

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

**1. INTRODUCCIÓ**

En aquesta pràctica, s'ha de determinar el contingut de quinina en una beguda de tònica, mitjançant l'anàlisi de la fluorescència intrínseca molecular, quan es il·luminada amb la longitud d'ona apropiada. El component principal de la tònica, és la quinina, és la responsable del fet que el seu sabor sigui amarg. La quinina és un alcaloide natural, té propietats analgèsiques, antipirètiques i antipalúdiques, gràcies a aquestes propietats, es pot utilitzar com a fàrmac en contra de la malària.

**2. OBJECTIUS**

L'objectiu principal de la pràctica és aprendre a manipular un instrument de fluorescència i entendre les diferències entre absorció i emissió molecular. Fent les mesures s'haurà de saber representar quin és l'interval de treball de concentracions de quinina i quantificar el contingut de quinina en una beguda de tònica.

**3. DESCRIPCIÓ DE LA MOSTRA**

La mostra és obtinguda d'una ampolla de Schweppes, és un líquid incolor amb un número de lot: 09022010.

**4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL**

Per preparar les solucions patrons, tenim com a reactius àcid sulfúric 0,25M i una solució stock preparada de quinina 10ppm en àcid sulfúric 0,05M.

Primer per determinar l'interval de concentracions de treball, s'han de preparar unes dilucions successives 1:10 de quinina en àcid sulfúric 0,05M, en matrassos de 25ml i a partir de la solució stock de 10ppm.

Es preparen patrons d'1; 0,1; 0,01; 0,001 ppm i s'han de realitzar els càlculs següents per saber la quantitat d'addició en cada patró:

- 1ppm

$$25ml \times \frac{1mg}{1000ml} \times \frac{1000ml}{10mg} = 2,5ml \text{ de la de } 10ppm$$

- 0,1ppm

$$25ml \times \frac{0,1mg}{1000ml} \times \frac{1000ml}{1mg} = 2,5ml \text{ de la de } 1ppm$$

- 0,01ppm

$$25ml \times \frac{0,01mg}{1000ml} \times \frac{1000ml}{0,1mg} = 2,5ml \text{ de la de } 0,1ppm$$

- 0,001ppm

$$25ml \times \frac{0,001mg}{1000ml} \times \frac{1000ml}{0,01mg} = 2,5ml \text{ de la de } 0,01ppm$$

Cada patró ha de contenir una concentració de 0,05M d'àcid sulfúric, per això s'ha de calcular el que s'ha d'afegir d'àcid sulfúric 0,25M, per arribar aquesta concentració.

$$2,5\text{ml} \times \frac{0,05\text{ mol H}_2\text{SO}_4}{1000\text{ml}} = 125 \times 10^{-6} \text{ mols afegits de H}_2\text{SO}_4 \text{ en el matràs de 25ml}$$

$25\text{ml} \times \frac{0,05\text{ mol H}_2\text{SO}_4}{1000\text{ml}} = 125 \times 10^{-5} \text{ mols}$  que ha d'haver de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en el matràs de 25ml perquè la concentració sigui 0,05M

$$125 \times 10^{-5} - 125 \times 10^{-6} = 0,001125 \text{ mols que s'han d'afegir de H}_2\text{SO}_4$$

$$0,001125 \text{ mols H}_2\text{SO}_4 \times \frac{1000\text{ml}}{0,25\text{mols}} = 4,5 \text{ ml de H}_2\text{SO}_4 \text{ 0,25M}$$

Finalment, perquè a cada matràs de 25ml hi hagi una concentració de 0,05M d'àcid sulfúric, s'han d'afegir 4,5 ml de la solució d'àcid 0,25M.

Després de fer els càlculs amb el fluorímetre, s'han de preparar més patrons que estiguin dins de l'interval lineal. Nosaltres afegirem el patró de 0,8ppm i 0,4ppm. Aquests els preparem a partir de la solució stock de 10ppm i afegint la mateixa quantitat d'àcid sulfúric 0,25M que en els altres patrons.

$$25\text{ml} \times \frac{0,8\text{mg}}{1000\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{10\text{mg}} = 2, \text{ ml de la de 10ppm}$$

$$25\text{ml} \times \frac{0,4\text{mg}}{1000\text{ml}} \times \frac{1000\text{ml}}{10\text{mg}} = 1\text{ml de la de 10ppm}$$

Per fer totes les mesures, s'ha utilitzat una pipeta graduada de 5ml.

Pel que fa a la preparació de la mostra es va traspasar una mica de tònica de l'ampolla a un vas de precipitats i es va degasificar durant 10 minuts. Les dilucions que es van fer s'expliquen posteriorment a l'apartat de resultats.

## 5. TRACTAMENT DE DADES I RESULTATS

Els patrons preparats i el blanc es porten a un fluorímetre per mesurar la seva intensitat de fluorescència i així construir una corba de calibrat que relacioni concentració i intensitat. Primerament, s'estableixen les longituds d'ona a les quals s'excita la quinina (350 nm) i a la qual es registra la seva intensitat d'emissió (450 nm). Cal destacar que les cubetes a les quals es col·loquen els patrons i les mostres presenten les 4 cares llises, de manera que es pot enregistrar simultàniament els espectres d'absorció i emissió.

Una vegada fixades les longituds d'ona, es mesura la intensitat d'emissió dels patrons preparats fent dilucions successives 1:10 a partir de la solució de quinina de 10 ppm del laboratori. Si es grafiquen els resultats es pot determinar l'interval lineal, en aquest cas entre 0.1 i 1 ppm, ja que els valors de les altres concentracions estaven per sota del blanc, cosa que vol dir que no els detecta bé. A continuació es mesura la intensitat d'emissió dels patrons de 0.1, 0.4, 0.8 i 1 ppm i s'obtenen els següents resultats:

Concentració(ppm)	Intensitat
0.1	53.716
0.4	210.781
0.8	400.517
1	503.041

Taula 1: Punts del calibrat

que si es representen gràficament donen lloc a la següent recta:

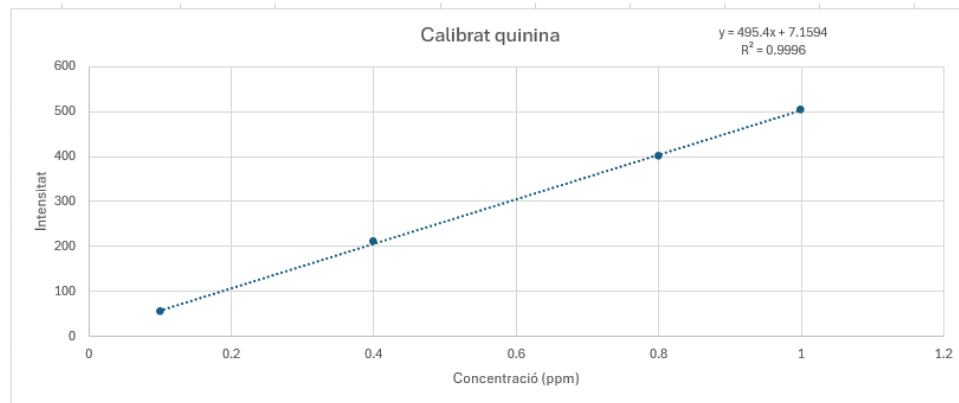


Figura 1: Recta de calibrat

Amb l'ajuda excel s'ha determinat la desviació estàndard dels residuals a partir de la funció "ESTIMACIÓN LINEAL". El valor obtingut és  $S_{y/x} = 4.885565483$

Per obtenir l'interval de confiança del valor obtingut per interpolació del senyal de la mostra es fa ús de les diferents fórmules de desviació estàndard, en aquest cas es vol obtenir el valor de la desviació estàndard del valor interpolat ( $S_0$ ) per així trobar l'interval de confiança:  $x \pm t \cdot S_0 = x \pm I$ , on  $t$  és la  $t$  d'estudent per 2 graus de llibertat i un interval de confiança del 95%.

ymitja	292.01375
sx	0.403112887
s^2x	0.1625
sxx	0.65
so	0.011341199
t	4.303
I	0.048801179

Taula 2: Tractament estadístic

On 
$$s_0 = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 S_{xx}}}$$

Pel que fa al límit de detecció ( $x_{LOD}$ ) es pot determinar aplicant les següents fórmules:

$$y_{LOD} = y_B + K s_B \text{ i } x_{LOD} = (y_{LOD} - a)/b$$

On  $y_{LOD}$  és la senyal al límit de detecció,  $y_B$  la senyal que proporciona el blanc,  $K=3$  i  $s_B$  la desviació estàndard del blanc després d'haver fet 10 mesures, en aquest cas (a i b són l'ordenada d'origen i el pendent de la recta respectivament). Aquests han estat els resultats després de mesurar el blanc 10 vegades:

Mesura	Intensitat blanc
1	1.146
2	1.081
3	0.668
4	1.039
5	0.948
6	0.951
7	0.9
8	1.099
9	0.957
10	1.063

*Taula 3: Mesures del blanc*

que donen un valor de  $s_B = 0.1367$ . Si s'agafa com a senyal del blanc  $y_B = 0.9852$  s'obté  $y_{LOD} = 1.3953$  i  $x_{LOD} = -0.01164$  ppm

Existeix un altre mètode on s'agafa l'ordenada d'origen com a valor de  $y_B$  i  $Sy/x$  com a valor de  $s_B$ . Aplicant aquest mètode s'obté un límit de detecció  $x_{LOD} = 0.02960$  ppm

Tot i que només amb el segon mètode s'obté un valor amb sentit (no és una concentració negativa) no es pot assegurar que sigui un valor exacte, ja que es basa en aproximacions dels valors de  $y_B$  i  $s_B$ .

Prèviament a la mesura de la mostra, aquesta es va diluir perquè el seu senyal estigui dins de l'interval lineal. Es va agafar com a valor de referència el màxim legal de quinina en tònica, que segons el reglament número 872/2012 de la Unió Europea (any 2012) són 100 mg/L, és a dir 100 ppm.

La mostra de tònica es va haver de desgasificar, abans de preparar les dilucions per ser analitzades. Així doncs, es va fer una primera dilució agafant 10 mL de tònica i diluint-la fins a 100 mL, després es va fer una segona dilució agafant 3 mL de la solució preparada prèviament, que es van diluir fins als 50 mL donant lloc a un factor total de dilució de 166.67. Cal destacar que abans d'enrasar a 50 mL també es van afegir 10 mL d'àcid sulfúric 0.25M, de manera que la concentració final al matràs de 50mL és 0.05M.

El senyal de la mostra diluïda té un valor de 184.465, que interpolat a la recta resulta en una concentració de 0.3579 ppm. Per saber el contingut de la quinina en la mostra de tònica s'aplica el factor de dilució i s'obtenen els següents resultats:

**Contingut de quinina en tònica:** 59.65 ppm

**Expressat amb l'interval de confiança:**  $60 \pm 8$  ppm

## **6. CONCLUSIÓ**

Com a conclusió, s'ha determinat el contingut de quinina en una beguda de tònica, mitjançant l'anàlisi de la fluorescència intrínseca molecular. S'ha excitat la molècula de quinina a una determinada longitud d'ona i s'ha mesurat la seva intensitat de fluorescència a una altra longitud.

Gràcies a aquesta tècnica s'ha pogut quantificar el contingut de quinina i veure si entra en el límit legal segons el reglament número 872/2012 de la Unió Europea (any 2012). Mitjançant la realització d'una recta de calibratge amb una sèrie de patrons de quinina, s'ha determinat el límit de detecció per així poder interpolar el senyal obtingut a l'hora de mesurar una mostra de tònica prèviament diluïda dins l'interval lineal del calibrat.