

CURSO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

10-12 SETEMBRO

FP A CARBALLEIRA (OURENSE)

DRA. MARTA LORES AGUÍN

CATEDRÁTICA QUÍMICA ANALÍTICA

DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN E BROMATOLOXÍA

FACULTADE DE QUÍMICA

UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA (USC)

CURSO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

OBJETIVOS

- 1.COÑECER OS FUNDAMENTOS DOS EQUIPOS EMPREGADOS NA ANÁLISE INSTRUMENTAL.
- 2.APLICAR DIFERENTES TÉCNICAS INSTRUMENTAIS PARA A MEDIDA DE PARÁMETROS ANALÍTICOS EN DIFERENTES MOSTRAS.
- 3.USAR EQUIPOS DE HPLC, ABSORCIÓN ATÓMICA, CROMATOGRAFÍA DE GASES, UV-VISIBLE.

CONTIDOS

- 1.FUNDAMENTOS DOS EQUIPOS DE ANÁLISE INSTRUMENTAL.
- 2.USO DOS EQUIPOS DE CROMATOGRAFÍA DE GASES, HPLC , ABSORCIÓN ATÓMICA E UV-VISIBLE.
- 3.DETERMINACIÓNS DE DIFERENTES PARÁMETROS DE ANÁLISE MEDIANTE O USO DESTAS TÉCNICAS.

PROGRAMA CURSO ANÁLISIS INSTRUMENTAL



Lunes 10:

10:00 a 14:30

- Fundamentos teórico-prácticos de las técnicas cromatográficas
- Calibrado por patrón externo
- Práctica HPLC

16:00 a 19:30

- Calibrado por patrón interno
- Práctica GC

Martes 11:

10:00 a 14:30

- Fundamentos teórico-prácticos de las técnicas espectroscópicas
- Calibrado con adición estándar

16:00 a 19:30

- Práctica Espectroscopía de Absorción Atómica (AAS)
- Determinación del Efecto Matriz

Miércoles 12

10:00 a 14:30

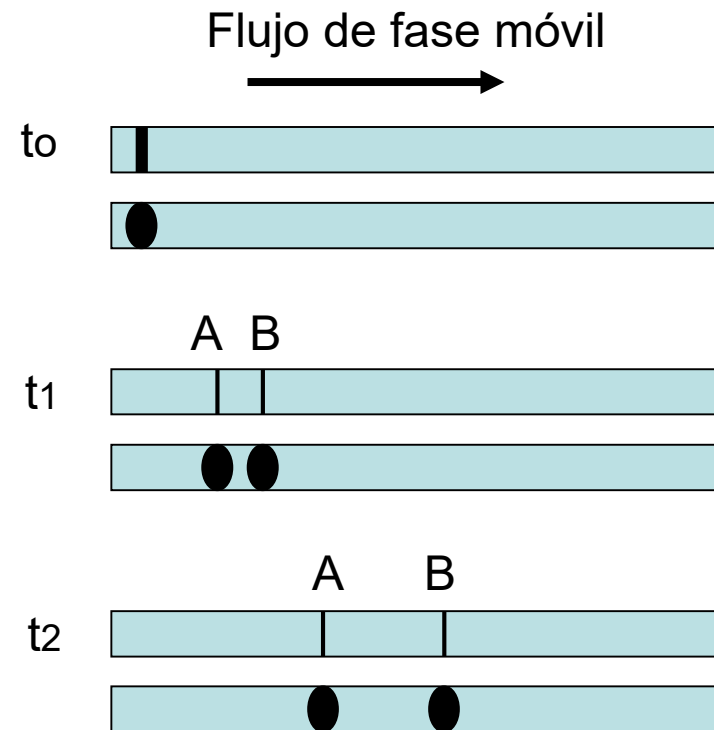
- Visión general de la Espectroscopía de Emisión Atómica
- Práctica Espectrofotometría Molecular UV-Vis



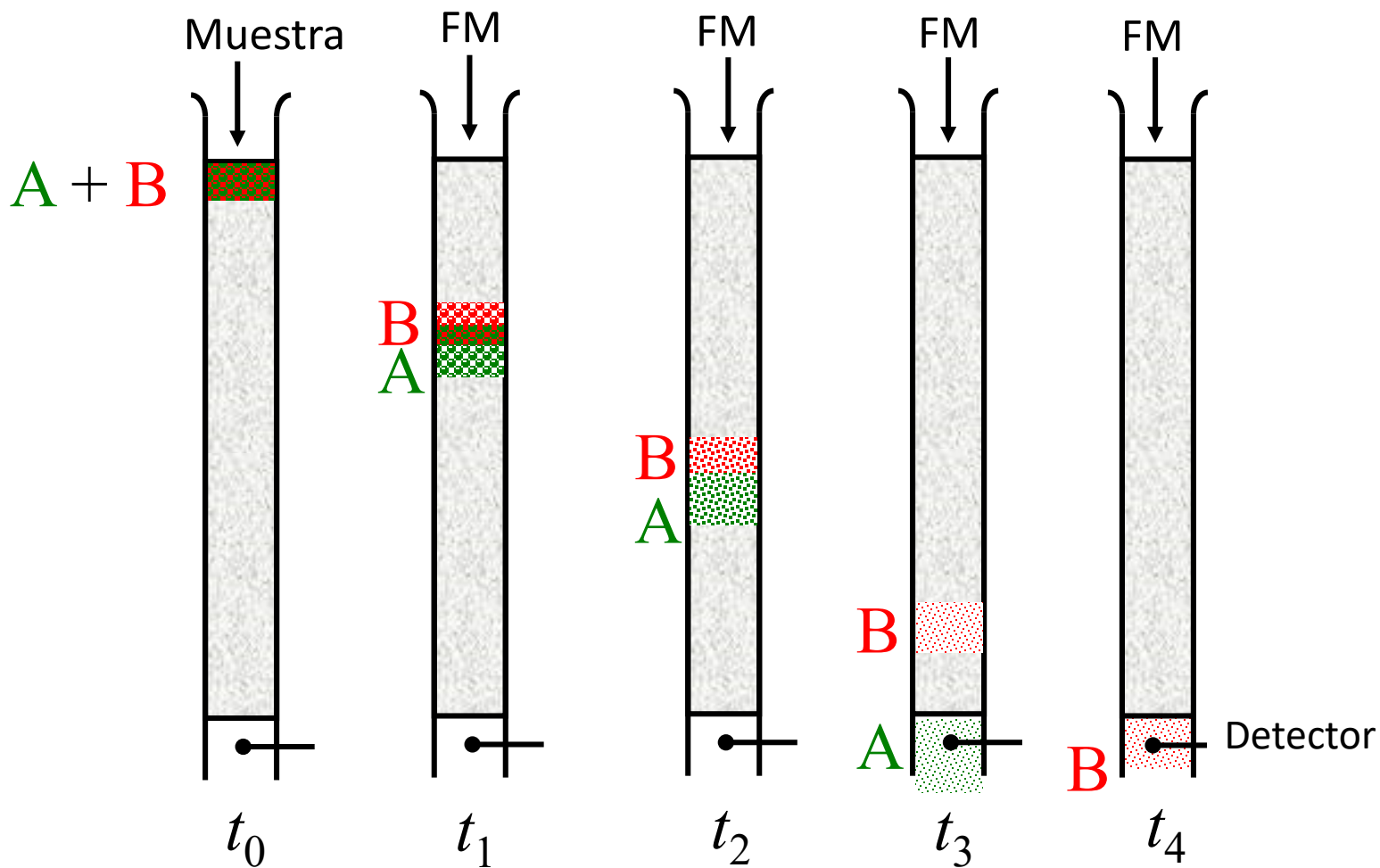
FUNDAMENTOS TEÓRICO-PRÁCTICOS DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Cromatografía

- La cromatografía es una técnica física de separación de los componentes de una mezcla por su diferente distribución entre una fase fija y otra fase móvil, que son inmiscibles.
- Es pues una técnica separativa donde los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases (FM y FE), como consecuencia de su diferente **afinidad** hacia dichas fases. La separación se basa en las **distintas velocidades de migración** de los analitos, determinadas por el tiempo que permanecen en cada fase
- Los componentes que son más fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil, y, por el contrario, si son débilmente retenidos, eluyen más rápidamente.



Cromatografía en columna: elución



Análisis cualitativo y
cuantitativo

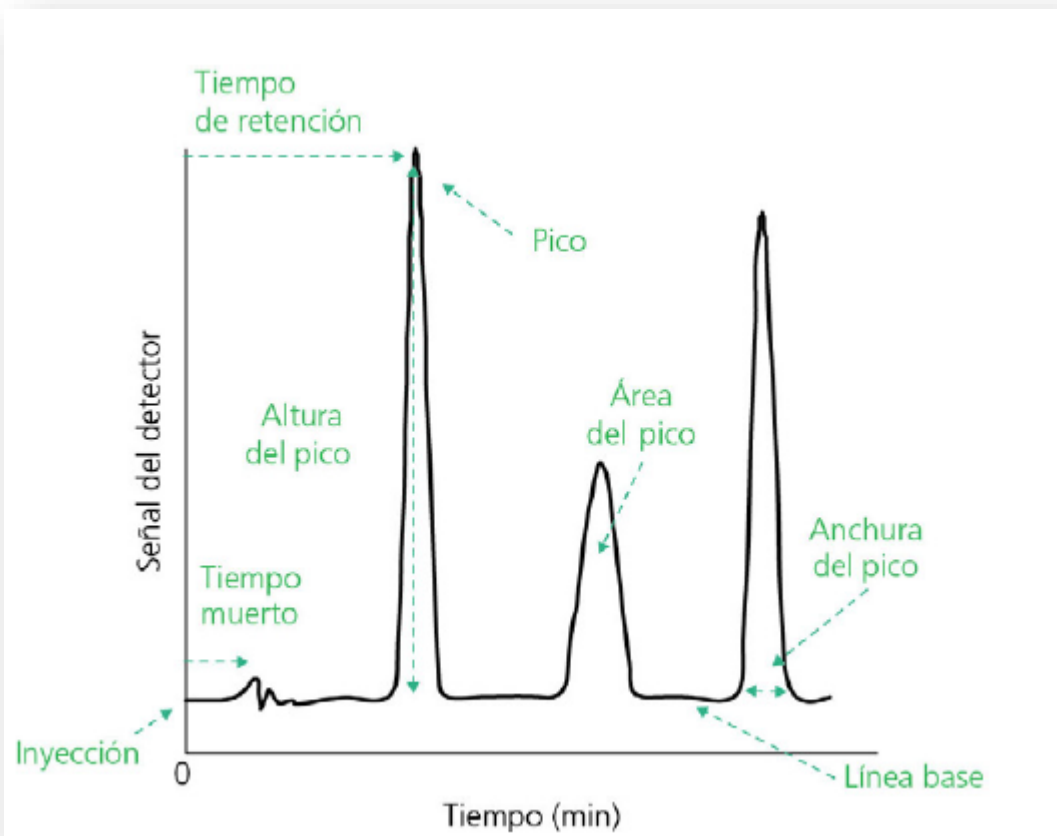


Cromatografía

- Un plato teórico es la longitud de columna en la cual el soluto alcanza el equilibrio entre las fases móvil y estacionaria.
- La **eficacia de separación** de una columna se describe por el número de platos teóricos. Cuanto mayor sea el número de platos teóricos, mejor será la eficacia. Ej.: una columna con partículas de 5 μm de unos 15 cm de largo, típica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*), tiene unos 10^4 platos teóricos.
- La cromatografía será tanto mejor cuanto más se puedan separar los componentes de la mezcla. Esto es importante, porque, en **una mezcla tan compleja como un fluido biológico**, puede haber sustancias que **coeluyan** con el compuesto de interés e interfieran en la medida.

Cromatografía

La salida de los compuestos de la columna se controla con un **detector**, que está seleccionado y ajustado para identificar sólo los compuestos que interesen. Al registro de las señales o picos que aparecen en función del tiempo se denomina **cromatograma**.



Desde que se inyecta la muestra hasta que comienzan a salir los compuestos no retenidos en la columna transcurre un corto período de tiempo, que es el **tiempo muerto**. El **tiempo de retención** de un compuesto es el tiempo que necesita para aparecer el máximo del pico desde que se inyecta la muestra. Estos picos aparecen sobre una línea base, que es la señal producida cuando por la columna sólo pasa fase móvil.

Cromatografía

El **cromatograma** proporciona información sobre la forma de los picos, los tiempos de retención, el área y la altura de los picos que forma cada compuesto al eluir.

A partir de ellos se puede llevar a cabo:

1. La **identificación** de un compuesto a través del tiempo de retención, que se refiere al momento en que aparece la señal y que se compara con un patrón de composición conocida.
2. La **cuantificación** de un compuesto usando el área o la altura del pico que forma en el cromatograma. Previamente se realiza una calibración con patrones de concentración conocida.

