

Taller

Absorción Atómica

Dra. Beatriz Soledad

Métodos ópticos de análisis

- Colorimétricos
- Espectroscopia atómica
- Espectroscopia molecular
- Fotometría de llama

Los **instrumentos** que se utilizan en las regiones **ultravioleta (UV)**, **visible e infrarroja (IR)** tienen varias características en común, por lo que con frecuencia se les llama **instrumentos ópticos** aun cuando el ojo humano es insensible a las longitudes de onda del ultravioleta y del infrarrojo.

Los métodos espectroscópicos ópticos se apoyan en seis fenómenos:

- 1) Absorción
- 2) Fluorescencia
- 3) Fosforescencia
- 4) Dispersión
- 5) Emisión
- 6) Quimioluminiscencia.

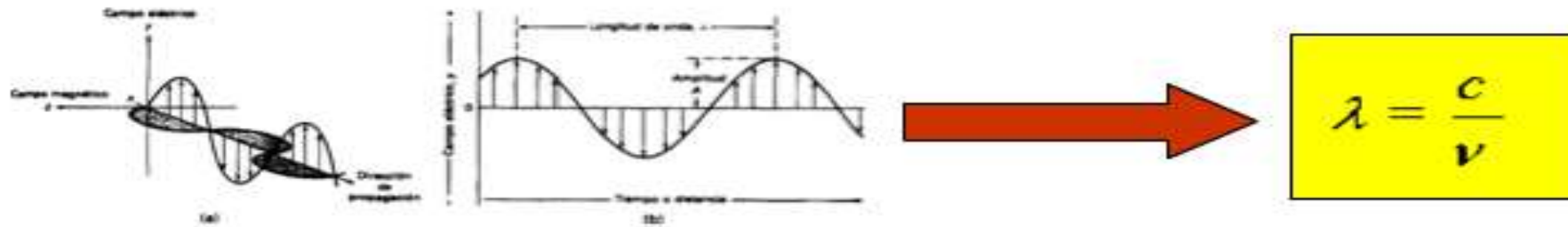
Los instrumentos que miden cada uno de ellos difieren un poco en su configuración, pero la mayor parte de sus partes básicas son muy similares.

Los instrumentos espectroscópicos típicos están compuestos por cinco componentes:

- 1) una fuente estable de energía radiante
- 2) un recipiente transparente en donde se coloca la muestra
- 3) un dispositivo que aísla una región restringida del espectro para efectuar las mediciones
- 4) un detector de radiación que convierte la energía radiante en una señal eléctrica útil
- 5) una unidad que procesa las señales y despliega resultados, la cual exhibe la señal que entrega el transductor en la escala de un medidor, una pantalla de computadora, un medidor digital u otro dispositivo de registro.

