



Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

ISSN: 0325-2957

actabioq@fbpba.org.ar

Federación Bioquímica de la Provincia de

Buenos Aires

Argentina

Duymovich, Claudio; Acheme, Rosana; Sesini, Sandra; Mazziotta, Daniel

Espectrofotómetros y Fotocolorímetros Guía práctica de actualización

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, vol. 39, núm. 4, septiembre-diciembre, 2005, pp. 529-539

Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires

Buenos Aires, Argentina

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53539414>

- ▶ Cómo citar el artículo
- ▶ Número completo
- ▶ Más información del artículo
- ▶ Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

# Espectrofotómetros y Fotocolorímetros

## Guía práctica de actualización

► Claudio Duymovich<sup>1</sup>, Rosana Acheme<sup>2</sup>, Sandra Sesini<sup>2</sup>, Daniel Mazziotta<sup>1</sup>

### Introducción

1. Licenciado en Ciencias Bioquímicas.
2. Bioquímica.

El espectrofotómetro constituye una herramienta fundamental en el laboratorio clínico. Más del 90% de las determinaciones que se realizan en Química Clínica tienen como paso final la lectura de una absorbancia o una transmitancia. El correcto desempeño de los espectrofotómetros es entonces determinante, en última instancia, de la calidad analítica de los resultados que emite el laboratorio (1-6).

El objetivo de esta guía consiste en que el bioquímico cuente con los materiales necesarios para la evaluación del funcionamiento del espectrofotómetro, y de esta manera, pueda verificar si los parámetros fotométricos se encuentran dentro de los rangos de aceptabilidad establecidos de acuerdo a las normativas internacionales.

Se deberán llevar registros que certifiquen dichos controles.

Los estándares de calidad del instrumental deberán cumplirse y por el contrario si algún parámetro estuviera fuera de rango, es conveniente realizar la reparación del instrumento a través de un servicio técnico acreditado y luego volver a verificar el buen funcionamiento.

### Control de la exactitud de la longitud de onda

#### NO APTO PARA FOTOCOLORÍMETROS NI AUTOANALIZADORES

Frecuencia del control: semestral

El control se podrá realizar en espectrofotómetros con selector continuo de longitudes de onda, no así en fotocolorímetros de filtro ni en autoanalizadores, ya que en estos no se pueden realizar espectros de barrido.

Definición: Grado de concordancia entre la longitud de onda que indica el seleccionador y la longitud de onda de referencia requerida. Se expresa en nm.

Fundamento: Se utiliza el método del punto isosbético: el rojo Congo tiene la particularidad que los espectros de las formas ácida y básica del colorante en igual concentración presentan la misma absorbancia a una longitud de onda denominada "punto isosbético"

(PI). Esta longitud de onda es independiente de la concentración del colorante y de la temperatura de trabajo por lo cual resulta un parámetro fijo de referencia. Si el punto isosbético hallado experimentalmente difiere del teórico, indica que existe un corrimiento en la longitud de onda (7) (8).

#### Procedimiento

El estudio consta de 3 pasos:

- Preparación de las formas ácida y alcalina del colorante
- Realización del espectro de barrido
- Interpretación de resultados: gráfico del espectro para hallar el PI

#### Reactivos requeridos

Solución de Rojo Congo 14 mg/L  
HCl 2,5 N  
NaOH 2,5 N

- Preparación de las formas ácida A y alcalina B del colorante.

Alicuotar con una misma pipeta 5 mL de solución de Rojo Congo 14 mg/L en dos tubos de ensayo rotulados A y B.

Solución A: al tubo A agregarle 20 uL de la solución de HCl 2,5 N

Solución B: al tubo B agregarle 20 uL de la solución de NaOH 2,5 N

Usar una única micropipeta para dispensar los 20 uL.

Las soluciones A y B una vez preparadas son estableces 1 hora a temperatura ambiente.

- Realización del barrido espectrofotométrico de las soluciones A y B entre 520 y 570 nm.

Se deberá realizar el espectro de las soluciones A y B contra agua destilada. Se puede trabajar a temperatura ambiente ya que el punto isosbético es independiente de la temperatura entre 4 y 45 °C.

Se recomienda proceder de la siguiente manera:

- Método manual para espectrofotómetros con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor.  
(Método que utiliza una cubeta)

Llenar una cubeta con agua destilada y ajustar el cero de absorbancia a 520 nm. El regulador de absorbancias no se tocará más durante toda la experiencia.

Leer y registrar las absorbancias a las longitudes de onda indicadas en la tabla provista.

Vaciar y llenar la misma cubeta con la solución A repitiendo el mismo barrido.

Vaciar, enjuagar con agua destilada y llenar la misma cubeta con la solución B repitiendo el mismo barrido.

