Es decir, no debe esperarse ningún tipo de mejora en la precisión de la medida (límite de detección, etc.) por utilizar un sistema de flujo (inyección secuencial en este caso).

4.3.2. Sistema Cromatográfico (HPLC):

Resultados comparables¹⁶ se han encontrado con un cromatógrafo de líquidos (HPLC) cuando se utilizó la válvula de inyección para introducir la muestra, así como cuando la muestra en sí misma se utiliza como eluyente o fase móvil (no se utiliza la válvula de inyección). El uso del sistema completo de inyección aumenta apreciablemente la incertidumbre combinada. Este aumento se podría explicar por un efecto independiente de la magnitud de la señal (**ecuación (5)**) del que puede deducirse un valor de k_1 , aplicable al proceso de inyección de la muestra (**Anexo III-3**).

4.4. Incertidumbre para espectrofotómetros de acoplamiento de carga (CCD):

Los CCD actualmente son muy utilizados como detectores para instrumentos ópticos. Sus características tecnológicas desde un punto de vista de las propiedades físicas, pueden encontrarse en la literatura²¹. Poseen grandes ventajas, como un amplio rango dinámico, tamaño reducido, poco consumo energético, adquisición de un espectro completo en milisegundos, etc. que los hacen interesantes para este propósito²². Desde el punto de vista de la capacidad de detección, los CCD son muy conocidos por ser detectores muy sensibles en condiciones de intensidad de luz baja^{23,24}. Sin embargo no es esta la zona más importante en nuestro estudio, sino la contraria; esto es, la zona en la que la intensidad de luz que llega al detector es alta (poca absorción, zona en la que se encuentran los límites de detección).

En la siguiente figura (Figura 12) se observa cómo el espectro de absorción adquirido por un espectrofotómetro CCD presenta más ruido aparente que el mismo tomado con un espectrofotómetro de diodos, o con uno de tipo fotomultiplicador.

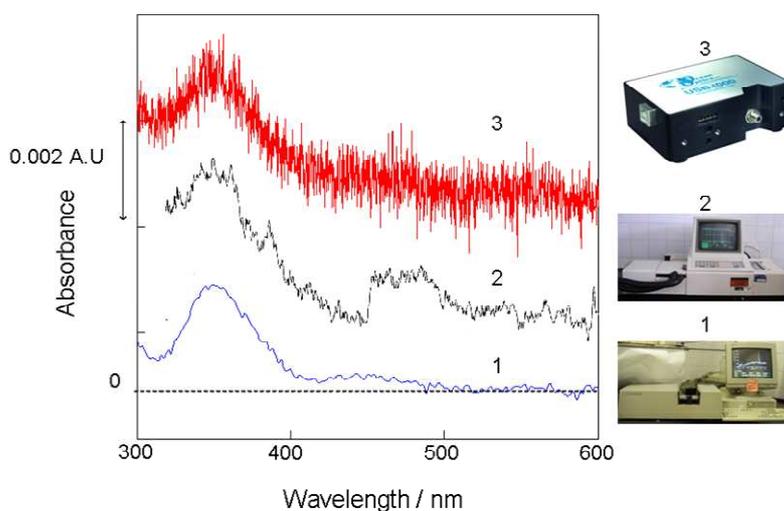


Fig.12: Espectro de una disolución de Dicromato $5.6 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ adquirido con distintos espectrofotómetros: (1), espectrofotómetro de diodos (Hewlett Packard HP8452 A); (2), espectrofotómetro de tipo fotomultiplicador (Shimadzu UV-260); y (3), espectrofotómetro CCD (USB 4000, sin rendija de entrada). Los tiempos de adquisición fueron: Diodos: 10 espectros a 0.1s/espectro= 1 s; CCD: 100 espectros a 0.01s/espectro= 1 s. La velocidad de barrido del fotomultiplicador fue de 3 nm/s aproximadamente. T ambiente.

²¹ G. H. Rieke, *Detection of light: from ultraviolet to the submillimeter*, 2nd Ed; Cambridge University Press, Cambridge 1994, ch 6.

²² Q. S. Hanley, C. W. Earle, F. M., Pennebaker, S. P. Madden, M. B. Denton; *Charge-transfer Devices in Analytical Instrumentation*; Anal. Chem. News and Features, 68 (1996), 21, 661A–667A.

²³ P. M. Epperson, J. V. Sweedler, R. B. Bilhorn, G. R. Sims, and M. B. Denton; *Applications of Charge-transfer Devices in Spectroscopy*; Anal. Chem. 60 (1988), 327A–335A.

²⁴ P. M. Epperson and M.B. Denton; *Binning Spectral Images in a Charge-Coupled Device (CCD)*; Anal. Chem. 61(1989), 1513–1519.

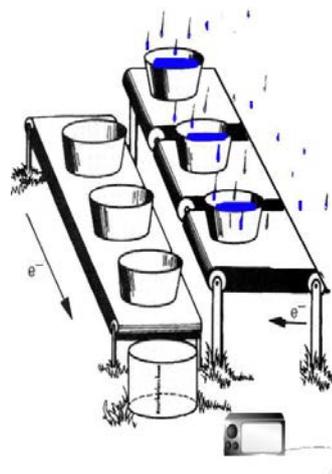
Se pueden encontrar numerosos trabajos relacionados con las características y funcionamiento de los CCD como detectores en instrumentación analítica²⁵, pero muy pocos relativos a la incertidumbre espectrofotométrica²⁶. De hecho, la mayoría de ellos se refieren a los CCD como detectores para luminiscencia, Raman, reflectancia, etc., y hacen frente a la manipulación analítica de la señal para la mejora de la relación señal-ruido²⁴ (promediados, suavizados, *binning*²⁷, etc).

En los CCDs, la transformación de la intensidad lumínica en señal, se produce en tres pasos principalmente. Cada uno de estos pasos está sujeto a la aparición de una o más fuentes distintas de ruido²⁸. Para entender bien estos procesos, pueden explicarse mediante la *analogía de los cubos y la lluvia*²⁹.

4.4.1. Analogía de los cubos y la lluvia. Orígenes del ruido:

a) **Transformación fotónica:**

Los fotones de luz (lluvia) que llegan a cada píxel (cubo) producen un aumento de la carga almacenada debido al efecto fotoeléctrico. Incluso cuando no hay flujo de fotones, existe una excitación de electrones, debida a radioactividad natural y a la energía térmica. Se produce una corriente conocida como *corriente oscura*, que es independiente de la intensidad de luz que llega, solo depende de la T^a . Aun existe otra fuente adicional de incertidumbre debida a pequeñas diferencias en la capacidad de transformación de la luz en carga por cada uno de los píxeles, llamada *no uniformidad*.



²⁵ S. Coles, M. Nimmo and P. J. Worsfold; *Performance characteristics of a low-cost, field-deployable miniature CCD spectrometer*; J. Autom. method manag. 2000, 22 (4) pp. 97–102.

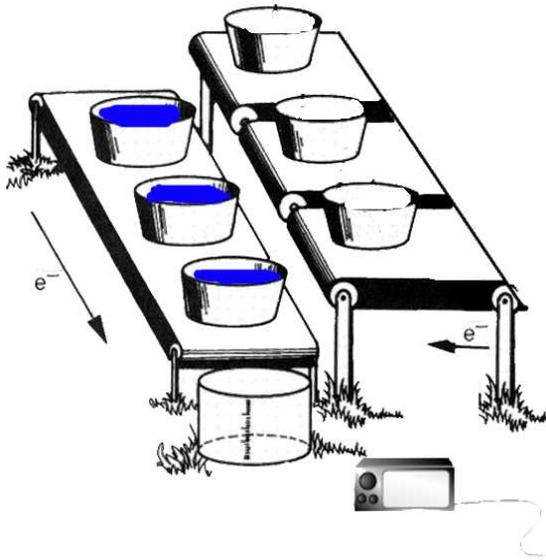
²⁶ E. P. Tsaousoglou, S. D. Bolis, C. E. Efstathiou; *Monte Carlo simulation for the prediction of precision of absorbance measurements with a miniature CCD spectrometer*; J. Autom. method manag. 2003, 25, 35-42.

²⁷ El *Binning* es un proceso que hace que se combinen las cargas de píxeles adyacentes durante el proceso de lectura. Se “agrupan” varios píxeles y se hace que se comporten como uno sólo. Esto tiene dos beneficios principalmente: mejora de la relación señal-ruido y velocidad de lectura (debido a que se reduce el número de puntos de lectura). También tiene desventajas, como la pérdida de resolución, por lo que lo habitual será evitarlo siempre que sea posible.

²⁸ T. J. Fellers, M. W Davidson; *Hamamatsu Articles, Concepts in Digital Imaging Technology, CCD Noise Sources and Signal-to-Noise Ratio*; <http://learn.hamamatsu.com/articles/ccdsnr.html> (vista en 2010).

²⁹ *CCD simulator*: <http://astro.unl.edu/classaction/animations/telescopes/buckets.html>; (vista en 2010).

