

Química Analítica

Instrumental

Guía de Técnicas seleccionadas

- **Espectrofotometría**
- **Potenciometría**
- **Fotometría de llama**
- **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)**

Bioq. Patricia Tierra
Jefe de trabajos Prácticos

Espectrofotómetro para visible y ultravioleta

La mayoría de los instrumentos se hallan preparados para trabajar indistintamente en ambas regiones, esto se debe a que el mecanismo de absorción es el mismo para las dos regiones citadas.

La radiación visible y ultravioleta excita a los electrones mas exteriores de los átomos y moléculas. Esta excitación puede ser provocada por un choque electrónico, por absorción de radiación de la frecuencia apropiada o, por temperaturas elevadas.

La longitud de onda de la radiación absorbida es inversamente proporcional a la energía de excitación. Los grupos mas fácilmente activados absorben a longitud de onda mayores. Las configuraciones moleculares que poseen la propiedad de absorber radiación son coloreadas en la luz visible o aparecerían coloreadas en la luz ultravioleta si el ojo humano fuera sensible a esta radiación. Tales grupos de átomos reciben el nombre de cromóforos. En los compuestos orgánicos, la absorción esta relacionada frecuentemente con los dobles enlaces entre átomos de carbono, nitrógeno oxígeno o azufre.

Análisis cuantitativo en la región ultravioleta: El principal inconveniente que se presenta es la elección del disolvente. Debe cumplir con dos condiciones: ser disolvente de la muestra y ser además transparente en la región espectral usada. El agua es generalmente excelente para esta última condición pero no es buen disolvente para los compuestos orgánicos

PARTE PRÁCTICA:

Fundamento teórico: La absorción de radiación electromagnética por parte de una solución puede ser empleada para la determinación de la concentración de la misma. Este fenómeno es interpretado por la Ley de Lambert y Beer que relaciona la intensidad de la radiación electromagnética que incide sobre la solución y la intensidad transmitida

$$A = \log \frac{I_0}{I} = a \cdot b \cdot c$$

como: $T = \frac{I}{I_0}$ por lo tanto $A = \log \frac{1}{T} = -\log T$

donde:

A = absorbancia de la solución

I_0 = intensidad de la radiación incidente

I = intensidad de la radiación transmitida

a = absortividad molar o coeficiente molar de extinción

b = espesor del medio absorbente en centímetros

c = concentración de la solución (mol/litro)

T = transmitancia de la solución (por ciento)

Este método es utilizado para determinar la concentración de una sustancia cuya solución es coloreada o bien adquiere color por reacción frente a un reactivo específico.

Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

Equipo empleado: Espectrofotómetro Espectronic 20

Con este modelo se puede trabajar en un intervalo de longitudes de onda de 380-625 nm.

Operación:

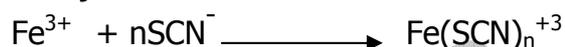
- 1) Encender el equipo con la perilla 2 y dejar que se estabilice por 5'.
- 2) Seleccionar la longitud de onda al valor deseado con la perilla 1.
- 3) Ajuste del 0%T: Con la perilla 2 llevar a 0% de T, con el portatubo vacío y cubierto.
- 4) Ajuste del 100%T: Con la perilla 3 y colocando en el portatubo el tubo con solución de referencia o blanco, lleno hasta la mitad y haciendo coincidir la marca del tubo con la del portatubo. Tapar.

En adelante no modificar los ajustes.

- 5) Retirar el tubo con el blanco y colocar la muestra incógnita o los testigos y leer la %T o A, de la misma forma; tubo lleno hasta la mitad y haciendo coincidir las marcas del tubo y portatubo.

Parte Práctica: Determinación de hierro

Fundamento del método: Los iones férricos en presencia de los iones tiocianato dan lugar a la formación de complejos intensamente coloreados de rojo de acuerdo a la siguiente reacción:



donde n:1,2,3,...6

Para bajas concentraciones de tiocianato, la especie preponderante es $\text{Fe}(\text{SCN})^{++}$, mientras que para concentraciones de tiocianato 0,1 M es $\text{Fe}(\text{SCN})_2$, para concentraciones de tiocianato superiores los complejos que predominan son las cargadas negativamente

El rango de concentración recomendado es de 0,015 a 0,25mg de hierro en 100ml de solución. El color se desarrolla inmediatamente y es bastante estable por 30 minutos, si la solución contiene H_2O_2 y esta protegida de la luz. Tanto el color como la absorción dependen de la concentración del tiocianato, por lo tanto es deseable usar un exceso de reactivo con lo cual la ley de Beer se cumple perfectamente. El efecto del ácido sobre el color depende de su tipo y concentración. No debe usarse ácido sulfúrico pues los iones sulfatos forman complejos con los iones férricos, disminuyendo la intensidad de color a medida que aumenta la concentración de ácido. Debe usarse ácido nítrico o clorhídrico.

