

Laboratorio Química Analítica II

(Grado Química)

Lorenzo Sanjuan Navarro

Departamento Química Analítica

Correo: lorenzo.sanjuan@uv.es

Tutorías: enviar correo



■ Laboratorio Química Analítica II

Material laboratorio

- Bata
- Gafas protectoras
- Guantes
- Mascarilla
- Libreta
- Guion prácticas individual
- Móvil, tablet u ordenador
- Calculadora
- Bolígrafo



- Resto de material preferentemente en la taquilla de la Facultad (Si se deja en la taquilla del laboratorio, desinfectar antes y después).
- Desinfectar banco de trabajo y limpiar todo el material que tendrán en la bandeja antes y después de la práctica.
- No hacer cola para pesar, solo una balanza.

■ Laboratorio Química Analítica II

Estructura libreta laboratorio:

- MATERIAL, REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN
- PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL (Esquema de trabajo)
- CÁLCULOS PREVIOS
 - Preparación patrones
 - Curva calibrado
 - Preparación muestras
 - Cantidades iniciales a pesar ...
- DATOS EXPERIMENTALES EN EL LABORATORIO
- CÁLCULOS POSTERIORES
 - Recalcular concentraciones
 - Obtención curva calibrado
 - Cálculo concentraciones analito en la muestra
 - Aplicación de diluciones
- RESULTADOS Y CONCLUSIONES

■ Laboratorio Química Analítica II

Evaluación

Trabajo experimental y resultados: 70%

- Preparación de la práctica en la libreta:
 - Materiales, reactivos e instrumentación
 - Esquema experimental
 - Cálculos previos (preparación curva calibrado y muestras)
 - Cálculos posteriores y resultados
- Cuestiones previas y posteriores
- Trabajo en el laboratorio
- Entrega de informes (modelo de informes)

Examen: 30%

INFORME ANALÍTICO

1.- Información de la muestra

Fecha de recepción:

Fecha de análisis:

Referencia de la muestra:

Aspecto de la muestra:

Referencia del laboratorio:

Toma de muestra:

2.- Objetivo del análisis

3.- Metodología

Técnica analítica:

Instrumentación utilizada:

Método:

4.- Resultados

Muestra	Réplicas	Media	Desviación estándar
Referencia de la muestra	1*		
	2		
	3		

* (indicad si se ha rechazado algun valor y el criterio estadístico utilizado)

5.- Resultado final

$$\text{Media} \pm s / \sqrt{n}$$

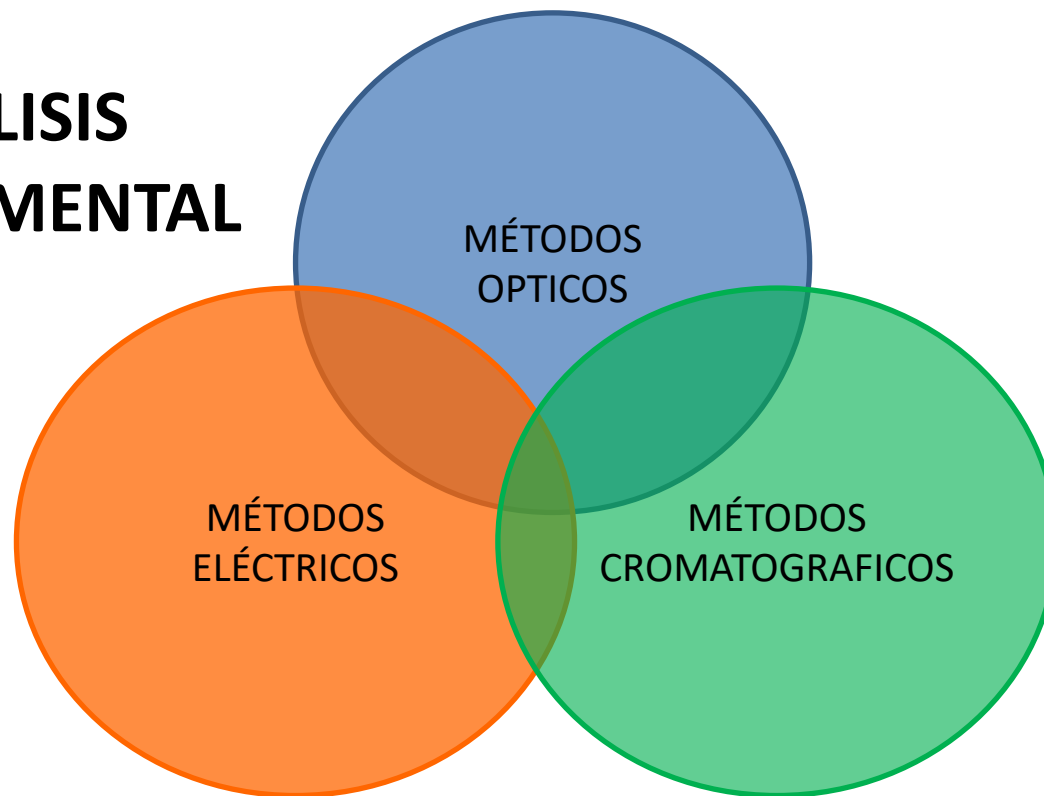
6.- Firma

7.- Anexos

- En su caso, incluir datos experimentales y tablas o figuras relativas al estudio de la influencia de variables. Discutir resultados.
- Incluir datos experimentales para la obtención de la curva de respuesta así como la ecuación de la recta (formato tabla)
- Indicar los datos relativos al tratamiento y medida de la muestra (masa de la muestra, diluciones efectuadas, señales medidas, concentración de las disoluciones de medida y contenidos en la muestra) en formato tabla.
- En su caso, justificar el rechazo de datos experimentales.
- Si se aplican dos procedimientos diferentes, seleccionar el más adecuado y justificar la elección mediante la aplicación de algún test estadístico.