- Método manual para espectrofotómetros con cubetas de caras paralelas de 1 cm de espesor.  
(Método que utiliza tres cubetas)

Elegir 3 cubetas iguales, sin rayaduras y perfectamente limpias. Llenar una con agua destilada y las otras con las soluciones A y B respectivamente. Ajustar el cero de absorbancia a 520 nm con la cubeta que tiene el agua destilada. Retirar dicha cubeta y medir la absorbancia de la solución A, y luego de la solución B registrando los valores en la tabla directamente como Abs. netas. Seleccionar luego 525 nm y repetir los pasos anteriores, es decir, ajustar primero el cero con agua destilada y luego leer las soluciones A y B. Repetir estos pasos a cada una de las longitudes de onda indicadas en la tabla adjunta, llevando a cero con la cubeta de agua destilada en cada longitud de onda.

- Método para los espectrofotómetros con microcubetas y bomba de succión.

Aspirar agua destilada y ajustar a cero de absorbancia a 520 nm. El regulador de absorbancias no se tocará más en toda la experiencia.

Mover el selector de longitudes de onda hacia los 570 nm realizando el espectro del agua tal como se indica en la tabla adjunta, registrando todos los valores de absorbancia.

Vaciar la cubeta y aspirar la solución A realizando el mismo barrido.

Vaciar la cubeta, enjuagar pasando agua destilada y aire y aspirar la solución B realizando el mismo barrido.

Nota: para realizar el barrido del agua destilada en los métodos b1 y b3 se recomienda empezar llevando a cero de absorbancia a 520 nm con el fin de tener todas las absorbancias positivas. Si el espectro del agua da valores negativos comenzar a otra longitud de onda de manera tal de no tener valores negativos de absorbancias ya que finalmente será restado el espectro del agua punto a punto del de las soluciones A y B.

Longitud de onda (nm)	Absorbancias absolutas		Absorbancias relativas		
	Agua	Solución ácida (A)	Solución alcalina (B)	Abs neta de A	Abs neta de B
520					
525					
530					
535					
536					
537					
538					
539					
540					
541					
542					
543					
544					
545					
550					
560					
570					

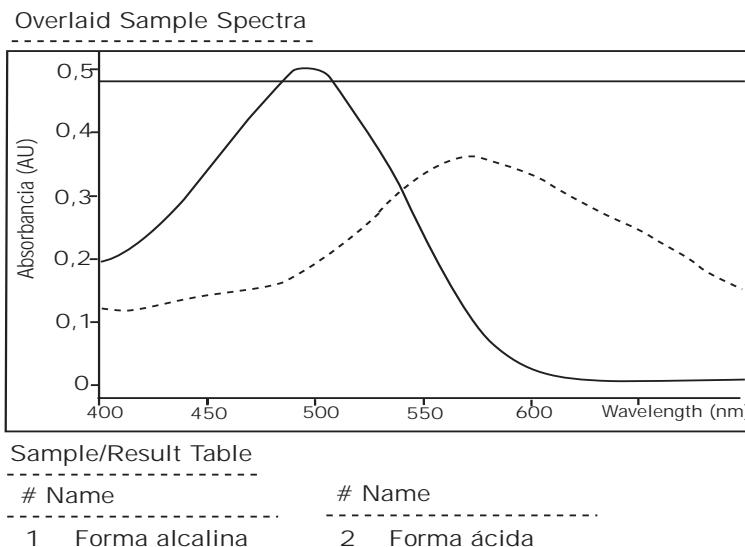


Gráfico de Punto Isosbético del Rojo Congo.

## Resultados

Graficar la absorbancia neta de las dos formas del colorante en papel milimetrado en función de la longitud de onda y establecer la longitud de onda a la que los dos espectros se cortan (punto isosbético). El punto isosbético teórico en las condiciones de realización de la experiencia es 541 nm.

Calcular el corrimiento que presenta el instrumento como:

$$\text{Corrimiento (nm)} = \text{p. isosbético hallado} - \text{p. isosbético teórico}$$

El punto isosbético teórico del Rojo Congo es 541 nm.

Ejemplo: Si el PI hallado es de 536 nm el corrimiento será:

$$536 - 541 = -5 \text{ nm}$$

Límites de aceptabilidad:  
Corrimiento: entre +/- 3 nm

Intervalo óptimo:  
Corrimiento: entre +/- 2 nm

## Control de la Exactitud Fotométrica

### APTO PARA ESPECTROFOTÓMETROS, FOTOCOLORÍMETROS Y AUTOANALIZADORES

**Definiciones:** La exactitud fotométrica es el grado de concordancia entre la absorbancia real y la absorbancia medida. El error cometido al leer una absorbancia respecto de una de referencia se denomina entonces "inexactitud fotométrica".