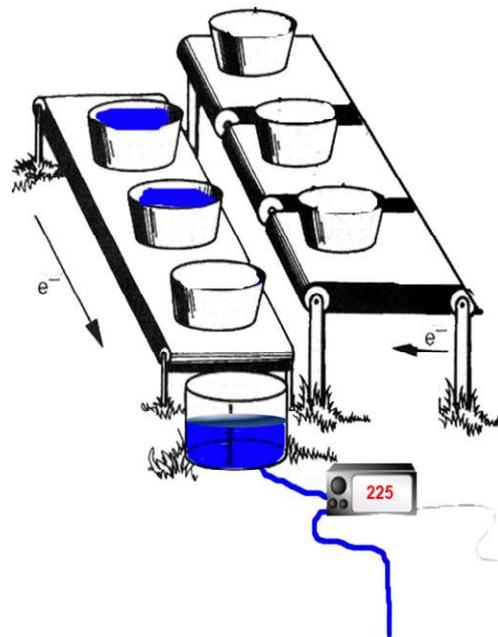
b) Lectura de carga:



En el segundo paso, la carga recogida en cada píxel se pasa (para su medición) del dominio de carga al dominio de voltaje. Los píxeles se reajustan de acuerdo a un nivel de voltaje de referencia, para poder volver a recoger un nuevo flujo fotónico. En este proceso se genera ruido (*reset noise*) por la incertidumbre en el nivel del voltaje de referencia, que se debe a variaciones térmicas³⁰.

c) Amplificación de salida:

Finalmente, el voltaje generado se amplifica para convertirlo en la señal analítica, normalmente digitalizada. Aquí se produce el llamado *ruido de lectura (read noise)*, el cual posee dos componentes primarios, a saber, el *ruido blanco* (white noise) y el *ruido de parpadeo o rosa* (flicker noise). El amplificador de salida tiene una resistencia que genera un ruido térmico (tipo Johnson), no dependiente de la frecuencia. La segunda fuente de ruido relacionada con el amplificador de salida es el ruido de parpadeo o flicker, comúnmente conocido como ruido 1/f debido a su dependencia inversa aproximada en la frecuencia. En el caso de los CCDs, la frecuencia se refiere a la velocidad de lectura.



³⁰ Dalsa Inc; *CCD Technology Primer*; <http://www.dalsa.com> (vista en 2010).

Así pues, para simplificar, pueden distinguirse diferentes grupos de incertidumbre en la medida con un detector CCD.

- Incertidumbre que depende de la señal fotónica que llega hasta el detector y es conocida como *shot noise*. Es consecuencia de la variabilidad en el número de fotones que llega a un determinado elemento del detector por unidad de tiempo. No depende de la temperatura, y es un tipo de incertidumbre común a todos los tipos de espectrofotómetros. La mayor parte de fotones que llegan al detector provienen de la muestra, aunque también alguno pueda provenir de otros orígenes (luz difusa), o bien carga proveniente de la señal oscura.

- Incertidumbre causada por el propio funcionamiento del detector. Es independiente de la señal fotónica, pero sin embargo depende de la temperatura. Aquí se engloban el *dark noise*, *reset noise* y el *read noise*.

- Otras fuentes de incertidumbre son las creadas por pequeñas variaciones aleatorias en la eficiencia cuántica de cada píxel. Este fenómeno es conocido como *non uniformidad*; esta incertidumbre se puede compensar por sustracción de un espectro de referencia adquirido bajo condiciones de temperatura idénticas, pero el resultado de la sustracción siempre es una incertidumbre residual adicional³¹.

La expresión aditiva de la incertidumbre es la varianza y de acuerdo con la **ecuación 15**, la varianza experimental (s_{exp}^2) será la suma cuadrática de todos los factores que contribuyan. En este caso:

$$s_{exp}^2 = s_{shot-noise}^2 + s_{dark-noise}^2 + s_{reset-noise}^2 + s_{read-noise}^2 + s_{non-uniformity}^2 \quad (25)$$

Otra clasificación útil distingue los orígenes del ruido sobre la base de si es *temporal* o *espacial*²⁸. El ruido temporal, por definición, varía según el tiempo y se puede reducir promediando varias adquisiciones (**Figura 13.a**), mientras que el ruido espacial no. La categoría de ruido temporal incluye el ruido fotónico, el ruido oscuro, el ruido de lectura y el ruido de reset.

³¹ Richard L. McCreery; *Raman Spectroscopy for Chemical Analysis*; Wiley & Sons, New York (2000), p.58.

4.4.2. Ruido espacial vs. ruido temporal:

La sensibilidad relativa de cada uno de los píxeles que forman el CCD no es constante, y esto se observa cuando el detector es sometido a una iluminación uniforme. La imagen resultante presenta un ruido espacial debido a que los píxeles adyacentes no reaccionan de la misma manera ante idénticos flujos incidentes. Las variaciones locales se deben a problemas en la fabricación del CCD. El ruido espacial está sujeto a la eliminación parcial, mediante algoritmos de sustracción (Figura 13.b), no eliminando la componente temporal.

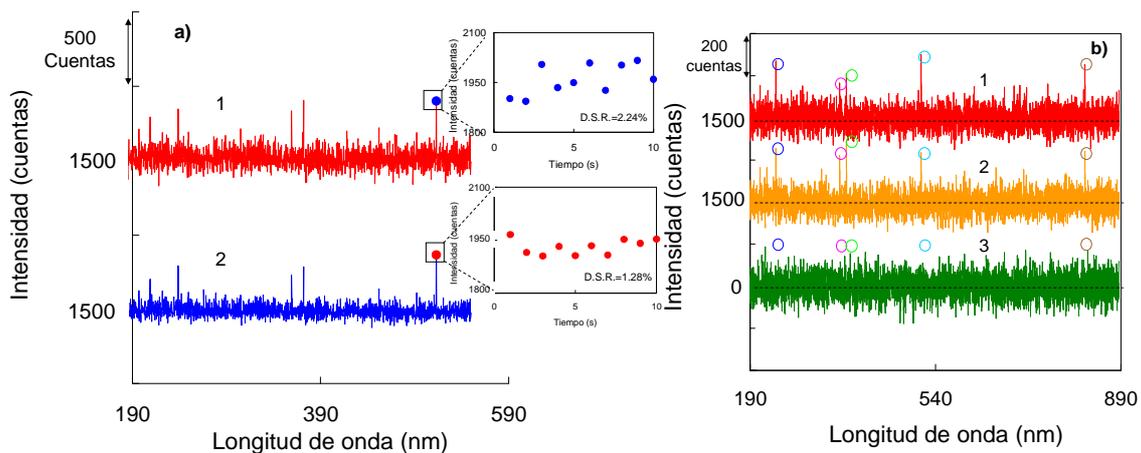


Fig.13: Espectros correspondientes a la corriente oscura de un detector de acoplamiento de carga (CCD) adquiridos con un tiempo de integración de 100 ms a temperatura ambiente.

a) Disminución de la componente temporal del ruido mediante promediado de espectros; 1) Sin promediar diversas adquisiciones; 2) promediando 10 adquisiciones. En los recuadros se observa la variación del valor de la intensidad de luz de un determinado píxel a lo largo del tiempo, y su desviación estándar relativa.

b) Eliminación de la componente espacial del ruido mediante sustracción de espectros. El espectro 3, es la resta de los espectros 1 y 2.

La señal de fondo (I_{Fondo}) está siempre presente al tomar cualquier medida experimental, contribuyendo con un valor constante a la intensidad total que se registra en el detector (I_{Total}). Si se quiere considerar únicamente la contribución analítica de la señal, a la I_{Total} se le resta la I_{Fondo} obteniendo así la I_{Exp} .

$$I_{Exp.} = I_{Total} - I_{Fondo} \quad (26)$$

De este modo la señal experimental no se ve afectada, por el valor constante de estas componentes, pero como el proceso de medida requiere de dos adquisiciones (la I_{Total} y la I_{Fondo}) la incertidumbre se verá incrementada de acuerdo a:

$$s_{I_{exp}}^2 = s_{I_{Total}}^2 + s_{I_{Fondo}}^2 \quad (27)$$

El resultado de la **ecuación 26** se puede observar en la **Figura 13.b** donde el valor de la señal experimental es prácticamente cero, y la *no uniformidad* se ve en cierta medida compensada, es decir se ha eliminado en cierta manera el *ruido espacial*.

La medida de la absorbancia tiene sus propias particularidades y sin embargo no se ha prestado gran atención a su medida mediante los detectores CCDs. El valor de la absorbancia se calcula tras la adquisición de tres lecturas de intensidad: la de la corriente oscura (I_{Fondo}), la de referencia (I_{Blanco}) y la lectura con la muestra de interés ($I_{Muestra}$), y la aplicación posterior del logaritmo (**Ecuación 28**);

$$Abs = -\log \frac{I_{Muestra} - I_{Fondo}}{I_{Blanco} - I_{Fondo}} \quad (28)$$

Por tanto la parte del ruido espacial está eliminada. Sin embargo, si se toman sucesivas lecturas para un elemento concreto (píxel) se observa que ese valor fluctúa (**Figura 14**), por efecto de la incertidumbre temporal.

