

LABORATORI D'ANÀLISI CROMATOGRÀFICA I ESPECTROSCÒPICA (LACE)

CURS 2024-2025

BLOC 1. ESPECTROSCÒPIA	3
A. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (I): ABSORCIÓ ATÒMICA: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Cu EN BEGUDES ALCOHÒLIQUES	3
B. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (II). EMISSIÓ ATÒMICA: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE K EN AIGUA POTABLE	6
C. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC	8
C1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (I): DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC	8
C2. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (II): DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe i Mn EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC	13
F. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (II). ANÀLISIS DE MESCLES MULTICOMPONENTS: DETERMINACIÓ SIMULTÀNIA DE Co(II) i Ni(II).	15
P. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (III). LUMINISCENCIA MOLECULAR: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE QUININA EN TÒNICA.	22
BLOC 2. CROMATOGRAFIA	25
H. CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC) (II): DETERMINACIÓ DE CAFÈINA EN CAFÈ SOLUBLE	25
I. CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC) (III): IDENTIFICACIÓ DE SULFONAMIDES EN MEDICAMENTS D'ÚS VETERINARI	28
J. CROMATOGRÀFIA DE GASOS (GC) (I): INFLUÈNCIA DE LA TEMPERATURA A LES SEPARACIONS	32
L. CROMATOGRÀFIA DE GASOS (GC) (II): DETERMINACIÓ DE METANOL EN AIGUARDENT D'ORUJO	34
ANNEX 1: Fórmules ajust mínims quadrats	37
ANNEX 2: Comparació de pendents de dues rectes de regressió	38
ANNEX 3: Gestió de Residus	40

Instruccions:

Els informes es realitzaran en la plantilla corresponent proporcionada (llibre Excel o document Word). A banda dels resultats, cal omplir les caselles corresponents a observacions i discussió dels resultats.

IMPORTANT: A l'Excel, feu els càlculs afegint les fórmules a les mateixes caselles de forma que es pugui comprovar d'on prové el resultat. Per exemple:

f_x	=D2/1000*E2		
	D	E	F
	mL	M	mols
	21,5	0,5	0,011

La casella F2 té com a resultat 0,011 mols i es pot veure que s'ha calculat fent servir el valor de la casella D2 dividit per 1000 i multiplicat pel valor de la casella E2.

Per càlculs més complexos, en el mateix arxiu trobareu un full anomenat "Càlculs" on heu d'incloure totes les dades i càlculs que heu fet, de forma que el professorat pugui veure les fórmules emprades i quines caselles del full Excel heu fet servir per fer els càlculs. Es puntuarà negativament si només apareix el valor i no com s'ha calculat (també aplica als càlculs estadístics). Recordeu que per realitzar càlculs estadístics a l'Excel, es pot activar un complement que es diu "eines per a anàlisi".

A tots els informes afegiu "**DESCRIPCIÓ MOSTRA**" per identificar la mateixa. Si es tracta d'una mostra comercial afegiu **marca i lot**.

BLOC 1. ESPECTROSCÒPIA

A. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (I): ABSORCIÓ ATÒMICA: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Cu EN BEGUES ALCOHÒLIQUES

Objectius:

- Practicar l'ús de material volumètric i entendre les reaccions químiques implicades en una valoració complexomètrica.
- Entendre la funció d'un indicador metal·locròmic.
- Dissenyar les etapes d'un procés de dilucions successives que permeti preparar solucions patró de concentració coneguda.
- Diferents tipus de calibratge: patró extern i addició estàndard
- Verificar l'existència o no d'efecte matriu.
- Entendre les causes d'aquest efecte, en cas de que existeixi.
- Aprendre a manipular un instrument d'absorció atòmica de flama.
- Quantificar el contingut de Cu en un aiguardent d'orujo.

Introducció

En aquesta pràctica s'introdueix l'espectroscòpia d'absorció atòmica de flama (AASF), aplicant-la a la determinació del coure (Cu) en begudes alcohòliques (concretament en una beguda comercial d'aiguardent). S'empraran tres mètodes de calibratge: patró extern, patró extern amb interferent (com a mètode alternatiu a l'addició estàndard utilitzat a l'indústria) i addició estàndard.

Principi

Es determina el contingut de Cu en un aiguardent, que trobareu al laboratori, per espectrofotometria d'absorció atòmica de flama; aspiració directa de la mostra i lectura a 324,7 nm.

Descripció general del procediment

Es prepara una dissolució estoc de Cu(II) aproximadament de 1000 ppm. Aquesta dissolució s'estandarditza amb una dissolució d'àcid etilendiamintetraacètic (EDTA) de concentració coneguda, emprant 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN) com a indicador metal·locròmic.

Per adequada dilució de la dissolució estoc de Cu, es preparen diverses dissolucions patrons que es fan servir per a mesurar les rectes de calibratge per patró extern, patró extern amb interferent i per addició estàndard.

Es determina el contingut de Cu a l'orujo amb els tres mètodes de calibratge. S'han de discutir els resultats obtinguts després de comparar el pendent del calibratge de

tots tres mètodes de calibratge entre si (el de patrons externs amb el de patrons externs amb interferent, i amb el d'addició estàndard). Si els pendents són diferents, existeix un efecte matriu.

Procediment

Estandardització de la dissolució de coure

Reactius i dissolucions:

Teniu preparades al laboratori les següents dissolucions:

- Dissolució de 0,025 M d'EDTA
- Tampó acètic/acetat 1 M, a pH = 5,0.
- PAN 0,1 % (w/v) en etanol

Per a cada parella:

Prepareu 250,0 mL d'una dissolució estàndard de 1000 ppm de Cu(II) en aigua a partir de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ i estandarditzeu-la seguint el següent mètode:

Pipetegeu 25,0 mL de la dissolució de coure en un Erlenmeyer. Afegiu-hi aproximadament 25 mL d'etanol, 3-4 mL de la dissolució tampó acètic/acetat i 2-3 gotes de la dissolució de PAN. Diluïu-ho, aproximadament fins a 60 mL amb aigua Milli-Q (no feu servir aigua destil·lada). Valoreu-ho amb una dissolució d'EDTA fins que el color canviï de violeta a verd. S'han de fer, com a mínim, tres valoracions.

Preparació de la recta de calibratge per patrons externs.

L'objectiu és preparar cinc patrons de calibratge de concentracions entre 0,1 i 3,0 ppm que es troben al rang lineal de l'equip. Aquests patrons es prepararan en matrassos aforats de 10,0 mL, afegint la quantitat adequada de dissolució de Cu i enrasant amb aigua Milli-Q.

A partir de la dissolució patró de 1000 ppm de Cu(II), feu dilucions intermèdies de la dissolució patró i prepareu els patrons de la recta de calibratge corresponent.¹

Preparació de la recta de calibratge per addició estàndard.

Prepareu també una altra recta de calibratge pel mètode d'addició estàndard. En aquest cas, en 5 matrassos aforats de 25,0 mL, afegint 20,0 mL de mostra a cada

¹ La regla bàsica per preparar dilucions és no emprar mai volums petits, que tan sols són acceptables en l'etapa final. Es pot justificar estadísticament amb les incerteses en la mesura de cada volum i amb la propagació de l'error, però s'entén millor pensant en la pràctica. Si es comet un error d'una gota, en 1,0 ml és un error molt gran i farà que a partir d'aquí tot estigui malament. Una gota en 10,0 ml és un error proporcionalment petit. Per això, sempre que cal diluir una dissolució patró, és millor fer-ho en etapes, agafant en cada etapa el major volum possible. Només s'utilitzen volums petits al final, al preparar els matrassos per al calibratge. Si hi ha un error només està malament la concentració en un matràs, no en tots. Normalment, el més fàcil és dissenyar el procediment partint de la darrera etapa.

matràs. Les concentracions de patró afegit poden ser el mateixos que els utilitzats pel calibratge per patró extern.

Preparació de la recta de calibratge per patrons externs amb interferent.

Cal preparar patrons de la mateixa concentració que al calibratge per patrons externs, però en aquesta ocasió s'afegirà un volum d'etanol als matrassos tal que el contingut final d'aquest sigui del 40% (v/v) (considereu que aproximadament l'etanol absolut té 100%). També caldrà preparar un blanc de calibratge amb aquest volum d'etanol.

Anàlisi per absorció atòmica²

Analitzeu amb l'equip d'absorció atòmica tant els patrons de cada calibratge com la mostra (aiguarent pur) tot fent la lectura a la longitud d'ona del Cu: 324,7nm. Per fer aquestes mesures seguiu les instruccions que trobareu al costat del instrument.

Anàlisi de dades

Amb les dades recollides, construïu les rectes de calibratge i calculeu la desviació estàndard de l'ordenada i del pendent. Calculeu la concentració i l'interval de confiança ($\alpha=0,05$) per al contingut de Cu en la mostra amb els tres calibrats.

Compareu els pendents dels tres mètodes de calibratge entre ells (vegeu l'annex 2). És a dir, per una banda, compareu el calibratge per patrons externs amb el de patrons externs amb interferent, i, per altra, amb el calibratge per addició estàndard, i decidiu si mostren diferències significatives. Feu la comparació també entre el calibratge per patrons externs amb interferent i el calibratge per addició estàndard.

Compareu les tres concentracions i els seus intervals de confiança. Discutiu els resultats obtinguts i justifiqueu quin valor prendríeu com a contingut de Cu a la mostra.

Compareu aquest valor amb el valor màxim autoritzat per la legislació Espanyola o Europea.

² Al laboratori trobareu instruccions sobre l'ús del espectrofotòmetre AASF.

B. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (II). EMISSIÓ ATÒMICA: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE K EN AIGUA POTABLE

Objectius:

- Aprendre a manipular un instrument d'absorció atòmica de flama en mode emissió.
- Entendre les diferències fonamentals entre absorció i emissió atòmiques.
- Entendre l'efecte d'un tampó d'ionització.
- Observar la coloració de la flama i interpretar els canvis.
- Quantificar el contingut de K en aigua potable.
- Verificar que compleix la normativa legal vigent.

Introducció

En aquesta pràctica s'introdueix l'espectroscòpia d'emissió atòmica amb flama, aplicada a la determinació de potassi (K^+) en aigua potable.

Principi

Es determina el contingut de K^+ en aigua potable per aspiració directa de la mostra en una flama de aire/acetilè i lectura de la intensitat d'emissió a 765 nm (K).

Procediment

La concentració de K^+ es determinarà per interpolació de la corresponent recta de calibrat, preparada per patrons externs.

Reactius i dissolucions:

Teniu disponibles al laboratori els següents reactius:

- Clorur de potassi
- Clorur de liti

Preparació solucions patró

1) Prepareu 250 mL d'una solució estàndard de 1000 ppm de K^+ en aigua Milli-Q mitjançant pesada de precisió de la seva sal de clorur (KCl).

2) A partir d'aquesta solució, i en les etapes que calgui, es prepararan els patrons de la recta de calibrat. Les concentracions proposades són: 0,5; 1,5; 2; 3 i 4 mg/L (contingudes en matrassos de 25,0 mL). Aquestes solucions patrons contindran una concentració de l'ordre de 75 mg/L de Li^+ , emprat com a tampó d'ionització.

Preparació mostra

La mostra serà aigua (de l'aixeta del laboratori, embotellada, de la font de la Facultat...). Al igual que als patrons, cal afegir el tampó d'ionització a la mostra, per

tant, heu d'enrasar en un matràs de 25,0 mL amb aquesta mostra d'aigua, tot afegint la mateixa concentració del tampó d'ionització que als patrons.

Equip

Abans de començar la mesura, l'equip d'emissió atòmica ajusta la longitud d'ona al voltant del valor nominal, per dur a terme aquesta optimització haureu d'emprar la solució del patró de la recta de calibrat més concentrat (comentar-ho amb el professor de pràctiques). Una vegada ajustat el valor òptim, es mesura la intensitat d'emissió de les solucions patró i de la mostra. **PRECAUCIÓ:** en funció de la sensibilitat de l'instrument és possible que s'hagi de modificar el rang de concentracions dels patrons de la recta. Així mateix, és possible que la solució de mostra s'hagi de diluir per a que el valor d'emissió quedi aproximadament a la meitat de la recta de calibrat.

Resultats

Els resultats de concentració s'expressaran en forma de mg/L amb els corresponents intervals de confiança.

Compareu aquest valor amb el valor màxim autoritzat per la legislació Espanyola o Europea.

Bibliografia

Panreac, *Métodos analíticos en alimentaria. Aguas. 1984*

C. DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC

En aquesta pràctica es determina el contingut de Fe en un comprimit multivitaminic mitjançant dues tècniques analítiques. En la primera part (C1) es farà la digestió en bany de sorra i determinació mitjançant espectrofotometria UV-Vis i, en la segona (C2), es determinarà per absorció atòmica de flama (AASF). L'objectiu és comparar els resultats obtinguts per les dues tècniques, fer una comparativa dels resultats obtinguts per altres parelles i realitzar el tractament estadístic de totes les dades mesurats el mateix dia en els torns de matí i tarda (els resultats han de ser pujats a la carpeta del Microsoft Sharepoint indicada pel professorat al Campus Virtual).

IMPORTANT: Aquesta pràctica és du a terme en dos dies. Per la segona part de determinació per AASF, part C2, haureu de guardar la dissolució mostra obtinguda després de filtrar, i el patró de treball en els vials que teniu a la caixa (mostra en el vial petit i patró en el vial gran).

C1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (I): DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC

Objectius

- Practicar un procediment analític estàndard, que inclou:
 - Tractament de la mostra.
 - Filtració quantitativa.
 - Preparació de solucions patró de concentració coneguda.
 - Preparació d'una recta de calibratge per patró extern.
 - Càlcul de la concentració d'una mostra per interpolació en la recta de calibratge.
 - Càlcul de l'interval de confiança del valor trobat.
- Entendre i saber aplicar, en cada cas, la diferència entre blanc espectroscòpic i blanc de la mostra.
- Entendre la diferència entre el valor trobat per interpolació i la concentració d'analit en la mostra.
- Saber calcular la concentració i l'interval de confiança de l'anàlit a la mostra.

Introducció

En aquesta pràctica s'aplica la reacció de complexació del Fe(II) amb el lligand o-fenantrolina (1,10-fenantrolina, o "phen") donant el complex $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ per a la determinació espectrofotomètrica del contingut total d'aquest metall en un complex multivitaminic comercial.

L'objectiu és que serveixi d'exemple d'una determinació quantitativa d'una mostra farmacèutica, que implica el tractament de la mostra, la preparació d'una corba de calibratge i el càlcul, tant de la regressió lineal de la recta patró i la interpolació de la mostra com els intervals de confiança corresponents.

Consideracions prèvies

La mostra es presenta en forma de comprimits. La primera etapa del procediment consisteix en dissoldre tot el ferro present, per la qual cosa el comprimit multivitàmic s'ha de tractar amb un medi àcid fort per tal d'assegurar-ne la seva total dissolució.

Per a la formació quantitativa del complex $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ hem de treballar en un medi tamponat.

La reacció és específica del Fe(II), i per tant, hem d'evitar la presència d'altres espècies de Fe ja que al dissoldre la mostra en medi àcid a l'aire, és possible que part de la Fe(II) s'hagi oxidat a Fe(III). Per assegurar que es determina tot el ferro del comprimit, cal reduir el Fe(III) a Fe(II), per això s'afegeix el clorhidrat d'hidroxilamina, que és un agent reductor.

Procediment

- Reactius:

- Clorhidrat d'hidroxilamina. Dissolució aquosa al 8% (m/v)
- Àcid acètic concentrat
- Acetat de sodi 2 M
- HCl 6 M
- Dissolució tampó d'àcid acètic i acetat de sodi, a pH 4,75
- Clorhidrat de 1,10-fenantrolina monohidratat 2,4 mg/mL

Preparació: peseu 0,12 g i enraseu a 50 mL amb aigua destil·lada amb una gota d'àcid clorhídric diluït.

- **Dissolució estoc de Fe(II) (0,04 mg de Fe(II)/mL).**

Preparació: dissolueu en aigua destil·lada els grams corresponents (pesats en balança analítica) de la sal mixta de ferro $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (sal de Mohr), en qualitat de reactiu analític, en un matràs aforat de 500,0 mL, que prèviament conté 1 mL d'àcid sulfúric concentrat (H_2SO_4). Si no disposeu d'un matràs de 500,0 mL, empreu aquell que sigui més adient de tots els que disposeu, adaptant la massa de sal pesada i la quantitat d'àcid sulfúric.

- **Dissolució treball de Fe(II) (0,02 mg de Fe(II)/mL)³.**

Preparació: Prepareu 50,0 mL de dissolució a partir de la dissolució estoc preparada. Aquesta dissolució de treball s'emprarà per a preparar els patrons de la recta de calibratge (punts 2 i 3 de l'apartat de preparació dels patrons).

- Tractament de la mostra

Peseu a la balança analítica un comprimit d'un complement vitamínic que conté ferro. Poseu una mica d'aigua (2-3 mL) i, aproximadament, 20 mL de HCl 6 M en un vas de precipitats de 100 mL; afegiu el comprimit. Poseu un vidre de rellotge a sobre del vas. Porteu el vas a ebullició i deixeu que bulli suaument durant aproximadament 15 minuts en un bany de sorra (inicialment la suspensió té un color groguenc que passarà a marronós). Deixeu refredar la dissolució i filtreu-la directament a un matràs aforat de 100,0 mL. Heu de rentar tant el vas de precipitats com el filtre diverses vegades amb petites porcions d'aigua per assegurar una transferència quantitativa (*atenció a les observacions del professorat respecte el traspass quantitatiu de mostra*). Enraseu tot barrejant adequadament la dissolució (movent el matràs circularment). Finalment, tapeu el matràs i agiteu la dissolució per homogeneïtzar-ne el contingut. A aquesta dissolució l'anomenarem "dissolució de la mostra".

Calculeu la concentració 'nominal' de ferro d'aquesta dissolució, assumint que el valor de l'etiqueta és correcte. Aquest valor es necessitarà posteriorment (punt 7 del guió de la pràctica)

- Preparació dels patrons

La força iònica d'una dissolució que analitzarem espectroscòpicament ha de ser constant i petita. Això obliga a afegir una concentració petita del tampó que es necessita per tal que les dissolucions que preparem per fer el calibratge estiguin al pH correcte i es formi el complex acolorit $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$; però la dissolució de treball de Fe(II) pot tenir un pH tant àcid que impedeixi que el tampó acètic/acetat funcioni correctament. Per aconseguir-ho, disminuïm l'acidesa de la mostra abans d'afegir el tampó. Fem una estimació aproximada del volum d'acetat que es gasta per aconseguir una acidesa adient per a la capacitat del nostre tampó prenent un volum i comptant les gotes de dissolució d'acetat necessàries per que el pH sigui d'aproximadament 4. Amb aquesta dada, s'afegirà una quantitat proporcional a cada una de les dissolucions de patró. D'aquesta manera es garanteix que el pH sigui el que es necessita en tamponar.

1) Amb una pipeta, transferiu 10,0 mL de la dissolució de treball de Fe(II) a un vas de precipitats i mesureu el pH amb paper indicador. Afegiu gota a gota la dissolució

³ La sal de Mohr és un patró primari pel que per simple pesada es pot preparar una dissolució estoc de concentració coneguda. No obstant això, perquè la precisió sigui adequada, s'ha de pesar com a mínim 100 mg. Això obliga a diluir l'estoc preparat a la meitat i després continuar. Si es fes directament es pesaria poc o s'hauria d'utilitzar volums molt grans.

d'acetat, fins que el pH sigui aproximadament de 4,0. Compteu les gotes (o el volum) que us calen.

2) Amb una pipeta, transferiu 5,0 mL de la dissolució de treball de Fe(II) a un matràs aforat de 25,0 mL i afegiu la meitat del nombre de gotes de la dissolució d'acetat que el nombre que heu determinat en el pas anterior. Comproveu que el pH és aproximadament de 4 (si no és així, afegiu alguna gota més d'acetat fins aconseguir-ho). A continuació, poseu a l'aforat 1 mL de la dissolució tampó d'acètic/acetat, 1 mL de la dissolució d'hidroxilamina i 1 mL de la dissolució de o-fenantrolina. Enraseu amb aigua i agiteu la dissolució per homogeneïtzar-ne el contingut.

3) Anàlogament, prepareu en matrassos aforats de 25,0 mL dissolucions amb 4,0; 3,0; 2,0 i 1,0 mL de la dissolució de treball de Fe(II). En cada cas, s'ha d'afegir un nombre de gotes d'acetat proporcional al que s'ha gastat en el punt (1). Comproveu que el pH és aproximadament de 4. En cada cas, afegiu el mateix volum de les altres dissolucions (tampó, hidroxilamina i fenantrolina) que en el punt (2) i enraseu.

Abans de mesurar-les, les dissolucions patró de $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ preparades, s'han de deixar reposar uns 10-15 minuts. Mentrestant, es pot preparar el blanc espectroscòpic.

Preparació del blanc espectroscòpic⁴

4) Aquest consisteix en una dissolució que contingui la mateixa quantitat de tampó acètic/acetat, hidroxilamina i o-fenantrolina que cadascuna de les cinc dissolucions patrons de $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$ preparades anteriorment; per tant, en un altre matràs aforat de 25,0 mL, afegiu 1 mL de la dissolució tampó d'acètic/acetat, 1 mL de la dissolució d'hidroxilamina i 1 mL de la dissolució d'o-fenantrolina.

Mesura

5) Mesureu l'absorbància de cada dissolució a 510 nm. Abans de fer les mesures, ajusteu amb el blanc espectroscòpic el 100% de transmissió de l'espectrofotòmetre.

Preparació de la mostra

Farem un procés similar al del punt (1) per aconseguir que la dissolució de la mostra acabi amb una acidesa adient per poder formar el complex $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$.

6) Amb una pipeta, transferiu 5,0 mL de la dissolució de la mostra a un vas de precipitats i mesureu el pH amb paper indicador. Afegiu gota a gota la dissolució d'acetat, fins que el pH sigui aproximadament de 4. Compteu les gotes (o el volum)

⁴ Aquest blanc espectroscòpic serveix per ajustar el 100% de transmissió (0 d'absorbància) de l'espectrofotòmetre.

que us calen. Pot ser necessari afegir-hi varis mL. No cal mesurar el pH després de cada gota. Si canvia molt mesureu molt sovint.

7) Volem que la mesura de l'absorbància del $[\text{Fe}(\text{phen})_3]^{2+}$, format amb el ferro present a la mostra, tingui un valor que correspongui a la zona central de la recta de calibratge; d'aquesta manera es disminueix l'interval de confiança del valor de la concentració calculada quan s'interpola a la recta.

Heu de calcular el volum necessari de mostra que s'ha de pipetejar a un matràs aforat de 25,0 mL (al que s'afegiran tots els reactius i s'enrasarà, com s'explica al punt (8)) i aquest volum de mostra dependrà de la concentració de ferro que tingui el preparat multivitamínic que s'analitza. Per trobar el valor, partiu de la concentració nominal de la mostra que heu calculat a l'apartat "Tractament de la mostra".

És possible que experimentalment no es pugui mesurar exactament el volum teòric (p. ex. si surt que s'ha de prendre 1,27 mL, faríem servir una pipeta de 2 ml graduada i afegiríem 1,3 mL); s'ha de pipetejar el valor exacte que s'apropi més al necessari i fer servir aquest valor pipetejat.

8) A partir del volum d'acetat necessari per portar la mostra a pH d'aproximadament 4, i que heu trobat al punt (6), afegiu a l'aforat a on es posen els mL de mostra calculats al punt (7) la quantitat proporcional que pertoca de la dissolució d'acetat (en gotes), 1 mL de la dissolució tampó, 1 mL de la dissolució d'hidroxilamina i 1 mL de la dissolució de o-fenantrolina (tal com s'havia fet pels patrons). Enraseu amb aigua i barregeu completament. Mesureu l'absorbància després que la dissolució reposi 10-15 minuts.

Blanc de la mostra⁵

9) Si la mostra original té color, cal preparar un "blanc de la mostra" en un matràs aforat de 25,0 mL que contingui la mateixa quantitat de dissolució de la mostra que la pipetejada al punt (7) i els mateixos reactius (gotes d'acetat, tampó i hidroxilamina), excepte o-fenantrolina, que s'han afegit al punt (8). Mesureu l'absorbància d'aquesta dissolució per restar-lo del valor de l'absorbància de la mostra.

⁵ Hem preparat un blanc espectroscòpic amb el qual s'ha ajustat el zero d'absorbància de l'espectrofotòmetre a on mesurem l'absorbància de tots els patrons, però altres components de la mostra poden absorbir a la longitud d'ona analítica. En aquest cas, la mostra és de color groc i presenta encara una petita absorció a 510 nm. Si mesurem la mostra sense corregir aquest efecte, tindriem sempre un error sistemàtic per excés. Per això es mesura l'absorbància d'un "blanc de la mostra". Mesurem l'absorbància de la mostra i interposem a la recta de calibratge l'absorbància corregida (mostra-blanc mostra). Aquesta absorbància és només deguda a la formació del complex de Fe(II).

Calibratge

10) Representeu gràficament la mesura de l'absorbància de cada dissolució dels patrons davant la concentració de Fe(II) en els patrons, expressada en mg/L.

11) Ajusteu els punts experimentals a una recta de regressió per mínims quadrats. Calculeu els paràmetres de la recta i les seves desviacions estàndard.

12) Interpoleu el valor de l'absorbància corregida de la mostra a la recta de calibratge. El valor de la mostra ha d'estar a prop del centroide. Si no és així, hi ha hagut un error al punt (7) i cal repetir la preparació de la mostra, tot corregint el volum de mostra emprat. Calculeu la concentració de Fe(II) i el seu interval de confiança. Aquesta és la concentració de Fe(II) al matràs.

13) El valor anterior no és el resultat final. S'ha de calcular la quantitat de ferro (mg) per comprimit amb el corresponent interval de confiança.

Recordatori: conservació de la mostra i la solució de treball

14) Guardeu la dissolució de la mostra i la dissolució de treball en els vials que teniu, ja que les utilitzareu el pròxim dia per fer la determinació mitjançant AASF (pràctica C2).

C2. ESPECTROSCÒPIA ATÒMICA (II): DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE Fe i Mn EN UN COMPRIMIT MULTIVITAMÍNIC

Objectius

- Entendre els avantatges de la determinació elemental de Fe per AASF.
- Practicar el tractament estadístic d'un conjunt de resultats.

Introducció

En aquesta pràctica s'analitza amb AASF el contingut en Fe i Mn del comprimit digerit a l'apartat C1.

Procediment

- Tractament de la mostra

La mesura de Fe i Mn al comprimit multivitaminic es farà a partir la dissolució filtrada guardada del dia anterior. Caldrà fer la mateixa dilució de mostra que la feta al punt 7 de l'apartat C1, diluint aquesta amb aigua Milli-Q, sense afegir cap altre reactiu.

- Preparació dels patrons

Prepareu en matrassos aforats de 25,0 mL dissolucions de 0,8; 1,6; 2,4; 3,2 i 4,0 ppm de Fe(II) com va fer a l'apartat C1, però sense afegir cap acetat, ni tampó, ni o-fenantrolina. Recordeu que si heu de reutilitzar el mateix matràs aforat per fer tots els patrons, heu de preparar els patrons de menys a més concentració per disminuir l'error en cas de que la neteja fos insuficient. Acidificar els patrons per evitar precipitació del ferro.

De la mateixa manera, prepareu patrons anàlegs als de Fe pel Mn (rang de 0,8 - 4,0 ppm) partint d'una dissolució estoc de 0,1 mg/mL.

- Anàlisi per absorció atòmica

Analitzeu amb l'equip d'absorció atòmica tant els patrons com la mostra (prèviament diluïda) tot fent la lectura a la longitud d'ona del Fe (248,3 nm) i del Mn (279,5 nm). Per fer aquestes mesures seguiu les instruccions que trobareu al costat del instrument.

- Anàlisi de dades

Amb les dades recollides, construïu les dos rectes de calibratge i calculeu la desviació estàndard de l'ordenada i del pendent. Calculeu les concentracions i els intervals de confiança ($\alpha=0,05$) per al contingut de Fe i de Mn en la mostra.

En el cas del Fe, adicionalment compareu aquest amb el obtingut el dia anterior mitjançant espectrofotometria UV-Vis.

Compareu les dos concentracions i els seus intervals de confiança amb el valor nominal descrit pel fabricant. Discutiu els resultats obtinguts, justifiqueu la idoneïtat de cada mètode i la desviació respecte del valor nominal.

Bibliografia

ATKINS, R.C. *J. Chem.* Ed. 52, 550 (1975)

HARRIS, D.C. *Anàlisi química cuantitativa*. S.I.: Iberoamèrica, 1992.

F. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (II). ANÀLISIS DE MESCLES MULTICOMPONENTS: DETERMINACIÓ SIMULTÀNIA DE Co(II) i Ni(II).

Objectius

- Aprendre a utilitzar un espectrofotòmetre UV-Vis de doble feix.
- Resoldre mesclades binàries per mètodes gràfics.
- Aprendre a utilitzar l'excel per resoldre regressions lineals múltiples.

Introducció

És freqüent requerir determinar diversos analits de propietats químiques molt semblants en una mateixa mostra, sense que sigui possible emprar tècniques de separació. Per exemple, en el control d'una reacció en un reactor, quan al cap de 1-2 hores arribessin els resultats cromatogràfics ja no serien representatius, atès que el procés ha seguit avançant durant aquest temps. Els resultats en un control de procés s'han d'obtenir en segons, idealment en temps real.

El desenvolupament d'instrumentació capaç de mesurar l'absorbància a diverses longituds d'ona en un espai de temps curt ha possibilitat el desenvolupament de nous mètodes analítics, de manera que avui en dia és habitual dur a terme la determinació espectrofotomètrica simultània de diversos analits o la determinació d'un únic analit en presència d'una matriu interferent, sense necessitat d'una etapa prèvia de separació.

L'objectiu d'aquesta pràctica és introduir les tècniques modernes de tractament de dades espectroscòpiques, en el benentès que els sistemes comercials aplicats en la indústria són molt més complexos. Per a això es planteja la determinació d'una barreja de Co(II) i Ni(II), que reaccionen amb el PAR (4-(2-piridilazo)resorcinol) per formar complexos amb un espectre visible molt semblant, però no exactament igual (es simula el cas de compostos químicament semblants).

Metodologia

Primerament, per determinar les constants de proporcionalitat entre absorbància i concentració (a cada longitud d'ona), es mesurarà la absorbància de dissolucions pures de concentració coneguda de cada compost (Ni i Co). Per a això, es prepararan tres dissolucions de cada metall a concentracions diferents.

Per altra banda, es prepararan tres barreges de composició coneguda de Ni(II) i Co(II) i es mesurarà la seva absorbància a les longituds d'ona que s'indica més avall.

Es determinarà la concentració de cada compost en la barreja utilitzant dos tractaments de dades diferents. Un gràfic, intuïtiu, fàcil de calcular i molt visual, però que té el problema d'estar limitat a un màxim de dos analits i de ser difícil d'automatitzar. El segon procediment es basa en la resolució per mínims quadrats d'un sistema sobredimensionat (més equacions que incògnites) (CLS, *classic least squares*); aquest últim mètode es pot considerar l'origen dels mètodes actuals.

Atenció!! En representar les gràfiques és possible que hi hagi punts que es surtin de la 'linealitat'. Això és degut a que si les absorbàncies són molt petites o molt iguals, petits errors experimentals s'amplifiquen en dividir. Aquests punts 'anòmals' han d'estar indicats a la gràfica, però no usats en el càlcul i, òbviament, tampoc es faran servir en el càlcul per CLS. El CLS en programari específic disposa d'eines auxiliars per detectar punts anòmals, però són massa complexes per a ser incorporats a un full Excel.

El resultat final ha de ser una taula en la qual es compararan els valors teòrics de Ni i Co a cada barreja amb els calculats pels dos mètodes. En cas que es produeixin divergències importants s'ha de proposar una raó de les mateixes.

Procediment

Reactius:

Teniu preparades les següents solucions i reactius

- solució patró de Co(II), preparada a partir de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- solució patró de Ni(II), preparada a partir de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- 4-(2-piridilazo)resorcinol, sal sòdica 0,20 % w/v
- solució 1 M d'acetat de sodi

Preparació dels patrons

- Prepareu, en tres matrassos de 50,0 mL, tres solucions de cada ió, de concentració perfectament coneguda i pròximes a 0,3; 0,4 i 0,5 mg/L, feu les dilucions intermèdies que creieu oportunes. A cadascuna s'afegeixen 5 mL de solució d'acetat de sodi i 2 mL de la solució de PAR i s'enrasa amb aigua destil·lada.
- Prepareu una solució de PAR que es farà servir com blanc: pipetgeu 2 mL de PAR i 5 mL de la solució d'acetat de sodi i enraseu fins a 50 mL amb aigua destil·lada.
- Es mesura l'espectre entre 450 i 580 nm fent servir com blanc la solució diluïda de PAR.

Preparació de les mesclades binàries

Níquel / Cobalt 0,2 / 0,4 (mg/L) 0,4 / 0,4 (mg/L) 0,4 / 0,2 (mg/L)
--

En matrassos de 50,0 mL prepareu 3 solucions amb una composició en mg/L com s'indica a la taula. Afegiu 2 mL de PAR i 5 mL de la solució d'acetat de sodi i enraseu. Llegiu a les mateixes longituds d'ona que en el cas dels patrons.

Fent servir els valors del Ni com a divisor de l'equació, calculeu la concentració de Ni i Co a cadascuna de les mesclades binàries i compareu amb els valors experimentals teòrics.

Procediment experimental

Obtenció espectres

S'obté el valor de l'absorbància a diferents longitud d'ona (480, 485, 490, 495, 500, 505, 510, 515, 520, 525, 530, 540, 545, 550 nm) per a cada solució patró dels cations i per a les mostres.

Es calcula la constant de proporcionalitat entre absorbància i concentració (a cada longitud d'ona) i es calcula la mitjana de la constant de les tres concentracions. S'utilitzarà com a millor valor per als càlculs següents. (**PRECAUCIÓ**: només es poden fer mitjanes de valors semblants. Si una solució patró dona valors significativament diferents no s'ha d'emprar. Una diferència important d'algun d'aquests valors és indicativa d'un error experimental, que ha de ser identificat i corregit. En tot cas, s'ha de raonar aquesta discrepància i fer els tests estadístics necessaris per poder eliminar els valors suposats anòmals).

Mètode gràfic

El Co(II) i el Ni(II) reaccionen de manera molt similar, trobant-se sovint junts en solució, pel que s'han emprat diversos reactius cromogènics per a la seva determinació simultània. El 4-(2-piridilazo)resorcinol (PAR) forma complexos acolorits amb els metalls de transició, amb espectres d'absorbància molt semblants, de forma que és un reactiu genèric per a la determinació indiscriminada d'aquest metalls fent servir una única longitud d'ona, λ . Aquest reactiu també es pot fer servir per a la determinació simultània de mesclades binàries de Co(II) i Ni(II) mesurant a diferents longituds d'ona.

En un sistema de dos components, si es compleix la llei de Lambert-Beer a cada longitud d'ona (A_λ), tenim que l'absorbància de la mescla (m) es pot expressar com:

$$A_{m,\lambda} = \varepsilon_{1,\lambda}bc_1 + \varepsilon_{2,\lambda}bc_2$$

on $\varepsilon_{1\lambda}$ i $\varepsilon_{2\lambda}$ són els coeficients d'absortivitat molar dels components 1 i 2, respectivament; b el camí òptic, i c_1 i c_2 les seves concentracions.

L'absorbància de les solucions patró de cadascun dels components purs vindrà donada per:

$$A_{i,\lambda}^0 = \varepsilon_{i,\lambda}bc_i^0 = k_{i,\lambda}c_i^0 \quad (\text{on } i = 1 \text{ o } 2)$$

Aïllant la constant $k_{i,\lambda}$, substituint en la primera equació i operant s'obté:

$$\frac{A_{m,\lambda}}{k_{1,\lambda}} = c_1 + \frac{k_{2,\lambda}}{k_{1,\lambda}} \times c_2$$

Representant $\frac{A_{m,\lambda}}{k_{1,\lambda}}$ en front de $\frac{k_{2,\lambda}}{k_{1,\lambda}}$ s'obté una recta de pendent c_2 i ordenada a l'origen c_1 .

NOTA: Utilitzeu la mitjana de les $k_{i,\lambda}$ considerant tots els patrons del mateix catió si són semblants. Si algun conjunt de valors es desvia molt de la resta, heu de descartar-ho.

Regressió Lineal Múltiple Clàssica (CLS)

Es basa en el compliment de la llei de Beer-Lambert per cadascun dels components de la mescla en tot el rang de treball, i en l'additivitat de les absorbàncies de les mesclades. L'error en el model es considera que és degut a les dades espectrals.

Si tenim una mescla amb p components que compleixen la llei de Beer, l'absorbància A_j , mesurada a la longitud d'ona (λ_j), es pot escriure com:

$$A_j = \varepsilon_{j1}bc_1 + \varepsilon_{j2}bc_2 + \dots + \varepsilon_{jp}bc_p$$

on b és el camí òptic (constant, perquè utilitzem sempre la mateixa cubeta), ε_{ji} és l'absortivitat molar del component i a la longitud d'ona λ_j .

Emprant un model com el descrit fins ara, s'obliga a l'equació a passar per l'origen, de manera que petites diferències en la línia base poden repercutir de forma significativa sobre els valors trobats. Per evitar-ho és possible considerar una ordenada a l'origen per la regressió que permeti l'ajust dels errors deguts a la línia base. D'aquesta forma, l'equació que descriu l'absorció a una determinada longitud d'ona resta com:

$$A_j = \varepsilon_{j1}bc_1 + \varepsilon_{j2}bc_2 + \dots + \varepsilon_{jp}bc_p + e_j$$

Agrupant els termes d'absortivitat molar i camí òptic en les constants k_{ji} , tenim:

$$A_j = k_{j1}c_1 + k_{j2}c_2 + \dots + k_{jp}c_p + e_j$$

Si es realitza la mesura a n longituds d'ona, aconseguint que $n \geq p$ (nombre de longitud d'ona mesurats més gran que el nombre de components), s'obtenen n equacions:

$$A_1 = k_{11}c_1 + k_{12}c_2 + \dots + k_{1p}c_p + e_1$$

$$A_2 = k_{21}c_1 + k_{22}c_2 + \dots + k_{2p}c_p + e_2$$

$$\dots$$
$$A_n = k_{n1}c_1 + k_{n2}c_2 + \dots + k_{np}c_p + e_n$$

que poden expressar-se en forma matricial de la manera següent:

$$A = KC + E$$

on A és el vector de les absorbàncies de la mostra-mescla de dimensions ($n \times 1$), K és la matriu de les constants (que tenen el significat dels espectres dels components purs a concentració unitat i amb un camí òptic unitat) de dimensions ($n \times p$), C és el vector de concentracions de dimensions ($p \times 1$), i E és el vector dels residuals model de dimensions ($n \times 1$). En forma matricial:

$$A = \begin{pmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \dots \\ A_s \end{pmatrix}; \quad K = \begin{pmatrix} k_{11} & \dots & k_{1p} \\ k_{21} & \dots & k_{2p} \\ \dots & \dots & \dots \\ k_{n1} & \dots & k_{np} \end{pmatrix}; \quad C = \begin{pmatrix} c_1 \\ c_2 \\ \dots \\ c_p \end{pmatrix}; \quad E = \begin{pmatrix} e_1 \\ e_2 \\ \dots \\ e_p \end{pmatrix}$$

Experimentalment coneixem els valors d'absorbància de la mescla a cada longitud d'ona (A_j). Les constants de proporcionalitat pel níquel i pel cobalt els hem determinat a partir de les solucions pures de cadascun ($k_{j, Ni}$, $k_{j, Co}$). Per tan, per calcular les concentracions, només s'ha de resoldre l'equació, calculant la matriu pseudo-inversa la qual es multiplica segons:

$$A = K C$$

$$K^t A = K^t K C$$

$$(K^t K)^{-1} K^t A = C$$

Es pot demostrar que aquesta manera de resoldre un sistema d'equacions correspon a un ajust per mínims quadrats, i la resolució per mínims quadrats d'una recta no és més que un cas especial en que només hi ha una concentració incògnita.

Procediment càlcul

Hi ha programes que permeten resoldre automàticament tots els passos. **Emprant full de càlcul Excel** hi ha dues maneres de resoldre el sistema d'equacions sobredimensionat:

- a) utilitzant el complement SOLVER
- b) resolent l'equació matricial pas a pas

Per la seva major simplicitat es recomana usar SOLVER, però és convenient que s'entengui el procediment pas a pas, ja que "visualitza" millor el sentit químic-matemàtic del procediment

a) SOLVER

Ha d'aparèixer a la pestanya de 'Dades', al costat dels complements de 'Anàlisi de dades'. En el cas que no es tingui instal·lat, el procediment per a la seva instal·lació es: a la pestanya 'arxiu', cliqueu sobre 'opcions'; 'complements'; clicar sobre SOLVER i tot seguit sobre 'anar' i finalment sobre 'acceptar'.

El SOLVER és un sistema de minimització de mínims quadrats que es pot emprar per a ajustar una funció teòrica a unes dades experimentals o per resoldre un sistema d'equacions. Exemples de la seva utilització es poden trobar en les últimes edicions de 'Quantitative Chemical Analysis' de D.C. Harris i Analytical Chemistry de G. Christian.

A Youtube es poden trobar bons vídeos tutorials sobre el seu ús. Un exemple bastant didàctic es el vídeo 'Nonlinear model fitting using excel'.

Breument, en la pràctica tindrem n equacions (les n longituds d'ona que hem mesurat). Per simplicitat, considerarem que la contribució de la línia base serà comuna per a totes les longituds d'ona (e); i a la suma de les absorbàncies de cada component

$$A_j = k_{j1}C_1 + k_{j2}C_2 + e$$

Assignant valors inicials als tres paràmetres (C_1 , C_2 i e) (p. ex. 0.1) calculem un valor inicial d'absorbància; amb aquest valor calculem el residual ($A_{\text{calculat}} - A_{\text{experimental}}$), el qual elevem al quadrat i sumem els quadrats de tots els residuals. A continuació s'indica al SOLVER que volem minimitzar la suma de quadrats i ja ens calcula directament els valors de C_1 , C_2 i e , que fan mínima aquesta suma.

El valor de e ha de ser petit (de l'ordre de 0,01-0,02 com a molt). Valors alts són indicatius d'error experimental o que hi ha un error important a alguna(s) longitud d'ona.

Atès que es pot representar els punts experimentals (espectre experimental) i l'espectre calculat, és molt fàcil detectar la presència de punts erronis. En l'informe s'ha d'incloure dues figures; la inicial amb tots els punts i la final amb només els valors considerats correctes. En el cas de que s'hagin eliminat punts, s'ha de comentar possibles causes que justifiquin o expliquin l'eliminació.

b) Càlcul matricial pas a pas.

S'ha d'anar pas a pas (o escriure el macro corresponent).

- 1) es construeix la matriu K
- 2) es transposa la matriu K
- 3) es multiplica $K^t \times K$. Per aconseguir-ho, empra la funció **MMULT**: seleccionar tantes caselles com les que ha de tenir la matriu resultant de la multiplicació. Inserir **MMULT**, indicar les dues matrius, prémer "Ctrl+Majús+Intro" i així es calcularà la matriu completa. Si no es prem "Ctrl+Majús" només s'escriurà la primera casella.
- 4) Invertir la matriu $(K^t K)$. En aquest cas, s'empra la funció **MINVERSA** i un procediment igual al descrit anteriorment
- 5) Es multiplica $(K^t K)^{-1}$ per K^t
- 6) Es multiplica $(K^t K)^{-1} K^t$ per A . La matriu (c) resultant d'aquesta multiplicació conté el valor de desviació respecte el zero, i la concentració dels components de la mescla.

Al ser un mètode per mínims quadrats es podria també calcular un interval de confiança per cada valor calculat, tot i que això no és l'objectiu d'aquesta pràctica.

Comentari final

Inicialment es treballa amb un interval de longituds d'ona relativament ampli. En funció de com s'hagi registrat l'espectre, del valor de l'absorbància, del soroll espectral, etc, és possible que alguns punts experimentals s'apartin de la corba

esperable. El gran avantatge de les representacions gràfiques és que és fàcil visualitzar aquells punts que s'allunyen de la tendència esperable. Cal revisar els resultats amb sentit crític i repetir-los eliminant els punts experimentals erronis. En les gràfiques finals s'han de mostrar tots els punts experimentals, diferenciant entre els usats en el càlcul i els descartats

Bibliografia

M. Blanco, J. Coello, H. Ituriaga, S. MasPOCH i J. Riba, "Quim. Anal." 9, 269-279 (1990)

D.C. Harris, Quantitative Chemical Analysis, 8th ed, Freeman, 2010

P. ESPECTROFOTOMETRIA UV-Vis (III). LUMINISCENCIA MOLECULAR: DETERMINACIÓ DEL CONTINGUT DE QUININA EN TÒNICA.

Objectius:

- Aprendre a manipular un instrument de fluorescència.
- Entendre les diferències fonamentals entre absorció i emissió molecular.
- Determinar la longitud d'ona d'excitació i d'emissió.
- Determinar l'interval de treball de concentracions de quinina.
- Quantificar el contingut de quinina en una beguda comercial de tònica.

Introducció

En aquesta pràctica s'introdueix la fluorescència molecular, aplicada a la determinació de quinina ($C_{20}H_{24}N_2O_2$) en una beguda de tònica. La quinina és un alcaloide natural amb importants propietats analgèsiques, antipirètiques i antipalúdiques. Es va utilitzar com a fàrmac contra la malària; si bé, actualment n'hi ha d'altres tractaments més efectius per a aquesta malaltia. La quinina és el principal component d'una coneguda beguda, la tònica, i és la responsable del seu sabor amarg.

Principi

Es determina el contingut de quinina en aigua de tònica comercial detectant la fluorescència intrínseca de la molècula (rendiment quàntic de 0,53 a 20 °C en àcid sulfúric 0,05 M) quan es il·luminada amb la longitud d'ona apropiada (excitació 350 nm, emissió 450 nm).

Descripció general del procediment

Amb ajuda del professor, mesurar l'espectre de excitació i d'emissió per comprovar les longituds d'ona de excitació i de emissió. Determinar l'interval de treball de concentracions de quinina. Determinar la concentració de quinina en aigua tònica per interpolació de la corresponent senyal de fluorescència de la mostra (diluïda apropiadament) a la recta de calibratge.

Reactius i dissolucions:

Teniu preparades al laboratori les següents dissolucions:

- Àcid sulfúric 0,25 M
- Solució stock de quinina 10 µg/mL en àcid sulfúric 0,05 M

Equip

Observeu que la cubeta del fluorímetre es diferent respecte de la cubeta estàndard utilitzada normalment per espectrofotometria UV-Vis ja que te les quatre cares llises per poder mesurar l'espectre de absorció i de emissió simultàniament.

Preparació solucions patró

1) Per determinar l'interval de concentracions de treball, prepareu 6 dilucions successives 1:10 de quinina en H₂SO₄ 0,05M (en matrassos de 25,0 mL i a partir de la solució stock)

2) Un cop determinat l'interval lineal, si la recta obtinguda no té almenys 5 punts a dins d'aquest interval (normalment té 3 o màxim 4), prepareu solucions intermèdies addicionals de patró de quinina en H₂SO₄ 0,05 M dins de l'interval lineal de treball determinat.

Preparació de la mostra

Utilitzant el bany d'ultrasons, desgasificar uns 10 mL d'aigua tònica en un vas de precipitats durant uns 10 minuts per eliminar el gas. A continuació, prenent el valor màxim de quinina en tònica com a referència dilueu la mostra de forma apropiada en àcid sulfúric 0,05 M per obtenir una concentració esperada de quinina dins l'interval lineal.

Quenching en presència d'halurs

La fluorescència del sulfat de quinina sofreix *quenching* a altes concentracions de diferent halurs, tals com clorur, bromur o iodur. Per tal d'avaluar aquest efecte, es prepararà una solució stock 25mM de KBr. A partir d'aquesta, prepareu cinc patrons de calibratge de concentracions entre 1,0 i 5,0 mM de Br⁻ en matrassos aforats de 25,0 mL, afegint la quantitat adequada de dissolució de Br⁻ i quinina (1ppm) en H₂SO₄ 0,05M.

Mesura

Analitzeu amb el fluorímetre tant els patrons com la mostra (prèviament diluïda) tot fent la lectura a la longitud d'emissió (λ_{em} =450 nm) i excitació (λ_{ex} =350 nm) adequades. Per fer aquestes mesures seguiu les instruccions que trobareu al costat del instrument.

Anàlisi de dades

Amb les dades recollides, construïu la recta de calibratge i calculeu la desviació estàndard de l'ordenada i del pendent. Calculeu la concentració i l'interval de confiança (α =0,05) per al contingut de quinina en la mostra.

Adicionalment, calculeu el límit de detecció (LOD). Recordeu, que segons la definició més acceptada, el LOD és correspon a aquella concentració que pot ser detectada amb una certesa raonable per a un procediment analític determinat, o el que és el mateix, que proporciona una senyal (y_{LOD}) significativament diferent a la del blanc (y_B). És a dir, aquella concentració que proporciona una senyal igual a la del blanc més "k" vegades la desviació estàndard d'aquest (s_B), on el valor de k dependrà del grau de confiança desitjat (tradicionalment k=3).

$$y_{LOD} = y_B + k s_B$$

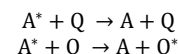
I per tant, aïllant aquesta a la recta de regressió obtinguda ($y = a + bx$), trobem que:

$$x_{LOD} = (y_{LOD} - a) / b$$

Ara bé, existeixen diferents formes de calcular aquests, entre els quals destaquen dos aproximacions:

- Càlcul a partir del blanc: Per una banda, repetiu la mesura del blanc 10 vegades i calculeu la mitjana i la desviació estàndard.
- Càlcul a partir de la recta de calibratge: D'altra banda, i a partir dels paràmetres de la recta de regressió, preneu el valor de l'ordenada a l'origen com a estimació de " y_B ", i " $s_{y/x}$ " enlloc de " s_B " per a l'estimació del LOD.
- Compareu els valors obtinguts segons els dos mètodes.

El terme *quenching* fa generalment referència a l'energia no radiativa transferida d'una espècie excitada (A) a altres molècules (Q, *quencher*); el qual segueix una de les següents expressions:



El *quenching* dinàmic, també anomenat *quenching* per col·lisió, requereix contacte entre l'espècie excitada i l'agent extintor (Q), requerint una concentració d'aquest prou alta perquè hi hagi una alta probabilitat de col·lisió entre l'espècie excitada i el *quencher* durant la vida útil de l'estat excitat.

La cinètica d'aquest procés segueix la relació de Stern-Volmer:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q[Q]$$

on F_0 són la fluorescència en absència i presència del *quencher*, respectivament, k_q és la constant de *quenching* de Stern-Volmer, i $[Q]$ és la concentració del *quencher*. Així doncs, és possible obtenir una relació lineal a partir del gràfic de F_0/F vs. $[Q]$, que permet obtenir el valor d'aquesta constant.

Resultats

Els resultats de concentració s'expressaran en forma de µg/mL amb els corresponents intervals de confiança.

Bibliografia

Curso experimental en química analítica, Jacinto Guiteras, Roser Rubio i Gemma Fonrodona (2003), Editorial Síntesis, ISBN Paper: 9788497560726.
Miller, J.N. & Miller, J.C. *Estadística y quimiometría para Química Analítica*. Prentice Hall, 2002.

BLOC 2. CROMATOGRAFIA

H. CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC) (II): DETERMINACIÓ DE CAFEÏNA EN CAFÈ SOLUBLE

Objectius

- Aprendre a utilitzar un cromatògraf HPLC.
- Preparar i filtrar una fase mòbil.
- Entendre l'ús de tampons de pH en la fase mòbil.
- Determinar el contingut en cafeïna de mostres de cafè soluble normal i descafeïnat.
- Verificar que ambdues mostres compleixen la normativa legal.

Esquema general del procediment

- Preparació de la fase mòbil. IMPORTANT: ha d'estar filtrada i desgasificada seguint el procediment que indiqui el professor.
- Preparació d'una dissolució de la mostra, pesant amb precisió la massa de cafè corresponent
- Preparació i injecció dels patrons de cafeïna. Càlcul de l'àrea del pic de la cafeïna.
- Càlcul de la recta de regressió de l'àrea en front de la concentració de patrons
- Injecció de la mostra.
- Interpolació de l'àrea del pic de la cafeïna de la mostra en la recta de calibratge.
- Càlcul de la concentració i l'interval de confiança de la cafeïna, expressada com a mg de cafeïna/g cafè.

Procediment

Preparació dels patrons.

Dissolució patró de 1000 ppm: Peseu 100,0 mg de cafeïna patró i dissolueu-la en 100 mL d'aigua **Milli-Q**.

A partir d'aquí prepareu una dissolució de 100 ppm (100 mL). I a partir d'aquesta, transferiu 1, 2, 4, 6, 10 mL a aforats de 50,0 mL enrasant amb aigua **Milli-Q**.

Preparació de les mostres.

Cafè normal. Peseu 100 mg de cafè soluble (normal) i enraseu-lo en un matràs aforat de 250 mL amb aigua **Milli-Q**.

Cafè descafeïnat: Peseu 250 mg de cafè soluble (descafeïnat) i enraseu-lo en un matràs aforat de 100 mL amb aigua **Milli-Q**.

Fase mòbil.

Dissolucions i reactius:

S1 = Àcid Acètic 0,1 M

S3 = Aigua **Milli-Q**

S2 = Acetat de sodi 0,1 M

S4 = Metanol (qualitat HPLC)

Composició de la fase mòbil: 8 % S1 + 12 % S2 + 40 % S3 + 40 % S4

Les dissolucions S1 i S2 estan preparades al laboratori. El % s'expressa en v:v

Preparació: heu de filtrar totes les dissolucions preparades per separat (excepte el metanol qualitat HPLC) a través d'una membrana de mida de porus adient (màxim 0,45 µm). Desgasifiqueu uns 5 min per eliminar els gasos dissolts.

A més, heu de filtrar i desgasificar 500 mL d'una dissolució d'H₂O **Milli-Q**:Metanol 90:10 per rentar l'equip d'HPLC.

Paràmetres del cromatògraf.

Columna: C₁₈

Cabal: 1 mL/min

Volum d'injecció: 20 µL

Longitud d'ona del detector: 272 nm

Posada en marxa del cromatògraf

- 1) Connecteu i purgeu el sistema de bombes seguint les instruccions del PNT que trobareu al costat de l'equip
- 2) Seleccionau les condicions de cabal adient i deixeu circular la dissolució d'H₂O **Milli-Q**:Metanol 90:10 durant uns 15 min per netejar el sistema.
- 3) Prepareu el mètode que utilitzareu
- 4) Passeu per la columna la fase mòbil per tal d'equilibrar-la, durant uns 20 min.

Presa i anàlisi de dades

- 5) Després de l'estabilització del sistema, injecteu els patrons. TOTES les dissolucions que injecteu s'han de filtrar adequadament (filtre xeringa).
- 6) Mesureu l'àrea de pic i construïu una recta de calibratge.
- 7) Injecteu les mostres i trobeu la seva concentració per interpolació a la recta de calibratge. Calculeu també l'interval de confiança.
- 8) Calculeu el contingut de cafeïna (i l'interval de confiança) als sobres de cafè: mg cafeïna/g cafè.

IMPORTANT: Les dissolucions patró es prepararen per grups (un calibratge únic per sessió de pràctiques), però cada parella prepararà i injectarà les seves mostres.

I. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ (HPLC) (III): IDENTIFICACIÓ DE SULFONAMIDES EN MEDICAMENTS D'ÚS VETERINARI

Introducció

Les sulfonamides constitueixen una família important de compostos, àmpliament estesa en la pràctica humana en pacients al·lèrgics als antibiòtics, i especialment utilitzada en el camp de la indústria veterinària pel tractament d'infeccions urinàries. Algunes de les sulfonamides que s'utilitzen amb major freqüència són el sulfatiazol (SFT), la sulfadiazina (SDZ), la sulfamerazina (SMRZ) i la sulfametazina (SMTZ). Les seves estructures es mostren a la Figura 1.

Curiosament, i malgrat ser espècies estructuralment i farmacològicament molt semblants, freqüentment s'administren conjuntament en preparacions que són mesclades binàries o ternàries de diferent contingut i composició. La raó d'això és minimitzar problemes que es donen en els ronyons per precipitació de les mateixes sulfonamides o dels seus metabòlits acetilats, els quals són encara més insolubles. Aleshores la combinació de diverses sulfonamides redueix la incidència d'aquest problema, ja que cada compost ingerit com una part de la dosi total, actua independentment des del punt de vista de solubilitat.

Com a conseqüència, força combinacions de sulfonamides estan disponibles com a productes comercials, i per tant és important desenvolupar mètodes amb els quals es pugui determinar el seu contingut.

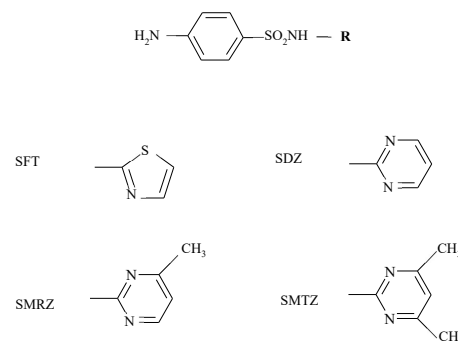


Figura 1. Estructures de les sulfonamides d'estudi: el sulfatiazol (SFT), la sulfadiazina (SDZ), la sulfamerazina (SMRZ) i la sulfametazina (SMTZ)

Objectius

- Comprovar l'efecte de la composició de la fase mòbil en la resolució dels pics cromatogràfics
- Identificar i quantificar les sulfonamides presents en un medicament d'ús veterinari

Mostres i reactius

La mostra a analitzar és: GranadilSulfa® (Industrial Veterinaria, S.A., Barcelona, Espanya), constituïda per una mescla ternària de sulfonamides (segons indica l'etiqueta del producte).

PROCEDIMENT

Aquesta pràctica és realitzarà en dos dies i totes les parelles haurien de tenir possibilitat d'operar l'HPLC. El primer dia es durà a terme l'optimització del mètode i el segon dia l'anàlisi quantitativa.

Paràmetres cromatogràfics:

El mètode analític es basa en el proposat per Goeht et al.⁶ que determinaven sulfonamides en sèrum. Les condicions o paràmetres del HPLC que empareu les trobeu en el quadre següent:

Columna:	C ₁₈ (5µm)
Fase mòbil:	àcid acètic 1% : acetonitril
Cabal:	1,5 mL/min
Detecció:	UV a 254 nm

Com a procediment estàndard de treball, prèviament als anàlisis cromatogràfics s'ha de gravar el mètode corresponent, on s'indiquen el cabal i la longitud d'ona de registre del cromatograma. Es deixa equilibrar la columna amb la fase mòbil adequada segons el mètode escollit i es procedeix a realitzar la injecció. L'ordinador comprova que les condicions experimentals concordin amb les previstes en el mètode indicat, obre un finestre per escriure el nom de la mostra a injectar i aprova la realització de la injecció.

⁶Simple High-Pressure Liquid Chromatographic Determination of Trisulfapyrimidines in Human Serum, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 67, n° 3, 1978, 404-406

Procediment experimental

A) Cromatògraf Shimadzu

El cromatògraf Shimadzu està equipat amb una bomba que permet l'aspiració i mescla a baixa pressió de fins a 4 dissolvents, el que permet programar gradients d'elució. Per a aquesta pràctica disposarem de dos dissolvents:

- a) Solució aquosa de HAc 1 % (filtrada y desgasificada com s'indica a l'apartat A1).
- b) Acetonitril (ACN) qualitat HPLC.

Els patrons i les mostres també es filtraran abans d'injectar-les a l'equip. Per fer-ho, es col·locarà un filtre de xeringa de 0.45 µm abans de fer la injecció.

A.1 Preparació de les fases mòbils

- Inicialment es prepara 1 litre de solució d'acètic a l'1 % (v/v) a partir de l'àcid acètic concentrat.
- Elimineu les micropartícules que hi puguin haver fet servir l'equip de filtració emprant una membrana polimèrica de mida de porus adient.
- Desgasifiqueu-la uns 5 min per eliminar els gasos dissolts (CO₂, N₂, etc.).
- Connecteu i purgeu el sistema de bombes tal i com s'indica a les instruccions d'ús de l'equip.

A.2 Preparació patrons

Prepareu, per pesada, solucions patró individuals de 2000 ppm de cadascuna de les 4 sulfonamides disponibles en el laboratori: SFT, SDZ, SMRZ, SMTZ.

Prepareu una barreja de les 4 sulfonamides posant 1 ml de cada dissolució en un got de precipitats o en un erlenmeyer i afegint uns 20 ml d'aigua.

A.3 Selecció de la millor fase mòbil. Identificació de pics

Comproveu l'eficàcia de la separació de la mescla de les 4 sulfonamides. En l'ordinador de control del cromatògraf programeu els mètodes que considereu per tal de fer la separació. Per començar, elaboreu un mètode per injectar 75% fase aquosa i 25% de fase orgànica. Anomeneu el mètode com "Sulfamides_75-25".

Deixeu equilibrar la columna al cabal de treball uns 15-20 min. Feu la injecció de la mescla de sulfonamides preparades segons l'apartat A2 i valoreu la qualitat de la separació amb el cromatograma obtingut.

Segons el resultat, modifiqueu la proporció de les fases per tal de millorar la separació (què passarà si es redueix la fase orgànica?). Anomeneu els diferents mètodes segons les proporcions de fase aquosa i orgànica emprades (Sulfamides_80-20, Sulfamides_85-15). Sempre que canvieu les condicions d'elució s'ha de deixar equilibrar l'equip 10 min.

Observeu els canvis en el cromatograma, apunteu-los i escolliu la fase mòbil que sembli més adequada. En l'informe s'hauran de descriure els canvis observats i raonar adequadament la seva causa.

Un cop escollida la fase mòbil més adequada, identifiqueu els pics a partir de la **injecció dels patrons "purs" (prèviament diluïts, però no mesclats)** preparats al apartat A2. Es considerarà identificació positiva la coincidència en temps de retenció.

A.4 Preparació i anàlisi de la mostra

Partint de 2 ml de mostra, prepara 50 ml de la mostra diluïda unes 2.000 vegades (cal preparar la dilució cada dia). Fes les dilucions intermèdies que consideris adients.

Seguint el mateix procediment descrit anteriorment, injecteu la dissolució de mostra i identifiqueu les sulfonamides presents.

A.5. Anàlisi quantitativa de la mostra

A partir de les solucions patró de les sulfonamides preparades a l'apartat A2, feu les dilucions necessàries per tal de preparar unes rectes de calibratge adequades per a la mostra. Prepara 5 patrons que continguin entre 20 i 100 ppm de SFT i SMTZ, i entre 10 i 50 ppm de SMRZ i SDZ. Cada patró ha de contenir totes les sulfonamides identificades a l'apartat A.4!

Injecta els diferents patrons a l'HPLC. Calcula la concentració de les diferents sulfonamides a la mostra. Compara els resultats obtinguts amb els valors indicats a l'etiqueta del producte.

J. CROMATOGRAFIA DE GASOS (GC) (I): INFLUÈNCIA DE LA TEMPERATURA A LES SEPARACIONS

Objectius

- Aprendre a utilitzar un cromatògraf CG
- Interpretar qualitativament la relació entre temperatura de ebullició, temperatura de columna i temps de retenció.
- Aprendre a dissenyar un gradient de temperatura

Introducció

Quan s'utilitzen detectors de tipus general, el millor mètode per caracteritzar els diferents productes és el temps de retenció, és a dir, el temps transcorregut entre la injecció i el màxim del pic cromatogràfic. En una sèrie homòloga de compostos orgànics cal esperar que el temps de retenció tingui una relació lineal amb el punt d'ebullició, el qual està relacionat amb la longitud de la cadena de carbonis. D'altra banda, si la diferència de punts d'ebullició és gran és d'esperar que no sigui possible obtenir una bona separació en condicions isoterms.

Per tant, els objectius concrets d'aquesta pràctica són:

- Interpretar la relació entre temperatura d'ebullició (T_{eb}) i temps de retenció (t_r)
- A partir de l'observació dels cromatogrames registrats en condicions isoterms a diferent temperatura, dissenyar un gradient d'elució que possibiliti l'obtenció d'un cromatograma en el que els 4 alcohols estiguin ben resolts en un temps total d'elució raonable.

1. Instrumentació: Shimadzu GC-2014

- Injecció Split-splitless automàtica
- Columna capil·lar
- Detector de ionització a la flama (FID)

1.1. Condicions del cromatògraf

L'equip consta d'una columna Alltech EC-wax 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m (temperatura màxima d'utilització 260 °C).

Seguiu les instruccions del PNT adjunt a l'equip per a posar en marxa el cromatògraf i ajusteu les següents condicions:

Temperatura inicial del forn 40 °C
Temperatura de l'injector 200 °C
Temperatura del detector (TCD) 250 °C

Cabals He: (columna) 1.3mL min⁻¹

Ajust dels manòmetres:

H ₂	2 bar
He	6 bar
Aire (O ₂)	2 bar

Relació Split 1:20

1.2 Anàlisi qualitativa

Fem servir primer un barreja de quatre alcohols: etanol, butanol, n-pentanol i etilenglicol. El FID és un detector molt sensible, les mescles s'han de preparar 10-100 vegades diluïdes en acetona. Per analitzar la mescla d'alcohols la provarem inicialment una proporció equivalent a 0,05 mL de alcohol en 5 mL de acetona i diluir si el pic es massa intens.

Feu injeccions de 0,5 ml d'aquesta mescla a l'injector del GC.

S'han de buscar les condicions per a una bona separació dels alcohols.

1.2.1. Busqueu en la bibliografia els punts d'ebullició dels alcohols i decidiu primer quina creieu que és la temperatura inicial que caldria fer servir per aconseguir la separació dels 4 alcohols. Segons sigui el cromatograma obtingut a la primera injecció, aneu modificant la temperatura per optimitzar la separació, si s'escau. Assajar almenys tres temperatures que es puguin considerar com a baixa, mitja i alta.

1.2.2. Si no es troba una temperatura que permeti la separació adequada dels quatre alcohols, intenteu millorar la seva separació aplicant un gradient de temperatura.

A partir dels resultats obtinguts a l'apartat anterior, podeu triar quines seran les millors condicions per fer el programa de temperatures. Una primera rampa de temperatura que podeu provar seria el següent programa: una $T_{inicial} = 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($t_{hold} = 1\text{ min}$) i una T_{final} de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($t_{hold} = 0,2\text{ min}$), amb un augment de la T a la velocitat de $20\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. A partir dels resultats trobats, i consultant amb el professor, prepareu altres gradients.

Un cop aconseguida una bona separació, **injectar els alcohols de forma individual** per identificar-los.

L. CROMATOGRAFIA DE GASOS (GC) (II): DETERMINACIÓ DE METANOL EN AIGUARDENT D'ORUJO

Objectius

- Aprendre a utilitzar un cromatògraf CG amb detector FID.
- Conèixer i interpretar els paràmetres de la injecció i del detector.
- Conèixer el software i paràmetres per a la integració de l'àrea del pic.
- Quantificar el contingut de metanol en un destil·lat alcohòlic.

Introducció

En tots els destil·lats alcohòlics és inevitable la presència d'una certa quantitat de metanol. La legislació estableix el seu contingut màxim que depèn del tipus de destil·lat⁷. Aquest valor màxim s'expressa en relació al contingut en etanol. Concretament, la norma per l'aiguardent d'orujó diu " *...el contenido máximo de metanol será de 1000 g/hl de alcohol a 100 % vol*"⁸

Instrumentació

Cromatògraf de gasos: Shimadzu GC-2014

- Injecció Split-splitless automàtica
- Columna capil·lar
- Detector de ionització a la flama (FID)

Condicions del cromatògraf

Columna	Alltech EC-wax 30 mx0.25 mm IDx0.25 µm (temperatura màxima d'utilització 260 °C)
Temperatura de l'injector	200 °C
Temperatura del detector (FID)	250 °C
Cabals He:	(columna) 1.3 mL min ⁻¹
Relació Split	1:20
Purge flow	3 mL min ⁻¹

Ajust dels manòmetres:

H ₂	2
He	6
Aire (O ₂)	2

⁷ Reglamento (CE)Nº 110/2008

⁸ Sorpren l'estranya definició del màxim legal. Cal tenir en compte que la legislació es dirigeix a les empreses fabricants i per això fa esment d'hectolitres. D'altra banda, el contingut d'alcohol en una beguda s'expressa com a % en volum. En aquest sentit, fixeu-vos que el contingut en MeOH no es refereix a un contingut absolut, sinó que està en funció del contingut en EtOH.

Condicions del gradient de temperatura

Programa els següents gradient de temperatures:

Per als patrons: $T_{\text{inicial}} 35^{\circ}\text{C}$ durant 1 min, rampa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins 60°C .

Per a la mostra d'orujó: $T_{\text{inicial}} 35^{\circ}\text{C}$ durant 1 min, rampa de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins 60°C , rampa de $90^{\circ}\text{C}/\text{min}$ fins a 200°C i mantenir 3 min.

Procediment experimental

Preparació recta calibratge. Mètodes per patrons externs

- Peseu amb exactitud una quantitat aproximada a 500 mg MeOH i diluiu amb aigua MilliQ a 100 ml. Feu una dilució 1/5 d'aquesta dissolució.
- En matrassos aforats de 10,0 mL, afegiu respectivament 1,2,3,4 i 5 mL de la dissolució anterior de MeOH; 4 mL de EtOH i enraseu amb aigua Milli-Q. Transferiu un volum adequat als vials del cromatògraf.
- Injecteu una mostra d'aiguardent.
- Calculeu i representeu la corba de calibratge.
- Trobeu la concentració i l'interval de confiança del MeOH en l'aiguardent en les unitats descrites en la norma.
- Discutiu si el contingut de MeOH està o no per sota del límit legal establert.

NORMES DE SEGURETAT

ÉS OBLIGATORI PORTAR SEMPRE BATA (100% COTÓ) I ULLERES PROTECTORES HOMOLOGADES.

El departament no disposa de bates per aquells que se'n oblidin però sí d'un nombre limitat d'ulleres per a casos excepcionals en cada laboratori.

La normativa complerta està disponible permanentment a la web del Departament de Química, entrant a la pestanya de docència de Grau

<https://www.uab.cat/ca/quimica/prevencio-seguretat>

ANNEX 1: Fórmules ajust mínims quadrats

MÈTODE DE MÍNIMS QUADRATS (per a una recta $y = a + bx$)

$b = \frac{S_{xy}}{S_{xx}}$ $a = \bar{y} - b \bar{x}$	<p>Les variables auxiliars S_{xx}, S_{yy}, S_{xy} es defineixen com</p> $S_{xy} = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) = \sum x_i y_i - n \bar{x} \bar{y}$ $S_{xx} = \sum (x_i - \bar{x})^2 = \sum x_i^2 - n \bar{x}^2$ $S_{yy} = \sum (y_i - \bar{y})^2 = \sum y_i^2 - n \bar{y}^2$ <p>\bar{x} és la mitjana dels valors x \bar{y} és la mitjana dels valors y n és el nombre de punts de la recta</p>
---	--

DESVIACIONS ESTÀNDAR

Desviació estàndard dels residuals	
$s_{y/x} = \sqrt{\frac{S_{yy} - b^2 S_{xx}}{n - 2}}$	
Desviació estàndard del pendent	Desviació estàndard de l'ordenada a l'origen
$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{S_{xx}}}$	$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n - \frac{\sum x_i^2}{n}}} = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{x}^2}{S_{xx}}}$
Desviació estàndard al càlcul de x_0 a partir d'un valor de y_0	Desviació estàndard al càlcul de x_0 a partir de m replicats de y
$s_0 = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 S_{xx}}}$	$s_0 = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 S_{xx}}}$ <p>y_0 és la mitjana dels m replicats.</p>
Desviació estàndard d'una concentració trobada pel mètode d'addició estàndard	
$s_E = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 S_{xx}}}$	

ANNEX 2: Comparació de pendents de dues rectes de regressió

La comparació dels pendents de dues rectes de regressió ($y = a + bx$) és una operació molt freqüent en el laboratori analític podeu tenir necessitat de fer-ho amb dues rectes de calibratge registrades en dies diferents, per veure si el mètode és robust; entre una recta de calibratge per patró extern i una per addició estàndard, per verificar si hi ha o no efecte matriu; etc.

En general, un problema afegit és que 'les nostres rectes' tenen pocs graus de llibertat el que sempre genera dubtes estadístics sobre la fiabilitat de la comparació. Per això, freqüentment s'aplica una regla simple, que no té cap justificació formal, però que és molt fàcil d'aplicar: si la diferència entre pendents és menor o igual al 10%, es considera que no hi ha diferència significativa. No obstant això, moltes vegades aquest càlcul és insuficient i hem de justificar la nostra decisió en base a algun argument amb una sòlida base científica. En aquest cas, vam acudir a l'estadística i a el test t de Student. El test t per comparar pendents no és exactament igual a el test t per comparar mitjanes, però guarda similituds formals, i hi ha un mètode rigorós quan es compleix la condició d'igualtat de variàncies i un mètode aproximat quan aquesta condició no es compleix.

El primer pas és verificar si les desviacions estàndard dels residuals de cadascuna de les rectes ($s_{y/x}1$ i $s_{y/x}2$) són significativament iguals (H_0) o diferents (H_1). Per a això aplicarem un test F.

$$F_{exp} = \frac{(s_{y/x})_1^2}{(s_{y/x})_2^2}$$

Si el valor de F_{exp} és menor o igual que el de F crítica, per al nivell de significació desitjat i n_1-2 i n_2-2 graus de llibertat, llavors acceptarem la hipòtesi d'igualtat de variàncies. Considereu el valor de una cua.

a) Càlcul de la t de Student quan les variàncies són iguals

i) Es calcula la variància mitjana

$$(s_{y/x})_0^2 = \frac{(n_1 - 2)(s_{y/x})_1^2 + (n_2 - 2)(s_{y/x})_2^2}{n_1 + n_2 - 4}$$

ii) Es calcula la desviació estàndard de la diferència entre els pendents

$$s_{b_1 - b_2} = (s_{y/x})_0 \sqrt{\frac{1}{(s_{xx})_1} + \frac{1}{(s_{xx})_2}}$$

A on $(s_{xx})_1 = \sum (x_{i1} - \bar{x}_1)^2$ i anàlogament per a la recta 2.

- iii) Es calcula l'estadístic t

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{s_{b_1 - b_2}}$$

Aquest valor es compara amb el valor crític per a un nivell de significació α preestablert i $n_1 + n_2 - 4$.

- b) Càlcul de la t de Student per al cas de variàncies desiguals.

En aquest cas no hi ha un resultat exacte i s'han descrit diverses aproximacions. Per a un estudi crític comparatiu veure ⁹

- i) Es calcula l'estadístic t

$$t_{exp} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}}$$

A on s_{b_1} i s_{b_2} són les desviacions estàndard dels pendents de les dues rectes

- ii) Es busca l'estadístic t crític en la taula corresponent per a un nivell de significació α preestablert. Els graus de llibertat es calculen d'acord amb l'equació que es presenta a continuació. Es fa servir el sencer més proper al valor de gdl calculat ($n_1 \leq n_2$)

$$\frac{1}{gdl} = \left[\left(\frac{c^2}{n_1 - 2} \right) + \left(\frac{(1 - c)^2}{n_2 - 2} \right) \right]$$

$$c = \frac{(s_{y/x})_1^2 / (s_{xx})_1}{(s_{y/x})_1^2 / (s_{xx})_1 + (s_{y/x})_2^2 / (s_{xx})_2}$$

Les diferents aproximacions descrites a la bibliografia difereixen, bàsicament, en la fórmula per computar els gdl. Com més gran sigui el nombre de punts de les rectes, més s'aproximen els resultats de les diferents aproximacions.

ANNEX 3: Gestió de Residus

La majoria de les pràctiques experimentals generen residus que tard o d'hora s'han de gestionar. Un dels objectius de l'Oficina de Medi Ambient de la UAB (<https://www.uab.cat/web/residus-1271850580613.html>) és donar les eines per minimitzar, manipular, emmagatzemar i donar una sortida als residus especials de laboratori d'una manera segura i respectuosa amb l'entorn i, a la vegada, complir la legislació vigent. És **responsabilitat de tothom** observar aquestes normes i fer-les complir.

Els criteris de classificació que implica la gestió dels residus dins la universitat són els següents.

- **Legalitat.** Han de complir la normativa vigent.
- **Naturallesa.** Es condicionaran els residus en funció de la seva naturalesa química, biològica o radioactiva, o les combinacions de qualssevol d'aquestes.
- **Perillositat.** La classificació ha de tenir en compte el tipus de perillositat a la qual s'enfronta qui treballa amb els residus. Així la classificació dels residus ha de considerar-ne els riscos inherents: inflamables, comburents, tòxics, irritants, nocius, corrosius, asfixiants, carcinogènics, mutagènics, tòxics per a la reproducció, al·lèrgicogens.
- **Estat físic.** L'estat físic (sòlid, pastós o líquid) implica uns requisits de contenció que determinen les característiques de l'envàs.
- **Quantitat generada.** El fet que es generi més o menys quantitat d'un residu pot fer que sigui idoni col·locar-lo en un grup determinat o bé establir un grup específic per ell.
- **Tractament final.** El tractament final influeix el nivell d'agregació dels grups de residus.
- **Condicionament i emmagatzematge.** Les restriccions de condicionament i emmagatzematge fan que determinats residus s'hagin de col·locar en una determinada classe de contenidors.

⁹ J.M. Andrade, M.G. Estévez-Pérez, Analytica Chimica Acta 838 (2014) 1–12

En les pràctiques de Química Analítica es generen diversos residus químics. A la taula següent es classifiquen per tipologia i s'indica el contenidor al qual s'han de gestionar. Per altres productes no inclosos a la taula, demanar informació al professor. A més a més, hi ha un contenidor per sòlids coneguts de baix risc (filtres HPLC, ...)

Contenidors Residus	A	B	C	P	F	H	I	J	L
Diss. Aqueoses Inorgàniques	EDTA Sols..	KCl Patrons K amb LiCl			1M NaAc				
Diss. Aqueoses Orgàniques	Tampò		HClhidroxilamina O-fenantrolina Sols. Calibratge		PAR Patrons	Fase mòbil Cafeïna	Diss. Patró		Diss. Patró Mostra
Solvents orgànics inflamables	Etanol							Mesclos Alcohols	
Àcids Inorgànics			Diss. Estoc comprimit HCl H ₂ SO ₄	H ₂ SO ₄					
Sals Inorgàniques, bases diluïdes, etc									
Diss. Metalls Pesants	Diss Cu		Diss Fe		Diss Ni i Co				
Sòlids Coneguts no tòxics					Filtres	Filtres HPLC	Filtres HPLC		

A la taula següent es mostra la classificació dels residus químics líquids d'acord a la seva tipologia i són els que es troben als laboratoris de practiques.

Taula 1. Classificació dels residus químics líquids.

QUÍMICS LÍQUIDS		
Grup	Codi	Subgrup
Ecotòxics	L01.A	Ecotòxics.
	L01.B	Olis minerals no contaminats.
	L01.C	Olis contaminats amb PCB i PCT.
Nocius / Irritants inorgànics	L02.A	Solucions aquoses inorgàniques i colorants o tincions nocives o irritants.
	L02.B	Reveladors provinents de processos de revelat.
	L02.C	Fixadors procedents de processos de revelat.
Nocius / Irritants orgànics	L03	Solucions aquoses orgàniques de baixa toxicitat.
Inflamables no halogenats	L04.0	Dissolvents orgànics inflamables no halogenats (alcohols i glicols), hidrocarburs alifàtics saturats i no saturats, hidrocarburs aromàtics, i altres materials inflamables i combustibles no especificats en d'altres grups.
	L04.A	Aldehids, amides, esters, èters, cetones, isocianats.
	L04.B	Amines alifàtiques i aromàtiques, compostos azo, compostos diazo, hidrazines, nitrils.
	L04.C	Epòxids
	L04.D	Mercaptans i sulfurs orgànics.
Inflamables halogenats	L05	Dissolvents orgànics halogenats.
Corrosius Àcids	L06.I	Àcids inorgànics.
	L06.O	Àcids orgànics, compostos orgànics nitrogenats, peròxids orgànics.
Corrosius Bases	L07.A	Bases diluïdes, sals inorgàniques, sulfurs, fluorurs i nitrurs inorgànics.
	L07.B	Bases fortes.
Tòxics	L08.A	Solucions amb metalls pesants i els seus derivats.
	L08.B	Solucions amb Fenols, Cresols, Tetraòxid d'osmi.
	L08.C	Solucions cianurades.
	L08.D	Solucions amb Carbamats, tiocarbamats i organofosforats.
	L08.E	Altres residus líquids amb propietats carcinògenes, mutàgenes o tòxiques per a la reproducció, amb propietats neurotòxics o disruptors endocrins, i materials d'un sol ús altament contaminats amb alguna substància tòxica.
Específics	L09.A	Reactius forts i peròxids en envàs original.
	L09.B	Substàncies desconegudes en estat líquid.