Frecuencia del control: mensual

Fundamento: El estudio de la exactitud fotométrica

consiste en la medición de absorbancias de soluciones certificadas y en la comparación de los valores hallados con los de referencia. Las soluciones comúnmente usadas como estándares de absorbancia son: (9-13):

- 340 nm: soluciones de dicromato de potasio en  $\text{HClO}_4$  0,001N con absorbancia certificada
- 405 nm: soluciones de p-nitrofenol en  $\text{NaOH}$  0,1N con absorbancia certificada o soluciones de sales de  $\text{Ni}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$  con absorbancia certificada.
- 505 nm: soluciones de sales de  $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$  en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  0,47N con absorbancia certificada
- 540 nm: soluciones de cianmetahemoglobina con absorbancia certificada

## Procedimiento

Se deberá medir la absorbancia de las soluciones y comparar dicho valor con los que figuran en los certificados correspondientes.

Seleccionar la temperatura de trabajo.

Seleccionar la longitud de onda.

Realizar un blanco con agua destilada. Realizar todas las medidas por duplicado.

Nota: En el anexo A figuran los diferentes procedimientos para las lecturas de las absorbancias de acuerdo al tipo de instrumento: espectrofotómetro o fotocolorímetro manual, con bomba de aspiración o equipos automáticos. Utilizar dicho anexo como guía para la realización de las medidas.

## Resultados

Estudio de exactitud fotométrica:

Calcular la inexactitud fotométrica como la diferencia entre la absorbancia promedio hallada y el valor de

referencia que se detalla en los certificados respectivos.

$$\% \text{ Inexactitud fotométrica} = \frac{(\text{Abs. hallada} - \text{Abs. referencia}) \times 100}{\text{Abs. referencia}}$$

#### Límites de aceptabilidad:

Exactitud fotométrica óptima: error entre +/- 2%  
Exactitud fotométrica aceptable: error entre +/- 3%

#### Ejemplo:

- Longitud de onda: 505 nm
- Temperatura: 30 °C
- Absorbancia contra agua destilada de ampolla B2:  
Medida 1: 0,315      Medida 2: 0,313
- Absorbancia promedio hallada : 0,314
- Absorbancia de referencia, 30 °C, 505 nm (según certificado): 0,323
- Inexactitud fotométrica =  $\frac{(0,314 - 0,323)}{0,323} \times 100 = -2,78\%$

Por lo tanto, la inexactitud del instrumento a dicha longitud de onda está dentro de los límites aceptables.

### Control de la Linealidad Fotométrica APTO PARA ESPECTROFOTÓMETROS, FOTOCOLORÍMETROS Y AUTOANALIZADORES

Definiciones: Capacidad de respuesta lineal de un espectrofotómetro a diferentes concentraciones de una sustancia que cumpla la ley de Beer.

Frecuencia del control: trimestral

**Fundamento:** El estudio de la linealidad fotométrica permite establecer el rango de absorbancias en el que el instrumento tiene respuestas proporcionales a los cambios de concentración (14-16).

#### Procedimiento

Se deberán medir las absorbancias de soluciones de concentraciones crecientes y contrastar dichos valores con los de referencia que figuran en los certificados correspondientes.

#### Seleccionar la temperatura de trabajo.

Seleccionar la longitud de onda: se realiza a las mismas longitudes de onda utilizadas para el control de exactitud fotométrica.

Realizar un blanco con agua destilada. Realizar todas las medidas por duplicado.

#### Resultados

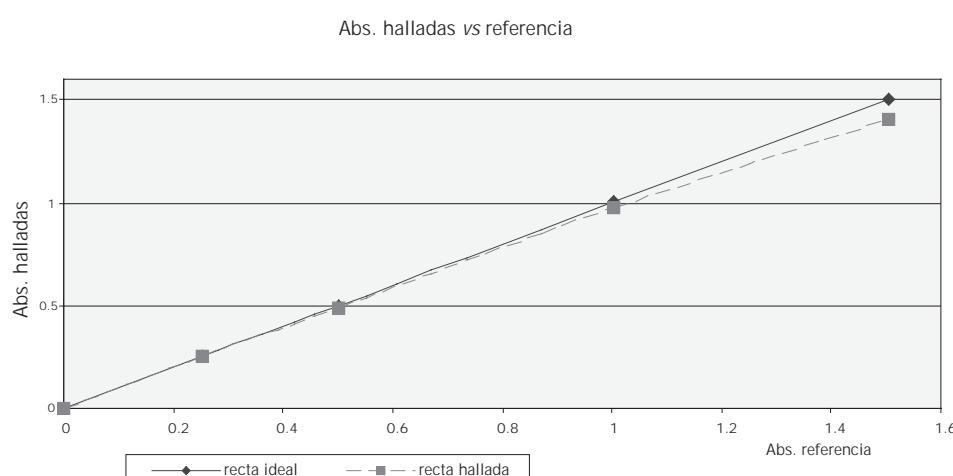
Graficar las absorbancias promedio halladas (eje y) en función de las absorbancias de referencia (eje x). Se obtendrá un gráfico del siguiente tipo:

#### Ejemplo:

Longitud de onda: 340 nm

Temperatura: 25 °C

Solución	Abs. hallada	Abs. referencia
Agua	0,000	0,000
A	0,249	0,251
B	0,489	0,502
C	0,980	1,004
D	1,426	1,506



Para el cálculo de la Linealidad fotométrica se deberá realizar un estudio de regresión lineal de la recta hallada:

$$Y = a + b X$$

Donde  $b$  es la pendiente de la recta y  $a$  la ordenada al origen. La pendiente  $b$  representa la Linealidad fotométrica. La recta ideal sería  $Y = X$  por lo cual la pendiente ideal es 1,00 que indica que el instrumento responde linealmente en el rango de absorbancias estudiadas.