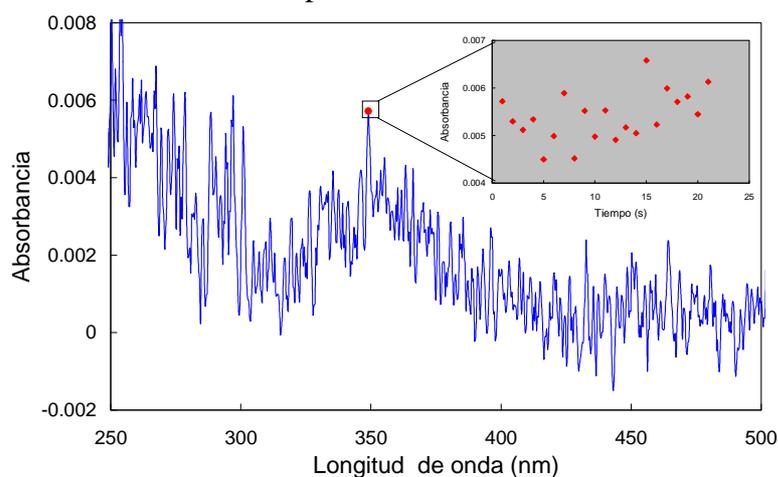


Fig.14: Ruido espectrofotométrico temporal. Espectro de dicromato $3 \times 10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$ en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. Espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) USB2000; tiempo de integración 150 ms. El espectro se adquirió como tal y no corresponde a ningún promediado. En rojo, se puede ver el valor de la absorbancia para el mismo píxel a lo largo del tiempo mostrando la incertidumbre temporal.

Tal y como ya se mencionó, la incertidumbre en el valor de la Absorbancia ($s_{Abs.}$) viene dada por:

$$s_{Abs} = 0.434 \frac{s_T}{10^{-Abs}}$$

Que se deriva directamente de la **ecuación (1)**.

De este modo se pueden aplicar las mismas ecuaciones que ya se habían empleado hasta ahora (**ecuaciones 1-15**). Como ejemplo se desarrollarán los resultados obtenidos para un espectrofotómetro con detector CCD, el USB2000 de Ocean Optics.

4.4.3. Incertidumbre para el espectrofotómetro USB 2000:

Se siguió el mismo procedimiento descrito en los apartados anteriores para el cálculo de la incertidumbre a distintos valores de absorbancia y posterior cálculo de las constantes. Se fijó un tiempo de integración tal que cuando se mide una disolución de blanco, la intensidad de la fuente que llega al detector, sea máxima, y se realiza un número de promediados de adquisiciones de forma que el producto entre el tiempo de adquisición y el número de promediados sea aproximadamente de 1 segundo.

En la siguiente figura (**Figura 15**), se muestran los valores experimentales de la incertidumbre espectrofotométrica obtenidos, junto con la línea de regresión de los mismos (**ecuación 15**). Se realizaron a su vez diversas adquisiciones sacando la celda de medida del portacubetas, con el fin de valorar el efecto de la colocación de la misma en este diseño (CUV-UV de Ocean Optics; **Figura 1.f**). A partir de la curva de regresión se pueden estimar los valores de las constantes (k_1 , k_2 y k_3).

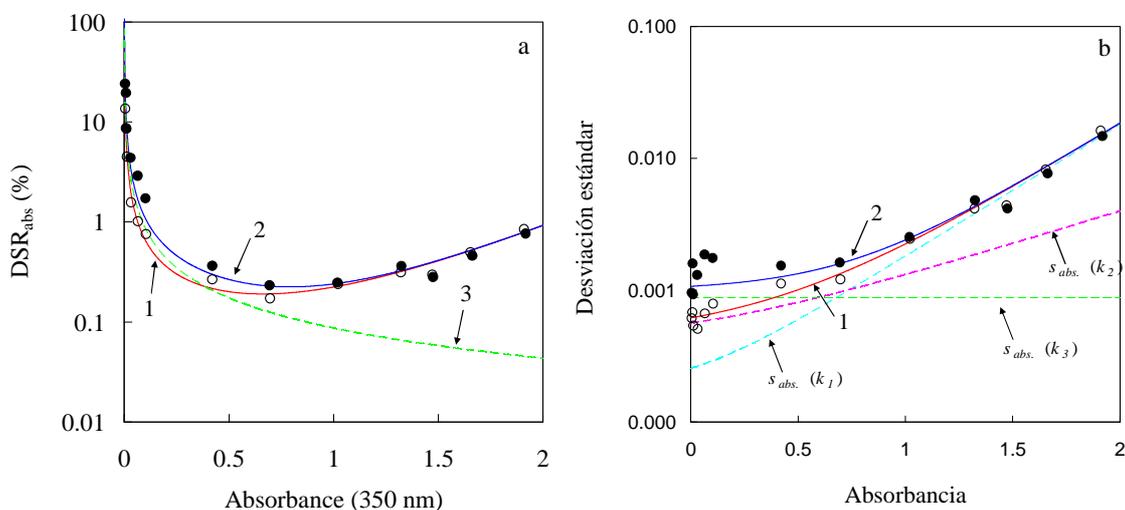


Fig.15: a) Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un detector de acoplamiento de carga (CCD) USB2000, tanto para cuando la cubeta permanece en el portacélulas (○), como cuando se saca en cada adquisición (●). Como absorbente se ha utilizado dicromato potásico ($\lambda_{Max.}=350$ nm) en ácido sulfúrico 5×10^{-3} M. 1) Línea de regresión de los puntos huecos. 2) Línea de regresión de los puntos llenos. 3) Línea teórica que representa el error debido a la colocación de la cubeta, y que se deduce de las líneas 1 y 2. b) Con el valor obtenido para las constantes (k_1 , k_2 y k_3) se pueden trazar las curvas correspondientes a la variación de la desviación estándar absoluta. Las líneas discontinuas muestran la contribución individual de cada uno de los efectos: $s_{abs.}(k_1)$, efecto derivado de la **ecuación (5)**; $s_{abs.}(k_2)$, efecto derivado de la **ecuación (7)**; $s_{abs.}(k_3)$, efecto derivado de la **ecuación (8)**.

Tal y como se observa en la **Figura 15.b**, cuando los valores de absorbancia son bajos, el término de incertidumbre que mayor relevancia tiene es el correspondiente a k_2 (**ecuación (7)**). De este modo, y encontrándose el portacubetas en perfectas condiciones, la curva de regresión (**curva 1**) de los puntos experimentales coincide prácticamente con la curva teórica asociada a este efecto. En el caso de un portacubetas deteriorado, la curva de regresión (**curva 2**), es el resultado de la combinación de efectos (**ecuaciones (7) y (8)**) según la **ecuación (15)**. Conforme aumentan los valores de la absorbancia cobra mayor relevancia el efecto producido por la **ecuación (5)**, y así a partir de valores de absorbancia por encima de 1, las curvas de regresión casi coinciden con la curva teórica asociada a este efecto, no teniendo apenas relevancia el resto. Para valores altos de absorbancia, el efecto del estado del portacubetas no tiene relevancia alguna como ya se comentaba en la bibliografía¹. Al aplicar la regresión no lineal por mínimos cuadrados se encuentran buenos ajustes de los puntos experimentales a las ecuaciones teóricas cuando se aplica el efecto combinado de las **ecuaciones (5) y (7)** según la **ecuación (15)**. Se obtienen los siguientes valores de k_1 y k_2 :

$$k_1 = 4.2 \times 10^{-4}; s = 1.5 \times 10^{-4}$$

$$k_2 = 9.1 \times 10^{-4}; s = 0.7 \times 10^{-4}$$

La **ecuación (5)** es necesaria para explicar la incertidumbre producida a absorbancias superiores a 1.0, y no tiene prácticamente relevancia alguna con valores de absorbancias inferiores a 0.5. En la **Figura 15** se puede observar además el efecto del posicionamiento de la cubeta. En este caso el portacubetas tiene un diseño muy simple (**Figura 1.f**), por el que la cubeta se ajusta únicamente con dos tornillos protegidos con cabezas de teflón. Este portacubetas se desajusta rápidamente por lo que la incertidumbre que ello provoca aumenta considerablemente. Sin embargo, un nuevo ajuste de los tornillos de sujeción, lleva a la reducción del citado efecto. Nuevamente el efecto del posicionamiento de la cubeta no es relevante siempre que el portacubetas se mantenga en unas buenas condiciones. Estos resultados se ven reflejados en el valor de la constante k_3 , (**ecuación 8**) obtenido cuando se fijan los valores de las constantes k_1 y k_2 y se aplica la **ecuación (15)**.

$$k_3 = 20.1 \times 10^{-4}; s = 0.2 \times 10^{-4}$$

Se siguieron los mismos procedimientos para diferentes espectrofotómetros de acoplamiento de carga (CCD) con distintas configuraciones, y los resultados se resumen en la siguiente tabla (**tabla 3**). En los **Anexos III-4 y 5** se pueden ver las curvas experimentales obtenidas para el resto de espectrofotómetros.