Propiedades de la radiación electromagnética

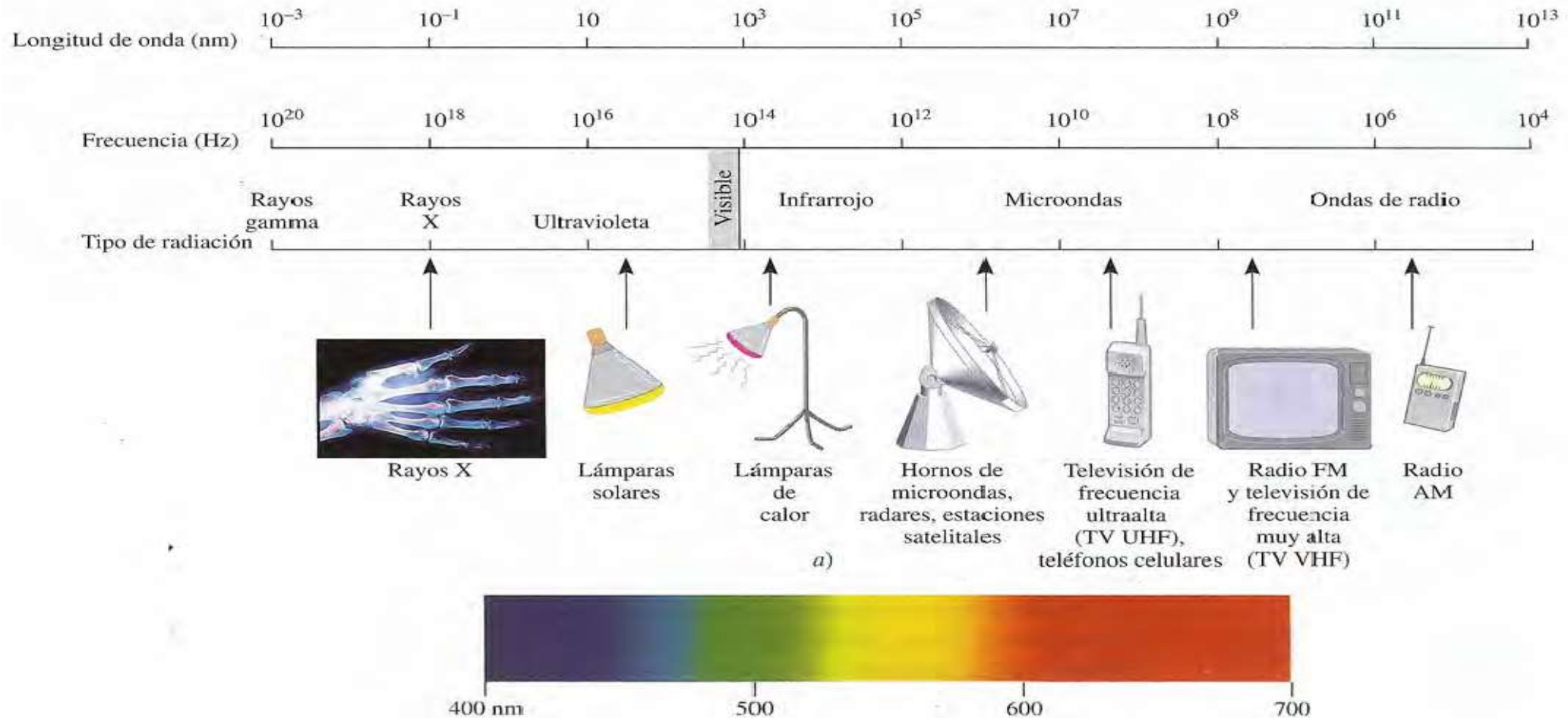
PROPIEDADES ONDULATORIAS



LA DUALIDAD ONDA- PARTICULA DE LA RADIACIÓN

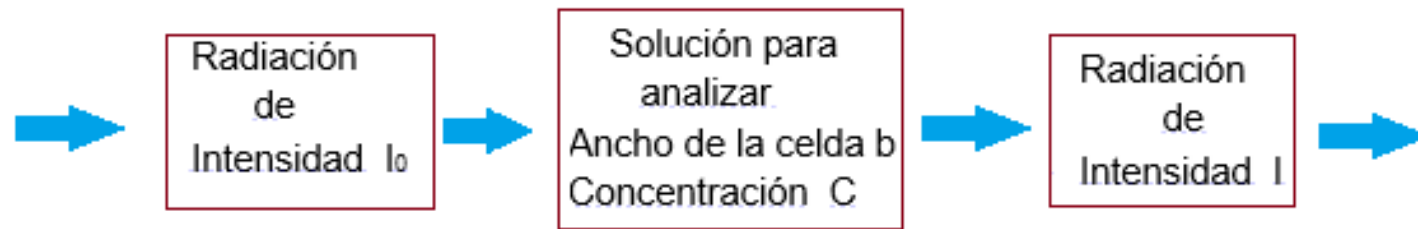
$$E = h\nu \left\{ \begin{array}{l} E = \text{Energía de la radiación} \\ \nu = \text{Frecuencia de la radiación} \\ h = \text{Constante de Planck} = 6.624 \times 10^{-27} \text{ erg-s} \end{array} \right.$$

Tipos de radiación electromagnética



Ley de Lambert-Beer

$$A = \epsilon bc$$



El espectro electromagnético en la región visible abarca desde 370 nm hasta 800 nm.

La absorción de la radiación por un sistema puede ser descrita por medio de una representación de la absorción como función de la longitud de onda.

Los métodos analíticos cuantitativos basados en la absorción de la energía radiante por la materia están relacionados con la medición de las intensidades de la radiación electromagnética incidente y transmitida después de pasar a través de un medio absorbente.

Entre los factores que influyen sobre la intensidad transmitida están:

- la intensidad incidente
- la concentración de la solución
- el recorrido del haz a través de la solución.

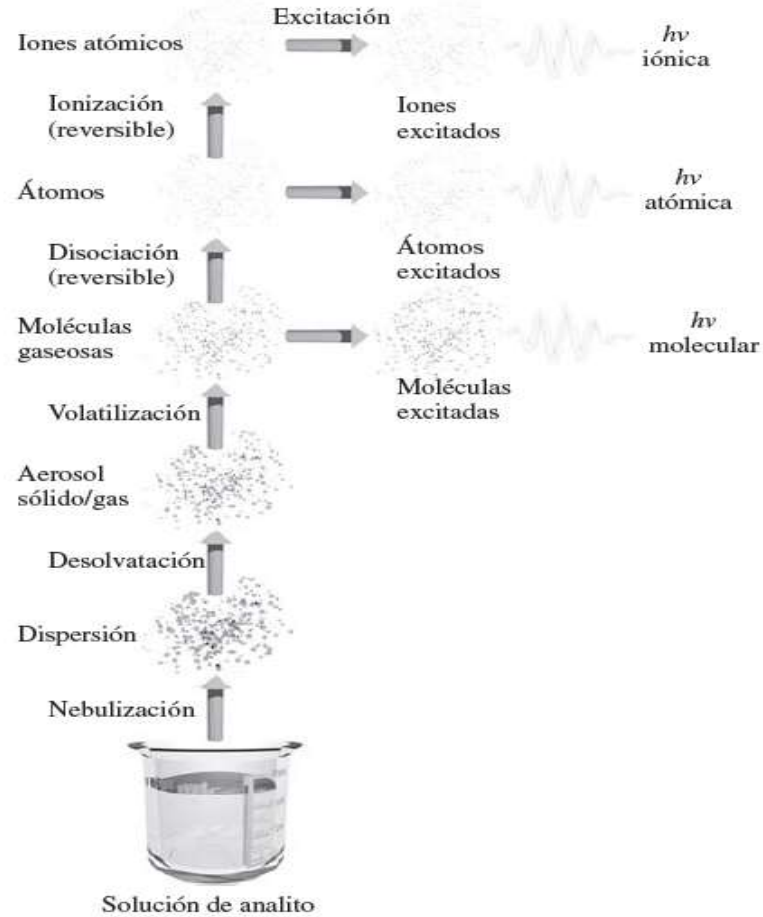
Los espectros de absorción se caracterizan por el porcentaje de transmitancia o la absorbancia de la muestra a una longitud de onda dada.

La transmitancia **T** y la absorbancia **A** se definen como:

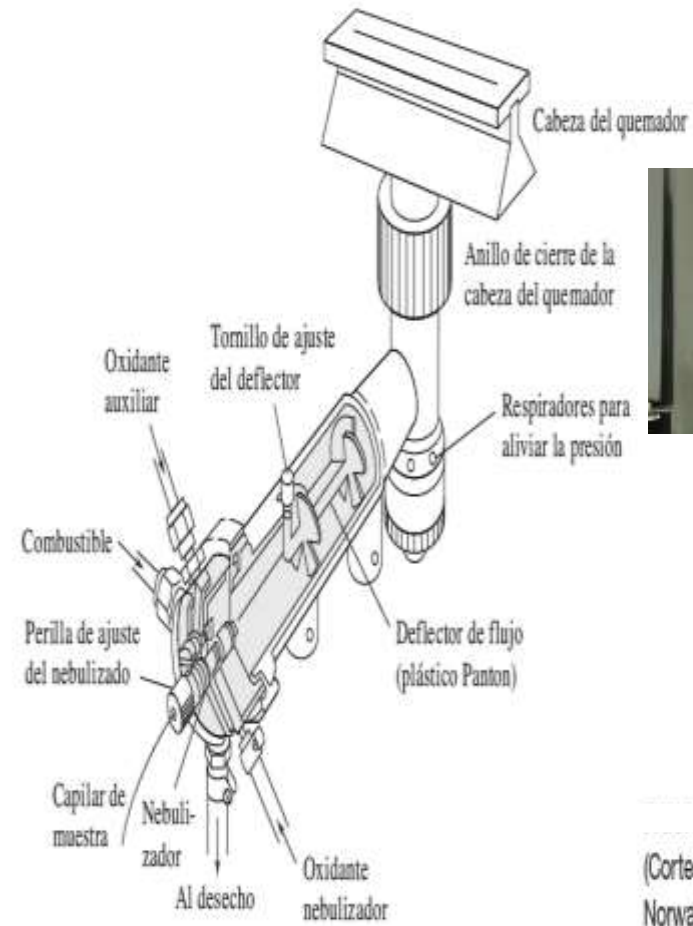
$$\%T = 100 \frac{I}{I_0} \quad A = \log \frac{I_0}{I}$$