Por el método de cuadrados mínimos se deberán calcular  $a$  y  $b$ .

Hay calculadoras científicas o programas de computación (tipo Excel) que permiten, incorporando los 4 datos de absorbancias halladas y los 4 de absorbancias verdaderas realizar una regresión lineal y calcular dichos valores.

#### Límites de aceptabilidad:

Pendiente ideal: 1,00

Pendiente óptima: entre 0,98 y 1,02

Pendiente aceptable: entre 0,97 y 1,03

En el ejemplo anterior, si se realiza el estudio de cuadrados mínimos la ecuación obtenida es:

$$Y = 0,95X + 0,009$$

Por lo tanto la pendiente de la recta es 0,95 (error - 5%), y no se encuentra dentro de los límites aceptables para el rango de absorbancias estudiadas (A1-A4).

En dicho caso se podría estudiar la Linealidad hasta el tercer punto, es decir considerando solo las absorbancias A, B y C. La ecuación obtenida es:

$$Y = 0,975 X + 0,001$$

La pendiente se encuentra dentro de los límites aceptables.

Conclusión: El instrumento se comporta linealmente hasta absorbancias aproximadamente iguales a 1.000 UA (C). Este instrumento no debería usarse para leer absorbancias mayores a este valor, ya que pierde sensibilidad de respuesta ante aumentos en la concentración.

#### Control de la presencia de luz parásita

APTO PARA ESPECTROFOTÓMETROS,  
FOTOCOLORÍMETROS Y AUTOANALIZADORES

Definición: Se denomina luz parásita 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.

Fundamento: este control se basa en la medida del porcentaje de transmitancia de una solución de nitrato de sodio 50 g/L. Esta sustancia tiene la propiedad de que sus soluciones absorben toda la radiación incidente de longitudes de onda menores a los 390 nm, por lo que se la denomina ópticamente opaca a la luz. Por lo tanto, la transmitancia a 340 nm de esta solución debe ser igual a cero y toda transmitancia detectada se corresponde con luz parásita (17-20).

#### Materiales necesarios

Solución de NaNO<sub>2</sub> 50 g/L

#### Procedimiento

- Temperatura de trabajo: La transmitancia de la solución es independiente de la temperatura entre 10 y 40 °C
- Longitud de onda: 340 nm

Realizar un blanco con agua destilada. Realizar las medidas por duplicado.

Si el instrumento permite medir transmitancias, realizar directamente la medición de la transmitancia de la solución calibrando el 100 % T con agua destilada.

#### Resultados

El valor de transmitancia porcentual es definido como la luz parásita existente en la zona espectral.

Luz parásita = TRANSMITANCIA % = 10<sup>(2 - absorbancia)</sup>

Ejemplo:

Absorbancia = 2.300 UA corresponde una T % = 0,5%

#### Límites de aceptabilidad:

Luz parásita óptima: T% menor del 0,5%.  
(absorbancia mayor a 2.300 UA).

Luz parásita aceptable : menor del 1%.  
(absorbancia mayor a 2.000 UA)

Nota: Puede suceder que la absorbancia leída supera el valor máximo de registro del instrumento. Por ejemplo, hay muchos aparatos que no pueden leer absorbancias superiores a 2.000 UA y al superar este valor el instrumento no indica lecturas o indica error. En estos casos sólo podrá calcular el%T reemplazando en la fórmula anterior la absorbancia por el valor máximo que lee el instrumento:

**Ejemplo:**

Absorbancia leída a 340 nm: supera el límite de 2.000 UA del espectrofotómetro. Esto significa que la absorbancia es mayor que 2.000 UA. En este caso:

$$\%T = 10^{(2-A)} = 10^{(2-2)} = 10^0 = 1,0\%$$

Por lo tanto, el %T, o sea, la luz parásita presente es menor al 1,0% cuando la absorbancia es mayor que 2.000 UA.

### Control de la Precisión Fotométrica

#### APTO PARA ESPECTROFOTÓMETROS, FOTOCOLORÍMETROS Y AUTOANALIZADORES

**Definición:** Se denomina precisión fotométrica a la medida de la dispersión de una serie de mediciones de transmitancia o absorbancia alrededor de la media y se expresa como coeficiente de variación porcentual (21).

**Materiales necesarios:** se puede utilizar cualquier solución, ya que no es necesario conocer el valor de la absorbancia. Sólo se necesita que la absorbancia de la solución permanezca estable en el tiempo.