La **resolución** o la separación entre los picos del cromatograma están determinadas por la diferencia entre los tiempos de elución de los picos y la anchura de éstos. Cuanto más separados y más estrechos son los picos, mejor separación. En cambio, unos picos anchos y solapados muestran una mala separación.

Tipos de Cromatografía

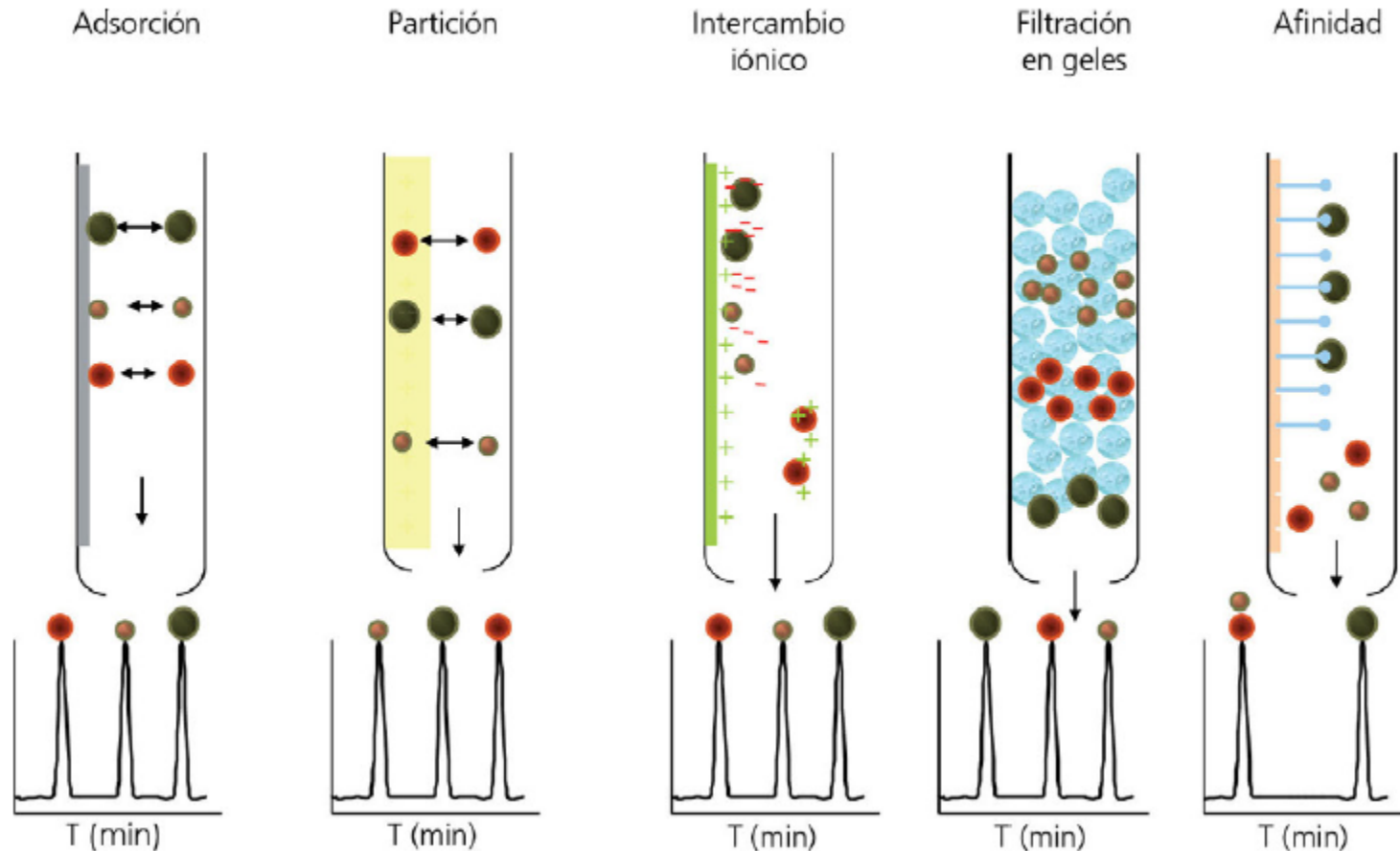
Atendiendo a la fase móvil, la cromatografía se divide en cromatografía líquida y de gases

Fase móvil	Fase estacionaria	Tipo de separación
Gaseosa	Sólida	Adsorción
	Líquida	Partición
Líquida	Sólida	Adsorción
		Intercambio iónico
		Afinidad
		Gel de exclusión
	Líquida	Partición

Según el tipo de interacción que permite separar los solutos, la cromatografía puede ser:

1. De Absorción
2. De Partición
3. De Intercambio Iónico
4. De Filtración por geles, o de Exclusión Molecular
5. De Afinidad

Cromatografía: Tipos de Separación



Tipos de separación cromatográfica. **Adsorción:** separación por adsorción/desorción. **Partición:** separación por diferente solubilidad. **Intercambio iónico:** separación por la carga iónica. **Filtración en geles:** separación por el tamaño. **Afinidad:** separación por la unión a un ligando.

Clasificación

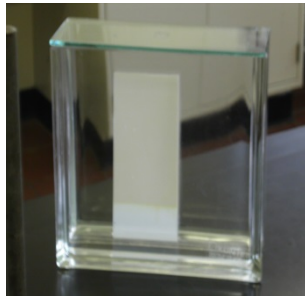
De acuerdo a la disposición física de la FE

Plana(r)

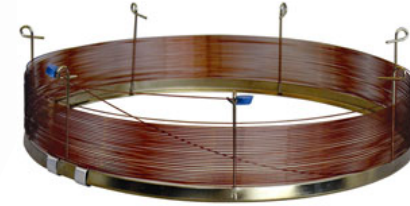
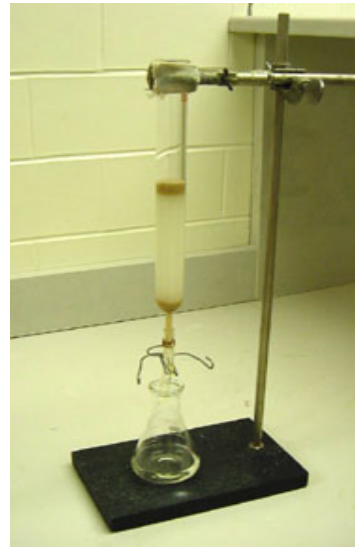
papel



capa fina

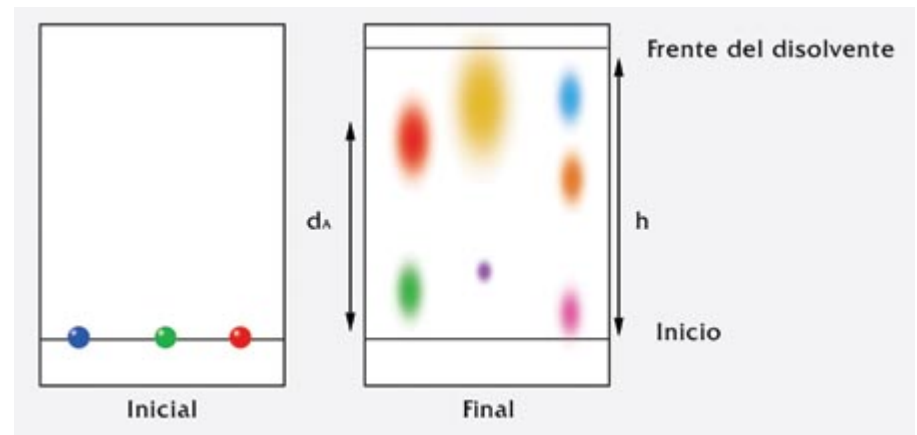
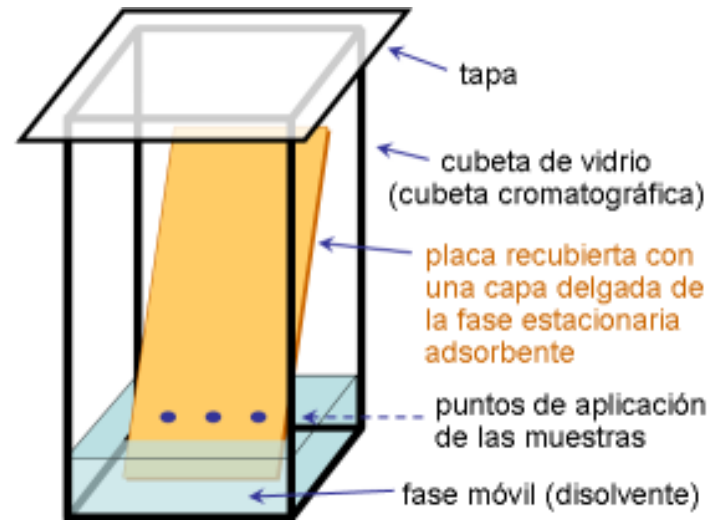


Columna

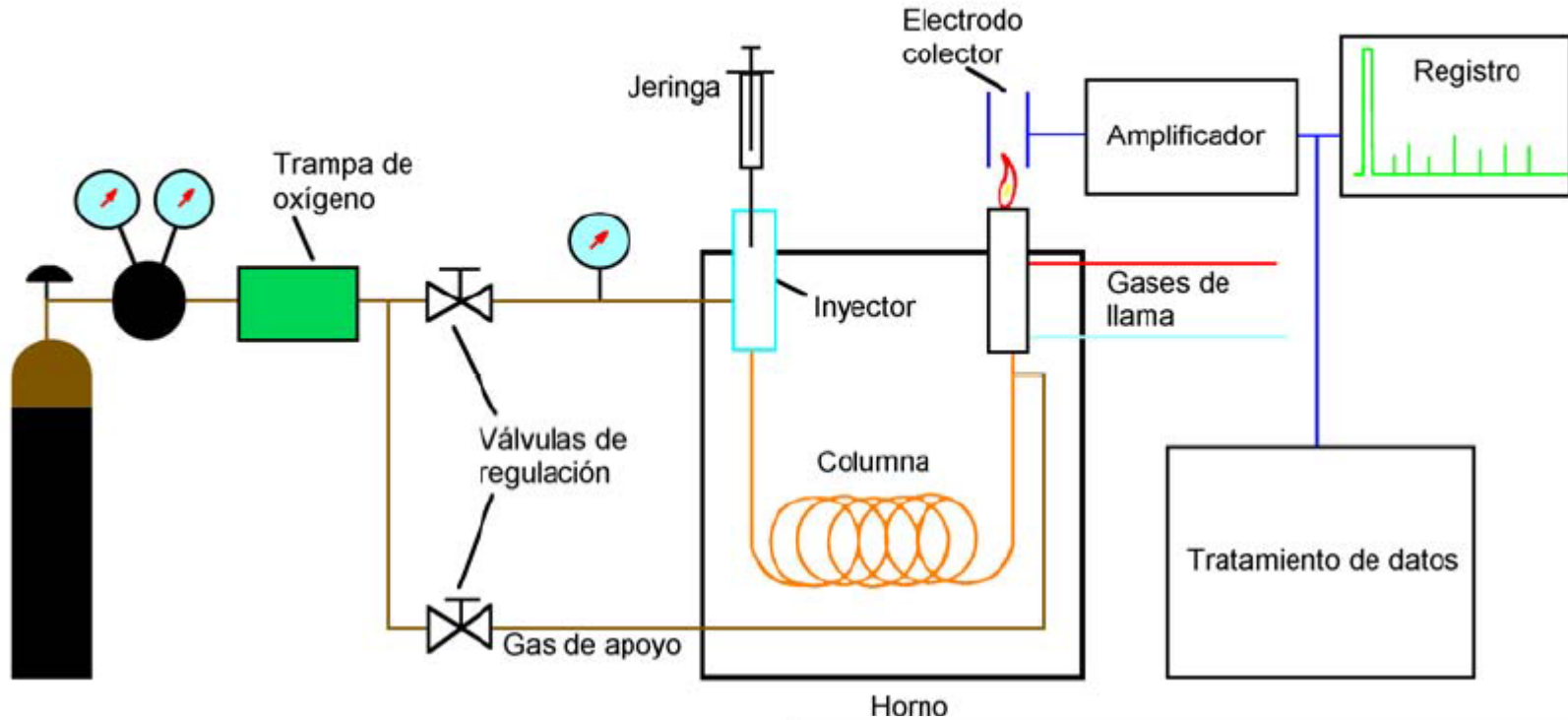


CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

- Se emplean placas de vidrio sobre las cuales se deposita una matriz, que suele ser una fina capa de sílice, alúmina o almidón.
- La placa se coloca verticalmente sobre un eluyente, que suele ser un disolvente orgánico o una mezcla de varios, y ascenderá por la placa por capilaridad.
- Las muestras se colocan por encima del nivel del eluyente y ascienden arrastradas por él. Se separan según su solubilidad, la polaridad del eluyente y de la sustancia, y la velocidad de difusión.