Tabla 3: Valores experimentales obtenidos a temperatura ambiente de las constantes que caracterizan los distintos detectores CCDs para la configuración dada. En todos los casos se utilizó dicromato potásico en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$ como absorbente.

Detector	Rendija ^a	$t_{\text{integración}}$ (ms)	promediados	Rango Lineal (u.a.)	$10^4 k^b$	
					k_1	k_2
USB 2000	Si	125	8	0 - 1.8	4 (2)	9 (1)
USB 4000	Si	100	10	0 - 1.8	5 (8)	8 (4)
QE 65000 ^c	No	35	30	0 - 1.0	-	2.9 (0.3)

^a En todos los casos se utilizó una fibra de 600 μm entre la fuente y el portacubetas, y una de 400 μm entre el portacubetas y el detector. En los casos en los que el espectrofotómetro consta de rendija de entrada, ésta fue de 25 μm .

^b Los valores de las constantes siempre se obtuvieron mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados, la desviación estándar se da entre paréntesis.

^c El espectrofotómetro consta de un aparato Peltier incorporado que permite la termostatación, pero en este caso, se mantiene apagado y por tanto a temperatura ambiente.

El valor de k_2 es en todos los casos mayor que el de k_1 , lo que indica la predominancia del ruido de disparo ($s_{\text{shot-noise}}^2$) a absorbancias bajas, mientras que para valores altos, es el término k_1 el que cobra más relevancia en la incertidumbre combinada (excepto para el caso del QE65000). Como se puede observar, no en todos los casos se han utilizado los mismos parámetros de adquisición (tiempo de integración y promediados) ya que la intensidad de luz que satura el detector (well capacity), para cada caso es diferente, y los parámetros se fijaron según se describió anteriormente en procedimientos.

4.5. Algunas consideraciones importantes acerca de los espectrofotómetros de acoplamiento de carga (CCD):

Se deben hacer otras consideraciones acerca de los espectrofotómetros de acoplamiento de carga. Por ejemplo la incorporación de sistemas de refrigeración a los nuevos modelos que podría de ese modo, reducir la incertidumbre, especialmente a valores de absorbancias altas³² (efecto k_I). Otro de los parámetros que influyen considerablemente en la incertidumbre espectrofotométrica, así como en la resolución espectral, es la presencia o ausencia de la rendija de entrada, por lo que se dedicará un breve apartado a la influencia que provoca. Otros parámetros instrumentales, tales como el tiempo de integración o el número de promediados realizados, también tienen influencia sobre la incertidumbre experimental, y se les da su correspondiente importancia dentro del programa de adquisición de datos para la mejora de la señal adquirida²⁶. La longitud, diámetro y material de las fibras ópticas también afectan a la incertidumbre espectrofotométrica, pero estos efectos quedan fuera del alcance del presente estudio.

4.5.1. *Efecto de la refrigeración:*

a) **No uniformidad.**

En la **ecuación 25**, únicamente el término $s_{shot-noise}^2$ depende del flujo fotónico que llega al detector. Cuando esta intensidad es alta, el ruido dependiente de la temperatura es proporcionalmente mucho menor y por lo tanto irrelevante. Si la intensidad de luz que llega al detector es baja, el ruido dependiente de la temperatura es entonces significativo. En técnicas de emisión como Raman, fluorescencia, dispersión etc., a mayor concentración de analito, mayor es la intensidad de luz que alcanza el detector, sin embargo, para concentraciones de analito bajas, mayor es la relevancia que cobra el ruido térmico y por lo tanto figuras como el límite de detección, dependerán de la temperatura del CCD. Esta es la razón por la que la instrumentación que incorpora sensores CCD (cámaras, telescopios, detectores, etc.) está frecuentemente dotada de sistemas de refrigeración³³. En la siguiente figura (**Figura 16.a**) se muestran espectros

³² G. Currell; *Analytical Instrumentation. Performance, Characteristics and Quality*, Wiley, Chichester, 2000, p. 268.

³³ J. H. Giles, T. D. Ridder, R. H. Williams, D. A. Jones, M. B. Denton; *Selecting a CCD Camera*; *Anal. Chem. News and Features*, 1998, 70, 663A-668A.

obtenidos en ausencia de cualquier flujo fotónico (corriente oscura) adquiridos a diferentes temperaturas. Como se puede apreciar, la señal del fondo (valor medio) y su incertidumbre (espacial y temporal) aumentan con la temperatura. La señal de fondo, y la contribución espacial pueden ser eliminadas por sustracción, pero también se puede observar que al realizar la resta, la incertidumbre aumenta (Figura 16.b). Este aumento no puede evitarse, y siempre afecta a las señales que son resultado de la sustracción del fondo (ecuación 26) tales como las de fluorescencia.

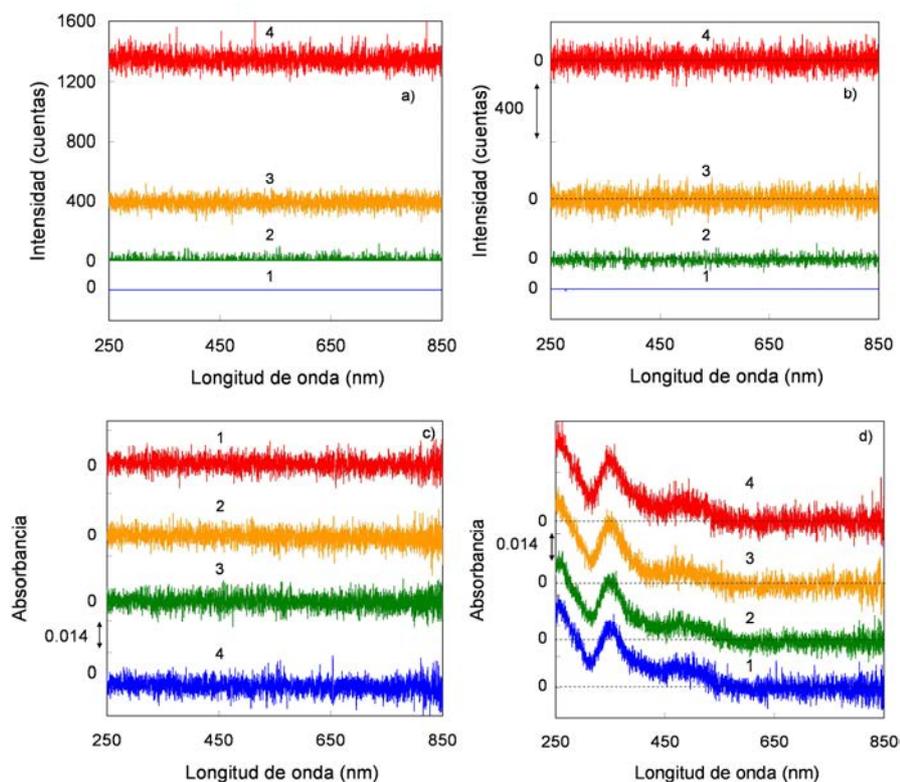


Fig.16: Efecto de la temperatura en la adquisición de señal con un detector CCD USB 4000 (rendija de entrada de 50 μm). El tiempo de integración fue de 80 ms en todos los casos y se adquirió un espectro solamente (no promediados). El espectrofotómetro se introdujo en un congelador, frigorífico o se dejó en el exterior para alcanzar las siguientes temperaturas de trabajo: 1) $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; 2) $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$; 3) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 4) ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$). a) Señal adquirida sin entrada de luz (Corriente oscura); b) Señal adquirida sin entrada de luz, sustrayendo la corriente oscura; c) Espectros de referencia (blancos) para absorbancia; b) Espectros de dicromato $8 \times 10^{-6}\text{ M}$ en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3}\text{ M}$.

En absorbancia, la dependencia de la incertidumbre con la temperatura únicamente se hace relevante cuando las intensidades de la muestra o bien del blanco son suficientemente bajas. Esto ocurre cuando los valores de absorbancia son altos, pero no a valores de absorbancia bajos. En la Figura. 16.c se ve cómo, tanto la señal en ausencia de analito (blanco) como la de una concentración pequeña de analito (Figura 16.d) no se ve afectada por la temperatura. El valor adquirido estará sujeto a una incertidumbre que reside únicamente en la componente temporal del ruido (Figura 14).

b) Ley de Beer: QE 65000.