Laboratorio Química Analítica II

ANÁLISIS INSTRUMENTAL



Estudio de variables experimentales (variables instrumentales)



Mejora de procedimientos existentes

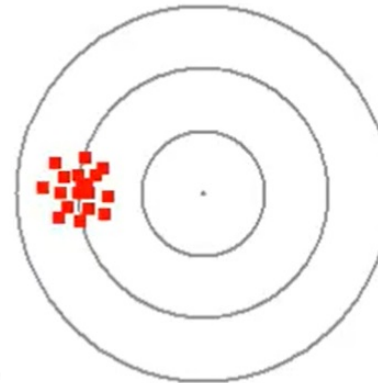
MÉTODO DE ANÁLISIS

*Miniaturización de técnicas
Empleo de nuevos (nano)materiales
Desarrollo de sistemas de medida in-situ
....*

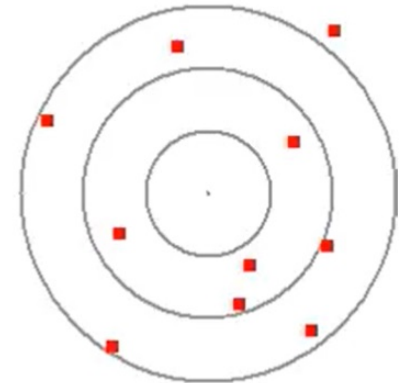
- **RECORDATORIO CALIBRACIÓN**



ERRORES SISTEMÁTICOS



Error sistemático



Error aleatorio



MODELO DE CALIBRACIÓN, ¿ES ADECUADO PARA NUESTRA MUESTRAS?

Calibración externa

Método de adición estándar

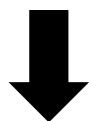
Calibración con patrón interno

• RECORDATORIO CALIBRACIÓN

CALIBRACIÓN EXTERNA

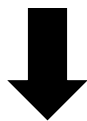
Preparación de patrones

Medida de la señal analítica para patrones



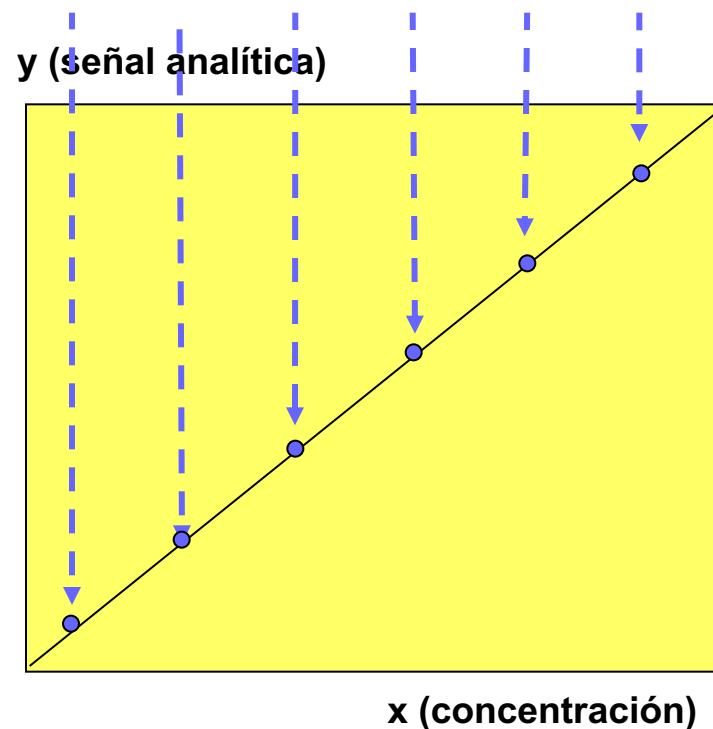
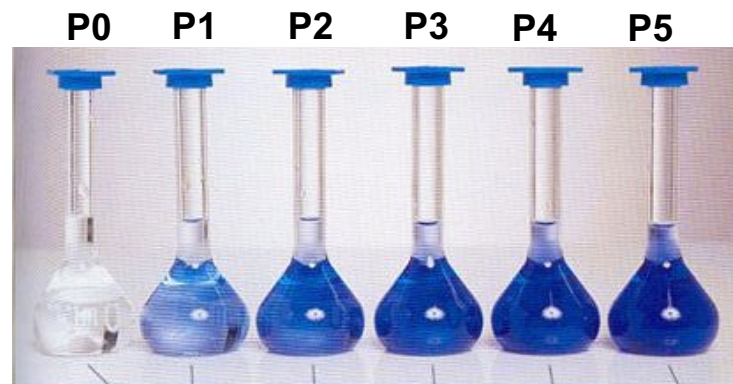
Parámetros de la recta de calibrado

$$y = b_0 + b_1x$$



Medida de la señal analítica para muestras

$$C \pm ts_{x0}$$



• RECORDATORIO CALIBRACIÓN

ERRORES SISTEMATICOS PROPORCIONALES: SI

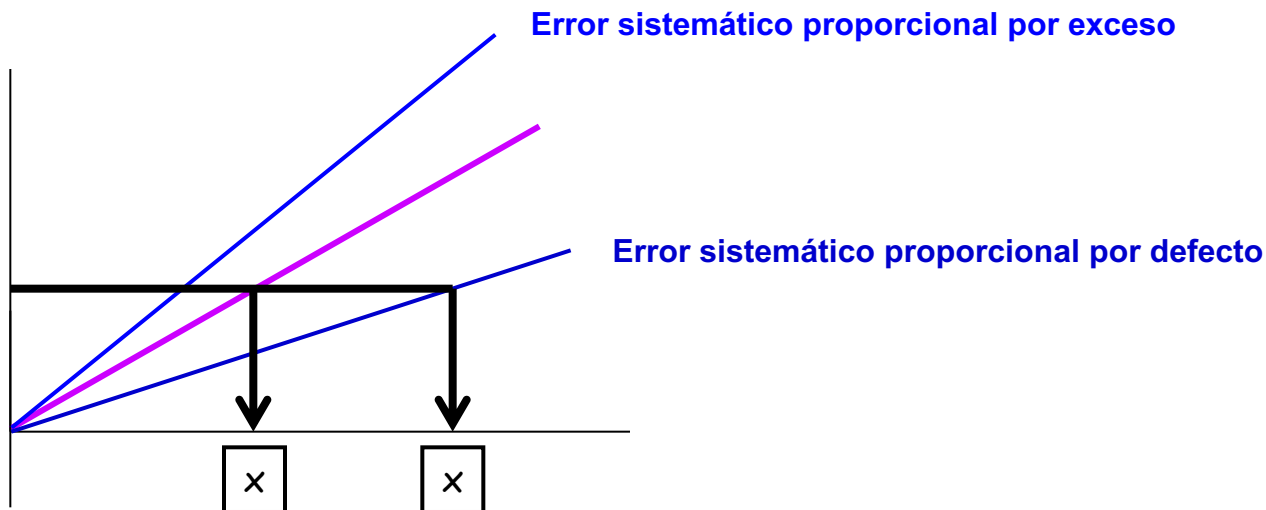
Cambio relativo significativo de la respuesta de analito por unidad de concentración (pendiente). Este cambio puede ser positivo o negativo

Es atribuible a parámetros del sistema de medida, procedimiento o métodos.

Detección: Se conoce como **efecto matriz** y se caracteriza por el cambio estadísticamente significativo del valor de la pendiente obtenido al hacer una calibrado con patrones puros y otro calibrado en presencia de muestra.