CROMATOGRAFÍA DE GASES



ácidos orgánicos, drogas,
esteroides,...

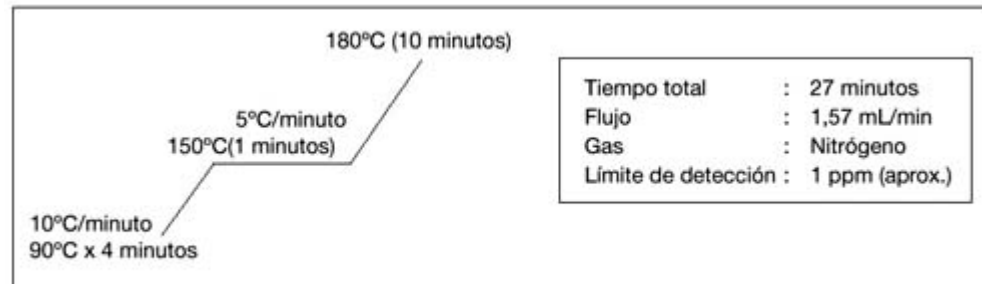
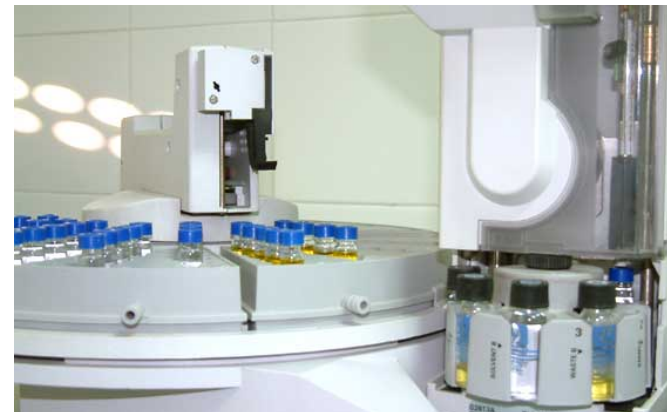
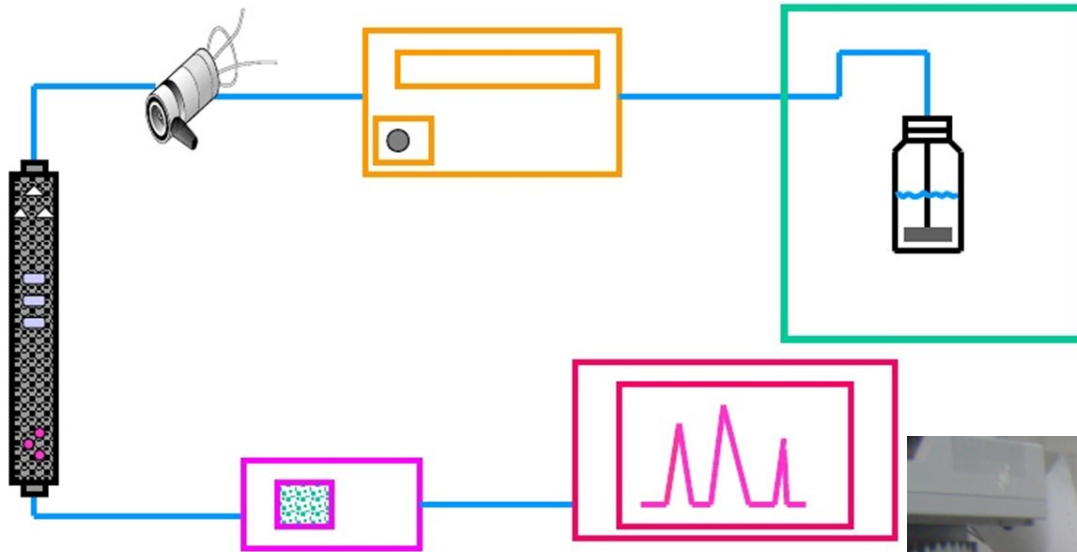


Figura 1. Programación de la temperatura.

Instrumentación: Cromatógrafos de Gases



CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC)



Es una de las técnicas cromatográficas más empleadas en el laboratorio clínico.

porfirinas, aminoácidos, péptidos,...



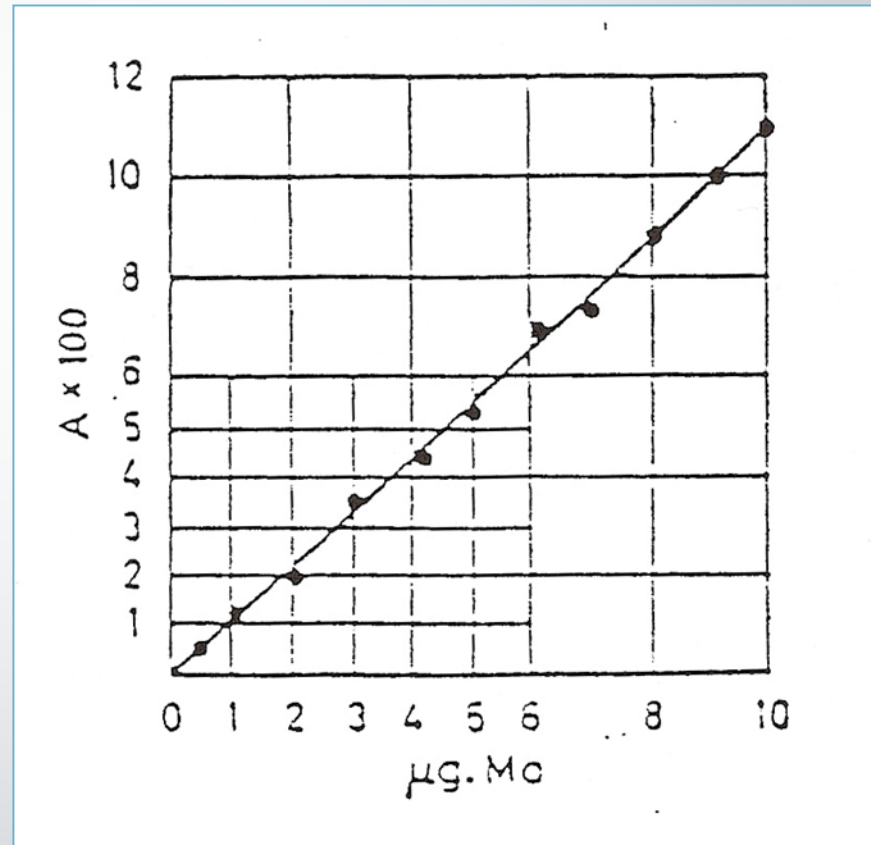
CALIBRADO POR PATRÓN EXTERNO (Absorbancia)

ESTABLECIMIENTO DE LA CURVA CALIBRADO

Recordemos que la **Ley de Beer** establece que para una radiación monocromática, **la A es directamente proporcional al camino óptico b a través del medio y la concentración c de la especie absorbente:**

$$A = \epsilon bc$$

- patrones igual matriz que las muestras
- diario
- linealidad



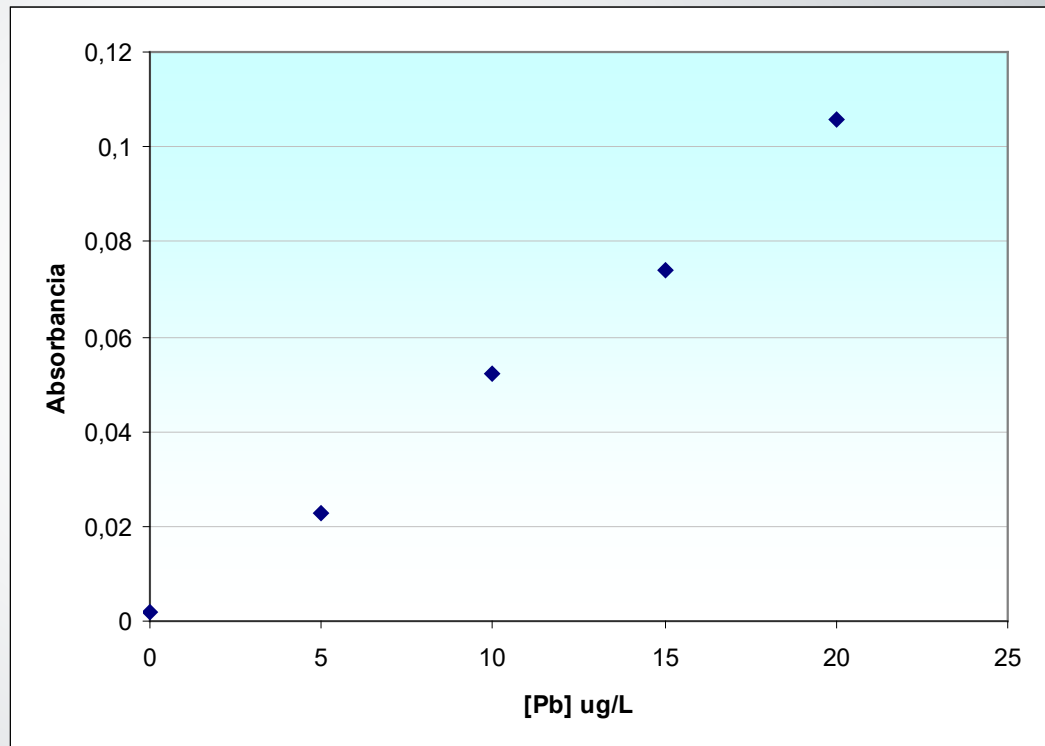
Representación gráfica de la ley de Beer

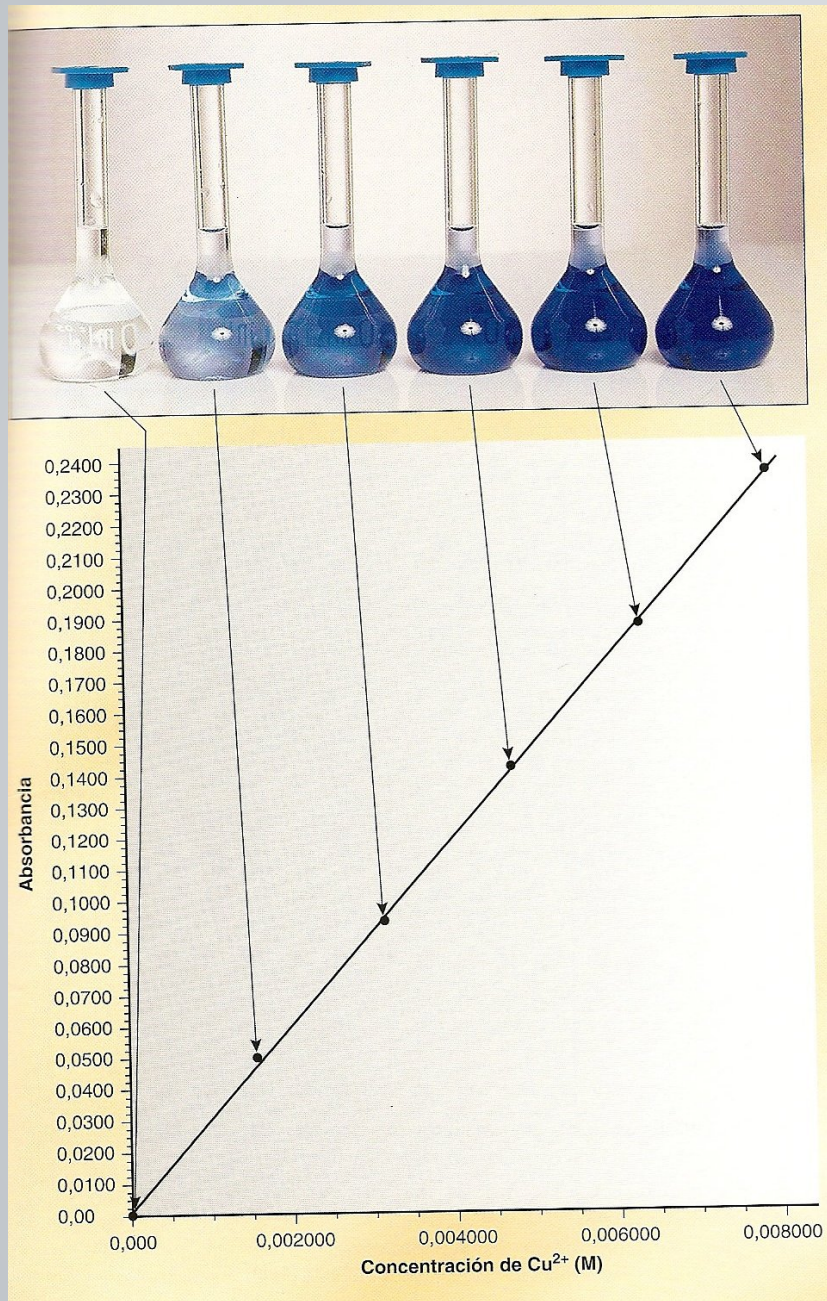
CALIBRADO POR PATRÓN EXTERNO (*Absorbancia*)

Método de mínimos cuadrados:

Método para trazar la “mejor recta” que se ajuste a los puntos experimentales.