Para el estudio del efecto que la refrigeración produce en el detector de acoplamiento de carga, tanto en las medidas de absorción como de emisión, se usó un espectrofotómetro QE65000 de la casa Ocean Optics, el cual incorpora un sistema de refrigeración (hasta $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) controlable por software. Se debe destacar que el espectrofotómetro en cuestión, no cuenta con rendija de entrada, por lo que el elemento que regula en este caso la cantidad de luz que llega al propio detector será el diámetro de la fibra óptica utilizada. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente (medidas realizadas manualmente), configurando el espectrofotómetro de dos maneras diferentes, una a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aprox.), y la otra refrigerando a $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

En ambos casos se da una desviación de la ley de Beer a partir de valores de absorbancia por encima de 1 (Figura 17), por lo que no se pueden sacar conclusiones definitivas acerca del efecto que produce la refrigeración del detector de acoplamiento de carga sobre la incertidumbre espectrofotométrica a absorbancias superiores a 1. Por lo tanto, el estudio se limitará al cálculo de la constante k_2 para este modelo de espectrofotómetro y se comprobará cómo el efecto de la refrigeración no tiene influencia en el valor de esta constante, que tiene que ver con el ruido de disparo, y no con el térmico (k_1).

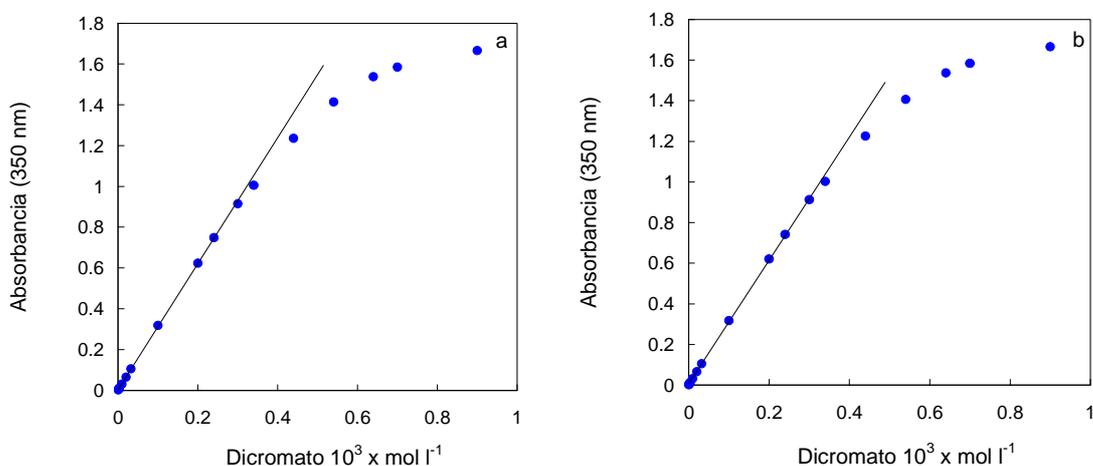


Fig.17: Representación de la absorbancia a 350 nm de distintas disoluciones de Dicromato frente a la concentración de Dicromato. Medidas realizadas con un espectrofotómetro de carga acoplada QE65000 sin rendija de entrada. El diámetro de la fibra óptica es de $400\text{ }\mu\text{m}$. Tiempo de integración 35 ms, número de promediados 30. a) T^{a} ambiente; b) $T^{\text{a}} = -5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Se utilizó únicamente como especie absorbente dicromato disuelto en sulfúrico 5×10^{-3} M. El procedimiento seguido es el mismo que en las experiencias anteriores, y las condiciones experimentales las descritas en la figura 17. Los valores de las constantes obtenidas a las dos temperaturas probadas son los siguientes:

$$T_{\text{ambiente}}: k_2 = 2.9 \times 10^{-4}; s = 0.3 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.83)$$

$$T_{-5^{\circ}\text{C}}: k_2 = 3.2 \times 10^{-4}; s = 0.2 \times 10^{-4}; (r^2 = 0.97)$$

Ambos valores de las constantes hacen que las curvas obtenidas por regresión no lineal se ajusten bastante bien a los puntos experimentales de ambas experiencias, demostrando además que no difieren apreciablemente.

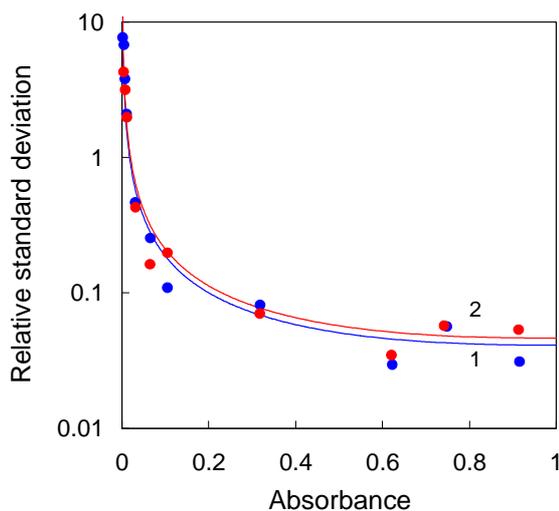


Fig.18: Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) QE65000. 1, Línea de regresión de los puntos experimentales adquiridos a T^a ambiente. 2, Línea de regresión de los puntos experimentales obtenidos a $T^a = -5^{\circ}\text{C}$.

c) USB 4000. Al congelador:

Dado que el espectrofotómetro utilizado no cubre el rango completo de absorbancias utilizadas habitualmente, debido a una rápida desviación de la ley de Beer, se diseñó otro experimento para comprobar el efecto que la refrigeración produce en la incertidumbre espectrofotométrica en lo que afecta al ruido térmico (k_1).



Se utilizó un espectrofotómetro de acoplamiento de carga USB4000, provisto de rendija de entrada. Ello permitió que el intervalo de aplicación de la ley de Beer alcanzara hasta una absorbancia de 2 aproximadamente. Para alcanzar las bajas temperaturas deseadas se introdujo el espectrofotómetro en una nevera ($T = 4\text{ °C}$) o bien en un congelador ($T = -20\text{ °C}$). Para evitar, en la medida de lo posible, efectos de condensación se introdujo el espectrofotómetro (1) en una bolsa con cierre (2) y se puso una bolsita con agente desecante en su interior (3). Para el control de la temperatura se contó con una sonda (4), tal y como puede observarse en la anterior imagen. El objetivo es comparar los resultados obtenidos a temperatura ambiente (Anexo III-4) con los obtenidos en las dos situaciones de bajas temperaturas (Figura 19).

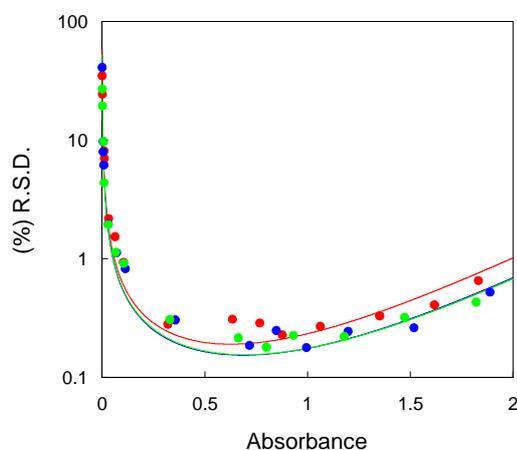


Fig.19: Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) USB4000. Curvas de regresión no lineal y puntos experimentales obtenidos. En rojo a T_{ambiente} ; En azul a $T_{\text{nevera}} (+4\text{ °C})$; En verde a $T_{\text{congelador}} (-20\text{ °C})$. El absorbente utilizado fue dicromato en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3}\text{ M}$.

Los valores que se obtienen para las constantes a las diferentes temperaturas se resumen en la siguiente tabla (tabla 4).

Tabla 4: Valores experimentales obtenidos a distintas temperaturas, de las constantes que caracterizan al siguiente detector CCD para la configuración dada. En todos los casos se utilizó dicromato potásico en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3}\text{ mol l}^{-1}$ como absorbente. La desviación estándar se da entre paréntesis.

Detector	Rendija ^a	$t_{\text{integración}}$ (ms)	promediados	Temperatura ^b	$10^4 k^c$	
					k_1	k_2
USB 4000	Si	100	10	Ambiente	5 (8)	8 (4)
				Nevera (4 °C)	3 (3)	8 (1)
				Congelador (-20 °C)	3 (7)	8 (3)

^a Se utilizó una fibra de 600 μm entre la fuente y el portacubetas, y una de 400 μm entre el portacubetas y el detector. La rendija de entrada era de 25 μm .

^b El espectrofotómetro se introdujo en la nevera o el congelador cuando fue preciso.

^c Los valores de las constantes siempre se obtuvieron mediante regresión no lineal por mínimos cuadrados.