CORRECCIÓN

Método de adición estándar



• RECORDATORIO CALIBRACIÓN

MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR

Objetivo: Diagnosticar efecto matriz, calibrado en presencia de error sistemático proporcional. Calibrado en presencia de muestra.

Requisitos: Las señales han de estar en la región lineal; se asume que la disolución sin el analito no presenta señal.

DISEÑO EXPERIMENTAL

- Añadir un volumen o cantidad constante de muestra
- Añadir las diferentes adiciones de patrón
- Llevar a un volumen final constante

ejemplo					
					disolvente patrón muestra
Solution no.	1	2	3	4	Std Conc=10 ppm
Sample vol.	5	5	5	5	
Std vol.	0	1	3	4	
Total vol.	10	10	10	10	

• RECORDATORIO CALIBRACIÓN

ERRORES SISTEMATICOS Y ALGUNOS ALEATORIOS: SI

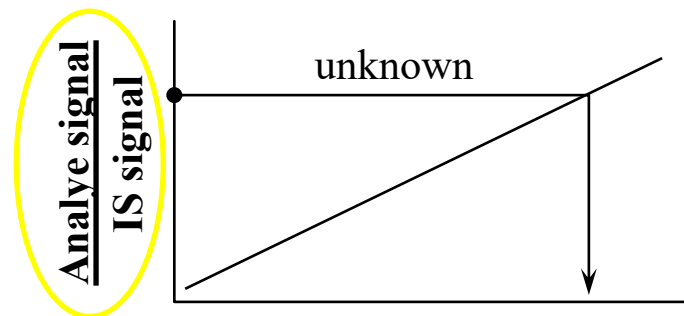
CALIBRACIÓN CON PATRÓN INTERNO

Un patrón interno es una sustancia con unas características físico-químicas parecidas a las del analito que se añade a las muestras y patrones en cantidad fija. El calibrado se hace comparando para cada disolución las respuestas de patrón y analito, es decir, utilizando como variable independiente el cociente.

Objetivo: Corregir errores multiplicativos no aditivos, en técnicas instrumentales en los que el sistema de introducción de muestra o partes del diseño instrumental no permite una buena repetibilidad de la señal analítica.

Metodología: Añadir una cantidad constante de patrón interno a patrones de calibración y muestras.

Curva de calibrado

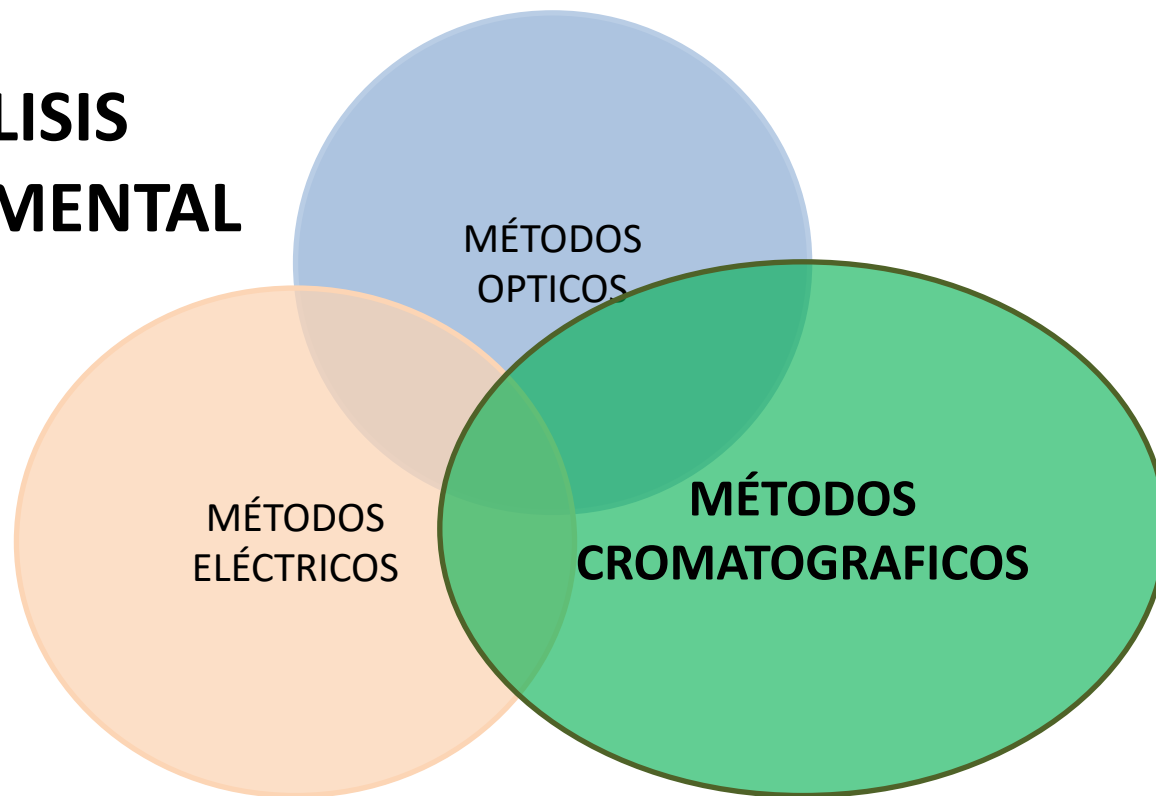


- Los patrones internos son especialmente útiles:

- La respuesta instrumental puede variar ligeramente a lo largo del análisis por causas difíciles de controlar, por ejemplo, cambio de caudal en cromatografía
- Se utilizan tratamientos que producen pérdidas significativas de analito
- En ciertos sistemas cromatográficos, ya que la cantidad de muestra que se inyecta es irreproducible

Laboratorio Química Analítica II

ANÁLISIS INSTRUMENTAL



Estudio de variables experimentales (variables instrumentales)



Mejora de procedimientos existentes

MÉTODO DE ANÁLISIS

*Miniaturización de técnicas
Empleo de nuevos (nano)materiales
Desarrollo de sistemas de medida in-situ
....*