[Pb] $\mu\text{g/L}$	Absorbancia
0	0,002
5	0,023
10	0,052
15	0,074
20	0,106



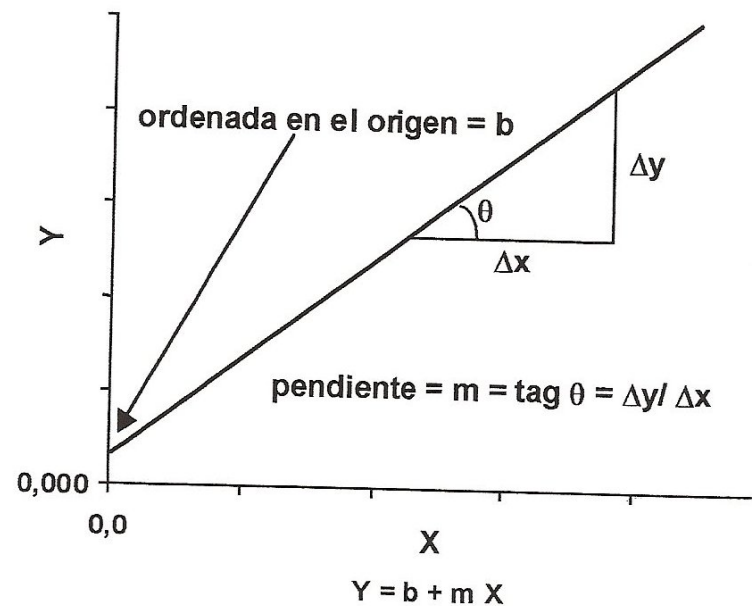


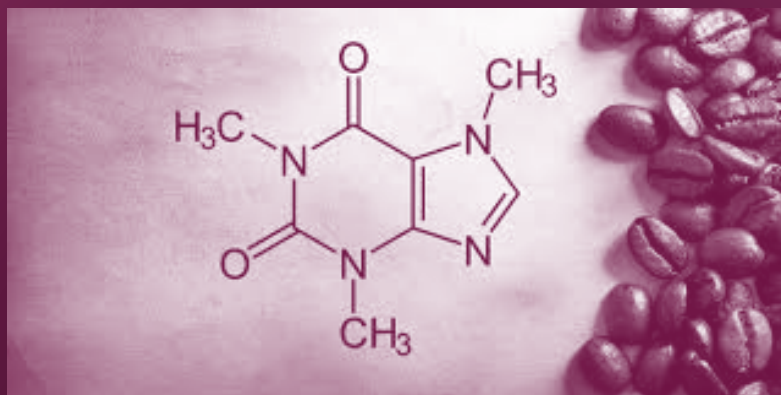
➤ Suponemos que existe una relación lineal entre la variable medida (Y) y la concentración (X)

$$Y = b + mX$$

b: ordenada en el origen

m: pendiente de la recta





PRÁCTICA HPLC

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA EN
DIFERENTES MUESTRAS
(CAFÉ, TÉ Y BEBIDAS DE COLA)
MEDIANTE HPLC CON
DETECCIÓN UV

PRÁCTICA HPLC

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA

OBJETIVOS

- 1. Familiarizar al alumno con la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC): manejo de la instrumentación, preparación de la fase móvil, control del flujo de fase móvil, detección.
- 2. Aplicación de la técnica a la determinación de la concentración de cafeína en diferentes muestras (café, té y bebidas de cola) por HPLC en fase inversa. Expectativas

INTRODUCCIÓN

- El método tradicional para la determinación de cafeína es medir su absorbancia con un espectrofotómetro.
- La Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) es un método de separación que se utiliza fundamentalmente para la determinación de sustancias no volátiles, generalmente polares y/o térmicamente lábiles.
- Con HPLC se consigue separar más fácil y rápidamente la cafeína de otras sustancias, tales como: ácido tánico, ácido cafeico y azúcares, que también se encuentran en este tipo de bebidas.
- Una vez conectado el cromatógrafo y estabilizado el flujo, se procede a la inyección de disolución patrón de cafeína de distintas concentraciones (2 inyecciones por lo menos de cada nivel).
- De los cromatogramas resultantes se obtienen los datos de tiempo de retención (t_R) y área de pico.
- Si el flujo y la presión de la bomba se han mantenido constantes a lo largo de todo el experimento, t_R podrá utilizarse como medida cualitativa y el área de pico como medida cuantitativa.
- Se construye la curva de calibrado (área de pico vs. concentración de los patrones de cafeína) y posteriormente se inyecta la muestra, pudiéndose calcular la concentración del analito presente en la misma.

PRÁCTICA HPLC

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA

REACTIVOS Y MATERIAL

Instrumentación:

- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución.
- Columna cromatográfica de fase Inversa: C18.
- Detector de absorbancia UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$)
- Flujo de la fase móvil: 2 mL/min

Reactivos:

- Cafeína (patrón puro)
- Metanol
- Agua Milli-Q
- Ácido acético

Material:

- 1 Probeta de 100 mL
- 6 matraces aforados de 25 mL
- 1 pipeta de 10 mL , otra de 25 mL y 5 mL
- Viales de 10 mL
- Filtros de muestra compatibles con metanol

PRÁCTICA HPLC

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA

PARTE EXPERIMENTAL

1. Preparar 1 L de una disolución: 30 % metanol/ 0.1 % ácido acético/ 69.9 % agua ($\cong$ pH 3.5).
 - Esta disolución se utilizará para preparar los patrones para el calibrado; la misma disolución se utiliza como fase móvil en el sistema cromatográfico, pero se da preparada porque hay que desgasificarla convenientemente, ya sea con una corriente continua de Helio o en un baño de ultrasonidos durante 5 minutos, y este proceso no puede realizarse en el laboratorio de prácticas.
2. Preparación de la curva de calibrado: A partir de la disolución patrón concentrada de cafeína de 1,000 g/L preparar en 5 matraces de 25 mL, disoluciones de 0,020 g/L, 0,040 g/L, 0,080 g/L, 0,100 g/L y 0,120 g/L, utilizando como disolvente la disolución preparada en el punto 1, y agitando convenientemente para asegurar su homogeneidad.
3. Preparar y conectar el sistema cromatográfico:
 - a) Encender la bomba: Fase móvil: Metanol / agua Milli-Q (30:70) acidulada a pH 3.5. Flujo: 2.0 mL/min.
 - b) Encender el detector de absorbancia: Longitud de onda: 254 nm
 - c) Encender ordenador e impresora
 - [Antes de inyectar los patrones en la columna, dejar pasar fase móvil durante 5-10 min, registrando simultáneamente la respuesta en el detector, para asegurarse de que no quedaron sustancias retenidas en la columna procedentes de experimentos previos y de que la línea de base es estable].

PRÁCTICA HPLC

DETERMINACIÓN DE CAFEÍNA

PARTE EXPERIMENTAL

4. Realizar 2 inyecciones de cada nivel de concentración de cafeína, de menor a mayor concentración: cargar la muestra con la válvula en posición LOAD (20 μ L) e inyectar girando a la posición INJECT.
5. **Preparación de las muestras de bebida:**
 - Café: 0.5 g de café en 150 mL de agua caliente. Tomar 10 mL de café, enrasar a 25 mL con metanol/agua/acético (30:69,9:0,1) y filtrar 5 mL de la disolución resultante.
 - Té: 1 bolsa en 150 mL de agua caliente. Tomar 7-10 mL de té, enrasar a 25 mL con metanol/agua/acético (30:69,9:0,1) y filtrar 5 mL de la disolución resultante.
 - Bebidas de cola: 15 mL de bebida de cola (Eliminar carbónico por agitación con varilla). Inyección directa, filtrando.
6. Inyectar las muestras de bebida por duplicado.

Tratamiento de los datos:



1. Determinar a partir del tiempo de retención medio del pico de cafeína patrón qué pico en el cromatograma de la muestra es originado por la cafeína.
2. Construcción de la curva de calibrado: área del pico frente a concentración.
3. Calcular la concentración de la muestra según la curva de calibrado: tomar el área de pico de la muestra e interpolar el valor en la curva de calibrado para determinar la concentración de cafeína en mg/mL. Calcular la media y desviación estándar. Incluir correcciones por dilución en los cálculos.

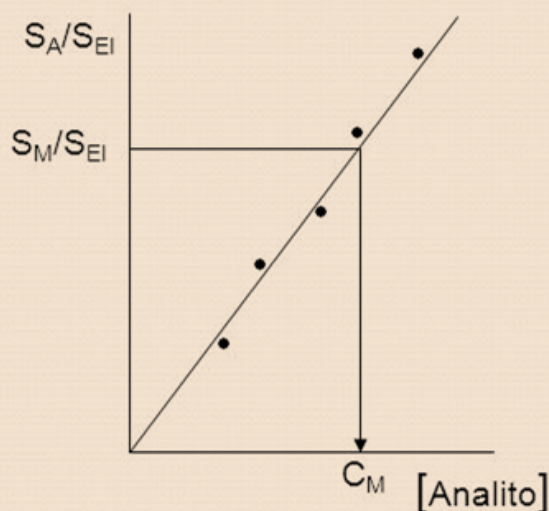
Cuestiones:



1. ¿A qué término inglés corresponden las siglas HPLC y cuál es su significado?
2. - ¿En qué se diferencian HPLC en fase normal y en fase inversa?
3. ¿En qué se diferencian elución isocrática y elución en gradiente? Y ¿en qué se parecen la elución en gradiente en HPLC y la programación de temperaturas en GC?.
4. - Los picos (más o menos definidos) que aparecen antes de la cafeína en las inyecciones de las muestras: ¿A qué pueden deberse? ¿Son más o menos polares que la cafeína?.

CALIBRADO POR PATRÓN INTERNO

Calibración interna



$$y = mx + b$$

(m y b por regresión lineal)

$$S_M / S_{EI} = m \cdot C_M + b \Rightarrow C_M = \frac{S_M / S_{EI} - b}{m}$$

Procedimiento

- 1) Una cantidad fija de una sustancia (estándar interno) se añade tanto a la muestra como a los estándares
- 2) Se determinan las respuestas del analito y del estándar interno
- 3) Se calcula el cociente de los dos resultados
- 4) Se representan los datos cociente de señales/concentración de analito
- 5) Se ajustan los datos a una recta
- 6) Se determina la concentración de analito en la muestra por interpolación en la recta de calibrado



PRÁCTICA GC

*DETERMINACIÓN DE ALCOHOLES
VOLÁTILES*

CROMATOGRAFÍA DE GASES. PATRÓN INTERNO

- Disolución madre EtOH concentración 1% en metanol
- Disolución madre butanol concentración 1 % en metanol

Tabla con patrón interno butanol

PATRÓN N	V disolución EtOH	V disolución butanol	V MeOH	Conc EtOH
Branco	0	0,25	0,75	0
1	0,05	0,25	0,70	0,05
2	0,1	0,25	0,65	0,1
3	0,25	0,25	0,5	0,25
4	0,5	0,25	0,25	0,5

V final = 1 mL

CROMATOGRAFÍA DE GASES.