**Por ejemplo:** se puede utilizar una solución de sulfato cúprico en medio ácido para 650 nm.

#### Procedimiento

- Longitud de onda: 650 nm o la más cercana (preferentemente superior) que el instrumento permita.
- Temperatura de trabajo: es preferible seleccionar la temperatura a la que habitualmente trabaja a esta longitud de onda.

Realizar un blanco con agua destilada y proceder a medir 10 veces la absorbancia de la solución de la siguiente manera:

- 1) Espectrofotómetros o fotocolorímetros manuales: cargar una cubeta con la solución y leer la absorbancia. Retirarla del portacubetas y volver a colocar la cubeta en la misma orientación, registrando nuevamente el valor de la absorbancia. Repetir el procedimiento hasta obtener 10 medidas.
- 2) Instrumentos con bomba de aspiración: realizar el blanco con agua. Aspirar la solución y registrar la absorbancia. Aspirar nuevamente y volver a registrar. Repetir hasta obtener 10 lecturas.
- 3) Autoanalizadores: cargar una copa de reacción con agua y leer el blanco. Retirar el agua y cargar la solución y leer la absorbancia. Volver a leer la absorbancia de la solución de la misma

copa de reacción 9 veces más para completar 10 lecturas.

Nota: el valor absoluto de la absorbancia de esta solución no es importante ya que no es una solución de referencia para determinar exactitud de la absorbancia, por lo que no se indica cuál es la absorbancia de referencia. Sólo es importante el valor del coeficiente de variación porcentual obtenido como índice de la imprecisión de las lecturas.

#### Resultados

Se tendrán 10 resultados de absorbancia.

Calcular la media aritmética X y la desviación estándar DE de dichas absorbancias.

Finalmente obtener el coeficiente de variación porcentual:

$$\text{Imprecisión Fotométrica} = \text{CV\%} = \frac{\text{DE} \times 100}{\text{X}}$$

#### Límites de aceptabilidad:

Precisión óptima: CV% menor de 0,5%

Precisión aceptable: CV% menor de 1%

**Ejemplo:** Se obtuvieron las siguientes lecturas del sulfato cúprico a 650nm:

0,224, 0,224, 0,225, 0,223, 0,225, 0,226, 0,223, 0,224, 0,227, 0,222.

La media de las 10 medidas es: X = 0,224

La desviación estándar será: DE = 0,0015

Por lo tanto, el CV% será:

CV\% = (0,0015/0,224) x 100 = 0,67%, que supera el límite óptimo pero sigue siendo aceptable.

### Control de la estabilidad Fotométrica

#### APTO PARA ESPECTROFOTÓMETROS, FOTOCOLORÍMETROS Y AUTOANALIZADORES

**Definición:** Se denomina estabilidad fotométrica a la capacidad del instrumento de mantener constante la absorbancia en función del tiempo.

Cuando se producen variaciones constantes y continuas hacia valores superiores o inferiores de absorbancia se habla de deriva fotométrica y cuando se producen variaciones al azar se está en presencia de ruido fotométrico.

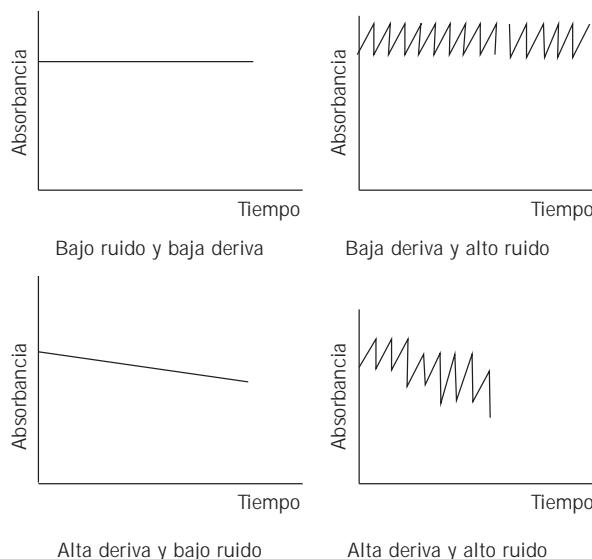


Figura - Estabilidad de la lectura, deriva y ruido.

#### Materiales necesarios

Solución de dicromato de potasio 50 g/L en medio perclórico (0,001 N)

#### Procedimiento

- Longitud de onda: 340 nm.
- Temperatura de trabajo: es preferible seleccionar la temperatura a la que habitualmente se trabaja a esta longitud de onda.

#### Espectrofotómetros o fotocolorímetros

Realizar un blanco con agua destilada.

Medir la absorbancia de la solución de dicromato.

En este momento poner en marcha un cronómetro y registrar la absorbancia cada 30 segundos durante 10 minutos sin variar ninguna condición de la medida. Por lo tanto, al cabo de 10 minutos se tendrán 21 valores.

#### Autoanalizadores:

Cargar una copa de reacción con agua y leer el blanco. Retirar el agua y cargar la solución de dicromato y leer la absorbancia. Volver a leer la absorbancia de la solución de la misma copa de reacción cada 30 segundos durante 5 minutos. Se tendrán así 11 valores.