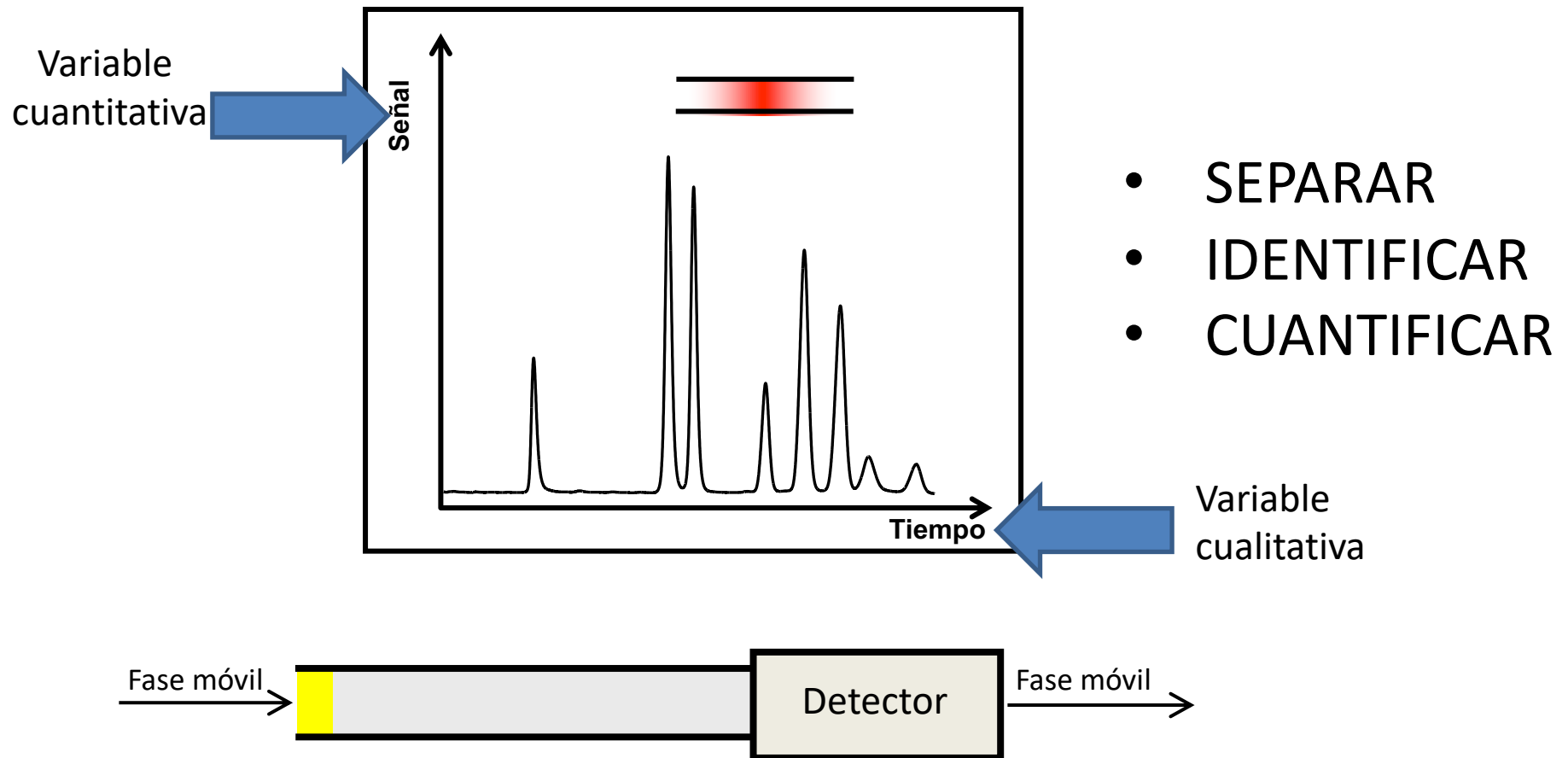
SEMINARIO

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

- **Práctica 6: Determinación de cafeína mediante HPLC**
- **Práctica 7 : Determinación de fenoles en orina mediante GC**

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Son técnicas que permiten la **separación** continua de los componentes de una mezcla compleja en el tiempo, debido a la **interacción con dos fases**: una permanece estática o fija (**fase estacionaria**) mientras que la otra fluye a su través (**fase móvil**)



CLASIFICACIÓN

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

CROMATOGRAFIA DE GASES:

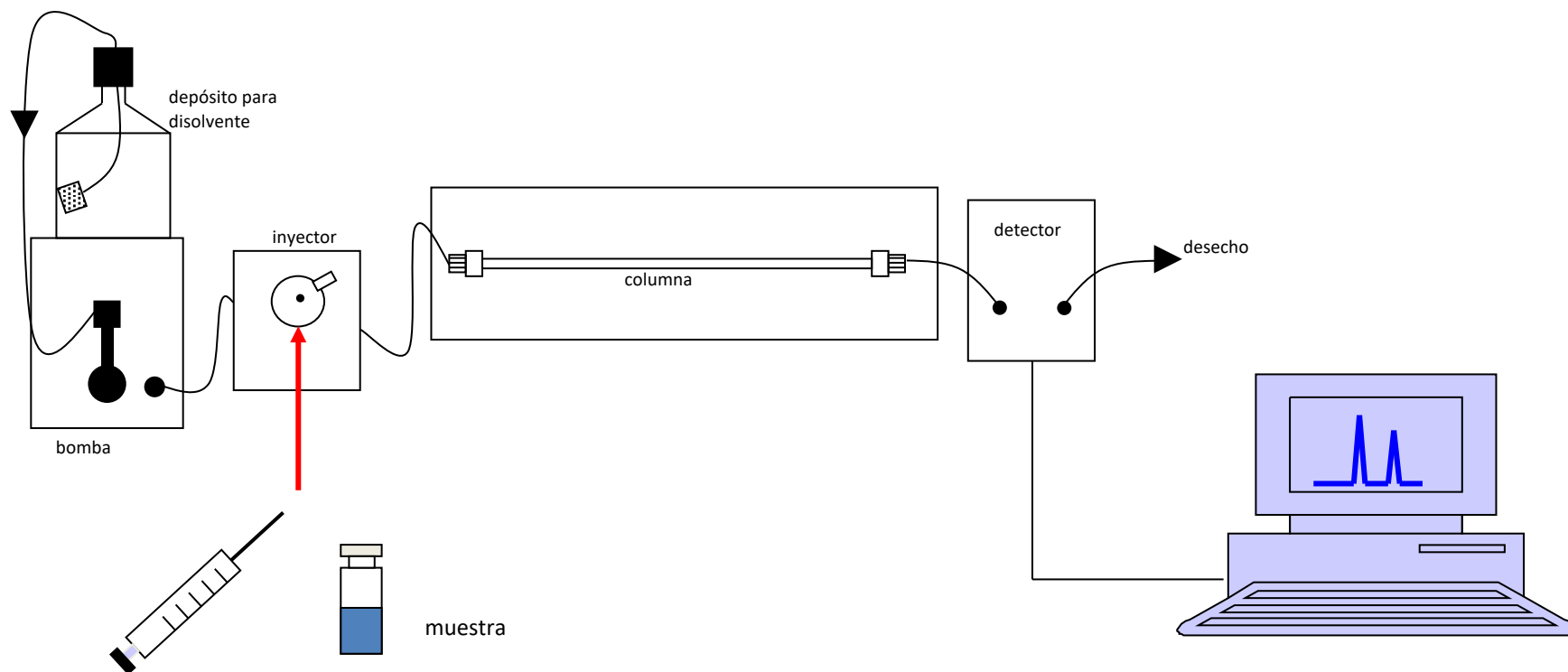
FM en estado gas y no hay interacción con los analitos

CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS:

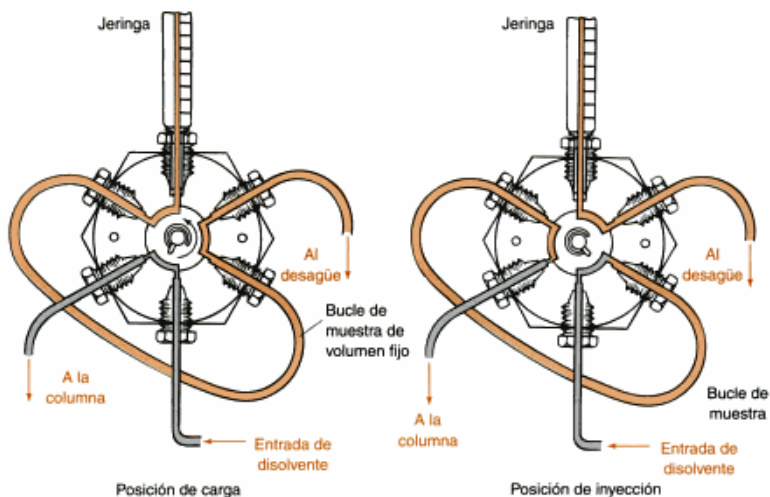
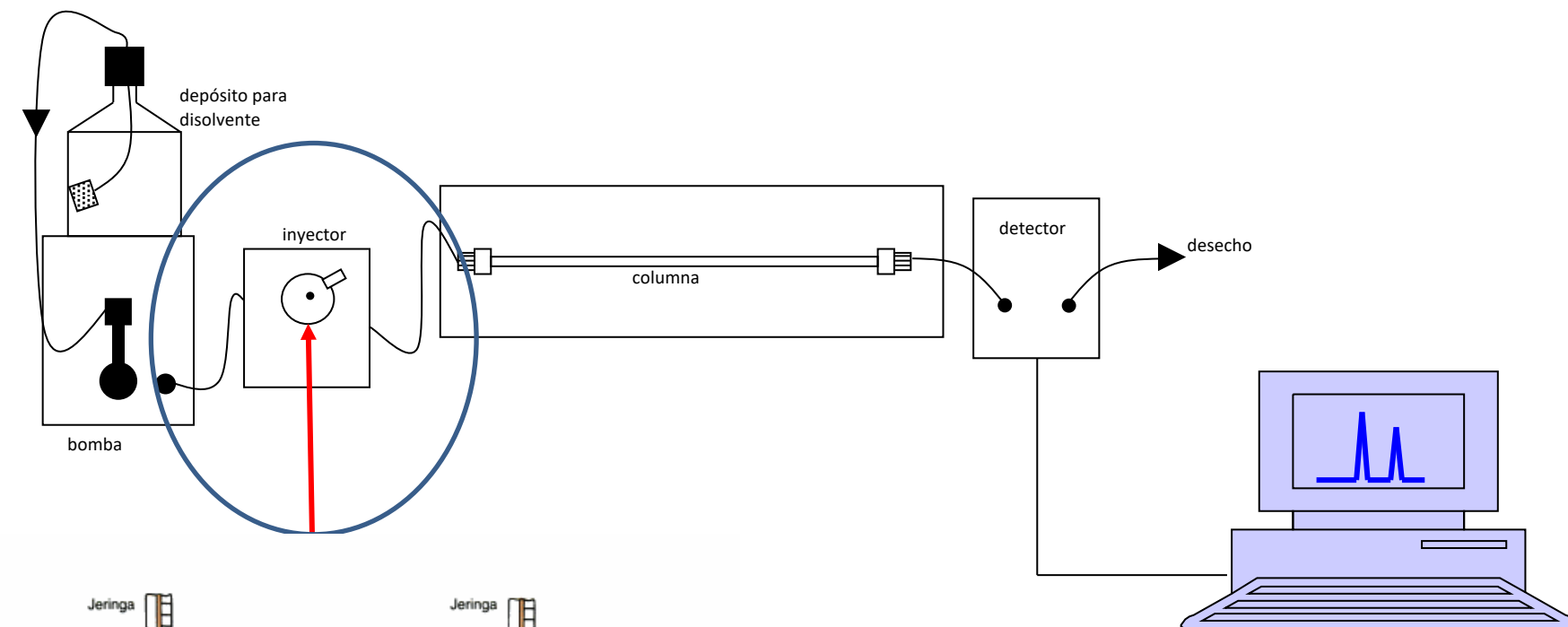
FM en estado líquido. Existe interacción con los analitos

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

FUNDAMENTO: La separación se produce a lo largo de una columna recubierta con fase estacionaria, donde los analitos son arrastrados por la FM. La separación es el resultado de la interacción de los analitos con la FM y FE.



CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)



VARIABLES A OPTIMIZAR

- FE
- Composición FM (% disolventes , pH)
- ELUCIÓN ISOCRÁTICA O EN GRADIENTE
- Caudal FM
- Temperatura
- Volumen de muestra

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

CONCEPTOS

Elución

Proceso en el que los solutos son arrastrados a través de la FE por el movimiento de una FM

Eluyente

Disolvente o mezclas de disolventes que se usa para arrastrar los componentes de una mezcla a través de la FE

Eluído o eluato

Solute que sale de la columna

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

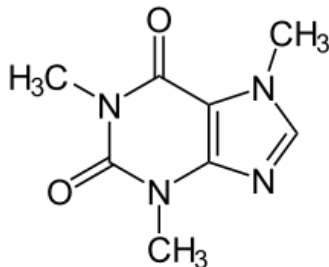
■ **Práctica 6:** Determinación de cafeína mediante HPLC