$$A = -\log T$$

Atomización de muestras

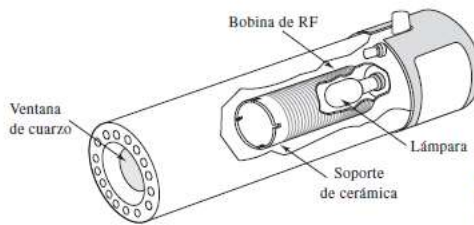
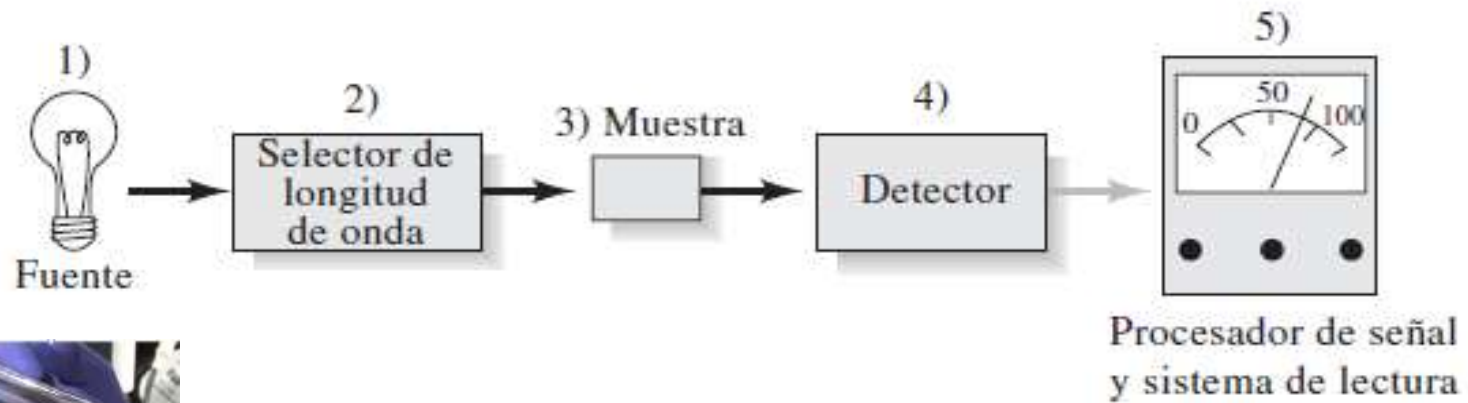


Procesos que ocurren durante la atomización.



Quemador de flujo laminar.
(Cortesía de Perkin-Elmer Corporation,
Norwalk, CT.)

Equipo Absorción Atómica



TÉCNICA ANALÍTICA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

*Es principalmente un método de **análisis cuantitativo** y es uno de los métodos más sensibles y precisos para el análisis de metales (alcalinos, alcalinotérreos, entre otros)*

- **Preparación de la muestra:** descomposición y disolución de muestras
- **Introducción de la muestra:** Inyección de flujo, absorción de la muestra, horno de grafito, entre otras
- **Curvas de calibración:** debe ser preparada en forma periódica una curva de calibración que abarca el intervalo de concentraciones del analito que se encuentre en la muestra
- **Método de adiciones estándar:** Se usa ampliamente en la espectroscopia de absorción atómica para compensar de forma parcial o completa las interferencias químicas o espectrales introducidas por la matriz de la muestra

Validación del método analítico

Errores en el análisis cuantitativo

Los resultados cuantitativos deben ir acompañados de una estimación de los errores inherentes a los mismos.

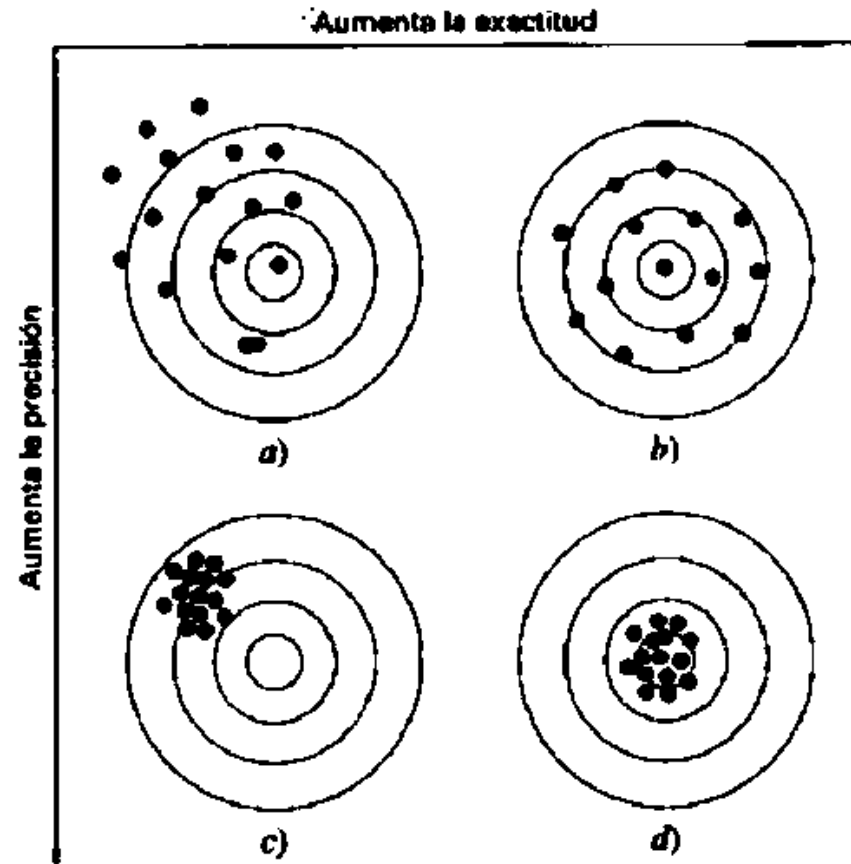
Tipos de error:

Sistemáticos: provocan que todos los resultados sean erróneos en *el mismo sentido*. EL error sistemático total es denominado **sesgo**.

Aleatorios: provocan que los resultados individuales difieran uno de otro de manera que caigan a *ambos lados* del valor medio. Afectan la **precisión** de un experimento

Exactitud vs. Precisión

- **Exactitud:** ¿Qué tan cercano está el valor calculado (o medido) respecto del valor verdadero?
- **Precisión:** ¿Qué tan cercanos se ubican entre sí los distintos valores calculados?