Nota: en equipos automáticos se estudia la estabilidad en un menor tiempo de acuerdo a sus características de trabajo.

#### Resultados

Se graficarán los 21 valores de absorbancia en función del tiempo determinando si existe deriva o ruido fotométrico

Cálculo de la deriva: este parámetro se define como la pendiente de la curva de absorbancia vs tiempo y se expresa como porcentaje del valor inicial de absorbancia.

Ejemplo: Se obtuvieron las siguientes medidas: 0,400, 0,400, 0,401, 0,401, 0,400, 0,401, 0,401, 0,402, 0,402, 0,402, 0,403, 0,403, 0,402, 0,403, 0,404, 0,404, 0,403, 0,404, 0,405, 0,405.

Si se supone un ruido despreciable, el valor de la deriva será:

$$\text{deriva} = \frac{(\text{Abs final} - \text{Abs inicial})}{\text{Abs inicial}} \times 100$$

$$\text{deriva} = \frac{(0,405 - 0,400)}{0,400} \times 100 = 1,25\%$$

Cálculo del ruido: este parámetro se calcula como la dispersión de los valores alrededor del valor medio de absorbancia multiplicando por 100 para expresar como porcentaje. En el caso que la deriva sea despreciable se calcula como:

$$\text{ruido} = \frac{\text{desviación estándar}}{\text{Abs media}} \times 100 = \frac{0,00155 \times 100}{0,4023} = 0,38\%$$

#### Límites de aceptabilidad:

Estabilidad óptima: ruido + deriva menor de 0,5%

Precisión aceptable: ruido + deriva menor de 1%

## ANEXO A

### MEDICIÓN DE ABSORBANCIAS

#### Espectrofotómetros y fotocolorímetros manuales

1. Encender el espectrofotómetro antes de realizar la prueba teniendo en cuenta el tiempo de termostatización recomendado por el fabricante.
2. Seleccionar la longitud de onda de trabajo. Si tiene un fotocolorímetro seleccione el filtro más próximo a la longitud de onda indicada.
3. Seleccionar la temperatura de trabajo.
4. Elegir una cubeta en buen estado (sin deformaciones ni suciedad)
5. Llevar a cero de absorbancia con agua destilada.
6. Vaciar la cubeta y enjuagarla con una pequeña porción de la solución a medir para evitar arrastre.
7. Cargar la cubeta con la solución y leer la absorbancia por duplicado informando la absorbancia promedio.
8. Si se debe medir más de una solución, enjuagar la cubeta con una porción de la solución antes de medir y leer como en el paso 7. Tener la precaución de empezar siempre por la solución más diluida.

#### Espectrofotómetros y fotocolorímetros con bomba de aspiración

1. Encender el espectrofotómetro antes de realizar la prueba teniendo en cuenta el tiempo de termostatización recomendado por el fabricante.
2. Seleccionar la longitud de onda de trabajo. Si se tiene un fotocolorímetro seleccionar el filtro más próximo a la longitud de onda indicada
3. Seleccionar la temperatura de trabajo.

4. Llevar a cero de absorbancia con agua destilada. Aspirar aire.
5. Aspirar la solución a medir y registrar el valor. Aspirar aire y repetir la operación con la misma solución. Calcular la absorbancia promedio.
6. Si se debe medir más de una solución aspirar aire entre muestra y muestra. Repetir el paso 5.

#### Autoanalizadores y equipos automáticos

1. Consultar el manual del fabricante para seleccionar la función o *test* que le permita medir absorbancias absolutas.
2. Seleccionar el filtro de longitud de onda más cercano a la longitud de onda de trabajo
3. Seleccionar la temperatura de trabajo.
4. Realizar un blanco con agua destilada y proceder a la medición de la absorbancia de la/s solución/es por duplicado.

En caso que el camino óptico de la celda de medición no sea de 1 cm realizar la corrección que corresponda para normalizar la absorbancia a 1 cm de paso de luz. El factor a utilizar en dichos casos será:

$$\text{Abs. normalizada} = \frac{\text{Abs. leída}}{\text{Camino óptico de la celda (en cm)}}$$

Frecuencia recomendada para las distintas propiedades fotométricas

El cronograma recomendado para el control de las distintas propiedades fotométricas es el siguiente:

	Mensual	Trimestral	Semestral
Precisión	X		
Linealidad		X	
Exactitud	X		
Longitud de onda			X
Luz parásita		X	

## ANEXO B

### PREPARACIÓN DE SOLUCIONES DE REFERENCIA PARA CONTROL ESPECTROFOTOMÉTRICO

Preparación de soluciones de dicromato de potasio en ácido perclórico 0,001N para el control de linealidad fotométrica en el UV

a) Materiales necesarios

- Dicromato de potasio calidad espectrofotométrica
- Ácido perclórico concentrado (69 - 72%)
- Agua bidestilada

b) Secado del dicromato de potasio

Colocar en estufa a 105 °C durante 2 h. Colocar en desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y pesar. Volver a 105 °C durante 1 hora más y repetir la pesada. Continuar hasta lograr peso constante. Dejar en desecador hasta el momento de ser usado.