OBJETIVO

OPTIMIZACIÓN composición de la fase móvil (% ACN, pH



DETERMINACIÓN de cafeína en una muestra de cola comercial



CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

■ **Práctica 6:** Determinación de cafeína mediante HPLC

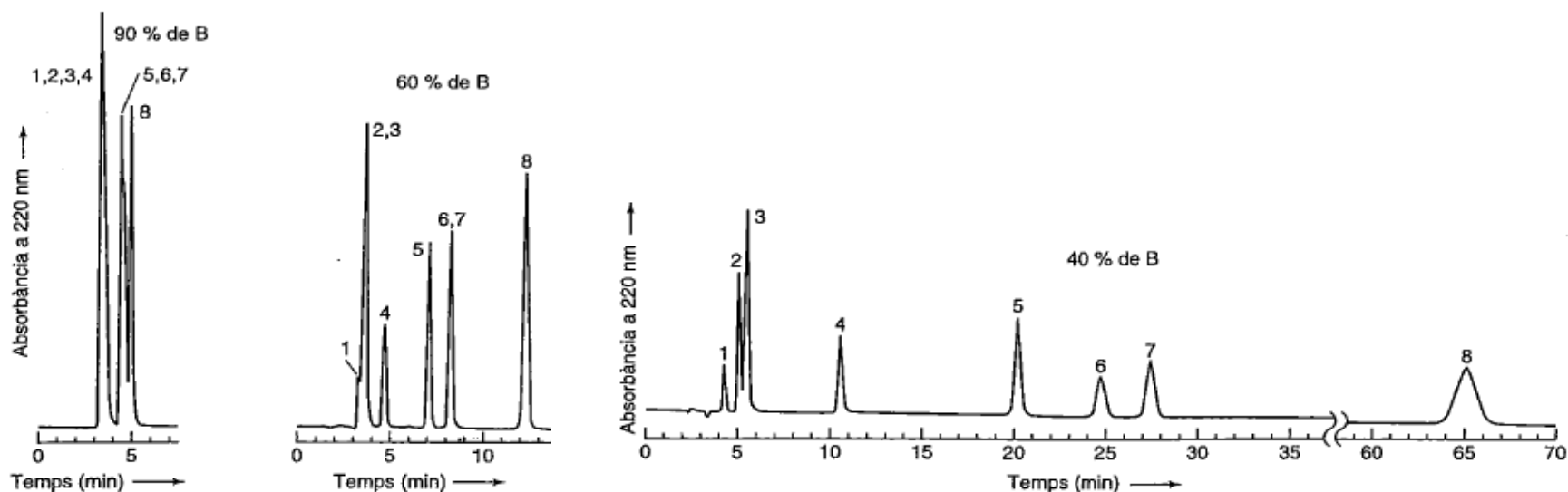
Ejemplo: Separación de compuestos aromáticos en HPLC. Optimización de la fase móvil

A- disolución amortiguadora (pH 3.5)

Columna Hypersil ODS 250 mm x 4.6 mm (5 μ m)

B- acetonitrilo

Flujo: 1 mL/min



HPLC

TÉCNICA INSTRUMENTAL

CURVA DE CALIBRADO

CALIBRACIÓN EXTERNA

Preparación de patrones

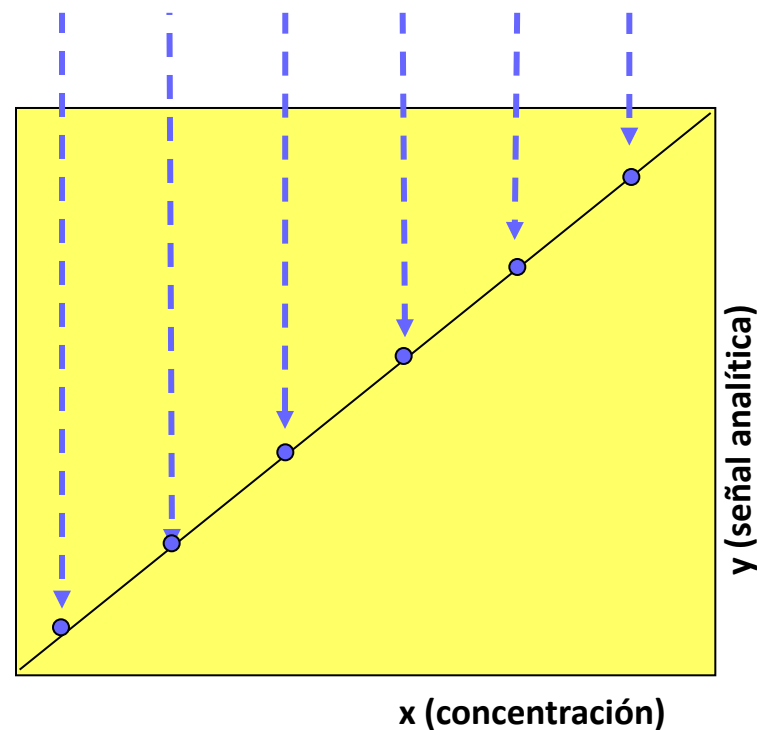
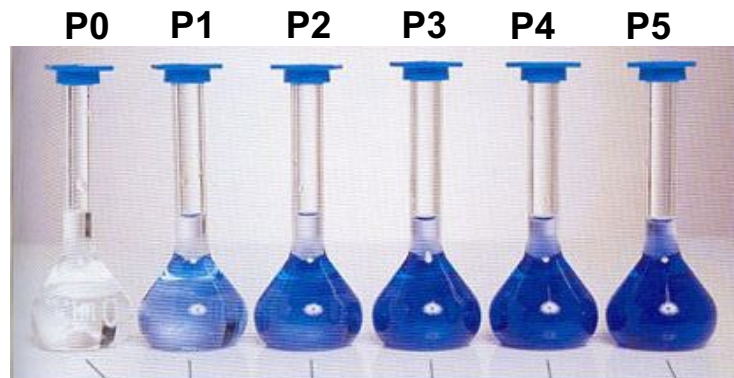
Medida de la señal analítica para patrones