A simple vista sólo se pueden apreciar pequeñas diferencias cuando se pasa de temperatura ambiente a temperatura más baja, pero sólo en el valor de la constante k_1 . El valor de k_2 se mantiene constante con la temperatura tal como cabía esperar, dado que depende exclusivamente del sistema de detección. El ruido llamado térmico afecta, de forma apreciable, exclusivamente a las zonas donde la absorbancia es más alta, es decir cuando la intensidad de la luz que alcanza al detector es baja y por tanto la corriente oscura cobra mayor relevancia relativa. Se ha podido observar cómo al disminuir la temperatura, la intensidad de la corriente oscura también disminuye (Figura 16.a). De hecho, si se toma el valor promedio de la intensidad de la corriente oscura a todas sus longitudes de onda y se representa frente a la temperatura a la que ha sido adquirida se obtiene la siguiente representación (Figura 20.a), que es muy similar a otras (Figura 20.b) que se pueden encontrar en la bibliografía²⁸.

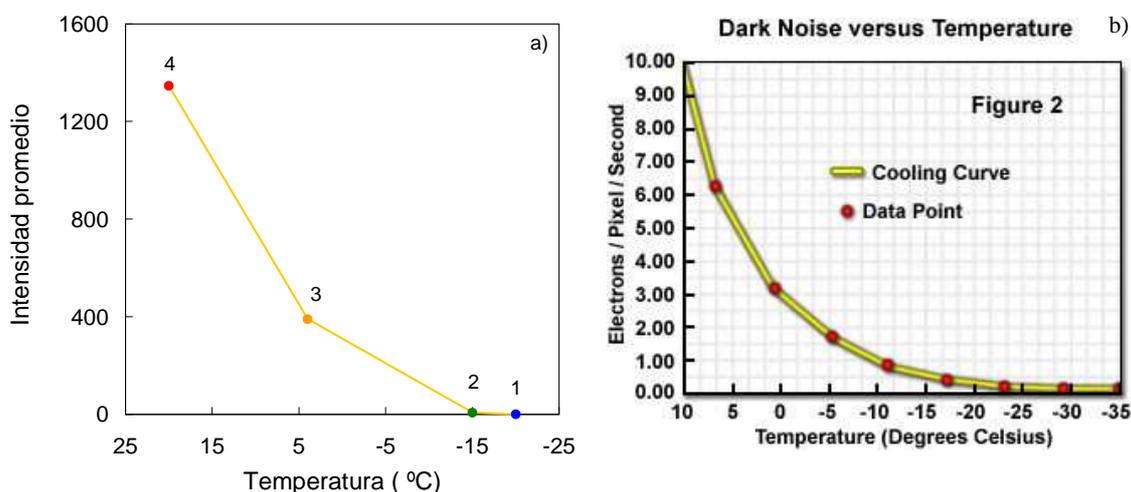


Fig.20: a) Valor promedio obtenido a partir de la intensidad de la corriente oscura (Fig. 16.a) a todas las longitudes de onda. Detector CCD USB 4000 (rendija de entrada de 50 μm , y sin termostatación incorporada). El tiempo de integración fue de 80 ms para todos los casos y únicamente se adquirió un espectro (no promediados). Se introdujo el espectrofotómetro en un congelador, frigorífico o se dejó en el exterior para alcanzar las siguientes temperaturas de trabajo 1) -20 °C; 2) -10 °C; 3) 4 °C y 4) ambiente (20 °C). b) Gráfica extraída del trabajo de Fellers y colaboradores²⁸.

Es decir que de las Figuras 16.c y d, 18 y 19 parece deducirse que la temperatura no influye apreciablemente en las medidas de absorción; sin embargo sí que lo hace, y de forma considerable, en las medidas de emisión (ver Figuras 16.a y b, y 20).

4.5.2. Consideraciones acerca espectrofotómetros sin rendija de entrada:

Algunos espectrofotómetros CCD pueden adquirirse sin rendija de entrada. En estos casos el diámetro de la fibra óptica utilizada es el limitante de la cantidad de luz que puede llegar al detector. Además de distintos tamaños de fibra óptica disponibles, existen otros tipos de artilugios como filtros o atenuadores, que permiten en cierto modo controlar la cantidad de luz que incide en el detector, y por tanto, la incertidumbre debida al término $s_{shot-noise}^2$ en la **ecuación (25)**. Al aumentar el tamaño de la rendija de entrada, o incluso suprimirla, se aumenta la cantidad de fotones que inciden en el detector, pero a su vez aumenta la cantidad de luz parásita³⁴ con lo que el rango lineal en el que se cumple la ley de Beer se reduce, como se aprecia en la siguiente figura (**Figura 21.a**). También la resolución se hace peor (**Figura 21.b**), pero a cambio se consigue una mayor relación Señal/Ruido y por tanto una menor incertidumbre⁵.

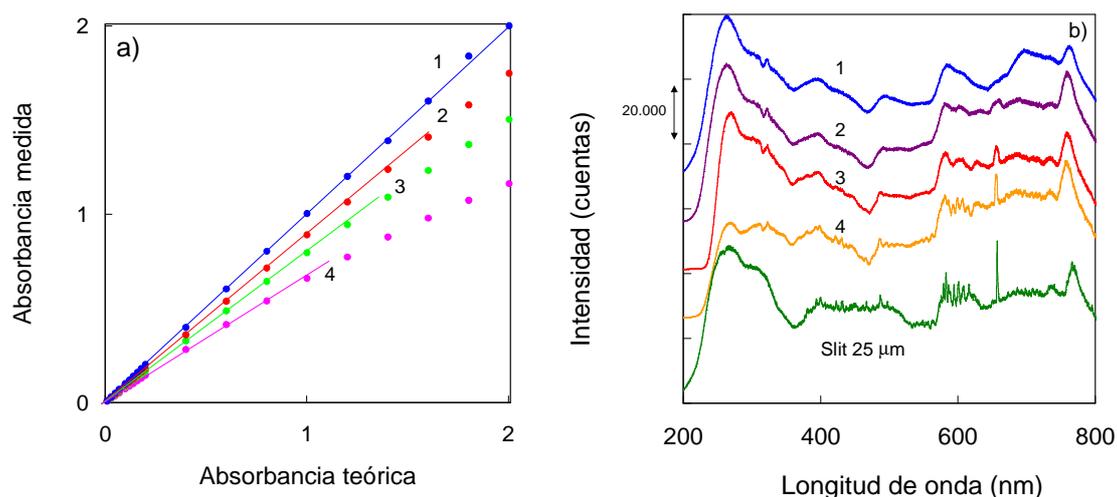


Fig.21: a) Representación de la ley de Beer para los datos simulados descritos en “procedimientos”. Se trata de datos obtenidos bajo una configuración en la que hacemos nula la intensidad de luz parásita, con presencia de ruido dependiente e independiente de la señal fotónica, y bajo diferentes diámetros de rendija de entrada. 1) Rendija de entrada de 5 nm; 2) 50 nm; 3) 70 nm; 4) 100 nm. b) Espectro de emisión de la fuente DT-MINI-2-GS, registrado con un espectrofotómetro USB4000 con una rendija de entrada de 25μm, y con el mismo espectrofotómetro sin rendija cambiando los diámetros de fibra óptica a la entrada: 1) 600 μm; 2) 400 μm; 3) 200 μm; 4) 100 μm.

Por otra parte, tiene especial interés comprobar experimentalmente la repercusión que tiene la cantidad de luz que incide en el detector, en la incertidumbre. Para ello se utilizó un atenuador de luz de apertura variable (FVA-UV de Ocean Optics)

³⁴ H. A. Strobel, W. R. Heineman; *Chemical Instrumentation: A Systematic Approach*, 3th ed.; Wiley Interscience; New York, 1989, p. 329.

(Figura 22.a) que se coloca entre la cubeta y el detector QE65000. En este caso el detector no tenía rendija de entrada y se trabajó a temperatura ambiente. Las curvas de incertidumbre pueden observarse en la siguiente figura (Figura 22.a).

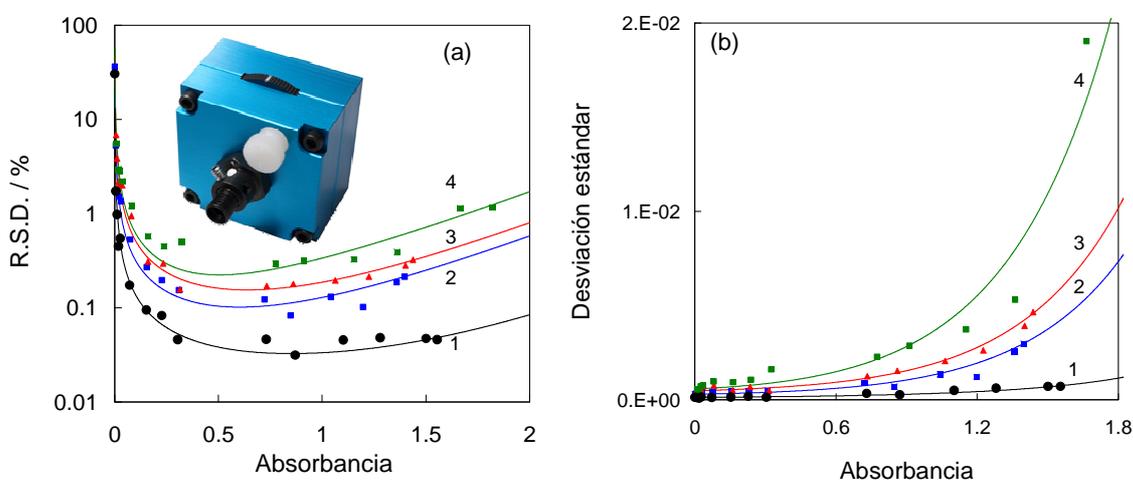


Fig.22: a) Atenuador FVA-UV de Ocean Optics y desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) QE65000 a temperatura ambiente. El absorbente utilizado fue el dicromato potásico en ácido sulfúrico 5×10^{-3} M. 1) Sin atenuador; 2) Atenuador con apertura máxima; 3) Atenuador con apertura intermedia; 4) Atenuador con apertura mínima. b) Puntos experimentales de desviación estándar absolutas, junto con las curvas de desviación estándar trazadas utilizando los valores de las constantes obtenidas en a).