c) Preparación de solución de ácido perclórico 1 N

Llenar hasta aproximadamente la mitad un matraz de 100 mL con agua bidestilada. Agregar 8,4 mL de ácido perclórico concentrado (70%). Completar hasta el enrase con agua bidestilada.

d) Preparación de las soluciones de dicromato de potasio en ácido perclórico 0,001 N

Se deberán preparar 5 soluciones de las siguientes concentraciones: 25, 50, 100, 150 y 200 mg/L.

- Preparación de solución de 25 mg/L:

- Pesar en balanza analítica con precisión de 0,1 mg, 25,0 mg de dicromato de potasio previamente secado.
- Llenar un matraz de 1 litro con agua bidestilada aproximadamente hasta la mitad.
- Trasvasar cuantitativamente el dicromato de potasio pesado a dicho matraz, arrastrando cualquier resto con agua bidestilada.
- Agregar 1 mL de solución de ácido perclórico 1 N (preparada en B).
- Completar hasta el enrase con agua bidestilada.
- Agitar por inversión hasta disolución total.
- Almacenar en frascos de vidrio color caramelo y en la oscuridad. Estable por lo menos 6 meses.

- Preparación de las soluciones 50, 100, 150 y 200 mg/L:

Proceder de la misma manera que en el caso anterior, pesando cada vez la cantidad que corresponda a cada solución con precisión de 0,1 mg.

Preparación de solución de nitrito de sodio 50 g/L para control de presencia de luz parásita

a) Materiales necesarios

- Nitrito de sodio calidad analítica
- Agua bidestilada

b) Secado del nitrito de sodio

Colocar en estufa a 105 °C durante 2 h. Colocar en desecador hasta que alcance la temperatura ambiente y pesar. Volver a 105 °C durante 1 hora más y repetir la pesada. Continuar hasta lograr peso constante. Dejar en desecador hasta el momento de ser usado.

c) Preparación de la solución de 50 g/L

- Pesar en balanza analítica con precisión de 0,1 mg, 50 g de nitrito de sodio previamente secado.
- Llenar un matraz de 1 litro con agua bidestilada aproximadamente hasta la mitad.
- Trasvasar cuantitativamente el nitrito de sodio pesado a dicho matraz, arrastrando cualquier resto con agua bidestilada.
- Completar hasta el enrase con agua bidestilada.
- Agitar por inversión hasta disolución total.

### MÉTODO DEL PUNTO ISOSBÉSTICO PARA EL CONTROL DE LA EXACTITUD DE LA LONGITUD DE ONDA

Preparación de la solución de Rojo Congo

a) Materiales necesarios

- Rojo Congo calidad analítica
- Agua bidestilada

b) Secado del Rojo Congo

Colocar el colorante en estufa a 70 °C la noche anterior a la preparación de la solución. Retirar de la estufa y colocar en desecador hasta que alcance la temperatura ambiente antes de pesar.

c) Preparación de la solución de Rojo Congo 14 mg/L

- Pesar en balanza analítica con precisión de 0,1 mg, 14,0 mg de Rojo Congo previamente secado.
- Llenar un matraz de 1 litro con agua bidestilada aproximadamente hasta la mitad.
- Trasvasar cuantitativamente el Rojo Congo pesado a dicho matraz, arrastrando cualquier resto con agua bidestilada.
- Completar hasta el enrase con agua bidestilada.
- Agitar por inversión hasta disolución total.

- Almacenar en frascos de vidrio color caramelo y en la oscuridad.

#### Procedimiento

- a) Materiales necesarios
  - Solución de Rojo Congo 14 mg/L
  - NaOH 5 N
  - HCl 5 N
- b) Preparación de las soluciones ácida y básica del colorante
  - Colocar en sendos tubos de ensayo 10 mL de la solución de Rojo Congo con una pipeta de doble aforo.
  - Agregar a uno de los tubos 20 uL de NaOH 5 N (solución básica). Mezclar por inversión.
  - Agregar al otro tubo 20 uL de HCl 5 N (solución ácida). Mezclar por inversión.
  - Dejar ambas soluciones en reposo 10 minutos.
  - Realizar el barridopectral antes de las 2 h.
- c) Realización del barrido espectral de las soluciones ácida y básica
  - Utilizar agua destilada como blanco, llevando a cero de absorbancia a 530 nm.
  - Leer las absorbancias del blanco entre 530 y 550 nm.
  - Sin modificar el cero, realizar el mismo barrido con las soluciones ácida y básica.