Parámetros de la recta de calibrado

$$y = b_0 + b_1 x$$

Medida de la señal analítica para muestras

$$C \pm t_{s_{x0}}$$

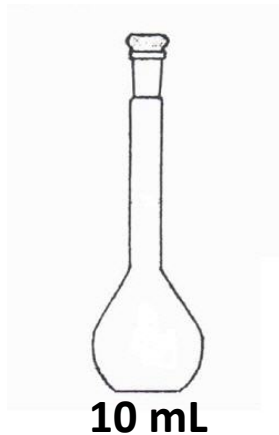


■ **Práctica 6:** Determinación de cafeína mediante HPLC

Preparación de patrones

A partir de disolución de cafeína 1000 ppm

P0	P1	P2	P3	P4	P5	
0	20	40	60	80	100	ppm



Preparación de muestra

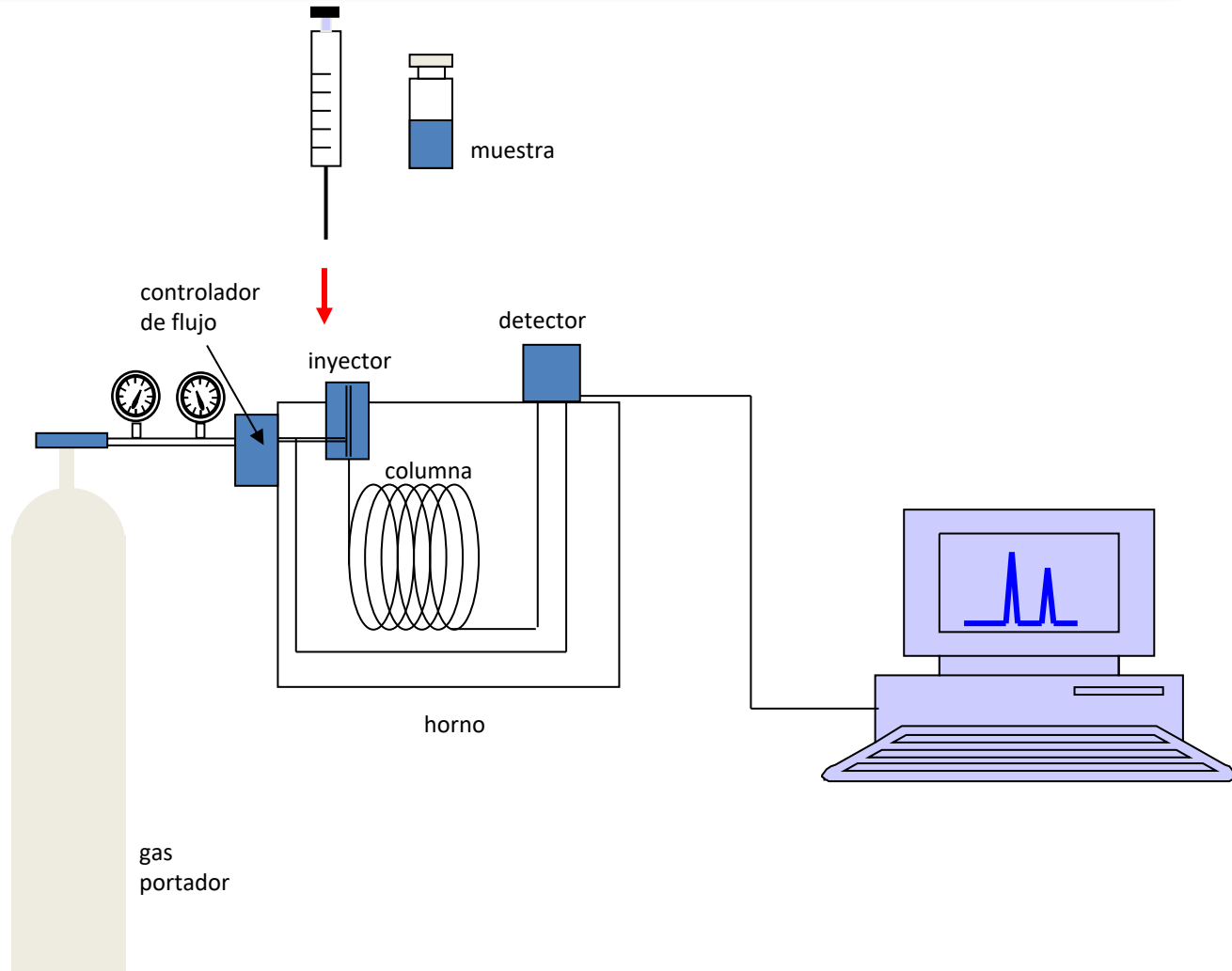
Contenido de cafeína en la muestra 80-120 ppm. Cual es la dilución a aplicar?

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

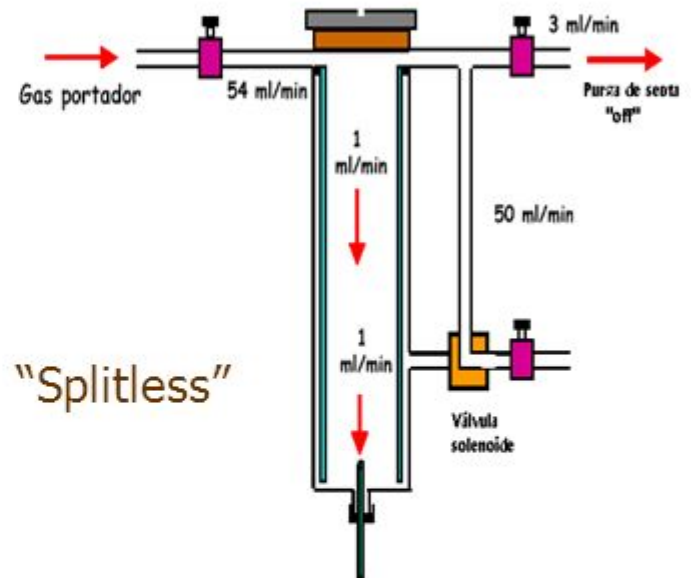
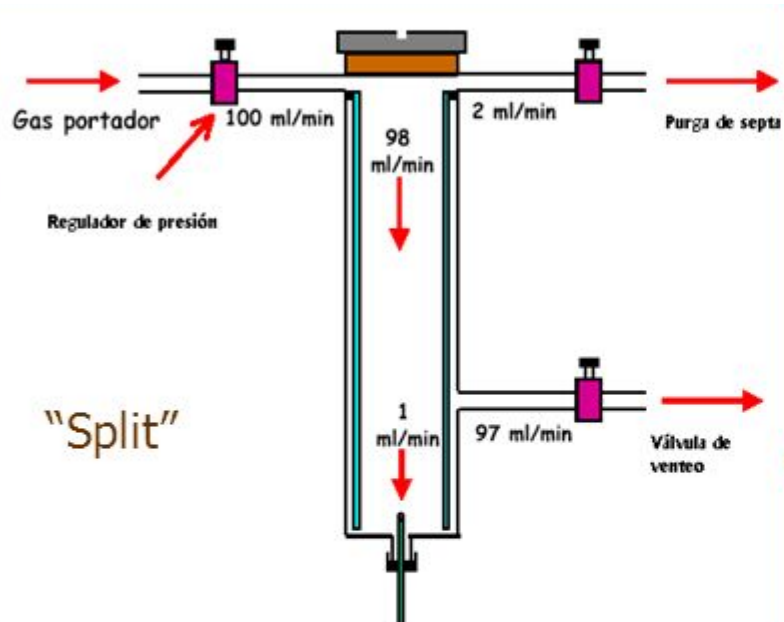
■ **Práctica 7:** Determinación de fenoles en orina mediante cromatografía de gases

FUNDAMENTO: Los analitos se introducen en el cromatógrafo de gases en forma gaseosa o, más frecuentemente en disolución vaporizándose inmediatamente por el aumento de la temperatura.

