

PRIMER PRUEBA INTERLABORATORIO NACIONAL PARA LA EVALUACIÓN DE TAMAÑO DE PARTICULA EN EL ORDEN DE NANOMETROS UTILIZANDO EL MICROSCOPIO ELECTRONICO DE BARRIDO (MEB)

J. Juárez, F. Martínez, F. Rosas
Centro Nacional de Metrología - División Cerámicos
km 4,5 Carretera a Los Cués Municipio El Marqués, A.P. 1-100 Querétaro, México
Tel. Fax: 211-05-00, jjuares@cenam.mx

RESUMEN

En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos en la prueba interlaboratorio organizada por la División de Materiales Cerámicos para evaluar el diámetro promedio de partícula en el orden de nanómetros de esferas de poliestireno. Se mencionan los puntos que deben ser cubiertos para la organización de tal tipo de pruebas y lo más importante, la utilización de un material de referencia caracterizado por medio de una microsonda analítica (MA), un microscopio electrónico de barrido (MEB) y un equipo de dispersión láser. Dicha prueba se dirigió a todos los laboratorios del país. El criterio de evaluación utilizado se basa en el *error cuadrático medio* (ECM), el cual es una estimación de la incertidumbre del laboratorio para cada medida reportada; éste involucra la variabilidad de los resultados y el sesgo del promedio con respecto al valor de referencia. El ECM proporciona una indicación del estado real de las mediciones, suponiendo que una medición perfecta tiene sesgo = 0 y desviación estándar = 0.

Con esta prueba de interlaboratorio se cumple con uno de los objetivos principales del CENAM, el cual es el desarrollo de MRC y disseminación de sus exactitudes; por otra parte, se intenta conocer la capacidad de medición de los laboratorios participantes en su desempeño en mediciones de alta complejidad, demandada cada vez y con mayor intensidad, debido al avance ininterrumpido de la tecnología en este ramo, se alcance y se demuestre en las pruebas a las que voluntariamente se someten, demostrando que se pueden desarrollar y efectuar mediciones cuantitativas micro dimensionales de la más alta exactitud en el país.

1. INTRODUCCIÓN

La microscopía electrónica de barrido en México ha crecido considerablemente en los últimos años. La información recopilada con el MEB es de gran ayuda, ya que la técnica tiene una resolución práctica de 4 nm a 100 nm (dependiendo del tipo de muestra a analizar). Por otra parte y no limitativa, el MEB nos ayuda a caracterizar la morfología (tamaño, forma y distribución) de las fases presentes en casi cualquier tipo de material (acero, nuevos materiales cerámicos, compuestos inorgánicos, muestras biológicas, etc.). Los laboratorios que realizan estas observaciones necesitan evaluar de manera objetiva la calidad de sus mediciones. La participación en pruebas interlaboratorio es una herramienta de gran utilidad para este fin.

El presente ejercicio consistió en evaluar a cada laboratorio mediante la determinación del diámetro promedio de partícula de un mismo material

(emulsión de poliestireno) de acuerdo a condiciones establecidas (protocolo o método de prueba). Dicha prueba se dirigió a todos los laboratorios del país. El número de laboratorios inscritos fue de diez. Los resultados permitirán a cada laboratorio evaluar su desempeño y llevar a cabo mejoras en sus procedimientos de medición. El criterio de evaluación utilizado se basa en el error cuadrático medio ECM, mediante la siguiente ecuación [1]:

$$ECM_{rel} = \sqrt{\left(\frac{s}{\mu}\right)^2 + \left(\frac{b}{\mu}\right)^2} \quad (1)$$

s = desviación estándar

b = sesgo

μ = incertidumbre estándar material de referencia

Y el sesgo (b) se determina de la siguiente forma:

sesgo = valor de referencia – valor obtenido

La caracterización de partículas nanométricas va tomando mayor relevancia en los procesos industriales. A manera de ejemplo, en la industria minera-metalúrgica conforme los procesos son mejorados (refinados) y las partículas disminuyen en tamaño, se requieren técnicas que nos permitan caracterizar estos finos con el propósito de entender los efectos y la eficiencia de un proceso en particular. Para este caso, la información recopilada con el MEB es de gran ayuda por la alta resolución que se alcanza [2, 6].