- Restar a cada absorbancia en cada longitud de onda, la lectura correspondiente al blanco de agua destilada.
- Graficar absorbancia en función de la longitud de onda para ambos espectros.
- Determinar la longitud de onda correspondiente al punto de corte de ambos espectros (punto isosbético)

Preparación de soluciones de cobalto para el control de linealidad fotométrica en el visible

El color de las soluciones de cobalto es debido al ion  $\text{Co}(\text{H}_2\text{O})_6^{+2}$ , cuyo máximo de absorción se encuentra en 512 nm. Las soluciones se preparan por disolución de la cantidad necesaria de una sal de cobalto (II), (nitrato, sulfato) que contenga entre 3 y 12 g de  $\text{Co}^{+2}$ .

Disolver la cantidad de sal pesada en aproximadamente 500 mL de agua destilada. Agregar 12 mL de ácido sulfúrico y llevar a 1 litro con agua destilada.

Las absorbancias a las longitudes de onda a controlar se deben asignar contra soluciones de referencia con valores de absorbancia certificados (NIST SRM 931) en un espectrofotómetro de referencia. Para esto se establecerá un protocolo para la asignación de valores de absorbancia en función de la temperatura de medición, ya que el coeficiente de extinción del ion Co(II) es dependiente de la temperatura entre 20 y 37 °C.

## Referencias bibliográficas

1. Murali Dharan. Control de calidad de instrumentos y equipamientos de laboratorio. En: Murali Dharan. Control de Calidad en las Laboratorios Clínicos. Madrid: Ed. Reverte S.A; 1980. p. 145-62.
2. Rand RN. Practical spectrophotometric standards. *Clin Chem* 1969; 15 (9): 839-63.
3. Frings CS, Broussard LA. Calibration and monitoring of spectrometers and spectrophotometers *Clin Chem* 1979; 25 (6): 1013-7.
4. Ellis K, Morrison J. Some sources of errors and artifacts in spectrophotometric measurements. *Clin Chem* 1976; 21(6): 776-7.
5. Francini C, Cattozzo G. La spettrofotometria in Biochimica Clinica: Verifica delle caratteristiche di tre spettrofotometri doppio raggio: esperienza pratica. *Biochimica Clinica* 1988; 12: 420-26.
6. American Society for Testing and Materials. Standard Practice for Describing and Measuring Performance of Ultraviolet, Visible, and Near-Infrared Spectrophotometers. ASTM Designation: E 275-93; 1993.
7. Alman D, Billmeyer F. A review of wavelength calibration methods for visible- range photoelectric spectrophotometers. *J Chem Educ* 1975; 52 (5): 510-5.
8. Hoxter G. Suggested Isosbestic wavelength calibration in clinical analyses. *Clin Chem* 1979; 25 (1), 143-6.
9. American Society for Testing and Materials. Standard Practice for the Periodic Calibration of Narrow Band-Pass Spectrophotometers. ASTM Designation: E 925-83; 1994.
10. National Bureau of Standards. Standard Reference Material 935 a: Crystalline Potassium Dichromate for Use as an Ultraviolet Absorbance Standard. 2000.
11. National Institute of Standards & Technology. Standard Reference Material 931f: Liquid Absorbance Standard for Ultraviolet and Visible Spectrophotometry. 1999.
12. National Bureau of Standards. NBS Special Publication 260-54. Standard Reference Materials: Certification and use of Acidic Potassium Dichromate Solutions as an Ultraviolet Absorbance Standard - SRM 935. Nat. Bur. Stand. (U.S.). Spec Publ 260-54. 1977.
13. Zijlstra WC. Standardization of hemoglobinometry. The extinction coefficient of hemiglobincyanide. *Clin Chem Acta* 1960; 5: 719-26.
14. Vanderlinde R, Richards A, Kowalski P. Linearity and accuracy of ultraviolet and visible wavelength photometers: an interlaboratory survey. *Clin Chim Acta* 1975; 61: 39-46.
15. Frings C, Muscat V, Waldrop N. Convenient method for checking detector response of spectrophotometers at three wavelengths. *Clin Chem* 1976; 22 (1): 101-2.
16. Bowers G, Mc Comb R, Christensen R, Schaffer R. High purity 4-nitrophenol: purification, characterization and specifications for use as a spectrophotometric reference material. *Clin Chem* 1980; 26 (6): 724-9.
17. Kaye W. Stray light ratio measurements. *Anal Chem* 1981; 53 (14): 2201-6.
18. Beeler M, Lancaster R. CAP Survey to assess the extent of stray light problems in precision spectrophotometry. *Am J Clin Pathol* 1975; 63: 953-79.
19. Sharpe M. Stray light in UV-VIS spectrophotometers. *Anal Chem* 1984; 56 (2): 339-56.
20. National Bureau of Standards. Standard Reference Material 2032: Crystalline Potassium Iodide. Heterochromatic Stray Radiant Energy Standard for Ultraviolet Absorption Spectrophotometry. 1979.
21. Korzum W, Miller W. Monitoring the stability of wavelength calibration of spectrophotometers. *Clin Chem* 1986; 32 (1): 162-5.