La separación se produce a lo largo de la columna, donde son arrastrados por la FM, un gas portador (inerte)



CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)



VARIABLES A OPTIMIZAR

- FE
- Separación ISOTERMA O CON RAMPA DE Tº.
- Caudal gas portador
- Temperatura
- Volumen de muestra
- Modo de inyección de muestra: split o splitless

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

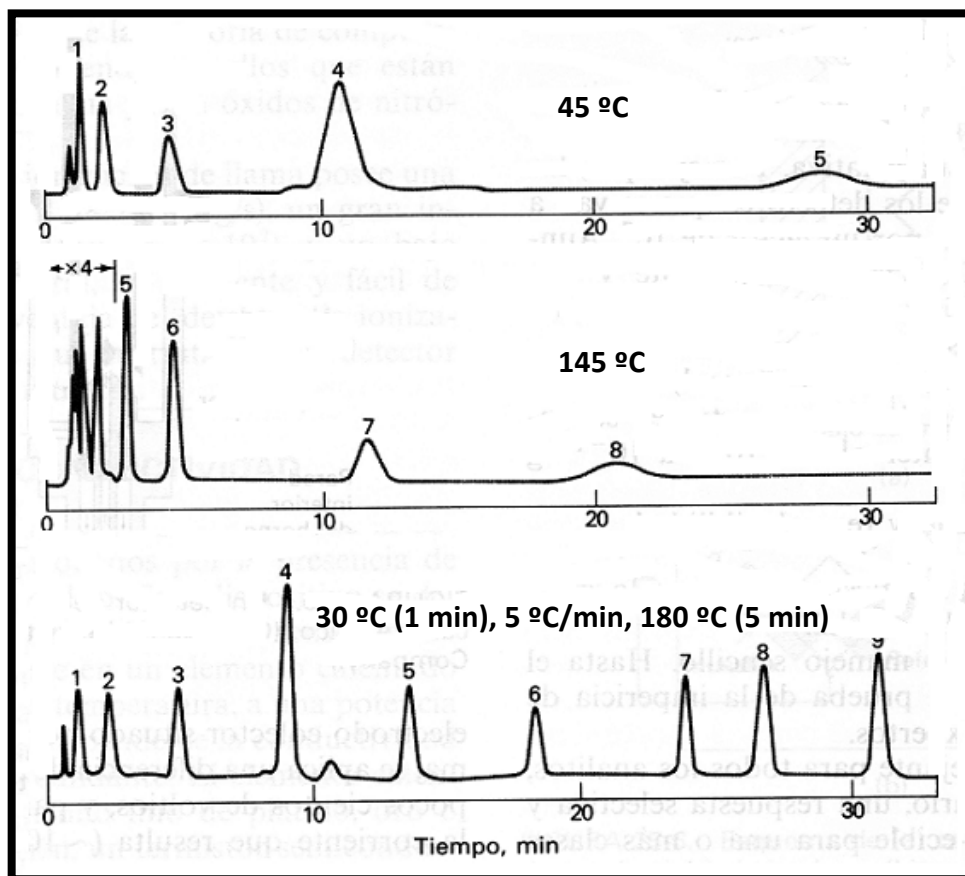
Influencia de la temperatura en el proceso de separación

Ejemplo: separación de 9 hidrocarburos

Fase estacionaria: 5% fenil-95% metilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm, 1 μ m de espesor de película)

Portador: nitrógeno, Caudal: 1 mL/min, T inyector: 200 $^{\circ}$ C, T detector: 250 $^{\circ}$ C

V inyección: 1 μ L en modo división 1:30



CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC)

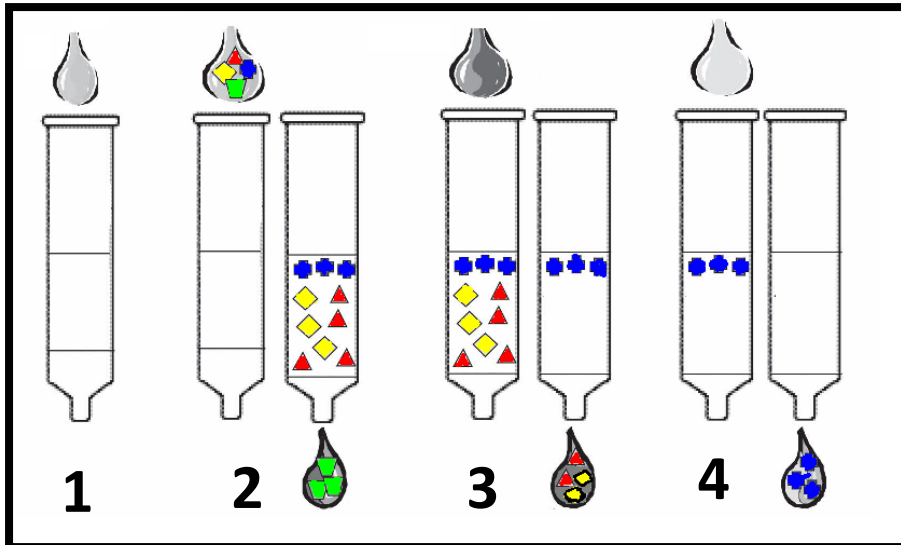
■ **Práctica 7:** Determinación de fenoles en orina mediante cromatografía de gases

Preparación de la muestra



ORINA: MUESTRA COMPLEJA, ELIMINACIÓN DE INTERFERENTES + PRECONCENTRACIÓN

SPE o EFS: Extracción en fase sólida



Etapas:

- 1) Acondicionamiento
- 2) Carga
- 3) Lavado
- 4) Elución

→ **SECADO???**

$$\text{Factor de preconcentración} = \frac{C_{\text{extracto}}}{C_{\text{muestra}}} = \frac{V_{\text{muestra}}}{V_{\text{extracto}}} R$$

GC

TÉCNICA INSTRUMENTAL

CURVA DE CALIBRADO

CALIBRACIÓN **PATRÓN INTERNO**

Preparación de patrones

Medida de la señal analítica para patrones

Parámetros de la recta de calibrado

$$y = b_0 + b_1 x, \text{ donde } y = A/A_{PI}$$

Medida de la señal analítica para muestras

$$C \pm t_{s_{x0}}$$