Ejemplo

La **Precisión** describe errores aleatorios

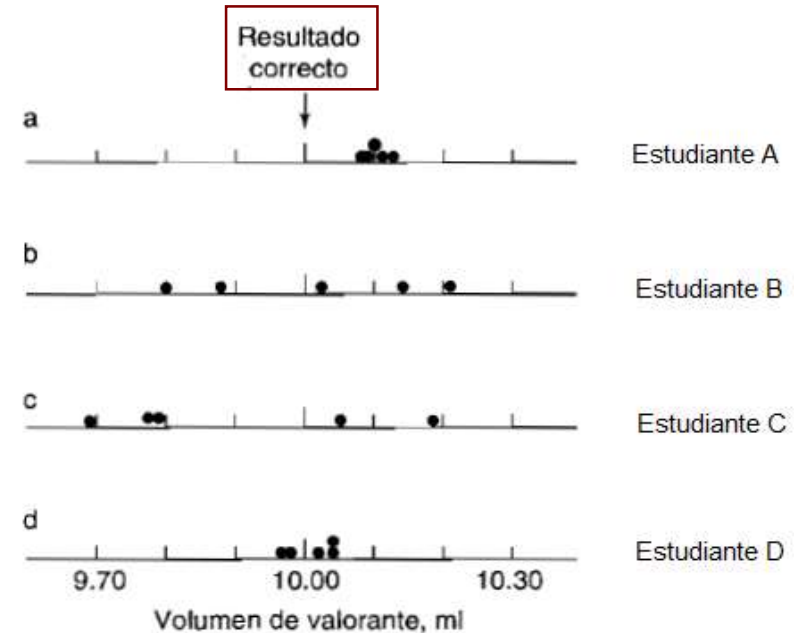
El **Sesgo** describe errores sistemáticos

La **Exactitud** incorpora ambos tipos de error

Miller y Miller (2002)

Errores aleatorios y sistemáticos.

Estudiante	Resultados (ml)					Comentario
A	10.08	10.11	10.09	10.10	10.12	Preciso, sesgado
B	9.88	10.14	10.02	9.80	10.21	Impreciso, insesgado
C	10.19	9.79	9.69	10.05	9.78	Impreciso, sesgado
D	10.04	9.98	10.02	9.97	10.04	Preciso, insesgado



Repetitividad y reproducibilidad

Repetitividad: repetir un análisis varias veces (3, 5 etc. el mismo día, bajo las mismas condiciones)

Reproducibilidad: Repetir un análisis días distintos, analistas diferentes, condiciones de tiempo diferentes)

Incertidumbre

Incertidumbre: Intervalo dentro del cual es razonablemente verosímil que se encuentre el verdadero valor. Debería dar una probabilidad (p.ej. 95%)

Media y desviación estándar

La media, \bar{x} , de n medidas viene dada por $\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$

La desviación estándar, s , de n medidas viene dada por

$$s = \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$$

Ejemplo

Encontrar la media y la desviación estándar de los resultados del estudiante A.

	x_i	$(x_i - \bar{x})$	$(x_i - \bar{x})^2$
	10.08	-0.02	0.0004
	10.11	0.01	0.0001
	10.09	-0.01	0.0001
	10.10	0.00	0.0000
	10.12	0.02	0.0004
Totales	50.50	0	0.0010

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} = \frac{50.50}{5} = 10.1 \text{ ml}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{0.001/4} = 0.0158 \text{ ml}$$

Nótese que $\sum (x_i - \bar{x})$ es siempre igual a 0.

Varianza = el cuadrado de la desviación estándar, s^2 .

Coefficiente de variación (CV) = desviación estándar relativa (DR) = $100 \frac{s}{\bar{x}}$ (DER)

Es un error relativo utilizado frecuentemente para comparar precisiones

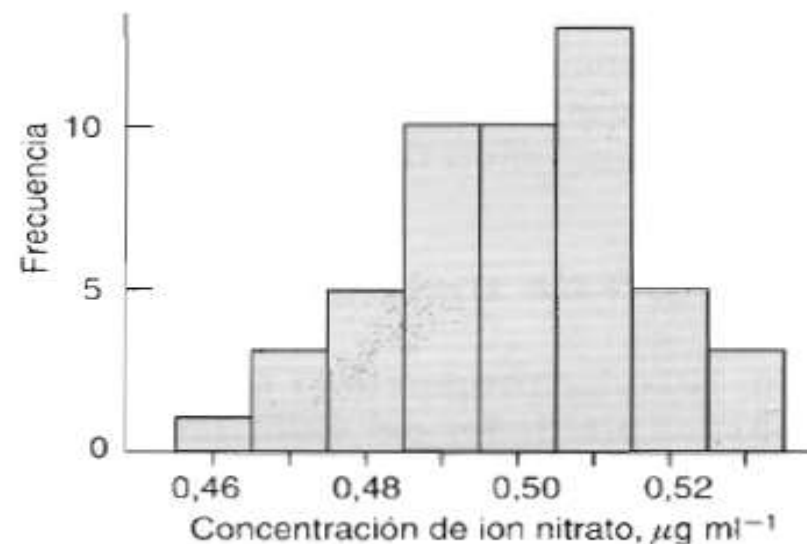
Frecuencias e histograma

Resultados de 50 determinaciones de concentración de ion nitrato, en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

0.51	0.51	0.51	0.50	0.51	0.49	0.52	0.53	0.50	0.47
0.51	0.52	0.53	0.48	0.49	0.50	0.52	0.49	0.49	0.50
0.49	0.48	0.46	0.49	0.49	0.48	0.49	0.49	0.51	0.47
0.51	0.51	0.51	0.48	0.50	0.47	0.50	0.51	0.49	0.48
0.51	0.50	0.50	0.53	0.52	0.52	0.50	0.50	0.51	0.51

Tabla de frecuencias para medidas de concentración de ion nitrato.

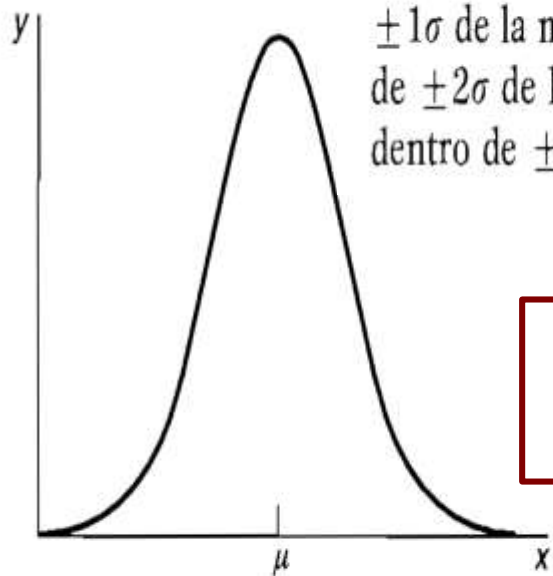
Concentración de ion nitrato ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Frecuencia
0.46	1
0.47	3
0.48	5
0.49	10
0.50	10
0.51	13
0.52	5
0.53	3