PARÁMETROS DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

- T inyector: 230 °C
- Split flow: 50 mL/min
- Split ratio: 50
- T horno: 35 °C
- T detector: 200 °C
- T filamento: 250 °C
- Flujo de gas de referencia: 1 mL/min



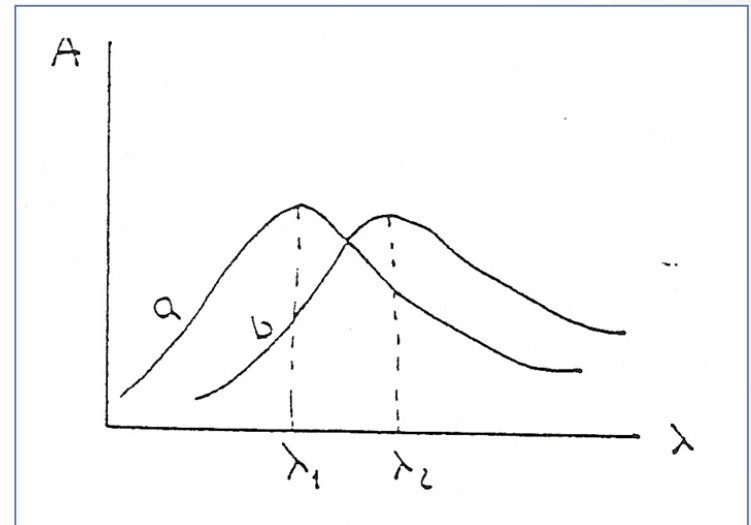
FUNDAMENTOS TEÓRICO-PRÁCTICOS DE LAS TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS

Absorción Molecular UV-VIS: Requerimientos de la ley de Beer

Ley de Beer

$$A = \epsilon bc$$

1. Radiación perfectamente monocromática
2. Medio ópticamente homogéneo que no disperse la radiación
3. Haz estrictamente paralelo
4. Moléculas absorbentes separadas para evitar interferencias

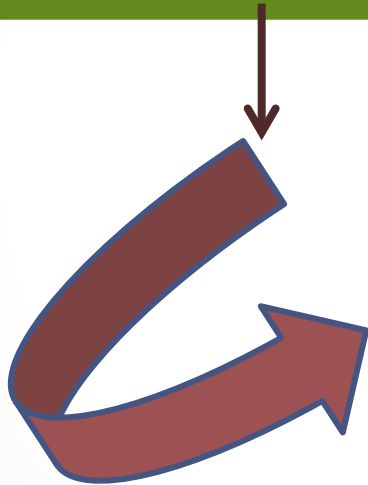


Absorción Molecular UV-VIS: LIMITACIONES de la ley de Beer

Ley de Beer

$$A = \epsilon bc$$

b : pocas excepciones



1. REALES o PROPIAS
2. QUÍMICAS
3. INSTRUMENTALES

Absorción Molecular UV-VIS:

Limitaciones a la aplicabilidad de la ley de Beer

1. *Limitaciones propias de la ley de Beer*

$$A = \epsilon bc$$

La ley de Beer describe correctamente el comportamiento de absorción de un medio que contiene **concentraciones de analito relativamente bajas**.

- A concentraciones altas ($[] > 0.01M$), d_{media} moléculas $\downarrow \Rightarrow$ cada molécula altera la distribución de carga de las moléculas vecinas $\Rightarrow$ alteración absorción a una λ
- $\downarrow$ [analito] $\uparrow$ [electrolitos] $\Rightarrow$ dilución
- Moléculas o iones grandes
- ϵ depende del índice de refracción del medio

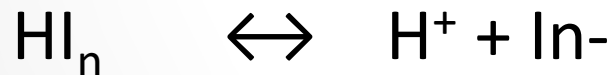
Absorción Molecular UV-VIS:

Limitaciones a la aplicabilidad de la ley de Beer

2. Desviaciones químicas

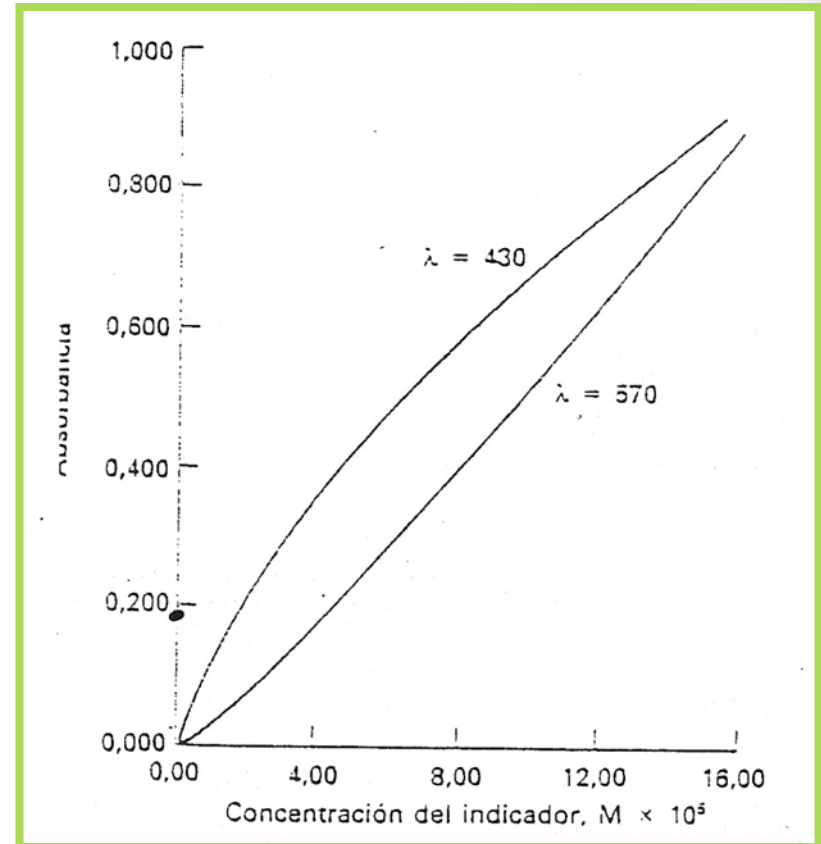
Analito : - se disocia
- se asocia
- reacciona con el disolvente

Desviación de la ley de Beer para HI_n



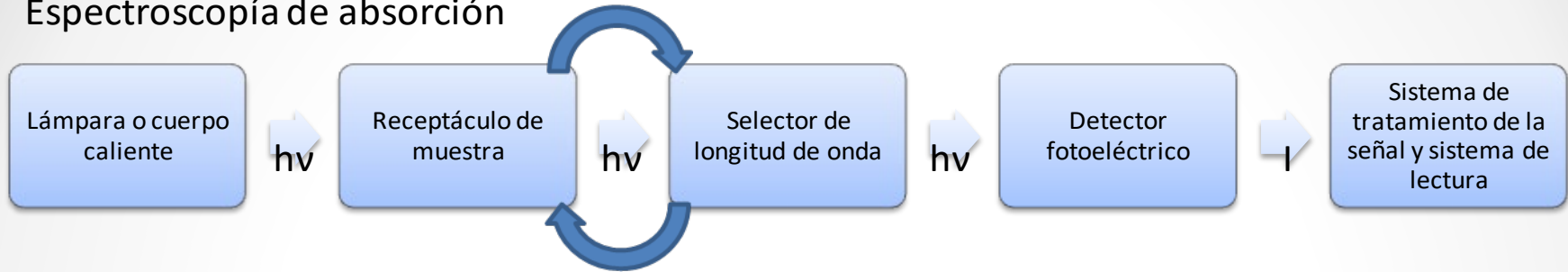
color 1
430 nm
(rojo)

color 2
570 nm
(verde)



Absorción Molecular UV-VIS: Instrumentación

Espectroscopía de absorción



UV-VIS

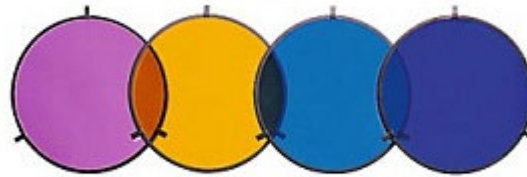
Lámpara	Tipo de fuente	Región	Longitudes de onda
Deuterio e hidrógeno	Continua	UV	160-375 nm
Filamento de wolframio	Continua	VIS, IR cercano	350-2500 nm
Arco de xenón	Continua	UV, VIS, IR cercano	200-1000 nm

Absorción Molecular UV-VIS:

Instrumentación: Selectores de Longitud de Onda

Filtros de : absorción
 interferencia

FOTOMETROS



Monocromadores : prisma
 red



ESPECTROFOTOMETROS



Absorción Molecular UV-VIS:

Instrumentación: Recipientes para la Muestra

Material de construcción :

UV < 350 nm cuarzo ó sílice fundida

VIS 350-2000 nm vidrios de silicato

IR cercano

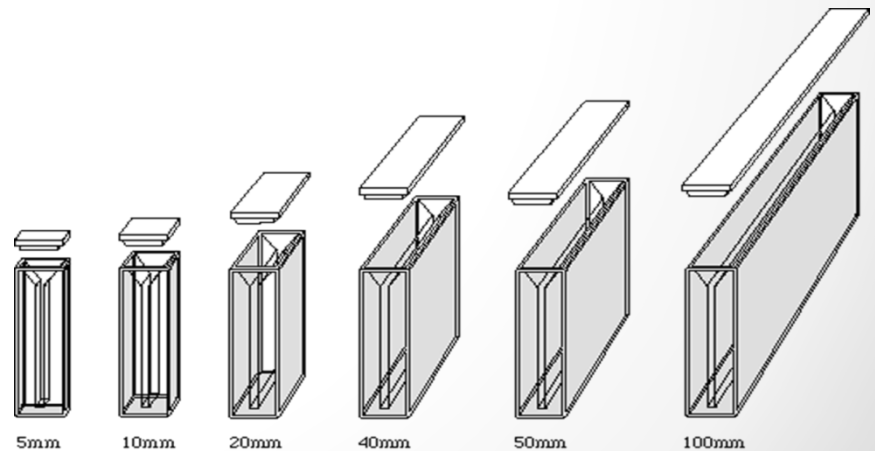
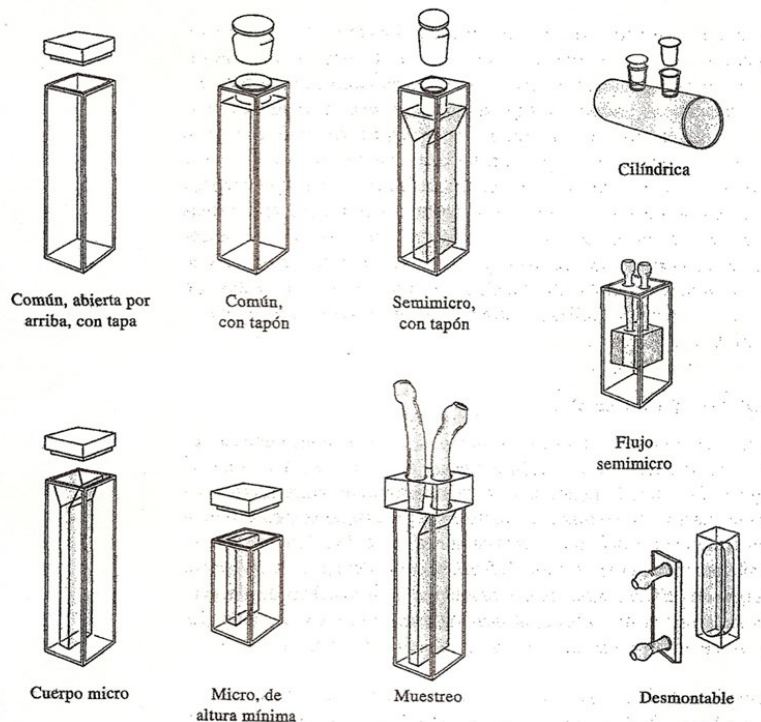
VIS 350-900 nm plástico

Espesor: 1 cm (desde 0 hasta 10 cm)

Formas: cilíndricas o rectangulares

Limpieza

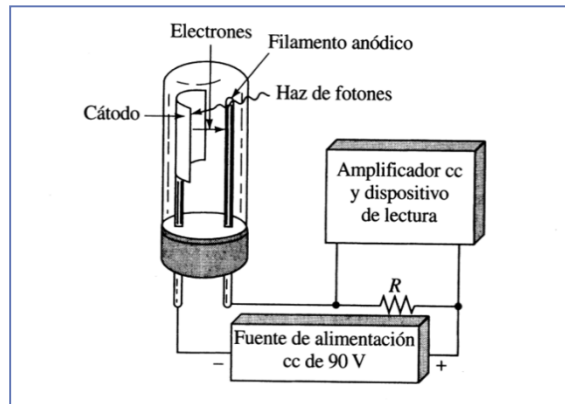
Cubetas de diferente longitud:
modificadas internamente pero no externamente



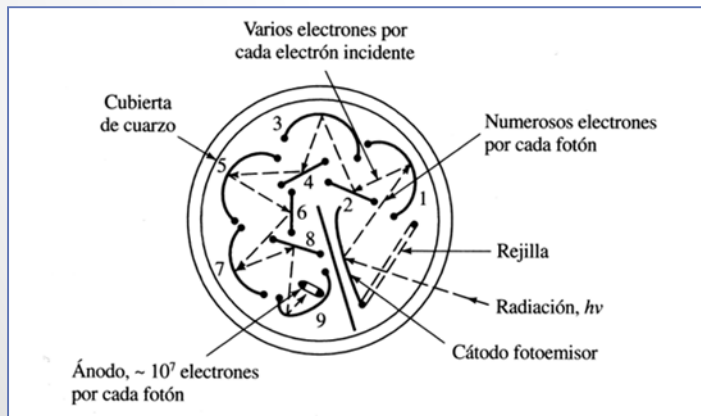
Absorción Molecular UV-VIS:

Instrumentación: Detectores

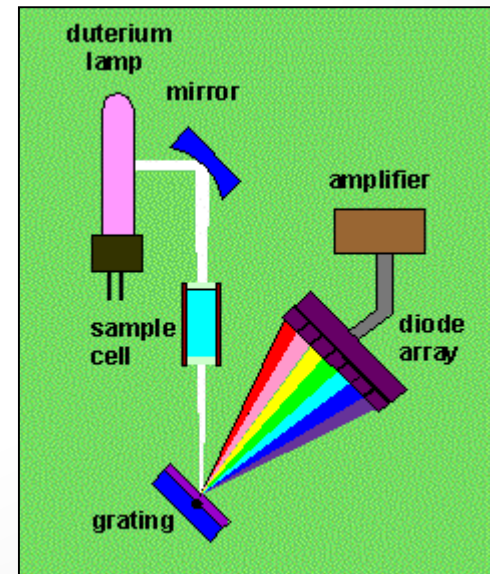
Fototubo de vacío



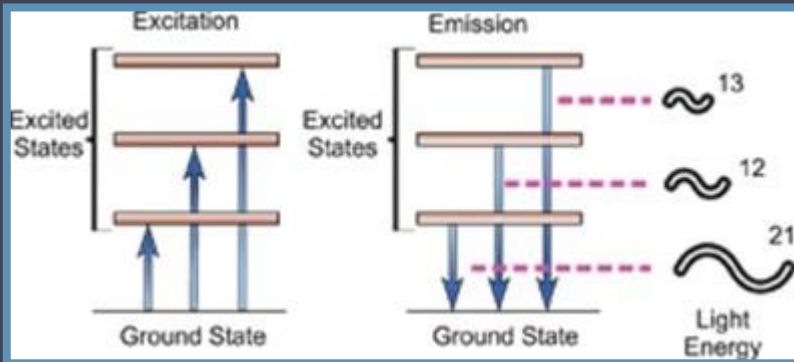
Tubos fotomultiplicadores



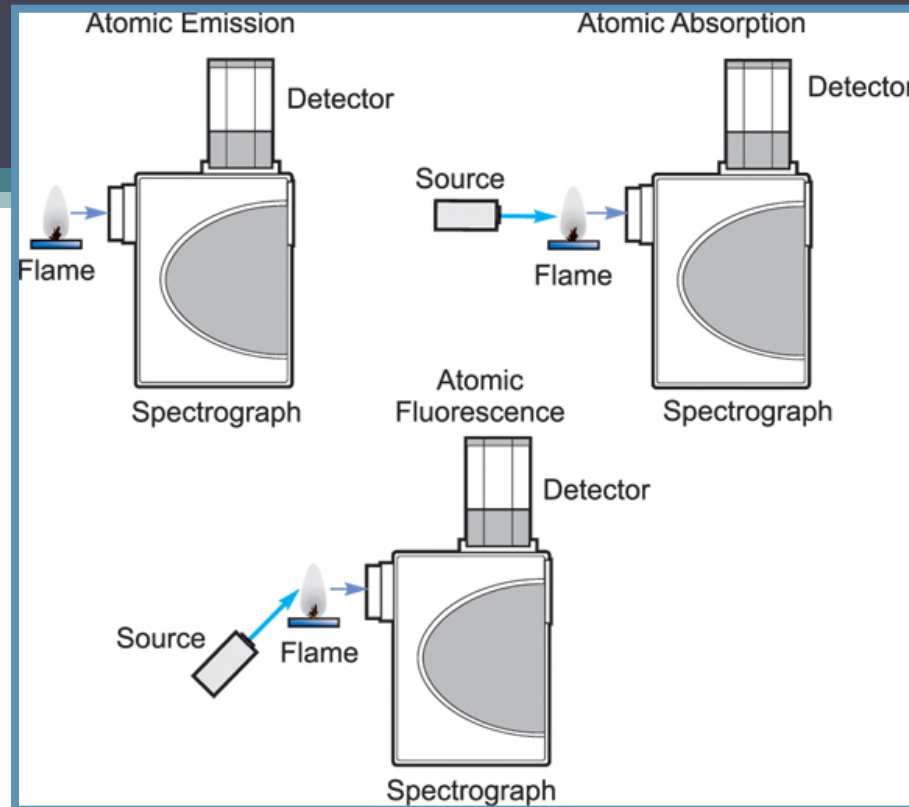
Detectores de diodos



ESPECTROSCOPÍA ATÓMICA



- 1.- Espectroscopía de Absorción Atómica
- 2.- Espectroscopía de Emisión Atómica
- 3.- Espectroscopía de Fluorescencia Atómica



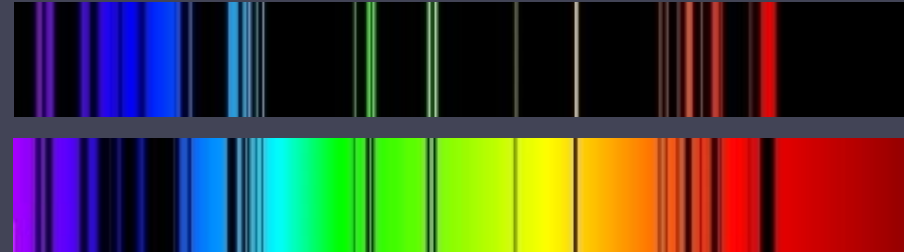
ESPECTROS ATÓMICOS

<http://herramientas.educa.madrid.org/tabla/espectros/sp/espectro.html>

MUESTRA → ÁTOMOS → EMISIÓN

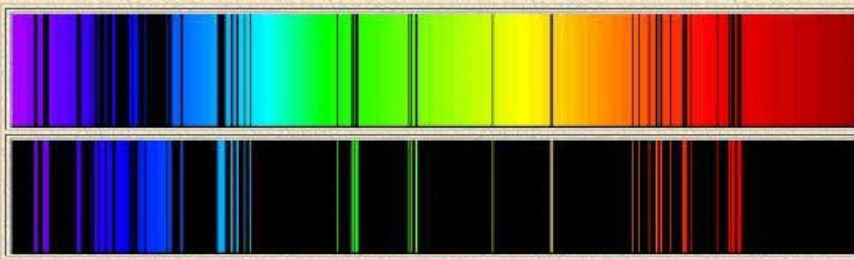
→ ABSORCIÓN

→ FLUORESCENCIA



SODIO

ESPECTROS DE ABSORCIÓN Y DE EMISIÓN



<http://casanchi.com/fis/espectros/espectros01.htm>

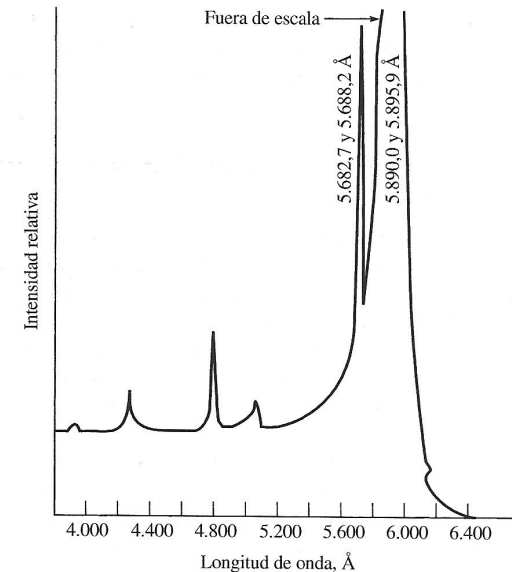


Figura 8-4. Fragmento del espectro de emisión de llama del sodio.

Espectrofotometría de absorción atómica

Esta técnica es muy sensible, precisa y específica, y es ampliamente utilizada en el laboratorio para determinar elementos químicos, como Li, Al, Cu, Fe, Zn y otros metales pesados.

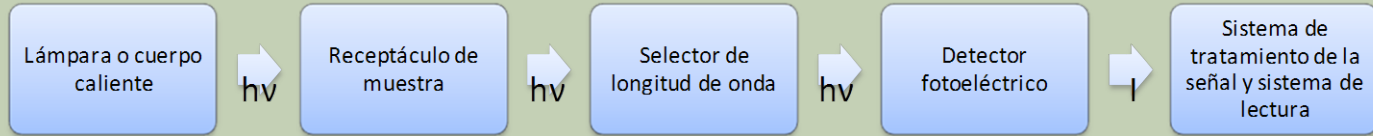
En absorción atómica, la muestra se vaporiza inicialmente, y los elementos se disocian y se reducen a su estado atómico fundamental:



Para ello se utilizan sistemas de atomización que proporcionarán la temperatura suficiente para que los átomos alcancen el estado fundamental

Instrumentación para absorción atómica

Espectroscopía de absorción



espectrofotómetro de
absorción atómica de
llama

Espectrómetro de Absorción
Atómica con Atomización
Electrotérmica (ETAAS)

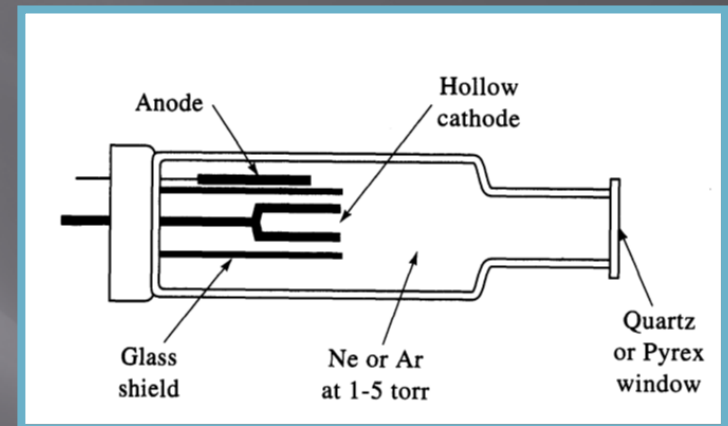
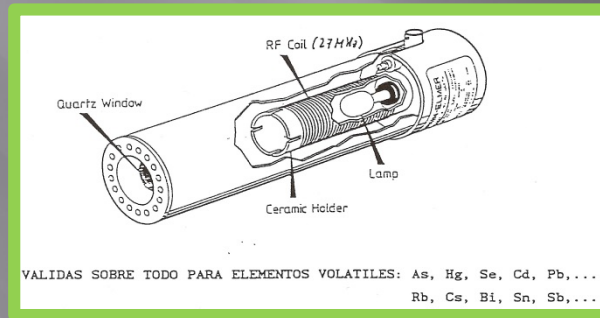


Fuentes de Radiación

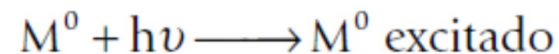
Lámparas Multielementales

TIPOS DE LÁMPARAS

- 1.- Lámparas de cátodo hueco (HCL):
- 2.- Lámparas de descarga sin electrodos (EDL):



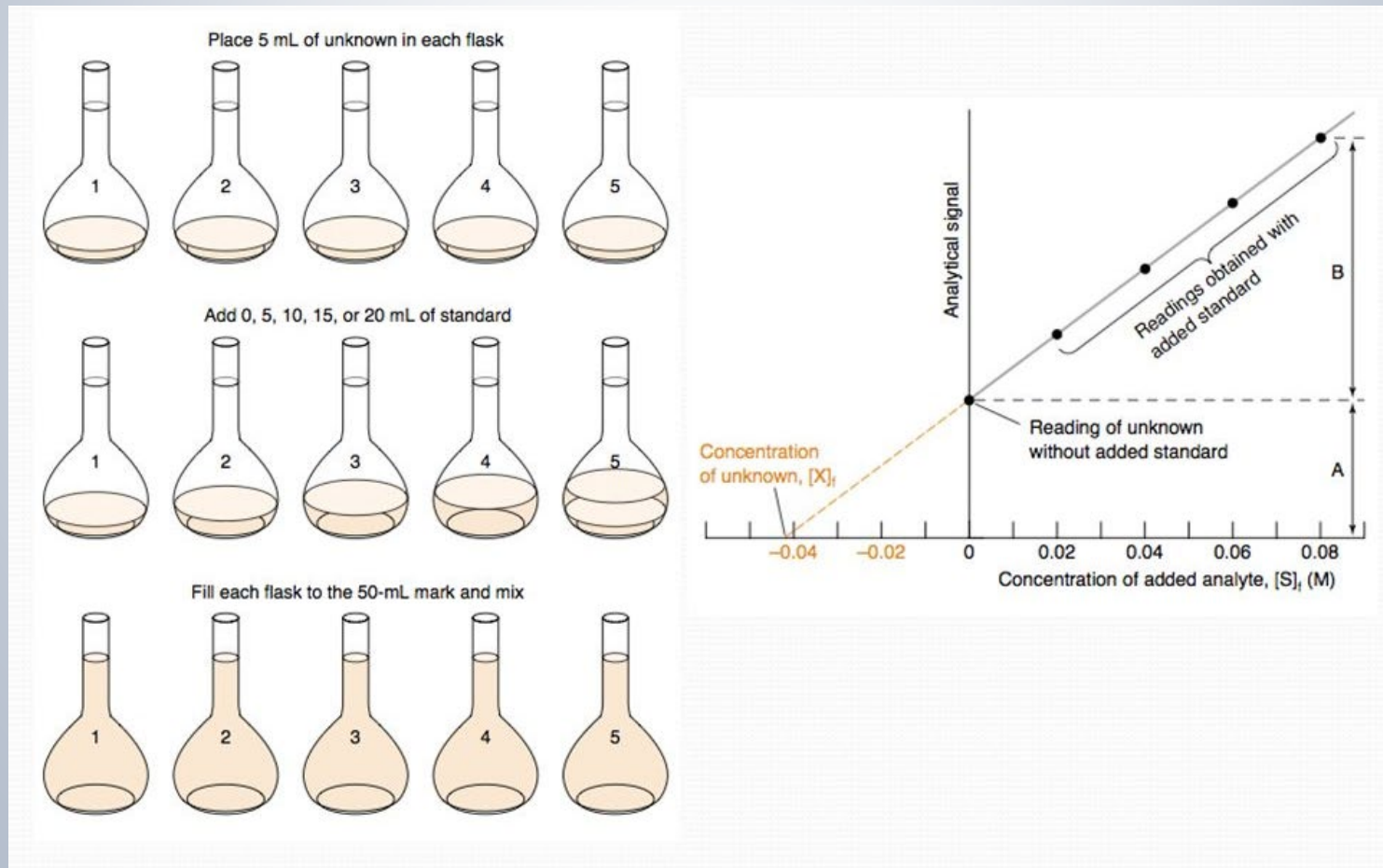
La energía que emite la lámpara la absorben los átomos de la muestra:



El número de átomos en estado basal es más del 99,9% del total de átomos, por lo que la mayoría de los átomos son capaces de absorber la energía radiante emitida por la lámpara de cátodo hueco.

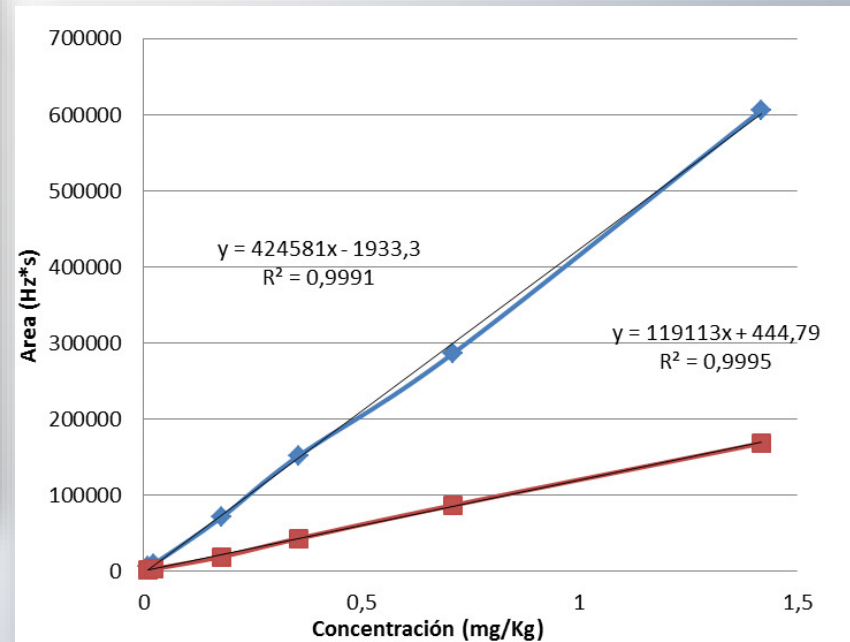
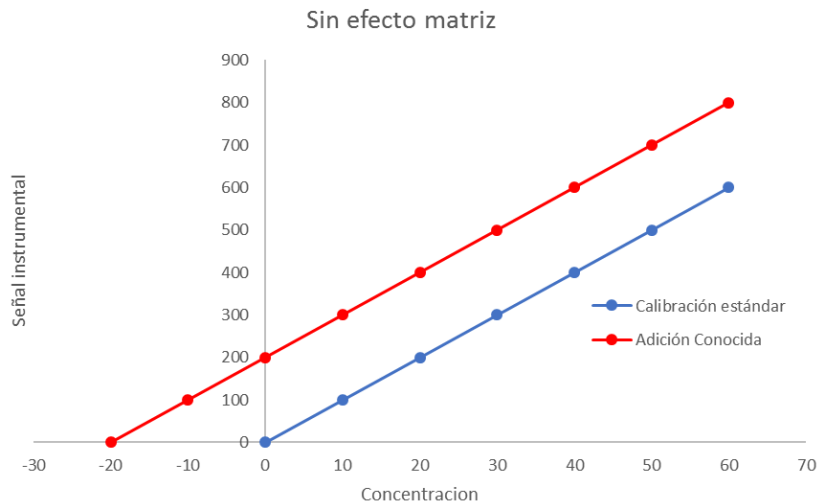
CALIBRADO CON ADICIÓN ESTÁNDAR

Apropiado cuando la composición de la muestra es desconocida o compleja y afecta a la señal analítica.



DETERMINACIÓN DEL EFECTO MATRIZ

Efecto matriz: Cambio que experimenta la señal analítica debido a la matriz de la muestra (todo lo que hay en la muestra excepto el analito)



PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE HIERRO EN
VINO MEDIANTE ESPECTROMETRÍA
DE ABSORCIÓN
ATÓMICA CON LLAMA

PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

OBJETIVOS

1. Conocer la espectroscopía de absorción atómica (AAS) con llama, que hace uso de las líneas atómicas específicas para cada elemento. Este elevado grado de especificidad la convierte en una de las técnicas más adecuadas para la determinación de metales.
2. Determinar Fe en vinos de mesa mediante AAS con llama. La forma más común de introducir la muestra para el análisis es en disolución. La muestra de vino puede introducirse directamente en el nebulizador.
3. Estudiar el “efecto matriz” en muestras líquidas. Se utilizará el método de calibración con patrón externo y se comprobarán los resultados con el método de adición estándar.

INTRODUCCIÓN

- La presencia de algunos metales a nivel traza en los vinos se debe a la naturaleza de los suelos de cultivo de la vid y también al proceso de elaboración.
- El contenido de Fe debe ser inferior a 10 mg/L, ya que concentraciones superiores pueden originar coprecipitación con polifenoles, proteínas o fosfatos, lo cual se manifiesta en la aparición de turbidez, aspecto no deseable en los procesos denominados “quebras del vino”.

Instrumentación:

- Espectrómetro de Absorción/Emisión Atómica con llama de aire/acetileno



PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

REACTIVOS Y MATERIAL

Material:

- 2 vasos de precipitados 250 mL
- 1 matraz aforado de 100 mL
- 1 matraz aforado de 50 mL
- 10 matraces aforados de 25 mL
- Pipetas de 1, 2, 5, 10 y 20 mL.
- 1 varilla

Reactivos y muestras:

- Disolución patrón de Fe: 1000 $\mu\text{g/mL}$ en HNO_3 al 2 %
- HNO_3 concentrado
- HNO_3 al 2 %
- Muestra de vino

Seguridad:

- El ácido nítrico concentrado es corrosivo, por lo que debe manipularse con precaución dentro de la campana extractora.
- El acetileno es tóxico y muy inflamable.

PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

PROCEDIMIENTO

No es necesario llevar a cabo tratamiento alguno de la muestra, ya que como hemos dicho es posible su introducción directa en el nebulizador

1. Preparación de los patrones: método de calibrado externo

- El intervalo de linealidad está comprendido entre 0,5 y 5 $\mu g/mL$ de Fe .
- Preparar 100 mL de una disolución patrón de hierro de 10 $\mu g/mL$ por dilución de la de 1000 $\mu g/mL$, enrasando con ácido nítrico al 2 %.
- A partir de la disolución patrón de hierro de 10 $\mu g/mL$ preparar patrones de 0,5; 1,0; 2,5; 3,5 y 5,0 $\mu g/mL$ en matraces aforados de 25 mL, enrasando con HNO_3 al 2 %.
- Se prepara también un blanco, que consiste en ácido nítrico al 2 %

2. Preparación de los patrones: Método de la adición estándar.

Calibración por el método de adición estándar: Las disoluciones patrón para la curva de adición estándar se preparan de forma similar a la del calibrado externo, adicionando en matraces de 25 mL los volúmenes de disolución patrón de hierro de 10 $\mu g/mL$ necesarios para cubrir el rango de 0.0 a 5.0 $\mu g/mL$. Previamente a la adición de los patrones, se introducen en cada matraz un volumen fijo de 10 mL de la muestra de vino. Finalmente, las disoluciones (vino más el volumen correspondiente de patrón de hierro) se enrasan con ácido nítrico al 2 %.

NOTA: El contenido de hierro en los vinos es variable y en algún caso es necesario diluir la muestra con agua destilada para que la concentración se encuentre en el intervalo lineal indicado anteriormente.

PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

PROCEDIMIENTO

3. Preparación de la muestra:

Diluir la muestra de la forma adecuada para realizar la medida en función del contenido de hierro.

El análisis de la muestra se realizará por quintuplicado.

RESIDUOS:

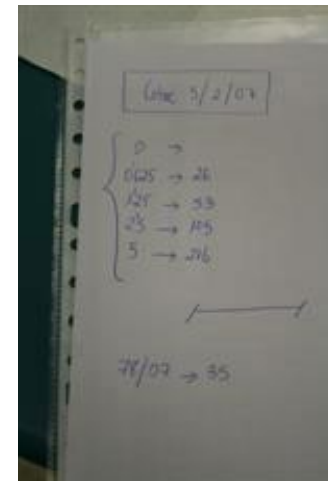
Cualquier disolución conteniendo ácidos (ácido nítrico) será depositada en el correspondiente recipiente de recogida de residuos al final del experimento.

4. Medida Instrumental:

Trabajando en modo "Energy", se selecciona la longitud de onda de 248,3 nm (ancho de rendija de 0.2 nm) con la lámpara de cátodo hueco encendida (30 Ma según el fabricante). A continuación se posiciona el sistema nebulizador-mechero a la altura correspondiente al paso de la radiación de la lámpara tangente a la parte superior del mismo. En ese momento, se ajusta el cero instrumental del equipo y se procede a encender el atomizador (llama aire acetileno oxidante). Aspirando la disolución de hierro de concentración intermedia y trabajando en modo "Energy" se posiciona el sistema mechero nebulizador y se ajusta el caudal de aspiración de tal forma que se obtenga la mayor intensidad de energía. Finalmente, aspirando la disolución de blanco (ácido nítrico al 2%) se hace el cero de absorbancia. A continuación, se mide la absorbancia de los patrones y de las muestras trabajando en modo "Data". La concentración en la muestra se calcula por interpolación en la recta de calibrado y en la recta de adición estándar obtenida a partir de las disoluciones patrón medidas.

AAS (Llama): *Fe en vinos*

Procedimiento



PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS Y CUESTIONES

1. Establecer la curva de calibrado con patrón externo, representarla gráficamente y ajustarla por mínimos cuadrados.

Resultados:

$[Fe] \mu g/mL$	Abs

Ajuste por mínimos cuadrados:

Ecuación de la recta:

2. Establecer la recta de adición estándar para el procedimiento de preparación de la muestra, representarla gráficamente y ajustarla. ¿Existen problemas de efecto matriz?

Resultados:

$[Fe] \mu g/mL$	Abs

Ajuste por mínimos cuadrados:

Ecuación de la recta:

Calcular la concentración de hierro en las muestras de vinos.

Muestra Problema: $\pm$ $\mu g/mL Fe$

Nota: Incluir todas las representaciones gráficas

PRÁCTICA AAS

DETERMINACIÓN DE Fe EN VINOS

TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS Y CUESTIONES

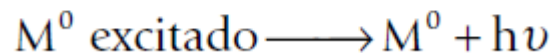
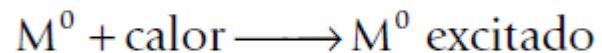
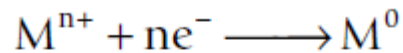
1. Comparar las ecuaciones obtenidas para las rectas de calibrado y adición.
2. Elegir la forma de calibración más adecuada justificándolo adecuadamente.
3. Calcular la concentración de Fe en la muestra problema.
4. Qué se puede decir acerca de la precisión del método?
5. Si la sensibilidad de la técnica utilizada no fuese la adecuada (poco sensible)
6. ¿Qué otra técnica atómica se podría utilizar?