De igual manera en el campo del análisis ambiental, la caracterización de partículas suspendidas en aire inferior a 2,5 µm se vuelve cada vez más crucial, de hecho recientes estudios demuestran que conforme el tamaño de la partícula es menor, el daño al sistema respiratorio es mayor. Así también, estas partículas tienen un gran potencial para acelerar reacciones de ozonólisis [3, 4, 5].

En fin, recientemente y ante la necesidad de evaluar una característica física esencial del cemento como lo es la distribución de tamaño de partícula (DTP) se han realizado pruebas "round robin" con el fin de identificar y proponer métodos normalizados, se conoce que la DTP del cemento esta muy relacionada con sus propiedades por lo tanto, dichos estudios han incluido los métodos de difracción láser, sensor eléctrico (Coulter), mallas y MEB [6].

Frecuentemente, mediciones realizadas en materiales presuntamente idénticos, bajo condiciones similares, no proporcionan resultados idénticos. Esto se atribuye a los errores aleatorios que son inherentes en cualquier proceso de medición y que solo pueden ser controlados parcialmente; sin embargo, otros factores que también contribuyen a la variabilidad son los llamados errores sistemáticos, los cuales pueden tener diversas causas, por ejemplo:

- a) El operador.
- b) Estabilidad del equipo utilizado.
- c) Calibración de la escala de amplificación.
- d) Condiciones ambientales (temperatura, humedad, etc.).
- e) Malas prácticas de laboratorio.

En cada laboratorio, estos factores influyen en forma diferente.

Las pruebas interlaboratorio permiten, entre otras ventajas:

1. Evaluar el desempeño de los laboratorios participantes para realizar pruebas específicas de medición y en caso de programas constantes de pruebas, para monitorear su desempeño.
2. Identificar problemas técnicos en los laboratorios e iniciar acciones correctivas.
3. Comparar la variabilidad de los resultados del laboratorio contra la obtenida por otros participantes, motivando de esta manera, programas de mejora continua.
4. Establecer la efectividad y comparabilidad entre nuevos métodos de medición.
5. Proporcionar una confianza adicional a los clientes de los laboratorios.

La participación en este tipo de pruebas es una alternativa eficaz que provee la evidencia necesaria de la calidad de los resultados emitidos por el laboratorio.

Actualmente, esta evidencia es un requisito indispensable para la acreditación de acuerdo con la norma NMX-EC-17025-IMNC-2000, en su sección 5.9 "Aseguramiento de la calidad de los resultados de calibración y prueba".

Este ejercicio se ha llevado a cabo de acuerdo a las recomendaciones de la siguiente norma internacional:

- ISO/IEC Guide 43-1-1997 "*Proficiency testing by interlaboratory comparisons. Part 1: Development and operation of proficiency testing schemes*".

Asimismo, se contó con las recomendaciones dadas en las siguientes normas ASTM:

- ASTM E 691-99. "*Standard Practice for Conducting an Interlaboratory Study to Determine the Precision of a Test Method*".
- ASTM E 1301-95. "*Proficiency Testing Programs by Interlaboratory Comparisons*".

2. DESARROLLO

El programa general se dividió en cuatro etapas:

- 1) Preparación del material.
- 2) Distribución de las muestras.
- 3) Análisis del tamaño de partícula en cada laboratorio.
- 4) Informe de resultados.

Preparación y caracterización de la muestra

La emulsión original empleada para el estudio es de un material polimérico, preparada por una empresa mexicana. Se utilizó la técnica de espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FT-IR) para efectuar la caracterización química cualitativa del material.

La morfología del material de la muestra se observó por MEB las imágenes se obtuvieron con electrones secundarios, como la que se muestra en la figura 1, la cual consiste de esferas de poliestireno.

El lote de material se preparó al 1% en volumen de la emulsión original. El lote consistió en el llenado de 100 botellas, y mediante un muestreo aleatorio estratificado; para llevar a cabo el estudio de homogeneidad se tomaron solo diez botellas identificadas con los números 1, 18, 23, 37, 48, 51, 64, 76, 84 y 100.