Histograma de los datos de concentración de ion nitrato

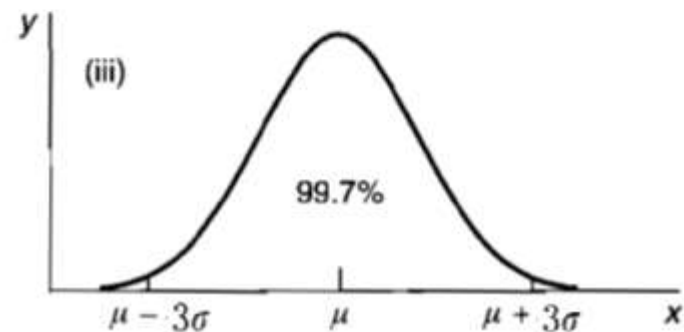
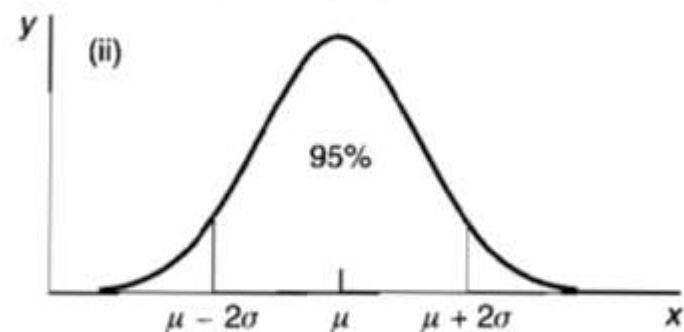
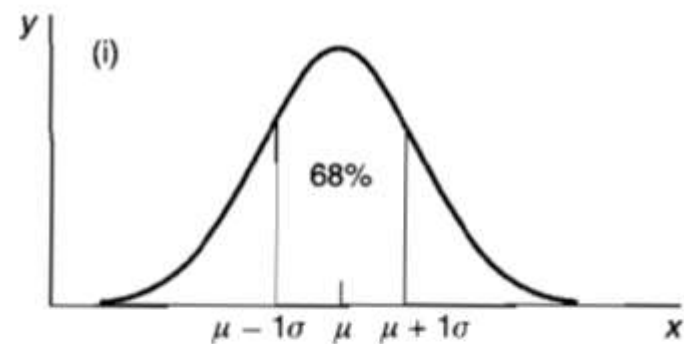
Distribución normal o Gaussiana

En una distribución normal con media μ y desviación estándar σ , aproximadamente el 68% de los valores de la población caen dentro de $\pm 1\sigma$ de la media, aproximadamente el 95% de los valores caen dentro de $\pm 2\sigma$ de la media, y aproximadamente el 99.7% de los valores caen dentro de $\pm 3\sigma$ de la media.

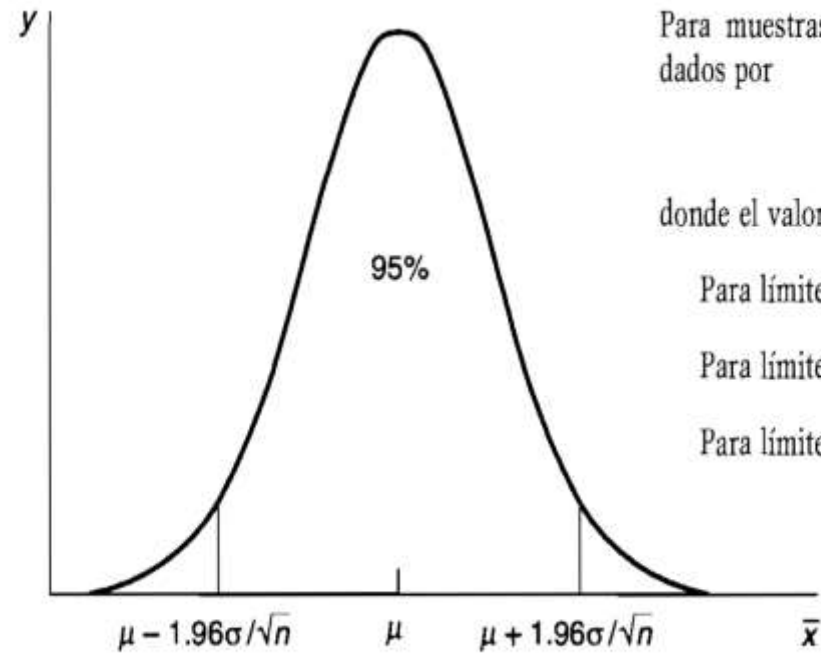
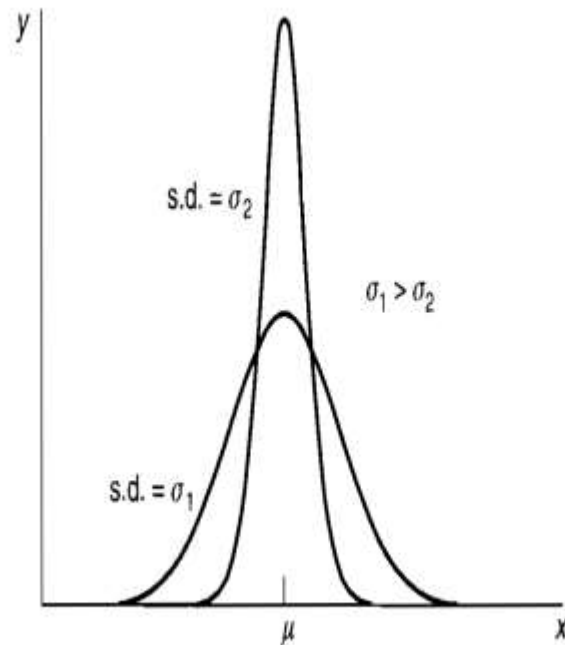


$$\text{Variable normal estandarizada, } z = \frac{(x - \mu)}{\sigma}$$

La distribución normal, $y = \exp[-(x - \mu)^2/2\sigma^2]/\sigma\sqrt{2\pi}$. La media se indica por μ .



Límite de confianza e intervalo de confianza



Para muestras grandes, los límites de confianza de la media vienen dados por

$$\bar{x} \pm zs/\sqrt{n}$$

donde el valor de z depende del grado de confianza requerido.

Para límites de confianza del 95%, $z = 1.96$

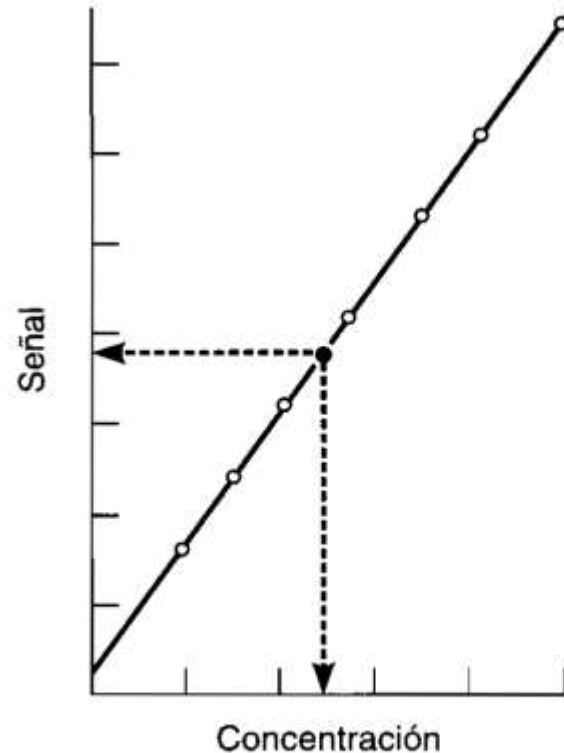
Para límites de confianza del 99%, $z = 2.58$

Para límites de confianza del 99.7%, $z = 2.97$

La distribución muestral de la media, mostrando el intervalo dentro del cual se encuentra el 95% de las medias muestrales.