La regresión no lineal por mínimos cuadrados obtenida para los puntos experimentales de desviación estándar relativa (**ecuación 15**, suma de **ecuaciones 5 y 7**), está muy influenciada por los puntos de absorbancias más bajas (residuales más altos) y por lo tanto para comprobar su fiabilidad pueden utilizarse los resultados obtenidos para las constantes k_1 y k_2 (**tabla 5**) para simular el comportamiento de la desviación estándar absoluta (**Figura 21.b**). Se comprueba que, en general, la simulación (líneas continuas en **Figura 22.b**) es bastante buena y que por lo tanto los valores encontrados para k_1 y k_2 son fiables.

Tabla 5: Valores obtenidos por regresión no lineal por mínimos cuadrados, a temperatura ambiente, de las constantes que caracterizan un espectrofotómetro QE65000, utilizando el atenuador variable de luz FVA-UV. En todos los casos se utilizó dicromato potásico en ácido sulfúrico 5×10^{-3} mol l⁻¹ como absorbente.

Apertura de atenuador	k_1 (x 10 ⁴)	k_2 (x 10 ⁴)
Sin Atenuador ^a	0.3 (1)	2.1 (0.2)
Máxima	3 (2)	4 (1)
Intermedia	4 (2)	7 (1)
Mínima	8 (1)	5 (2)

^a Se trata de un espectrofotómetro distinto al de la **figura 18**

Se puede conseguir un efecto similar al de atenuador, en lo que a la señal fotónica se refiere, utilizando fibras ópticas de diferentes diámetros internos (disponibles comercialmente desde 50 μm hasta de 1000 μm). El efecto que se obtiene es similar; es decir, conforme el diámetro de fibra óptica se estrecha, la incertidumbre es mayor (Figura 23.a), pero mejora la resolución (Figura 21.b).

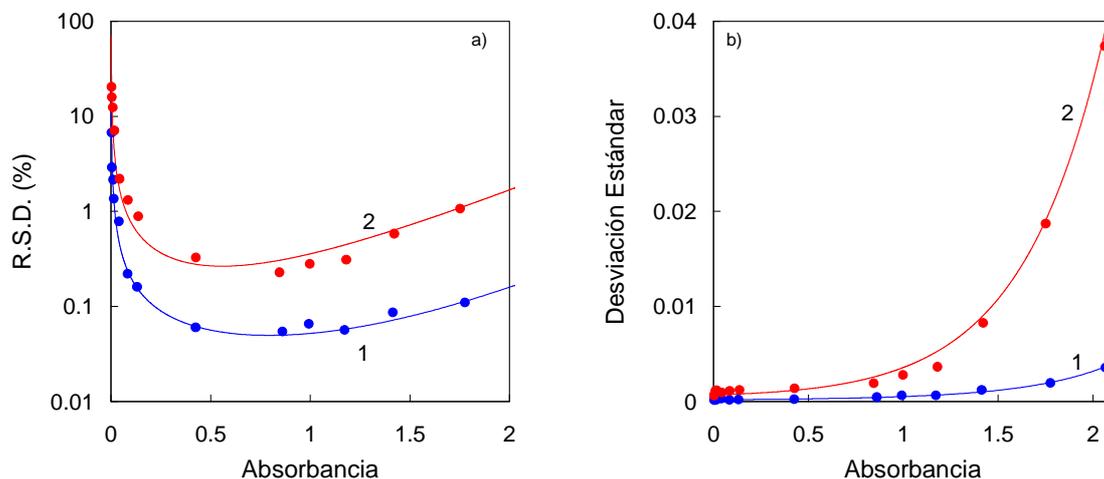


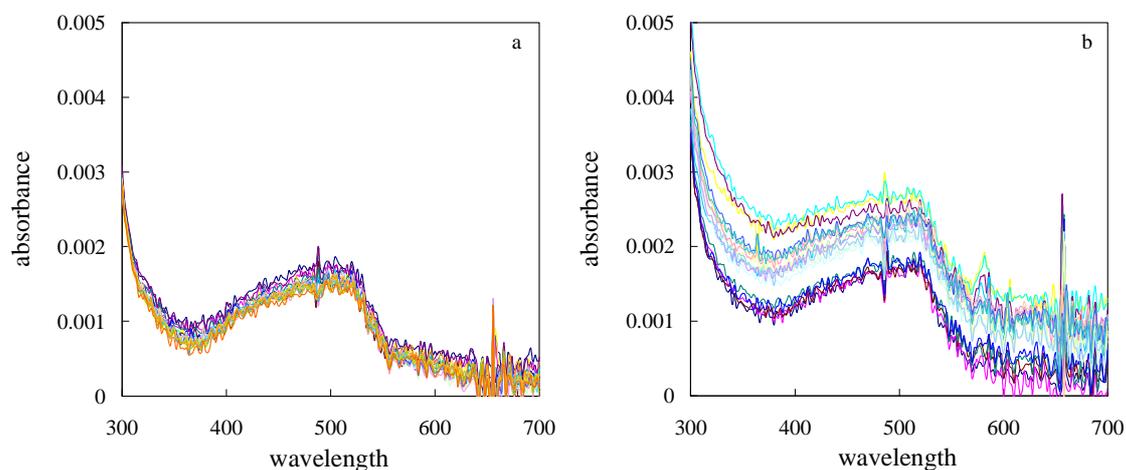
Fig.23: a) Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) USB4000 a temperatura ambiente y sin rendija de entrada para dos diámetros distintos de fibras ópticas. El absorbente utilizado fue el dicromato potásico en ácido sulfúrico 5×10^{-3} M. 1) Diámetro interno de la fibra óptica = 600 μm ; 2) Diámetro interno de la fibra óptica = 100 μm ; b) Puntos experimentales de desviación estándar, junto con las curvas de desviación estándar trazadas utilizando los valores de las constantes obtenidas en a).

5. CONCLUSIONES

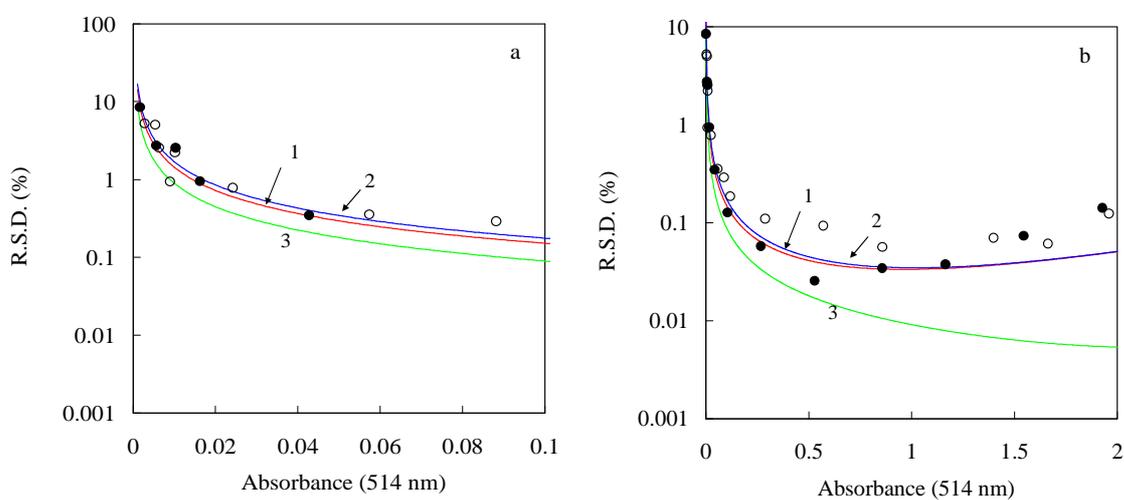
En conclusión, en el presente capítulo:

- Se han dado valores para las constantes que rigen la incertidumbre en diferentes tipos de espectrofotómetros.
- Se ha visto que la colocación de la cubeta en el portacélulas no introduce incertidumbre significativa, siempre que se encuentre en buenas condiciones de uso.
- Se ha mostrado que la refrigeración en espectrofotómetros con CCDs tiene mucha importancia en medidas de emisión y prácticamente ninguna en medidas de absorción.
- Se ha aportado una magnífica evidencia experimental para efectos como: variación de la intensidad de corriente oscura del detector CCD con la T^a , efecto de un atenuador y del diámetro de las fibras ópticas utilizadas en la incertidumbre, ruido de *no-uniformidad*, ruido espacial y temporal, influencia de la presencia o no de rendija en el cumplimiento de la ley de Beer y en la resolución, etc.