Se utilizó el equipo Mastersizer X para llevar a cabo el estudio de homogeneidad, dicho equipo se encuentra dentro de un programa de mantenimiento anual que tiene incluida la verificación de operación del mismo, utilizando microesferas de polímero (proveedor Duke Scientific Corporation) con diámetro medio de 1 μm , 8,9 μm y 39,6 μm . Así mismo, la secuencia de medición incluyó la medición de la distribución de tamaño de partícula de la retícula de verificación LV-40.0-1.2-0.025 y del diámetro medio del material de referencia SRM 1690 (esferas de poliestireno con diámetro nominal de 1 μm). Se realizaron mediciones de las muestras por triplicado durante tres días. El resultado del estudio de homogeneidad realizado con el método basado en la difracción láser, indica que el material es homogéneo (la prueba estadística aplicada a los resultados de medición indicó que no hay una diferencia significativa dentro y entre las botellas).

Se realizaron mediciones del diámetro promedio de las esferas de poliestireno por el método basado en microscopía. Una pequeña gota de la emulsión se colocó sobre la cinta de grafito, se secó a las condiciones ambientales de laboratorio y posteriormente se recubrió con una fina capa de oro-paladio (se montaron diferentes gotas en 10 muestras aleatoriamente estratificadas).

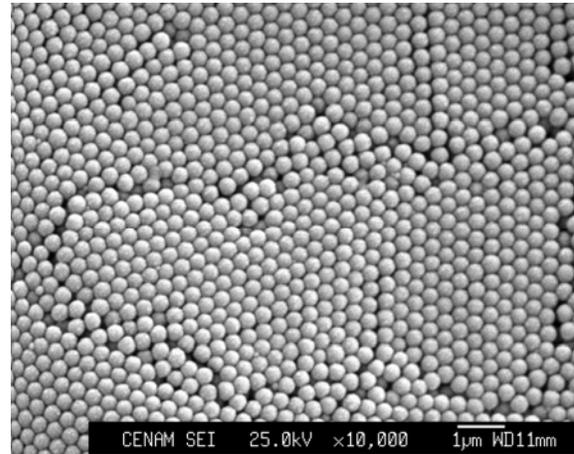


Figura 1. Imagen obtenida con electrones secundarios de la muestra utilizada en la prueba, 10000X.

Las imágenes de la muestra se adquirieron en la supersonda JXA-8200 bajo las condiciones de 10000X de amplificación, voltaje de aceleración 25 kV, distancia de trabajo de 11 mm y corriente del haz de 1×10^{-10} A. Posteriormente y con ayuda del analizador de imágenes Scion Image™ se midió el diámetro de 400 partículas en píxeles. La calibración del analizador de imágenes y la obtención del factor de conversión $\mu\text{m}/\text{píxeles}/\mu\text{m}$ se calculó utilizando el material de referencia certificado SRM 1690 (valor de referencia 0,895 $\mu\text{m} \pm 0,008 \mu\text{m}$). Finalmente se obtuvo el valor de las mediciones (valor de referencia 0,376 μm) y se procedió a el cálculo de incertidumbre combinada con $K = 2$, (0,030 μm).

Participantes

El número de instituciones que declararon su disposición a participar en la prueba interlaboratorio fue de diez, todos ellos utilizando microscopía electrónica de barrido, utilizando equipos de diferentes marcas (JEOL; TOPCON, PHILIPS, CAMECA). En la tabla 1 se muestra la información solicitada y recopilada de los laboratorios participantes con el fin de conocer el estado de sus mediciones y de la calidad de ellas.

Tabla 1. Información recopilada en el cuestionario.

Lab.	MRC del Lab.	Valor certificado del MR	Incertidumbre	Sistema de Calidad Acreditado
4422	---	---	---	No
0193	---	1 μm	---	No
9648	MRS-3XY. Lote #1080730	2 μm	$\pm 0,083 \mu\text{m}$	Sí
4875	---	---	---	No
3827	Aldrich Cat. 46, 172-5	0,554 μm	---	No
1215	Portaobjetos para MET	---	---	No
0088	Rejilla de calibración	1 μm	---	No
0004	---	---	---	No
2451	---	---	---	No

3. RESULTADOS

En la tabla 2 se observan los resultados de las mediciones realizadas a las partículas por cada participante y la figura 2 muestra los resultados graficados. El coeficiente de variación (CV) es igual a la desviación estándar entre el valor promedio de la medición por 100, este nos indica la variabilidad de las mediciones por el laboratorio sin tomar el cuenta el número de mediciones, en esta prueba nos indica la variación en porcentaje probable del diámetro de las esferas, repetibilidad y reproducibilidad de las mediciones, entre otros aspectos.