Interferencias: El cobre cúprico en cantidades mayores de 2mg /l, el mercurio mercúrico en cantidades superiores a 1mg/l y el bismuto en cantidades que superen los 10mg/l, dan lugar a la formación de iones complejos con el tiocianato. El cinc, cadmio, níquel, cobalto y manganeso en grandes cantidades, dan complejos coloreados. Fosfatos fluoruros y oxalatos aun en pequeñas cantidades interfieren formando complejos estables con los iones férricos. Nitratos y cloruros tienen pequeño efecto, aun cuando estén en cantidades grandes.

Reactivos:

a) Solución Standard de hierro: 1ml =0,05mg de Fe

Disolver 0,3511g de $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot \text{SO}_4(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 5ml de ácido nítrico (1:1). Diluir a 1l en matraz aforado.

Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

b) Agua oxigenada 3%: Diluir 10ml de H_2O_2 (30%) con agua destilada en un matraz aforado de 100ml.

c) Solución de tiocianato de amonio: Disolver 115g de $SCN(NH_4)_2$ en 300ml de agua destilada, filtrar y diluir a 1l en matraz aforado.

Curva de calibración:

Los patrones de calibración se preparan colocando las alícuotas indicadas debajo.

volumen.sol.Standard	volumen.final patron	concentracion .sol. patron.
ml	ml	mg/ml
1	100	0,0005
2	100	0,0010
3	100	0.0015
4	100	0,0020

Transferir 1, 2, 3 y 4ml de solución Standard de hierro a matraces aforados de 100ml y diluir con 10ml de agua destilada. En otro matraz aforado de 100ml agregar 10ml de agua destilada para ser utilizado como blanco.

A cada matraz aforado, en el orden indicado y mezclando después de cada agregado, colocar 5ml de ácido nítrico (1:1); 50ml de agua destilada, 1ml de agua oxigenada (3%) y 20ml de $SCNNH_4$. Llevar a 100ml y mezclar.

Medición de la absorbancia de los patrones:

Transferir una porción de cada solución al tubo de lectura y medir la absorbancia contra el blanco a 480nm, inmediatamente de desarrollado el color. Graficar la absorbancia en función de los miligramos de hierro de cada solución patrón.

Muestra problema: Transferir 1ml de solución problema a un matraz de 100ml, agregar suficiente nítrico (1: 1) asegurando un contenido total de 5ml. Diluir hasta 60ml con agua destilada. Agregar 1ml de agua oxigenada y mezclar. Agregar 20ml de tiocianato de amonio, diluir a la marca y mezclar. Transferir una porción adecuada al tubo de lectura y medir la absorbancia a 480nm. Con el valor obtenido buscar en la curva de calibración los miligramos de hierro presentes en la solución incógnita.

Calcular la concentración de hierro férrico en gramos /litro.

DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMETRICA DE NITRITOS

Introducción Teórica: Los nitritos representan la forma intermedia, meta-estable y tóxica del nitrógeno inorgánico en el agua. Dada la secuencia de oxidación bacteriana: proteínas → amonio → nitritos → nitratos, los nitritos se convierten en un importante indicador de contaminación, advirtiendo sobre una nitrificación aun incompleta. La corta vida de los nitritos en un proceso normal de nitrificación, conduce a concentraciones reducidas, que, de todas formas, se pueden determinar fácilmente por la alta sensibilidad de la reacción de Griess. La oxidación bacteriana presupone el desarrollo de dos cepas bacterianas:



Normalmente después de algún tiempo se desarrollan colonias suficientes como para asegurar la nitrificación continua por oxidación de amonio y nitritos a igual velocidad. Las aguas subterráneas que contienen nitritos, indican la presencia de focos de putrefacción y descomposición en el suelo (basurales, pozos absorbentes). Los ríos que contienen aguas residuales de uso industrial y comunal presentan a menudo 0,5 a 1ppm de NO_2^- . Las aguas contaminadas contienen generalmente entre 0,1 y 2ppm. En algunos casos especiales también las aguas no contaminadas presentan contenidos relativamente altos de nitritos: las aguas pantanosas contienen de 0,1 a 1ppm y las de lluvia con tormentas eléctricas hasta 0,3ppm.

Dado que los nitritos son oxidados en los procedimientos eficientes de tratamiento del agua, no deberían ser detectables en el agua potable; sin embargo, algunos países permiten cantidades entre 0,005 y 0,1ppm.

Respecto de la toxicidad propia de los nitritos, no es muy importante en los niveles habituales del agua para la población humana, aunque puede ser importante para peces, dependiendo de la especie edad y demás condiciones físico-químicas del agua. Incluso no se considera probable la formación de nitrosaminas cancerígenas a partir de nitritos y aminas del agua, ya que las nitrosaminas no se pueden identificar a un límite de detección de 0,0005ppm, y además en aguas normales el pH es demasiado alcalino, la concentración de reactantes muy bajas y las nitrosaminas son fotosensibles y degradables por plantas y otros organismos.

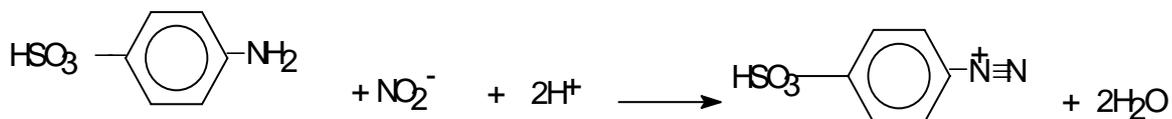
PARTE PRÁCTICA: Muestra para analizar: a determinar

Rango de trabajo: 0,02-0,6ppm de nitritos.

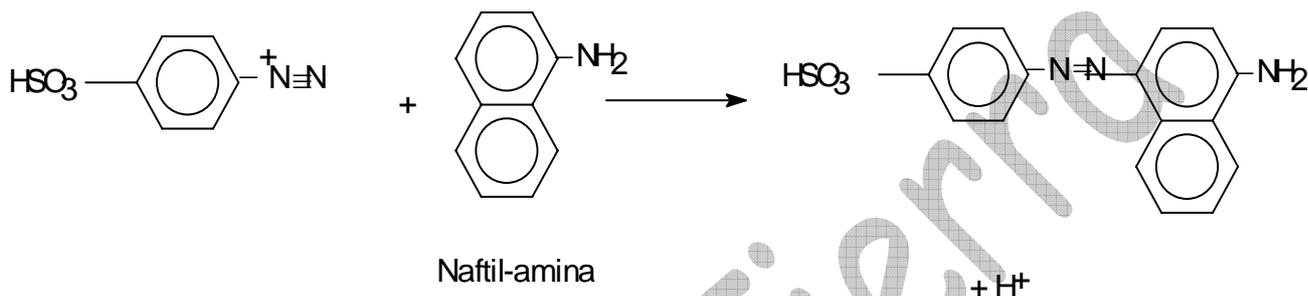
Procedimiento:

Se tratan 50ml de muestra, con 2ml de solución de ácido sulfanílico y 2ml solución de 1-naftílamina, llevar a 100ml en matraz se mezcla bien, y a los 60 minutos de reacción (durante los cuales se debe evitar la radiación solar directa) se mide a 525nm frente a un blanco de reactivos. La curva de calibración se construye con patrones de nitrito de sodio, según tabla. El volumen de la muestra dependerá de su procedencia y origen, y si se trata de un alimento, se harán los cálculos correspondientes.

Fundamento de reacción:



ácido sulfanílico



Reactivos:

1) Sol de ácido sulfanílico: Se calienta 1g de ácido sulfanílico con 15ml de ácido acético 96% p.a. y 15ml de agua destilada y se disuelve añadiendo 270ml de agua destilada caliente. El ácido sulfanílico se disuelve lentamente, por lo que es posible que se deba calentar otra vez. La solución se conserva en frasco pardo y en lugar fresco.

2) Sol de 1-naftilamina: Se disuelven 0,2g de 1-naftilamina p.a. en 10ml de ácido acético 96% y 40ml de agua destilada

3) Sol patrón de nitrito de sodio: Se pesan 0,05g de nitrito de sodio y se diluyen a 1 litro. A partir de esta se preparan los patrones según tabla.

	sn patron	Ac. Sulfanílico	1-naftil- amina	agua destilada
Patron 1	0,8 ml	2 ml	2 ml	llevar a 100ml
Patron 2	1,0 ml	2 ml	2 ml	llevar a 100ml
Patron 3	1,4ml	2 ml	2 ml	llevar a 100ml
Patron 4	1,6 ml	2 ml	2 ml	llevar a 100ml
Patron 5	2,0 ml	2 ml	2 ml	llevar a 100ml

Dejar en reposo 1 hora y luego leer testigos y muestra a 525nm.

Análisis de Aceros

El análisis de acero es uno de los tipos más importantes de análisis aplicado. Las propiedades físicas y químicas de un material ferroso están determinadas por las clases y cantidades de elementos menores que están presentes, y la determinación de estos constituye el análisis de acero. Los elementos siempre presentes en acero son: carbono, manganeso, fósforo, azufre y silicio, los cuales se determinan por su importante efecto sobre las propiedades del material ferroso.

Determinación de manganeso por espectrofotometría

De acuerdo con las cantidades de manganeso generalmente presentes en los aceros (menores que 1o 2%), el mejor método es la determinación colorimétrica como permanganato, luego de la oxidación con peryodato en presencia de ácido fosfórico y nítrico.

Fundamento de la reacción:



Procedimiento:

Pesar 0,5 gr de muestra de acero y colocar en un vaso de 250ml, añadir 50ml de ácido nítrico 1:3 y calentar hasta disolución. Hervir durante unos pocos minutos para eliminar los óxidos de nitrógeno. Añadir con precaución 1gr de $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ y hervir suavemente durante 10 minutos, para oxidar los compuestos de carbono y eliminar el exceso de $\text{S}_2\text{O}_8^{=}$. Si es visible el color del permanganato o se han separado óxidos oscuros de manganeso, añadir sulfito de sodio hasta conseguir una solución clara. Hervir durante unos minutos para eliminar el dióxido de azufre. Enfriar la solución, trasvasar a un matraz de 100ml y llevar a volumen con agua destilada.

Colocar dos alícuotas de 25ml de ésta solución en vasos pequeños. Agregar 5ml de ácido fosfórico 85% a cada uno. Trasvasar una de las soluciones a un matraz de 100ml y llevar a volumen con agua. Reservar ésta solución para usar como blanco en la medición de la absorbancia.

Añadir 0,25gr de KIO_4 al segundo vaso y mantener en ebullición durante 10 minutos. Enfriar, trasvasar a un matraz de 100ml y llevar a volumen con agua. Medir la absorbancia de esta solución a 545 nm, utilizando como blanco la solución mencionada anteriormente. Obtener la concentración de manganeso VII de la curva de calibración e informar el porcentaje de manganeso en la muestra.

Solución patrón de manganeso: Pesar una cantidad de permanganato de potasio, tal que la solución contenga 0,10gr de manganeso en un litro. Añadir 1gr de KIO_4 para mantener al permanganato estable.

Curva de calibración:

Medir con pipeta aforada 5, 10 y 15 ml de la solución patrón de permanganato en matraces de 100ml y llevar a volumen con agua. Medir la absorbancia a 545nm contra blanco de agua. Graficar $abs = f(cc)$. Deberá obtenerse una recta que pase por el origen. Calcular a partir del gráfico la concentración de Mn del acero en %.

Observaciones: La reacción es muy rápida en solución de ácido fosfórico y nítrico. El fosfórico contribuye a facilitar la oxidación del manganeso y evita la precipitación del peryodato férrico y decolora el Fe III por formación de un complejo.

Patricia Tierra

Componentes fenólicos en el vino

En el vino, los fenoles varían, desde compuestos simples, hasta sustancias complejas como los taninos. Estos componentes fenólicos son importantes por distintas razones: proporcionan el color al vino, dan el sabor astringente y olor picante, constituyen una reserva para la reducción del oxígeno (antioxidantes). Estos componentes fenólicos pueden ser de estructura flavonoide o no flavonoide.

Determinación de fenoles totales por espectrofotometría

Método Folin Ciocalteu

Fundamento: El tungstato y el molibdato del reactivo son reducidos por los fenoles a óxidos de coloración azul.

Reactivo: En un balón de un litro se disuelven 50gr de tungstato de sodio y 12,5gr de molibdato de sodio en 350ml de agua. Se añaden 25ml de ácido fosfórico p.a. 85% y 50ml de ácido clorhídrico p.a.. Se calienta a reflujo durante 10hs. Se enfría. Se añaden 75gr de sulfato de litio y gotas de bromo, se hierve 15' bajo campana. El color final deberá ser amarillo. Se pasa a matraz de 1litro y se lleva a volumen con agua destilada. Se homogeneiza, se filtra y se guarda en botella ámbar por 8 meses.

Sol de carbonato de sodio al 20%: Se disuelven 200gr de carbonato de sodio anhidro en 1litro de agua destilada, se filtra a las 24hs.

Sol patrón de fenol: Se pesan 0,5gr de ácido gálico se disuelven en matraz de 100ml con agua destilada.

Curva de calibración: Para trazar la curva de calibrado seguir instrucciones según cuadro.

Preparación de los testigos:

	A	B	C	D	E
Sol patrón	1ml	2ml	3ml	5ml	10ml
Agua dest	llevar a volumen en matraz de 100ml				
Cc final	50ppm	100ppm	150ppm	250ppm	500ppm

Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

Preparación de la curva y muestra: Si la muestra es de vino tinto, se diluye 1/10, y de ahí se toma 1ml. Si es un vino blanco se toma 1ml sin diluir.

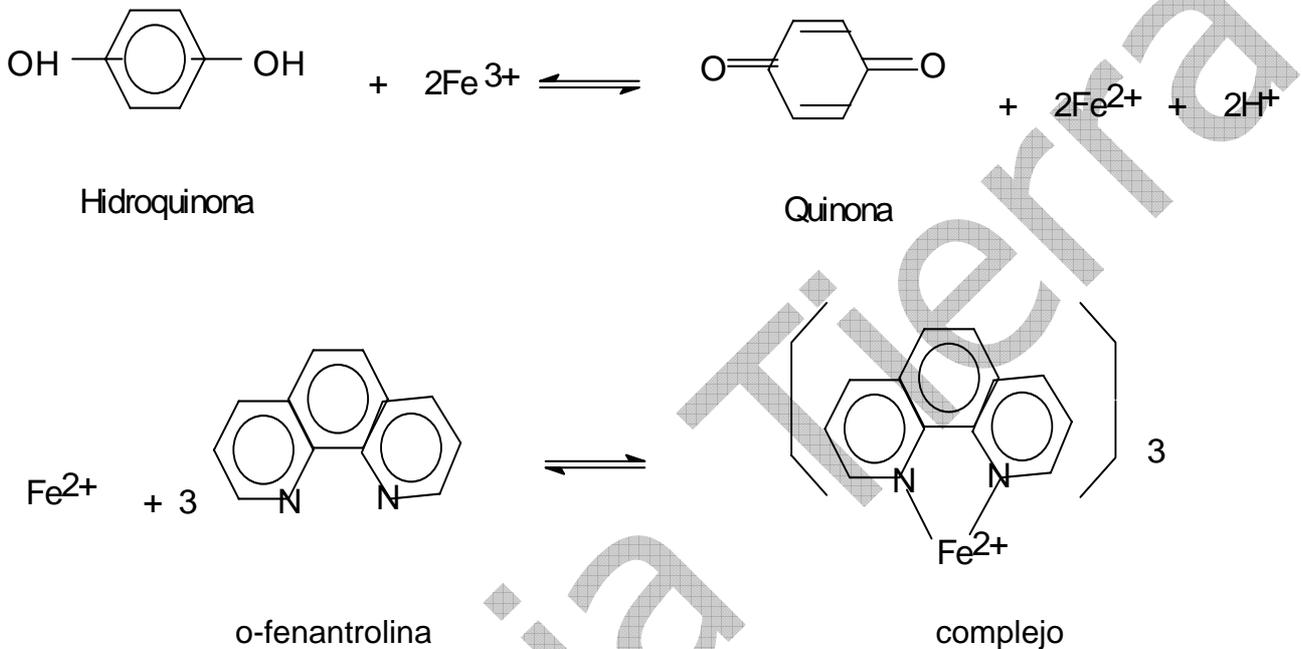
	Blanco	A	B	C	D	E	muestra
Sol test	-	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml	1ml
Agua dest	60ml	60ml	60ml	60ml	60ml	60ml	60ml
Reactivo	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml	5ml
Carbonato	15ml	15ml	15ml	15ml	15ml	15ml	15ml

Llevar a 100ml en matraz con agua destilada y dejar 2hs a 24°C. Leer la absorbancia a 765nm, frente al blanco. Graficar $abs = f(cc)$.

Determinación Espectrofotométrica de Hierro en un medicamento

Muestra: Comprimido vitamínico con hierro, o hierro en solución (gotas).

Fundamento: El Fe^{3+} se reduce a Fe^{2+} con hidroquinona y luego con o-fenantrolina forma un complejo coloreado que absorbe a 508nm.



Reactivos:

Hidroquinona: Disolución recién preparada de 10gr/litro. Guardar en frasco ambar.

Citrato sódico: Disolver 25gr en un litro.

O-fenantrolina: Disolver 2,5gr en 100ml de etanol y añadir 900ml de agua. Guardar en frasco ambar.

Patrón de hierro: Corresponde a una concentración de 0,04mg. Disolver 0,281gr de sulfato ferroso amónico- 6 H_2O en 100ml de agua destilada que contenga 1ml de ácido sulfúrico 98% y aforar a un litro.

Preparación de la muestra:

Si es un comprimido de vitamina con hierro, disolver el mismo en 25ml de HCl 6M en vaso de 100ml, hervir durante 15 minutos. Filtrar directamente en matraz de 100ml, lavar el vaso y el filtro varias veces con pequeñas porciones de agua. Llevar a 100ml y homogeneizar. Diluir 5ml de esta disolución a 100ml. Si la etiqueta del producto indica que la pastilla contiene menos de 15mg de hierro, usar 10ml en lugar de 5ml.

Si el medicamento es en solución, tomar una alícuota que contenga entre 25mg y 15mg de hierro (fijarse en la etiqueta) y llevar a 100ml en matraz, tomar 5ml de esa disolución y llevar a 100ml nuevamente.

Preparación de los testigos:

Tomar 10 ml del patrón de Fe^{2+} y medir el pH. Añadir solución de citrato, gota a gota hasta que el pH sea aproximadamente 3,5 (contar las gotas). Para cada testigo se coloca una cantidad proporcional de citrato según esta prueba.

	Blanco	A	B	C	D	muestra
Sol patrón	-	1ml	2ml	5ml	10ml	10ml
Citrato sódico	4gotas	cantidad en gotas p/ llevar pH a 3,5 según prueba.				
Hidroquinona	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml	2ml
O-fenantrolina	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml	3ml
Agua dest	llevar a 100ml en matraz aforado					
Cc final de Fe	-	0.04	0,08	0,2	0,4	?

Dejar en reposo 10 minutos. Leer la absorbancia a 508nm frente al blanco. Graficar $\text{Abs} = f(\text{cc})$ con los testigos. Usando la curva calcular los mg de hierro en el medicamento.

Fotometría de llama

Determinación fotométrica de sodio

Fundamento: El sodio presenta una emisión característica, cuando lo quemamos en el seno de una llama. Esta propiedad espectrofotométrica se aprovecha para el análisis cuantitativo de metales alcalinos como el sodio y el potasio, ya que la intensidad de la emisión es proporcional a la concentración del metal en la solución. El equipo que se utiliza es el fotómetro de llama. Debido a que este instrumento posee alta sensibilidad es importante proceder con la máxima limpieza y preparando correctamente las diluciones.

Procedimiento: Si la muestra es sólida pesar alrededor de 2gr (peso exacto, 1/10 de mg) y hacer cenizas, no es preciso que queden blancas. Pasar las cenizas a un vaso de 100cc y disolver en agua destilada y 1o 2ml de HCl cc tapando con un vidrio de reloj en caso de producirse efervescencia. Llevar a ebullición suave durante 5 minutos. Filtrar sobre matraz aforado por 250cc y llevar a volumen. Si la muestra es líquida hacer diluciones de manera tal que la solución a medir tenga entre 25mg y 50mg/ml de concentración.

Solución patrón de NaCl: Pesar 0,2542gr de NaCl p.a. previamente desecado., disolver en agua destilada y llevar a 1 litro. Factor de corrección= peso/0,2542

Preparación de la curva de calibración:

Testigos	1	2	3	4	5	6
patrón (ml)	5	10	25	50	75	100
agua destilada	llevar a 100cc en matraz aforado					
cc final mg/ml	0,005	0,010	0,025	0,050	0,075	0,100

Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

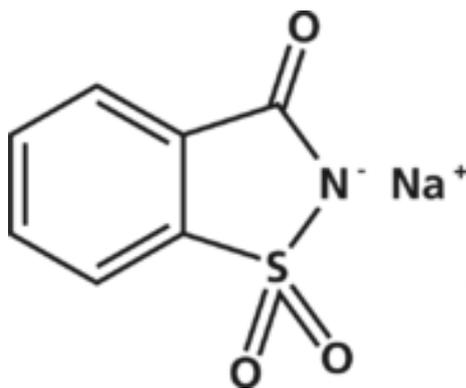
Ajustar la respuesta del equipo a cero con agua destilada y la respuesta a 100 con la solución patrón. Leer las emisiones de los testigos para sodio. Leer la muestra. Graficar emisión = $f(cc)$. Con el valor de emisión de la muestra hallar en el gráfico la cc de la misma.

Patricia Tierra

Potenciometría

Valoración de sacarina en medio no acuoso

En diversos medicamentos se utiliza la sacarina como edulcorante, especialmente en los medicamentos pediátricos como complejos vitamínicos, jarabes y otros.



- $C_7H_4NNaO_3S$
- Solubilidad: 10g/100ml a 24°C
- Pureza: 98%
- Ácida al tornasol

Reactivos:

- Ácido acético glacial
- Anhídrido acético.
- Violeta cristal al 0,5 % en medio acético que vira del violeta al azul turquesa.
- Biftalato de potasio: Para valorar el ácido perclórico.
- Solución 0,1M de ácido perclórico en medio acético glacial: se miden 8,5ml de ácido perclórico en 500ml de ácido acético glacial, agregar 25ml de anhídrido acético y completar a 1L con acético glacial. Como no debe haber agua en el medio, se agrega el anhídrido acético, que reacciona con el agua para dar ácido acético.

Valoración del ácido perclórico: pesar exactamente entre 0,2g y 0,15g de biftalato de potasio, disolver en 50ml de ácido acético que contenga 1,5ml de anhídrido acético, calentar, si es necesario, para disolver el biftalato. Agregar 1gota de violeta cristal y titular hasta viraje del indicador (hacer titulación en blanco, sin biftalato, para saber cuanto perclórico consumen 50ml de ácido acético).

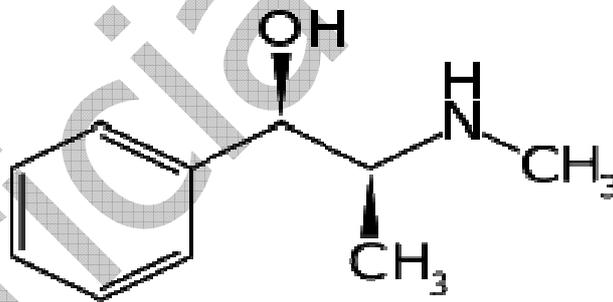
Cálculo de la normalidad: $V N = p / meq$

➤ Determinar la pureza de la sacarina

Pesar exactamente 0,10g de sacarina y disolver en vaso de precipitados en 50ml de ácido acético glacial con 1,5ml de anhídrido acético. Agregar 1 gota del indicador. Colocar electrodo y agitador magnético, (desconectar el agitador para leer). Agregar el perclórico de a 1ml los 5 primeros ml y leer los mv en el potenciómetro, luego volúmenes pequeños de 0,1 ó 0,2ml. Continuar la titulación hasta superar el punto final, observando todos los cambios de color. Determinar el volumen de ácido perclórico requerido para llegar al punto final, usando el método de la segunda derivada. Con ese dato calcular la concentración de sacarina, expresarla como porcentaje de pureza.

➤ Valoración de efedrina en medio no acuoso:

La **efedrina** es una amina simpaticomimética de origen vegetal. Es un agonista adrenérgico (directo e indirecto), muy activo sobre los receptores del sistema nervioso simpático, pero relativamente poco potente como estimulante del sistema nervioso central. Esto se debe a la limitada destreza de la molécula para atravesar la barrera hematoencefálica, en relación con otros compuestos similares como la anfetamina.



➤ $C_{10}H_{15}NO$

➤ Solubilidad: poco en agua, alcohol, éter, cloroformo

➤ Pureza: 99%

➤ Alcalina al tornasol.

Utilizando los mismos reactivos, e igual metodología que para la sacarina, determinar la pureza de una muestra de efedrina.

Pesar aproximadamente 0,15g de efedrina, disolver en 50ml de ácido acético glacial y 1,5ml de anhídrido acético. Proceder a la lectura de los mv, agregando de a 1ml, hasta 3ml y luego agregar volúmenes de 0,2-0,1ml hasta superar el punto final, y observar los cambios de color.

Calcular la concentración de efedrina, expresar como % de pureza.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN

HPLC

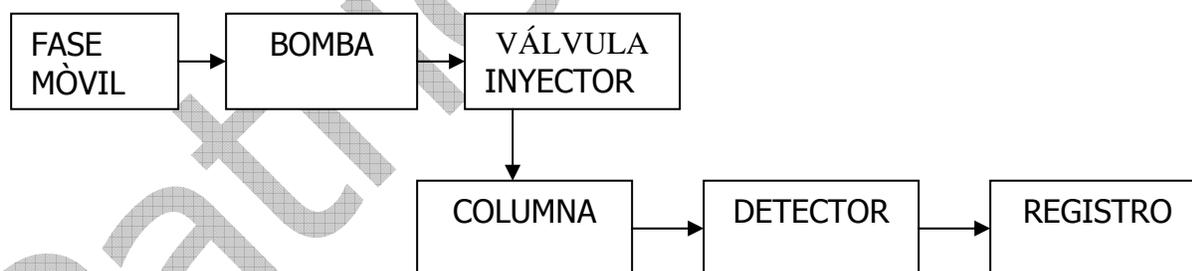
- **Introducción:**

La cromatografía clásica se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual esta rellena con la fase fija. Luego de sembrar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de la fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluya la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con altas presiones. Según el fenómeno físico que provoca la separación, la cromatografía puede ser de diferente tipo. La que usaremos en este caso es una cromatografía de reparto en fase reversa.

Aquí, la fase fija tiene unido químicamente un hidrocarburo alifático (C18), y se emplean fases móviles polares. En este caso, las sustancias más polares eluyen primero.

- **Instrumental:**

Un equipo para cromatografía líquida de alta resolución puede representarse con el siguiente esquema:



Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Cuando durante toda la separación se utiliza siempre el mismo solvente, se denomina *isocrática*, sin embargo es normal realizar un gradiente de composición del solvente a lo largo de la cromatografía, en *gradiente*. La bomba envía el solvente a través de caños de acero hacia la válvula inyectora. Esta permite introducir en el flujo de solvente, la muestra contenida en un aro o *loop* de volumen calibrado. Luego de que se produce la separación en la columna, los componentes de la mezcla pasan al detector, que emite una señal eléctrica proporcional a la cantidad de materia. Esta señal pasa al registrador que realiza un gráfico de intensidad en función de tiempo = cromatograma. Se trata de picos gaussianos, en donde cada pico corresponde a un componente de la muestra. El integrador calcula además el área del pico, la cual es proporcional a la cantidad de sustancia.

• TRABAJO PRÁCTICO

Objetivos:

- Determinar las áreas de los picos de soluciones testigo de cafeína, benzoato y aspartame.
- Cuantificar el contenido de cafeína, benzoato y aspartame en una muestra de coca Light.

Instrumental y reactivos:

- Equipo HPLC Perkin Elmer compuesto por una bomba binaria, válvula inyectora con un loop de 20ul, un detector de absorción UV- visible de longitud de onda variable y un registrador integrador.
- Columna analítica marca Phenomenex C18 de 150mm de longitud y 4,6mm de diámetro.
- Buffer fosfato 0,025M de pH 3.
- Metanol calidad HPLC.
- Muestra: bebida cola light, bebidas estimulantes o energizantes.
- Placa filtrante con membrana para desgasar y eliminar partículas.
- Patrones de cafeína, benzoato de sodio y aspartame.

Soluciones:

- Fase móvil: mezcla de 45% de metanol y 55% de buffer fosfato 0,025M.
- Patrón de cafeína: solución madre 0,5g/l, solución A: hacer una dilución 1/10 de la solución madre.
- Patrón de benzoato: solución 0,01g/l.
- Patrón de aspartame:

Parámetros:

- Programar bomba: fijar flujo en 1ml/minuto, tiempo de corrida 8 minutos, 100% A (isocrática).
- Programar detector: Fijar longitud de onda en 215nm, tiempo de corrida 8 minutos, ajustar sensibilidad y otros parámetros.

Trabajos Prácticos de Química Analítica Cuantitativa

Procedimiento:

Inyectar patrón de cafeína y realizar el cromatograma, hacer lo mismo para el benzoato y el aspartame. Buscar los tiempos de retención y áreas de ambos picos, y reservar estos datos. Inyectar la muestra y hacer el cromatograma correspondiente, identificar los picos según su tiempo de retención y determinar las áreas de igual manera que para los patrones.

Cálculos:

$$\text{Conc. cafeína} = \frac{\text{área muestra} \times \text{cc testigo cafeína}}{\text{área testigo cafeína}}$$

Proceder de igual forma para obtener la cc de benzoato y aspartame.

Bibliografía de este trabajo

- *I M Kolthoff y B Sandell “Análisis Químico Cuantitativo”*
- *Daniel C Harris “Análisis Químico Cuantitativo”*
- *Matissek. Ed Acribia “Análisis de Alimentos”*
- *Skoog y Leary “Análisis Instrumental”*
- *Métodos Oficiales de Análisis (AOAC).*