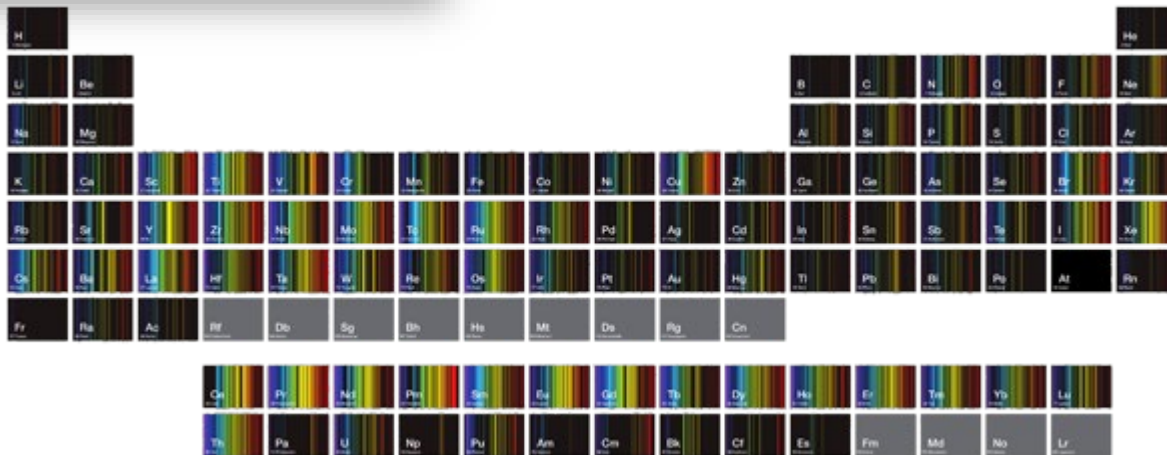
VISIÓN GENERAL DE LA ESPECTROSCOPÍA DE EMISIÓN ATÓMICA

Fotometría de emisión en llama

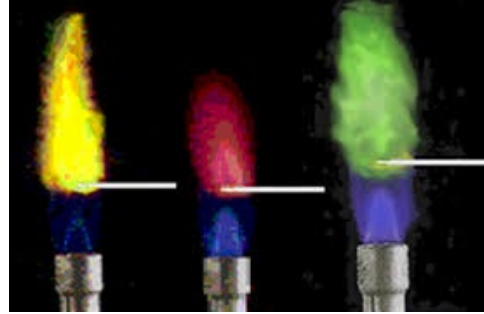
- La fotometría de emisión en llama consiste en la excitación térmica de los átomos mediante el empleo de una llama, de forma que éstos, al volver a su nivel basal de energía, liberan esa energía en forma de luz de una longitud de onda característica de cada elemento:



En este caso **no se necesita una fuente de emisión de radiación**, puesto que es la propia muestra la que genera su emisión. La intensidad de esa energía emitida por los átomos en la llama es directamente proporcional al número de átomos excitados y, por tanto, también a la concentración en la muestra.



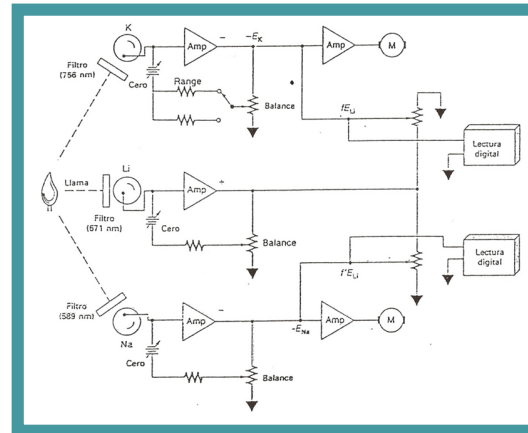
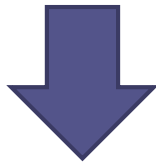
Fotometría de emisión en llama



Emisión de radiación por gotas de disoluciones de sales de **sodio** (luz amarilla, 589 nm), **litio** (roja, 760 nm) y **bario** (verde) depositadas en sendos alambres de platino.

calcio (luz rojo amarillenta, 622 nm), **potasio** (violeta, 766 nm)

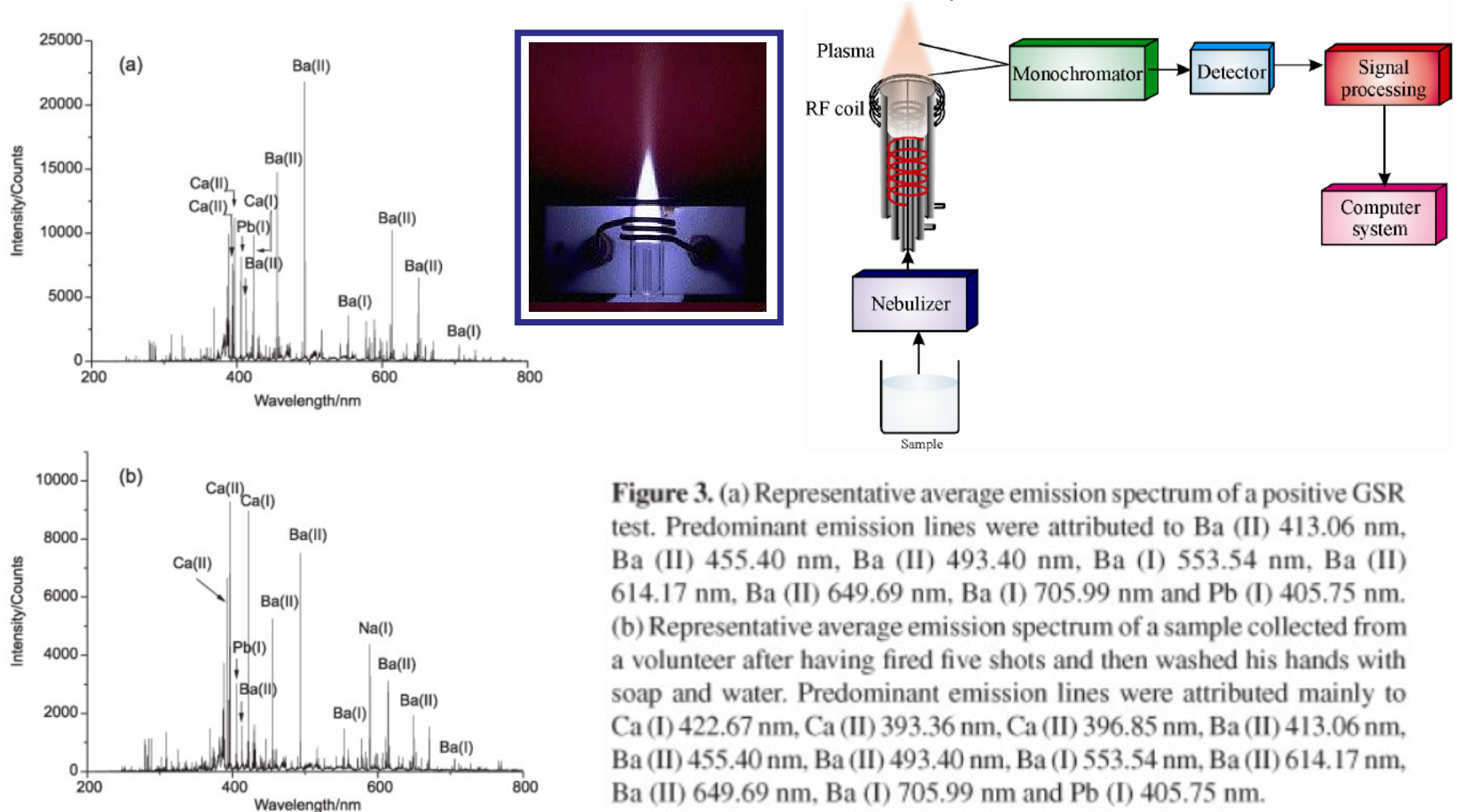
La fotometría de llama se ha utilizado en el **laboratorio clínico** para la cuantificación de la **concentración de elementos abundantes**, como **sodio, potasio y litio** en líquidos biológicos, que son fácilmente excitables en la llama, pero esta técnica ya se usa muy poco.



Fotómetro de 3 canales para Na, Li y K

Espectroscopía de emisión atómica por plasma

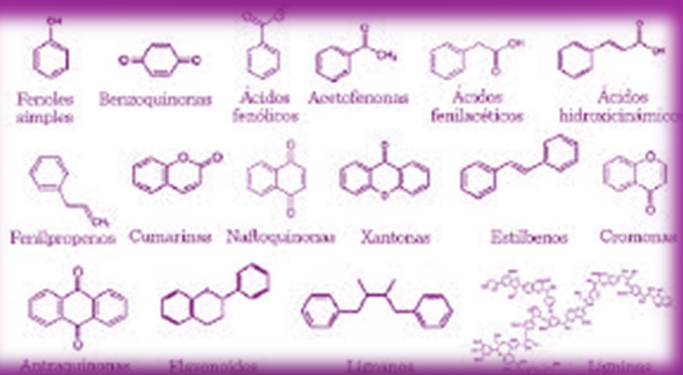
Análisis multielemental: todos los átomos de un espécimen se excitan a la vez.





PRÁCTICA ESPECTROFOTOMETRÍA MOLECULAR UV-VIS

DETERMINACIÓN DE POLIFENOIS TOTAIS EN VIÑOS



PRÁCTICA UV-VIS

DETERMINACIÓN DE POLIFENOIS TOTAIS EN VIÑOS

1. Obxectivo

O obxectivo deste PNT é a determinación de compostos fenólicos no viño.

2. Xeral

Os compostos fenólicos son metabolitos secundarios que se encontran en todos os tecidos das plantas. No viño, proceden das distintas partes da uva e son extraídos durante o proceso de vinificación. A gran diversidade de familias existentes fai que se poidan encontrar en forma soluble (antocianos) ou polimerizada de solubilidad variable (taninos). Ademais, son especialmente interesantes polas súas propiedades hixiénicas bactericidas, antioxidantes, vitamínicas e protectoras de enfermidades cardiovasculares.

3. Alcance

Desenvolvemento dos módulos de Análise Instrumental (LACC) e Operacións de Análise Química (OL).

4. Definicións

Os polifenoles son compostos que se caracterizan por ter unha estrutura básica formada por, polo menos, un anel bencénico substituído nunha ou máis posicións por grupos hidroxilo.

5. Fundamento teórico

O método baséase no máximo de absorción que presentan os aneis bencénicos dos compostos fenólicos a lonxitude de onda de 280 nm.

PRÁCTICA UV-VIS

DETERMINACIÓN DE POLIFENOIS TOTAIS EN VIÑOS

6. Material e equipamento

- ☐ Espectrofotómetro UV-Vis
- ☐ Cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico
- ☐ 2 matraces aforados de 100 mL
- ☐ 4 matraces aforados de 25 mL
- ☐ Vaso de precipitados de 50 mL
- ☐ Vaso de precipitados de 100 mL
- ☐ Pipeta automática de volumen variable 0,5-5 mL
- ☐ 1 pipeta aforada de 10 mL

7. Reactivos

- ☐ + catequina
- ☐ Etanol

PRÁCTICA UV-VIS

DETERMINACIÓN DE POLIFENOIS TOTAIS EN VIÑOS

8. Metodoloxía

8.1 Preparación da recta de calibrado

- ❑ Pesar exactamente 0,100 g de catequina, disolver en etanol absoluto e enrasar nun matraz aforado de 100 mL co mesmo disolvente.
- ❑ Preparar unha disolución de traballo de catequina de 0,1 g/L. Para iso tómanse 10 mL da disolución anterior, vértense nun matraz aforado de 100 mL e enrásase con auga destilada.
- ❑ Preparar 4 patróns de concentración 5, 10, 15 e 20 mg/L, respectivamente, de catequina. Para iso tómanse 1,25, 2,5, 3,75 e 5 mL da disolución de traballo cunha pipeta automática e vértense respectivamente en catro matraces de 25 mL enrasando con auga destilada.
- ❑ Medir a absorbancia destas catro disolucións a lonxitude de onda de 280 nm para obter así a recta de calibrado. Usar como branco unha disolución 10:90 de etanol en auga.

8.2 Preparación e medida da mostra

- ❑ Se a mostra é de viño branco diluírase 20 veces. Para iso deberanse tomar 1,25 mL de mostra, verter nun matraz aforado de 25 mL e enrasar con auga destilada.
- ❑ Se a mostra é de viño tinto haberá que diluír 100 veces tomando 1 mL de mostra, verter nun matraz de 100 mL e enrasar con auga destilada.
- ❑ Medir a absorbancia da mostra a lonxitude de onda de 280 nm e obter a concentración de polifenoles totales a partir da recta de calibrado.

9. Valor de referencia

1000 - 4000 mg/L para viños tintos e arredor dos 250 mg/L para viños brancos.

FIN

*Graciñas
pola vosa
atención*