Para la evaluación del desempeño de los laboratorios se utilizó el criterio del error cuadrático medio relativo (ECM_{rel}) calculado con la ecuación 1, ésta es solamente una propuesta de evaluación ya que cada laboratorio tiene requisitos particulares de calidad y en este ejercicio no se realizó ningún consenso para establecer criterios de aceptación o rechazo de resultados.

Para la construcción de tabla y gráfica de ECM_{rel} se utilizaron los valores de desviación estándar y sesgo, divididos por la incertidumbre del valor de referencia, esto facilita la comparación entre laboratorios y permite realizar la comparación de su desempeño para cada analito, contra los valores de referencia (CENAM).

En la tabla 3, se han ordenado los laboratorios con respecto a sus valores de ECM relativo de menor a mayor, considerando que el desempeño es mejor para valores menores de ECM_{rel} .

Tabla 2. Resultados de los participantes en la prueba interlaboratorio.

Lab.	No. de partículas medidas	Promedio [μm]	Desviación estándar (s) [μm]	CV
4422	No reporta	0,334	0,02	6,0
3827	365	0,351	0,003	0,9
9648	411	0,375	0,04	10,7
0088	300	0,391	0,02	5,1
4875	395	0,360	0,03	8,3
1215	300	0,414	0,01	2,4
0193	314	0,382	0,02	5,2

En la gráfica de la figura 3, cada participante puede determinar la calidad de sus resultados localizando su posición por medio de su número de código. Los mejores resultados son los más cercanos al origen.

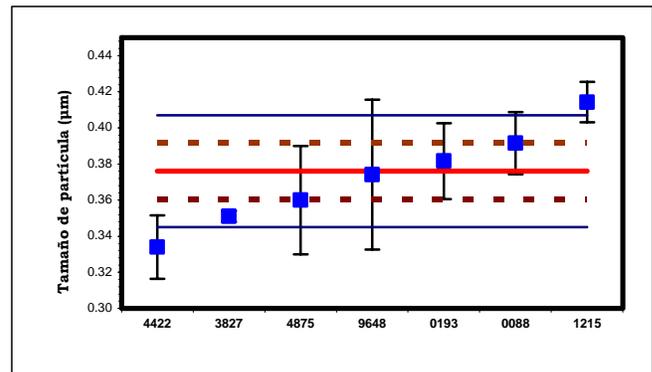


Figura 2. Gráfica del promedio de los resultados obtenido por los laboratorios, valor de referencia: 0,376 μm , incertidumbre estándar: 0,015 μm .

Tabla 3. Valores del $ECM_{relativo}$

Lab.	Sesgo (b) [μm]	s/ μ	b/ μ	$ECM_{relativo}$
0193	-0,006	1,4	0,4	1,4
0088	-0,015	1,1	1,0	1,5
3827	0,025	0,2	1,6	1,6
4875	0,016	1,9	1,0	2,2
9648	0,001	2,6	0,1	2,6
1215	-0,038	0,7	2,5	2,6
4422	0,042	1,1	2,7	2,9

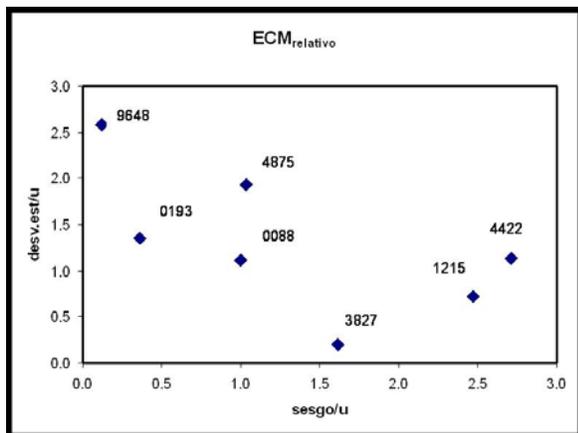


Figura 3. Gráfica del ECM_{rel} obtenido por cada laboratorio.