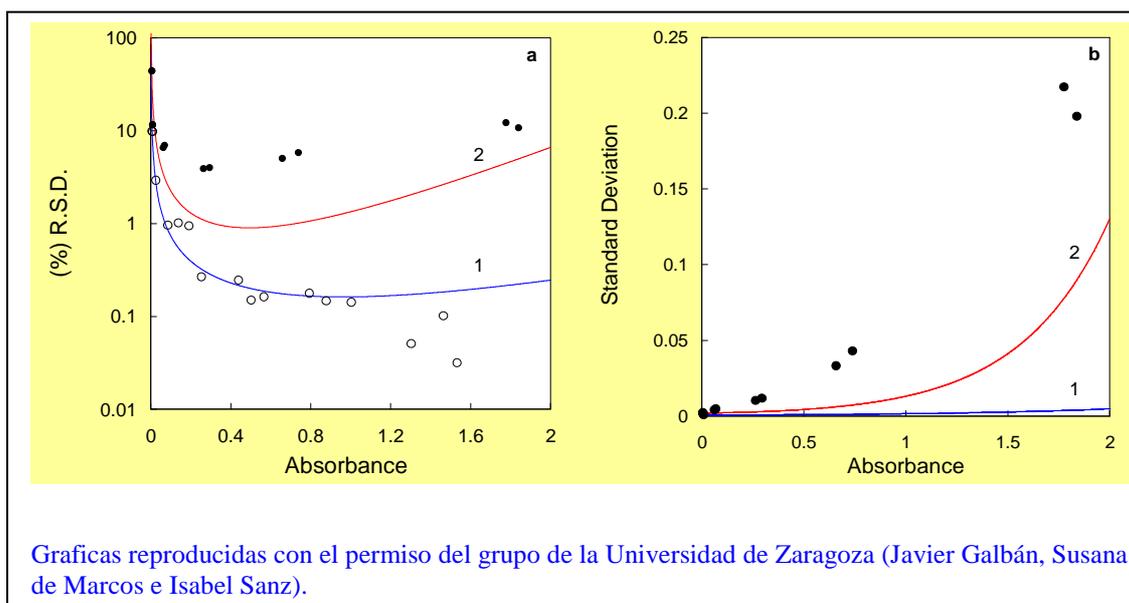
ANEXO III



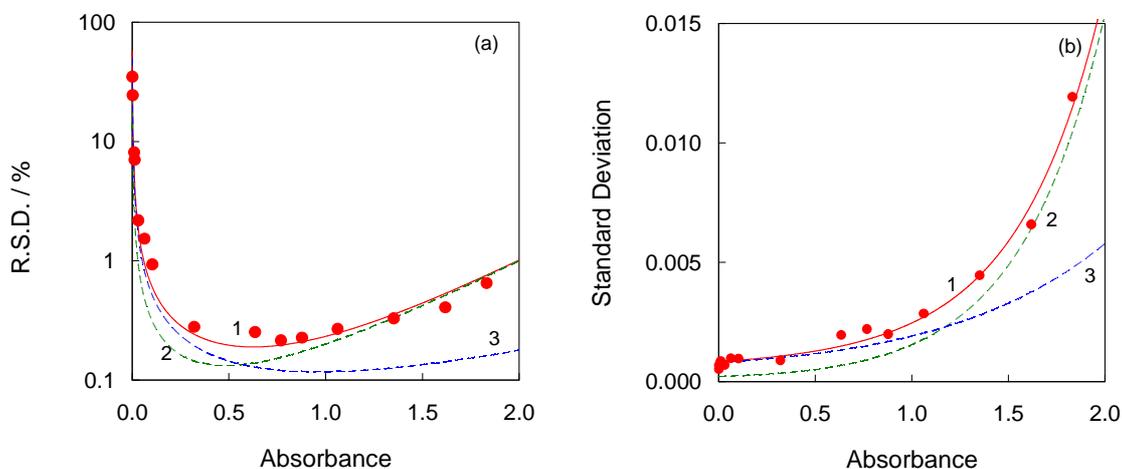
Anexo III-1: Espectros repetidos de una disolución de ferrioxalato 8×10^{-8} M en agua; **a)** sin sacar la cubeta del portacélulas y **b)** sacando la cubeta entre cada adquisición. Espectrofotómetro de diodos HP 8452. Tiempo de integración, 1 s.



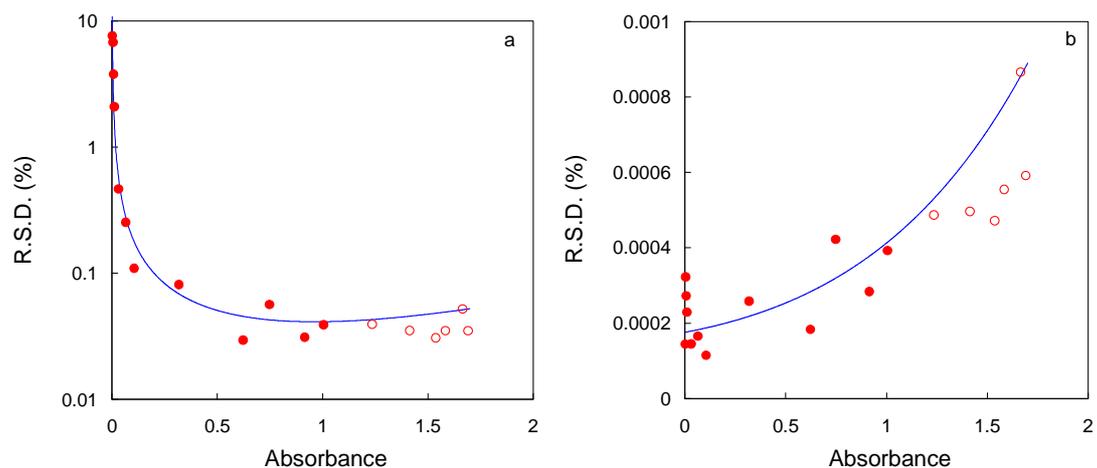
Anexo III-2 Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia para un espectrofotómetro de diodos, tanto para cuando la cubeta permanece en el portacélulas (\circ), como cuando se saca en cada adquisición de la medida (\bullet). **1**, Línea de regresión de los puntos huecos. **2**, Línea de regresión de los puntos llenos. **3**, Línea teórica que representa el error debido a la colocación de la cubeta, y que se deduce de las líneas **1** y **2**. **(a)** Zona de absorbancias bajas. **(b)** Zona de absorbancias altas.



Anexo III-3: a) Desviación estándar relativa de la absorbancias frente al valor de la absorbancia en el sistema HPLC con quinina como especie absorbente. b) Desviación estándar de la absorbancia en función de la absorbancia. (○) Puntos experimentales hallados cuando no se utilizó válvula de inyección. (●) Puntos experimentales hallados cuando las disoluciones de quinina son inyectadas al sistema HPLC. (1) Línea de regresión obtenida por ajuste de los puntos vacíos a la ecuación (7); (2) Línea de regresión obtenida por ajuste de los puntos experimentales (llenos) a la **ecuación (23)**.



Anexo III-4: Comportamiento del espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) USB4000 (Ocean Optics). a) Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia. Los puntos representan los valores experimentales. Como absorbente se ha utilizado Dicromato potásico ($\lambda_{\text{Max.}}=350$ nm) en ácido sulfúrico 5×10^{-3} mol l⁻¹. 1) Curva obtenida por regresión no lineal por mínimos cuadrados de los puntos experimentales; 2) contribución individual del término correspondiente a la k_1 obtenida; 3) contribución individual del término correspondiente a la k_2 obtenida; b) desviación estándar experimental, junto con las curvas correspondientes trazadas utilizando los valores obtenidos por regresión en a).



Anexo III-5: Comportamiento del espectrofotómetro de acoplamiento de carga (CCD) QE65000 (Ocean Optics). a) Desviación estándar relativa de la absorbancia en función de la absorbancia. Los puntos representan los valores experimentales, y los huecos aquellos para los que el rango lineal (ley de Beer) no se cumple. Como absorbente se ha utilizado Dicromato potásico ($\lambda_{\text{Max.}}=350$ nm) en ácido sulfúrico $5 \times 10^{-3} \text{ mol l}^{-1}$. La curva se obtiene por regresión no lineal por mínimos cuadrados de los puntos experimentales (Sin los huecos). b) desviación estándar experimental junto con su curva correspondiente, trazada utilizando el valor de la constante obtenido por regresión en a).