Distribuciones normales con la misma media pero con diferentes valores de la desviación estándar (d.e.).

Métodos de calibración en análisis instrumental: regresión y correlación

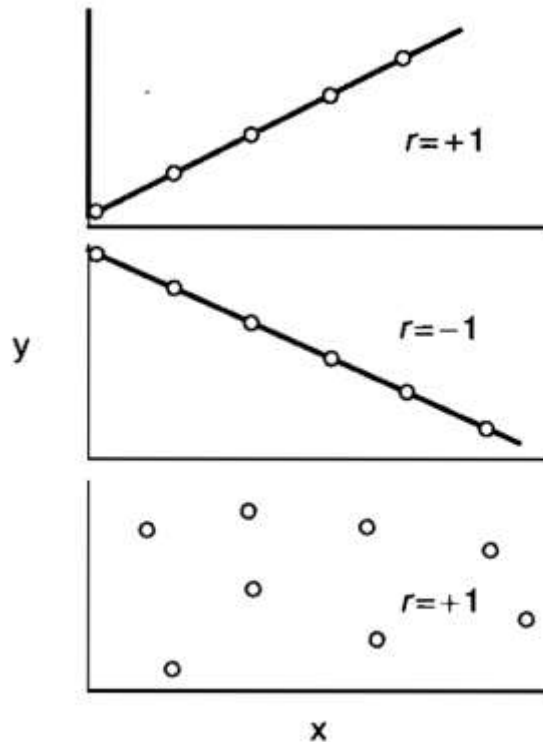


Procedimiento de calibración en análisis instrumental:

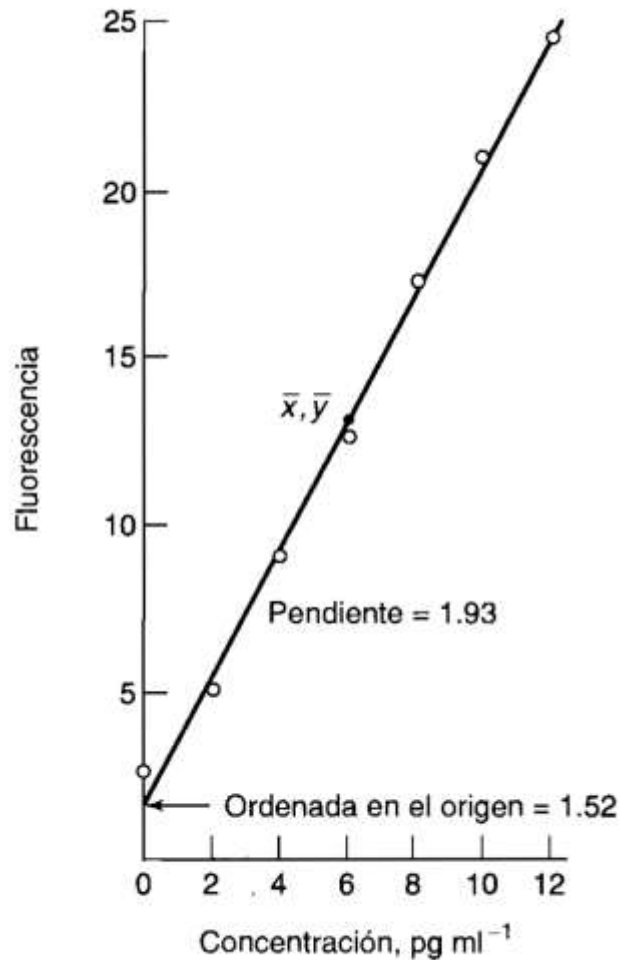
- puntos de calibrado
- muestra de ensayo

El coeficiente de correlación momento-producto,

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\left\{ \left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right] \right\}^{1/2}}$$



El coeficiente de correlación momento-producto, ***r***



Gráfica de calibrado de los datos del Ejemplo

Se puede demostrar que la recta de mínimos cuadrados viene dada por:

Pendiente de la recta de mínimos cuadrados:

$$b = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

Ordenada en el origen de la recta de mínimos cuadrados:

$$a = \bar{y} - b\bar{x}$$

se calculó que, para esta curva de calibrado:

$$\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = 216.2; \quad \sum_i (x_i - \bar{x})^2 = 112; \quad \bar{x} = 6; \quad \bar{y} = 13.1$$

se calcula que

$$b = 216.2/112 = 1.93$$

$$a = 13.1 - (1.93 \times 6) = 13.1 - 11.58 = 1.52$$

La ecuación para la recta de regresión es $y = 1.93x + 1.52$.

Errores en la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión

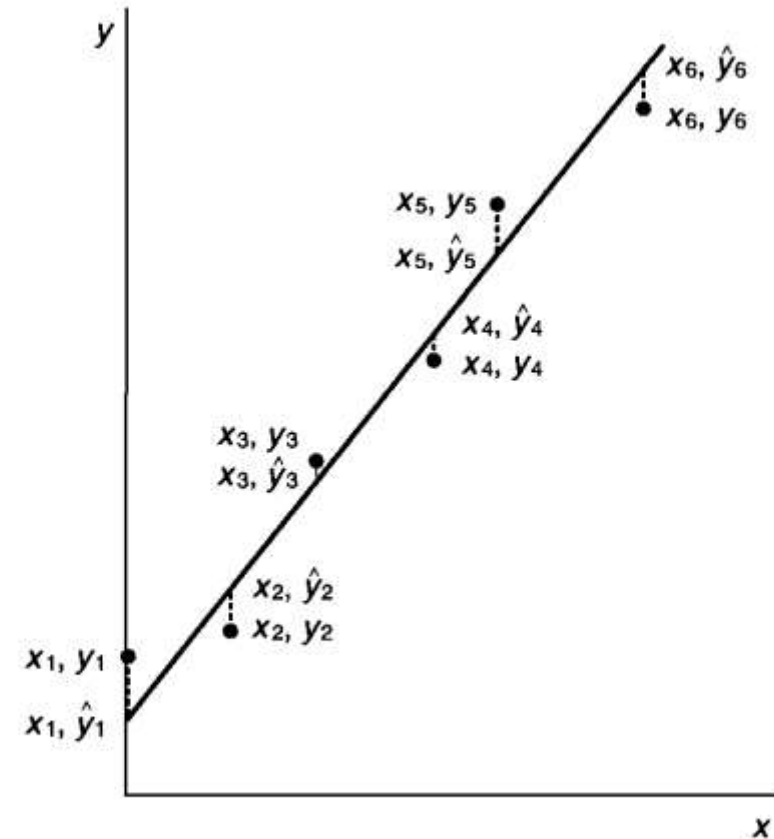
$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$$

Desviación estándar de la pendiente:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Desviación estándar de la ordenada en el origen:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$



Los residuos de y de una regresión lineal.

Desviación estándar y límites de confianza para la pendiente y ordenada

Calcular la desviación estándar y los límites de confianza para la pendiente y ordenada en el origen de la recta de regresión calculada en la Sección 5.4.

Este cálculo puede que no sea realizable directamente en una calculadora simple, aunque se encuentran disponibles programas de computadora. Aquí se desarrolla el cálculo manualmente, utilizando una tabla estructurada.

x_i	x_i^2	y_i	\hat{y}_i	$ y_i - \hat{y}_i $	$(y_i - \hat{y}_i)^2$
0	0	2.1	1.52	0.58	0.3364
2	4	5.0	5.38	0.38	0.1444
4	16	9.0	9.24	0.24	0.0576
6	36	12.6	13.10	0.50	0.2500
8	64	17.3	16.96	0.34	0.1156
10	100	21.0	20.82	0.18	0.0324
12	144	24.7	24.68	0.02	0.0004
$\sum x_i^2 = 364$		$\sum (y_i - \hat{y}_i)^2 = 0.9368$			

A partir de esta tabla y utilizando la Ecuación (5.6) se obtiene:

$$s_{y,x} = \sqrt{0.9368/5} = \sqrt{0.18736} = 0.4329$$

De la Sección 5.3 se sabe que $\sum (x_i - \bar{x})^2 = 112$, y la Ecuación (5.7) puede ser utilizada para mostrar que:

$$s_b = 0.4329 / \sqrt{112} = 0.4329 / 10.58 = 0.0409$$

El valor de t para $(n - 2) = 5$ grados de libertad y un nivel de confianza del 95% es 2.57 (Tabla A.2). Los límites de confianza del 95% para b son, por tanto:

$$b = 1.93 \pm (2.57 \times 0.0409) = 1.93 \pm 0.11$$

La Ecuación (5.8) requiere conocer $\sum x_i^2$, calculado de la tabla como 364. Entonces, se puede escribir:

$$s_e = 0.4329 \sqrt{\frac{364}{7 \times 112}} = 0.2950$$

de manera que los límites de confianza al 95% son:

$$e = 1.52 \pm (2.57 \times 0.2950) = 1.52 \pm 0.76$$

Cálculo de una concentración y su error aleatorio

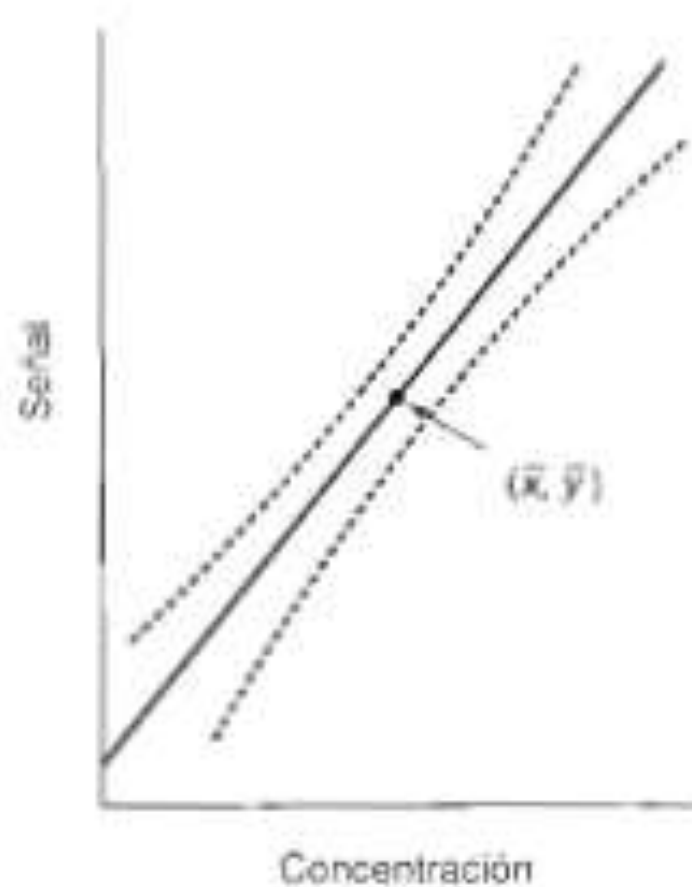
Error global en la
concentración

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Desviación
estándar
estimada de x_0

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

Forma general de los límites de confianza para una concentración calculada

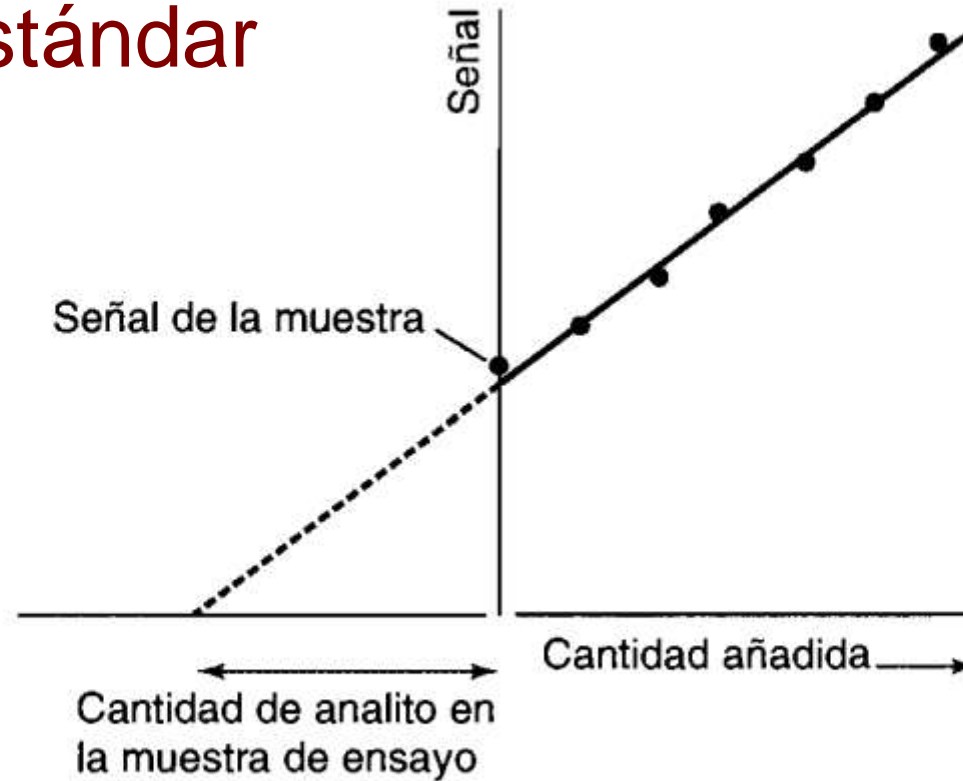


Forma general de los límites de confianza para una concentración determinada utilizando una recta de regresión no ponderada.

Límite de detección Límite de detección (LOD) = $y_B + 3s_B$

Límite de cuantificación (LOQ) $y_B + 10s_B$

Método de adición de estándar



El método de las adiciones estándar.

Validación de Métodos Analíticos

En la USP 30, en el capítulo referente a la “*Validación de Métodos Compendiados*”, se define validación como:

“Validación de un método analítico es el proceso por el cual se establece, por estudios de laboratorio, que las características de funcionamiento del método cumple los requisitos propuestos por las aplicaciones analíticas”.

Frecuentemente se utiliza el análisis estadístico, como por ejemplo el análisis de regresión lineal y la desviación estándar relativa (DER) de los datos de los métodos de validación, para demostrar la validez del mismo (*Miller, J y col. 2002*).

También se incluyen los equipos, instrumentos y aparatos que son utilizados en los métodos de análisis a los cuales es importante evaluar para determinar las variaciones potenciales que pueden ocurrir durante el desarrollo del análisis, además de su calibración y mantenimiento preventivo periódico.

Características analíticas típicas usadas en métodos de validación

Características analíticas usadas en los métodos de validación

Exactitud

Precisión

Especificidad

Límite de detección

Límite de cuantificación

Linealidad

Rango

Robustez

Reproducibilidad

Exactitud

La **exactitud** se define como el acercamiento de los resultados experimentales obtenidos, al valor verdadero. Se expresa como el porcentaje de recuperación por el ensayo de cantidades conocidas adicionadas al analito.

Precisión

La **precisión** de un método analítico se refiere al grado de concordancia entre los resultados individuales de la prueba, cuando el procedimiento se aplica repetitivamente a muestras múltiples o a una muestra homogénea.

La precisión del método, se expresa como la **desviación estándar o desviación estándar relativa** (coeficiente de variación) de una serie de mediciones.

Especificidad

La habilidad para evaluar inequívocamente el analito en presencia de los componentes que se espera que estén presentes, así como impurezas, productos de degradación, y componentes de la matriz.

Límite de detección

El *límite de detección* es un parámetro de prueba límite. Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito, pero no necesariamente cuantificarse, bajo las condiciones experimentales establecidas.

$$Y_{LOD} = 3 \text{ desv std}$$

$$LOD = (Y_{LOD} - \text{ordenada}) / \text{pendiente}$$

Límite de cuantificación

Es la concentración de muestra en un analito que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones experimentales establecidas.

$$Y_{LOQ} = 10 \text{ desv std}$$

$$LOQ = (Y_{LOQ} - \text{ordenada}) / \text{pendiente}$$

Linealidad

Es la habilidad del método para obtener resultados en la prueba proporcionales a la concentración del analito en muestras dentro de un rango dado que resultan directamente o mediante una transformación matemática bien definida

Rango

Es el intervalo entre el nivel más alto y más bajo del analito en el que se ha demostrado que puede ser determinado con exactitud, precisión y linealidad, tal y como lo indica el método.

Reproducibilidad

Es el grado de reproducibilidad de los resultados de la prueba obtenidos por el análisis de una misma muestra bajo una variación de las condiciones normales de prueba, tales como diferentes laboratorios, analistas, ensayos, temperaturas, lotes de reactivos, días, etc.

Características de validación recomendadas de varios tipos de ensayos.

Tipo de ensayo /Características	Identificación	Ensayo para Impurezas		Prueba. Disolución (Medición solamente, Contenido/Potencia)	Ensayos específicos
		Cuantitativo	Límite		
Exactitud	-	+	-	+	+4
Precisión-Repetibilidad	-	+	-	+	+4
Precisión-Precisión Intermedia	-	+1	-	+1	+4
Especificidad	+2	+	+	+5	+4
Límite de Detección	-	-3	+	-	-
Límite de Cuantificación	-	+	-	-	-
Linealidad	-	+	-	+	-
Rango	-	+	-	+	-
Reproducibilidad	-	+	-3	+	+4

NOTA:

- Significa que esta característica no es usualmente evaluada

+ Significa que esta característica es usualmente evaluada.

1 En casos donde la reproducibilidad ha sido realizada la precisión intermedia no es necesaria.

2 Carencia de especificidad para un procedimiento analítico puede ser compensada por la adición de un segundo procedimiento analítico.

3 Puede ser necesaria en algunos casos.

4 Puede no ser necesaria en algunos casos

5 Carencia de especificidad para un ensayo para liberación puede ser compensada por un ensayo de impurezas.

Ejercicio

I. En un análisis de sodio por Absorción Atómica, se obtuvo los siguientes valores para la recta de calibración.

Determine:

- Ecuación de la recta
- Linealidad
- Coefficiente de correlación
- Coefficiente de determinación
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

Tabla N° 1. Recta de calibración del sodio por AA

Concentración (ppm)	Medida
2,0	0,035
4,0	0,067
6,0	0,104
8,0	0,146
10,0	0,192

II. En un análisis de una muestra efectuado por un analista, se encontró lo siguiente:

Tabla N° 2. Análisis de sodio en un lote del producto

N° Análisis	Medida
1	0,121
2	0,115
3	0,098

Si el valor teórico de la concentración de sodio en la muestra es de 6,4 ppm, determine la exactitud y precisión del análisis.

Análisis por absorción atómica		
Concentración (ppm)	medida	
2	0,035	
4	0,067	
6	0,104	
8	0,146	
10	0,192	

Para la recta de calibración:			
pendiente	0,01965	-0,0091	ordenada
desv std pend	0,00080571	0,00534447	desv std ordenada
r2	0,99498158	0,00509575	sy/x
F	594,797176	3	df
suma de los cuadr	SCReg	0,0154449	7,79E-05 SCRes
	YLOD=	0,00618725	
	YLOQ=	0,0418575	
	LOD=	Y LOD - (-2E-05/0,000012) =	0,778
	LOQ=	Y LOQ - (-2E-5/0,0000112) =	2,593

Análisis	Medida	ppm
1	0,121	6,6
2	0,115	6,3
3	0,098	5,4
	Prom	6,1
	Desv Std	0,5
	DER	8,1

Gráfico de calibración que muestra una línea de tendencia lineal con los datos de concentración y medida. La ecuación de la recta es $y = 0,0197x - 0,0091$ y el coeficiente de determinación es $R^2 = 0,995$.