4. DISCUSIÓN

Debemos mencionar que algunas de las fuentes de error más comunes en las técnicas de caracterización de partículas por microscopía MEB son las siguientes:

Errores asociados con la preparación de la muestra

- Muestreo no representativo de la emulsión
- Una dispersión inapropiada o inadecuada de la emulsión durante la preparación de la muestra
- Aglomeración o fractura de partículas durante la preparación de la muestra
- Contaminación de la muestra/ introducción de artefactos durante la preparación de la muestra / almacenamiento
- Degradación de la muestra durante el almacenamiento

Errores asociados con la instrumentación/ equipo y el análisis de imágenes

- Calibración inapropiada de la magnificación del microscopio
- Operación del microscopio bajo parámetros menores a los ideales (p. e., voltaje de aceleración o corriente, de las lentes condensadoras, seleccionados muy alto o muy bajo, errores debido al astigmatismo)
- La superficie de la muestra se carga bajo el haz de electrones
- Calibración inapropiada del software/ hardware para análisis de imágenes
- Errores en el establecimiento del "threshold" de la escala de grises en las técnicas de análisis de imágenes
- Conteo inadecuado del número de partículas.

Errores debidos a factores humanos y otros factores

- Fatiga del operador
- Habilidad y experiencia del operador (en el uso de equipo y técnicas asociadas con el análisis)
- Falta de entendimiento de las capacidades y limitaciones del equipo y del software/hardware
- Errores debidos a un inadecuado o incorrecto análisis estadístico.

El entendimiento a fondo de estas fuentes de error, es esencial para poder identificar la ocurrencia de ellos y desarrollar procedimientos de trabajo que minimicen su impacto en los resultados finales.

3 de los 10 laboratorios registrados no entregaron sus resultados, algunos de ellos argumentaron problemas con sus equipos.

Se observa en la tabla 1 que la mayoría de los laboratorios no tienen un sistema de calidad acreditado. Solo uno de los laboratorios ha establecido el cálculo de incertidumbre para este tipo de medición.

El uso de patrones o materiales de referencia ha sido declarado y establecido por 4 de los laboratorios. Sin embargo, no se observa un uso adecuado de ellos para realizar correcciones a las mediciones o para estimar la incertidumbre.

Todos los laboratorios realizaron las mediciones del diámetro de partícula con los programas de análisis de imágenes integrados a sus equipos.

Si consideramos la variabilidad dentro de los laboratorios como el coeficiente de variación, se puede decir que se encuentra entre 1 y 11 %.

5. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente prueba interlaboratorio permitirán a cada laboratorio llevar a cabo mejoras en sus procesos de medición.

Por ejemplo el laboratorio 9648 obtiene un resultado similar al obtenido por el CENAM, sin embargo su cálculo de incertidumbre es muy alto.

Los laboratorios 1215 y 4422, deberían considerar el uso de materiales de referencia.

Es necesario continuar con este tipo de pruebas para la búsqueda de razones precisas de variabilidad en los resultados e involucrar a mayor número de laboratorios.

REFERENCIAS

- [1] Alvarez Rojas L, et al. Quality Assurance and TQM for Analytical Laboratories, Melbourne, Australia (1995).
- [2] Hagni Ann M., Fine Particle Characterization by Rietveld QXRD, CLM, and SEM-EDS Phase Mapping, JOM, December 2002, pp.24-26.
- [3] Bang J. J y Murr L. E., Collecting and Characterizing Atmospheric Nanoparticles, JOM, December 2002, pp.28-30.
- [4] VAM NEWS,
http://www.npl.co.uk/environment/fm_cs_three.html.
- [5] NOM-024-SSA1-1993, Salud Ambiental. Criterio para Evaluar la Calidad del Aire Ambiente con respecto a las Partículas Suspendidas Totales (PST). Valor Permisible para la Concentración de Partículas Suspendidas Totales en el Aire Ambiente como Medida de Protección a la Salud de la Población.
- [6] Ferraris Ch. F., Analysis of the ASTM Round Robin Test on Particle Size Distribution of Portland Cement: Phase II, December 2002.

: