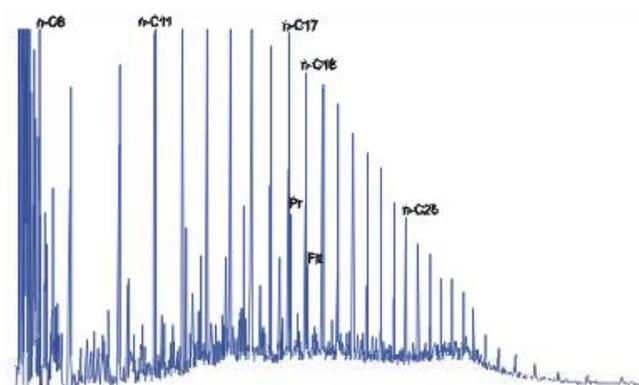


Química Analítica: materiales docentes

Grado de Ingeniería Química

2º curso



A.M. Carro Díaz
R.A. Lorenzo Ferreira

A.M. Carro Díaz
R.A. Lorenzo Ferreira

Química Analítica: materiales docentes
Grado de Ingeniería Química
2º curso

2011
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

CARRO DÍAZ, Antonia María

Química analítica : materiales docentes : grado de Ingeniería Química, 2ª curso / A. M. Carro Díaz, R. A. Lorenzo Ferreira. – Santiago de Compostela : Universidade, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, 2011. – xxx p. – ISBN 978-84-9887-774-8

1. Química analítica. I. Lorenzo Ferreira, Rosa Antonia. II. Universidade de Santiago de Compostela. Servizo de Publicacións e Intercambio Científico, ed.

543

© Universidade de Santiago de Compostela, 2011

Edita

Servizo de Publicacións
e Intercambio Científico
Campus Vida
15782 Santiago de Compostela
www.usc.es/publicacions

ISBN 978-84-9887-774-8 (Edición digital PDF)

En el marco del Espacio Europeo de Educación Superior (EEES), cobra especial relevancia el impacto de las Tecnologías de la Información y la Comunicación (TICs) con posibilidades tanto para la elaboración del conocimiento como para su adquisición y transmisión, mediante métodos pedagógicos más innovadores, accesibles e interactivos que se adapten a los diferentes tipos de estudiantes. El acceso a las redes de la información dotan al docente y al alumnado de poderosas herramientas que abren un gran abanico de posibilidades metodológicas. Siguiendo esta línea, el ámbito de aplicación de este material docente corresponde a la materia de enseñanza-aprendizaje de “Química Analítica” de segundo curso (primer semestre) de la titulación de Grado en Ingeniería Química impartida en la Escuela Técnica Superior de Ingeniería (ETSE) de la Universidad de Santiago de Compostela.

La Química Analítica es un área de conocimiento con gran impacto en la vida cotidiana y su desarrollo posibilita grandes avances en muchas otras áreas como la Medicina, Biotecnología, Ciencia de los Materiales, Ciencia Forense, Ingeniería, Medio Ambiente, Tecnología de los Alimentos, etc. Es un instrumento fundamental en todos los laboratorios clínicos, industriales o de investigación por su carácter interdisciplinar. Los dos principales objetivos de la Química Analítica son garantizar una alta calidad metrológica y resolver los problemas analíticos proporcionando información con exactitud (bio) química que permita tomar las decisiones correctas y oportunas¹.

La Química Analítica está estrechamente relacionada con otras asignaturas que se imparten en el Grado de Ingeniería Química, como Química fundamental e Inorgánica, Física Estadística y Matemáticas, siendo fundamental para todos los perfiles profesionales de la titulación. Como requisitos previos a la hora de cursar esta asignatura es necesario que los

¹ M. Valcárcel Talanta 85 (2011) 1707-1708

alumnos hayan adquirido, parcialmente, las competencias transversales desarrolladas-evaluadas en las asignaturas de primer curso como Química fundamental e Inorgánica.

Esta Guía docente facilita la comprensión de los contenidos de las clases expositivas al disponer de los conocimientos teóricos y prácticos necesarios para planificar, aplicar y gestionar la metodología analítica más adecuada para abordar problemas de índole medioambiental, sanitario, industrial o alimentario. Introduce al alumno en la metodología de la Química Analítica, con el fin de que adquiera las bases claras y actualizadas del proceso analítico, su fundamento y las aplicaciones al análisis cuantitativo de los métodos volumétricos, así como de los métodos instrumentales. Se ha dividido en 10 capítulos y en todos los casos se presentarán aplicaciones al análisis actual de productos industriales y contaminantes residuales relacionados con los procesos de fabricación.

El capítulo 1 está dedicado al proceso analítico y a las propiedades analíticas que afectan a la calidad del resultado y del procedimiento de análisis químico. El capítulo 2 describe el muestreo y diferentes procesos de preparación de muestra.

El capítulo 3 trata de los diferentes métodos volumétricos de análisis, incluyendo las valoraciones ácido-base, de formación de complejos, en medio heterogéneo y de oxidación-reducción.

Los tres capítulos siguientes están relacionados con los métodos espectroscópicos. El capítulo 4 es un tema de introducción a los métodos instrumentales en el que se describen los métodos de calibración, las fuentes de ruido y las características, especificaciones y clasificación de los analizadores de procesos y incluyendo el analizador continuo de flujo no segmentado. El capítulo 5 describe los métodos espectroscópicos en UV-Visible e IR, sus principios básicos,

componentes, función y requerimientos. El capítulo 6 está dedicado a los métodos espectroscópicos de análisis molecular, fundamento, aplicaciones y manejo de instrumentos. En el capítulo 7 se describe las características generales y aplicaciones de las técnicas de espectroscopía atómica o elemental.

El capítulo 8 se dedica a las generalidades de la cromatografía, incluyendo el fundamento y aplicaciones de la cromatografía de gases y la detección por espectrometría de masas. El capítulo 9 describe los aspectos básicos e instrumentación de la cromatografía de líquidos de alta resolución y su acoplamiento a espectrometría de masas.

Finalmente, en el capítulo 10 se describe el fundamento clasificación y aplicaciones de los sensores electroanalíticos.

INDICE	
TEMA 1.EL PROCESO ANALITICO	1
1.1. Introducción a la Química Analítica	1
1.2. Objetivo, finalidad y metodología de la Química Analítica	3
1.3. Parámetros de calidad de un método analítico	11
1.3.1. Propiedades analíticas supremas	11
1.3.2. Propiedades analíticas básicas	12
1.3.3. Propiedades analíticas complementarias	16
1.4. Fuentes bibliográficas	19
TEMA 2. EL MUESTREO Y LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	20
2.1. La toma de muestra.	20
2.2. Clasificación de las muestras.	21
2.3. Plan de muestreo.	25
2.4. Métodos y equipos para la toma de muestra.	27
2.5. Preparación de las muestras de laboratorio	34
2.6. Transporte y conservación de la muestra.	39
2.7. Preparación de la muestra para el análisis.	39
2.7.1. Disolución	43
2.7.2. Mineralización	44
2.7.3. Extracción	46
2.7.3.1. Extracción líquido-líquido clásica	47
2.7.3.2. Extracción sólido-líquido clásica con Soxhlet	49
2.7.3.3. Extracción con disolventes asistida por microondas	50
2.7.3.4. Extracción en fase sólida	51
2.7.3.5. Microextracción en fase sólida	53
2.8. Fuentes bibliográficas	56
TEMA 3. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS DE ANÁLISIS	57
3.1. Fundamento de los métodos volumétricos.	57
3.1.1. Procedimientos de valoración	59
3.1.2. Propiedades generales de las sustancias tipo patrón primario	61
3.2. Aplicaciones de las volumetrías ácido-base	63
3.2.1. Características de los indicadores ácido-base	63
3.2.2. Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl	64
3.2.3. Determinación de mezclas de carbonatos (NaCO_3 ; NaHCO_3 y NaOH)	66
3.3. Aplicaciones de las volumetrías de formación de complejos	67
3.3.1. Constantes de estabilidad	67
3.3.2. Reacciones parásitas o laterales	68
3.3.3. Constantes condicionales de estabilidad	68
3.3.4. Características de los indicadores metalocrómicos	68
3.3.5. Valoraciones con AEDT	69
3.4. Reacciones en medio heterogéneo	72
3.4.1. Producto de solubilidad	72
3.4.2. Factores que afectan al equilibrio de una reacción de precipitación	73
3.4.3. Sistemas indicadores del punto final	74
3.5. Aplicaciones de los métodos gravimétricos	77
3.6. Volumetrías de oxidación-reducción	78
3.6.1. Sistemas indicadores químicos	80
3.6.2. Uso de los reactivos oxidantes y reductores	82
3.6.2.1. Determinación de reductores	83
3.6.2.2. Determinación de oxidantes. Valoración indirecta con KI .	
Métodos yodométricos.	84
3.7. Fuentes bibliográficas	86

TEMA 4. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS INSTRUMENTAL	87
4.1. Trazabilidad e incertidumbre.	87
4.1.1. Concepto de trazabilidad.	87
4.1.2. Características de la calibración	89
4.1.3. Concepto de incertidumbre	90
4.1.4. Tipos de estándares y su trazabilidad.	91
4.2. Calibración de patrón externo.	93
4.3. Calibración de adición estándar	95
4.4. Calibración con patrón interno	96
4.5. Señales y ruido	97
4.6. Analizadores de procesos industriales.	100
4.6.1. Definición y características de los analizadores de procesos.	100
4.6.2. Clasificación de los analizadores de procesos.	102
4.6.3. Componentes de un analizador y sistemas de transporte.	107
4.7. Analizador continuo de flujo no segmentado	109
4.7.1. Fundamento del análisis por inyección en flujo (FIA)	109
4.7.2. Factores que afectan a la dispersión	111
4.7.3. Instrumentación en FIA	112
4.7.4. Aplicaciones de FIA	114
4.8. Bibliografía	116
TEMA 5. INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS	117
5.1. Teoría de la radiación electromagnética.	117
5.1.1. Espectro electromagnético.	119
5.1.2. Transformación de la energía.	121
5.1.3. Pureza espectral.	122
5.2. Absorción y emisión de radiación.	123
5.2.1. Absorción de la radiación.	124
5.2.2. Emisión de la radiación.	126
5.3. Procesos de relajación. Métodos luminiscentes.	127
5.3.1. Fluorescencia no resonante.	130
5.4. Refracción de la radiación.	131
5.5. Reflexión de la radiación.	133
5.6. Fuentes de radiación.	133
5.7. Láser.	136
5.8. Selector de longitud de onda.	137
5.8.1. Filtros de absorción y de interferencia.	138
5.8.2. Monocromadores.	139
5.9. Cubetas o celdas.	141
5.10. Detectores de fotones o fotoeléctricos.	141
5.10.1. Fototubo de vacío.	141
5.10.2. Tubos fotomultiplicadores.	142
5.10.3. Detectores de diodos en serie.	143
5.10.4. Detectores multicanal de transferencia de carga.	144
5.11. Detector térmico o de calor.	145
5.12. Fibras ópticas.	146
5.13. Bibliografía	148
TEMA 6. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE ANÁLISIS MOLECULAR	149
6.1. Ley de Beer	149
6.2. Diseño de instrumentos para absorción molecular.	151
6.3. Aplicaciones de la espectrometría de absorción molecular UV-Vis.	156

6.4. Aplicaciones de espectrometría de absorción molecular IR.	159
6.5. Aplicaciones de espectrometría de fluorescencia molecular.	164
6.6. Bibliografía	168
TEMA 7. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL	169
7.1. Generalidades de la espectroscopía de análisis elemental.	169
7.2. Métodos de introducción de muestra.	171
7.3. Métodos de atomización.	176
7.3.1. Atomización electrotérmica.	177
7.3.2. Atomización con llama.	180
7.3.3. Atomización con plasma	183
7.4. Instrumentación en espectrometría de absorción atómica (AAS).	
Aplicaciones.	187
7.4.1. Fuentes de radiación	188
7.4.2. Sistemas de atomización	191
7.4.3. Espectrofotómetros	191
7.5. Interferencias químicas en espectrometría de absorción atómica (AAS).	194
7.6. Instrumentación en espectrometría de emisión atómica (AES).	
Aplicaciones.	196
7.7. Interferencias químicas en espectrometría de emisión atómica (AES).	203
7.8. Bibliografía	204
TEMA 8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS I	205
8.1. Generalidades de la cromatografía	205
8.2. Clasificación de los métodos cromatográficos.	206
8.2.1. Mecanismos de separación.	206
8.2.2. Métodos de análisis cromatográfico.	207
8.2.3. Clasificación de acuerdo con la forma del lecho cromatográfico.	208
8.2.4. Clasificación según la naturaleza física de las fases.	208
8.3. Parámetros básicos en cromatografía.	209
8.4. Aplicaciones: análisis cualitativo y cuantitativo.	212
8.5. Cromatografía de gases (Gas-Líquido)	213
8.6. Instrumentación en cromatografía de gases.	214
8.6.1. Gas portador.	215
8.6.2. Sistemas de inyección	216
8.6.3. Modos de inyección.	218
8.6.4. Columnas cromatográficas.	222
8.6.5. Control de la temperatura.	227
8.6.6. Selección del detector.	229
8.6.7. Detector de ionización de llama (FID).	230
8.6.8. Detector de captura electrónica (ECD).	232
8.6.9. Detector de emisión atómica (AED).	234
8.7. Acoplamiento CG-espectrometría de masas (MS).	236
8.7.1. Ionización por impacto electrónico.	237
8.7.2. Analizador de trampa de iones.	239
8.7.3. Analizador de cuadrupolo.	240
8.7.4. Detectores	241
8.8. Bibliografía	245
TEMA 9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS II	246
9.1. Fundamento de la cromatografía líquida (LC).	246
9.2. Clasificación de los métodos de cromatografía líquida.	247
9.2.1. Mecanismos de separación.	247
9.3. Cromatografía de líquidos de fase enlazada	251

9.4. Modos de operación.	252
9.5. Instrumentación básica en HPLC	255
9.5.1. Fase móvil.	256
9.5.2. Modos de elución.	258
9.5.3. Sistemas de bombeo.	260
9.5.4. Control de gradiente.	264
9.5.5. Sistemas de inyección.	265
9.5.6. Columna	266
9.5.7. Sistemas de detección.	270
9.6. Acoplamiento de LC y espectrometría de masas (MS).	274
9.6.1. Termospray.	275
9.6.2. Ionización química a presión atmosférica (APCI).	275
9.6.3. Electro spray (ESI).	277
9.6.4. Analizador de triple cuadrupolo.	278
9.6.5. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).	280
9.6.6. Analizador híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF).	281
9.6.7. Cromatografía líquida en el control de procesos.	281
9.7. Bibliografía	284
TEMA 10. SENSORES ELECTROANALÍTICOS	285
10.1. Fundamento de los sensores electroanalíticos (ISE).	285
10.2. Clasificación de los sensores potenciométricos.	287
10.3. Electrodo de vidrio para medir pH.	288
10.3.1. Errores en la medida de pH con electrodo de vidrio	290
10.4. Electroodos de vidrio selectivos de iones.	291
10.5. Electroodos selectivos de iones en estado sólido cristalizado.	292
10.6. Electroodos selectivos de iones de matriz líquida.	294
10.7. Electroodos selectivos de iones sensibles a gases.	296
10.8. Biosensores.	298
10.9. Aplicaciones de los sensores potenciométricos.	299
10.10. Sensores amperométricos.	300
10.11. Bibliografía	

TEMA 1. EL PROCESO ANALÍTICO

Objetivos

- ✓ Definir las Técnicas Analíticas, ofreciendo una visión actual de las mismas.
- ✓ Exponer sistemáticamente las etapas generales de los procesos analíticos llevados a cabo dentro y fuera del laboratorio.
- ✓ Emplear ejemplos para ofrecer una panorámica general de cómo se obtienen los resultados analíticos.
- ✓ Comparar la información requerida y la suministrada por el laboratorio analítico.
- ✓ Diferenciar y definir las propiedades analíticas que afectan a la calidad del resultado y del procedimiento en un análisis químico.

1.1. Introducción a la Química Analítica.

En la primera mitad del siglo XX, la Química analítica se centra en los métodos analíticos clásicos basados en los equilibrios en disolución, la introducción de reactivos orgánicos, el desarrollo del microanálisis y las marchas sistemáticas de identificación, los métodos volumétricos de análisis, la electrogravimetría, las extracciones con disolvente, el cambio iónico, etc. Tras la segunda guerra mundial se entró en un período que se podría calificar de Ciencia Metrológica en el que destaca la utilización de instrumentación cada vez más sofisticada (cromatográficas, espectroscópicas, espectrométricas, electroanalíticas). El desarrollo de la Química analítica continúa en el siglo XXI y se caracteriza por los avances en otras áreas en las que aparecen nuevas herramientas y recursos analíticos como es el caso de la tecnología láser, la automatización, los sensores, la miniaturización, la especiación, la quimiometría, el control de procesos y de calidad, la utilización de robots,

redes neuronales, técnicas de screening, etc. De ahí que mantenga una relación multidireccional y simbiótica con otras áreas científico-técnicas, como la Química Física, Biología, Ciencias de la Salud, Matemáticas, Informática o Ingeniería, y que deba mantener fructíferas relaciones con ámbitos socio-económicos que generan problemas analíticos o de I+D+i. En la figura 1.1. se muestran ejemplos de aplicabilidad de la Química Analítica.

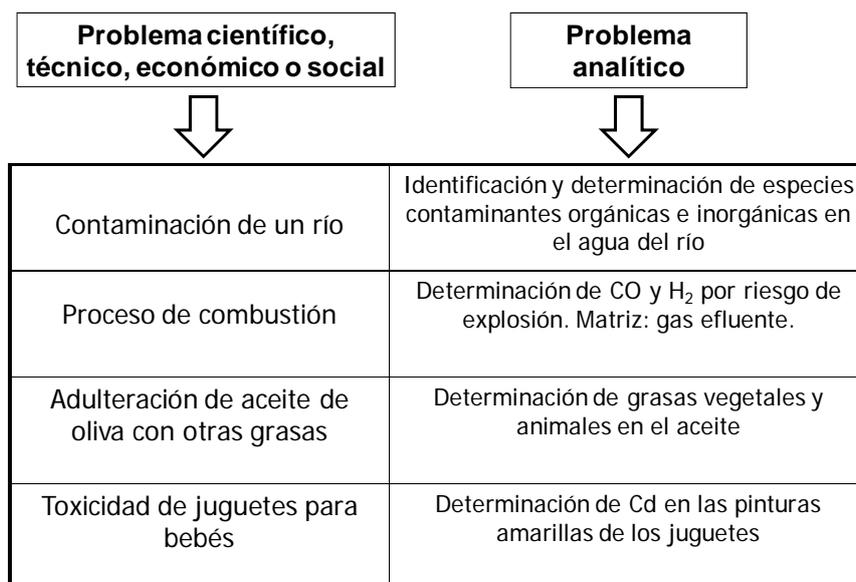


Fig. 1.1. Problemas reales que justifican problemas analíticos actuales.

La evolución histórica de la Química analítica proporciona muchas y variadas definiciones, entre las que se pueden destacar las siguientes:

La Química Analítica es una disciplina científica que desarrolla y aplica métodos, instrumentos y estrategias para obtener y evaluar información sobre la naturaleza y

composición de la materia en el espacio y en el tiempo. Definición del WPAC (Working Party on Analytical Chemistry), Edimburgo, 1993.

La Química Analítica es una ciencia metrológica que desarrolla, optimiza y aplica herramientas (materiales, metodológicas y estratégicas) de amplia naturaleza, que se concretan en procesos de medida encaminados a obtener información (bio)química de calidad, tanto parcial (presencia/concentración en muestras de especies-analitos (bio)químicos) como global sobre materias o sistemas de amplia naturaleza (química, bioquímica, biológica) en el espacio y en el tiempo para resolver problemas científicos, técnicos económicos y sociales. Definición de M. Valcarcel "Principios de Química Analítica" Springer, Barcelona 1999. *TRAC (Trends in Analytical Chemistry) 16(3),124-131 (1997)*

1.2. Objetivo, finalidad y metodología de la Química Analítica

En respuesta a las demandas de información analítica cada vez más exigentes en el siglo XXI, los objetivos de las determinaciones analíticas han evolucionado de forma espectacular siguiendo diversas directrices. En ellas tiene cabida la demanda de información analítica cualitativa (respuestas binarias Si/No) la información cuantitativa; la repercusión de la incertidumbre de los resultados; la creciente importancia de factores como el tiempo, el esfuerzo personal, el riesgo o el coste de los materiales y del análisis; o la información analítica obtenida fuera del laboratorio (desde el muestreo hasta la implantación de analizadores de procesos industriales, sistemas de control de contaminación automatizados y/o miniaturizados).

La Química analítica es una ciencia experimental cuyo objeto de estudio es la materia y, basándose en principios químicos, físicos y matemáticos, establece las estrategias para separar, identificar y determinar las cantidades relativas

de los componentes que forman una muestra (analitos), como se puede observar en la figura 1.2.

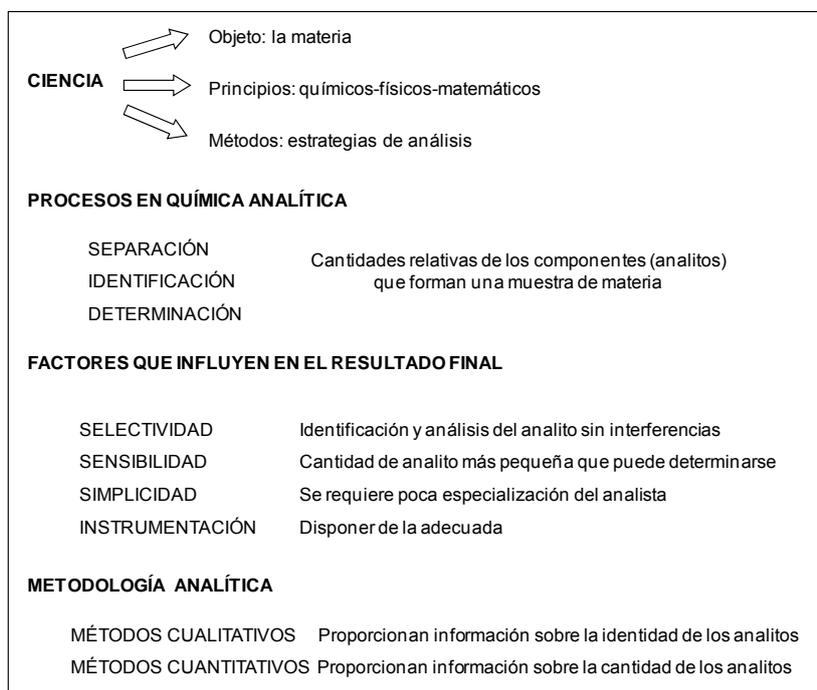


Fig. 1.2. Conceptos básicos relacionados con la Química Analítica.

La Química Analítica actual es una ciencia multidisciplinar que tienes tres finalidades fundamentales:

1. Obtener información química sobre los sistemas materiales: composición, estructura, distribución, etc.
2. Desarrollar métodos de medida (métodos, técnicas y procedimientos analíticos) que permiten la obtención de información.

3. Construir modelos que justifiquen la aplicación generalizada de los métodos de medida.

En la figura 1.3. se muestra la clasificación de los métodos analíticos.

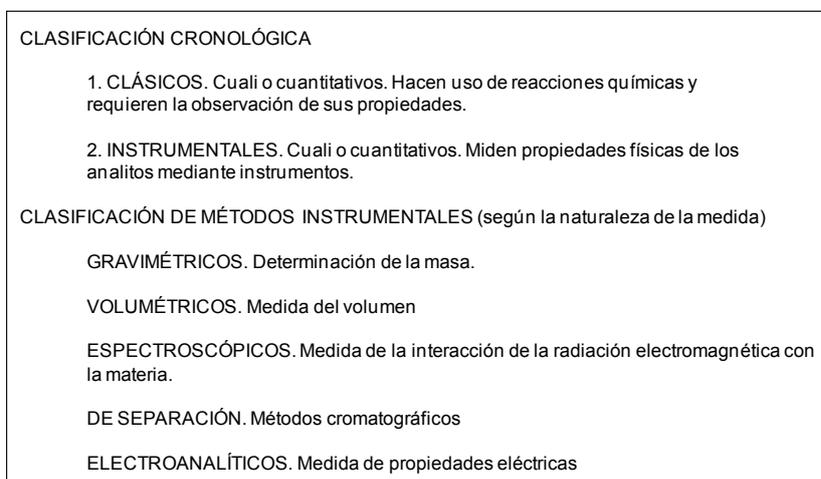


Fig. 1.3. Clasificación de los métodos utilizados en análisis químico.

La metodología analítica responde a dos preguntas simples: ¿qué hay? y ¿cuánto hay? que se refleja en el esquema de la figura 1.4.

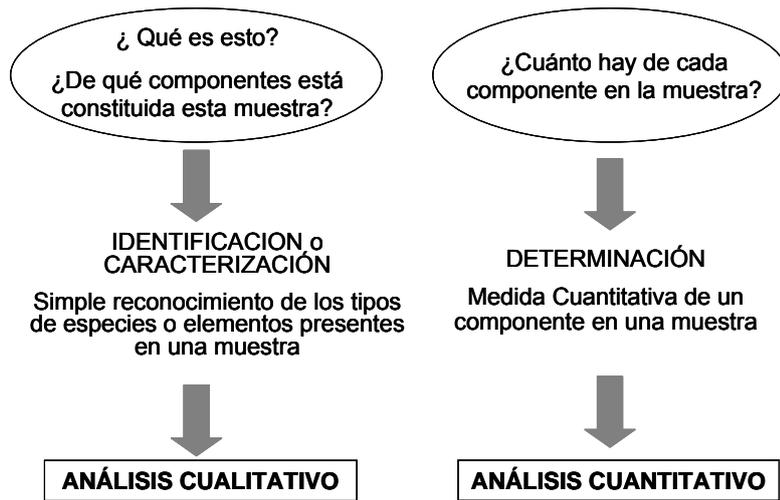


Fig. 1.4. Metodología analítica según la información requerida.

La estrategia analítica es el conjunto de operaciones que definen el procedimiento a seguir por el analista/ingeniero químico. En la figura 1.5. se pueden ver las etapas que conforman la metodología de análisis químico para la resolución de problemas.

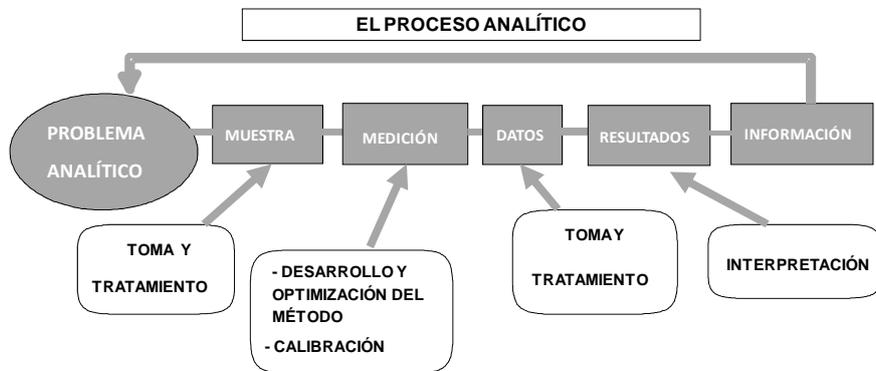


Fig. 1.5. Estrategia general del proceso analítico.

La primera etapa comienza con las *operaciones previas de la toma y tratamiento de la muestra*, siendo una de las etapas del proceso analítico que consume mayor tiempo y tiene una gran repercusión en la calidad de los resultados. Implica diversas subetapas, aunque no siempre son todas necesarias:

- Toma de muestra: estrategia de muestreo
- Medida de la muestra (peso, volumen)
- Secado
- Trituración, tamizado
- Homogeneización
- Conservación
- Disolución/disgregación
- Eliminación de la materia orgánica
- Separación/concentración
- Reacciones analíticas
- Transporte/introducción de la muestra en el instrumento de medida de la señal.

La segunda etapa es la *medición y transducción de la señal analítica* se lleva a cabo mediante diferente instrumentación que se clasifica según los criterios mostrados en el gráfico de la figura 1.6. Las señales medidas en el instrumento pueden basarse en las características químicas (reactividad) o físico-químicas de los analitos. Los instrumentos cuya naturaleza implica los sentidos humanos incluyen los métodos volumétricos. Los instrumentos pasivos producen una señal no provocada, como la masa en la balanza. Los instrumentos activos, en cambio, producen una señal provocada, como en fotometría. Algunos sólo necesitan calibración instrumental (primarios), como la balanza, mientras que los instrumentos relativos hacen uso tanto de la calibración instrumental como de la metodológica, de las que se hablará en el capítulo 4.

Las señales instrumentales pueden ser de naturaleza variada dando lugar a diferentes instrumentos en concepción y diseño, como se refleja en la tabla 1.1.

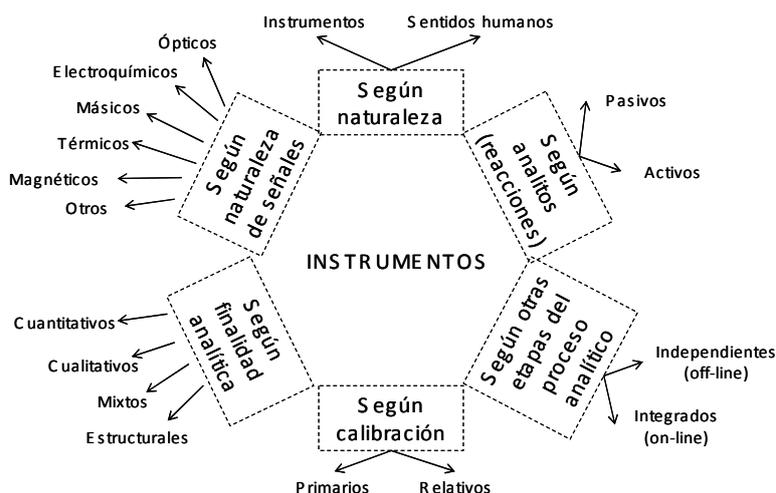


Fig. 1.6. Criterios de clasificación de los instrumentos analíticos.

La tercera etapa es la *toma y tratamiento de datos*. La adquisición de datos puede ser manual o automática mediante un ordenador en interfase con el instrumento de medida. El tratamiento estadístico de resultados se lleva a cabo mediante softwares informáticos apropiados que validan la calidad del método en términos de precisión, exactitud, etc.

La cuarta etapa es la *interpretación de los resultados para generar información*. Los resultados analíticos interpretados son la información que se necesita para resolver un cierto problema o, al menos, para la toma de decisiones por parte del organismo o persona que solicita estos resultados. No siempre los resultados obtenidos conducen a la solución esperada y es preciso replantear el problema, formulando nuevas preguntas y estrategias.

Tabla 1.1. Clasificación de diversos instrumentos de uso habitual en el laboratorio

Instrumento	1	2	3	4	5	6
Balanza	másico	Instrumento propiamente dicho	pasivo	Fuera de línea	primario	cuantitativo
Bureta manual	Volumen (másico)	Instrumento propiamente dicho	pasivo	Fuera de línea	primario	cuantitativo
Bureta automática	Volumen (másico)	Instrumento propiamente dicho	pasivo	Fuera de línea	primario	cuantitativo
Fotómetro (UV-visible)	óptico	Instrumento propiamente dicho	activo	Fuera de línea / en línea (cromatógrafo)	relativo	cuantitativo
Espectrofotómetro de emisión atómica	óptico	Instrumento propiamente dicho	activo	Fuera de línea	relativo	Cualitativo y cuantitativo
Potenciómetro (medidas de pH, pM)	electroanalítico	Instrumento propiamente dicho	pasivo	Fuera de línea	Relativo (especial)	cuantitativo

Para resolver un problema la información química tiene que interpretarse para que sea información utilizable por el usuario tal como se observa en el ejemplo real abordado mediante el proceso analítico (figura 1.7.). Primeramente se establece un diálogo con el cliente para recavar información sobre el análisis (que puede haberse hecho anteriormente, por lo que habrá bibliografía, o ser la primera vez que se lleva a cabo). En ocasiones la empresa donde trabaja el ingeniero químico proporciona los datos solicitados sobre el producto y calidad del proceso de manufactura, el grado de contaminación de sus efluentes en el medioambiente, etc.



Fig. 1.7. Diagrama de flujo de un enfoque analítico a la solución de un problema real. A la izquierda se refleja las relaciones establecidas entre el cliente (que plantea el problema) y el analista (que resuelve el problema analítico en el laboratorio). A la derecha queda reflejado un ejemplo real de problema analítico.

Otros ejemplos de procesos analíticos vinculados a problemas socioeconómicos reales pueden ser los siguientes:

- Adulteración de aceite de oliva: determinación grasas vegetales y animales.
- Determinación de Cadmio en juguetes.
- Determinación de cafeína en chocolate.
- Determinación de metales en aguas.

- Determinación de metilmercurio en pescados y mariscos.
- Análisis de carbono medioambiental y demanda de O₂
- Determinación de sílice en rocas.
- Determinación de la dureza de un agua.

1.3. Parámetros de calidad de un método analítico

Los parámetros de calidad de los métodos analíticos, son los criterios, expresados en términos cuantitativos, que permiten decidir sobre el método analítico más adecuado para resolver un determinado problema. Su objetivo es la validación del método analítico para probar de forma documentada que el método analítico se ajusta al fin al que se destina. La validación es un proceso que tiene dos metas:

1. Definir y asegurar la calidad de la información analítica generada (resultados, informes) a través de las propiedades analíticas supremas, básicas y complementarias.
2. Garantizar la coherencia entre la información analítica generada y las necesidades planteadas por la sociedad, industria, comercio, ciencia y tecnología.

1.3.1. Propiedades analíticas supremas

La *exactitud* es el grado de concordancia entre los valores reales y los valores medidos. Para evaluarla se utilizan materiales de referencia certificados o métodos de referencia oficiales. Describe si el resultado experimental obtenido es correcto. Se caracteriza por el error sistemático (desvíos constantes) y se expresa como error absoluto (E_a) o como error relativo (E_r), que aparecen fruto de calibraciones

inadecuadas, de la pureza de los reactivos o de medidas instrumentales incorrectas.

$$E_a = \left| \bar{X} - \hat{X} \right| \quad E_r = \frac{\left| \bar{X} - \hat{X} \right|}{\hat{X}} \times 100$$

La *representatividad* es el grado de coherencia, concordancia y consistencia de resultados. Tiene como soporte básico un muestreo adecuado y se relaciona con todo el proceso analítico.

1.3.2. Propiedades analíticas básicas

La *precisión* es el grado de concordancia entre un grupo de resultados obtenidos al aplicar repetitiva e independientemente el mismo método analítico a alícuotas de la misma muestra. Se relaciona con el error aleatorio (error experimental) y se expresa como desviación estándar (s), varianza (s^2), desviación estándar relativa (*RSD*) o coeficiente de variación (*CV*).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$$

$$RSD = CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

La precisión se puede evaluar en términos de:

Repetibilidad: resultados obtenidos con experimentos independientes utilizando el mismo método, analista, instrumento, reactivos en un mismo intervalo de tiempo.

Reproducibilidad: dispersión de resultados de ensayos independientes aplicando el mismo método a la muestra pero variando alguno de los factores anteriormente mencionados (diferentes laboratorios o analistas o instrumentos o intervalo de tiempo).

La *sensibilidad* expresa la capacidad de un método para poder detectar (cualitativamente) y determinar (cuantitativamente) pequeñas cantidades de analito en la muestra. Es la razón entre el incremento de la señal y el incremento de la concentración del analito.

La sensibilidad de calibración representa la relación entre la señal y la concentración y se expresa como la pendiente de la recta de calibrado ($y=a + bx$).

$$b = \frac{Y - a}{x}$$

La sensibilidad de calibrado no tiene en cuenta la precisión, entonces se define la sensibilidad analítica como el cociente entre la pendiente de la recta del calibrado y la desviación estándar de las señales. La sensibilidad analítica es insensible a los factores de amplificación que puede sufrir la señal analítica.

$$\gamma = \frac{b}{S_s}$$

Según el ejemplo de la figura 1.8., en las técnicas espectroscópicas de emisión se puede aumentar la sensibilidad incrementando el voltaje aplicado al tubo fotomultiplicador (a), pero también aumenta el ruido de fondo (b), situación que se traduce en una sensibilidad constante, que no varía con la amplificación.

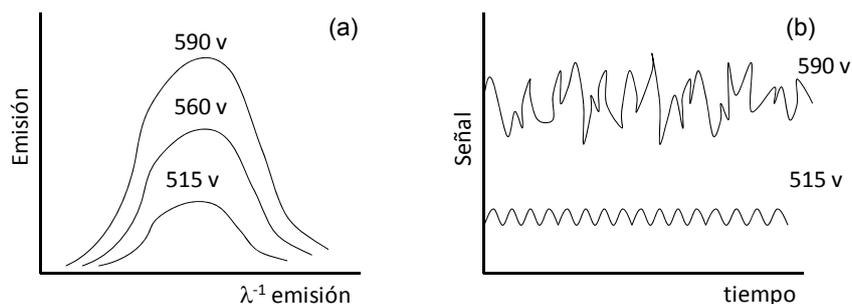


Fig. 1.8. Espectro de emisión fluorescente a diferentes voltajes (a). Fluctuación de la señal en el máximo de emisión a lo largo del tiempo (b)

El *límite de detección* se refiere a la mínima cantidad de analito que puede detectarse para un nivel de confianza dado; corresponde a: Aquella concentración que proporciona una señal (y) en el instrumento significativamente diferente de la señal de un “blanco” o del “ruido” o “señal de fondo”. Se consideran señales tres veces superiores a la señal del ruido de la línea de base. El cálculo de la señal correspondiente al límite de detección (Y_{LD}) se lleva a cabo mediante la medida media del blanco (\bar{Y}_{blanco}) más tres veces la desviación estándar del blanco ($3S_{blanco}$).

$$Y_{LD} = \bar{Y}_{blanco} + 3S_{blanco}$$

El límite de detección se expresa en términos de concentración (X_{LD}), sustituyendo el valor de (Y_{LD}) en la recta de calibrado ($Y=a+bx$).

$$X_{LD} = \frac{(\bar{Y}_{blanco} + 3S_{blanco}) - a}{b}$$

El *límite de cuantificación* hace referencia al límite más bajo para determinaciones cuantitativas precisas. Se consideran

señales diez veces superiores a la señal del ruido de la línea de base, y se expresa como:

$$Y_{LQ} = \bar{Y}_{blanco} + 10S_{blanco}$$

El límite de detección se expresa en términos de concentración (X_{LQ}), sustituyendo el valor de (Y_{LQ}) en la recta de calibrado ($y=a+bx$).

$$X_{LQ} = \frac{(\bar{Y}_{blanco} + 10S_{blanco}) - a}{b}$$

Otros parámetros relacionados con las propiedades analíticas básicas son:

La *linealidad*, que mide el ajuste de la relación entre la señal analítica y la concentración con un modelo lineal.

El *intervalo de concentración aplicable* es el intervalo comprendido entre la concentración más pequeña con la que pueden realizarse medidas cuantitativas, hasta la concentración a la cual la recta se desvía de la linealidad. Es el tramo en el cual la pendiente permanece constante (figura 1.9.).

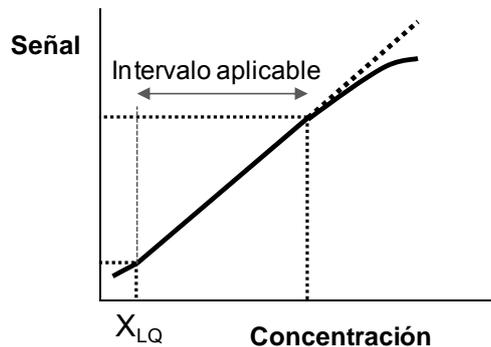


Fig. 1.9. Intervalo aplicable para el calibrado, en el que se establece un tramo lineal con pendiente constante y cuyo inicio puede coincidir con el límite de cuantificación (X_{LQ}).

La *robustez* es la cualidad de un método analítico que mide su capacidad de resistir pequeños cambios en las condiciones operacionales sin que su funcionamiento se vea alterado.

1.3.3. Propiedades analíticas complementarias

La *selectividad* se define como la capacidad de un método analítico para originar resultados que dependan de forma exclusiva del analito/s para su identificación o cuantificación en la muestra. Soporta directamente a la exactitud ya que las interferencias causan errores sistemáticos que alejan (por exceso o defecto) al resultado del valor considerado como verdadero. Estas referencias pueden ser de distintos tipos:

- Interferencias de origen químico, por ejemplo, la especie química perturbadora origina una reacción coloreada con un reactivo o ligando similar a la que produce el analito de la muestra.
- Interferencias de origen físico, por ejemplo la presencia de partículas en suspensión en una muestra puede causar dispersión de la radiación cuando se realizan medidas de intensidad de fluorescencia del analito o su producto de reacción.
- Interferencias de origen instrumental, consecuencia del control inadecuado del caudal y/o temperatura en cromatografía de gases.
- Interferencias de signo positivo (por exceso). Como la interferencia química
- Interferencias de signo negativo (por defecto), por ejemplo, la presencia de una especie enmascarante

que reacciona competitivamente con el analito por el reactivo.

- Interferencias con el mismo mecanismo como para que se produzca la señal del analito (como la interferencia química).
- Interferencias con diferente mecanismo como para que se produzca la señal del analito (como la interferencia física).
- Interferencias con efecto aditivo, causadas por especies con independencia de la concentración del analito.
- Interferencias con efecto proporcional, cuyo efecto perturbador depende de la concentración del analito, y hace aumentar o disminuir la sensibilidad según la pendiente del calibrado
- Interferencias con efecto múltiple que implican tanto errores aditivos como proporcionales.

Una información analítica suministrada fuera de plazo es inútil y por tanto de mala calidad, por tanto la *rapidez* es una propiedad importante atribuible al proceso analítico que define globalmente la productividad del laboratorio. Se refiere al tiempo de análisis y se expresa como frecuencia de muestreo (δ): Número de muestras (n) procesadas de forma completa, desde su muestreo, hasta la consecución del resultado en un período dado de tiempo (ej. 1 hora).

$$\delta = n \cdot h^{-1}$$

El valor económico de cada análisis es un elemento sustancial de la productividad del laboratorio. Con frecuencia los *costes* se convierten en un parámetro prioritario y pueden clasificarse según varios criterios como costes generales (relacionados con el montaje y mantenimiento del laboratorio de análisis), específicos (se refieren al precio de los análisis), fijos (relacionados con la instrumentación del

laboratorio) y variables (relativas a la contratación de personal) como se muestra en la figura 1.10. Se expresa en moneda/ resultado o muestra, en hombres/hora, etc.

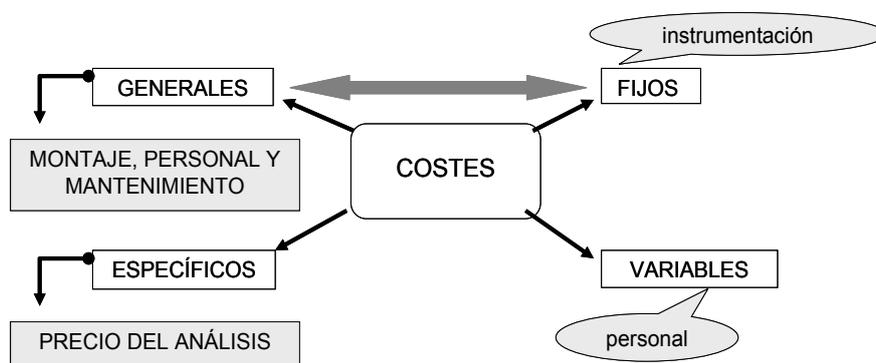


Fig. 1.10. Propiedad analítica complementaria de costes.

La automatización aumenta los gastos fijos (relacionados con una instrumentación cara, útil para gran cantidad de muestras cuando se exige rapidez en la medida) y disminuye los gastos variables (derivados de una reducción de personal).

El *personal* es un aspecto práctico de gran trascendencia que caracteriza al proceso analítico. Se puede dividir en dos grupos: El primero, relacionado con la seguridad del operador, personal del laboratorio y medio ambiente (desechos); y el segundo, relacionado con la comodidad del personal del laboratorio (evitar tareas tediosas, que impliquen estrés, etc.)

1.4. Fuentes bibliográficas

D. C. HARRIS "Análisis Químico Cuantitativo" 3ª Ed. Ed. Reverté S.A. Barcelona (2007).

M. VALCARCEL "Principios de Química Analítica" Springer, Barcelona (1999).

R. KELLNER, J.M. MERMET, M.OTTO, M. VALCÁRCEL y H.M.WIDMER "Analytical Chemistry" 2ª Ed Wiley-VCH. New York (2004).

TEMA 2. EL MUESTREO Y LA PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Objetivos

- ✓ Resaltar la importancia de la toma de muestra dentro del proceso analítico y su influencia en la calidad del resultado final.
- ✓ Destacar las principales estrategias de toma de muestras sólidas, líquidas y gaseosas.
- ✓ Conocer los métodos más comunes utilizados para disolver muestras.
- ✓ Adquirir los conceptos básicos de las distintas técnicas de extracción.

2.1. La toma de muestra.

El muestreo es la primera de las subetapas de las operaciones previas del proceso analítico (Figura 2.1.) y está relacionado con la calidad de dicho proceso, desde la recogida de la muestra, pasando por su recepción en el laboratorio, donde es almacenada antes y después del análisis. El objetivo final de la garantía de calidad en los laboratorios analíticos es obtener información con la calidad requerida para la toma de decisiones correctas. La muestra debe ser debidamente registrada y codificada en el momento de su recepción en el laboratorio y también tras ser analizada, ya que puede afectar a la calidad y significado de los resultados analíticos.

El objetivo del muestreo es separar de una cantidad grande de material (objeto) una muestra reducida (alícuota) que tenga la misma composición que el conjunto del que ha sido tomada (muestra representativa: réplica en miniatura del sistema real). A continuación tendrá lugar la transformación en la forma química y física (sólido, líquido y gas) y las concentraciones adecuadas al método analítico que se va a

emplear. Después se produce, si es posible, la extracción del analito de interés o de especies interferentes en las medidas analíticas. El paso siguiente es el homogeneizado de la muestra para el análisis (pulverizado de sólidos, homogeneizado de mezclas y disoluciones) (figura 2.1.).

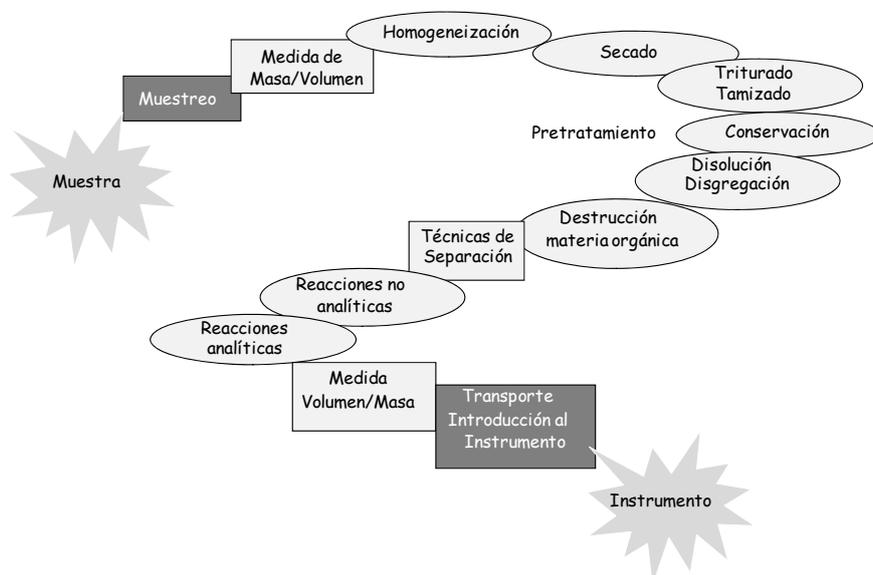


Fig. 2.1. Subetapas de las operaciones previas del proceso analítico.

2.2. Clasificación de las muestras.

Existen diversos criterios para clasificar las muestras:

a) Según el tamaño de muestra inicial.

Condiciona el tipo de análisis a realizar (Figura 2.2.). La dificultad aumenta al disminuir el tamaño de muestra, aunque las nuevas tecnologías (balanzas, microbalanzas, etc.) han hecho posible el análisis de muestras de tamaño del orden de μg con suficiente fiabilidad.

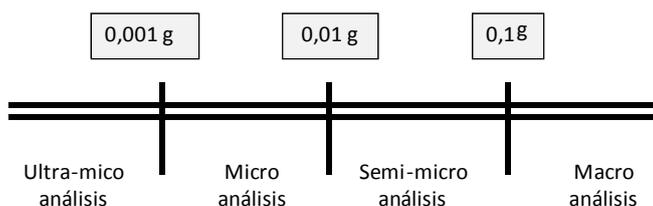


Fig. 2.2. Clasificación de la muestra según el tamaño inicial

- b) Según la proporción relativa de los analitos en la muestra. Pueden diferenciarse tres tipos de determinación a realizar (Figura 2.3.) También aquí la dificultad aumenta al disminuir la concentración de analito a determinar.

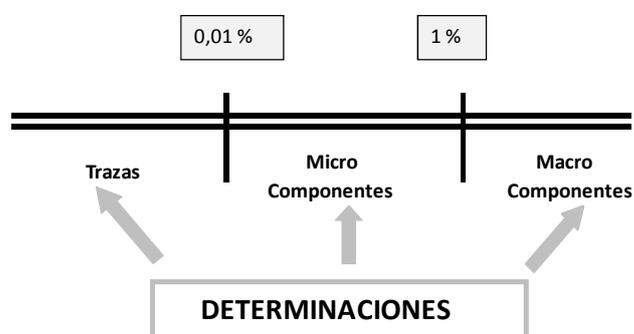


Fig. 2.3. Clasificación de la muestra según la proporción relativa de analito.

La combinación de estas dos clasificaciones da lugar a situaciones de complejidad creciente desde la determinación de macrocompuestos (>1%) en macromuestras (>0.1g) y hasta la determinación de trazas (<0.01%) de analitos en ultramicromuestras (<0.001g).

- c) Según la forma de la toma de muestra.
Muestra aleatoria: Cada parte de la población tiene la misma probabilidad de ser seleccionada. No es una muestra tomada

de forma casual, sino que deben utilizarse tablas de números aleatorios.

Muestra sistemática o selectiva: Se toman con objeto de reflejar o controlar alguna hipótesis sistemática, como el cambio en la composición de la muestra con el tiempo, la temperatura o la localización.

Muestra representativa: Muestra obtenida de una población que se supone tiene las propiedades promedio de dicha población. Pueden ser:

- Muestras definidas previamente por un organismo oficial.
- Muestras de materiales homogéneos.

Muestra compuesta o estratificada: Se obtienen reuniendo varias porciones de muestras obtenidas por procedimientos aleatorios (Figura 2.4.).

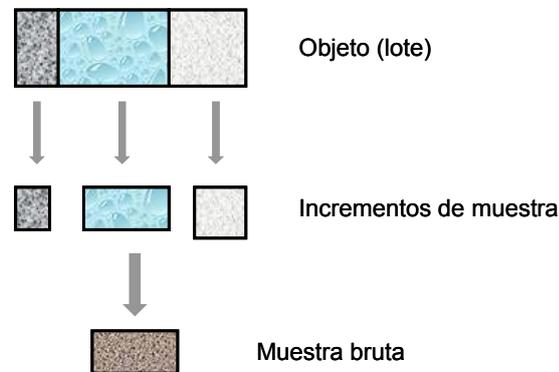


Fig. 2.4. Muestra compuesta o estratificada de 3 zonas de volúmenes relativos (1:4:2).

Muestra de conveniencia: Considera diferentes criterios para la toma de muestra como la accesibilidad, el coste, la eficacia, etc., como la disponibilidad de muestras de una línea de proceso de producción para control de calidad del producto.

d) Según el tamaño y la proximidad al objeto se pueden considerar dos tipos de muestreo aplicado a la

acumulación de un componente de un producto en la entrada de la fábrica (Figura 2.5.):

- A. Muestreo para obtener una composición media o global
- B. Muestreo de su composición discriminada espacialmente (superficie, interior y fondo del lote).

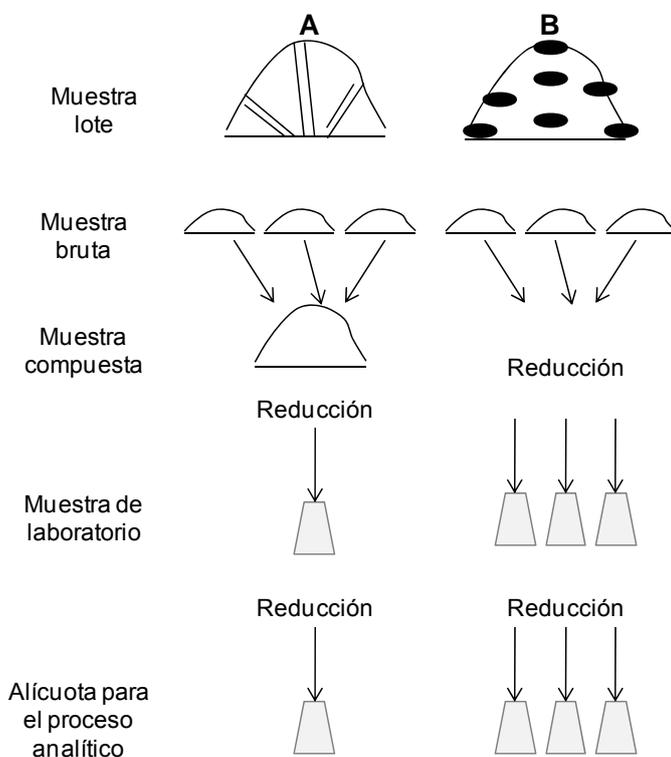


Fig. 2.5. Muestreo para obtener información global (A) y para información discriminada (B).

La IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) recomienda la utilización de los siguientes conceptos:

Lote / Objeto: Material completo del que se toma la muestra.

Muestra primaria bruta: De gran tamaño y tomada para el análisis o almacenamiento.

Muestra agregada o compuesta: varias porciones de muestra bruta.

Muestra de laboratorio: Muestra reducida tomada de la muestra agregada o bruta que debe tener la misma composición.

Muestra test o alícuota: Tomada de la muestra de laboratorio que es sometida al proceso de medida química (PMQ), tras reducción o adecuación.

2.3. Plan de muestreo.

Un plan de muestreo es la estrategia seguida para obtener una muestra bruta representativa, a partir de un lote y responde de forma apropiada a las siguientes cuestiones con ayuda de la estadística de muestreo:

1.- *¿En qué parte del material debe tomarse la muestra?*

Dependiendo del tipo de muestra que se va a tomar, hay dos procedimientos generales:

Muestras aleatorias: El lote se divide en un número de segmentos reales o imaginarios y se recogen con ayuda de una tabla de números aleatorios, es decir, un conjunto de cifras entre 0 y 9 cuyo orden no obedece ninguna regla de formación, que se pueden leer individualmente o en grupos y en cualquier orden, en columnas hacia abajo, columnas hacia arriba, en fila, diagonalmente. Si se desea formar números aleatorios en un determinado rango, basta con calcular la proporción, otra forma de usarlo es sumando dos números tomados de alguna posición o multiplicarlos.

Materiales estratificados: Se toma una muestra compuesta que resulte lo más representativa posible.

2.- ¿Qué cantidad de muestra debe tomarse?

La cantidad de muestra necesaria que proporcione una desviación estándar de muestro (S_m) puede definirse teniendo en cuenta la ecuación siguiente:

$$m S_m^2 = K_s$$

donde m es el peso de muestra analizada; S_m es la desviación estándar del muestreo (%) y K_s es la constante de muestreo de Ingamells, característica de cada material y definida como la cantidad de masa requerida para limitar la incertidumbre del muestreo al 1%.

3.- ¿Cuántas porciones deben analizarse?

El número de muestras implica que el muestreo sigue una distribución gaussiana y se puede conocer el número de muestras mínimo para limitar la incertidumbre, e , con un nivel de significación del 95%. Para ello se hace uso de la siguiente expresión:

$$n = \frac{t^2 S_m^2}{e^2}$$

donde n es el número de muestras a analizar; S_m es la desviación estándar del muestreo (%); t es el estadístico de Student para el 95% de significación y $n-1$ grados de libertad y e es la incertidumbre basada en el valor medio. S_m y e deben expresarse ambos como errores absolutos o ambos como errores relativos.

La calidad del proceso analítico se ve afectada por el error analítico que depende de la desviación estándar del proceso global (S_o) y considera dos desviaciones estándar:

- La naturaleza de la muestra, afectada por la desviación estándar del muestreo (S_m).

- El procedimiento analítico utilizado, afectado por su desviación estándar (S_a).

El error global se puede expresar en términos de varianza del siguiente modo:

$$S_o^2 = S_m^2 + S_a^2$$

2.4. Métodos y equipos para la toma de muestra.

Muchos de los protocolos de toma de muestra se encuentran recogidos en diferentes normas de carácter internacional (International Standard Organization, ISO, o American standards and testing materials, ASTM). Además se debe considerar el estado físico de la muestra (sólido, líquido, gas), diferentes aplicaciones (control de calidad, seguridad, toxicidad medioambiental), los posibles riesgos de contaminación de la misma y la falta de representatividad.

Muestras sólidas

Su mayor heterogeneidad obliga a diseñar cuidadosamente la toma de muestra para evitar la falta de representatividad. Los factores que deben considerarse son el estado de agregación (material particulado o compacto) y si la muestra está en movimiento o es estática.

- *Materia particulada en movimiento.* Es muy importante considerar el tamaño de partícula en el diseño de la toma de muestra. El muestreo de una muestra de un reactivo en una cinta transportadora, puede llevarse a cabo de forma automática con un muestreador mecánico sin parar la cinta. El muestreador toma una muestra unidireccional a intervalos regulares de tiempo (figura 2.6.)

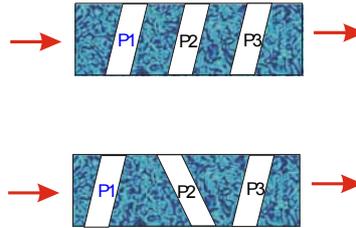


Fig. 2.6. Toma de muestra en una fracción de tiempo prefijada. Modelo dinámico con toma de muestra unidireccional (arriba) y con toma de muestra bidireccional (abajo).

- *Materia particulada estática.* Existe riesgo de falta de representatividad debido a la distinta distribución de partículas. El muestreo puede ser: superficial o a diferentes profundidades; o permitir buscar una composición media de una zona entre la superficie y una profundidad dada. Se utilizan muestreadores tipo sonda como el de la figura 2.7.a y los taladros de tornillo (figura 2.7.b). Son introducidos verticalmente, de forma manual o mecánica, en la muestra a la vez que se guían. La rotación del cilindro interior abre y cierra las hendiduras situadas a lo largo de la vaina del cilindro externo.

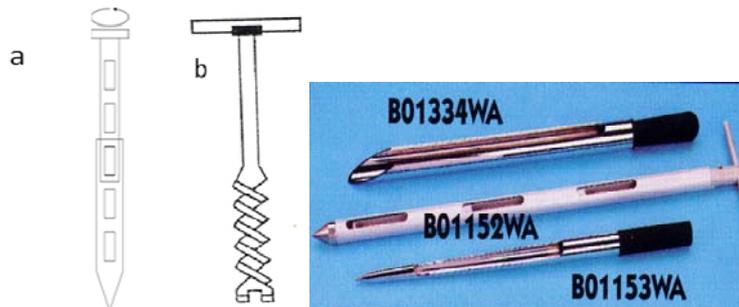


Fig. 2.7. Muestreadores tipo sonda (a) y taladros de tornillo (b). En la fotografía sonda de bayoneta.

Muestras líquidas

- *Muestras líquidas en movimiento en sistemas abiertos* como (océanos, estuarios, ríos, efluentes industriales). La composición de la muestra puede variar en función de la temperatura, caudal, profundidad, distancia de la fuente, etc. Por lo que se recomienda tomar un número elevado de muestras en períodos consecutivos. Los equipos varían dependiendo de si la toma de muestra es superficial (1-2 m de profundidad) o en la columna de agua a grandes profundidades (varios km). Se utilizan contenedores en forma de botella de cuello ancho, con un tapón que puede quitarse a una determinada profundidad, que van situados en una especie de cesta con un peso.

También se utilizan equipos automáticos (Figuras 2.8.) que constan de: Una sonda de longitud variable por donde se aspira la muestra; una bomba de succión; un distribuidor automático de las muestras succionadas; un automuestreador que contiene de 20 a 100 contenedores y un microprocesador que controla el proceso.



Fig. 2.8. Sistema de muestreo automático para muestras líquidas en movimiento.

Cuando la muestra tiene materia sólida en suspensión, debe filtrarse y analizar la materia sólida en paralelo con la muestra líquida.

- *Muestras líquidas en movimiento en sistemas cerrados*, como canalizaciones de agua de suministro a una población, fluido en una tubería en una industria (figura 2.9.). Es necesario controlar la velocidad de flujo para asegurar la homogeneidad de la muestra. La muestra se toma en la dirección opuesta al flujo del líquido. Además se controla la velocidad de flujo para asegurar la homogeneidad de la muestra.

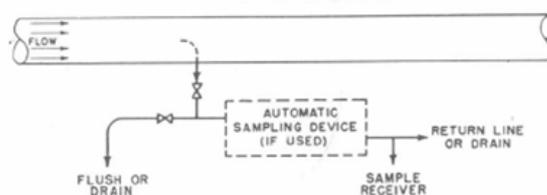


Fig. 2.9. Sistema de muestreo para flujo continuo.

- *Muestras de líquidos almacenados en contenedores cerrados*, como un tanque contenedor de aceite en una industria conservera. Hay que tener en cuenta la posible heterogeneidad de la muestra debido a una estratificación por diferentes densidades. En ese caso, el muestreo puede realizarse tomando porciones a diferentes profundidades, usando una botella como la de la figura 2.10.

- *Muestras de líquidos estáticos en sistemas abiertos* como un lago o un embalse. El muestreo puede llevarse a cabo con cualquiera de los dispositivos indicados anteriormente. Aunque se recomienda la instalación de una estación permanente y automática de muestreo a diferentes profundidades (figuras 2.11. y 2.12).

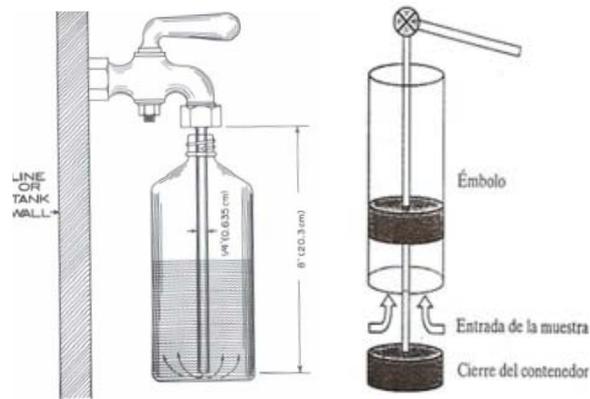


Fig. 2.10. Botella para muestreo de líquidos almacenados en sistemas cerrados (izquierdo). Muestreador con émbolo para líquidos almacenados en tanques (derecha).



Fig. 2.11. Muestreo de aguas subterráneas a distintos niveles de profundidad (a) Muestreador con refrigeración de aguas residuales (b).

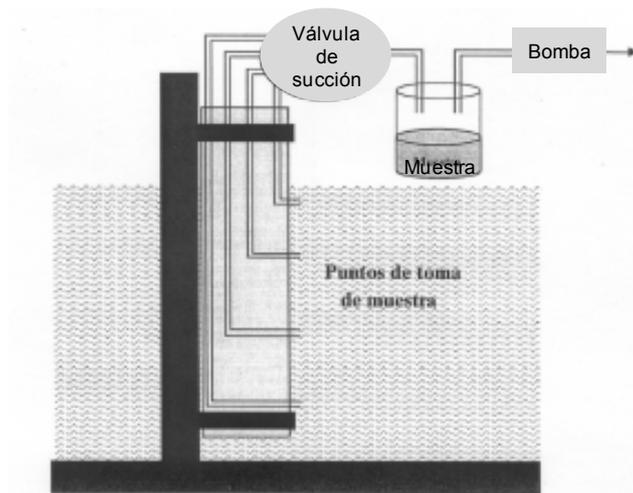


Fig. 2.12. Estación de muestreo de muestras líquidas a distintas profundidades.

- *Muestras gaseosas.* Cuando se realiza el muestreo de analitos orgánicos o inorgánicos (gases, partículas en suspensión, en forma de gotas o aerosoles) se utilizan dispositivos como los de las figura 2.13 y 2.14. Constan de una bomba de succión de aire. Las partículas quedan retenidas en el filtro de teflón. Los gases, por ejemplo, SO_2 son retenidos en el lecho de carbón impregnado de un reactivo que interacciona con el analito originando SO_4^{2-} que queda adsorbido en el soporte activo

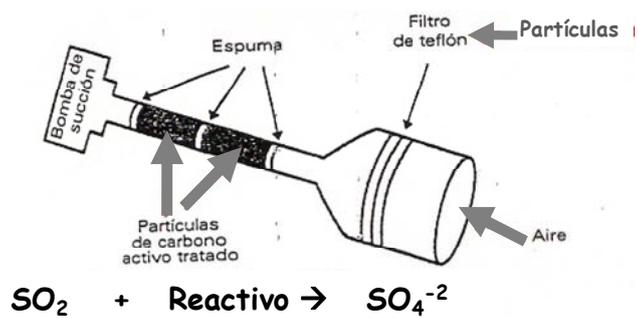


Fig. 2.13. Esquema de muestreador para la determinación de partículas en suspensión y gases inorgánicos (arriba). Dispositivo con bomba muestreadora de gases y kits de tubos detectores de gases e impurezas (abajo)



Fig. 2.14. Impingers para muestreo de aire.

2.5. Preparación de las muestras de laboratorio

El pretratamiento dependerá de la forma física de la muestra, de la matriz de muestra, del tipo de analito y para ello puede requerir la preconcentración de la muestra u otra transformación de los analitos en la forma química más adecuada para la técnica de determinación que se vaya a utilizar (Tabla 2.2.). Esta operación, algunas veces la realiza el analista y otras el propio instrumento de medida. La preparación de la muestra incluye la separación de interferencias de la matriz, especies diferentes del analito de interés. Un método con pocas interferencias se denomina específico.

Tabla 2.2. Directrices para el tratamiento de muestras.

MUESTRA BRUTA		
SÓLIDA	LÍQUIDA	GASEOSA
Tratamiento muestra bruta Secado División Pulverización	Homogenización	Obtención Presión muestra
	Separación de fases Sin cambio químico Con cambio químico -Fase sólida -Fase gaseosa	
Homogeneización Mezcla en centrífuga Pruebas de homogeneidad	Preconcentración Precipitación	Adsorción /Absorción Absorbentes líquidos Adsorbentes sólidos
Submuestreo Por pesada	Submuestreo Por pesada o volumen	

En el caso de muestras sólidas, pueden requerir una reducción de tamaño que mejore su homogeneización para que la muestra final sea lo más representativa posible. Algunos instrumentos Trituran de forma cortante mediante molino de cuchillas (para materiales con fibras como vegetales, papel, madera) y otros actúan por impacto, molino de bolas (para materiales duros como rocas, o minerales). También pueden utilizarse morteros de diversos materiales dependiendo de la dureza de la muestra (ágata y acero para muestras duras y porcelana o vidrio para muestras más blandas). También se pueden utilizar reductores de muestra o divisor automático rotatorio para dividir la muestra de forma controlada y reproducible. La muestra se coloca en un embudo acoplado a un sistema de vibración que permite la salida de la muestra hacia un carrusel giratorio especial (hasta 16 recipientes) para obtener submuestras de manera rápida (figura 2.15.)

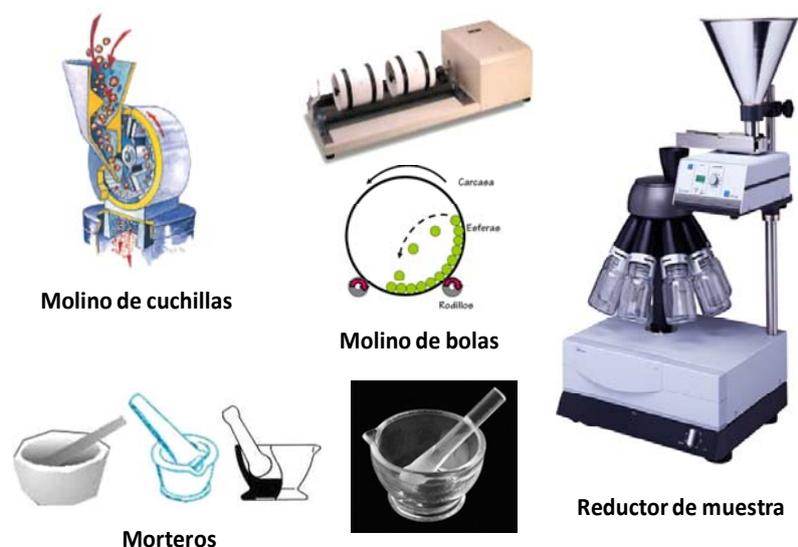


Fig. 2.15. Diversos sistemas de división de la muestra.

Tras la pulverización puede ser necesaria la separación por tamaño de partícula, para posteriores tratamientos de las submuestras, mediante tamices o cribas (acero, latón y nailon) con diferente número de malla o diámetro de los huecos del tamiz que permite pasar las partículas (figura 2.16.).

Generalmente el contenido de humedad de una muestra puede ocasionar alteraciones en el rendimiento de etapas posteriores de extracción. Por ello se requiere su eliminación por secado al aire (en campana extractora), mediante estufas (entre 90 y 110 °C, pero inadecuada para analitos volátiles) o por liofilización, procedimiento de secado en frío (-40 °C con N₂ líquido) por sublimación del hielo a estado vapor y sometiendo las muestras a vacío (10 Pa de presión).



Fig. 2.16. Tamices utilizados para separar las partículas sólidas por tamaño.

La temperatura es muy importante, si es muy alta provoca descomposición de la muestra, si es demasiado baja, asegura la integridad de la muestra pero aumenta el tiempo de secado y el riesgo de contaminación. Las muestras secas se guardan en desecadores (figura 2.17.) para evitar que adquieran humedad ambiental.

A veces la homogeneización de muestras líquidas requiere, dependiendo de la posible presencia de materia particulada, el uso de centrifugación o filtración.

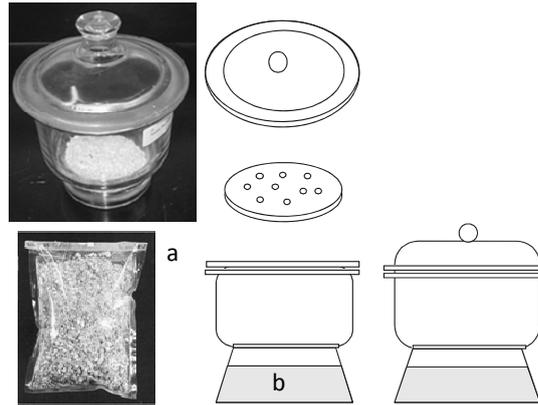


Fig. 2.17. Fotografía y esquema de un desecador. Utiliza un desecante (a), generalmente sílica gel que se coloca en el interior del desecador (b).

En el caso de muestras gaseosas se utilizan absorbentes y adsorbentes (figura 2.18.).

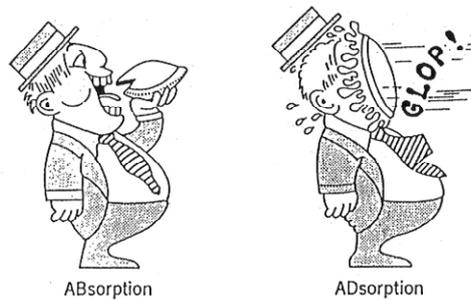


Fig. 2.18. Diferencia entre absorción (atraer y retener una muestra líquida en el interior de un sólido) y adsorción (unión de las moléculas de la muestra a la superficie de un sólido).

2.6. Transporte y conservación de la muestra.

En el transporte de las muestras se debe tener ciertas precauciones para mantener la integridad de las mismas y evitar la pérdida de analitos: (a) Evitar la exposición a humedades extremas y mantener las muestras a 4 °C. (b) Congelar las muestras biológicas o de alimentos para su transporte.

En la conservación de las muestras también se deben tener ciertas precauciones que están interrelacionadas: (a) Reducir los riesgos de alteraciones por contacto con la atmósfera, absorción y oxidación. (b) Evitar la exposición de la muestra al aire y a la luz y su manipulación. (c) Los sólidos se mantienen secos eliminando el agua en una estufa. (d) Las muestras biológicas se congelan en nitrógeno líquido o se liofilizan. (e) El tratamiento de los líquidos depende del tipo de análisis a realizar. En general, la estabilización de iones orgánicos se consigue por acidulación con HNO_3 .

2.7. Preparación de la muestra para el análisis.

Es una etapa determinante en el proceso analítico. Representa más del 60% del tiempo requerido para el análisis (figura 2.19.) y engloba gran número de procedimientos que están afectados por errores.



Fig. 2.19. Tiempo consumido (%) por las diferentes etapas del proceso analítico.

Consideraciones generales:

1. La preparación de muestra debe hacerse sin que se produzca la pérdida de ninguno de los analitos (recuperación cuantitativa y reproducible) de muestra a muestra.
2. La preparación de la muestra debe llevar los analitos a la forma química más adecuada para el método de medida que se utilice posteriormente (figura 2.20.).
3. Esta etapa debe incluir la separación de interferencias de la matriz (cuando sea necesario).
4. En la preparación de muestra debe evitarse la adición de nuevas interferencias de los reactivos o recipientes de reacción. Un problema común es la aparición de contaminación cruzada, cuando algún material de una muestra se incluye en otra muestra
5. La preparación de muestra debe incluir, sí es necesario, la dilución o concentración de los analitos para que sus concentraciones se encuentren dentro del mejor rango de medida del método (figura 2.21.). Así, para la concentración de los analitos se puede utilizar un rotavapor que elimine el disolvente a presión reducida en

un matraz evaporador que rota mecánicamente en un baño de agua a temperatura controlada de 30-40 °C. El sistema está conectado a una bomba de vacío. En el caso de procesar varias muestras simultáneamente, se pueden evaporar-concentrar las muestras mediante un turbo-vap. Permite un calentamiento homogéneo a presión reducida y la entrada de gas que se satura de disolvente en su ruta de salida. En el caso de analitos termolábiles hay que tener la precaución de no evaporar a sequedad el extracto. Para ello se recomienda el uso de un mini-vap que elimina el disolvente mediante corriente de gas en inerte (N₂) en ausencia de calor.

6. La presencia de compuestos inactivos en la muestra es importante cuando se desarrollan métodos de preparación de muestra.
7. Existen muchos mecanismos por los que puede haber pérdida de analitos (adsorción a las paredes de los recipientes, evaporación, reacciones químicas laterales, accidentes) El % de recuperación se refiere a una comparación entre la concentración de analito encontrada (determinada) y la concentración de analito presente en la muestra.

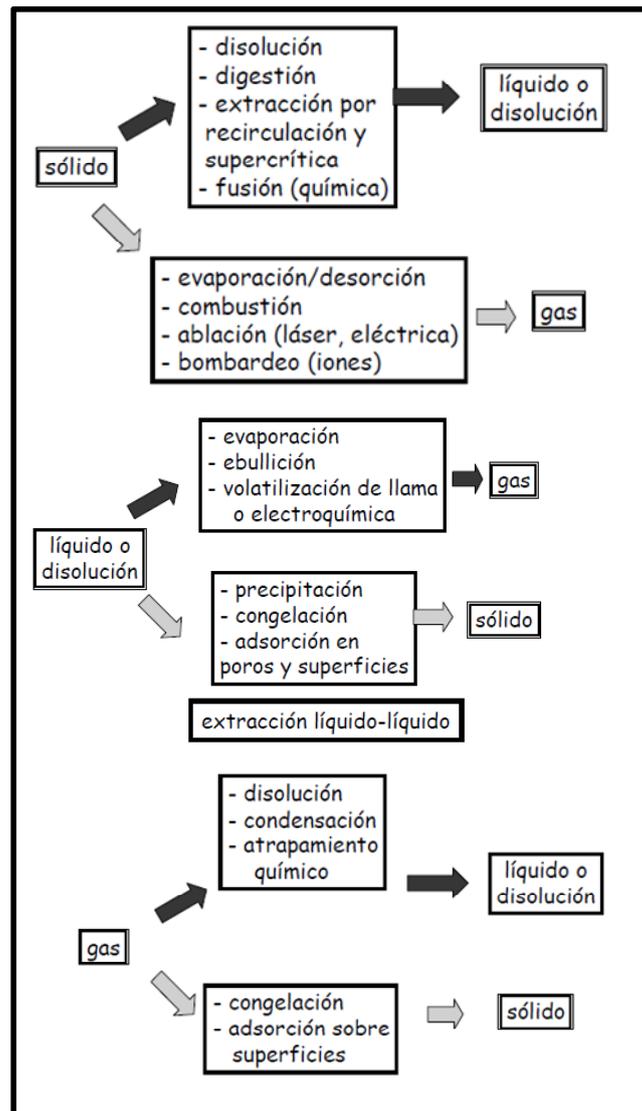


Fig. 2.20. Mecanismos de cambio de estado.

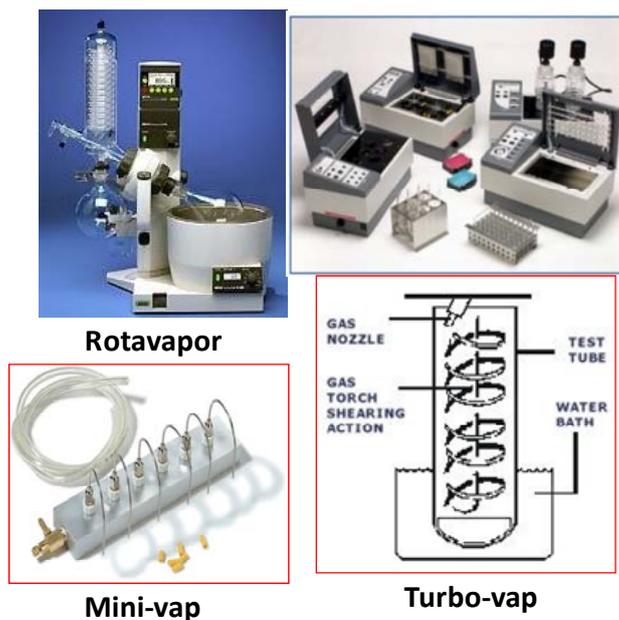


Fig. 2.21. Sistemas de concentración de muestra: rotavapor, turbo vap,; minivap. Estos dos últimos dispositivos evitan pérdidas elevadas de analitos.

2.7.1. Disolución

La disolución de la muestra se basa en convertir los analitos a determinar en una forma química que permanezca estable en un disolvente adecuado. El procedimiento más sencillo se lleva a cabo con agitación y calentamiento suave o con ayuda de un sistema de ultrasonidos (figura 2.22.). Este sistema se caracteriza por proporcionar un pequeño desplazamiento de partículas, agitación y activación de las moléculas de disolvente y una gran aceleración del proceso de disolución. Se originan vibraciones que proporcionan agitación de las muestras por generación de burbujas microscópicas que se contraen y expanden y se facilita la transferencia de masas.

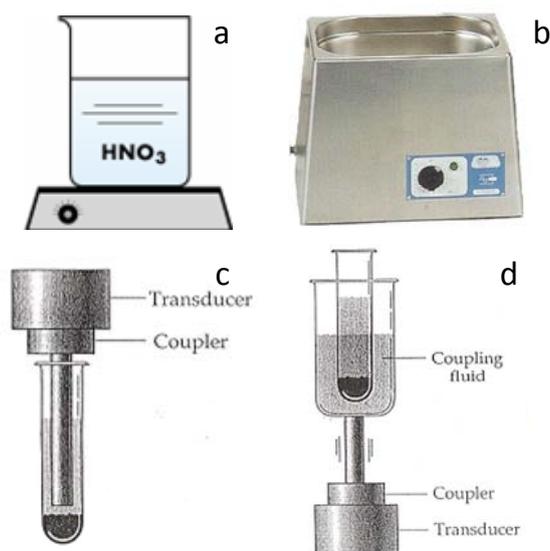


Fig.2.22. Sistemas de disolución con placa agitadora y calentamiento por conducción a través del recipiente y por convección en el seno de la disolución(a) y mediante ultrasonidos (b), con sonda de ultrasonidos, el transductor está sumergido en el disolvente (c) y con baño de ultrasonidos donde el transductor alcanza la parte inferior del recipiente (d).

2.7.2. Mineralización

Supone la eliminación de la materia orgánica de una muestra. Se realiza cuando se determinan elementos traza en muestras con materia orgánica. Se utilizan disolventes ácidos o mezclas de ácidos que aumentan la eficacia del proceso, disolviendo las muestras inicialmente sólidas: H_2SO_4 , $\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$, $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{HClO}_4$, $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \text{HClO}_4$. Se lleva a cabo por vía seca o por vía húmeda.

a) Vía seca

- Se utiliza un crisol con el material colocado en un horno a temperaturas elevadas ($500\text{ }^\circ\text{C}$).

- Un plasma de radiofrecuencia de oxígeno a bajas temperaturas ($< 150\text{ }^{\circ}\text{C}$), pero el proceso es lento (24 h)
- Mediante combustión en atmósfera de oxígeno activado.

b) Vía húmeda

La digestión se realiza en un sistema abierto (matraz Erlenmeyer o tipo Kjeldahl, de fondo redondo y cuello largo que permite el calentamiento a reflujo, minimizando la pérdida de componentes volátiles) mostrados en la figura 2.23.

También puede llevarse a cabo en reactores de digestión sometidos a presión o mediante energía de microondas (utilizando material transparente a las microondas que facilita la rapidez del calentamiento). En ambos casos la combinación de la presión y la temperatura ($100 - 150\text{ }^{\circ}\text{C}$) reduce el tiempo de mineralización (1 - 2 h) (ver figura 2.24.).

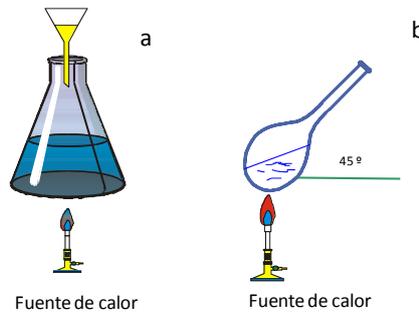


Fig. 2.23. Digestión en sistemas abiertos (a) matraz Erlenmeyer (b) matraz tipo Kjeldahl.

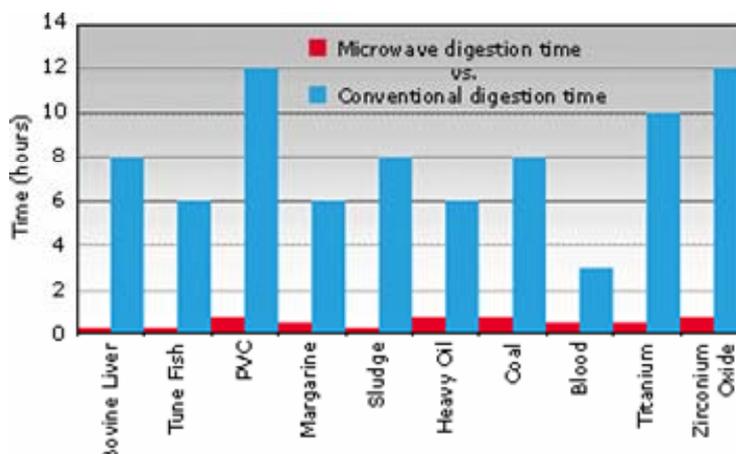


Fig. 2.24. Diagrama comparativo del tiempo de digestión mediante microondas o por procedimiento convencional.

Las ventajas que ofrece la digestión mediante microondas son numerosas:

- Tiempos de digestión más cortos.
- No hay pérdida de elementos volátiles.
- No hay desprendimiento de vapores ácidos.
- No se produce contaminación de la muestra.
- Concentraciones muy bajas en los blancos.
- No se requiere la presencia del operador.
- Control riguroso de la temperatura y presión.

2.7.3. Extracción

Procesos que se utilizan fundamentalmente para la separación de compuestos orgánicos; mejorar la sensibilidad, mediante la preconcentración de los analitos; mejorar la selectividad, mediante la eliminación de interferencias; y favorecer la detección de los analitos en el nuevo medio en el que se encuentra.

2.7.3.1. Extracción líquido-líquido clásica.

Se basa en la transferencia de una o más sustancias entre dos fases líquidas inmiscibles puestas en contacto entre sí (figura 2.25.). Se establece un equilibrio entre ambas fases que puede alterarse con temperatura y presión:



definiéndose la constante de distribución (K_D) y la razón de distribución (D) si existen varios equilibrios que puedan influir en el reparto del soluto entre las dos fases:

$$K_D = \frac{[A]_{org}}{[A]_{ac}} \quad D = \frac{\sum [A]_{org}}{\sum [A]_{ac}}$$

Modos de extracción:

- a) Extracción líquido-líquido sencilla (figura 2.26), para la que es necesario conocer la relación entre el rendimiento y las variables operacionales que se pueden controlar, como el tipo de disolvente, el volumen de disolvente y de fase acuosa y el número de operaciones (mejor con varias extracciones de poco volumen de disolvente que con una sola extracción y mayor volumen). Es un proceso rápido, siempre que no se formen emulsiones al agitar los dos disolventes.
- b) Extracción líquido-líquido continua que consiste en poner en contacto la fase inicial, generalmente la acuosa, con porciones nuevas del segundo disolvente, alcanzándose el equilibrio en cada operación. Utiliza dispositivos especiales como los mostrados en la figura 2.27., en los que el disolvente pasa de forma continua por goteo a través de la disolución acuosa mediante un sistema de destilación. Se emplean cuando las relaciones de distribución no son muy favorables y no se puede lograr la

extracción de una sustancia de las demás, en una única operación.

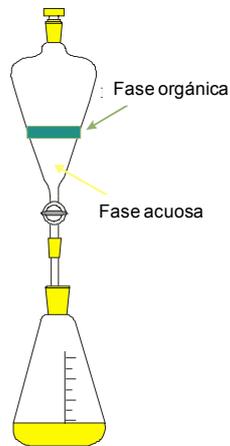


Fig. 2.25. Esquema de extracción líquido-líquido clásica mediante embudo de decantación o extracción que consta de una llave de teflón.

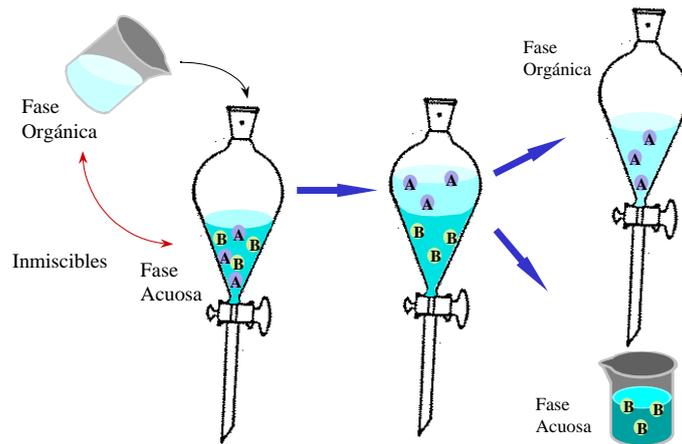


Fig. 2.26. Esquema de extracción líquido-líquido sencilla con embudo de decantación.

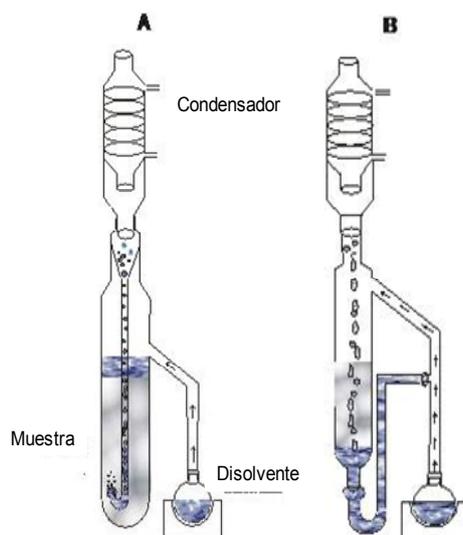


Fig. 2.27. Sistemas especiales para extracción líquido-líquido continua (A) disolvente menos denso (éter) que la fase acuosa (B) disolvente más denso (cloroformo) que la fase acuosa.

2.7.3.2. Extracción sólido-líquido clásica con Soxhlet.

Se trata de una extracción cuantitativa a reflujo, utilizando grandes volúmenes de disolvente (200 - 300 mL) para cantidades de muestra entre 1 - 10 g durante un período de tiempo considerable (12 - 24 horas). Se utiliza el dispositivo mostrado en la figura 2.28. Cuando la cámara de extracción se llena de disolvente hasta un determinado nivel, impregnando la muestra sólida, un sifón lateral envía prácticamente todo el volumen de disolvente de nuevo al matraz y se repite la operación. Es un sistema adecuado para el análisis de grasas en alimentos o de aceites.

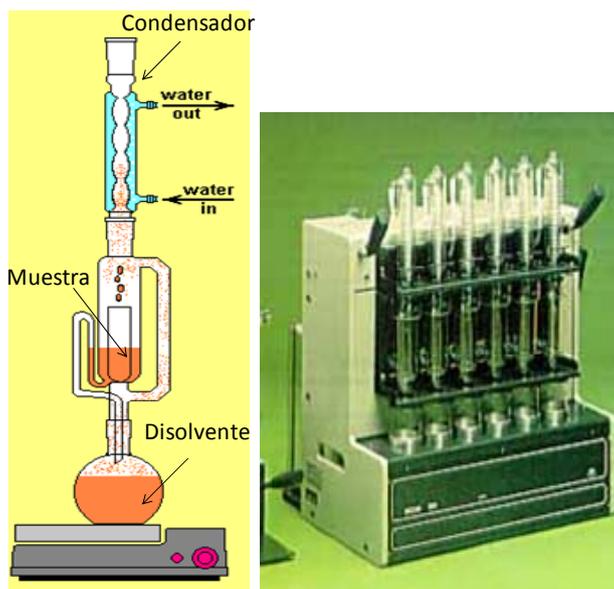


Fig. 2.28. Dispositivo de extracción Soxhlet y sistema para extracción en serie.

2.7.3.3. Extracción con disolventes asistida por microondas.

Es una alternativa a la extracción convencional con disolventes. Se utiliza un sistema cerrado a presión (semejante al digestor). Se basa en que los diferentes disolventes absorben radiación de microondas en función de su constante dieléctrica, de modo que a mayor constante, mayor absorción. De este modo la muestra con el disolvente se calienta a una temperatura superior al punto de ebullición del disolvente y los analitos se extraen. En el caso de utilizar disolventes que no absorben la energía de microondas, se puede añadir unos microlitros de agua a la muestra para favorecer la absorción y la liberación de los analitos al disolvente frío. Es un método más suave, en cuanto a calentamiento y, por lo tanto adecuado para analitos termolábiles.

Entre las ventajas que ofrece la extracción asistida por microondas (MAE) cabe destacar la menor cantidad de

disolventes utilizada (unos pocos mL), el menor riesgo de toxicidad y la posibilidad de optimizar la extracción mediante estrategias quimiométricas como el diseño de experimentos, teniendo en cuenta los factores que pueden afectar a la MAE (tiempo de calentamiento, temperatura, volumen de disolvente y tipo de disolvente). Como riesgos, comentar el uso de energía de microondas y manejar recipientes a presión (figura 2.29.) Es un sistema adecuado para la extracción de aromas, lípidos en alimentos, pesticidas y otros contaminantes en sedimentos y suelos, aditivos en polímeros.

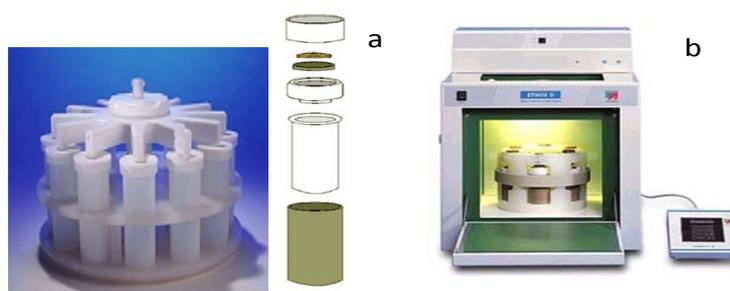


Fig. 2.28. Celda para extracción asistida por microondas (a) Equipo para MAE que dispone de un horno sometido a presión y temperatura y un carrusel con cabida de hasta doce celdas (b).

2.7.3.4. Extracción en fase sólida

Esta técnica se basa en el reparto de los analitos, contenidos en una matriz generalmente acuosa, entre dos fases, una sólida y otra líquida.

Los analitos a extraer deben tener mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz (etapa de adsorción).

Los compuestos retenidos en la fase sólida son eluidos con un disolvente que tenga mayor afinidad por los analitos (etapa de elución o desorción).

Los principales objetivos de la técnica de extracción en fase sólida (SPE) se resumen en: la separación de compuestos

interferentes presentes en la matriz junto a los analitos de interés; preconcentración de la muestra (1 litro a 1 mL); fraccionamiento de la muestra en grupos de compuestos; almacenamiento de analitos inestables en otro disolvente, llevar a cabo simultáneamente reacciones de derivatización entre los analitos de interés y los compuestos de la superficie adsorbente. En el esquema de la figura 2.29 se presentan las diferentes etapas del proceso de SPE.

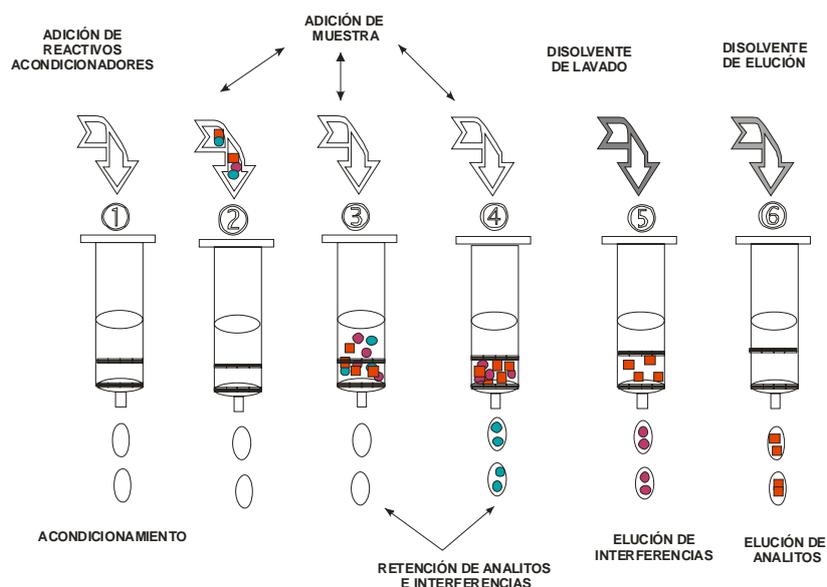


Fig. 2.29. Etapas de SPE: acondicionamiento del adsorbente con un disolvente adecuado (metanol) (1), adición de la muestra (adsorción) (2-4) Separación de interferencias (lavado) (5) elución de los analitos (desorción) (6).

El adsorbente está empaquetado entre dos discos fritados en un cartucho de polipropileno o en una columna de jeringa. Las fases líquidas pasan a través de él por gravedad, succión o aplicando presión. También puede inmovilizarse el adsorbente en una membrana de microfibras de 0.5 mm de espesor que permite flujos más elevados que con cartuchos.

En la figura 2.30. se muestran algunos dispositivos utilizados en SPE.

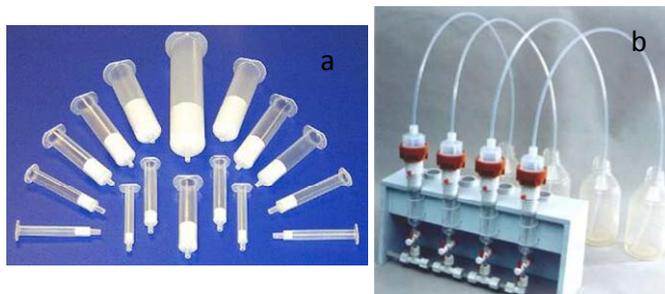


Fig. 2.30. Jeringas con columnas de adsorbente para SPE (a). Dispositivo para SPE en serie (b).

El adsorbente o fase estacionaria más utilizada como fase inversa es el octadecilsilano (C_{18}) que es apolar. La sílice o el N-propiletildiaminosilano (PSA) son dos adsorbentes polares utilizados como fase normal. El carboximetilsilano (CBA) o el dietilaminopropilsilano (DBA) son adsorbentes utilizados para cambio iónico.

La SPE es una técnica alternativa frente a la extracción líquido-líquido porque proporciona altas recuperaciones, reducción de la manipulación de la muestra y del consumo de disolventes, alto nivel de concentración y purificación, fácilmente automatizable.

2.7.3.5. Microextracción en fase sólida

Esta técnica de microextracción en fase sólida (SPME) es más reciente y está basada en el reparto de los analitos entre la muestra y una fase sólida que es una microjeringa de sílice fundida con un recubrimiento de distintos materiales (polidimetilsiloxano, poliimida, carbowax, grafito, etc) que está introducida en la aguja de una microjeringa (figura 2.31.).

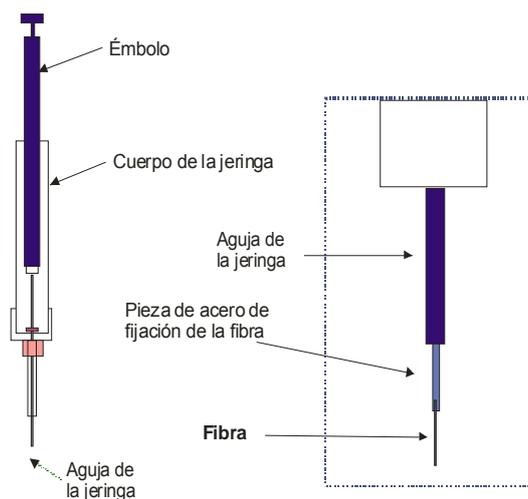


Fig. 2.31. Dispositivo de microextracción en fase sólida.

Los analitos son absorbidos/adsorbidos, según la naturaleza de la fibra, en 2 - 15 min al introducir la aguja de la jeringa en la muestra (ver los modos de extracción en la figura 2.32.). La SPME se aplica para el análisis de compuestos volátiles. Al pulsar el émbolo la fibra se introduce en la muestra líquida (inmersión directa) o en el espacio de cabeza del matraz (HS). Tras la adsorción/absorción de los analitos, la fibra es retirada dentro de la aguja. Los analitos son desorbidos térmicamente, introduciendo la aguja en el inyector de un cromatógrafo de gases. En la figura 2.33. se muestran las etapas de SPME.

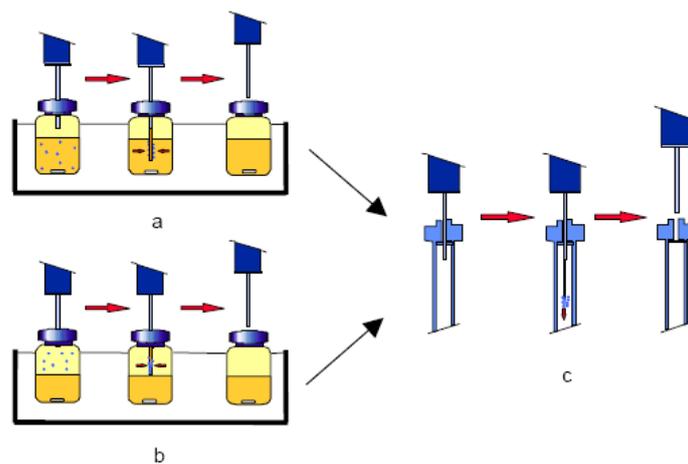


Fig. 2.32. Esquema del proceso de SPME (a) inmersión directa en la muestra líquida; (b) extracción en espacio de cabeza (HS-SPME); (c) desorción térmica en inyector de cromatógrafo de gases.

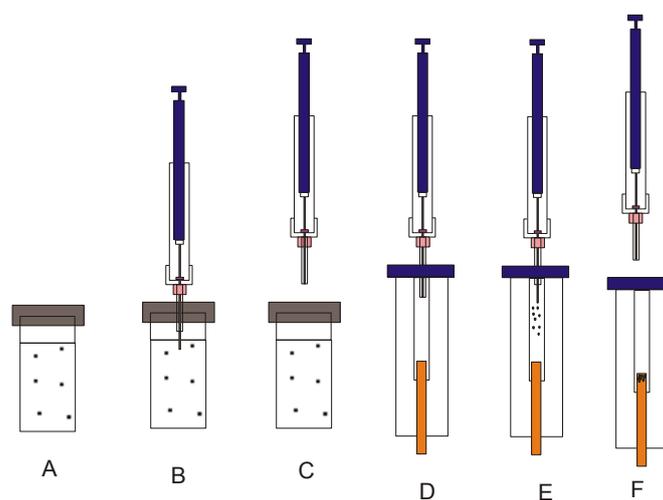


Fig. 2.33. Etapas de SPME: muestra (A); absorción de los analitos en la fibra (B); la fibra se retrotrae en la aguja de la jeringa (C); desorción térmica en inyector de un cromatógrafo de gases (D-F).

2.8. Fuentes bibliográficas

C. CÁMARA, P. FERNÁNDEZ, A. MARATÍN-ESTEBAN, C. PÉREZ-CONDE y M. VIDAL “Toma y tratamiento de muestras” Ed. Síntesis. Madrid (2002).

<http://www.rsc-teacher-fellows.net/labTechniques/SoxhletExtractionVideo.htm>

http://www.sigmaaldrich.com/Club_Usuarios_SPME.html

http://www.sigmaaldrich.com/Brands/Supelco_Home/Datanodes.html?cat_path=970203,970204&supelco_name=SPME&id=970204

TEMA 3. MÉTODOS VOLUMÉTRICOS DE ANÁLISIS

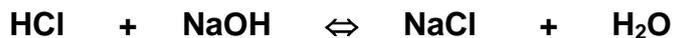
Objetivos

- ✓ Características de las reacciones utilizadas en volumetrías.
- ✓ Procedimientos de valoración.
- ✓ Sustancias tipo primario y disoluciones patrón.
- ✓ Aplicaciones analíticas de las volumetrías.
- ✓ Conocer el funcionamiento de los indicadores.
- ✓ Aplicaciones de métodos gravimétricos.

3.1. Fundamento de los métodos volumétricos.

Se basan en la adición de una disolución del reactivo de concentración exactamente conocida a la disolución problema, hasta lograr que reaccionen entre sí cantidades equivalentes. Se puede determinar la concentración de un analito a través de la medida del volumen de un reactivo valorante estándar o previamente estandarizado.

Ej.:



Definir:

- ✓ Punto de equivalencia: punto en el que la cantidad de agente valorante y de sustancia valorada, coinciden estequiométricamente.
- ✓ Punto final: punto experimental en el que se detecta el punto de equivalencia.
- ✓ Indicador: sustancia o técnica que permite visualizar o detectar el punto final.
- ✓ Error volumétrico: cuando los puntos de equivalencia y final no coinciden. Hay que establecer siempre las condiciones de valoración para que sea $< 0.1\%$. Engloba

tres tipos de errores: error químico (asociado a la reacción), error visual (debido al observador) y error del indicador (consumo de disolución valorada por el indicador, pero se puede estimarse mediante la valoración de blancos).

Características de los métodos volumétricos:

- La reacción entre el agente valorante (patrón o previamente valorado) y la sustancia a valorar debe ser cuantitativa (99,9 %) entre la sustancia valorada y Rápido
- La interacción entre el valorante y la sustancia valorada debe ser estequiométrica, según una reacción definida.
- La velocidad de la reacción debe ser suficientemente alta para que la valoración sea rápida. Las reacciones lentas pueden acelerarse por medio de catalizadores
- La medida en el punto de equivalencia se debe realizar mediante la utilización de un indicador.

En la figura 3.1. se muestra algunos de los materiales volumétricos utilizados. Las probetas miden volúmenes aproximados. Los matraces aforados miden exactamente el volumen de la disolución que contienen, mientras que las buretas miden exactamente el volumen de líquido que dispensan al accionar la llave. Las micropipetas están provistas de un pistón y puntas desechables. Pueden medir entre 20 y 500 μL (volumen fijo o variable)

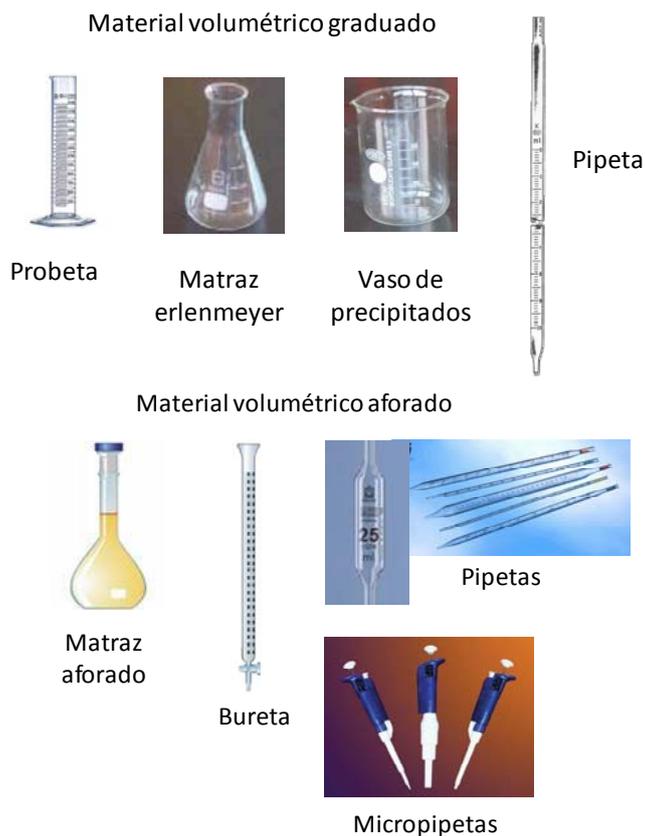
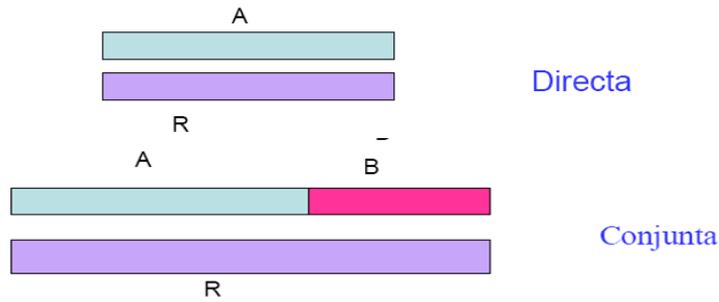


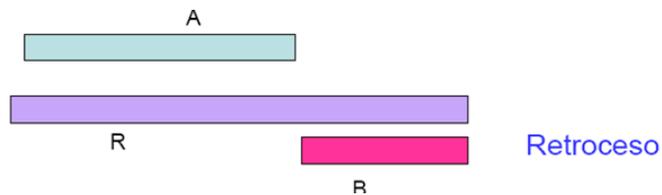
Fig. 3.1. Material volumétrico.

3.1.1. Procedimientos de valoración

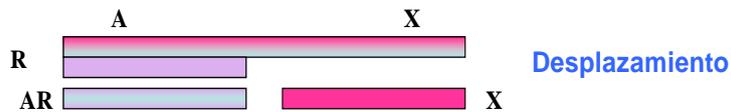
Valoración directa. Implica la adición gradual o continua del reactivo valorante sobre la disolución que contiene la especie a determinar. Es el procedimiento preferible por su rapidez, simplicidad y mejor precisión. Es aplicable cuando se dispone del valorante, disolvente e indicador adecuados.



Valoración por retroceso. Se realiza añadiendo un exceso de disolución estándar (primer valorante) cuyo exceso, que no ha reaccionado, se valora después con otra disolución estándar (segundo valorante). Como consecuencia de la utilización de dos disoluciones estándar, los errores son mayores y el procedimiento consume más tiempo.



Valoración indirecta. Se utiliza cuando no es posible hacer la valoración directa. Este procedimiento utiliza alguna reacción analítica auxiliar con la especie a determinar (preferiblemente específica o selectiva). Como consecuencia de esta reacción se libera una cantidad equivalente de un tercer reactivo, el cual se valora con otra disolución estándar.



En las diferentes curvas de valoración se representa:

- Variación de pH frente al volumen de reactivo valorante (ácido-base).
- Variación de pM frente al volumen de AEDT añadido (formación de complejos metal-ligando).
- Variación de p(especie) frente al volumen de reactivo valorante (precipitación).
- Variación del potencial frente al volumen de reactivo valorante (redox).

En la Tabla 3.1. se muestran diferentes expresiones utilizadas para los cálculos volumétricos.

3.1.2. *Propiedades generales de las sustancias tipo patrón primario*

Deben de cumplir una serie de requisitos:

- Que sea idóneo para el fin perseguido.
- Que tenga pureza elevada con incertidumbre pequeña para alcanzar cotas altas de exactitud y trazabilidad.
- Debe existir una amplia variedad de estándares de medida analíticos, para cubrir diversas necesidades.
- Conocer detalles de conservación y forma de empleo. Deben de venir adecuadamente documentados
- Asequibles económicamente. Generalmente son materiales caros porque, aunque el material base sea barato, los trabajos previos y la oferta de varias magnitudes con sus incertidumbres certificadas implican mucho trabajo y costes.
- Las características referenciales deben estar bien establecidas y a ser posible certificadas, sobre todo la exactitud e incertidumbre.
- Deben ser estables (identificados con fecha de caducidad, algunos sólo pueden ser usados una única vez) y homogéneos (que no varíen con el tiempo, ni interaccionen con agentes atmosféricos).
- Que sean fáciles de preparar.

Algunos patrones primarios: ácido oxálico ($\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$), carbonato sódico (Na_2CO_3), ftalato ácido de potasio ($\text{KHC}_8\text{H}_7\text{O}_4$), yodato ácido de potasio ($\text{KH}(\text{IO}_3)_2$)

Tabla 3.1. Unidades habituales utilizadas para expresar la concentración

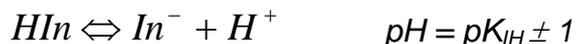
Nombre	Unidades ^a	Símbolo
molaridad	moles soluto	M
	litros disolución	
formalidad	número PF soluto	F
	litros disolución	
normalidad	número Eq soluto	N
	litros disolución	
molalidad	moles soluto	<i>m</i>
	kg disolvente	
peso %	g soluto	% p/p
	100 g disolución	
volumen %	mL soluto	% v/v
	100 mL disolución	
% peso-volumen	g soluto	% p/v
	100 mL disolución	
partes por millón	g soluto	ppm
	10^6 g disolución	
partes por billón	g soluto	ppb
	10^9 g disolución	

^aPF = peso fórmula; Eq = n° equivalentes = g/PE;
PE (peso equivalente) = PM/n

3.2. Aplicaciones de las volumetrías ácido-base

3.2.1. Características de los indicadores ácido-base

Compuestos orgánicos (ácidos o bases débiles) en las que las formas protonadas (HIn) y desprotonada (In⁻) tienen distinto color y estructura. Los mecanismos de cambio de color son fruto de la variación del pH, reacciones de fluorescencia o fenómenos turbidimétricos



Conocer el intervalo de viraje: un color definido para un pH y otro para otro pH, dos unidades superior. En la zona de viraje hay mezcla de color (figura 3.2.).

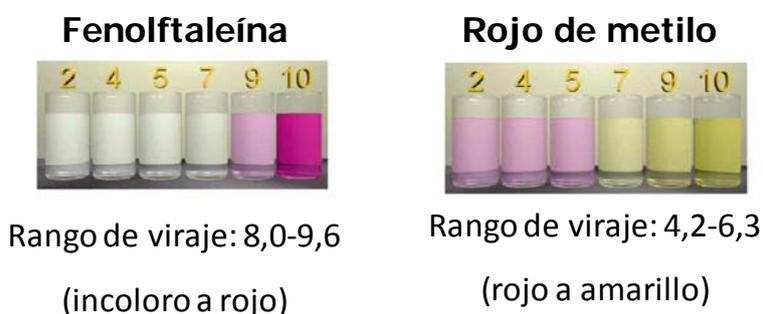


Fig. 3.2. Intervalos de viraje para fenolftaleína y rojo de metilo.

No deben consumir disolución valorante. Deben de tener una solubilidad adecuada y presentar estabilidad química.

En la tabla 3.2. se muestran diferentes indicadores ácido-base con sus correspondientes intervalos de viraje.

Tabla 3.2. Características de indicadores ácido-base.

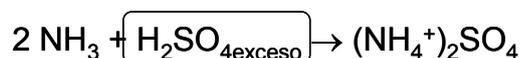
INDICADOR	Rango de viraje (pH)	Color ácido	Color básico
Azul de Timol	1,2-2,8 8,9-9,6	Rojo Amarillo	Amarillo Azul
Amarillo de metilo	2,9-4,0	Rojo	Amarillo
Anaranjado de metilo	3,1-4,4	Rojo	Amarillo
Verde Bromocresol	3,8-5,4	Amarillo	Azul
Rojo de metilo	4,2-6,3	Rojo	Amarillo
Azul de bromotimol	6,0-7,6	Amarillo	Azul
Rojo de fenol	6,4-8,0	Amarillo	Rojo
Púrpura de cresol	7,4-9,0	Amarillo	Púrpura
Fenolftaleína	8,0-9,6	Incoloro	Rojo
Timolftaleína	9,3-10,5	Incoloro	Azul
Amarillo de alizarina	10,1-12,0	Incoloro	Violeta

3.2.2. Determinación de nitrógeno. Método de Kjeldahl

El nitrógeno está presente en los compuestos orgánicos como los polipéptidos. El nitrógeno de los grupos amino y amido del polipéptido se convierte en ión amonio, el cual se disuelve en la disolución oxidante, y posteriormente es convertido en NH_3 gas. La determinación volumétrica se lleva a cabo en un dispositivo como el mostrado en la figura 3.3.

Las etapas del proceso se pueden resumir como sigue (figura 3.4.).

Etapla 1. Digestión en caliente de la muestra con ácido sulfúrico concentrado. El ácido fija el NH_4^+



Etapla 2. La disolución digerida se alcaliniza con NaOH y el NH_3 liberado se destila y es recogido en una disolución ácida.



Etapa 3. El amonio se valora con ácido y luego por retroceso, el exceso de ácido con una base.

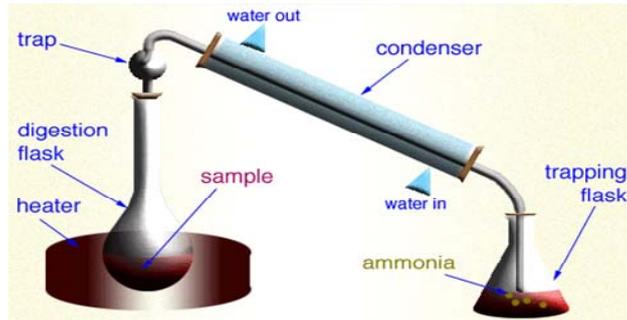
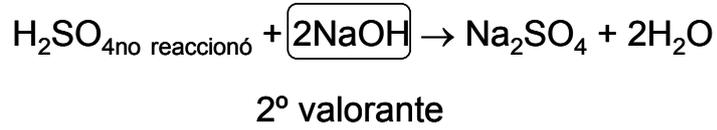


Fig. 3.3. Montaje propuesto por (Kjeldahl-1883) para la determinación de nitrógeno.

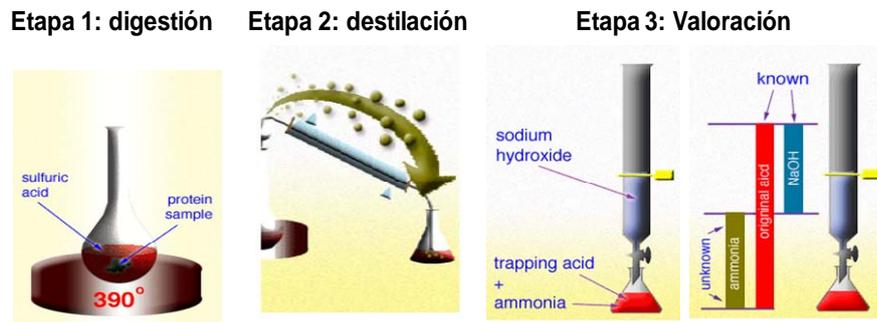


Fig. 3.4. Etapas del método Kjeldahl.

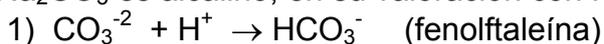
3.2.3. *Determinación de mezclas de carbonatos (NaCO₃; NaHCO₃ y NaOH)*

En cualquier disolución sólo pueden existir dos de las tres especies, ya que por reacción entre ellas queda eliminada la tercera.

Valoración de ácido fuerte con base fuerte: puede usarse naranja de metilo o fenolftaleína como indicadores.

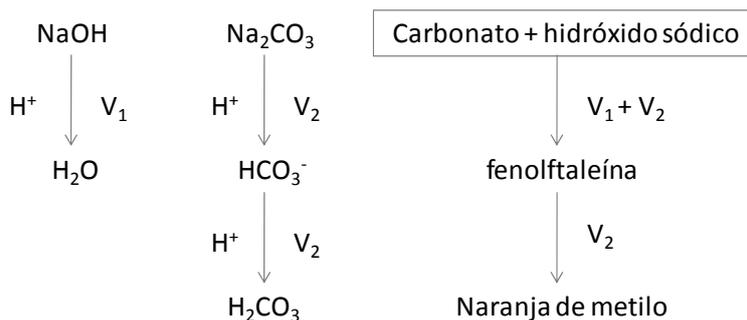
Fenolftaleína (8-9,6) Naranja de metilo (3,1-4,4)
 incoloro → rojo (rosa) rojo → anaranjado (amarillo)

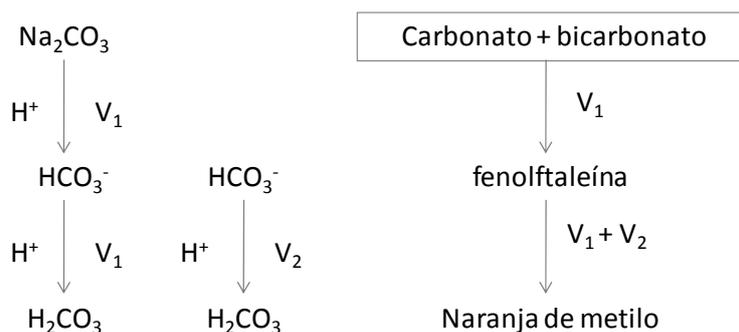
El Na₂CO₃ es alcalino, en su valoración con HCl:



Valoración de NaHCO₃

El NaHCO₃ no es alcalino a la fenolftaleína, al valorar con HCl:

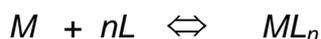




3.3. Aplicaciones de las volumetrías de formación de complejos

3.3.1. Constantes de estabilidad

La constante de formación o estabilidad (K) mide la extensión en que se produce la reacción de formación del complejo entre un metal M (ion central) y un ligando L (agente complejante).



Las moléculas del disolvente que permanecen unidas al ion central pueden ser sucesivamente reemplazadas por más ligandos hasta formarse el complejo ML_n . El número máximo de ligandos n que se une de forma covalente al ion central se denomina índice de coordinación. Las constantes parciales, $K_1, K_2, K_3, \dots, K_n$, responsables de la formación de complejos en etapas, y las constantes globales, $\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_n$ son las responsables de explicar la formación del complejo.

$$\beta_1 = K_1$$

$$\beta_2 = K_1 \cdot K_2$$

$$\beta_3 = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3$$

$$\beta_n = K_1 \cdot K_2 \cdot K_3 \cdot \dots \cdot K_n$$

La constante de disociación es la inversa de la constante de formación ($K_d=1/K$)

3.3.2. Reacciones parásitas o laterales

Causadas por otros ligandos que donan electrones en medio ácido, aniones, metales que aceptan electrones en medio alcalino, cambios de pH (H^+ y OH^-).

En medio ácido, los ligandos por poseer al menos un par de e- libre, actúan como bases y participan en reacciones ácido-base. Existe una competencia entre el M y los H^+ por L. En medio alcalino, los metales se comportan como ácidos de Lewis, la formación de hidroxocomplejos supone una competencia con el ligando. Se evalúa mediante los coeficientes de reacción parásita (α) hasta qué punto las reacciones parásitas son importantes y alteran la formación del complejo, dependiendo del pH del medio.

3.3.3. Constantes condicionales de estabilidad

Representan una medida cuantitativa de la extensión en que se produce la reacción principal de formación de complejos, según la importancia de posibles reacciones parásitas.



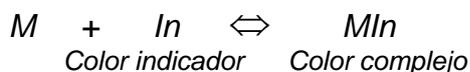
$$K' = \frac{[ML_n]}{[M][L]^n} = \frac{K}{\alpha_M \alpha_L} \quad \log K' = \log K - \log \alpha_M - \log \alpha_L$$

K es la constante de estabilidad y K' es la constante condicional de estabilidad. Si no se forma la posible reacción parásita, $\alpha=1$ y, por tanto $\log \alpha=0$

3.3.4. Características de los indicadores metalocrómicos

Son sustancias orgánicas quelatantes (ligandos polidentados que pueden unirse al ion central por varias posiciones) con

propiedades ácido-base, capaces de experimentar cambios de color cuando se forman o destruyen complejos metal-indicador.



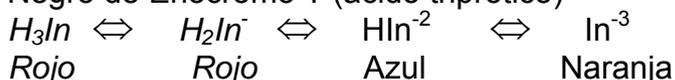
El indicador actúa como ligando y puede intervenir en reacciones parásitas ácido-base al aceptar H^+ .

El intervalo de transición del indicador viene definido por la ecuación según la cual el pM cambia bruscamente en el punto de equivalencia. La transición de color se aprecia si el cociente entre las concentraciones del indicador en su forma libre (In) y su forma complejada (MIn) es igual a 10 ó 1/10.

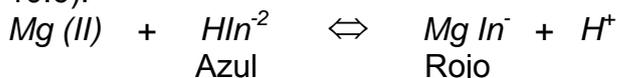
$$pM = \log K' \pm 1$$

Ejemplo:

Negro de Eriocromo T (ácido triprótico)



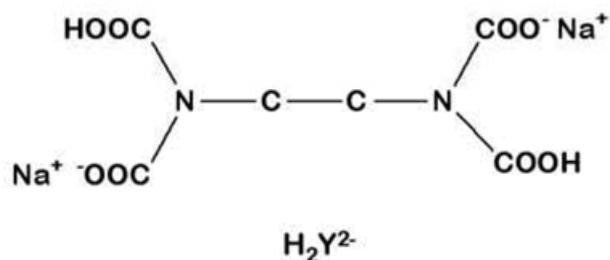
En presencia de un metal como Mg (II) (pH: 7.3 - 10.6):



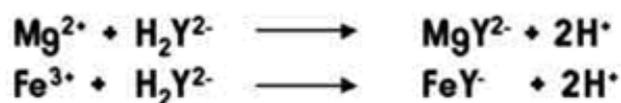
En este último caso, al añadir AEDT, este reacciona con Mg libre y, después desplaza al indicador del complejo rojo ($MgIn^-$) antes del punto de equivalencia. El cambio de color de rojo a azul del indicador en su forma libre (In^-) señala el punto final de la valoración.

3.3.5. Valoraciones con AEDT

Complejos quelatos solubles en agua con estequiometría (1:1) y constantes de formación (K) muy elevadas. Son muy estables y dan lugar a valores de pM elevado en la curva de valoración.



Las disoluciones de AEDT se preparan a partir de la sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético, que es un agente quelatante con seis átomos donadores.



El AEDT experimenta reacciones parásitas de protonación a pH ácidos. Se presenta como sal disódica que hay que estandarizar previamente a su uso. H_4Y es una especie que predomina en medio ácido, mientras que Y^{4-} predomina a $\text{pH} > 12$. Para minimizar estas reacciones laterales se trabaja a pH alcalino, por lo que el ligando complejante de iones metálicos es H_2Y^{2-} .

A) *Método directo*: Reacciones rápidas y se dispone de un método para detectar el punto final.

Ejemplo: dureza total de un agua (mg CaCO_3/L).

B) *Valoraciones por retroceso*: Complejos estables pero no se dispone de un indicador adecuado.

Añade un exceso de AEDT

El AEDT que no ha reaccionado se valora con Mg(II) y negro de eriocromo T (NET).

C) Valoraciones por desplazamiento:

Se añade un exceso de una disolución del complejo AEDT-Mg(II)

Se valora el Mg(II) liberado con AEDT

La reacción que tiene lugar es la siguiente:



Se valora con AEDT

Las reacciones parásitas que tienen lugar son: de protonación de Y^{4-} a pH ácido y formación de hidroxocomplejos del metal a pH alcalino.

D) Volumetrías indirectas: Determinación de aniones.

Ejemplo: determinación de sulfato.

La tabla 3.3. presenta ejemplos de volumetrías con AEDT.

Tabla 3.3. Aplicaciones de volumetrías de AEDT para la determinación de metales

Ión metálico	pH	Indicador	Condiciones
Ba ²⁺	9-12	Azul-metil-timol	Valoración directa en exceso NH ₃
Cu ²⁺	8	Murexida	Valoración directa, NH ₃ diluido
Hg ²⁺	9-10	Negro Erio T	Valoración retroceso con Zn ²⁺ /NH ₃
Ni ²⁺	8-9	Murexida	Valoración directa/tampón NH ₃
Zn ²⁺	9-10	Negro Erio T	Valoración directa/tampón NH ₃

3.4. Reacciones en medio heterogéneo

Se define la solubilidad como la concentración de un soluto en una disolución saturada de iones en equilibrio con su precipitado. Es un valor constante y característico a una temperatura dada. Depende de la naturaleza y concentración de otras sustancias presentes en la disolución. Se expresa en mol L⁻¹ ó g 100 mL⁻¹.

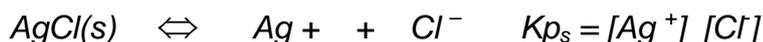
Disolución saturada: sustancia como fase pura en equilibrio con la disolución.

Disolución sobresaturada: contiene una sustancia disuelta a mayor concentración que la disolución saturada.

Disolución no saturada: tiene menor concentración que la disolución saturada.

3.4.1. Producto de solubilidad

La constante de equilibrio de la reacción de disolución de un sólido salino poco soluble con sus iones en disolución saturada, se conoce como producto de solubilidad (K_{ps}).



La solubilidad está relacionada con el producto de solubilidad a través de la ecuación:

$$S_{(\text{AgCl})} = \sqrt{K_{ps(\text{AgCl})}}$$

Para una reacción de precipitación general:



La solubilidad viene dada por la siguiente expresión:

$$S = \sqrt[n+m]{\frac{K_{ps}(M_m N_n)}{m^m \cdot n^n}}$$

3.4.2. Factores que afectan al equilibrio de una reacción de precipitación

1. El producto de solubilidad es constante para una temperatura dada.
2. Si la concentración de uno de los iones aumenta, la del otro debe disminuir proporcionalmente. Esto tiene como consecuencia un desplazamiento del equilibrio que produce una disminución de la solubilidad. Este efecto se conoce como efecto del ion común.
3. Generalmente, nunca se precipita una sustancia a partir de sus iones en agua pura, sino que existen otras sustancias (electrolitos) que están presentes, debido a las operaciones previas, ajustes de pH, etc. Y por lo tanto existe una fuerza iónica apreciable. El incremento de la fuerza iónica aumenta la solubilidad (efecto salino). Este aumento puede ser apreciable o compensado por el efecto de los iones comunes, es mayor cuanto mayor es la fuerza iónica y está afectado por la carga del ion.

En la figura 3.5. se muestra la influencia del efecto salino, a través de la fuerza iónica de las especies K_2SO_4 y KNO_3 , aumentando la solubilidad de $TlCl$. El efecto de K_2SO_4 es mayor por la doble carga de SO_4^{2-} . También se puede observar que a causa del efecto del ión común la concentración de Tl^+ decrece por adición de KCl (línea de puntos). Pero el efecto es débilmente contrarrestado por el incremento en la fuerza iónica (línea continua) confirmando que el efecto del ion común es más importante que el efecto salino.

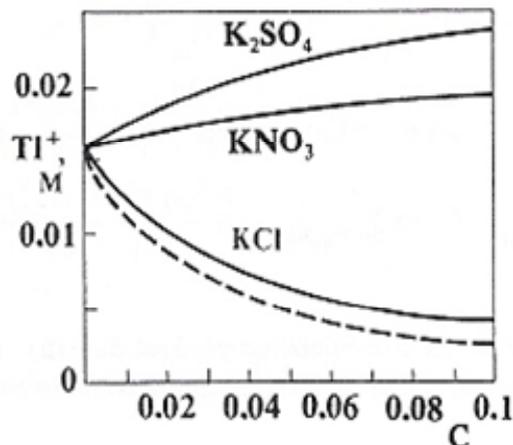


Fig. 3.5. Dependencia de la concentración de equilibrio de Tl^+ en equilibrio con el precipitado $TlCl$ en presencia de diferentes concentraciones de K_2SO_4 , KNO_3 y KCl .

Las reacciones parásitas pueden llegar a impedir la precipitación. El camino más conveniente para tomarlas en cuenta es utilizar los coeficientes (α) de las reacciones laterales y definir un producto de solubilidad condicional ($K'p_s$):

$$pK'p_s = pKp_s - m \log \alpha_M - n \log \alpha_N$$

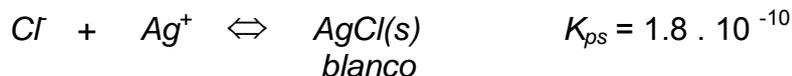
Si $pK'p_s < pKp_s$ significa que $K'p_s > Kp_s$ porque las reacciones parásitas cobran importancia. Como consecuencia aumenta la solubilidad de la especie formada en la reacción principal.

3.4.3. Sistemas indicadores del punto final

1) Formación de un precipitado coloreado: Método de Mohr

Se basa en precipitar el haluro correspondiente (Cl^- , Br^-) con nitrato de plata en presencia de cromato potásico como indicador. Es necesario controlar el pH de la disolución

añadiendo CO_3HNa o Na_2CO_3 (tener un pH 6-10). Si el pH es ácido, disminuye la concentración de cromato (CrO_4^{2-}) al formarse dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) más soluble. A pH alcalino se forma el precipitado de Ag_2O .



En el punto final el CrO_4^{2-} se combina con el exceso de plata originando un precipitado rojo. Mientras existan iones cloruro en exceso, sólo se formará AgCl . Al finalizar la precipitación de cloruro, comienza la precipitación de cromato de plata, es una precipitación fraccionada.

Como el ion cromato tiene un color amarillo bastante intenso, una concentración de cromato relativamente grande tiende a ocultar la aparición del precipitado de color rojo. Por ello, en la práctica es necesaria una concentración menor de cromato, utilizándose corrientemente concentraciones de 0.005 a 0.01M para que el precipitado rojo sea visible.

Para corregir este error en la valoración debe hacerse un ensayo en blanco con el indicador. Con ello se mide el consumo de Ag^+ para una suspensión de CaCO_3 exenta de Cl^- y de un volumen semejante al de la valoración y con la misma cantidad de indicador.

El volumen así determinado se debe restar del volumen de disolución valorada gastado en cada determinación. La valoración del ensayo en blanco sirve como color de referencia para sucesivas valoraciones.

2) Formación de un complejo coloreado: Método de Volhard

Se basa en la precipitación de tiocianato de plata (AgSCN) en medio nítrico, empleando Fe(III) como indicador para detectar el exceso de SCN^- .



Aplicaciones:

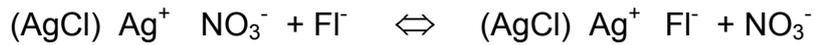
- a) Determinación directa de Ag(I) con disolución patrón de SCN^-
- b) Determinación por retroceso de Cl^- , Br^- , I^- en medio ácido

3) Método de Fajans. Indicadores de adsorción

Compuestos orgánicos cuyo mecanismo de acción se debe a la adsorción del indicador en la superficie del precipitado cuando se alcanza el punto de equivalencia.

Aplicaciones: Determinación de cloruros

Ejemplo: Valoración de NaCl con AgNO_3



En el punto de equivalencia el indicador (FI^-) adsorbido como contraión sobre el precipitado de AgCl (figura 3.6.).

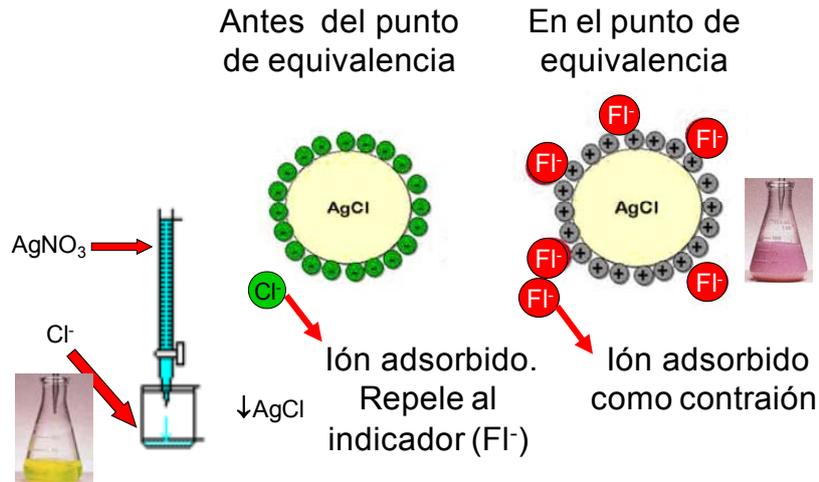


Fig. 3.6. Etapas en la valoración de cloruro con AgNO₃ utilizando el método de Fajans como indicador.

3.5. Aplicaciones de los métodos gravimétricos

Las gravimetrías por precipitación necesitan una balanza analítica.

Características de las reacciones:

- El componente a determinar precipite cuantitativamente (99,9 %)
- El precipitado obtenido es de baja solubilidad, puro y adecuado para los tratamientos posteriores
- El compuesto final utilizado en la pesada debe ser químicamente puro, estable y de composición estequiométrica exacta y conocida.

En el cálculo de los análisis gravimétricos es necesario hacer dos medidas experimentales:

- 1.- El peso de muestra tomada para hacer la determinación
- 2.- El peso final del producto de composición definida

Reacción:



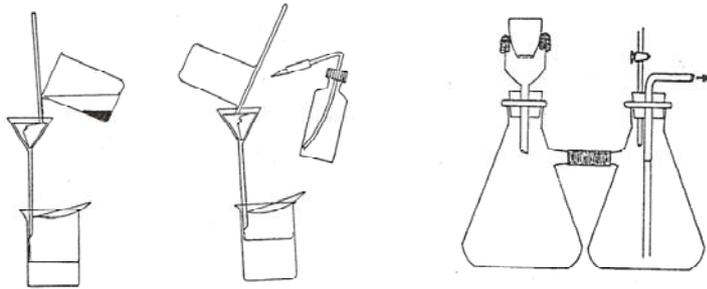
$$\% A = \frac{gA}{gmuestra} \cdot 100$$

$$gA = \frac{a Pm_A}{d Pm_D} W_D$$

Factor gravimétrico

El factor gravimétrico (gA) incluye los factores estequiométricos de la reacción (a, d), los pesos moleculares de las especies iniciales y finales (Pm_A, Pm_D) y el peso de producto final (W_D).

En la figura 3.7. se muestran algunos procesos frecuentes en la obtención de un precipitado en análisis gravimétrico.



Filtración de un precipitado por decantación

Filtración de un precipitado por succión

Fig. 3.7. Procesos de filtración de un precipitado.

3.6. Volumetrías de oxidación-reducción

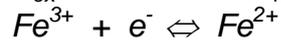
Un proceso de oxidación-reducción corresponde a la transferencia de electrones de un reactivo (agente reductor) a otro (agente oxidante).



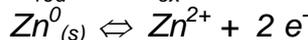
Definir los conceptos de:

Agente Oxidante: especie que gana electrones (se reduce) a través de una reacción de reducción.

Agente Reductor: especie que pierde electrones (se oxida) a través de una reacción de oxidación



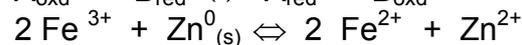
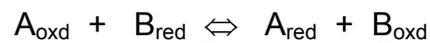
Se reduce (gana electrones)



Se oxida (pierde electrones)

Reacción redox: Reacción en la que una o más especies cambian su nº de oxidación. Oxidación y reducción tienen lugar de forma simultánea en la misma reacción. Las formas oxidadas y reducidas de una sustancia constituyen un sistema conjugado llamado sistema redox o par redox, que está regido por un potencial de electrodo (E), expresado en forma de la ecuación de Nerst

Reacción neta:



Cálculo del potencial: Ecuación de Nerst

$$E = E^o - \frac{0,059}{n} \log \frac{[Red]}{[Oxid]}$$

Donde E^o es el potencial normal del electrodo. Cuando el proceso redox está en equilibrio $E_1 = E_2$

3.6.1. *Sistemas indicadores químicos*

En el punto de equivalencia se produce un marcado cambio en el potencial del sistema.

a) Autoindicadores

El reactivo valorante ($KMnO_4$) actúa como indicador (forma oxidada de color rosa/violeta).

Inconveniente: Hay que añadir un exceso de reactivo.

Solución: Realizar un ensayo en blanco.

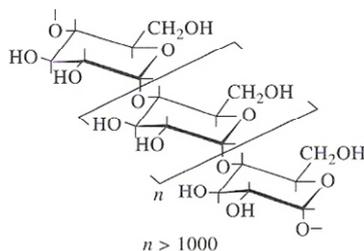
b) Indicadores específicos

Reaccionan con uno de los participantes en la reacción.

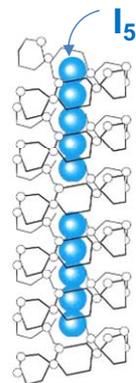
Ejemplo: Almidón, forma un complejo azul oscuro con el I_5^- que indica el punto final de las reacciones en las que se consume o genera yodo.

La función activa del almidón es la β -Amilosa que forma hélices. El yodo, en forma de (I_5^-) entra en el centro del las cadenas largas de hélices de β -Amilosa.

Almidón + Yodo \rightleftharpoons Complejo azul



β -Amilosa



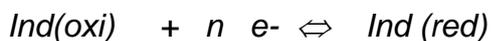
Hélice de β -Amilosa

La disolución de almidón se prepara disolviendo el almidón en agua destilada y hervida a la que se añade un conservante, para que no se degrade. En la volumetría, el almidón se añade en las proximidades del punto final para evitar la adsorción irreversible de yodo.

c) Indicadores redox

Especies susceptibles de sufrir reacciones redox con el agente valorante. Sus formas oxidada y reducida cambian de color reversiblemente al variar el potencial redox de la disolución a la que se añaden.

Son sistemas redox cuya forma oxidada tiene un color distinto de la forma reducida.



$$E_{Ind} = E_{Ind}^o - \frac{0,059}{n} \log \frac{[Ind_{red}]}{[Ind_{oxd}]}$$

$$E_{Ind} = E_{Ind}^o \pm \frac{0,059}{n}$$

En la tabla 3.4. se muestran varios ejemplos de sistemas indicadores utilizados en volumetrías redox.

Tabla 3.4. Indicadores utilizados en volumetrías redox.

Indicador Redox	COLOR		E ⁰ (V)	n
	Forma Reducida	Forma Oxidada		
DIFENILAMINA	INCOLORO	VIOLETA	0.76	2
FERROÍNA	ROJO	AZUL	1.06	1
AZUL DE METILENO	INCOLORO	AZUL	0.36	2
ÁCIDO DIFENILAMINO SULFÓNICO	INCOLORO	VIOLETA	0.84	2

3.6.2. Uso de los reactivos oxidantes y reductores

Objetivo: Conseguir que el analito a determinar se encuentre en un único estado de oxidación, mediante un oxidante o un reductor auxiliar. Ej: Cuando se disuelve una aleación de hierro en medio ácido se obtiene Fe²⁺ y Fe³⁺, por eso es necesario añadir un oxidante o reductor para que todo el hierro esté en una sola forma oxidada (Fe²⁺ ó Fe³⁺).

Requisitos: La reacción debe ser cuantitativa para que el agente prerreductor o preoxidante sea eficaz. El exceso de reactivo debe ser fácilmente eliminable.

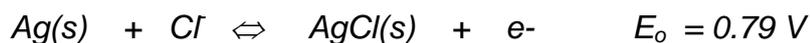
Oxidantes

Bismutato sódico, NaBiO₃

Persulfato amónico, (NH₄)₂S₂O₈

Reductor de Walden

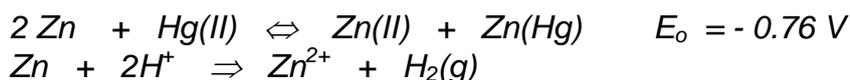
Ciertos metales pierden electrones fácilmente: Ag, Zn, Cd, Al, Pb, Ni, Cu, Hg



La presencia del ácido es esencial para evitar contaminar la muestra con Ag^+ (precipitándola). Es menos vigoroso que el reductor de Jones

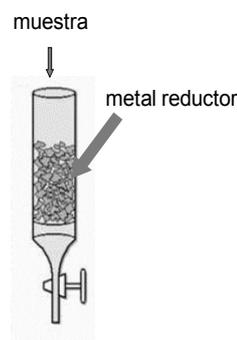
Reductor de Jones

La amalgama entre zinc y mercurio evita el desprendimiento de hidrógeno de la disolución ácida.



La reducción permite asegurar un sólo estado de oxidación de la muestra (más bajo).

La amalgama evita el desprendimiento de H_2 :



La disolución con la muestra que se quiere reducir pasa a través de columnas con empaquetamiento de gránulos del reductor metálico. Al abrir la llave, la disolución reducida se recoge en un matraz, para después valorar con un oxidante.

3.6.2.1. Determinación de reductores

Valoraciones con KMnO_4

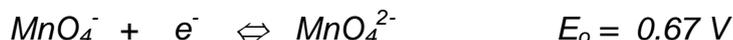
Es un oxidante fuerte en medio ácido, mediante una reacción irreversible



En medio débilmente ácido, neutro o poco alcalino, se reduce a Mn(IV)



En medio fuertemente alcalino, se reduce a manganato (verde)



No es patrón primario, se estandariza frente a $\text{Na}_2\text{C}_2\text{O}_4$. El punto final se establece por la coloración del primer exceso de ión permanganato (autoindicador).

Aplicaciones: Determinación de Fe(II), H_2O_2 , NO_2^- , HSO_3^- y H_3AsO_3

Valoraciones con I_2 . Métodos directos o yodimétricos

El par I_2/I^- puede utilizarse tanto en oxidimetrías (reacciones de oxidación) como en reductimetrías (reacciones de reducción).

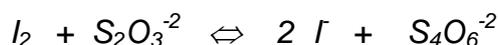
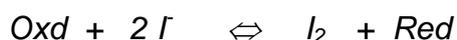


siendo el potencial $\text{I}_2 + 2 \text{e}^- \Leftrightarrow 2 \text{I}^- \quad E_o = 0.54 \text{ V}$

El I_2 es poco soluble en agua, pero sí lo es el complejo I_3^- . Por eso el I_2 se prepara en presencia de I^- para aumentar su solubilidad.

3.6.2.2. Determinación de oxidantes. Valoración indirecta con KI. Métodos yodométricos.

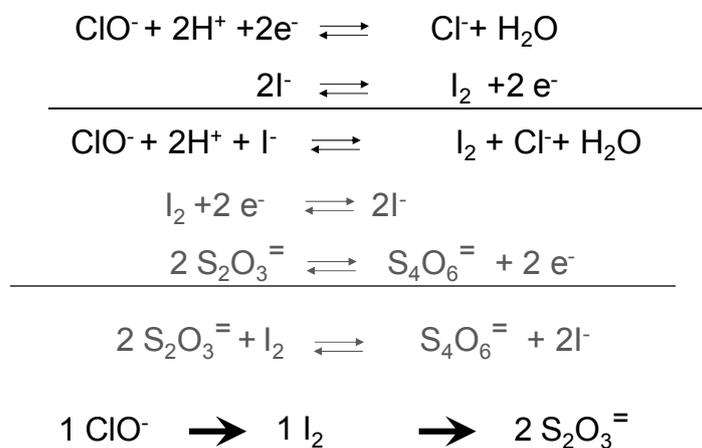
Se aplica a las valoraciones de oxidantes, añadiendo exceso de I^- y valorando el I_2 generado con tiosulfato.



El $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ no es patrón primario, se estandariza frente a dicromato, yodato o bromato

Aplicaciones: Determinación de H_2O_2 , Cu(II) , Br_2 , Fe(III) , dicromato, bromato, hipoclorito.

Ejemplo: Determinación de hipoclorito de sodio en disolución blanqueadora



3.7. Fuentes bibliográficas

D. C. HARRIS. "Análisis Químico Cuantitativo" 3ªEd. Ed. Reverté S.A. Barcelona (2007).

D. HARVEY "Química Analítica Moderna" Mc Graw Hill. Madrid (2002).

<http://www.uwplatt.edu/chemep/chem/chemscape/labdocs/catofp/measura/concentr/titrate/fitraon.htm>

TEMA 4. INTRODUCCIÓN AL ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Objetivos

- ✓ Conocer la calibración de los métodos instrumentales para relacionar la medida analítica con la concentración de analito.
- ✓ Describir las fuentes más comunes de ruido y modos de disminuir sus efectos sobre la información analítica de interés (señal).
- ✓ Definir y caracterizar los analizadores de procesos.
- ✓ Conocer y justificar la clasificación de analizadores de procesos.

4.1. Trazabilidad e incertidumbre.

4.1.1. Concepto de trazabilidad.

La importancia de los estándares o patrones en las medidas de parámetros físicos, químicos, bioquímicos y biológicos es innegable. ¿Qué traje le saldría bien a un sastre si emplease una cinta métrica elástica para tomar las medidas al cliente?

La trazabilidad se relaciona directamente con la calidad de los procesos de medida y con la calidad de los resultados generados. Su significado se corresponde con la definición de trazabilidad en el “Vocabulario de Gestión y Garantía de Calidad” (ISO 8402, 1994) define la trazabilidad como: *“Aptitud de rastrear (conocer) la historia, aplicación o localización de una entidad (producto, proceso, servicio, organización) por medio de identificaciones registradas”*.

El término trazabilidad puede ser usado con tres enfoques principales:

Con respecto a un *producto*, la trazabilidad ofrece un seguimiento desde el origen de los materiales, historia de su producción, distribución, localización, etc.

Con respecto a la *calibración*, la trazabilidad se aplica a la relación de los equipos de medida con los estándares (patrones) nacionales e internacionales, con patrones

primarios, con propiedades físicas básicas o con materiales de referencia. Permite asegurar que los equipos estén en condiciones óptimas para su utilización.

Con respecto a la *adquisición de datos*, la trazabilidad relaciona los datos generados y con los cálculos.

En la figura 4.1. se muestra la cadena de trazabilidad en los métodos de análisis comparativos (técnicas instrumentales). Se puede destacar la trazabilidad de la pesada con el calibrado de la balanza, la trazabilidad de los patrones con su correspondiente certificado y la trazabilidad del instrumento que aplica la calibración directa de equipos (patrones y medidas con las mismas unidades) y la calibración metodológica o indirecta, mediante el calibrado analítico (patrones y medidas con distintas unidades).

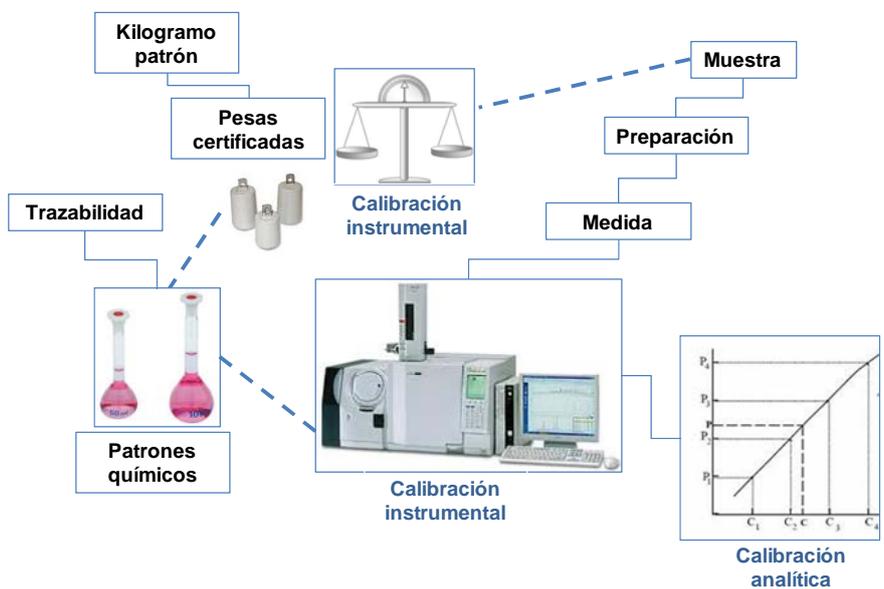


Fig.4.1. Cadena de trazabilidad en los métodos de análisis comparativos (técnicas instrumentales).

4.1.2. Características de la calibración

La calibración directa o instrumental y la indirecta o metodológica se comparan en la tabla 4.1.

Tabla 4.1. Comparación de la calibración instrumental y metodológica

	CALIBRACIÓN INSTRUMENTAL	CALIBRACIÓN METODOLÓGICA
Definición	Comprobación funcionamiento correcto instrumento	Caracterización respuesta instrumental en función de la propiedad(es) del analito
Objetivo	Aparato o instrumento. Corregir la respuesta instrumental	Método analítico. Establecimiento relación inequívoca entre medidas (señal) y características del analito
Estándar	No contiene analito	Contiene en analito (excepto en factorización en volumetrías)
Información	Analítica No Analítica	Analítica

Se consideran diferentes procedimientos de calibración:

a) Procedimientos absolutos

Relacionar la señal del instrumento con una magnitud física y coloca la marca o escala del aparato en la posición correcta respecto al resultado de la calibración.

Ejemplos de ajuste de equipos:

- Calibrar una balanza
- Calibrar una pipeta.
- Calibrar la escala de longitud de onda de un espectrofotómetro UV-VIS con la disolución de CrO_4K_2 .

b) Procedimientos estequiométricos.

Se llevan a cabo mediante reactivos valorados o normalizados, que se relacionan con las muestras en función de la estequiometría de la reacción química.

Ejemplos:

Cada una de las disoluciones normalizadas que se utilizan en volumetrías ácido-base, de precipitación, de formación de complejos, o redox.

c) Procedimientos comparativos.

Se establece una función de calibración aplicando el mismo procedimiento de medida a patrones y a muestras. La relación es una función matemática que permite establecer la relación entre señal y concentración.

Ejemplo:

Relación de regresión entre señal instrumental, y (área de pico) y la propiedad de interés, x (concentración) en cromatografía, mediante un modelo lineal polinómico de grado 1.

4.1.3. Concepto de incertidumbre

El intervalo dentro del cual se espera encontrar el valor real de aquello que se mide. Representa el nivel de duda en la estimación del resultado y engloba errores aleatorios y sistemáticos. Teniendo en cuenta los principios metrológicos:

1. Medir es comparar respecto a patrones.
2. No se puede comparar sin conocer las incertidumbres.

En la figura 4.2. se muestran las componentes aleatorias y sistemáticas de la incertidumbre. Una medida puede verse afectada por un error. El error sistemático debe tratarse de eliminar, mientras que el error aleatorio puede minimizarse pero no se eliminará totalmente. Algunos errores se propagan y afectan al resultado final.

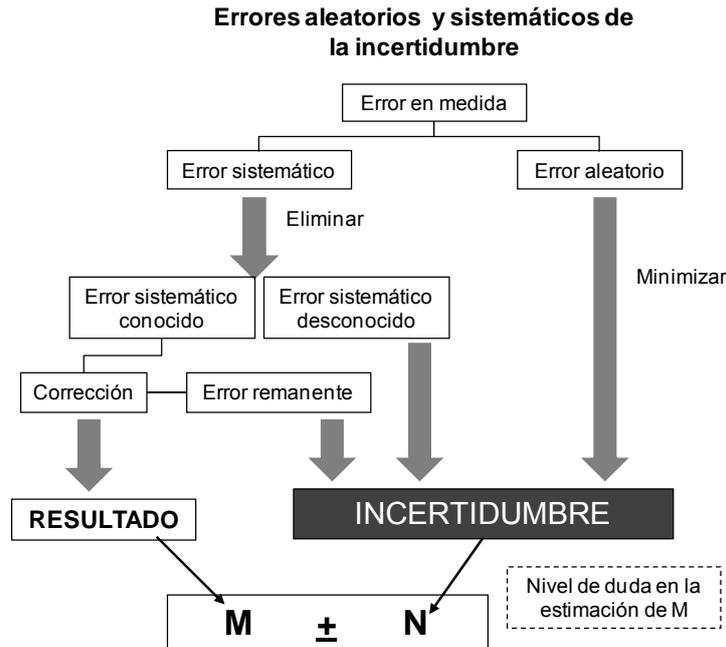


Fig. 4.2. Propagación de errores desde la medida hasta el resultado final.

4.1.4. Tipos de estándares y su trazabilidad.

a) Estándares básicos

Se consideran las siete unidades básicas del Sistema Internacional de Unidades: tiempo (s), longitud (m), corriente eléctrica (amperio), temperatura dinámica (grado Kelvin), intensidad luminosa (candela), masa (kilogramo) y cantidad de sustancia (mol). De ellos se derivan otras unidades: volumen (m³), frecuencia (Hz), presión (Pa).

b) Estándares químicos

Vínculo entre los básicos y los químico-analíticos.

Isótopo 12 del carbono (base del cálculo de los pesos atómicos), Número de Avogadro (el número de moléculas o átomos contenidos en 1 mol de sustancia, $N = 6.023 \cdot 10^{23}$), Pesos atómicos, y los operacionales: Faraday (cantidad de

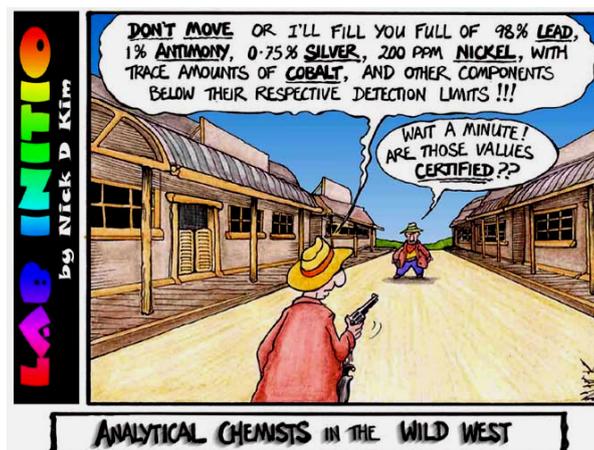
electricidad necesaria para transformar electroquímicamente 1 equivalente de una sustancia redox) y plata ultrapura (99.999%).

c) Estándares químico-analíticos

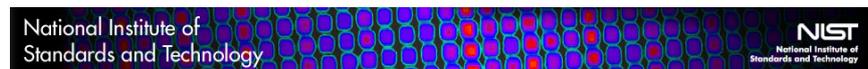
Derivados de los estándares básicos. Son los que realmente se suelen utilizar en la práctica en los procesos de medida. Podemos hablar de dos tipos fundamentales:

1c) Estándares analíticos primarios

Sustancias estables y homogéneas con propiedades bien establecidas, que permiten relacionarse directamente con los estándares químicos (pesos atómicos) a través de su trazabilidad, teniendo en cuenta la incertidumbre específica de cómo se ha conseguido el valor de la magnitud que los caracteriza. (Pureza (%) 99.5 ± 0.2) Ejemplo: Materiales de Referencia Certificados (MRC). Se trata de materiales de referencia que tienen certificados uno o varios valores, con sus incertidumbres específicas, de una o más propiedades y obtenidos por procedimientos especiales (ejercicios interlaboratorio) bajo la responsabilidad de un organismo competente e independiente.



Direcciones de diferentes organismos productores de MCR o SRM (standard referente material):



<http://www.nist.gov/ts/msd/srm/index.cfm>



<http://www.iaea.org/programmes/aqcs/>



http://irmm.jrc.ec.europa.eu/reference_materials_catalogue/catalogue/Pages/index.aspx

http://www.irmm.jrc.be/html/reference_materials_catalogue/catalogue/attachements/ERM-CE464_report.pdf

2c). Estándares analíticos secundarios

Sustancias con propiedades no adecuadas para ser utilizadas directamente como estándares analíticos, pero que se utilizan cuando el estándar primario no existe, o es inasequible o caro. En este caso, se debe establecer el vínculo de trazabilidad con un patrón primario a través de la experimentación (Volumetría. Disoluciones valorantes).

4.2. Calibración de patrón externo.

Consta de las siguientes etapas:

- 1.- Selección del modelo: Polinomio lineal

$$y = a + bx$$

- 2.- Establecimiento del plan experimental
- 3.- Realización de las medidas
- 4.- Cálculo de las estimaciones de los parámetros del modelo matemático

a, ordenada en el origen

b, pendiente

5.- Validación del modelo. Coeficiente de correlación y determinación. Análisis de la varianza (ANOVA)

6.- Etapa de predicción. Cálculo del intervalo de confianza de la media.

$$\bar{X} \pm t_{n-1} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \text{ Error estándar}$$

Para validar el modelo estadísticamente se utiliza ANOVA que plantea dos test:

Test de linealidad: para demostrar la significación estadística de la regresión (modelo planteado) frente al residual (errores).

Test de fallo de ajuste: para demostrar que el ajuste del modelo a los datos experimentales es mejor que los errores aleatorios presentes.

En ambos casos se postulan la hipótesis nula y la alternativa y un test F de Fisher de comparación de varianzas.

El planteamiento de este tipo de calibración pasa por la preparación de patrones de concentraciones perfectamente conocidas, que proporcionan señales analíticas proporcionales que responden a una función de calibración lineal ajustada por mínimos cuadrados a un polinomio lineal de primer grado. Esta función de regresión señal-concentración servirá para predecir los valores de concentración de muestras desconocidas utilizando el intervalo de confianza de la media (ver esquema de la figura 4.3.)

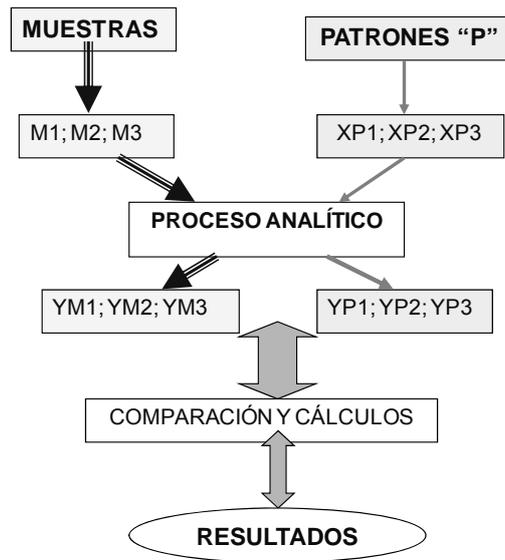


Fig. 4.3. Esquema de elaboración de calibración con patrón externo.

4.3. Calibración de adición estándar

Se aplica cuando existe un efecto matriz (influencia en la magnitud de la señal analítica de alguna sustancia presente en las disoluciones de las muestras) que no es posible corregir. Casos de muestras difícilmente reproducibles en preparaciones de patrones (alimentos, sedimentos, lodos...). Se mide la señal analítica de la disolución de la muestra y de disoluciones que, además de la muestra, contienen cantidades conocidas y crecientes de analito (patrón o estándar). Se representa gráficamente (figura 4.4.) las señales analíticas de la muestra y de las muestras con adición respecto al incremento de concentración. Por extrapolación se obtiene la concentración de analito en la muestra no adicionada (igualar a cero la ecuación de calibración).

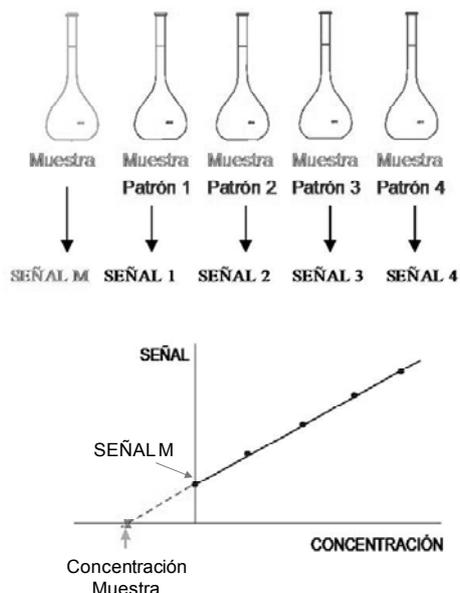


Fig. 4.4. Esquema de elaboración de la calibración de adición estándar.

Al comparar la pendiente del calibrado de adición estándar con el calibrado de patrón externo se puede evaluar la existencia o no de efecto matriz. Si las rectas son paralelas no existirá efecto matriz. Cuando el cociente entre la diferencia en valor absoluto de las pendientes, y la pendiente del calibrado de patrón externo es mayor de 10%, se considera que existe efecto matriz y el método de adición estándar es la única calibración válida para el estudio en cuestión.

4.4. Calibración con patrón interno

Se aplica cuando, entre medidas sucesivas, es difícil mantener alguno de los parámetros operacionales o para métodos analíticos que no garantizan alta reproducibilidad en el procedimiento experimental.

Se añaden a las muestras y a los patrones cantidades conocidas de una sustancia, el patrón interno (PI), que cumple los siguientes requisitos:

- No estar presente en las muestras.
- Presentar características, concentración y comportamiento análogo al del analito.
- No reaccionar con los componentes de la muestra ni interferir en el análisis.

Se representa el cociente entre la señal de patrón y la del PI frente a la concentración (ver figura 4.5.)

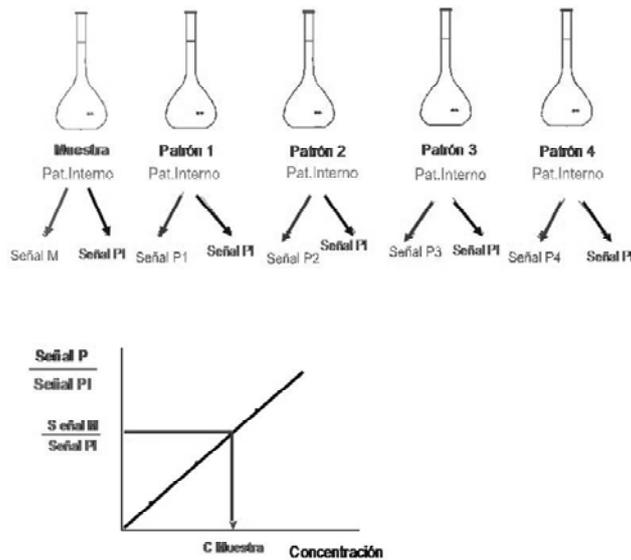


Fig. 4.5. Esquema de elaboración de la calibración con patrón interno.

4.5. Señales y ruido

El ruido degrada la exactitud y la precisión de un análisis instrumental y aumenta los valores del límite de detección. Un parámetro de calidad más útil que el ruido es la relación Señal/Ruido.

$$S/R = \frac{Y_s - Y_0}{S}$$

Las condiciones más favorables para efectuar una medida se tendrán a relaciones de señal/Ruido (S/R) altas ($S/R \geq 3$). Se establece una relación $S/R=3$ para calcular el límite de detección.

Se establece una relación $S/R=10$ para calcular el límite de cuantificación.

Las principales fuentes de ruido en análisis instrumental se dividen en:

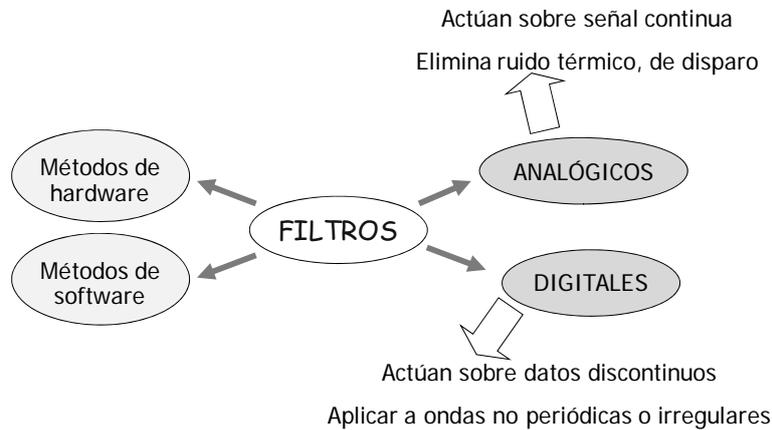
Ruido químico: producido por variables incontroladas relacionadas con el sistema (Vibraciones, luz, variaciones de humedad, variaciones de temperatura y presión) que afectan a materiales fotosensibles, al equilibrio químico de reacciones, a sólidos pulverulentos, etc.

Ruido instrumental: asociado a los distintos componentes del instrumento. Tipos:

- Ruido térmico o de Johnson. Se produce por agitación térmica de los electrones, en procesos con o sin corriente y al azar. Da lugar a una variación en el voltaje que es el causante del ruido. Para reducirlo se debe disminuir la temperatura, el ancho de banda de frecuencia o la resistencia.
- Ruido de disparo. Se produce por movimiento de electrones a través de una unión, si existe corriente y una discontinuidad en el circuito. Da lugar a una variación en la intensidad que es el causante del ruido. Este tipo de ruido, disminuye si ancho de banda de frecuencia también disminuye.
- Ruido de parpadeo. Asociado a los amplificadores de corriente. Se denomina $1/f$ y produce derivas en la señal. Se puede reducir trabajando con frecuencias de señal > 100 Hz.

- Ruido ambiental o de interferencia. Aparece como consecuencia del entorno en el que está ubicado el instrumento.

Para reducir el ruido asociado a la señal analítica se utilizan diferentes sistemas de filtrado que mejoran la relación señal/ruido (figura 4.6.).



4.6. Filtros de señales, analógicos y digitales.

Las técnicas de filtrado digitales se basan en algoritmos matemáticos que tratan los datos obtenidos (cromatograma, espectro) y suavizan el ruido. Se pierde cierta resolución pero se mejora la relación S/R:

- Promediado conjunto de señales.
- Promediado por grupos (Box-Car)
- Promediado por grupos de ventana móvil.
- Transformada de Fourier (figura 4.7.). Una señal en el dominio del tiempo se convierte en una señal en el dominio de la frecuencia. Tras la aplicación de un filtro digital que elimina componentes de ruido, se aplica la transformación matemática inversa para obtener el espectro inicial filtrado.

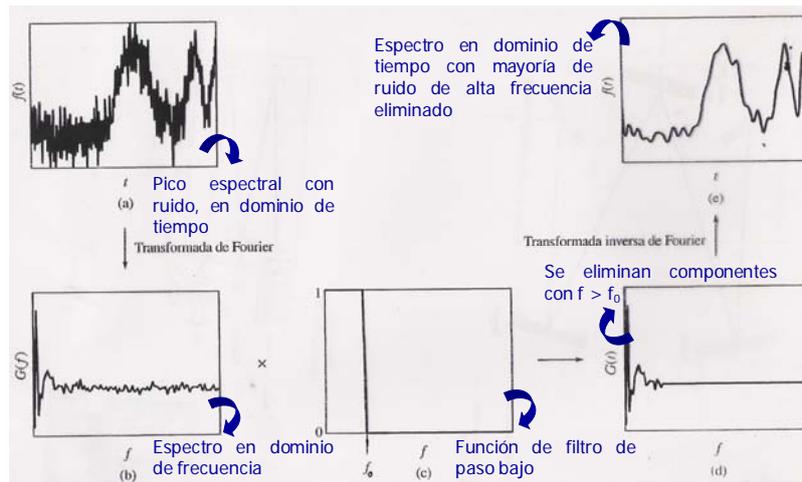


Fig. 4.7. Etapas del funcionamiento del algoritmo de filtrado basado en la transformada de Fourier.

4.6. Analizadores de procesos industriales.

4.6.1. Definición y características de los analizadores de procesos.

Los analizadores de procesos son dispositivos automáticos adaptados a su medio y concebidos para la medida continua o periódica de uno o más parámetros físicos o químicos a lo largo de una línea de un proceso industrial.

Instrumentos destinados a facilitar información relacionada con las características físicas o la composición química de un fluido. Incrementan el rendimiento de los procesos, su control de calidad y la reducción de la contaminación ambiental.

La principal razón de la rapidez con que se ha extendido el uso de estos instrumentos en los últimos años estriba en su papel a favor del incremento del rendimiento de los procesos, su control de calidad y la disminución de la contaminación ambiental.

En muchos procesos industriales es necesario controlar o medir los cambios en la composición química de ciertos

productos que indiquen el grado de eficacia del proceso (impurezas del producto analizado).

Requerimientos y características de los analizadores de procesos:

- Simplicidad y robustez.
- Selectividad.
- Exactitud y precisión.
- Velocidad de respuesta (control de línea de proceso).
- Rango de aplicación.
- Autocalibración y mantenimiento sin interrupción.
- Fácil manejo (no requiere personal especializado).
- Automatización (repetibilidad y estabilidad).
- Coste razonable y rendimiento alto.

Estos analizadores surgen de la adaptación de la instrumentación habitual de laboratorio (tabla 4.2.)

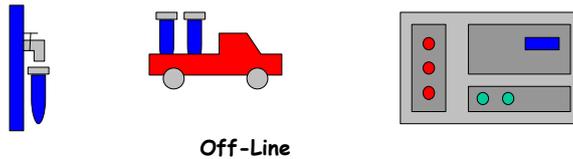
Tabla 4.2. Comparación de las características de los instrumentos de laboratorio y los analizadores de procesos industriales.

INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	ANALIZADORES DE PROCESOS
Flexibles (especies y condiciones)	Análisis específicos y condiciones establecidas
Complejos y delicados	Simple y robustos
Trabajan 8 h/día y 5 días/semana	Trabajan 24 h/día y 7 días/semana
Personal especializado	Personal no especializado
Calibrar antes de análisis	No calibración frecuente (autocalibración)
Procesado manual de muestras	En línea con sistema de toma y tratamiento de muestra
Habitaciones limpias y termostatazadas	Analista distante y condiciones extremas (humedad, temperatura, corrosión)
Responsabilidad de fabricante es la garantía de funcionamiento	Responsabilidad de fabricante es mayor

4.6.2. Clasificación de los analizadores de procesos.

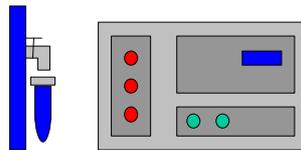
1. Clasificación según la localización en la línea del proceso.

a) *Control fuera de línea (off-line)*: las muestras son extraídas de la línea del proceso. Toma y transporte manual de muestras antes de realizar las medidas en sistemas instrumentales de respuesta rápida (GC-MS) que se encuentran en un área separada y son manipulados por personal especializado (se reduce la rapidez de obtener información).



Off-Line

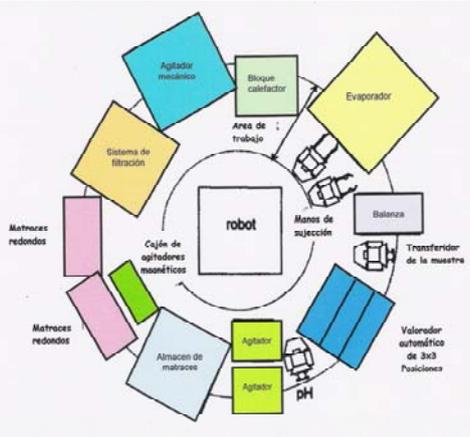
b) *Control at-line o a pie de línea*: las muestras se extraen del sistema y se transportan de forma discontinua hasta el analizador. Similar al anterior, pero el instrumento adecuado está instalado en una zona próxima al punto de toma y manipulación de la muestra (aumenta la rapidez de proceso).



At-line

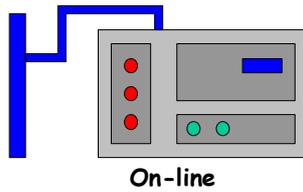
Sistema de control de emulsiones de aceites industriales.

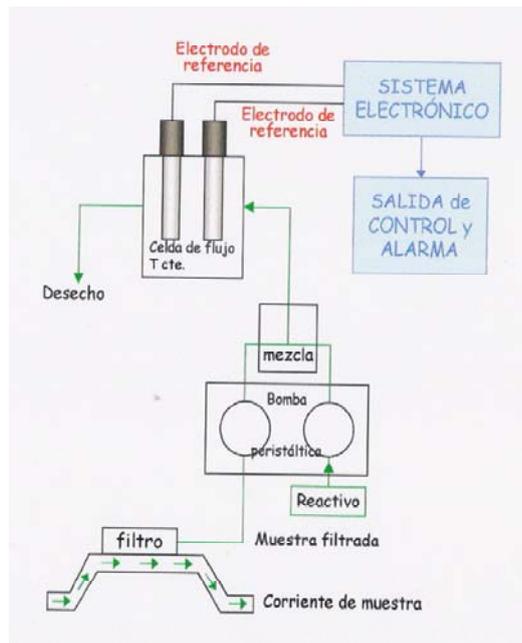
Tareas: Homogeneización, medidas de conductividad y pH, Pesada de muestras, Rotaevaporación, Calentamiento a reflujo, Adición de reactivos, Valoraciones, etc.
Determinaciones: Conductividad, pH, porcentaje de aceite y sílice, índice de saponificación.



Analizadores robotizados "at-line"

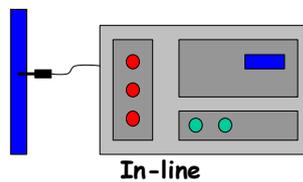
c) *Control sobre línea (on-line)*: Son analizadores localizados en continuo cerca de la línea de proceso (automuestreador). Se emplea un sistema de by-pass automático para extraer la muestra, tratarla y realizar las medidas instrumentales. Proceso en continuo o de forma intermitente (discontinuo) ej.: FIA, SIA.

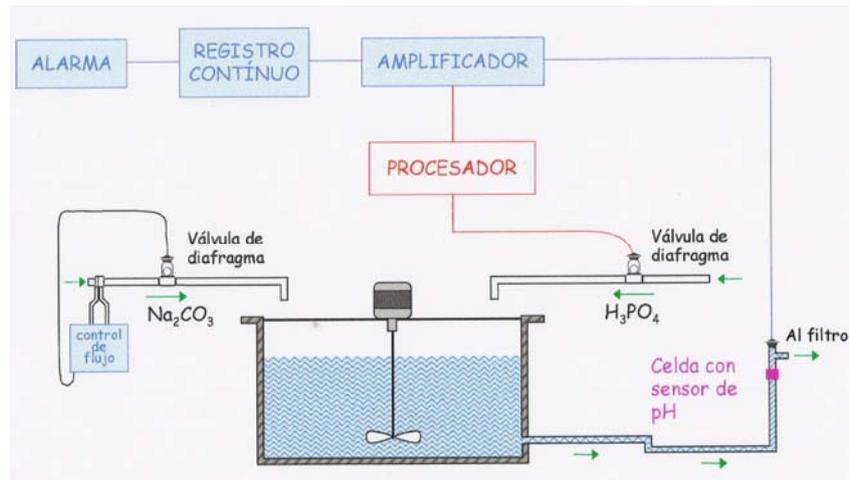




Analizador potenciométrico "on-line"

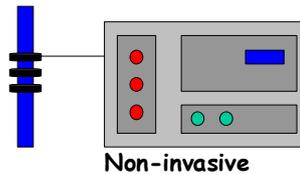
d) *Control en línea (in-line)*: Análisis in situ mediante una sonda sensible a la propiedad a medir. Se abre la posibilidad de fabricar sensores múltiples que permitan la determinación simultánea de varios analitos. Con sensores insertados directamente en la línea del proceso (medidor de pH).





Producción de Na_2HPO_4 : Sensor de pH "in-line"

e) *Control no invasivo (non-invasive)*: La alternativa más deseable ya que el sensor no entra en contacto físico con la muestra. Directamente relacionado con técnicas de control remoto y técnicas de análisis no destructivas. No requieren la separación del analito de la línea ni sensores dentro del sistema (ultrasonidos de baja frecuencia).



2. Clasificación de los analizadores según el objetivo.

Como se ilustra en la figura 4.8. se pueden realizar dos tipos de funciones:

a) Analizadores para la protección o seguridad.

Medida de contaminantes en efluentes industriales o en atmósfera de trabajo

b) Controladores de la línea del proceso.

Aquellos que determinan la calidad del producto final. Controlan una o más especies representativas de la eficiencia del proceso.

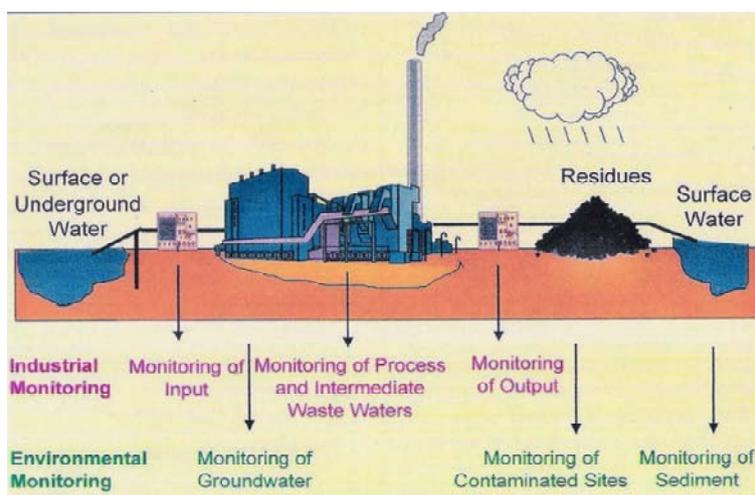


Fig. 4.8. Controles para la protección o seguridad del medioambiente y realizados en la línea de un proceso industrial.

3. Clasificación según la interpretación de resultados.

- Analizadores de control de procesos indirecto (sin intervención humana).
- Analizadores de control de procesos directo (técnico toma las decisiones).

4. Clasificación según el parámetro a determinar.

- Analizadores físicos:
Conductivímetros,
Viscosímetros,
Refractómetros,

Medida de Presión y Temperatura.

- Analizadores químicos:

Miden directamente la concentración de una o más especies en el fluido. Pueden ser:

Específicos para una especie dada (pH, potenciómetros)

Que permitan controlar varios compuestos simultáneamente (cromatógrafo de gases).

Que permitan controlar varios compuestos sucesivamente (fotómetros).

4.6.3. Componentes de un analizador y sistemas de transporte.

Los componentes fundamentales (figura 4.9.) de un analizador de procesos son:

- 1) Un sistema de muestreo.
- 2) El propio analizador (instrumento).
- 3) El sistema de recogida de datos.
- 4) La protección del analizador.

Ciertas precauciones han de ser consideradas en los sistemas de transporte. Así, deberán evitarse condensaciones, evaporaciones, adsorciones o degradaciones. Son deseable flujos rápidos y líneas cortas, diámetros anchos y materiales inertes.

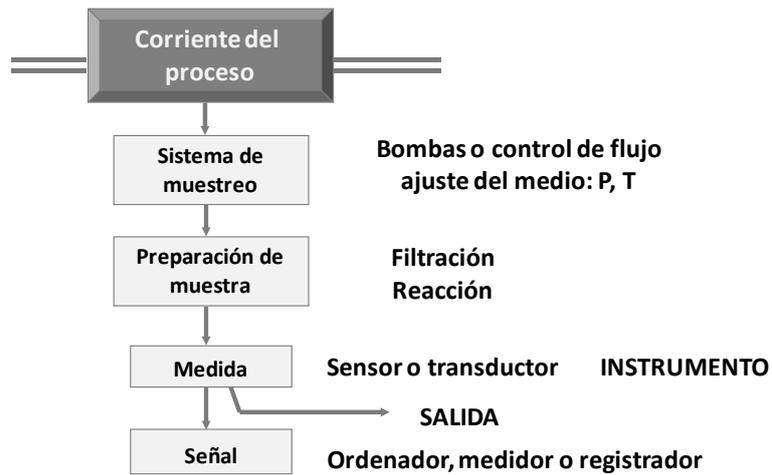


Fig. 4.9. Esquema de un analizador continuo.

Los sistemas de transporte se pueden clasificar en tres tipos, como se muestran en la figura 4.10.

Con línea simple

Cuando el volumen de línea es pequeño respecto al volumen de muestra que requiere el analizador.

Con línea de bypass

Permite un caudal de muestra elevado. Para muestras que se vaporizan y no hay dispositivos de retorno al conducto. La muestra se drena o ventea.

Bypass con línea rápida de retorno

Cuando el analizador está lejos del punto de extracción. Velocidad de circulación alta por diferencia de presión en línea. La muestra no utilizada retorna al conducto.

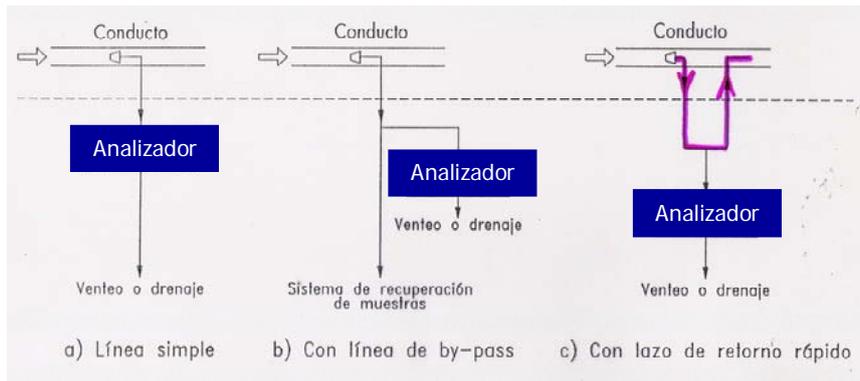


Fig. 4.10. Sistemas de transporte de muestra en un analizador de proceso.

4.7. Analizador continuo de flujo no segmentado

4.7.1. Fundamento del análisis por inyección en flujo (FIA)

El fundamento de FIA es el fenómeno de dispersión: Dilución que sufre un volumen de muestra inyectada en el flujo en un sistema determinado.

Se caracteriza por el perfil de concentraciones que en un momento dado adquiere el “trozo” o “bolo” intercalado en un lugar determinado sin interrumpir el flujo (figura 4.11.).

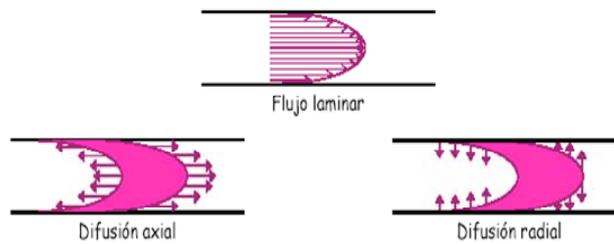


Fig. 4.11. El perfil de la muestra insertada se modifica, debido al flujo laminar y a causa de la difusión. El transporte por difusión se deberá a los gradientes de concentración: Difusión axial y difusión radial.

La dispersión se evalúa mediante el coeficiente de dispersión.

$$D = \frac{C_0}{C}$$

donde se definen C_0 = Concentración del analito en la muestra inyectada directamente; C = Concentración en el detector después de todo el proceso de transporte

Al análisis por inyección en flujo contribuyen: Factores físicos y factores químicos (cuando tiene lugar una reacción química entre algunos componentes del flujo y la muestra).

El flujo no está segmentado por burbujas de aire. En el momento de la detección no se alcanza ni el equilibrio físico, ni el equilibrio químico, siendo su instrumentación más simple y sencilla que el de los sistemas clásicos. En la figura 4.12. se muestra un esquema con los componentes de FIA y el registro de la señal en forma de diagrama.

Se define:

Tiempo de arranque, t_a , tiempo transcurrido desde la inyección hasta que comienza la señal desde la línea base.

Tiempo de referencia, T , tiempo transcurrido desde la inyección hasta que alcanza el máximo de la señal.

Tiempo de retorno, T_r , tiempo transcurrido desde el máximo de la señal hasta que vuelve a la línea base.

Tiempo durante el cual aparece la señal, Δt , corresponde con el ancho de banda y define la dispersión o dilución del analito.

Altura de pico, H , relacionada con la concentración.

Componentes del sistema FIA

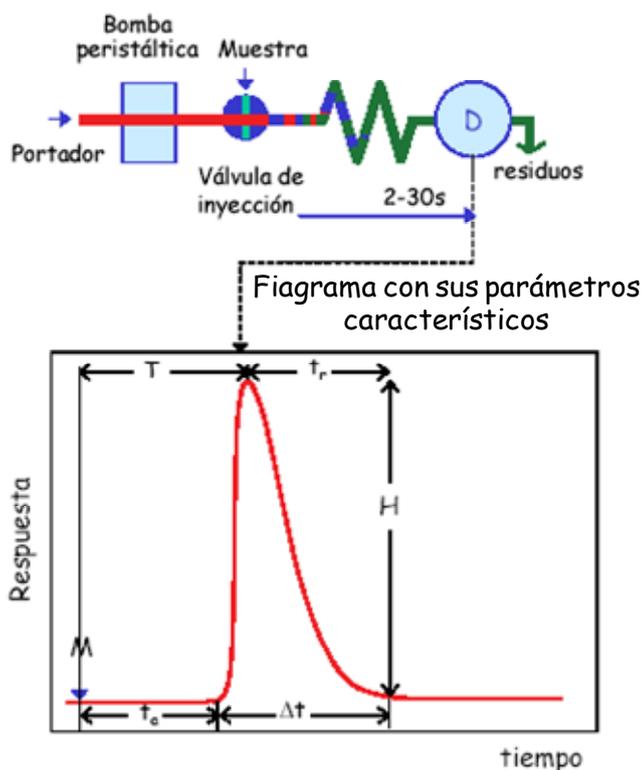


Fig. 4.121. Características generales del análisis por inyección en flujo.

4.7.2. Factores que afectan a la dispersión

Factores físicos:

Volumen de muestra: disminuye el factor de dispersión (D), al aumentar el volumen. También aumenta el tiempo de residencia (T) y el ancho de banda (Δt), mientras que el tiempo de arranque (t_a) no se afecta.

Caudal: al aumentar el caudal, disminuye la D , disminuye t_a y disminuye el ancho de pico.

Longitud del tubo: al aumentar la longitud de la línea, aumenta la D , aumenta la t_a y aumenta Δt .

También influye forma del serpentín, relleno,... En la figura 4.13. se esquematiza la influencia de los factores físicos.

Factores químicos:

Será imprescindible conocer la contribución de la cinética a la dispersión, sabiendo que las medidas de FIA se realizan en condiciones de no equilibrio.

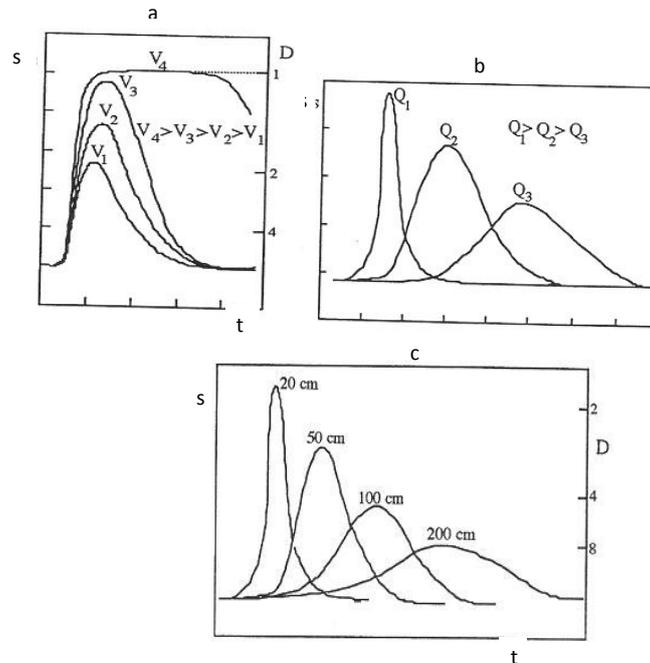


Fig. 4.13. Influencia del volumen de muestra (a), del caudal (b) y de la longitud del tubo (c) sobre el factor de dispersión.

4.7.3. Instrumentación en FIA

Los componentes básicos del sistema FIA se muestran en la figura 4.14.

Sistema de propulsión, caudal constante (bomba peristáltica o con presión gaseosa)

Sistema de inyección, para insertar un volumen exacto y perfectamente reproducible en la corriente continua de flujo (inyector automático)

Reactor ó tubo de reacción, y que es donde tiene lugar el transporte con o sin proceso adicional. Puede ser un tubo recto, en forma de serpentín, o bien tener una cámara de mezcla, un tubo relleno de material inerte o activo químicamente.

Célula de flujo, incorporada a un instrumento de medida que traduce la señal continua a un registrador y/o un microprocesador.

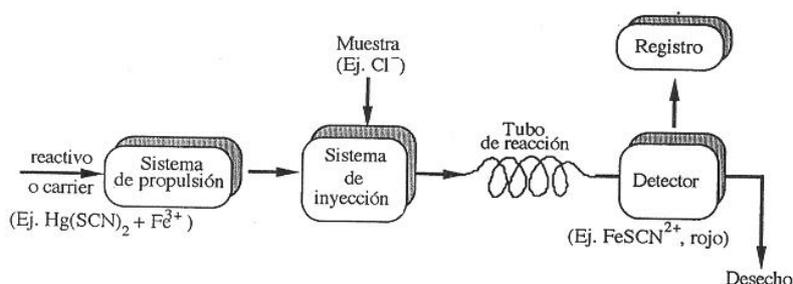


Fig. 4.14. Componentes del sistema FIA para el análisis fotométrico de Fe en forma de complejo FeSCN^{2+} (colorimetría).

Los sistemas de detección deben cumplir unos requisitos básicos para su acoplamiento a FIA:

Pequeño volumen.

Bajo nivel de ruido.

Señal independiente del caudal.

Respuesta rápida y lineal en un amplio margen de concentración.

Alta sensibilidad.

1. Detectores electroquímicos
 - Detección potenciométrica
 - Detección amperométrica
2. Detectores ópticos
 - Detectores espectrofotométricos

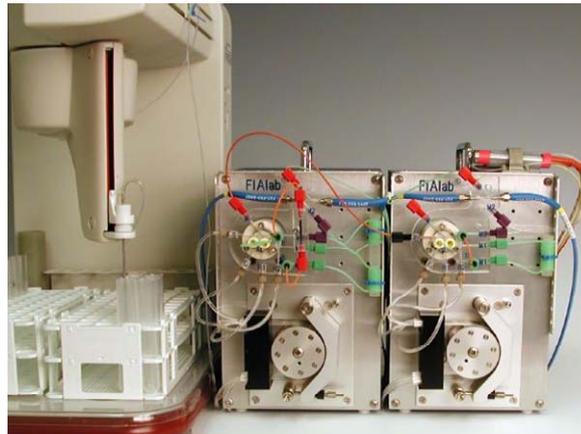
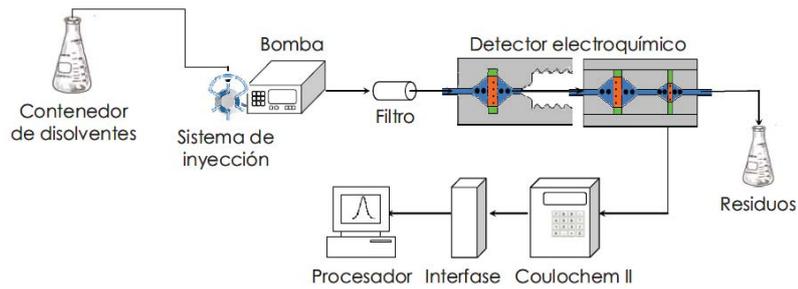
Detección fluorimétrica

3. Técnicas atómicas

Las técnicas atómicas se utilizan principalmente para la detección de elementos metálicos. La característica de estas es que no necesitan célula de flujo, pues el portador se aspira continuamente hasta el nebulizador.

4.7.4. Aplicaciones de FIA

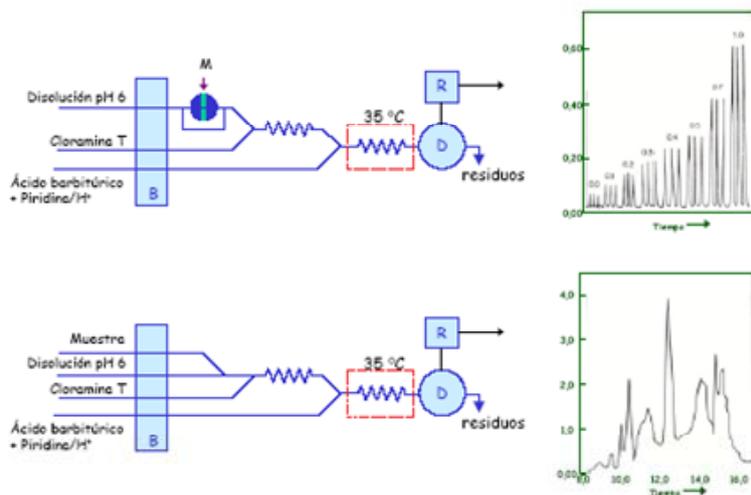
- Control de procesos
- Contaminación medioambiental
- Química clínica.



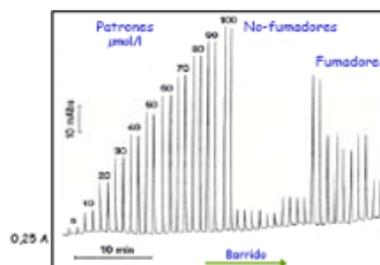
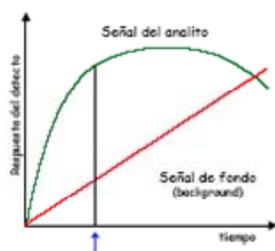
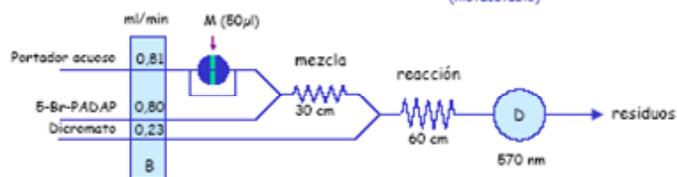
Sistema comercial FIA de doble canal configurado para determinar NITRATO (izquierda) y AMONIO.

DETERMINACIÓN de CIANUROS

A. Ríos, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, *Talanta*, 31, 673 (1984)



FIA con CONVERSIÓN



4.8. Bibliografía

MILLER, J.C. MILLER, J.N. **“Estadística y Quimiometría para Química Analítica”**. 2ª Ed. Prentice Hall. Madrid (2002)

KOCH, K.H. **“Process Analytical Chemistry”**, Springer, Berlin. (1999)

M. VALCÁRCEL, M. D. LUQUE DE CASTRO **“Flow Injection Analysis. Principles and Applications”**. Ellis Horwood. Chischester (1987)

TEMA 5. INTRODUCCIÓN A LOS MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

Objetivos

- ✓ Razonar adecuadamente los fenómenos físico-químicos asociados a las distintas técnicas instrumentales.
- ✓ Manejar esquemas para clarificar fundamentos.
- ✓ Manejar con soltura y precisión la terminología correspondiente a los fenómenos, elementos y componentes implicados en el análisis instrumental.
- ✓ Introducir los principios básicos, componentes, función y requerimientos de los principales métodos espectroscópicos (UV-Vis e IR).

5.1. Teoría de la radiación electromagnética.

La propiedad en que se basan los métodos espectroscópicos es la radiación electromagnética. Es una forma de energía cuyas características se explican teniendo en cuenta su naturaleza ondulatoria y corpuscular (modelo dual de comportamiento). Como se muestra en la figura 5.1. el campo eléctrico y magnético están en fase, con oscilaciones sinusoidales perpendiculares, uno respecto al otro y respecto a la dirección de propagación de la radiación. La naturaleza ondulatoria se utiliza para explicar la difracción de la radiación, mientras que la corpuscular (fotón) explica la absorción y emisión.

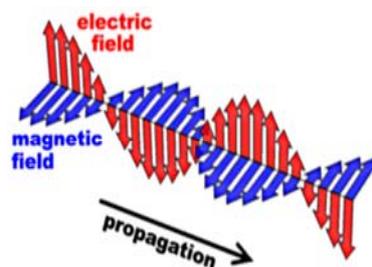


Fig. 5.1. Representación de un haz de radiación monocromática polarizada en el plano.

La figura 5.2. muestra algunos conceptos que caracterizan la radiación eléctrica.

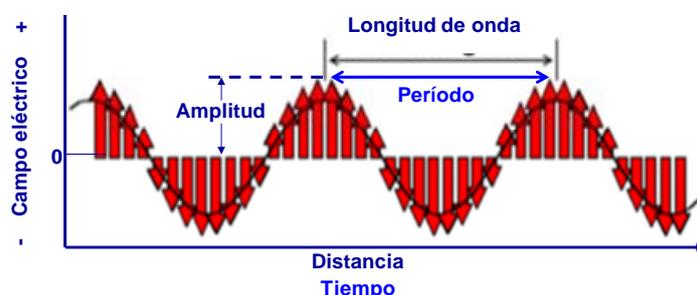


Fig. 5.2. Representación bidimensional del componente eléctrico de la radiación.

Se define:

Amplitud: longitud del vector eléctrico en el máximo de la onda.

Período: tiempo necesario para el paso de sucesivos máximos o mínimos por un punto fijo en el espacio.

La interacción entre la muestra y la radiación electromagnética se comprende admitiendo que la segunda está formada por un haz de partículas energéticas llamada *fotones*. Como se observa en la siguiente expresión, la

energía de la radiación depende de su frecuencia (ν), longitud de onda (λ) y número de onda ($\bar{\nu}$).

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda} = hc\bar{\nu}$$

donde $h = 6.62 \times 10^{-34}$ Julios (Constante de Planck).

5.1.1 Espectro electromagnético.

La frecuencia y la longitud de onda de la radiación electromagnética pueden variar dentro de muchos órdenes de magnitud. Por comodidad, la radiación se divide en distintas regiones según el tipo de transición atómica o molecular que produce la absorción o la emisión de fotones. El intervalo es tan grande que se utiliza una escala logarítmica, aunque existen solapamientos (figura 5.3. y 5.4.).

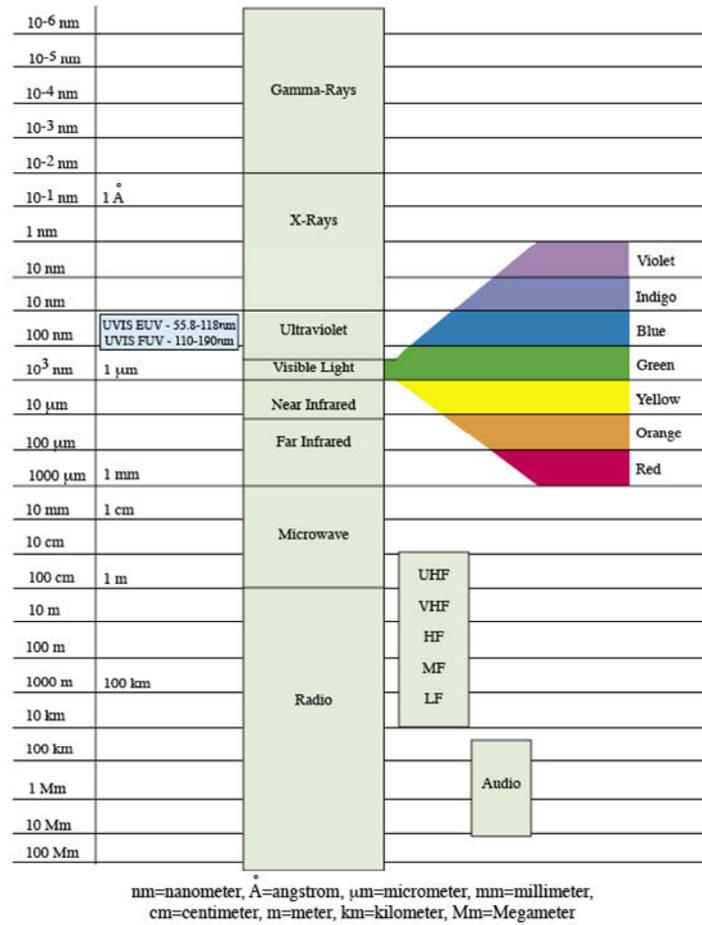


Fig. 5.3. Espectro electromagnético de longitudes.

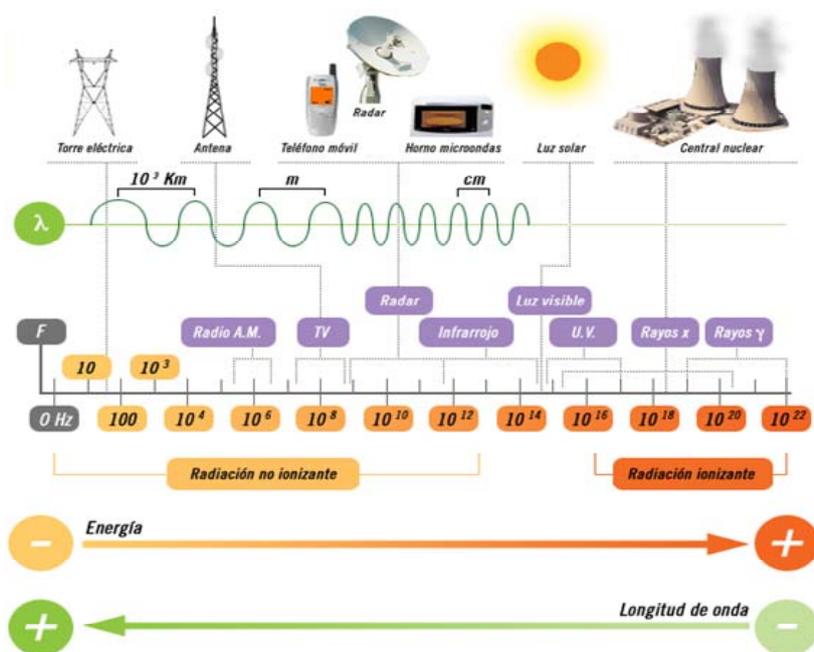


Fig. 5.4. Espectro electromagnético de frecuencias.

5.1.2. Transformación de la energía.

Según el principio de conservación de la energía: La suma de todas las formas de energía que entran en la muestra debe ser igual a la suma de todas las formas de energía que salen de la muestra, más la energía que queda en el material (figura 5.5.). Como la radiación se puede transformar en calor, la longitud de onda de la radiación (luz) que se emite puede ser mayor (menor energía) que la que excita el átomo o la materia, debido al calentamiento del átomo y sus alrededores.

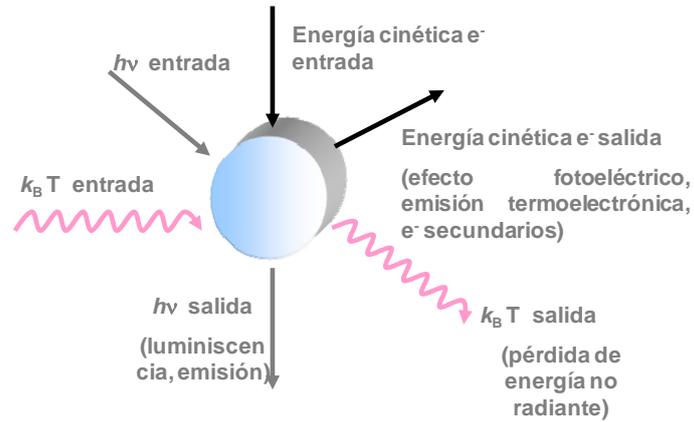


Fig. 5.5. Interacciones de la radiación con una partícula de materia.

5.1.3. Pureza espectral.

Para las medidas de señales electromagnéticas es deseable trabajar con longitudes de onda simples o radiación monocromática. Sin embargo, en la realidad existe una anchura de banda o línea espectral muy fina para toda radiación monocromática.

La medida cuantitativa utilizada es la anchura de banda a media altura entre la línea de base y el pico denominada anchura total a media altura o a la mitad del máximo, centrada en un valor de longitud de onda nominal dada. El perfil tiene forma de banda Lorentziana como se observa en la figura 5.6.

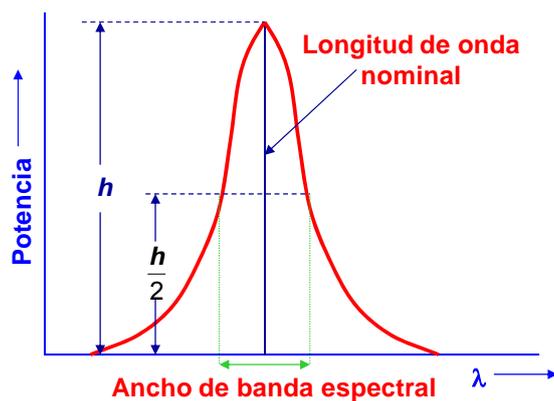
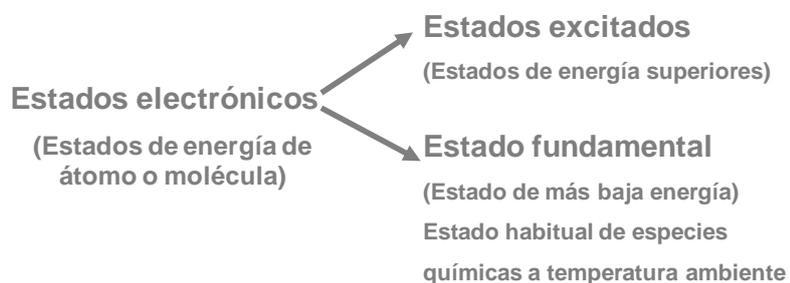


Fig. 5.6. Diagrama de la pureza espectral requerida para las medidas de radiación.

5.2. Absorción y emisión de radiación.

Los átomos, iones o moléculas existen en estados discretos de energía. Cuando una especie cambia su estado, absorbe o emite una cantidad de energía exactamente igual a la diferencia de energía entre los estados. La energía de cualquier estado es debida al movimiento de electrones alrededor del núcleo cargado positivamente (estados electrónicos).



Las transiciones por absorción o emisión se producen como muestra el diagrama de la figura 5.6.

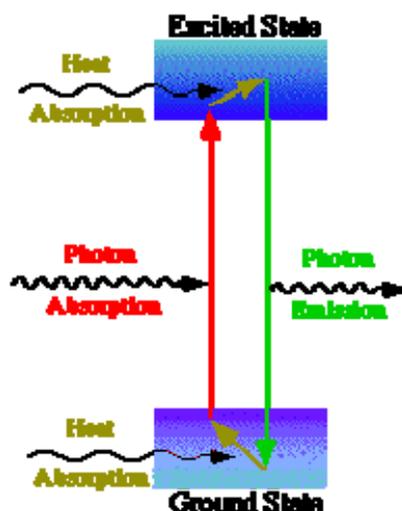


Fig. 5.6. Absorción y emisión de radiación entre niveles electrónicos.

5.2.1. Absorción de la radiación.

En el caso de átomos, los espectros son simples debido al pequeño número de posibles estados de energía. La transición ocurre para los electrones más externos o enlazantes (UV-Vis) Es un proceso electrónico en el que algún electrones se promociona a un nivel de energía superior. Para partículas monoatómicas se produce la absorción de unas pocas λ del espectro, bien definidas, produciendo un espectro de absorción.

La naturaleza del espectro de absorción depende de la complejidad, estado físico y entorno de la especie absorbente. Así, la figura 5.7. presenta diferentes espectros, correspondientes a especies más complejas o en diferente estado físico. Espectro de vapor de sodio que presenta dos líneas de absorción agudas en la región amarilla de espectro visible (a). Espectros moleculares, de bandas, en las regiones UV-Vis. Presentan líneas de absorción muy próximas entre sí que constituyen una banda (b). Sin instrumento de alta resolución los picos individuales no se

pueden detectar y la forma que presenta el espectro es de suaves picos anchos (c). Espectro continuo. Las líneas individuales tienden a ensancharse aún más en estado condensado y en presencia de moléculas de disolvente (d).

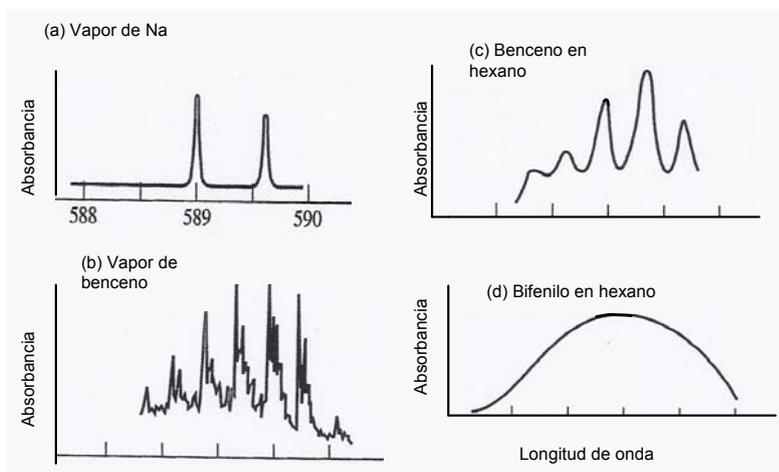


Fig. 5.7. Espectros de diferentes especies.

Los espectros de absorción molecular son más complejos debido a la existencia, no sólo de niveles electrónicos, sino también de niveles vibracionales (como consecuencia de vibraciones interatómicas) y niveles rotacionales (debido a la rotación alrededor de centro de gravedad) en las moléculas. Así el número de estados rotacionales > número de estados vibracionales > número de estados electrónicos.

La energía asociada a las bandas de una molécula está formada por tres componentes:

$$Energía = E \text{ electrónica} + E \text{ vibracional} + E \text{ rotacional}$$

La energía electrónica proviene de los estados energéticos de los diferentes electrones enlazantes.

La energía vibracional está asociada al elevado número de vibraciones interatómicas.

La energía rotacional es debida a los diferentes movimientos rotacionales dentro de molécula.

5.2.2. Emisión de la radiación.

La emisión de radiación se produce cuando las partículas excitadas, situadas en niveles superiores de energía, se relajan a niveles de menor energía cediendo fotones (figura 5.8.).

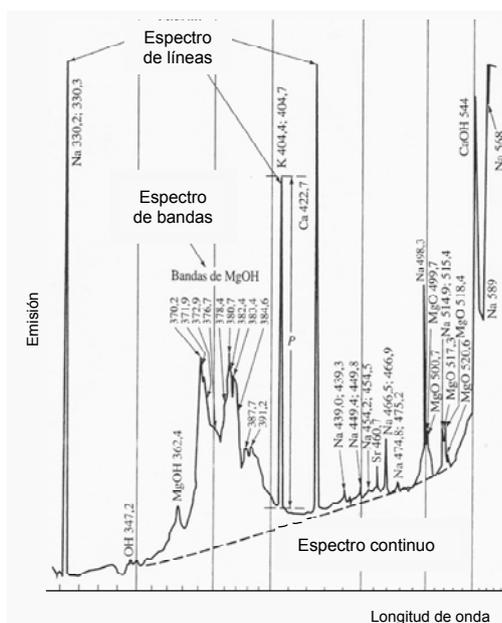


Fig. 5.8. Diferentes espectros de emisión.

Se observan: Los espectros de líneas son una serie de picos agudos originados por átomos individuales excitados. Los espectros de bandas están formados por grupos de líneas estrechamente espaciadas, producidas por radicales o moléculas pequeñas, que no se resuelven completamente. Por otro lado, el espectro continuo es consecuencia del aumento de ruido de fondo (por encima de 350 nm).

En la figura 5.9. se muestran, comparativamente, los espectros de emisión de varios gases excitados (a) y de absorción de hidrógeno (b).

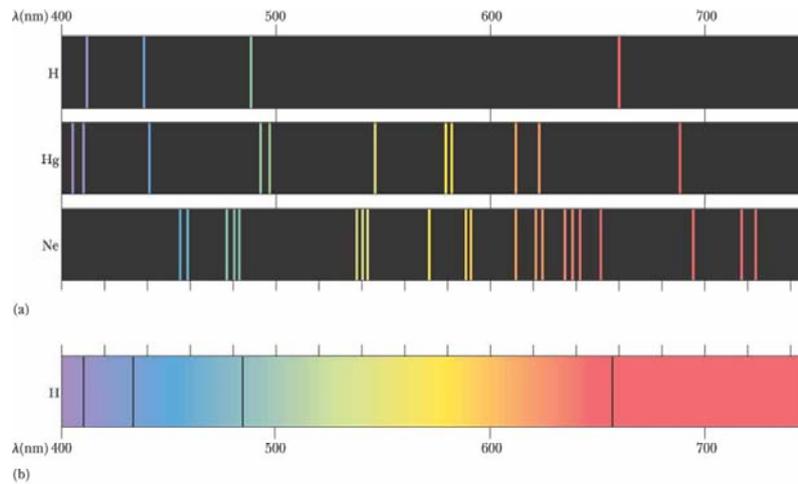


Fig. 5.9. Comparación de espectros de emisión (a) y absorción (b).

5.3. Procesos de relajación. Métodos luminiscentes.

El tiempo de vida media de un átomo o molécula excitados por absorción de radiación es breve y tienden a volver al estado fundamental mediante diversos procesos de relajación. Además, el Principio de exclusión de Pauli establece que en un átomo no puede haber 2 electrones que tengan iguales los cuatro números cuánticos (coordenadas establecidas por Schrödinger que describen el movimiento de los electrones alrededor del núcleo). Sólo puede haber 2 electrones en el mismo orbital y deben tener los espines opuestos. Así, en el estado singlete los dos electrones deben tener los espines (número cuántico que se refiere al giro del electrón sobre sí mismo) apareados, mientras que en el estado triplete el electrón tiene el espín paralelo. La figura 5.10. muestran los diferentes estados energéticos en

un átomo o en una molécula, entre los que tienen lugar las distintas transiciones electrónicas.

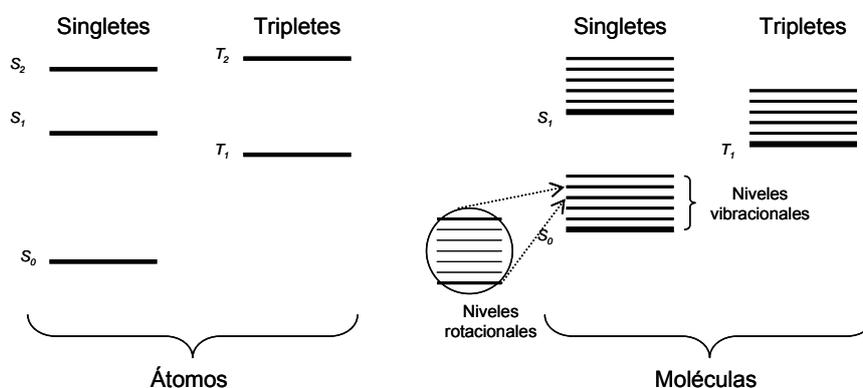


Fig. 5.10. Diagrama de niveles de energía para átomos y moléculas que tienen estados de singlete y de triplete.

Los procesos de relajación o desactivación electrónica pueden ser: de tipo *no radiante*, que permite a los átomos y moléculas regresar al estado fundamental desde estados excitados de energía sin emitir radiación; y de tipo *radiante*, como la fluorescencia (emisión de radiación rápida entre estados singlete-singlete) y la fosforescencia (emisión de radiación lenta y persistente entre estados triplete-singlete) La figura 5.11. representa gráficamente los niveles de energía asociados con unos pocos de los numerosos estados electrónicos y vibracionales de la molécula.

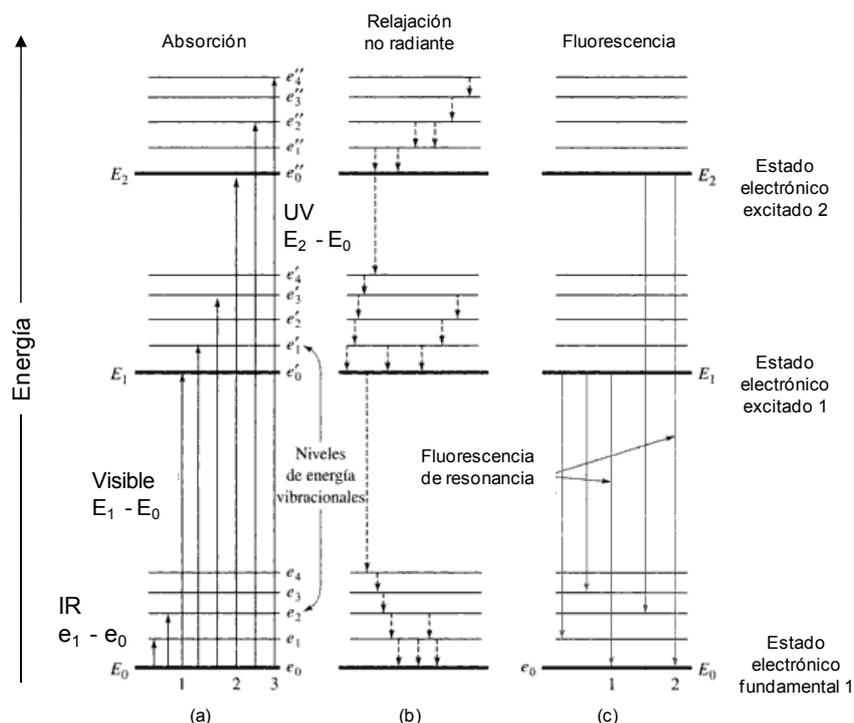


Fig. 5.11. Diagramas parciales de niveles de energía de una molécula orgánica fluorescente. Absorción (a), relajación no radiante (b) y fluorescencia (c).

Otros procesos de desactivación no radiante son (figura 5.12.):

Relajación vibracional: se pierde el exceso de energía vibracional (entre niveles vibracionales), como consecuencia de la colisión entre moléculas de la especie excitada y del disolvente, en disolución

Conversión interna: procesos intermoleculares por los que la molécula pasa a un estado electrónico de menor energía, cuando los niveles electrónicos están lo suficientemente próximos como para que se produzca un solapamiento de los niveles vibracionales.

Cruce entre sistemas: se invierte el espín de un electrón excitado y como resultado un cambio en la multiplicidad de la molécula. La probabilidad de esta transición aumenta si los niveles vibracionales de dos estados singlete y triplete se solapan.

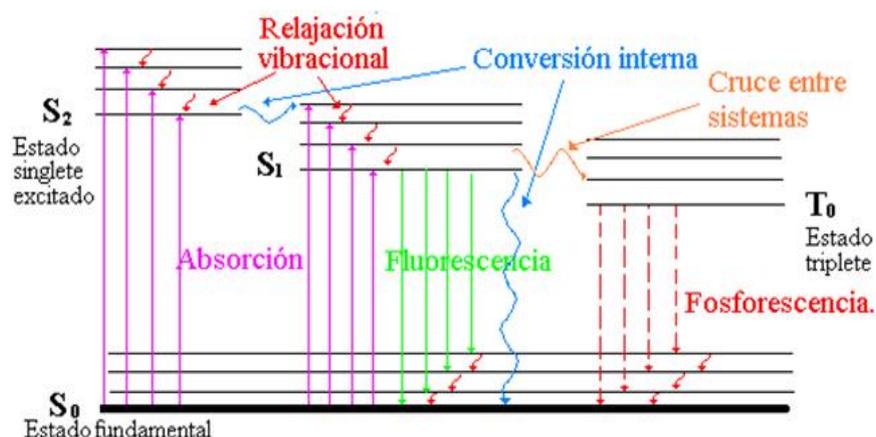


Fig. 5.12. Diagrama de energía parcial para un sistema fotoluminiscente.

Los métodos luminiscentes engloban la *fotoluminiscencia* (excitación mediante absorción de fotones) que incluye la fluorescencia y fosforescencia; y la *quimioluminiscencia* (excitación mediante una reacción química) que produce un espectro del producto de oxidación (ej. análisis de gases).

5.3.1. Fluorescencia no resonante.

Proceso radiante producido por moléculas fluorescente en disolución o en estado gaseoso. La energía de la radiación emitida por fluorescencia es menor que la energía de la radiación absorbida en una cantidad igual a la energía de radiación vibratoria. Esta variación de la energía se conoce con el nombre de desplazamiento de Stokes (figura 5.13.).

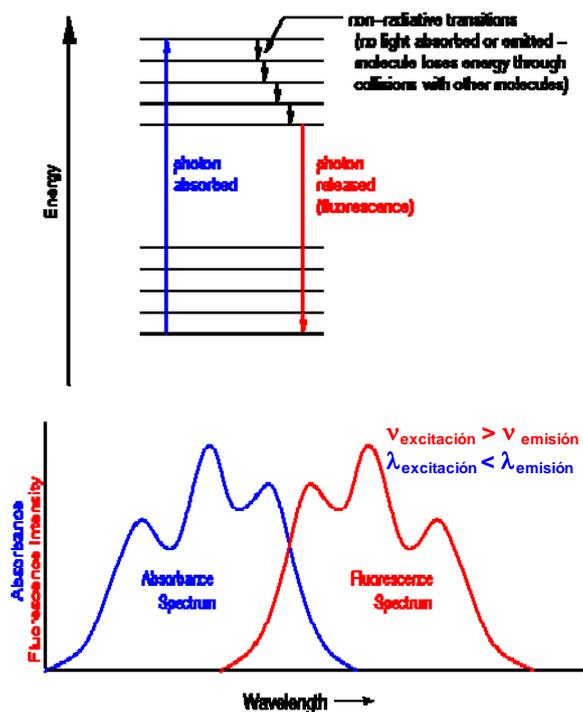


Fig. 5.13. Fluorescencia no resonante. Como consecuencia del desplazamiento de Stokes la longitud de onda de emisión de radiación fluorescente es mayor que la de la radiación de excitación.

5.4. Refracción de la radiación.

Desviación en la dirección del haz incidente en la interfase entre dos medios transparentes de distinta densidad, como consecuencia de una diferencia de velocidad de la radiación en los dos medios (figura 5.14.)

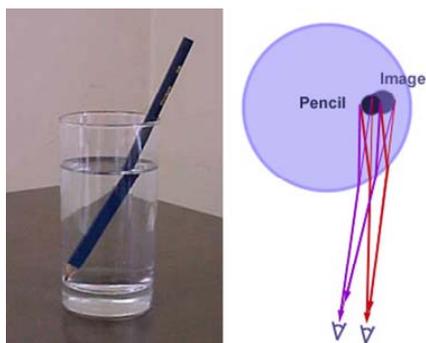


Fig. 5.14. Fenómeno de refracción.

La refracción responde a la Ley de Snell, ilustrada en la figura 5.15.

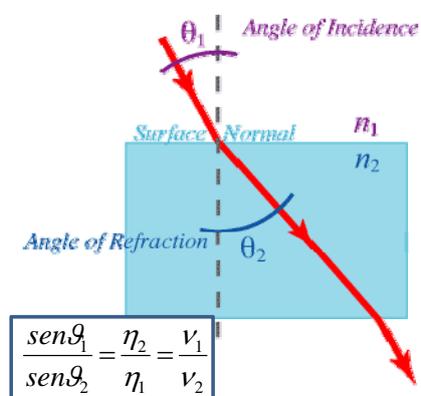


Fig. 5.15. Esquema de la ley de Snell que rige la refracción de la radiación.

El índice de refracción (n_i) indica la velocidad de la radiación en el medio en el que se desplaza.

5.5. Reflexión de la radiación.

Fenómeno según el cual se produce el retorno de la radiación procedente de una superficie. Tiene lugar siempre cuando la radiación atraviesa una interfase entre dos medios con diferente índice de refracción (figura 5.16.).

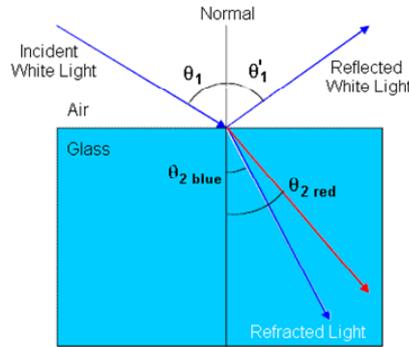


Fig. 5.16. Esquema que ilustra la reflexión de la radiación.

El fundamento del funcionamiento de la fibra óptica es la *reflexión total interna*, que se produce cuando la fracción de haz incidente que se refleja es mayor a medida que aumenta el ángulo de incidencia. Más allá de cierto ángulo crítico, la reflexión es completa.

5.6. Fuentes de radiación.

Deben de tener la suficiente potencia y un voltaje estable. Se utilizan fuentes de radiación continuas y de líneas.

1. Fuentes continuas de radiación visible: Filamento de tungsteno o wolframio (figura 5.17.). Emite un espectro continuo desde 350 a 2500 nm, en las regiones Visible e IR cercano (figura 5.18.). Necesita una fuente de voltaje estabilizada electrónicamente. Se calienta hasta incandescencia al paso de corriente, alcanzando una temperatura de filamento de 2870 K. Las características se mejoran con la fuente de wolframio/halógeno al añadir una pequeña cantidad de I₂ dentro de la cubierta de cuarzo.

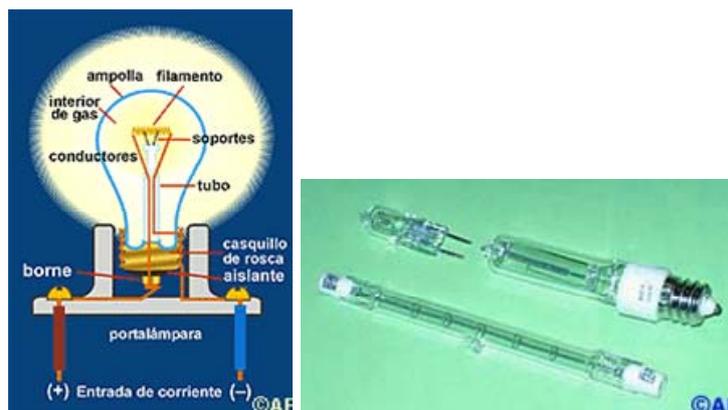


Fig. 5.17. Fuente de tungsteno o wolframio (izquierda) y de wolframio/halógeno (derecha).

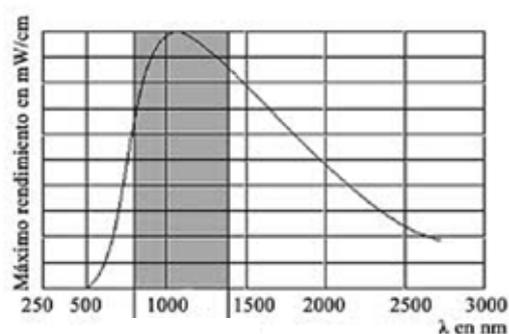


Fig. 5.18. Espectro de emisión de la fuente de tungsteno.

2. Fuentes continuas de radiación ultravioleta: Deuterio o hidrógeno (figura 5.19.) Funciona por una descarga eléctrica entre dos electrodos situados en el seno de gas D_2 . Se producen colisiones entre los electrones de descarga y las moléculas gaseosas. Emite un espectro de líneas a baja presión y un espectro continuo a alta presión, en el intervalo 160-390 nm (figura 5.20.).



Fig. 5.19. Fuente de deuterio o hidrógeno.

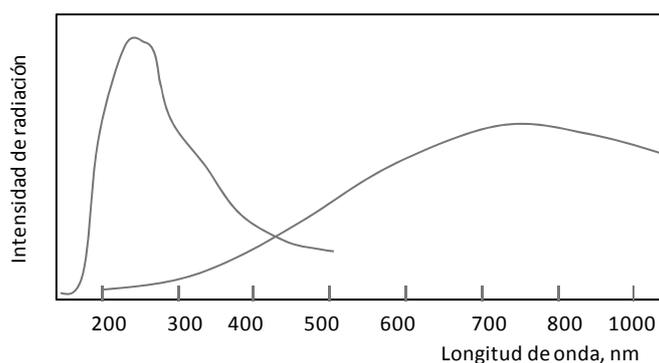


Fig. 5.20. Espectro de emisión de la fuente de deuterio (izquierda) superpuesto con el espectro de emisión de la fuente de wolframio (derecha). En UV-Visible se debe utilizar la fuente más potente.

3. Fuentes continuas de radiación infrarroja: Emisor de Nernst (figura 5.21.), formado por un cilindro refractario de 2 x 20 mm de óxidos de ZrO_2 y de Y_2O_3 . Emite radiación IR al calentarse, mediante una resistencia, a altas temperaturas (2200 K) por el paso de corriente eléctrica (figura 5.22.)

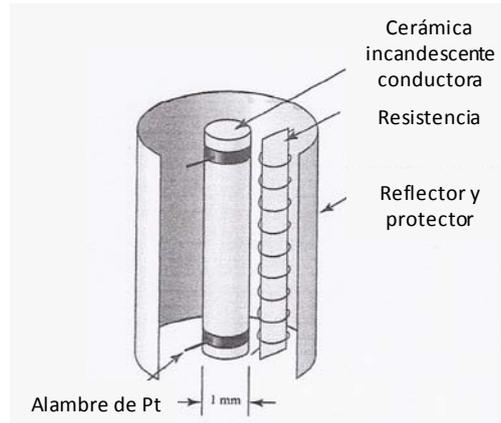


Fig. 5.21. Fuente emisor de Nernst.

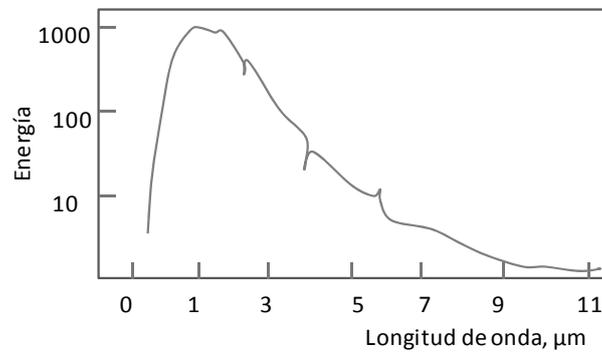


Fig. 5.22. Espectro de emisión del emisor de Nernst.

5.7. Láser.

Su nombre es el acrónimo de "light amplification by simulated emission of radiation". Es adecuada para las regiones del visible, UV e IR. Sus principales características son: poseer una intensidad elevada, producir bandas estrechas y radiación coherente. Para su funcionamiento se necesitan los siguientes componentes (figura 5.23.):

1- Un medio que genera el láser (puede ser de 3 niveles y 4 niveles).

2- Una fuente de activación del láser (corriente eléctrica, radiación externa).

3- Un sistema de amplificación (espejos) que genera fotones adicionales al pasar numerosas veces la radiación a través del medio (haz paralelo).

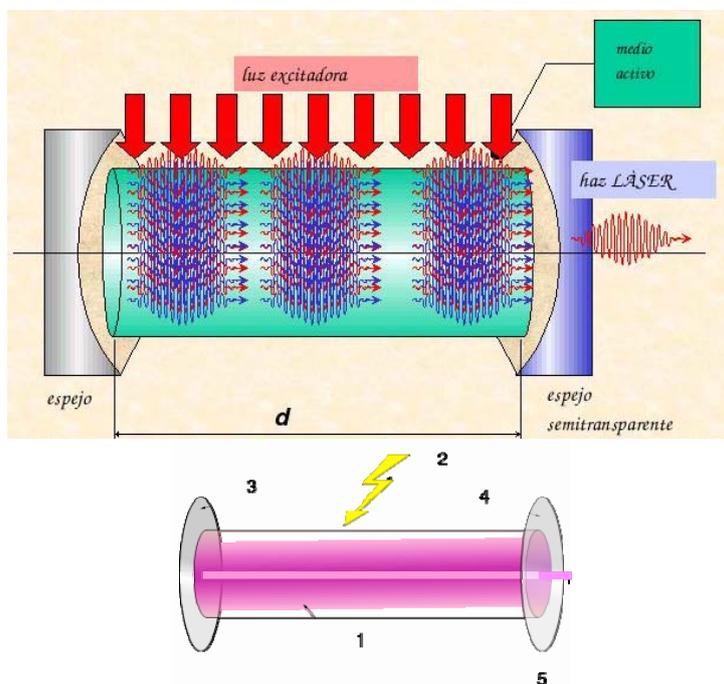


Fig. 5.23. Componentes del láser: 1. Medio activo para la formación del láser. 2. Fuente de bombeo para el láser. 3. Espejo reflectante al 100%. 4. Espejo reflectante al 99%. 5. Emisión del rayo láser.

5.8. Selector de longitud de onda.

Dispositivos que restringen la radiación que se va a medir a una banda estrecha para que se absorba o emita por el analito (radiación monocromática). La ley de Beer se aplica con la radiación monocromática. Los anchos de banda estrechos aumentan la sensibilidad al disminuir la señal del blanco pero no la de la muestra. La selectividad mejora con

radiación monocromática porque hay menor probabilidad de que otras sustancias distintas al analito absorban. Por tanto, los filtros aumentan la sensibilidad y selectividad y dan lugar a una respuesta lineal en absorción.

5.8.1. Filtros de absorción y de interferencia.

Son láminas que al interponerse en el paso de la luz absorben parte de la radiación o la interfieren, permitiendo que pase únicamente la longitud de onda deseada.

Los filtros de interferencia son mejores que los de absorción porque tienen anchos de banda efectivos menores y el porcentaje de transmitancia en el máximo es más alto (70-80% del inicial) mientras que en los filtros de absorción es de 50 % (figura 5.24.)

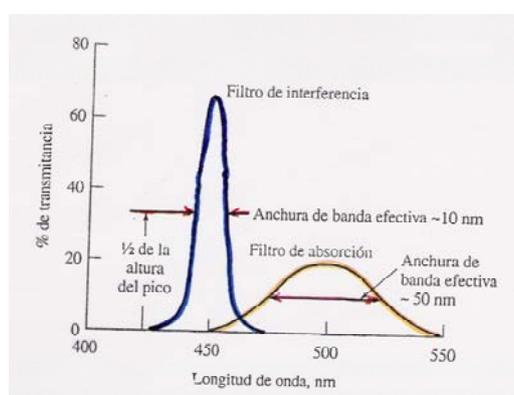


Fig. 5.24. Anchuras de banda efectiva para dos tipos de filtros. Se observa la medida inversa de la calidad del dispositivo selector.

Los filtros de interferencia están basados en interferencias ópticas. Reflejan las radiaciones sin interés y producen anchos de banda de 5-10 nm. Están formados por un dieléctrico (aislante), transparente a mayoría de regiones espectrales, CaF_2 ó MgF_2 , situado entre dos películas metálicas semirreflectantes de plata (figura 5.25.).

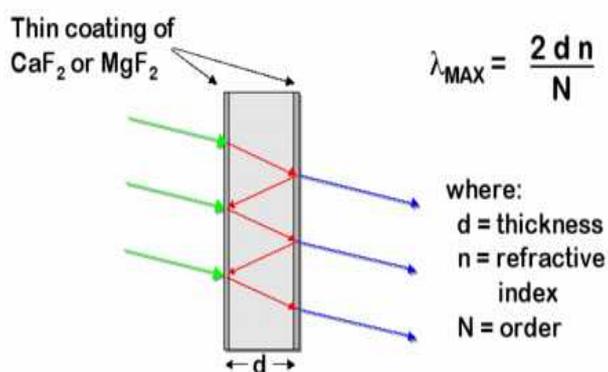


Fig. 5.25. Filtro de interferencia. Se puede controlar el grosor del dieléctrico (d) pues de él depende la λ .

5.8.2. Monocromadores.

Selectores de longitud de onda de mejor calidad y más complejos que los filtros. Tipos de monocromadores:

1. Prismas.

Dispersan la radiación separando espacialmente las longitudes de onda de la luz policromática, proporcionando bandas de anchura pequeña (monocromática) (figura 5.26.).

Existen diferentes tipos:

- Prisma de cuarzo tipo Cornu (formado por un único bloque de 60 grados; dos prismas de cuarzo cristalino de 30 grados)
- Monocromador de Bunsen (60 grados)
- Prisma de cuarzo tipo Littrow (30 grados con cara posterior especular, dando diseños más compactos).

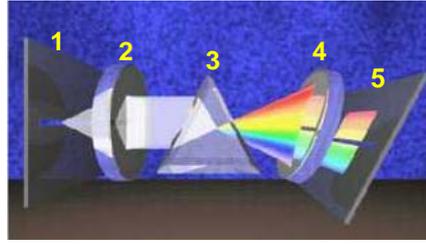


Fig. 5.26. Componentes de un prisma: 1. Rendija de entrada (deja pasar haz fino de radiación). 2. Lente o espejo colimador (dirige la radiación en un haz paralelo). 3. Elemento dispersante (red o prisma). 4. Elemento focalizador (forma imagen de nuevo y la enfoca en plano focal). 5. Rendija de salida sobre plano focal (deja pasar radiación deseada).

2. Redes de difracción

En una red (reflexión y transmisión) la luz se dispersa linealmente, lo que significa que la separación de las distintas longitudes de onda a lo largo del plano focal varía linealmente con la longitud de onda.

La red de reflexión, en escalera o tipo escalerilla, está formada por una superficie ópticamente plana de aluminio reflectante, recubierta de SiO_2 transparente para evitar oxidación, con surcos grabados paralelos y cercanos. En las caras más anchas se produce la reflexión (figura 5.27.).

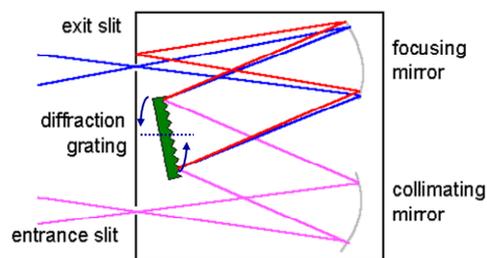


Fig. 5.27. Red de reflexión tipo monocromador Czerny-Turner.

5.9. Cubetas o celdas.

La forma de las celdas depende del estado físico de la muestra y el tipo de análisis a realizar. Según el tipo de radiación utilizada, variará el material de composición de la cubeta (figura 5.28.). Con radiación UV se recomienda cubetas fabricadas en cuarzo o sílice fundida, porque otro material absorbe dicha radiación. En la región de visible se puede utilizar cualquier material, pero los más baratos son el vidrio y el plástico. Para trabajar en infrarrojo se utilizan celdas de NaCl, KBr, ICs, AgCl, materiales que no absorben radiación IR.

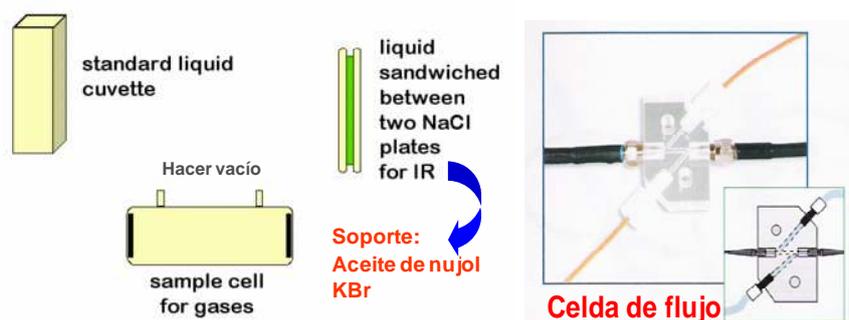


Fig. 5.28. Diferentes tipos de cubetas para análisis espectroscópico

5.10. Detectores de fotones o fotoeléctricos.

Se basan en la interacción de la radiación con una superficie reactiva para promover electrones a estados de energía que puedan conducir la electricidad.

5.10.1. Fototubo de vacío.

Está constituido por un cátodo semicilíndrico y un ánodo de filamento colocados en una ampolla de cuarzo o vidrio donde se ha hecho el vacío (figura 5.29.). El material fotosensible de la superficie cóncava del cátodo (óxidos de metales alcalinos) emite electrones al incidir sobre la radiación, UV-VIS (190-700 nm). Cuando se aplica una

diferencia de potencial entre los electrodos, los fotoelectrones emitidos por el cátodo, al incidir la radiación, son captados por el filamento del ánodo produciendo corriente eléctrica.

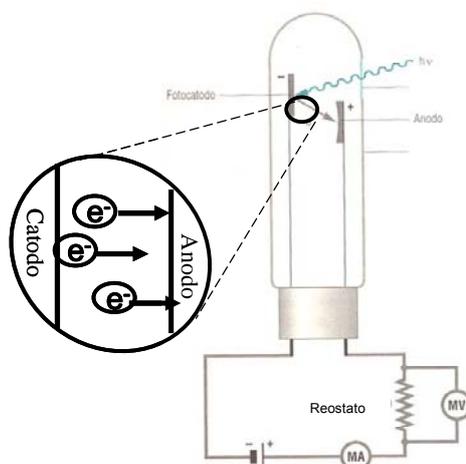


Fig. 5.29. Esquema de funcionamiento de un fototubo de vacío.

5.10.2. Tubos fotomultiplicadores.

Constituido por un cátodo fotosensible (similar al fototubo) y un ánodo colector, separados por una serie de electrodos positivos (entre 5-11) de MgO, GaP, llamados dínodos (cada uno a un voltaje 90 V superior al anterior) que emiten de 2 a 5 electrones cuando son golpeados con electrones de suficiente energía (figura 5.30.).

Al ser irradiado, el cátodo fotosensible emite electrones que son acelerados por el campo eléctrico e inciden sobre varias superficies liberando una cascada de electrones secundarios (106- 107 electrones por cada fotón incidente).

Estos detectores tienen la ventaja de ser muy sensibles al UV-Visible, respuesta rápida y la capacidad de medir radiación de baja potencia.

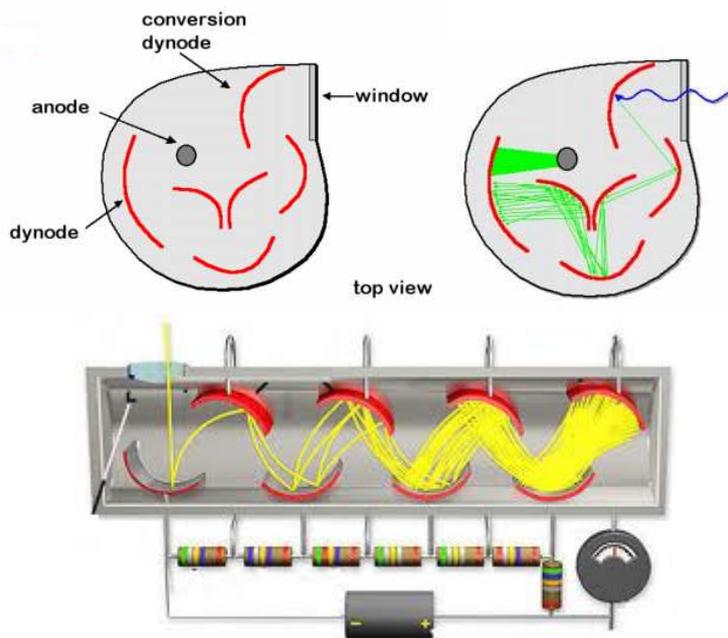


Fig. 5.30. Esquema de funcionamiento de un tubo fotomultiplicador.

5.10.3. Detectores de diodos en serie.

Los fotodiodos se pueden miniaturizar y alinear (1000 o más) en un solo chip pequeño de Si. Cada uno consiste en una unión *pn* polarizada inversamente (figura 5.31.).

Este detector situado a lo largo de plano focal de un monocromador permite controlar simultáneamente todas las longitudes de ondas, dando lugar a una espectroscopía de alta velocidad (detector multicanal). Este detector tiene menor sensibilidad, rango dinámico y S/R que el fotomultiplicador.

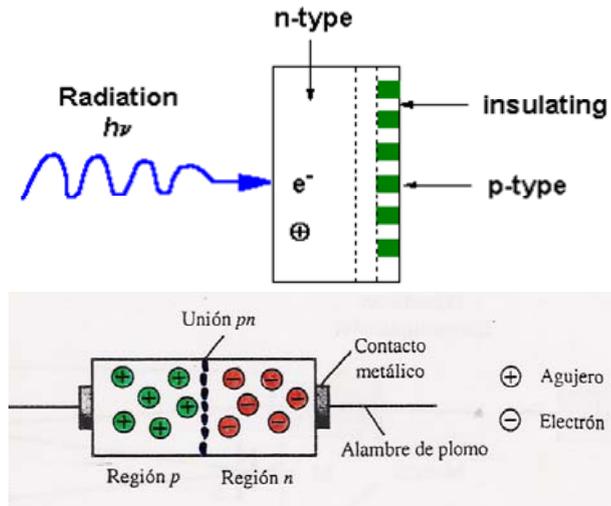


Fig. 5.31. Esquema de un detector de diodos en serie (arriba). Conducción en semiconductores de silicio o germanio (abajo) por movimiento de electrones (e^-) desde la región n y agujeros (huecos positivos) desde la región p , en direcciones opuestas.

5.10.4. Detectores multicanal de transferencia de carga.

Un ejemplo son los detectores de acoplamiento de carga (CCD). Destacar que, en este caso, el semiconductor está formado por silicio tipo p y el condensador está polarizado positivamente, de manera que los electrones formados por absorción de radiación se recogen en el pozo bajo el electrodo, mientras que los huecos migran hacia el sustrato tipo n (figura 5.32.)

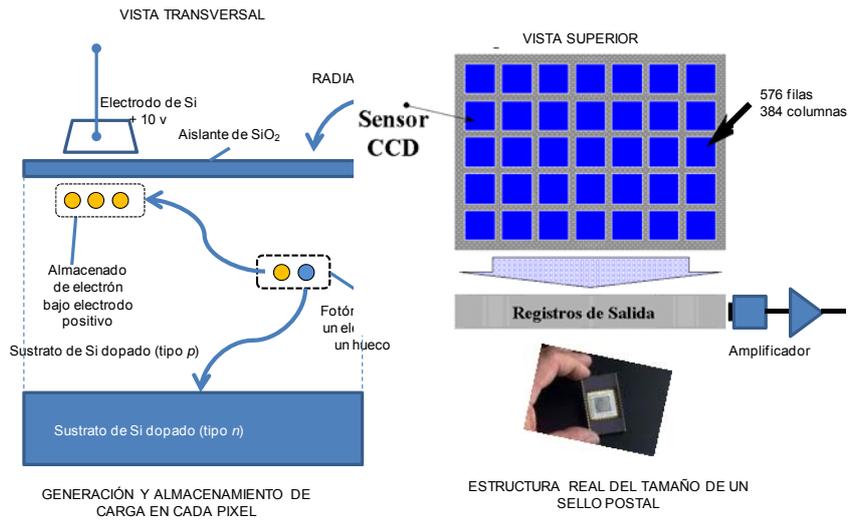


Fig.5.32. Esquema de funcionamiento detector de acoplamiento de carga.

5.11. Detector térmico o de calor.

La radiación provoca una diferencia de temperatura que se convierte en una señal eléctrica. En los termopares se necesita formar un par de uniones al soldar dos piezas de metal (Bi y Sb). Se genera un potencial entre las dos uniones que varía en función de la diferencia de temperatura (figura 5.33.). La unión se ennegrece para aumentar la capacidad de absorber calor, se sella en una cámara de vacío con ventana transparente a IR.

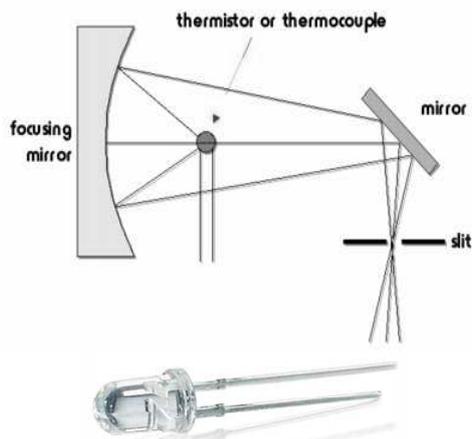


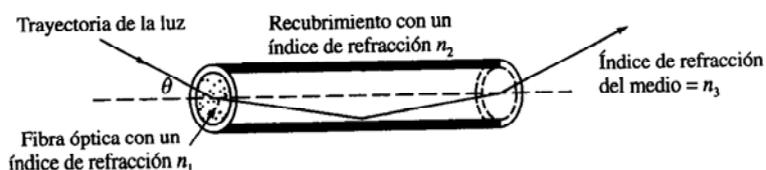
Fig. 5.33. Esquema de un termopar.

5.12. Fibras ópticas.

El fenómeno de reflexión total interna explica la transmisión de radiación a través de la fibra óptica. Tienen lugar refracción y reflexión en la interfaz de dos medios con diferentes índices de refracción ($n_1 > n_2$). No toda la radiación que penetra en la fibra se propaga a lo largo de ella. Se transmite la radiación contenida en un cono de apertura o aceptación limitado por un ángulo θ (figura 5.34.) según la siguiente ecuación:

$$n_3 \cdot \sin \theta = (n_1^2 - n_2^2)^{1/2}$$

$$\text{con } n_1 > n_2 > n_3$$



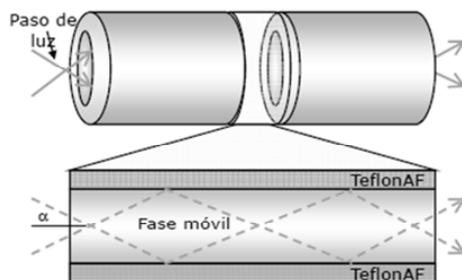


Fig. 5.34. Funcionamiento de fibra óptica.

En la figura 5.35. se muestra el acoplamiento de una fibra óptica en un instrumento espectroscópico.

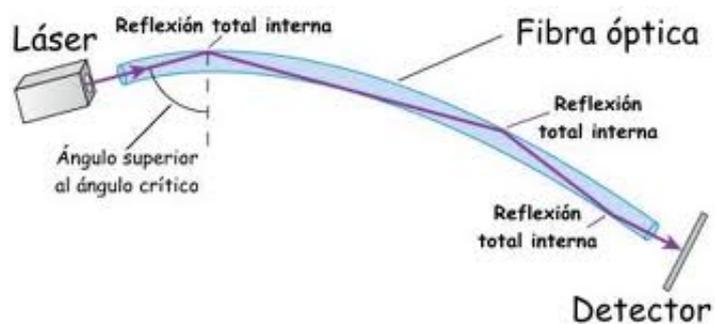


Fig. 5.35. Transmisión de la radiación a través de fibra óptica.

5.13. Bibliografía

D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER, S.R. CROUCH
“**Fundamentos de Química Analítica**”. 7ª Ed Ed. Thonson
(Paraninfo Editores). Madrid (2005).

D.A. SKOOG, F.J. HOLLER and T.A. NIEMAN “**Principios de
Análisis Instrumental**” 5º Ed. Mc Graw Hill Madrid (2001).

K.A. RUBINSON and J.F. RUBINSON ” **Análisis Instrumental**” Ed
Prentice Hall. Madrid (2000).

http://www.shsu.edu/%7Eechm_tgc/sounds/pushmovies/grating.gif

http://www.shsu.edu/%7Eechm_tgc/sounds/pushmovies/pee.gif

http://www.shsu.edu/%7Eechm_tgc/sounds/pushmovies/pmt.html

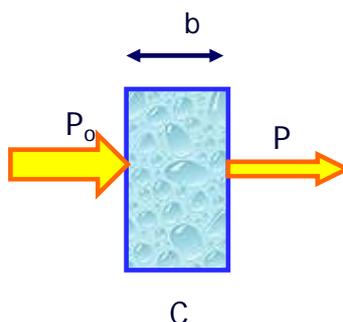
TEMA 6. MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS DE ANÁLISIS MOLECULAR

Objetivos

- ✓ Conocer las aplicaciones generales, ventajas e inconvenientes de las técnicas de espectrometría molecular.
- ✓ Capacitar para el desarrollo de métodos espectroscópicos y su aplicación a la resolución casos particulares.
- ✓ Aprender a manejar tablas, dibujos y diagramas de bloque que faciliten la comprensión de su fundamento, aplicaciones y manejo de instrumentos.

6.1. Ley de Beer

Cuando un haz de radiación monocromática de potencia P_0 incide y atraviesa una disolución de espesor b cm y una concentración c de la especie absorbente, la potencia de la radiación disminuye de P_0 a P debido a la interacción de los fotones y las partículas absorbentes. T es la fracción de radiación incidente transmitida por la disolución.

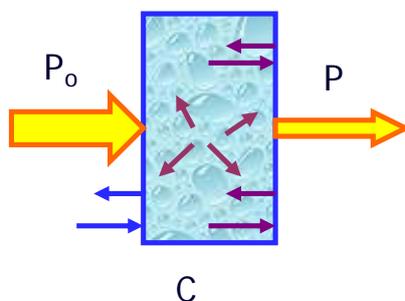


$$\% T (\text{Transmitancia}) = \frac{P}{P_0} \times 100$$

$$A (\text{Absorbancia}) = \log \frac{1}{T} = \log \frac{P_0}{P} = -\log T$$

La absorbancia aumenta a medida que disminuye la transmitancia.

Pero, cuando se mide la absorbancia o la transmitancia, la muestra está colocada en una cubeta en la cual pueden darse fenómenos de dispersión por parte de las partículas de la disolución y de reflexión en las interfases aire/pared y pared /disolución.



Para compensar estos efectos, la potencia del haz transmitido por la disolución del analito se compara con la potencia del haz transmitido a través de una cubeta idéntica que contiene sólo disolvente, midiéndose la absorbancia experimental.

$$\text{Absorbancia} = \log \frac{P_{\text{disolvente}}}{P_{\text{disolución}}} \approx \log \frac{P_0}{P}$$

La ley de Beer relaciona directamente la absorbancia con el espesor de la cubeta (expresado en cm) y la concentración de la especie absorbente (expresada en mol L⁻¹):

$$A = \varepsilon b c$$

ε se define como el coeficiente de absortividad molar y se expresa como L mol⁻¹ cm⁻¹

6.2. Diseño de instrumentos para absorción molecular.

Esta instrumentación se utiliza para medir la fracción de radiación (UV, visible e IR), de una determinada longitud de onda, que atraviesa la muestra. Los fotómetros son instrumentos que constan de fuente, filtros (como selectores de la longitud de onda), detector fotoeléctrico, procesador de señales y sistema de lectura. (Figuras 6.1.- 6.4.)

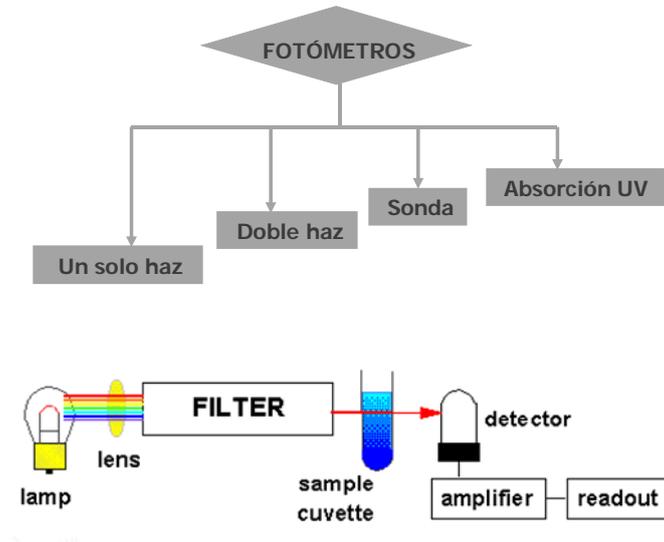


Fig. 6.1. Configuración de un fotómetro de haz simple.

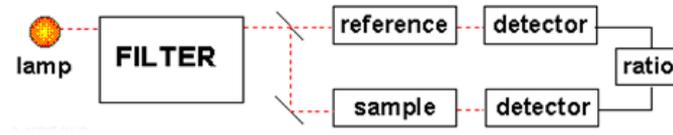


Fig. 6.2. Configuración de un fotómetro de doble haz (uno de ellos pasa a través de la muestra y el otro de una referencia).



Fig. 6.3. Dispositivo provisto de lámpara de mercurio, filtro 254 nm, para detección de absorción UV en equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

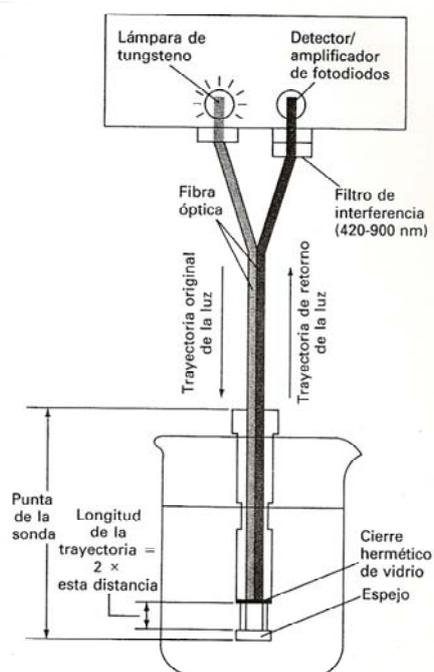


Fig. 6.4. Esquema de un fotómetro tipo sonda, que utiliza fibra óptica para la transmisión de la radiación de la lámpara a la muestra y de ahí al detector.

Los espectrofotómetros son instrumentos que constan de fuente, monocromador con una rendija en el plano focal, un

detector fotoeléctrico procesador de señales y sistema de lectura. (figuras 6.5. – 6.8.)

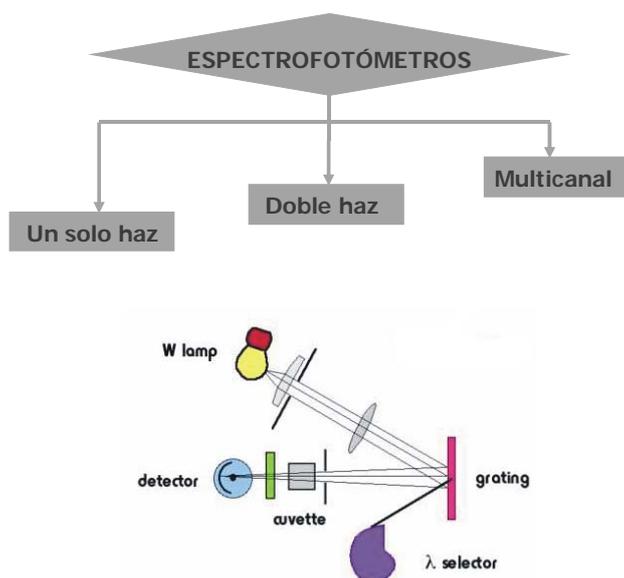


Fig. 6.5. Configuración de un espectrofotómetro de un haz.

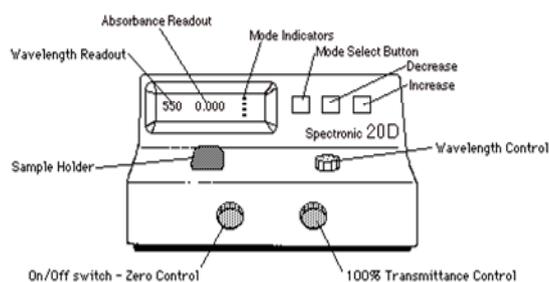


Fig. 6.6. Esquema de espectrofotómetro Spectronic 20 de haz simple: Rango de λ de trabajo: 340-950 nm; Lámpara: Wolframio; Selector de λ s: red de difracción; Detector: fototubo.

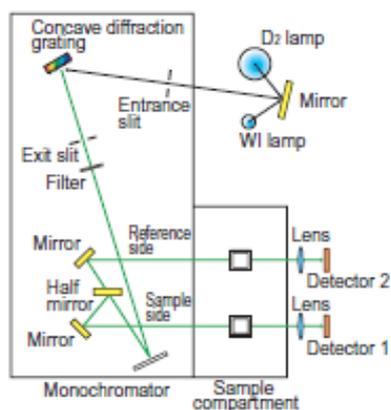


Fig. 6.7. Configuración de un espectrofotómetro de doble haz.

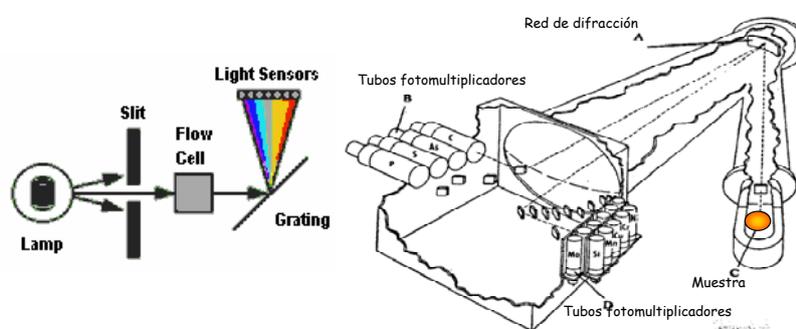


Fig. 6.8. Configuración de un espectrofotómetro multicanal, con detector de serie de diodos (izquierda) o con varios tubos fotomultiplicadores (derecha).

En la figura 6.9. se muestra un espectrofotómetro multicanal con detector de acoplamiento de carga (CCD).

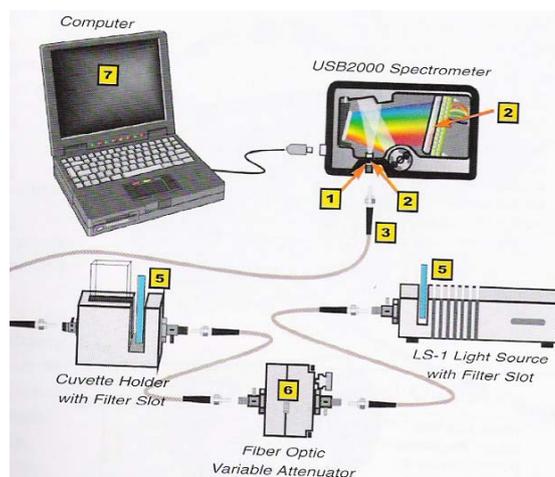


Fig. 6.9. Configuración de un espectrofotómetro con detector de acoplamiento de carga (CCD). 1- rendija, 2- filtros instalados, 3- fibra óptica, 5- filtros móviles para modificar la radiación, 6- atenuador de señal, 7- ordenador que controla el equipo y procesa las señales.

Los instrumentos temporales operan en un solo canal y las bandas de absorción se analizan de forma secuencial en el tiempo. Dentro de este tipo destacan los instrumentos dispersivos (con monocromador) como los mostrados en la figura 6.10. La radiación entra a través de la rendija y se dispersa. (a) El policromador produce un espectro (intensidad frente a λ) muestreando la salida con una serie de detectores. El ancho de la banda del espectro es función del ancho de la rendija, las cualidades de la red de difracción, el número de elementos individuales del detector y la geometría de cada uno de los componentes. (b) Un instrumento basado en un monocromador debe barrer el espectro. Para ello, la red de difracción se rota. La pureza espectral depende de las anchuras de las rendijas y de las cualidades de la red de difracción y su geometría.

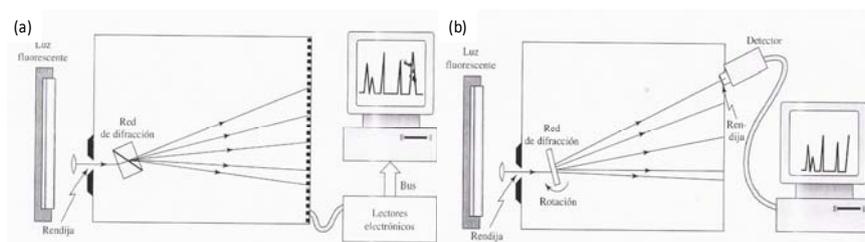


Fig. 6.11. Representación de las estructuras generales de los espectrómetros dispersivos.

6.3. Aplicaciones de la espectrometría de absorción molecular UV-Vis.

Se muestran diferentes aplicaciones de la espectrometría de absorción molecular UV-Vis en las siguientes figuras.

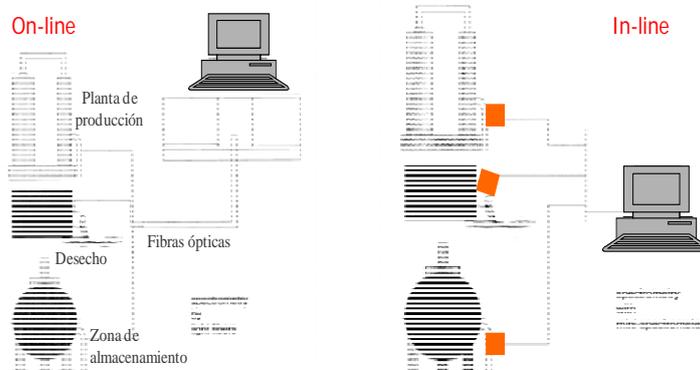


Fig. 6.12. Control espectrofotométrico de producción y monitorización ambiental.

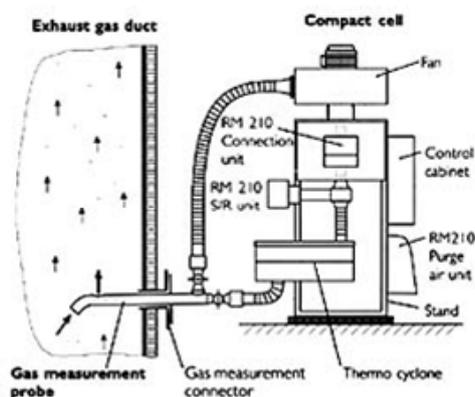


Fig. 6.13. Fotómetro de dispersión de luz con sistema on-line de bypass para análisis de concentraciones traza de cenizas en salidas de gases húmedos y calientes. Presenta diversas ventajas como: Diseño compacto, instalación simple, elevada seguridad operacional, bajo mantenimiento.

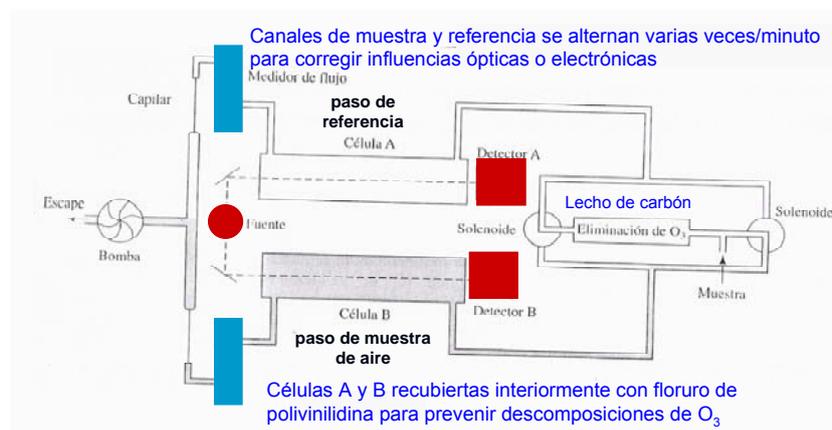


Fig. 6.14. Analizador con espectrómetro de doble haz para control de O_3 en gases expulsados por 5 aviones comerciales de 3 compañías aéreas europeas que vuelan en la tropopausa (entre troposfera y estratosfera). El gas de referencia es el mismo que el de muestra pero ha pasado

por lecho de carbón para eliminar presencia de O₃. Se mide la diferencia de absorción.

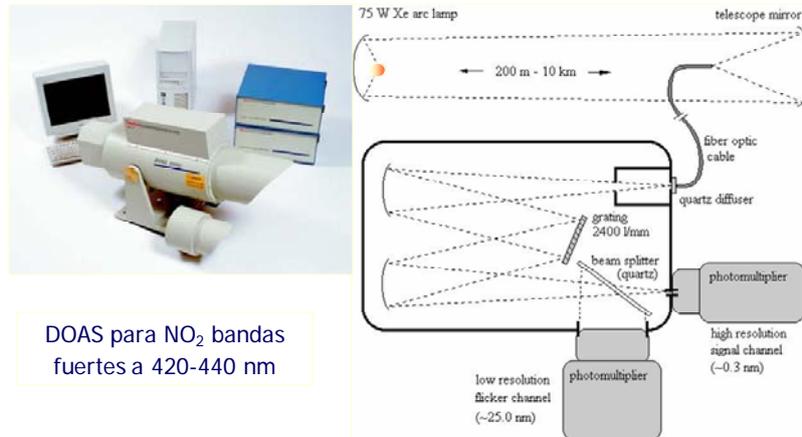


Fig. 6.15. Sistema de espectrometría de absorción óptica diferencial (DOAS) para medida de gases. Un emisor proyecta un haz de luz hacia un receptor. La luz se transfiere al sistema de medida a través de cables de fibra óptica. El área de control suele tener varios cientos de metros de longitud.

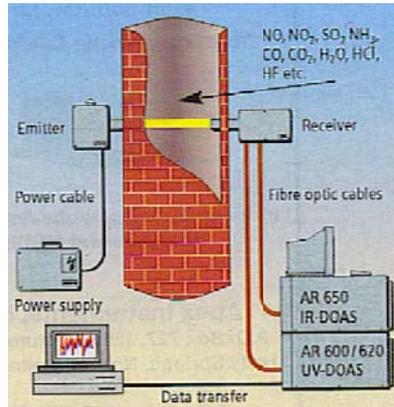


Fig. 6.16. Monitorización in-situ de emisión continua en desechos de incineradoras y en plantas cementeras

mediante sistema DOAS. Diferentes gases volátiles absorben radiación procedente de regiones conocidas del espectro (UV, Vis, IR). La absorción es registrada mediante un ordenador que controla el espectrómetro. Se trata de una técnica no invasiva, automática y libre de calibración

6.4. Aplicaciones de espectrometría de absorción molecular IR.

La absorción de radiación IR implica transiciones entre distintos niveles de energía vibracional y rotacional asociados con el nivel electrónico más bajo de las moléculas.

1.- La molécula debe sufrir un cambio neto en su momento dipolar debido a diferentes movimientos de vibración o rotación.

Se define momento dipolar químico (μ) como la medida de la intensidad de la fuerza de atracción entre dos átomos. Es la expresión de la asimetría de la carga eléctrica. Está definido como el producto entre la distancia d que separa a las cargas (longitud del enlace) y el valor de las cargas iguales y opuestas en un enlace químico: $\mu = q d$

2.- El campo eléctrico alterno de radiación puede interactuar con la molécula y provocar cambios en la amplitud de sus movimientos.

3.- Si la ν de la radiación IR coincide con la ν de vibración/rotación natural de la molécula se produce una transferencia de energía que produce un cambio en la amplitud de vibración molecular. Esto se traduce como absorción de radiación IR (figura 6.17.).

Las especies mononucleares (sin momento dipolar) no absorben (O_2 , Cl_2 , N_2).

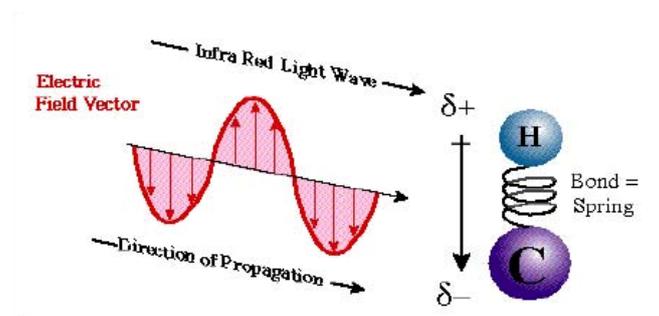


Fig. 6.17. Interacción entre la radiación IR y un grupo funcional de molécula en movimiento.

En la figura 6.18. se muestran las regiones del espectro IR donde absorben distintos grupos funcionales. Los espectros se presentan de forma habitual como %Transmitancia frente a número de onda. Destacar que la *región de huella digital* es aquella zona del espectro entre 1500 y 700 cm^{-1} donde aparecen bandas características de los grupos funcionales que permiten la identificación cualitativa de una muestra desconocida (ver ejemplos en figura 6.19.)

La identificación de analitos orgánicos se lleva a cabo siguiendo las siguientes pautas:

1. Examinar frecuencias de grupo, pero hacer hincapié en la región de huella digital donde se observan cambios en el aspecto, distribución de picos debido a pequeñas diferencias de estructura.
2. Comparación directa del espectro desconocido con espectros conocidos (de referencia).
3. Seguir un esquema sistemático de la presencia/ausencia de bandas.

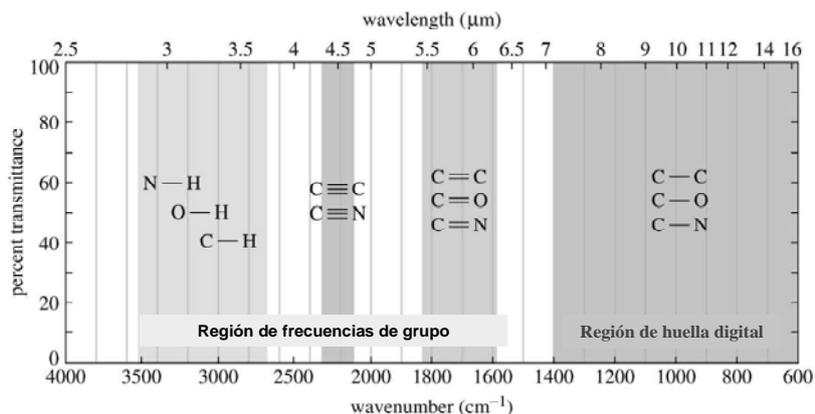


Fig. 6.18. Regiones características en el espectro IR.

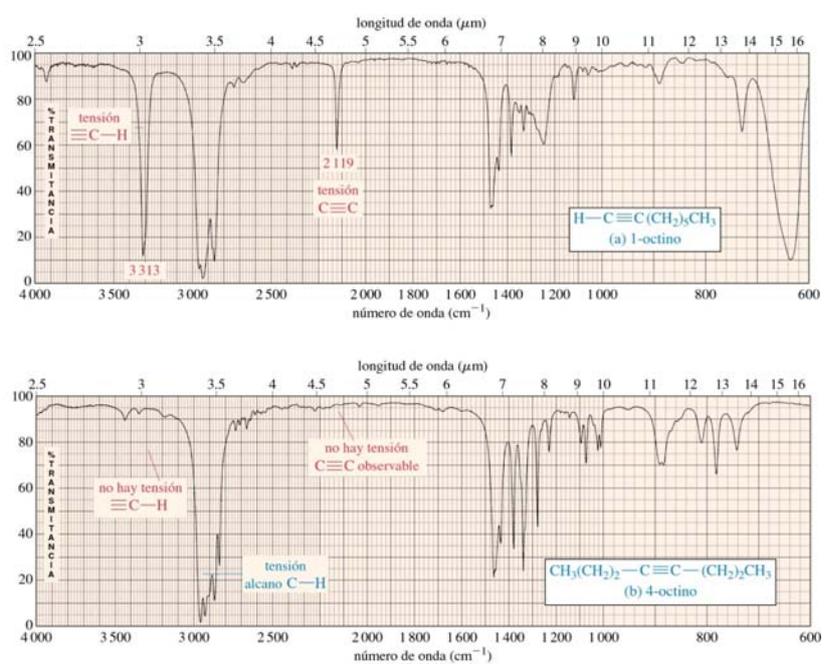


Fig. 6.19. Diferencias en las bandas de absorción de los los espectros de la región IR para la identificación de (a) 1-octino y (b) 4-octino.

En la figura 6.20. se muestran los componentes básicos de un espectrómetro de absorción IR. A diferencia de las configuraciones mostradas cuando se utiliza radiación UV-Vis, en este caso el selector de longitudes de onda (monocromador) está situado a continuación de la cubeta de muestra/referencia para evitar que la radiación dispersada por las partículas de la muestra alcance el detector. Además la energía de la radiación IR es suficientemente baja como para no producir fotodescomposición de la muestra.

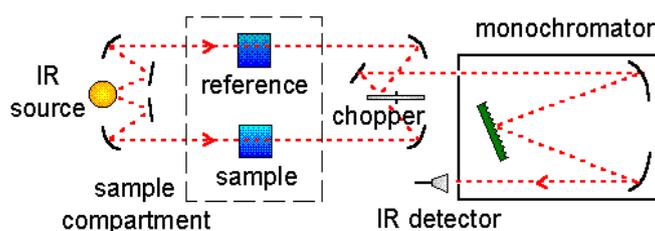


Fig. 6.20. Configuración de un espectrómetro de doble haz con detector térmico.

En las figuras siguientes se presentan diferentes aplicaciones de la espectrometría IR.

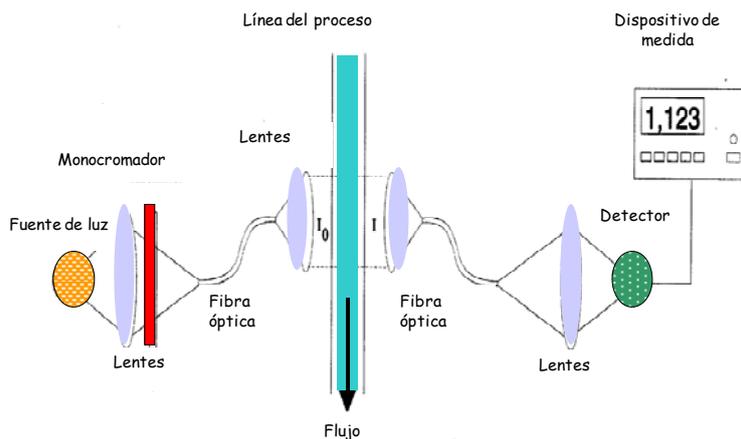


Fig. 6.21. Equipo basado en espectrometría IR, dotado de fibras ópticas, de un analizador in-line.

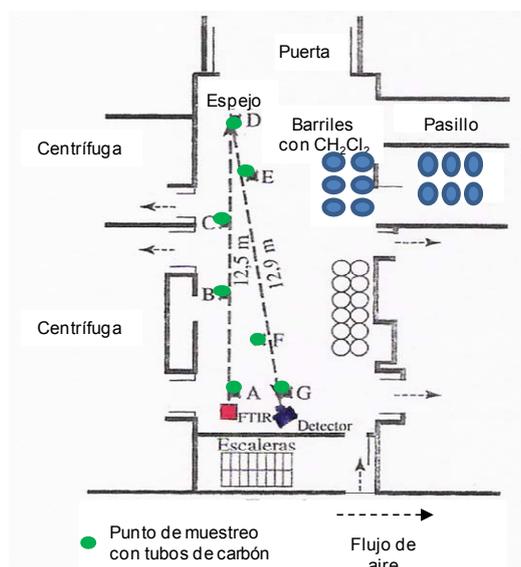


Fig. 6.22. Monitorización remota de aire en zona de trabajo expuesta a materiales peligrosos: compuesto farmacéutico que se extrae con cloruro de metileno (CH_2Cl_2) mediante centrifugación y luego el disolvente se transfiere a barriles

de almacenamiento. En el mapa se muestra los puntos de toma de muestra remota del equipo de absorción IR provisto de algoritmo de transformada de Fourier (FTIR), y la trayectoria del haz en la zona de trabajo. A lo largo de esta trayectoria se han dispuesto tubos de muestreo de carbón vegetal. La sustancia absorbida se mide también por cromatografía de gases (GC) y así se valida el método FTIR. Se rechazan los datos si la trayectoria del haz se ha cortado. Se ofrecen niveles exactos de concentración promedio en tiempo real.

6.5. Aplicaciones de espectrometría de fluorescencia molecular.

Los espectros de luminiscencia se obtienen cuando la muestra, tras absorber radiación adecuada, la reemite en todos los sentidos y a una longitud de onda mayor

Factores influyentes:

- Distinto pH puede dar lugar o no a fluorescencia.
- Valores de viscosidad alta y temperatura baja favorecen la disminución de las colisiones entre partículas de soluto y disolvente, reducen la amortiguación coloidal o conversión interna y favorece un incremento de la fluorescencia.
- La influencia del tipo de estructura es importante. Así, la falta de rigidez de la molécula provoca un aumento de velocidad de conversión interna (desactivación no radiante) provocando una disminución de la fluorescencia. La presencia de grupos aromáticos, confiriendo una mayor rigidez a la molécula produce un incremento de la fluorescencia.
- La presencia de un disolvente con átomos pesados reduce los valores de fluorescencia.

En la figura 6.23. se muestra la instrumentación utilizada para las medidas de fluorescencia molecular, ya sea un fluorómetro (utilizando filtros como selectores de longitud de onda) o un espectrofluorímetro (utilizando monocromadores). Nótese que la configuración forma un ángulo de 90° entre el haz de excitación (procedente de la

fuente) y el haz de emisión de fluorescencia (procedente de la muestra). De esta forma se evita que la radiación de la lámpara llegue al detector, junto con la radiación fluorescente emitida por la muestra, produciendo interacciones en la medida. La emisión fluorescente de la muestra en todas direcciones hace posible este diseño instrumental.

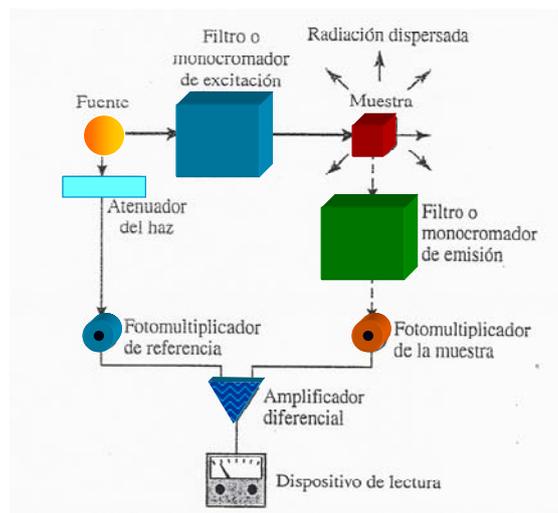


Fig. 6.23 Configuración de un fluorómetro (usa filtros) o espectrofluorímetro (utiliza monocromadores).

En las siguientes figuras se presenta una interesante aplicación de la espectrometría de fluorescencia molecular. Se trata de un biosensor de glucosa para medir la concentración de glucosa en el interior de la vena del paciente. A través de la pared del sensor (membrana) difunden moléculas pequeñas como la glucosa. Cuando todo el dextrano está unido a membrana, no hay ningún cromóforo fluorescente en el camino óptico y no se detecta fluorescencia (figura 6.24).

Cuando la glucosa de la corriente sanguínea libera parte del dextrano enlazado, al unirse a concanabalina A, el dextrano

se difunde hasta el haz de luz y aparece fluorescencia. La misma fibra óptica transporta la fluorescencia al detector (figura 6.25).

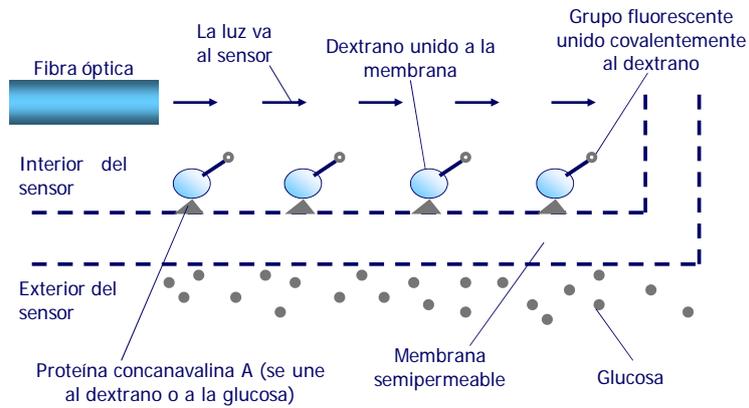


Fig. 6.24. Biosensor de glucosa. Sin detección de fluorescencia.

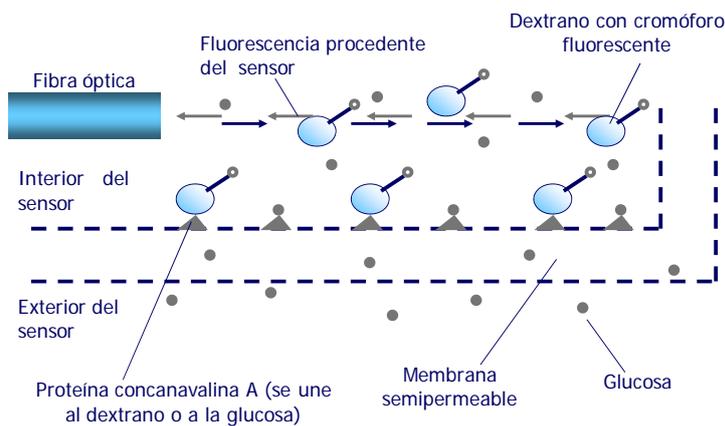


Fig. 6.25. Biosensor de glucosa. Detección positiva de fluorescencia.

En la figura 6.26. se muestra el uso de fluorescencia para la medida de oxígeno.

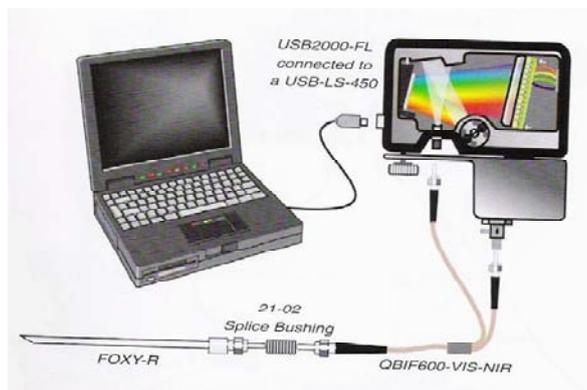


Fig. 6.26. Espectrómetro de fluorescencia con sensor de oxígeno.

6.6. Bibliografía

D.C. HARRIS “**Análisis Químico Cuantitativo**” 2ª Ed. Ed. Reverté S.A. Barcelona (2001).

D.A. SKOOG, F.J. HOLLER and T.A. NIEMAN “**Principios de Análisis Instrumental**” 5º Ed. Mc Graw Hill Madrid (2001).

K.A. RUBINSON and J.F. RUBINSON ” **Análisis Instrumental**” Ed Prentice Hall. Madrid (2000).

TEMA 7. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS DE ANÁLISIS ELEMENTAL

Objetivos

- ✓ Conocer las aplicaciones generales, ventajas e inconvenientes de las técnicas de espectroscopía atómica o elemental.
- ✓ Capacitar para el desarrollo de métodos espectroscópicos y su aplicación a la resolución casos particulares.
- ✓ Aprender a manejar tablas, dibujos y diagramas de bloque que faciliten la comprensión de su fundamento, aplicaciones y manejo de instrumentos.

7.1. Generalidades de la espectroscopía de análisis elemental.

En absorción atómica, los átomos absorben parte de la radiación procedente de una fuente, y el resto de radiación llega al detector. La emisión atómica procede de átomos que se encuentran en estado excitado por la gran energía térmica de la llama. Para observar la fluorescencia se tiene que excitar a los átomos mediante una lámpara externa o un láser. Un átomo puede emitir las mismas longitudes de onda que absorbe, o puede decaer a otros estados y emitir otras longitudes de onda (ver figura 7.1.).

Por otra parte, el coste de la instrumentación utilizada aumenta a medida que lo hace la sensibilidad alcanzada, como se puede observar en la figura 7.2.

Las configuraciones básicas para las técnicas de espectroscopía de absorción atómica (AAS) y emisión atómica (AES) con atomizador de llama se muestran en la figura 7.3.

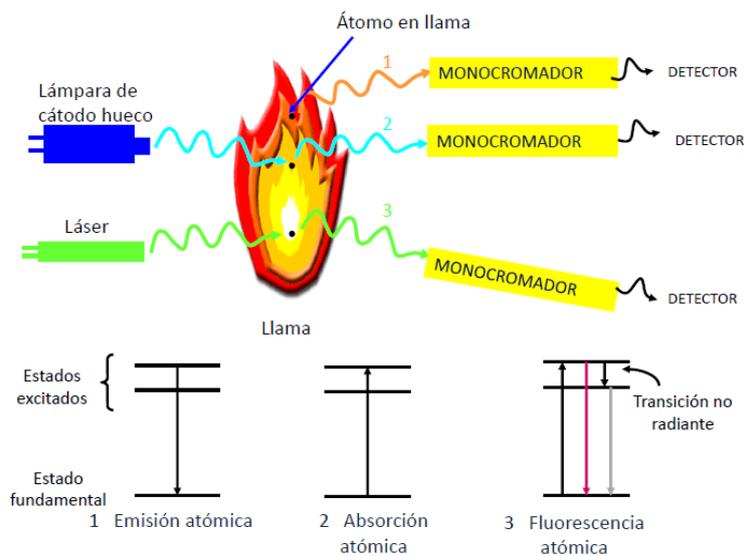


Fig. 7.1. Representación esquemática de la absorción, emisión y fluorescencia de átomos en la llama.

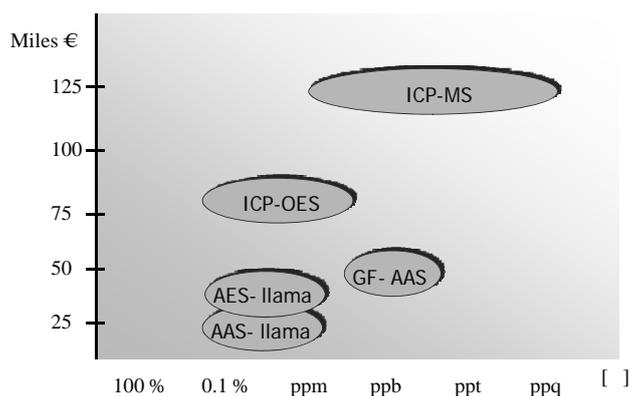


Fig. 7.2. Comparación del coste de diferente instrumentación para la determinación de trazas/ultratraza de elementos en disolución.

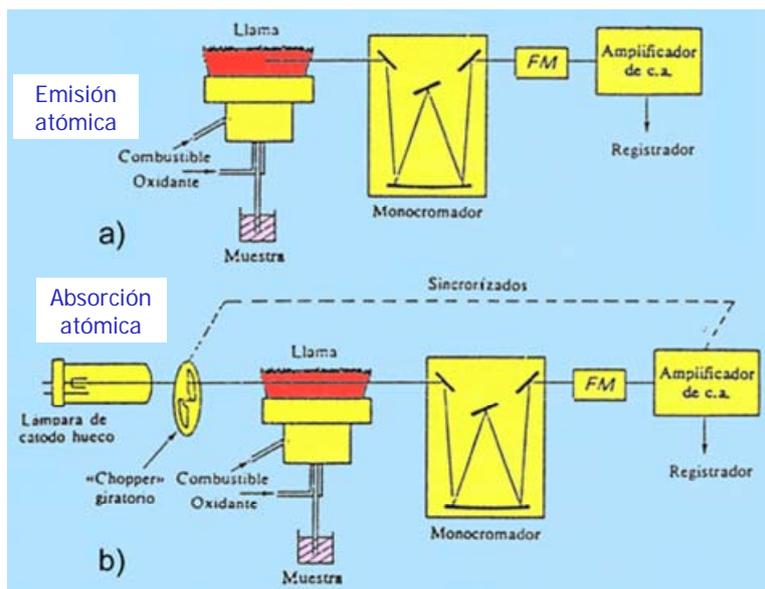


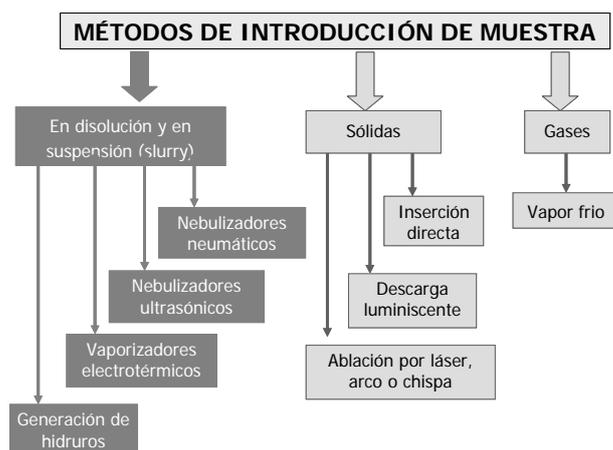
Fig. 7.3. Esquemas de instrumentación en espectroscopía de absorción y emisión atómica de llama.

7.2. Métodos de introducción de muestra.

El siguiente esquema resume diferentes posibilidades de introducción de la muestra en los métodos de espectroscopía de análisis elemental, aunque sólo se comentarán de manera más detallada las correspondientes a muestras en disolución o en suspensión (slurry).

La muestra debe atomizarse para encontrarse en su forma elemental. Para ello se pueden utilizar diferentes técnicas de atomización: llama, horno calentado eléctricamente, plasma de radiofrecuencia.

¿Qué le ocurre a una muestra diluida en un espectrofotómetro de absorción/emisión atómica?



En un instrumento con atomizador de llama, la muestra pasa por diversas etapas desde que es aspirada a través de un nebulizador, el aerosol formado se mezcla con los gases que formarán la llama (en cámara de premezcla), la selección de partículas de tamaño adecuado por reducción de las gotas mediante aspas (spoiler) y la introducción de la mezcla en el quemador. Es aquí donde, tras la pérdida de disolvente se obtiene un aerosol sólido-gas que sufrirá el proceso de atomización.

La figura 7.4. muestra dos tipos de nebulizador neumático. El sistema de atomización de llama está basado en un mechero de premezcla que utiliza un sistema de introducción de muestra basado en el nebulizador neumático (ver figura 7.5.)

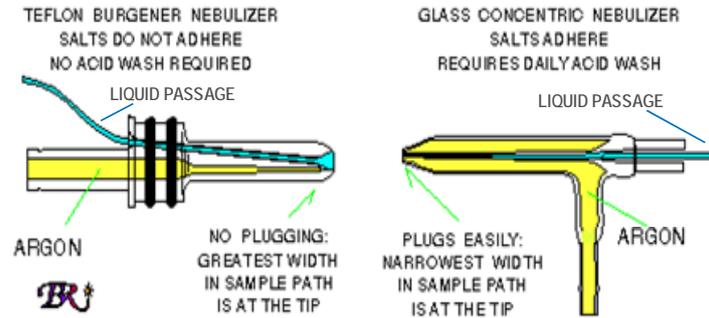


Fig. 7.4. Esquema de nebulizador neumático de trayectoria paralela (izquierda) y de tubo concéntrico (derecha).

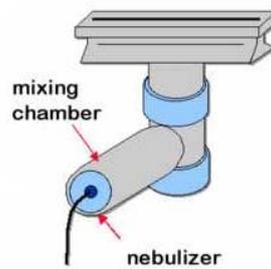


Fig. 7.5. Mechero de premezcla

La figura 7.6. muestra un esquema de un nebulizador ultrasónico. Las gotas se forman por el flujo de gas turbulento, después chocan con una placa vibradora a frecuencias ultrasónicas que rompe las gotas grandes para formar otras mucho más finas.

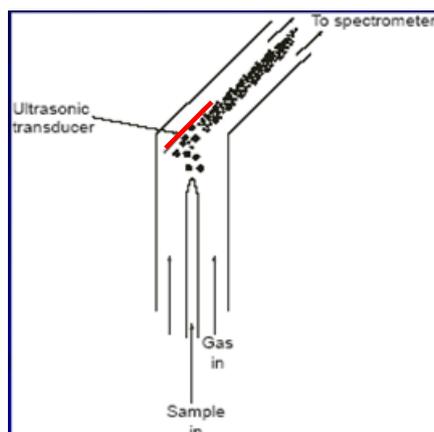


Fig. 7.6. Esquema de nebulizador ultrasónico.

El evaporador electrotérmico está situado en una cámara cerrada a través de la cual un gas inerte (Ar) transporta la muestra vaporizada hasta el atomizador. Una pequeña cantidad de muestra sólida o líquida se sitúa sobre un conductor (filamento de Tántalo o barra de carbono). Una corriente eléctrica evapora rápida y completamente la muestra mezclándose con el argón. La figura 7.7. muestra un sistema de introducción de muestra mediante vaporización electrotérmica, que se acopla a un atomizador de plasma.

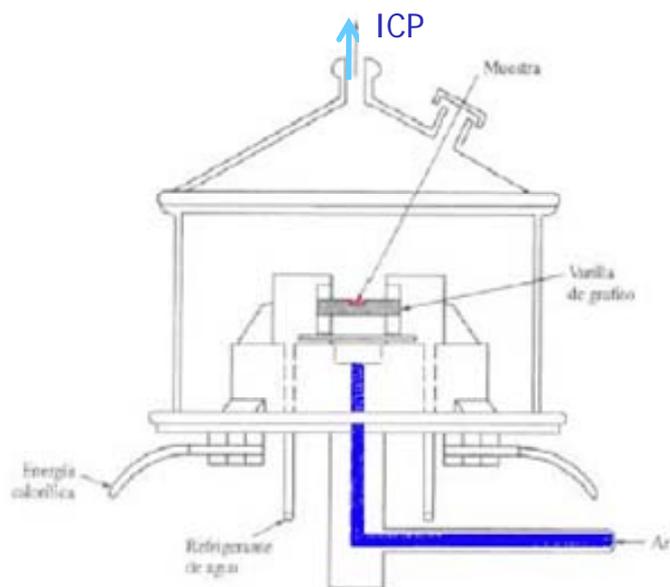


Fig. 7.7. Esquema de vaporizador electotérmico.

La figura 7.8. muestra una configuración instrumental para la introducción de muestra de arsénico mediante generación de hidruros. Una muestra de ácido arsenioso en disolución acuosa acidificada, reacciona con NaBH_4 para producir un hidruro volátil (arsina) que es arrastrado por un gas inerte hacia la cámara de atomización, según la siguiente reacción.



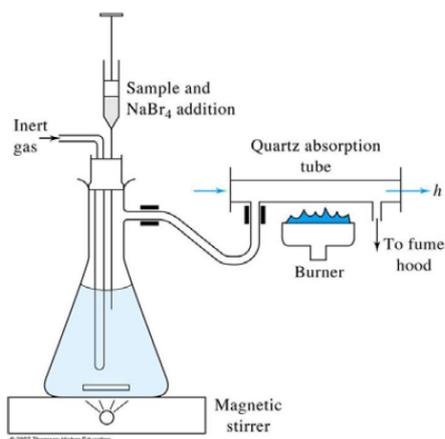


Fig. 7.8. Sistema de generación de hidruros para espectrometría de absorción atómica con atomización de llama.

7.3. Métodos de atomización.

La absorción atómica y la fluorescencia atómica se aplican a los átomos obtenidos, mientras que éstos deben ser excitados para que puedan emitir radiación que es medida en el detector (emisión atómica). La figura 7.9. muestra los diferentes procesos previos a la atomización de la muestra. En primer lugar se nebuliza la muestra que se introduce por aspiración. Las pequeñas gotas de disolución se calientan en el sistema para evaporar el disolvente. La volatilización de las partículas sólidas es una etapa crítica.

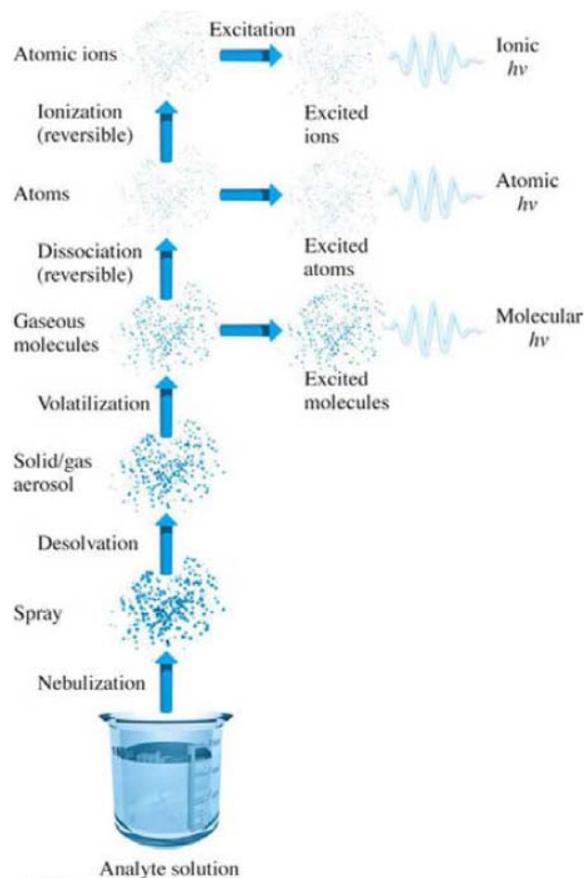


Fig. 7.9. Procesos que tiene lugar durante la atomización.

Existen diferentes posibilidades de atomización de la muestra en los métodos de espectroscopia de análisis elemental.

7.3.1. Atomización electrotérmica.

La atomización electrotérmica se basa en la utilización de una cámara de grafito. Atomiza sólidos, suspensiones y disoluciones en espectroscopia de absorción atómica. Se calienta (2000-3000 °C) al hacer pasar una corriente

eléctrica a través del tubo de grafito que actúa como resistencia. Algunas cámaras u hornos incluyen en su interior una plataforma de grafito (plataforma de L'vov) donde se coloca la muestra (figura 7.10.). La plataforma sólo toca los lados del horno por el canto inferior, de forma que el calor de sus paredes no calienta la muestra directamente. La muestra se calienta principalmente por medio de calor radiado que tiende a producir un calentamiento más uniforme. En primer lugar se calientan las paredes del horno y después se evapora la muestra.

El horno se calienta a una temperatura intermedia elevada (>100 °C) para vaporizar algunas interferencias de la matriz (etapa de calcinación o pirolisis). Para ello, el analito debe ser térmicamente estable. Después se eleva la temperatura para la atomización (figura 7.11.). Se trabaja en atmósfera inerte (Ar) durante calentamiento para reducir reacciones químicas no deseadas.

A veces, se utilizan modificadores de matriz que forman complejos con el analito y permiten incrementar la temperatura de vaporización y eliminar efectos de interacción entre el analito el horno. Aumentan la volatilidad de la matriz o disminuye la volatilidad del analito, mejorando la separación entre matriz y analito. En el análisis de manganeso en agua de mar, gran parte de la absorbancia aparente que se produce se debe a la dispersión de la radiación producida por el humo formado durante la calefacción de NaCl siguiendo el perfil de temperaturas (figura 7.11) en un horno de grafito. Se produce una interferencia en la medida de Mn (durante la atomización) que puede ser significativamente reducida al añadir NH_4NO_3 a la muestra. Este compuesto reacciona con NaCl para dar NH_4Cl y NaNO_3 que son más volátiles que NaCl y se evaporan limpiamente sin formar humo.

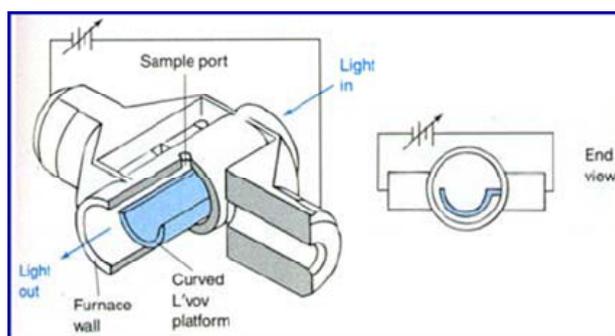
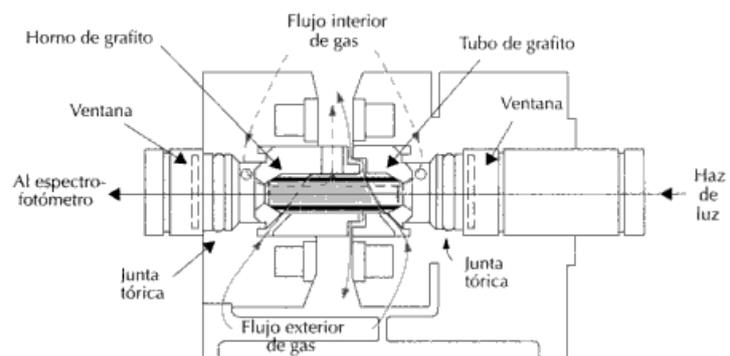


Fig. 7.10. Sección longitudinal de un horno de grafito (arriba). Plataforma de L'vov y su posición en el horno de grafito (abajo).

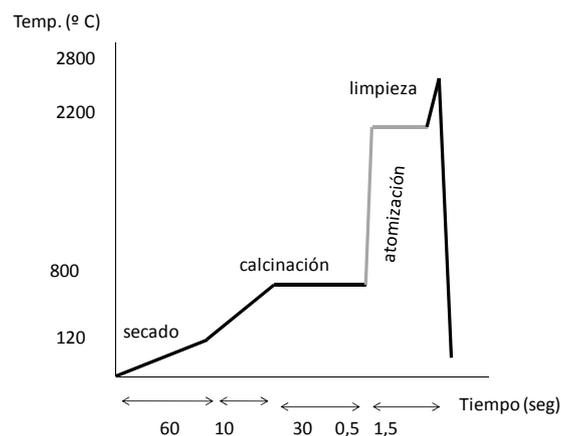


Fig. 7.11. Ciclo de calentamiento en el proceso de separación entre los analitos y la matriz en un horno de grafito.

7.3.2. Atomización con llama.

Es un sistema de atomización utilizado para muestras líquidas en espectroscopía de absorción y de emisión atómica. Como los gases de la llama diluyen la muestra, se necesita una llama con trayectoria larga para obtener altas sensibilidades (la absorción aumenta al aumentar la trayectoria del paso óptico). Para ello se utiliza un quemador de ranura en un mechero de flujo laminar conectado con un nebulizador neumático de tubo concéntrico (figura 7.12.).

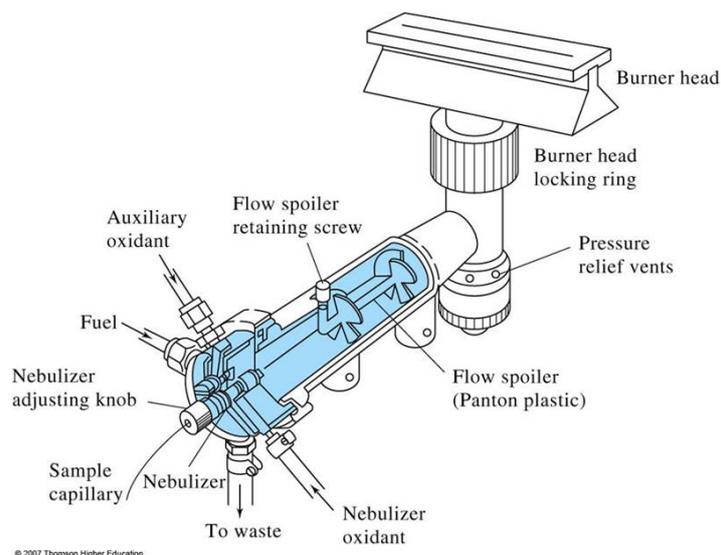


Fig. 7.12. Quemador de flujo laminar para la atomización con llama.

El aerosol formado en el nebulizador se mezcla con el flujo de gas oxidante y de combustible y pasa a través de una serie de deflectores que eliminan las gotas de disolución que no sean suficientemente finas. La mayor parte de la muestra se recoge en el fondo de la cámara de mezcla donde se drena hacia un contenedor de desechos. El 5-10% del aerosol, el oxidante y el combustible se queman en el mechero de ranura (5-10 cm de largo). Los mecheros de flujo laminar proporcionan una llama relativamente estable y larga que permite aumentar la sensibilidad y la reproducibilidad. Existen reguladores de presión de doble diafragma y válvulas de aguja para disminuir la presión, porque la mezcla es potencialmente explosiva en la cámara de mezcla si el caudal es demasiado bajo y pudiese haber retroceso en la llama.

La elección del combustible y el oxidante para generar la llama depende de la temperatura que se desea alcanzar así

como de los elementos que se quieren determinar (ver tabla 7.1.).

Tabla 7.1. Propiedades de las llamas

Combustible	Oxidante	Temperatura (°C)	Velocidad máxima de calor (m/s)
Gas Natural	Aire	1700 – 1900	39 – 43
Gas Natural	Oxígeno	2700 – 2800	370 – 390
Hidrógeno	Aire	2000 – 2100	300 – 440
Hidrógeno	Oxígeno	2550 – 2700	900 – 1400
Acetileno	Aire	2100 – 2400	158 – 266
Acetileno	Oxígeno	3050 – 3150	1100 – 2480
Acetileno	Oxido nitroso	2600 - 2800	285

El combustible y el oxidante se mezclan en proporción estequiométrica. Sin embargo, en la determinación de metales que forman óxidos estables es más conveniente el empleo de una llama que contenga un exceso de combustible.

El sistema de medida de caudal de gases más empleado es el rotámetro (tobo cónico graduado y transparente, montado en vertical. El flujo de gas levanta un flotador liviano, esférico o cónico, cuya posición determina el caudal.

La figura 7.13. muestra las diferentes regiones de temperatura de la llama. El cono interno o zona de combustión primaria es donde ocurre la desolvatación de la muestra. En esta zona no se alcanza el equilibrio térmico. En la región interconal (un centímetro por encima del cono interno) se alcanza la temperatura máxima y es la región de interés, donde se produce la atomización. Por eso, debe ajustarse la altura del quemador para encontrar la región de absorbancia/emisión óptima para cada elemento. Los productos formados en la zona interior de la llama se

convierten en óxidos moleculares estables que se dispersan en el cono externo o zona de combustión secundaria.

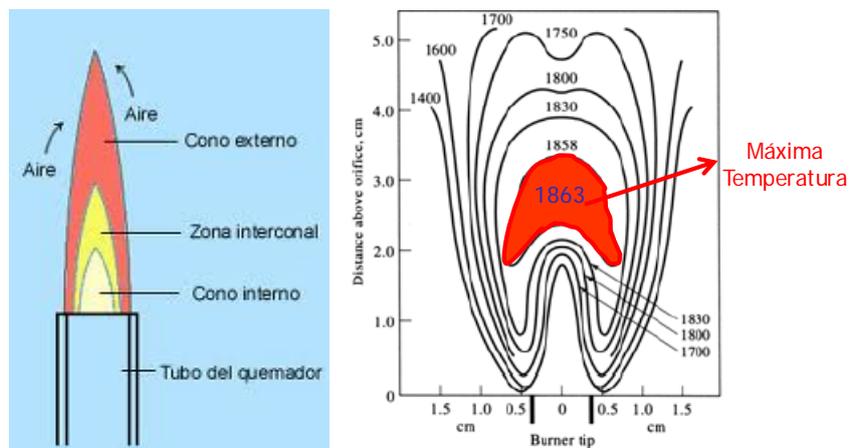


Fig. 7.13. Estructura de la llama (izquierda). Perfiles de temperatura en °C para una llama de gas/aire (derecha)

La velocidad de combustión es importante porque las llamas sólo son estables en ciertos intervalos. El tamaño de la llama varía dependiendo del combustible y del oxidante.

En zonas menos calientes de la llama, existe una concentración de átomos no excitados que absorben (autoabsorción) radiación emitida por los átomos excitados (AES). El efecto es un ensanchamiento de banda y una menor señal registrada en el detector.

7.3.3. Atomización con plasma

Un plasma es un gas ionizado por interacción con un campo electromagnético en unas condiciones de presión adecuadas. Para originar el plasma es necesario un aporte externo de energía que provoque la ionización del gas y la mantenga estacionaria. En función de cómo se aporte esa energía externa, se han desarrollado tres tipos de fuentes de alimentación:

Fuente de corriente continua (DCP)

Fuente de microondas (MIP)

Campo de radiofrecuencia (ICP)

La figura 7.14 muestra una antorcha de plasma ICP, el más utilizado en espectrometría de emisión atómica. El argón se excita e ioniza mediante la energía de radiofrecuencia que se emite desde una bobina de inducción situada en la base del plasma. El plasma que se forma es hueco, y el analito pasa a través de la región hueca mediante una corriente de gas. Los gases que transportan la muestra nebulizada fluyen de abajo arriba junto con otra corriente de gas refrigerante para enfriar la antorcha de cuarzo. El plasma se suspende alejado de las paredes de cristal a través de una combinación de la ruta helicoidal del flujo del gas enfriador y la forma de la radiofrecuencia del campo electromagnético. La separación evita que las altas temperaturas alcanzadas (3000-8000 °K) fundan la sílice. Tanto el flujo helicoidal del gas como la forma del plasma ayudan a mantener la antorcha con los gases más calientes.

La introducción de muestra al sistema puede realizarse mediante nebulizador neumático, ultrasónico y vaporización electrotérmica.

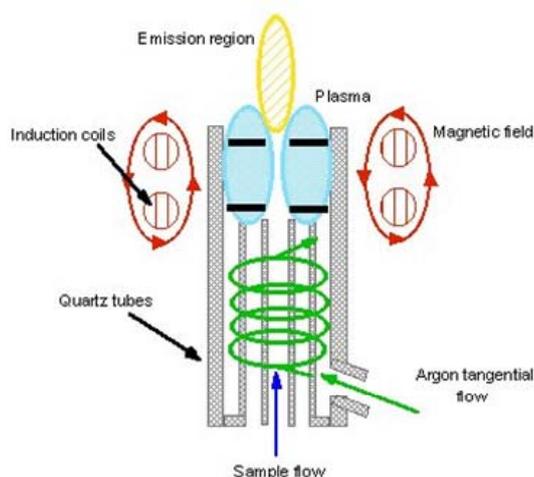


Fig. 7.14. Esquema de una antorcha de plasma ICP.

Ventajas de la utilización del plasma ICP como sistema de atomización:

- Elimina muchas interferencias por la presencia del gas inerte.
- Alcanza mayor temperatura y más uniforme que la llama.
- Tiempo de residencia mayor que en la llama.
- Atomización del analito más completa y señal mayor.
- Formación despreciable de óxidos e hidróxidos del analito.
- Libre de radiación de fondo.
- Autoabsorción poco importante con respecto a llama.
- Curvas de calibrado lineales (5 órdenes de magnitud).
- Posibilidad de configuración vertical o radial y horizontal o axial (alineada con el espectrómetro) (figura 7.15.).

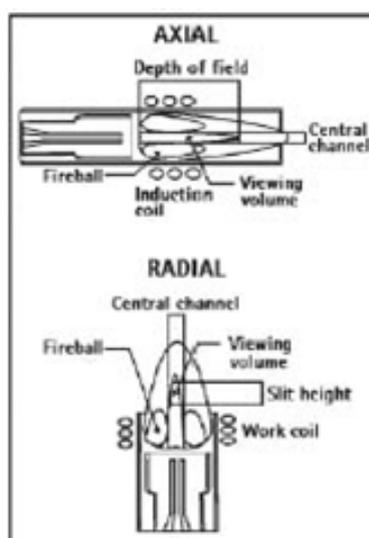


Fig. 7.15. Diferente diseño de antorcha ICP. La configuración axial proporciona un volumen de plasma observado mayor. Esto se traduce en una mayor sensibilidad. La desventaja es que requiere penetrar a través de penacho, dando lugar a variaciones de temperatura que producen interferencias analíticas. Se debe utilizar un gas inerte de desvío.

El plasma inducido por microondas (MIP) se utiliza en la interfase de cromatografía de gases cuando se utiliza un detector de emisión atómica (GC-MIP-AED), como se muestra en la figura 7.16.

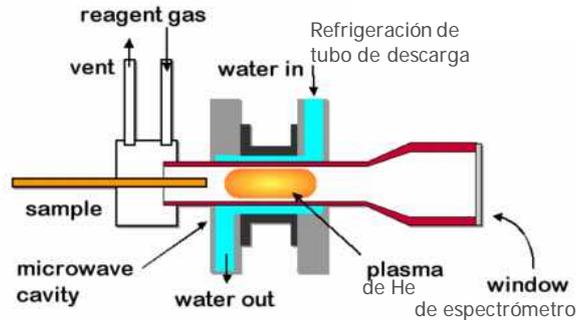
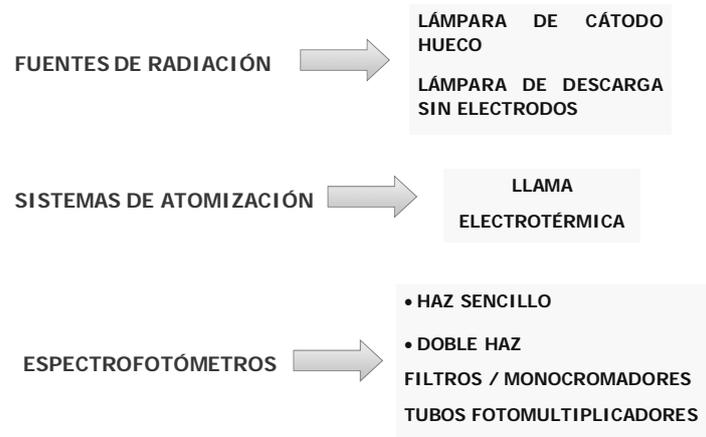


Fig. 7.16. Cavidad de plasma MIP.

La muestra llega a la cavidad del plasma o tubo de descarga a través de la columna cromatográfica. Una vez que el analito es atomizado y excitado emite radiación que es detectada. Existe un sistema de control de venteo para que el disolvente de la muestra no entre en el plasma, produciendo depósitos de carbón en el tubo de descarga.

7.4. Instrumentación en espectrometría de absorción atómica (AAS). Aplicaciones.



La figura 7.17. muestra el despiece general de un espectrómetro atómico para absorción.

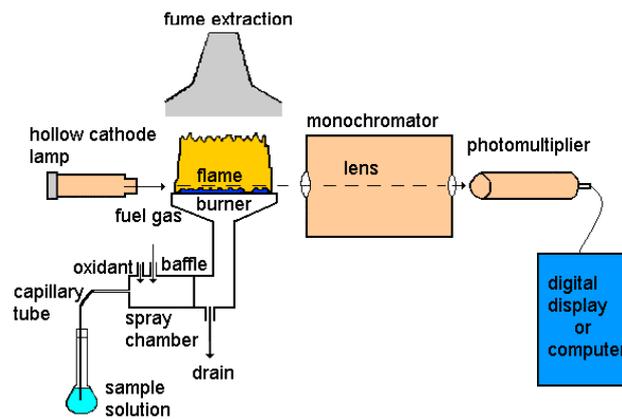


Fig. 7.17. Componentes básicos de un instrumento AAS con atomización de llama.

7.4.1. Fuentes de radiación

Fuentes de radiación que emiten una única línea estrecha del elemento que se analiza. En la figura 7.18. se comparan las anchuras de líneas correspondientes al espectro producido por la emisión de una fuente (a), el espectro de absorción de la muestra (b) y el espectro de emisión de la muestra (c). La anchura de la línea del espectro de absorción es 10-100 veces mayor que la línea de emisión

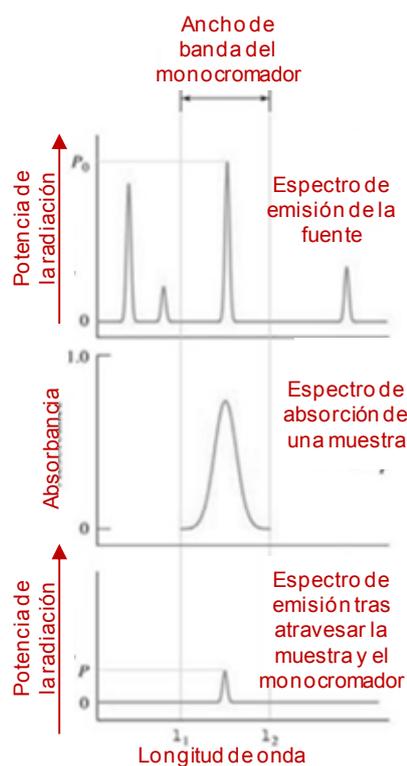


Fig. 7.18. Comparación de anchuras de líneas de espectros.

Lámpara de cátodo hueco

De uso más corriente en AAS, porque producen líneas de emisión estrechas de los elementos que la componen. Consta de un ánodo de wolframio y cátodo cilíndrico del

metal de interés (de 1 a 3 elementos). Ambos electrodos están encerrados herméticamente en un tubo de vidrio con neon o argón en su interior (figura 7.19.).



Fig. 7.19. Lámpara de cátodo hueco (abajo). Esquema de sección transversal (arriba).

Cuando se aplica un potencial del orden de 300 v entre los dos electrodos se produce la ionización del gas inerte y da lugar a una corriente de 5-15 mA y los iones y electrones migran hacia los electrodos. Si el potencial es lo suficientemente grande, los cationes gaseosos arrancan átomos metálicos de la superficie del cátodo y producen una nube atómica (sputtering). Una parte de los átomos metálicos desprendidos se encuentran en estado excitado y al volver al estado fundamental emiten su radiación característica. Los átomos metálicos se vuelven a depositar en el cátodo o en las paredes de vidrio del tubo. Su configuración cilíndrica aumenta la probabilidad de deposición del metal sobre el cátodo.

La eficacia de la lámpara de cátodo hueco depende de su geometría y del potencial aplicado. Potenciales elevados producen intensidades de corriente elevadas. Las corrientes elevadas pueden producir un aumento del número de átomos no excitados, que son capaces de absorber la radiación emitida por los átomos excitados. Esta autoabsorción reduce la intensidad sobre todo en el centro de la banda de emisión.

Lámpara de descarga sin electrodos

Son fuentes de espectros atómicos de líneas que producen intensidades radiantes 1-2 órdenes de magnitud mayores que la lámpara de cátodo hueco. Consta de un tubo de cuarzo herméticamente cerrado que contiene un gas inerte a baja presión y una pequeña cantidad de metal o su sal, cuyo espectro se desea obtener (figura 7.20.). Para su activación se utiliza radiación de microondas o un campo intenso de radiofrecuencias, que produce la ionización del argón. Los iones de Ar acelerados excitan a los átomos del metal. Estas fuentes existen para 15 o más elementos. Presentan el inconveniente de ser menos estables que las lámparas de cátodo hueco, produciendo un aumento de la relación S/R.

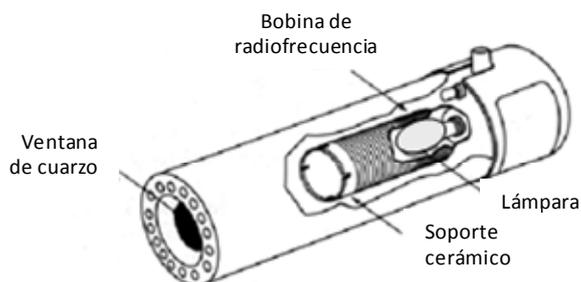


Fig. 7.20. Sección de una lámpara de descarga sin electrodos.

7.4.2. Sistemas de atomización

Habitualmente los sistemas de atomización utilizados en AAS son la atomización con llama y con cámara de grafito o atomización electrotermia (ambas descritas en los apartados 7.3.1 y 7.3.2. de este tema).

7.4.3. Espectrofotómetros

La figura 7.21. muestra configuraciones instrumentales de espectrómetro de haz simple y doble haz, respectivamente.

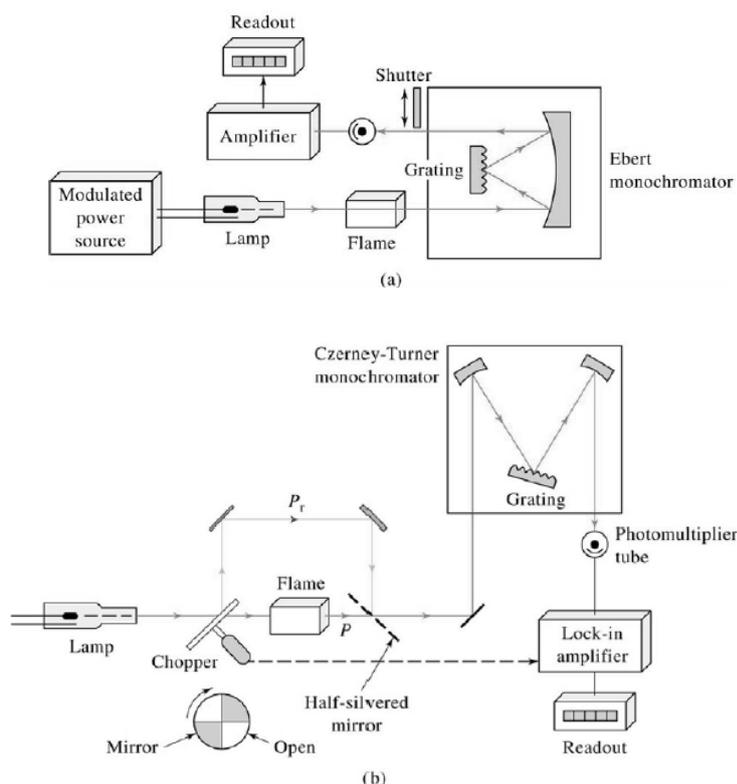


Fig. 7.21. Espectrómetros de haz simple (a) y doble haz (b).

En ambos casos el detector es un tubo fotomultiplicador. El cortador (chopper) de la figura 7.21.b proporciona un haz de radiación intermitente, desde la fuente, que permite modular

y eliminar la corriente continua que proviene de la llama (interferencias de átomos excitados que emiten radiación). La figura 7.22 muestra dos equipos comerciales de AAS, con atomización de llama y con cámara de grafito.

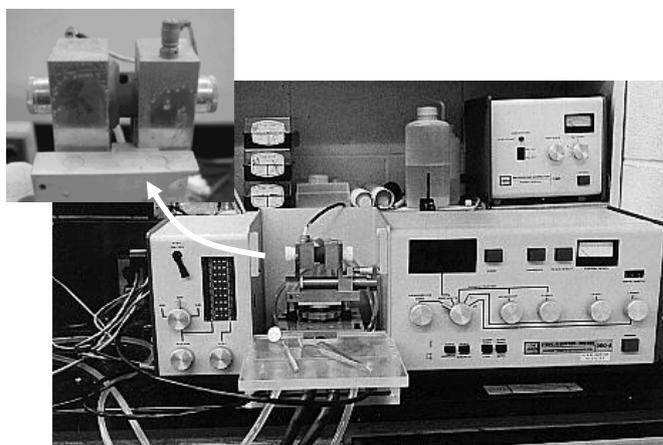


Fig. 7.22. Equipo AAS con atomizador de llama (arriba) y con atomización electrotérmica (abajo). Detalle de la cámara de grafito.

La figura 7.23. muestra la configuración para un equipo de AAS-SF (en modo secuencial rápido). La diferencia respecto al AAS convencional radica en la disponibilidad de un sistema

de lámparas de cátodo hueco fijas y un espejo rotatorio que las puede enfocar secuencialmente.

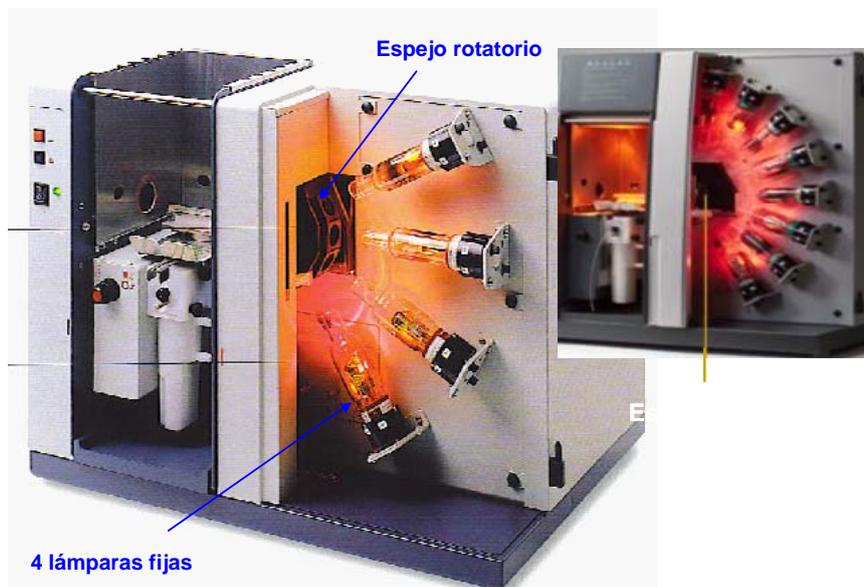


Fig. 7.23. Equipo de AAS-SF (modo secuencial rápido) con 4 lámparas y con 8 lámparas (cuadro superior derecha).

Ventajas de AAS convencional:

- Técnica sencilla y muy establecida.
- Coste de inversión asequible y bajo coste de operación.
- Interferencias de matriz conocidas e interferencias espectrales escasas.

Ventajas de AAS-SF:

- Medir 5-10 elementos en la misma muestra (mayor rapidez de análisis)
- Varias lámparas y un enfoque móvil motorizado (espejo)
- Entrada de muestras con 1 bomba que permite dilución on-line.
- Entrada de muestras con 2 bombas que permite utilizar el método de adición o la adición de matriz.

En la actualidad también existen diseños instrumentales que permiten combinar dos sistemas de atomización en el mismo equipo (AAS-DUO) para analizar simultáneamente concentraciones traza y ultratrazas de elementos y beneficiarse de las ventajas de ambas técnicas de atomización.

Características de la atomización con llama:

- Alto factor de dilución.
- Aporte de 10% de muestra (90% va al desecho).
- Mínimo tiempo de residencia.
- Atomización afectada por muchas variables.
- Menor tiempo de análisis.
- Adecuada para gran número de elementos.
- Mide concentraciones traza.

Características de la atomización con cámara de grafito:

- No existe dilución.
- Aporte de 100% de muestra.
- Alto tiempo de residencia, hasta 1000 veces más sensibilidad
- Mayor tiempo de análisis.
- Volumen de trabajo relativamente bajo.
- Adecuada para menos elementos.
- Mide concentraciones ultratrazas.

7.5. Interferencias químicas en espectroscopía de absorción atómica (AAS).

Son las interferencias más importantes que aparecen en esta técnica. Surgen cuando un compuesto químico presente en la muestra o que se forma en la llama, reduce el grado de atomización del analito de interés.

1. Formación de óxidos, hidróxidos, carburos o nitruros metálicos térmicamente estables (Al, V, Zn, Si, Ta, W). Se corrige utilizando:

- Llamas reductoras al aumentar el flujo de combustible. Esto permite reducir las especies oxidadas del analito que podían impedir la atomización.

-Llamas con altas temperaturas (utilizando óxido nitroso, N_2O , como oxidante) para aumentar el grado de disociación de estos compuestos.

2. Presencia de aniones que forman compuestos muy estables con el analito, difíciles de disociar y que reducen la población de átomos neutros (SO_4^{2-} , PO_4^{3-} , SiO_4^{2-}). Se corrige utilizando:

- Agentes liberadores como La o Sr, que reaccionan con los aniones interferentes, impidiendo que éstos lo hagan con el analito de interés.

-Agentes complejantes como AEDT, que forma complejos estables con muchos cationes metálicos (el analito de interés) que se descomponen fácilmente en la llama.

3. Ionización del analito de interés que se produce a altas temperaturas de la llama. La absorción de los iones es diferente que la absorción atómica. Se corrige utilizando:

- Un supresor de ionización. La presencia un elemento fácilmente ionizable de modo que las concentraciones de dicho ion y de los electrones aumentan en la llama, disminuyendo la ionización del analito de interés. El grado de ionización depende del potencial de ionización del supresor, de la concentración del analito (la ionización aumenta al disminuir la concentración), la temperatura de la llama y la presencia de elementos fácilmente ionizables. La figura 7.24. muestra un ejemplo de aplicación de supresor de ionización. Las concentraciones de potasio y de electrones aumentan produciendo una disminución de la ionización de analito de interés (Sr).

Aumenta la pendiente de la curva de calibrado al anular la ionización del analito, aumentando la sensibilidad.

Aumenta sensibilidad al utilizar N_2O en lugar de aire, aumentando la temperatura en la llama, lo que produce un aumento de la velocidad de descomposición y volatilización de los compuestos del analito.

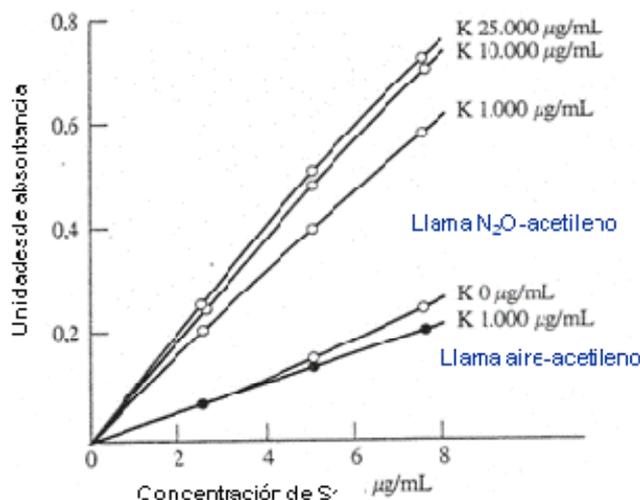


Fig. 7.24. Efecto de la concentración de potasio sobre la curva de calibrado del Sr. Las curvas con puntos blancos se realizaron con N₂O como oxidante en la llama.

7.6. Instrumentación en espectroscopía de emisión atómica (AES). Aplicaciones.

La metodología de espectroscopía de emisión atómica es para análisis cuantitativo y cualitativo (unielemental). Es adecuada para gran número de elementos pero presenta ciertos inconvenientes: necesita elevada resolución, presenta problemas con interferencias espectrales (utilizar correctores de fondo para solventar problemas de radiaciones procedentes de otros elementos y la superposición de líneas de emisión sobre bandas emitidas por óxidos, gases de la llama y otros compuestos de la muestra) y son dependientes de la temperatura.

Los espectrómetros para emisión atómica con llama utiliza la misma instrumentación que en AAS (ver figura 7.23. superior). En este caso no se utiliza la fuente externa (lámpara de cátodo hueco), la atomización y la excitación de

los átomos ocurre con la temperatura de la llama (figura 7.25.)

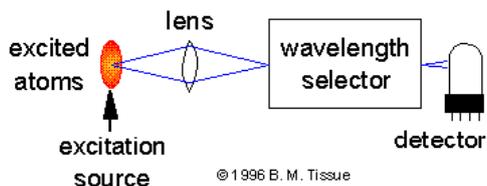


Fig. 7.25. Componentes básicos en un diseño de AES con llama.

En este caso es necesario optimizar una serie de parámetros con el fin de mejorar la sensibilidad de las medidas:

- a) Caudal de gases.
- b) Posición del mechero (llama).
- c) Selección de longitud de onda de línea espectral.
- d) Selección del ancho de rendija.

La instrumentación más utilizada con fuente de plasma (atomización y excitación de la muestra) para el análisis de concentraciones traza, responde al diseño de un espectrómetro de emisión atómica con plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES) como el de la figura 7.26.

Se utiliza para el análisis de cationes y metales en todo tipo de muestras líquidas o sólidas disueltas en diferentes tipos de disolventes, bien sea orgánicos u inorgánicos.

Las características técnicas más importantes son:

- Sistema óptico basado en doble monocromador.
- Rango de longitud de onda: 160-900 nm.
- Detector de estado sólido con matriz de diodos.
- Generador de radiofrecuencias de 40 MHz. Plasma axial y radial.
- Cámara de premezcla, nebulizador de flujo cruzado.
- Nebulizador ultrasónico.



Fig. 7.26. Equipo ICP-AES.

Para completar la instrumentación ICP-AES, existen diseños que permiten trabajar con un mayor rango dinámico (lineal) pero que presentan mayor número de interferencias (se excitan más sustancias a mayor temperatura) y por tanto exigen un mayor coste en la inversión y el mantenimiento operacional. Se trata de sistemas:

ICP-AES secuencial que dispone de un detector y un sistema dispersivo (red de difracción) móvil. Permite un volumen de trabajo moderadamente alto (análisis de 12 elementos en 3 min). Es flexible para programar las λ y ofrece una buena resolución espectral (0.005 nm).

ICP-AES simultáneo (multicanal) que dispone de varios detectores (tubos fotomultiplicadores, CCD) y un sistema dispersivo especial (un prisma y una red combinados o un monocromador de red cóncava) inmóvil (figura 7.27.). El tiempo de análisis disminuye considerablemente y los resultados son más completos (mapas de imágenes con 70.000 pixels, con CCD). Consigue analizar 73 elementos en unos pocos segundos.

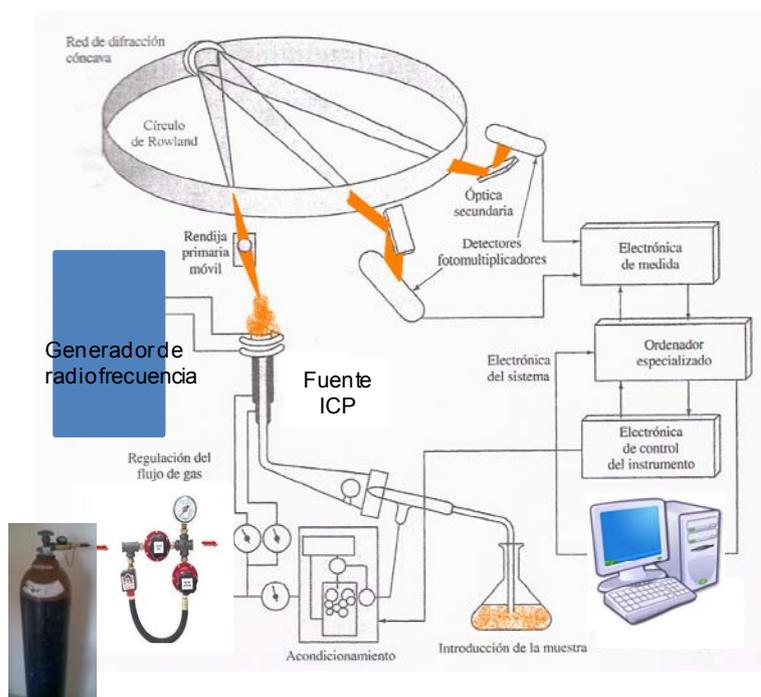


Fig. 7.27. Policromador ICP-AES. La radiación procedente de varias rendijas se refleja en espejos y se dirige hacia los tubos fotomultiplicadores.

Este tipo de instrumentación se utiliza para el análisis de rutina de control de fabricación de aleaciones. Consigue medir más de 20 elementos en 5 min. Destacar la utilización de hasta 60 fotomultiplicadores colocados detrás de rendijas en un plano focal curvado de un monocromador de red cóncava (círculo de Rowland).

Otro diseño interesante, desarrollado en Japón, es el utilizado en el control de proceso en un alto horno para el análisis in-line de metales calientes (Si, Mn...) y azufre en acero fundido (figura 7.28.)

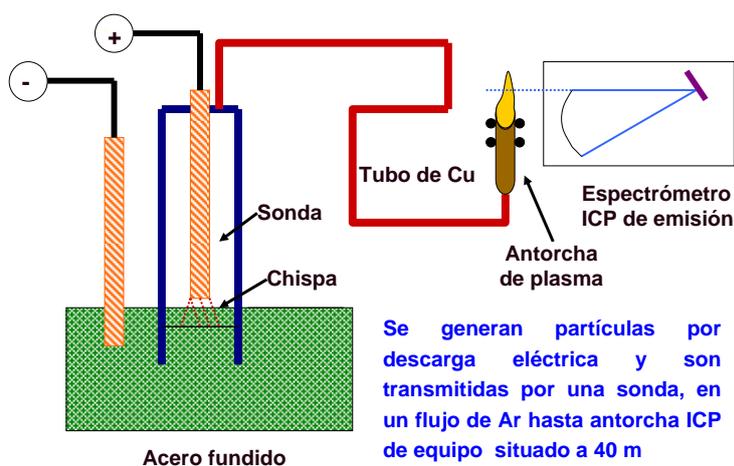


Fig. 7.28. Esquema de un generador de aerosol mediante excitación con chispa y espectrometría ICP-AES de una analizador in-line.

El análisis de detergentes, que normalmente contienen surfactantes aniónicos y varios ingredientes, necesitan disolventes orgánicos (Ej. cloroformo) para las extracciones y valoraciones. Estos métodos analíticos quedan desfasados por costes y efectos nocivos en el medioambiente, en detrimento del análisis instrumental mediante ICP-AES. Siguiendo el protocolo de la figura 7.29. en la preparación de la muestra se redisuelve e hidroliza el precipitado, eliminando los disolventes y reduciendo el tiempo de análisis.

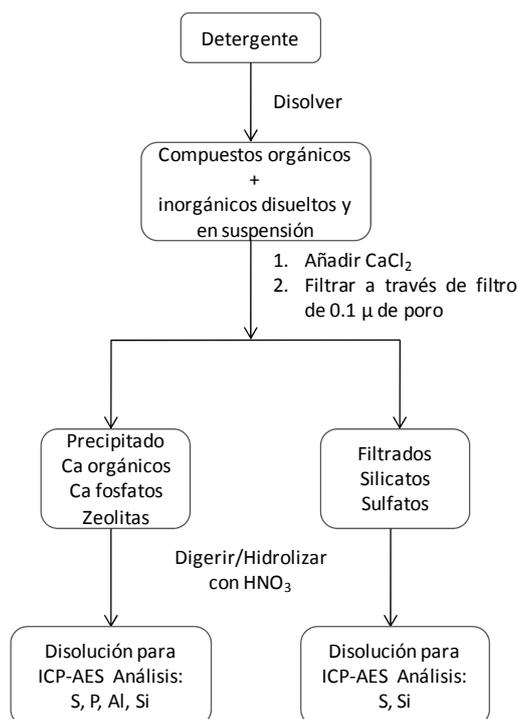


Fig.7.29. Esquema de las etapas del análisis de los componentes de un detergente mediante ICP-AES.

La figura 7.30. muestra una tabla periódica con los elementos y sus correspondientes límites de detección (LODs) para la técnica de ICP-AES.

Laser-Induced Breakdown Spectroscopy (LIBS) es un tipo de espectroscopía de emisión atómica que utiliza la potente energía del láser pulsado como fuente de excitación. El láser se enfoca sobre el material para formar un plasma, que disocia por ablación (descomposición) el material. Se produce la atomización y excitación las muestras. No requiere preparación de muestra y se utiliza para el análisis elemental de diversos materiales (figura 7.31.).

H																	He
Li 2	Be 0.1											B 3	C 40	N	O	F	Ne
Na 5	Mg 0.1											Al 5	Si 4	P 50	S 50	Cl	Ar
K 70	Ca 0.1	Sc 0.3	Ti 0.5	V 3	Cr 3	Mn 0.4	Fe 3	Co 3	Ni 7	Cu 1	Zn 3	Ga 10	Ge 20	As 20	Se 50	Br	Kr
Rb 100	Sr 0.06	Y 0.3	Zr 0.8	Nb 5	Mo 5	Tc	Ru 8	Rh 8	Pd 2	Ag 2	Cd 2	In 40	Sn 30	Sb 40	Te 50	I	Xe
Cs 50000	Ba 0.1	La 1	Hf 15	Ta 20	W 20	Re 10	Os 0.4	Ir 20	Pt 30	Au 5	Hg 50	Tl 50	Pb 40	Bi 20	Po	At	Rn
Fr	Ra	Ac															

Ce 10	Pr 40	Nd 50	Pm	Sm 40	Eu 3	Gd 20	Tb 20	Dy 10	Ho 6	Er 10	Tm 5	Yb 2	Lu 1
Th 70	Pa	U 20	Np	Pu	Am	Cm	Bk	Cf	Es	Fm	Md	No	Lw

Fig. 7.30. Límites de detección en ICP-AES para los elementos de la tabla periódica.

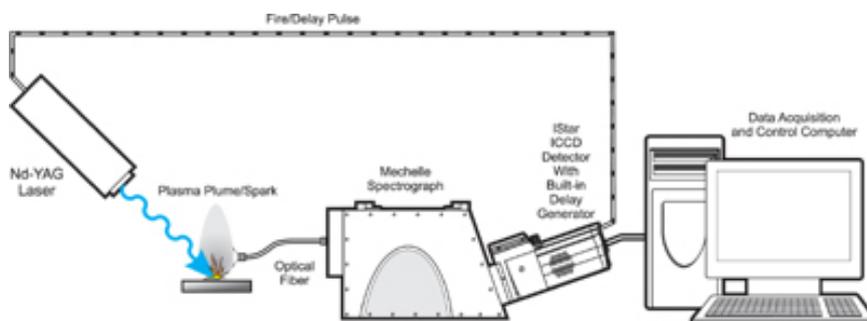


Fig. 7.31. Configuración instrumental para LIBS. La transmisión de radiación emitida por el material excitado por el láser se realiza a través de fibra óptica, conectada a un detector CCD.

7.7. Interferencias químicas en espectroscopía de emisión atómica (AES).

Similar a lo descrito en AAS. Se utilizan los mismos procedimientos de corrección (Ej. Agentes liberadores).

El análisis cuantitativo requiere el uso de curvas de calibrado con un intervalo lineal adecuado. En AES se producen dos fenómenos dependiendo de la concentración del analito de interés:

- Ionización (descrito en el apartado 7.5. de este tema): se produce a baja concentración del analito, con llamas a temperaturas relativamente bajas. Es necesario utilizar supresores de ionización que limiten la ionización del analito de interés.

- Autoabsorción: se produce a concentración alta del analito. El centro de la llama está más caliente que la parte externa. Por ello, la radiación emitida por los átomos excitados de la zona central de la llama puede ser, en parte, absorbida por los átomos de analito de la zona más fría que no han sido excitados. Se corrige utilizando alguna línea que no sea de resonancia o utilizar un calibrado de patrón interno.

7.8. Bibliografía

D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER and S.R. CROUCH
“**Fundamentos de Química Analítica**” 8º Ed. Thomson Madrid
(2005).

D.A. SKOOG, F.J. HOLLER and T.A. NIEMAN “**Principios de
Análisis Instrumental**” 5º Ed. Mc Graw Hill Madrid (2001).

K.A. RUBINSON and J.F. RUBINSON ” **Análisis Instrumental**” Ed
Prentice Hall. Madrid (2000).

D.C. HARRIS “**Análisis Químico Cuantitativo**” 2ª Ed. Ed. Reverté
S.A. Barcelona (2001).

http://www.shsu.edu/%7Echm_tgc/sounds/pushmovies/ICP.gif

TEMA 8. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS I

Objetivos

- ✓ Adquirir los conceptos básicos necesarios para optimizar una separación cromatográfica
- ✓ Conocer el fundamento de las separaciones por cromatografía de gases
- ✓ Adquirir los conocimientos básicos de los diferentes componentes de un cromatógrafo de gases
- ✓ Resaltar los parámetros que afectan al desarrollo de métodos.
- ✓ Mostrar la viabilidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de compuestos volátiles y no volátiles mediante cromatografía de gases.
- ✓ Interpretar y aplicar los conocimientos básicos sobre cromatografía de gases al control de procesos.

8.1. Generalidades de la cromatografía

La cromatografía es un método analítico utilizado ampliamente en la separación, identificación y determinación de compuestos químicos en mezclas complejas.

Existe una gran variedad de sistemas y técnicas cromatográficas pero todos tienen en común la utilización de una fase móvil (FM), gas o líquida, que transporta los componentes de la muestra a través de la fase estacionaria (FE). Los componentes a separar deben de ser solubles en la FM, pero deben de ser capaces de interaccionar con la FE. Así, durante la separación cromatográfica, los analitos se distribuyen entre las dos fases. La separación está basada en la diferencia de velocidad de migración entre los componentes de muestra. El movimiento relativo de cada molécula es resultado de un equilibrio dinámico entre dos fuerzas antagonistas:

- Las que desplazan a las moléculas en el seno de la FM.

- Las que frenan el desplazamiento por interacciones con la FE y son de distinta naturaleza según el tipo de cromatografía.



El botánico ruso Mikhail Tswett consiguió separar por primera (1903) vez pigmentos de plantas (xantofila, clorofila y α y β -caroteno) formando bandas de color en una columna de partículas finamente divididas en carbonato cálcico al añadir éter de petróleo.

8.2. Clasificación de los métodos cromatográficos.

8.2.1. Mecanismos de separación.

- a) Separación por adsorción (cromatografía de adsorción)
Basada en la diferente afinidad de los componentes de la muestra sobre la superficie de un sólido activo (componentes con polaridad baja o media).
- b) Separación por tamaño molecular (Cromatografía de permeación de gel, de tamiz molecular o de exclusión por tamaños).

La FE sólida es un gel poroso que retiene moléculas dependiendo de su tamaño.

c) Separación por Intercambio iónico

La separación se basa principalmente en la diferente afinidad de una FE sólida para el intercambio de iones de los componentes de la muestra.

d) Separación por reparto (cromatografía de reparto)

Basada en la diferente solubilidad en fases estacionaria y móvil (Componentes con polaridad media o alta).

$$\text{Coeficiente de Reparto} = K_d = \frac{[A]_{\text{Fase móvil}}}{[A]_{\text{Fase Estacionaria}}}$$

8.2.2. *Métodos de análisis cromatográfico.*

- Análisis por desarrollo (cromatografía en papel o capa fina).
- Análisis frontal.
- Análisis por desplazamiento.
- Análisis por elución (cromatografía de gases, cromatografía líquida). La muestra o soluto se reparte entre dos fases (equilibrio) y la separación se basa en la retención relativa. Si aumenta la longitud de la columna, el grado de separación se ve incrementado (figura 8.1.).

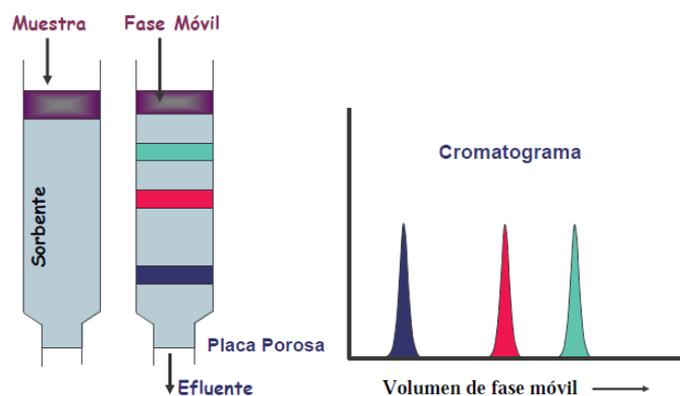


Fig. 8.1. Análisis por elución.

8.2.3. Clasificación de acuerdo con la forma del lecho cromatográfico.

a) Cromatografía en columna

- Columna empaquetada
- Columna tubular abierta

b) Cromatografía plana (o de lecho abierto)

- Cromatografía en papel
- Cromatografía en capa fina (TLC) (figura 8.2.).

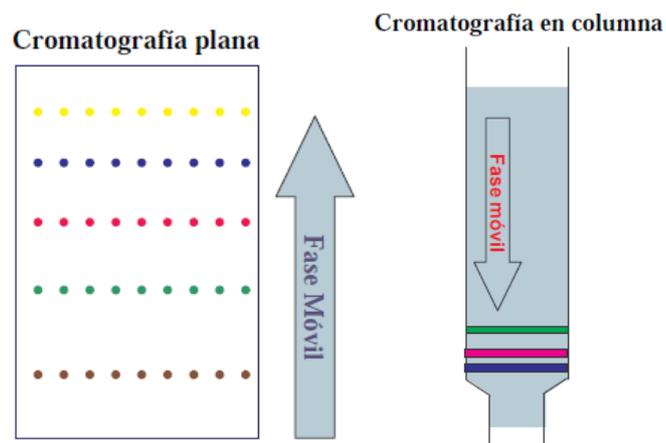


Fig. 8.2. Fundamento de la cromatografía plana (FE sobre superficie plana) y en columna (FE en interior de un tubo cilíndrico).

8.2.4. Clasificación según la naturaleza física de las fases.

ESTACIONARIA	MÓVIL	TIPO
SÓLIDA	LÍQUIDA	C. LÍQUIDO-SÓLIDO
	GAS	C. GAS-SÓLIDO
LÍQUIDA	LÍQUIDA	C. Líquido-líquido
	GAS	C. Gas-Líquido
	FLUIDO	C. Fase supercrítica
	SUPERCRÍTICO	

Tanto la cromatografía de gases (c. gas-líquido) como la cromatografía líquida (c. líquido-líquido) se desarrollan en una columna. Si al final de ella se coloca un detector que responde a la concentración del soluto y se registra su respuesta en función del tiempo o del volumen de FM que ha pasado a través de la columna, se obtienen una serie de picos más o menos simétricos que constituyen el cromatograma.

8.3. Parámetros básicos en cromatografía.

Los procesos cromatográficos no son estáticos. Diversos parámetros caracterizan el proceso de separación dinámico:

a) Retención: capacidad real de la fase estacionaria para retardar la salida de un componente. El tiempo de retención de un soluto (t_R) es el tiempo que transcurre desde el inicio hasta la señal máxima (Figura 8.3.).

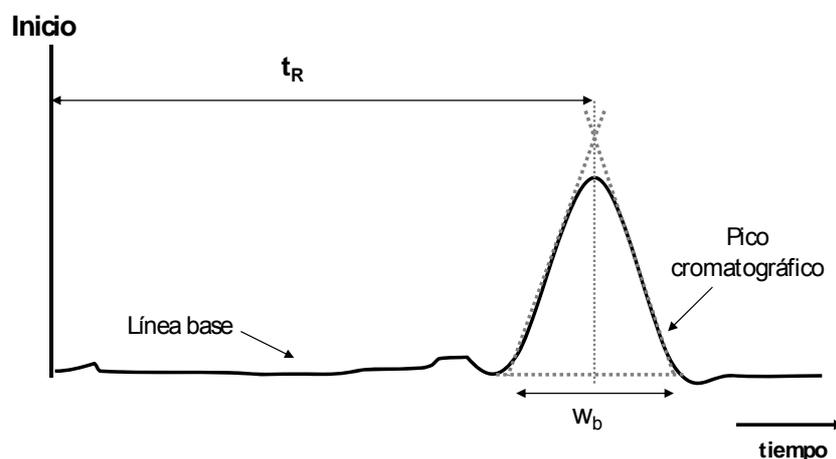


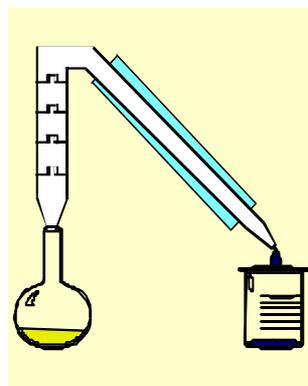
Fig. 8.3. Características de un pico cromatográfico.

La línea base es el registro cuando por la columna sólo pasa FM.

El pico cromatográfico es la señal del detector cuando emerge un componente de la columna.

El ancho de pico en la base (W_b) es utilizado para el cálculo del área de pico y para fijar su altura. Ambos parámetros están directamente relacionados con la concentración del analito y se utilizan en el análisis cuantitativo.

Martin y Synge en 1941 desarrollaron los aspectos teóricos de la separación cromatográfica. La llamada Teoría de platos está basada en procesos de destilación, tratando la columna como un sistema estático en equilibrio formado por una serie de estrechas capas horizontales (platos teóricos). En cada plato se produce una interacción o equilibrio entre el soluto y la FE (figura 8.4.).



b) Eficacia de la columna cromatográfica: poder de separación o resolución de la columna cromatográfica. Está relacionada con el ensanchamiento de banda. Implica la obtención de picos estrechos y puntiagudos (gaussianos) y bien separados. La eficacia se mide en función de dos parámetros:

- Altura de plato teórico, H
$$H = \frac{L}{n}$$

(L , longitud de columna)

- Número de platos teóricos, n
$$n = 16 \left(\frac{t_R}{\omega_b} \right)^2 \quad n = \frac{L}{H}$$

Cuanto menor es la altura del plato teórico, mayor es el número de platos o equilibrios, lo que supone una mayor resolución de la columna cromatográfica.

Debe evitarse el ensanchamiento de bandas. Depende de las características de columna, la velocidad de fase móvil, las características de los disolventes utilizados en la separación. La ecuación de Van Deemter relaciona todos

estos aspectos. Las variables importantes que afectan a la eficacia de la columna son: el diámetro de las partículas que constituyen el relleno (que sea reducido); el diámetro de la columna (que sea reducido); el espesor de la FE (cuando es un líquido adsorbido sobre soporte sólido, que sea reducido); los coeficientes de difusión en la FE que sean elevados, mientras que en la FM deben ser bajos (pueden reducirse bajando la temperatura).

c) Resolución: medida cuantitativa de la capacidad de la columna para separar los analitos. Está relacionada con la eficacia (figura 8.4.).

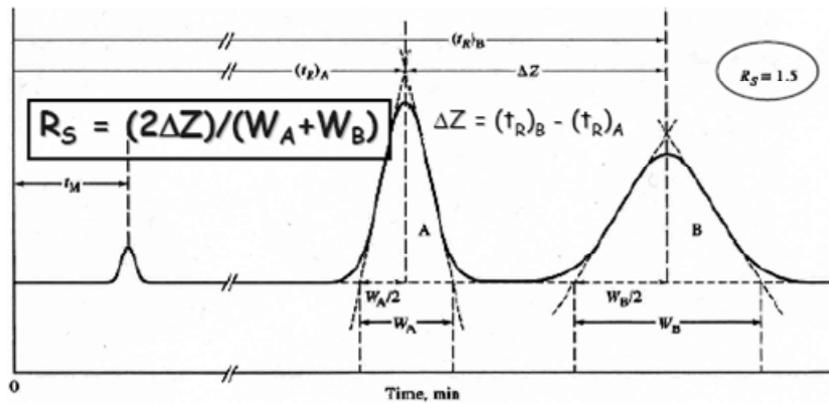


Fig. 8.4. Parámetros cromatográficos para el cálculo de la resolución entre los picos A y B teniendo en cuenta su ancho en la base del pico y sus respectivos tiempos de retención. ΔZ representa la distancia entre máximos de señal.

$$R_S = \frac{2\Delta Z}{w_{b(A)} + w_{b(B)}} = \frac{2(t_{R(B)} - t_{R(A)})}{w_{b(A)} + w_{b(B)}}$$

Se busca un valor de resolución máxima en un tiempo de análisis mínimo. La resolución se mejora aumentando la

longitud de la columna. Esto aumenta el número de platos teóricos. Pero al incrementar la L y n también lo hace el tiempo requerido para la separación. La figura 8.5. muestra tres ejemplos de resolución. Se observa que a a partir de un valor de $R_s=1.5$ se consiguen picos cromatográficos completamente resueltos.

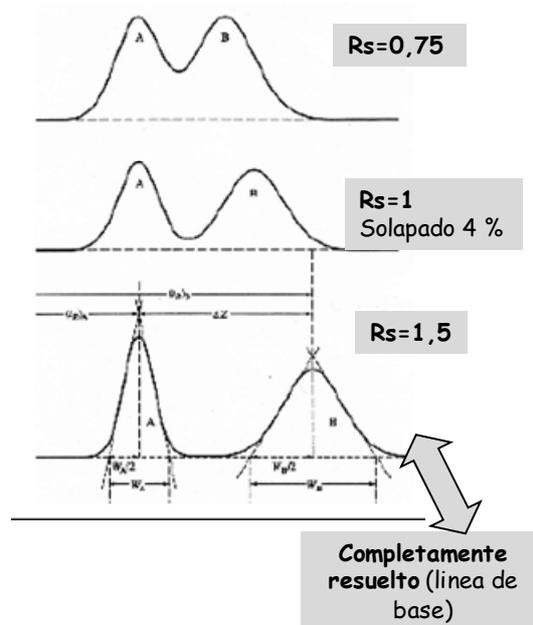


Fig. 8.5. Gráfico correspondiente a tres cromatogramas con diferente resolución entre picos.

8.4. Aplicaciones: análisis cualitativo y cuantitativo.

La utilidad de la cromatografía es clara, tanto para análisis cualitativo (la posición de los picos sirve para identificarlos según su tiempo de retención), como análisis cuantitativo (las áreas bajo los picos y las alturas son una medida cuantitativa de la cantidad de cada especie presente en la muestra).

Los picos cromatográficos son señales proporcionales a la concentración de los analitos que deben ser lineales en la calibración. Además cada compuesto responde cromatográficamente de forma diferente dando lugar a diferentes picos (factor de respuesta).

La presencia o ausencia de compuestos se puede confirmar comparando los t_R de los picos con los de patrones disponibles para esos compuestos, utilizando varios detectores buscando resultados selectivos y utilizando hibridación o acoplamiento con otras técnicas: GC-MS, LC-MS, etc.

Los resultados obtenidos a partir de áreas de pico (medida más precisa pues se ve menos afectada por irreproducibilidades) y de alturas (medida más adecuada cuando los picos son agudos y bien separados) son utilizadas en la calibración (método de patrón externo y patrón interno) y el tratamiento de datos (normalización de áreas).

8.5. Cromatografía de gases (Gas-Líquido)

Distribución de un componente entre una fase móvil (FM) gaseosa y una líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (FE). La muestra se volatiliza y es arrastrada por la fase móvil (gas inerte) a la cabeza de la columna cromatográfica. La FM y la FE no interaccionan. En la columna se produce la interacción de los solutos con la fase estacionaria, produciéndose la separación de los mismos.

La cromatografía de gases es el método de separación adecuado para analizar tanto compuestos orgánicos volátiles (con un punto de ebullición por debajo de los 250°C), como gases. Ambos grupos de compuestos poseen presiones de vapor suficientemente elevadas como para ser arrastrados por la fase móvil gaseosa.

Cuando los analitos no son volátiles, puede realizarse una reacción de derivatización, transformando ciertos grupos químicos que originan presiones de vapor bajas, en otros grupos que dan lugar a compuestos más volátiles (con

presiones de vapor relativamente altas). Por ejemplo transformando R-COOH en R-COOCH₃.

Tan solo el 20% de los compuestos orgánicos conocidos son analizados por cromatografía de gases.

8.6. Instrumentación en cromatografía de gases.

La muestra y el fin del análisis determinan la configuración del instrumento. Los componentes básicos (figura 8.6.) son:

-Gas portador (He, Ar, N₂, CO₂, H₂). Es la FM y se comporta como un gas ideal y no contribuye al proceso de separación, sólo sirve como portador de los componentes de la muestra a través de la FE.

-Sistemas de introducción/inyección de muestra. Los inyectoros reciben la muestra, la vaporizan instantáneamente y envían el material vaporizado a la cabeza de columna.

-Columna cromatográfica. Elemento esencial en cromatografía de gases, pues en ella ocurren los procesos físico-químicos en los que se basa la separación. Los solutos tienen distinta movilidad según los valores relativos de volatilidad/solubilidad.

-Sistemas de detección. Sistemas continuos de detección por el que pasa el gas portador procedente de la columna. Su misión es poner de manifiesto el paso de los analitos originando una señal eléctrica que es amplificadora, registrada y enviada al procesador.

-Sistema de adquisición y procesado de datos. Sistema informático que permite la integración de las señales y la calibración.

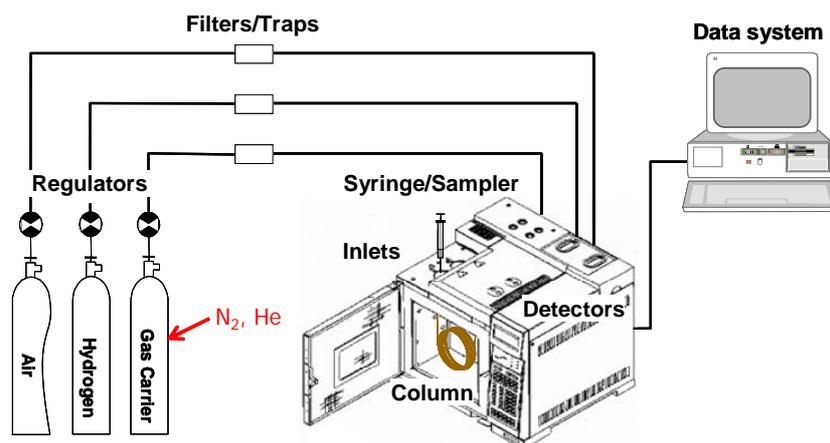


Fig. 8.6. Componentes básicos de un sistema GC.

8.6.1. Gas portador.

La elección de gas portador depende de la naturaleza de la muestra, de la FE y del detector que se utilice. El suministro de la FM se realiza desde botellas de gas que está a presión entre 10-50 psi (figura 8.7.). Los manómetros y reguladores de presión controlan el caudal de flujo ($1-15 \text{ mL min}^{-1}$ para columnas capilares y $25-150 \text{ mL min}^{-1}$ para columnas empaquetadas). La medida del caudal en cabeza de columna se realiza automáticamente mediante un rotámetro; al final de la columna cromatográfica la medida se lleva a cabo con un medidor de burbuja o mediante un dispositivo electrónico del propio sistema GC (figura 8.8.). Estos sensores de flujo electrónicos son detectores de conductividad térmica modificado. Permiten una medida continua del flujo. Debe ser calibrado para que las medidas sean exactas. La respuesta variará en función del gas portador.

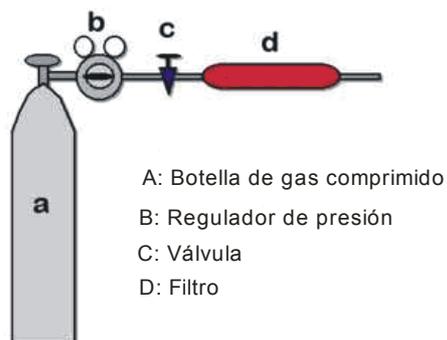


Fig. 8.7. Contenedor de gas para FM en sistema GC.

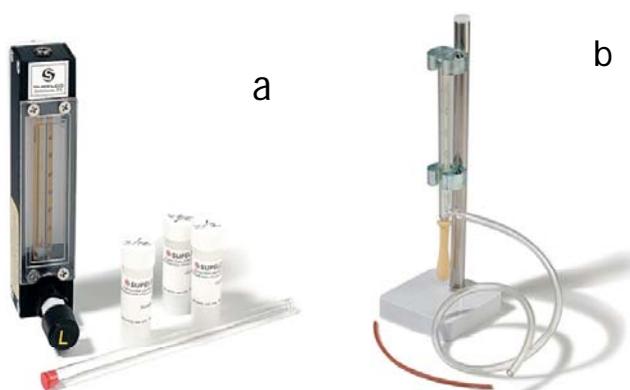


Fig. 8.8. Medidores de caudal de gas portador (a) rotámetro, (b) medidor de burbuja.

8.6.2. Sistemas de inyección

Dependen de la naturaleza de la muestra, del rango de concentración de los solutos y de las condiciones cromatográficas (columna, detector, flujo). Su objetivo es evaporar la muestra e introducirla en la columna. La figura 8.9. muestra un inyector de muestras en disolución. Es un dispositivo metálico y termostatzado (a una temperatura superior a 50 °C la temperatura de la columna). La inyección

se realiza mediante una microjeringa, a través del septum o diafragma de silicona. Este septum debe ser estable a la temperatura del inyector y es necesario reemplazarlo regularmente. En el interior del inyector se introduce una cámara de vaporización de vidrio o liner para aislar la muestra del metal del inyector.

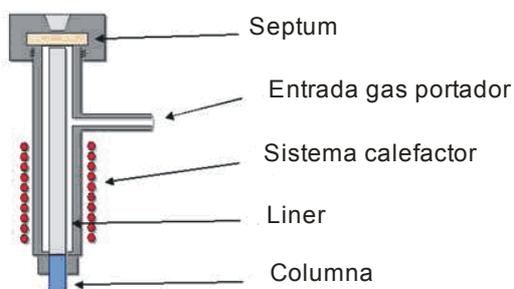


Fig. 8.9. Inyector de muestras líquidas en un sistema GC.

Cuando se trata de muestras gaseosas el sistema de muestreo es una válvula ya que es difícil introducir una cantidad constante de gas con una jeringa. La precisión es elevada: $\pm 0,1\%$ y el equipo es sencillo pero requiere temperatura constante (figura 8.10.).

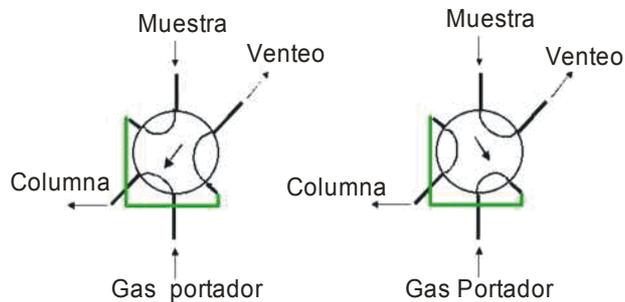


Fig. 8.10. Válvula de muestra para gases en un sistema GC.

8.6.3. Modos de inyección.

Inyección directa. Permiten flujos elevados para columnas empaquetadas o capilares de diámetro interno de 0.53 mm (figura 8.11.).

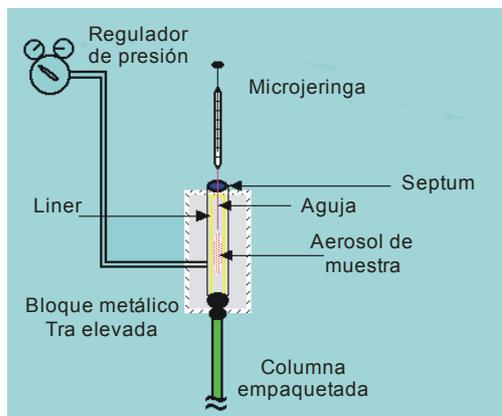


Fig. 8.12. Inyección directa con microjeringa.

Inyección Split/splitless. En la inyección en modo Split la muestra se mezcla con el gas portador y se divide en dos partes; la mayor se ventea y la menor entra en la columna. Es el modo adecuado para introducir muestras con componentes mayoritarios. Es poco sensible para el análisis de concentraciones traza (llega poca cantidad de muestra a la columna y al detector). La relación de Split se mide según la siguiente expresión:

$$\text{Relación de } split = \frac{\text{Flujo de venteo}}{\text{Flujo en columna}}$$

El modo de inyección en splitless es una técnica de preconcentración de la muestra, adecuado para el análisis de muestras muy diluídas (trazas, solutos térmicamente inestables o que eluyen próximos al frente del disolvente). La

válvula del inyector está cerrada durante el tiempo de splitless. La muestra vaporizada es transferida desde la cámara de vaporización a la columna. Después se hace pasar el flujo por el divisor (Split) para purgar la cámara de vaporización, una vez que la mayoría de la muestra ha pasado a la columna (esta transferencia dura entre 30-90 segundos) produciendo un ensanchamiento inicial de la banda. La preconcentración se lleva a cabo por efecto del disolvente o mediante una trampa fría o criofoco (figura 8.13.).

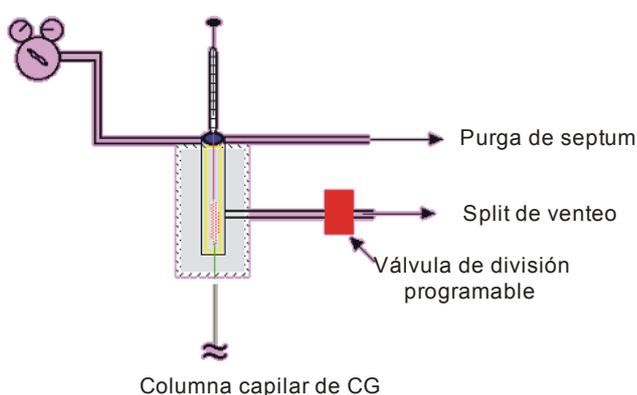
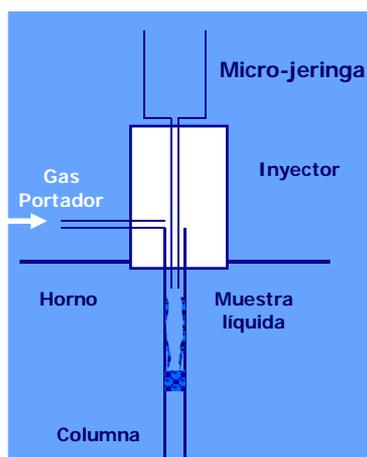


Fig. 8.13. Sistema para inyección en Split/splitless.

Inyección directa en columna (*on-column*). La muestra líquida se inyecta directamente en la columna (sin cámara de vaporización). La función del inyector es soportar la columna y suministrar el gas portador (figura 8.14.). El inyector se mantiene relativamente frío para permitir la evaporación del disolvente en la aguja de la jeringa. La columna se mantiene a una temperatura inferior al punto de ebullición del disolvente y evitar la evaporación súbita del disolvente en la aguja. Inmediatamente después se eleva la temperatura de la columna hasta la temperatura de trabajo. Este modo de inyección se aplica para compuestos de baja volatilidad y mezclas de solutos con un rango amplio de volatilidades.

Fig. 8.14. Sistema de inyección *on-column*.

Inyección con temperatura programada (PTV). La temperatura inicial del inyector es 20-30 °C inferior del punto de ebullición del disolvente. Durante la inyección se programa la temperatura (200 °C min⁻¹) hasta la temperatura de trabajo (mayor que la temperatura de la columna).

Inyección de grandes volúmenes. Se inyectan volúmenes menores de 100 µL (el volumen habitual de inyección es menor de 2 µL). Es un modo de inyección ventajoso para el análisis de trazas. La muestra se introduce sin retención o precolumna. Se evapora la mayor parte del disolvente a bajas temperaturas (Split). Las muestras se reconcentran mediante splitless (efecto del disolvente o crioenfoco).

Cámaras de vaporización o liners. Estos insertos de vidrio representan el área en la que se produce la vaporización de la muestra. Deben de ser reemplazados regularmente porque los compuestos no volátiles y otros productos de degradación quedan retenidos en él (figura 8.15.).

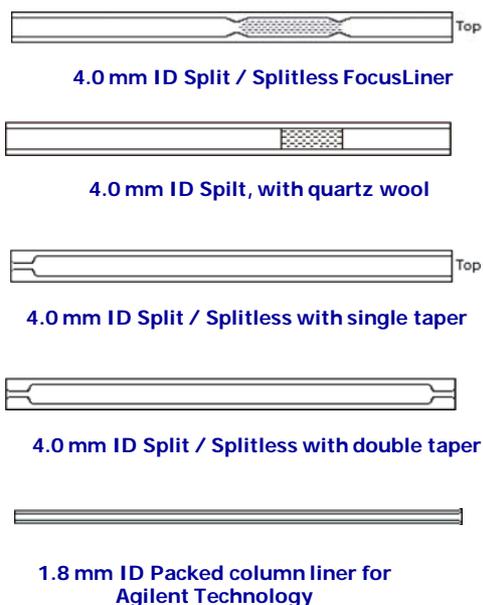


Fig. 8.15. Cuatro tipos de insertos/liners para columnas capilares y uno para columnas empaquetadas.

Jeringas de inyección: La muestra debe ser inyectada rápidamente para que sea introducida como un pequeño “tapón”.

Se utilizan diferentes tipos (agujas fijas, agujas separables) de varias longitudes, volúmenes y biseles, con una precisión de $\pm 1\%$. El tamaño de muestra también varía dependiendo del tipo de cromatografía: 0.1-10 μL en cromatografía líquida y 0.5-5 ml en cromatografía de gases (figura 8.16.).

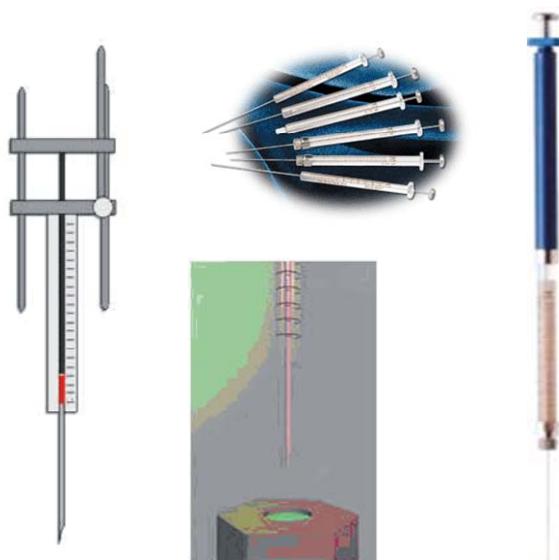


Fig. 8.16. Diferentes tipos de jeringas utilizadas para la introducción de muestra en cromatografía.

8.6.4. Columnas cromatográficas.

Es el elemento esencial en CG, ya que en ella tienen lugar los procesos físico-químicos en los que se basa la separación.

Los solutos tendrán distinta movilidad según sus valores relativos de volatilidad-solubilidad.

Columna empaquetada o de relleno (figura 8.17.). Son tubos de acero inoxidable o vidrio de 3-6 mm de diámetro y 1-5 m de longitud. Lleva en su interior un soporte de grano fino recubierto con un líquido no volátil de estructura química similar a los componentes de la muestra (fase estacionaria, FE). A veces, el propio sólido es la FE. Las características de este soporte sólido son: poseer una gran área superficial, no existir interacciones con los solutos y tener propiedades mecánicas y térmicas adecuadas.



Fig. 8.17. Columna empaquetada o de relleno.

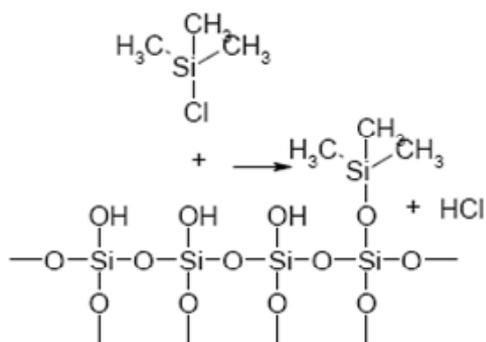
Columna capilar o abierta (figura 8.18.). Conducen a la obtención de una mayor resolución debido a su mayor longitud (12-60 m), un menor tiempo de análisis debido a la menor cantidad de FE (se inyecta menor cantidad de solutos que se retienen menos tiempo), una mayor sensibilidad debido a que en el detector se puede añadir una corriente de gas portador (gas auxiliar o make-up). De esta forma los contaminantes del septum son purgados continuamente, se reduce el paso de FE al detector y las fluctuaciones del gas portador (FM) son amortiguadas por la longitud de la columna capilar. Además los picos cromatográficos obtenidos son más estrechos y con un área mayor (aumenta la relación señal/ruido, S/R).



Fig. 8.18. Columnas capilares.

Las columnas están recubiertas exteriormente por una capa de poliimida. La fase estacionaria está retenida en la pared interna de la columna de diferentes modos (figura 8.19.):

- La columna capilar puede tener la pared recubierta: columna de sílice fundida con la FE líquida depositada directamente en el interior, sin soporte.
- En otros casos la fase está enlazada: la FE está enlazada químicamente a la sílice de la columna mediante un enlace silano.



La superficie de la sílice puede ser modificada con trimetilclorosilano para reducir la polaridad de la superficie.

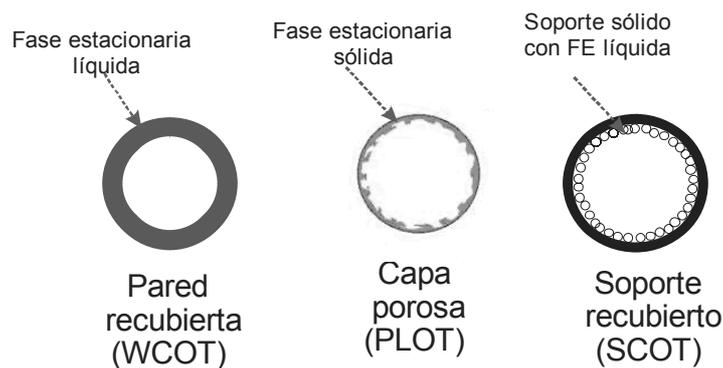


Fig. 8.19. Diferentes tipos de columnas capilares: WCOT, columna tubular abierta de pared recubierta directamente con FE; PLOT, columna tubular abierta con pared interna porosa que retiene la FE; SCOT, columna tubular abierta con pared interna recubierta de partícula de soporte sólido (50 μm) que retiene la FE.

La tabla 8.1. presenta las características de las columnas empaquetadas y capilares de forma comparativa.

La selección de la columna cromatográfica para un determinado proceso se lleva a cabo mediante consulta bibliográfica, de aplicaciones de catálogos comerciales o utilizando la columna recomendada por un método estándar oficial (métodos de la EPA). La figura 8.20 presenta diversas composiciones de fases estacionarias utilizadas en columnas capilares. En función de sus características de polaridad son utilizadas para la separación de diferentes analitos. Así si éstos son polares requerirán la utilización de una columna con FE polar.

Tabla 8.1. Características de las columnas cromatográficas.

	<i>Empaquetadas</i>	<i>Capilares</i>
Longitud (m)	0,5-5	5-100
DI, mm	2-4	0,1-0,7
Flujo (mL/min)	10-60	0,5-15
Presión cabeza (Psi)	10-40	3-40
Nº Platos	4000	250000
Capacidad*	10 µg/pico	100 ng/pico
Espesor FE (µm)	1-10	0,1-8

*Capacidad=factor de retención (K') relacionado con la termodinámica del proceso de reparto que cambia con la temperatura y la composición de la FE (K'=1-5)

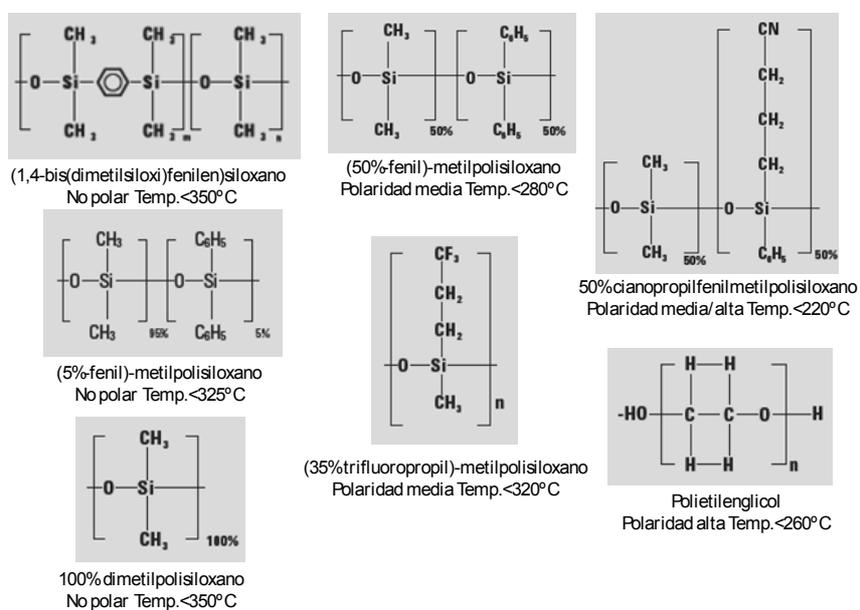


Fig. 8.20. Composición de diferentes fases estacionarias utilizadas en las columnas capilares.

8.6.5. Control de la temperatura.

La temperatura juega un papel decisivo en las separaciones mediante cromatografía de gases.

Existen tres zonas en el cromatógrafo donde esta variable debe ser controlada con precisión: inyector, horno cromatográfico (columna) y detector (Figura 8.21.)

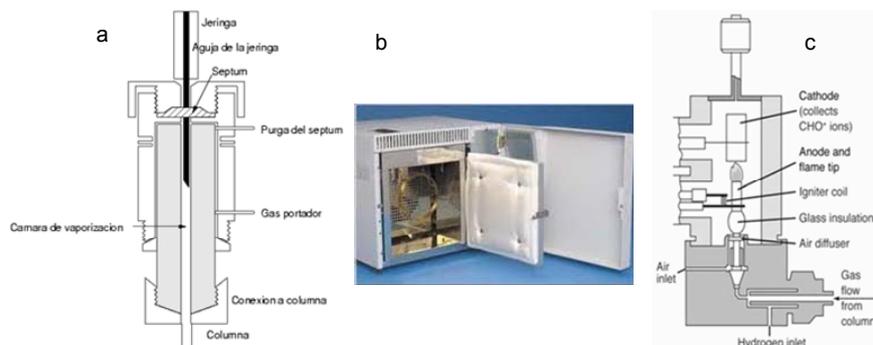


Fig. 8.21. El control de la temperatura en GC se realiza en el inyector (a), el horno que alberga la columna cromatográfica (b) y el detector (c).

En el inyector, la temperatura varía dependiendo del modo de inyección. En general se necesita una temperatura alta, superior a la de la columna, para vaporizar por completo la mezcla de solutos. Sin embargo, debe ser lo suficientemente baja como para evitar que se produzca la descomposición térmica de los solutos.

En el detector debe utilizarse una temperatura adecuada para evitar condensaciones que darían lugar a pérdidas de compuestos menos volátiles y a solapamiento de picos.

La mayor incidencia de la temperatura sobre la separación tiene lugar en la columna cromatográfica ya que afecta a la relación de distribución. A menor temperatura, mejor separación, pero mayor tiempo de análisis. La temperatura óptima de trabajo depende de los puntos de ebullición de los solutos, no debe ser inferior a la de éstos. Los tiempos de

retención se duplican cuando la temperatura desciende 30°C.

Desde el punto de vista práctico existen dos modos de trabajar con la temperatura de la columna.

Modo isoterma: la temperatura se mantiene constante durante la separación. Los picos más volátiles eluyen de la columna con picos más próximos y estrechos. Los componentes menos volátiles eluyen con picos más espaciados, anchos y bajos. Se utiliza cuando los puntos de ebullición varían poco (figura 8.22.a).

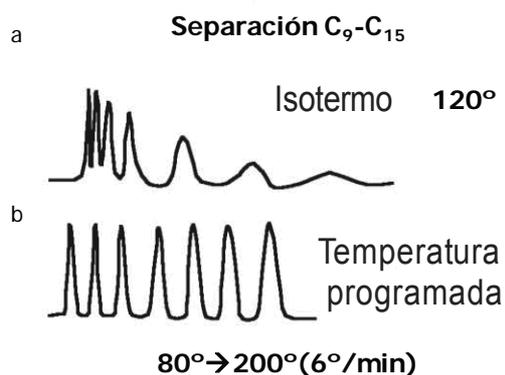


Fig. 8.22. Mejora de un cromatograma obtenido en modo isoterma (a) cuando se aplica programación de temperatura en columna (b). Los componentes se eluyen con buena separación de picos estrechos con un tiempo de análisis menor.

Temperatura programada: la temperatura varía de forma progresiva durante la separación cromatográfica. En series homólogas, el tiempo de retención aumenta exponencialmente con el número de átomos de carbono. Al incrementar el t_R , aumenta el ancho de pico y disminuye la altura, haciendo difícil la detección. Como la solubilidad de un gas en un líquido disminuye al aumentar la temperatura,

se reducirá el tiempo de retención al aumentar la temperatura de la columna. Así se reduce el tiempo de análisis (figura 8.22.b).

8.6.6. Selección del detector.

Se debe tener en cuenta:

- Características de la muestra: los compuestos de interés, otros componentes de la muestra y la concentración de ambos.

- Características del detector ideal y su aplicabilidad:

- Adecuada sensibilidad (alta a ser posible en función de la pendiente de la recta de calibrado).
- Buena estabilidad y reproducibilidad.
- Una respuesta lineal para los componentes que se extienda a varios órdenes de magnitud.
- Ruido de fondo bajo pues determina la relación señal/ruido ($S/R=10$ para calcular el límite de cuantificación).
- Intervalo térmico de trabajo (25-400 °C).
- Baja sensibilidad a las variaciones de flujo, presión y temperatura.
- Un tiempo de respuesta corto que lo haga independiente del Caudal.
- Alta fiabilidad y manejo sencillo.
- Respuesta semejante para todos los componentes.
- No destructivo.

No existe un detector que resuelva todo tipo de problemas y muestras. Los más utilizados son enumerados a continuación (figura 8.23.):

1. Conductividad térmica
2. Ionización de llama
3. Nitrógeno-fósforo
4. Fotométrico de llama
5. Captura electrónica
6. Emisión atómica
7. Espectrometría de masas
8. IR con transformada de Fourier

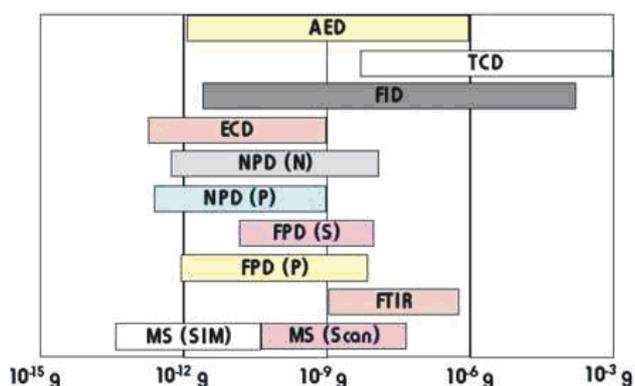


Fig. 8.23. Rango de Sensibilidades de los detectores más utilizados en GC.

8.6.7. Detector de ionización de llama (FID).

Consta de dos electrodos situados en la base de la llama (electrodo negativo) y alrededor de la llama (de hidrógeno/aire), en forma de cestilla (electrodo colector positivo) (figura 8.24.). Los componentes de la muestra llegan con el gas portados a la base del detector, se mezclan con hidrógeno y entran en la llama. Se produce la ionización de los analitos en la llama resultando una corriente de partículas (iones y electrones) que hace disminuir la resistencia entre los electrodos y origina una señal medida posteriormente. Algunas de las características más importantes de este detector son: es un detector universal (responde a la mayoría de compuestos orgánicos), específico (la muestra debe ser combustible), destructivo (se produce la pirólisis de la muestra), muy sensible (Límite de detección $\approx 5 \text{ pg carbono seg}^{-1}$), rango lineal $\approx 10^7$, utiliza gas auxiliar (make-up) en columnas capilares.

Los grupos funcionales, tales como carbonilo, alcohol, halógeno y amina, originan en la llama pocos iones o

prácticamente ninguno. Además, el detector es insensible a los gases no combustibles como H₂O, CO₂, SO₂, y NO_x.

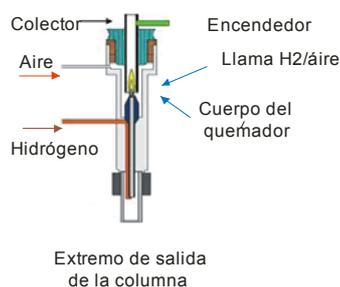


Fig.8.24. Esquema de un detector de ionización de llama.

Esas propiedades hacen del detector de ionización de llama uno de los detectores generales más utilizado para el análisis de la mayoría de compuestos orgánicos, incluyendo aquellos que están contaminados con agua y con óxidos de nitrógeno y de azufre.

La respuesta del FID se basa en el número de átomos de carbono. Si otros elementos como halógenos u oxígeno están presentes se reducen la combustión y la señal (figura 8.25.).

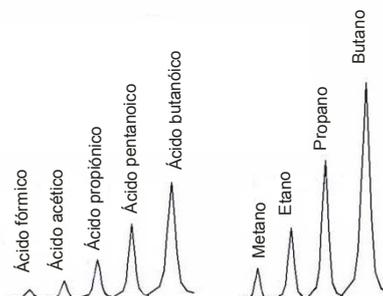


Fig. 8.25. Efecto de la presencia de átomos de oxígeno (izquierda) en la señal de los analitos detectados con FID.

8.6.8. Detector de captura electrónica (ECD).

El efluente de la columna pasa sobre un emisor β , como níquel-63 o tritio (adsorbido sobre una lámina de platino o de titanio). Un electrón del emisor provoca la ionización del gas portador (con frecuencia se trata de nitrógeno) y la producción de una ráfaga de electrones. De este proceso de ionización, en ausencia de especies orgánicas, resulta una corriente constante entre un par de electrodos. Cuando al detector llega una molécula que posee grupos funcionales electronegativos capturan algunos de los electrones y reducen la corriente (señal eléctrica) medida entre los dos electrodos (figura 8.26.).

El detector de captura de electrones es de respuesta selectiva, siendo muy sensible a las moléculas que contienen grupos funcionales electronegativos tales como halógenos, peróxidos, quinonas, y grupos nitro; en cambio, no es sensible a grupos funcionales como aminas, alcoholes e hidrocarburos. Es un detector no destructivo, con un límite de detección $\approx 0,1 \text{ pg seg}^{-1}$, tan sensible como el FID, posee un rango lineal $\approx 10^4$.

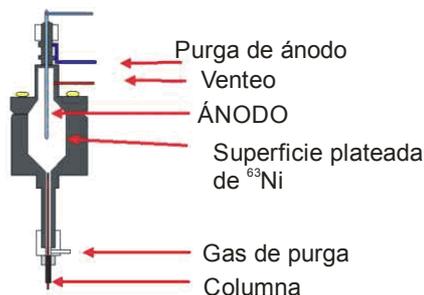


Fig. 8.26. Esquema de un detector de captura electrónica.

Como desventaja, se trata de un detector radiactivo. Una aplicación importante del detector de captura de electrones

es la detección y determinación de insecticidas clorados. El ECD es altamente sensible y tiene la ventaja de no alterar la muestra de manera significativa (a diferencia del FID). Por otra parte, su intervalo lineal de respuesta normalmente se limita a unos dos órdenes de magnitud.

La figura 8.27 muestra los esquemas correspondientes al ECD convencional y al μ ECD que permite aumentar, considerablemente la sensibilidad.

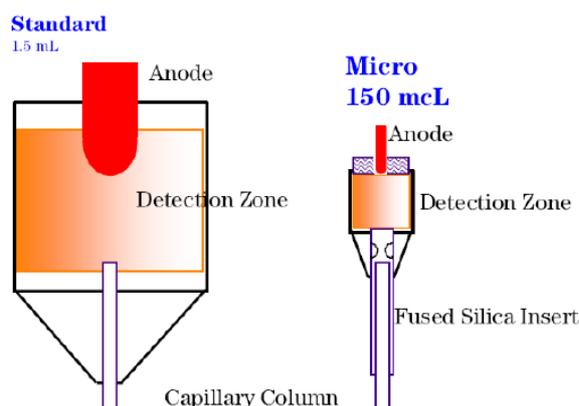


Fig. 8.27. Esquema del ECD estándar y μ ECD, provisto de microcelda.

Los gases principales de efecto invernadero en la atmósfera terrestre son CO_2 , CH_4 y N_2O . La medida continuada de estos gases proporciona información significativa para evaluar la tendencia de las emisiones de gases en procesos industriales. Existen analizadores de procesos basados en cromatografía de gases para el control de emisión de gases que utilizan FID y μ -ECD como sistemas de detección (figura 8.28.).

La muestra se inyecta en una columna corta (columna1) que separa aire, CO_2 y CH_4 del agua. Todos los analitos que

salen después del N_2O se envían al exterior (vent 1). N_2O , CO_2 y CH_4 se separan en la columna 2. El aire (O_2) debe enviarse fuera del metanizador y del μ -ECD a través de vent 2. El CO_2 se convierte en CH_4 mediante el metanizador y se mide en el FID. Una vez el CO_2 eluye de la columna 2, el flujo se desvía hacia el detector μ -ECD para medir el N_2O .

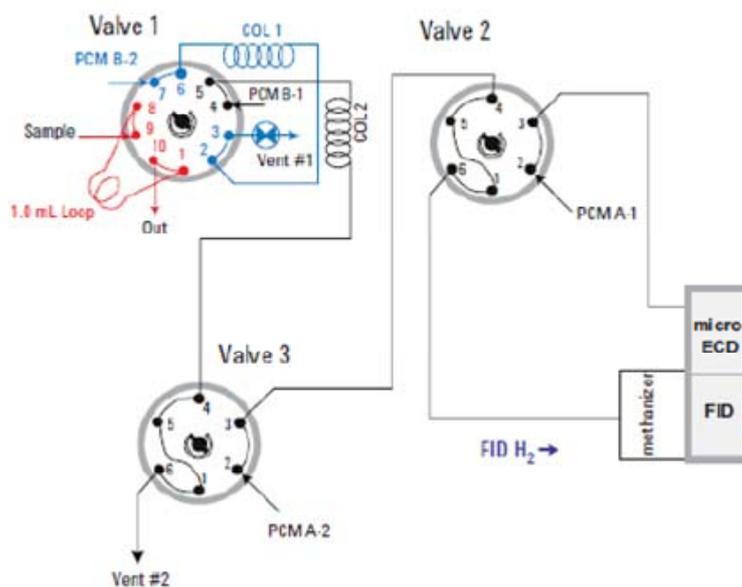


Fig. 8.28. Analizador GC con dos detectores FID y μ -ECD para determinar N_2O , CO_2 y CH_4 .

8.6.9. Detector de emisión atómica (AED).

En este dispositivo, el eluyente procedente de la columna cromatográfica se introduce en un plasma de helio obtenido con microondas, que se acopla a un espectrómetro de emisión con series de diodos. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener sus espectros de emisión característicos. Esos espectros son recogidos en un

espectrómetro que utiliza una serie de diodos configurados en un plano móvil, que es capaz de detectar la radiación emitida desde 170 a 780 nm. La serie de diodos móvil es capaz de controlar simultáneamente de dos a cuatro elementos en cada posición (figura 8.29.).

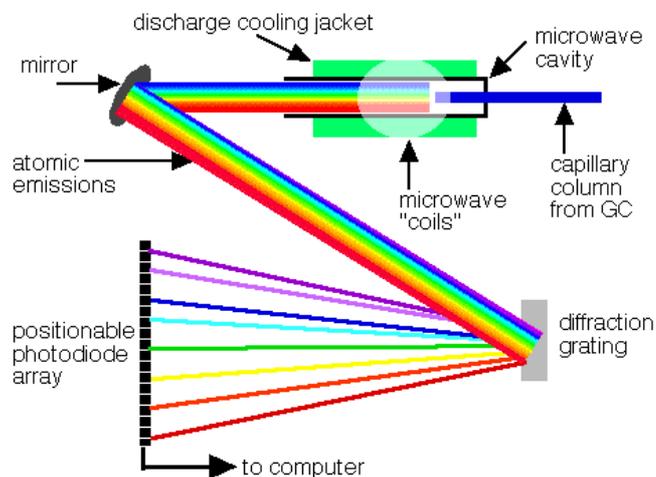


Fig. 8.29. Esquema de funcionamiento de un AED.

La Figura 8.30 ilustra las posibilidades de este tipo de detector. En este caso la muestra es una gasolina que contiene una pequeña concentración de metil-terc-butiléter (MTBE), un agente antidetonante, además de varios alcoholes alifáticos a bajas concentraciones.

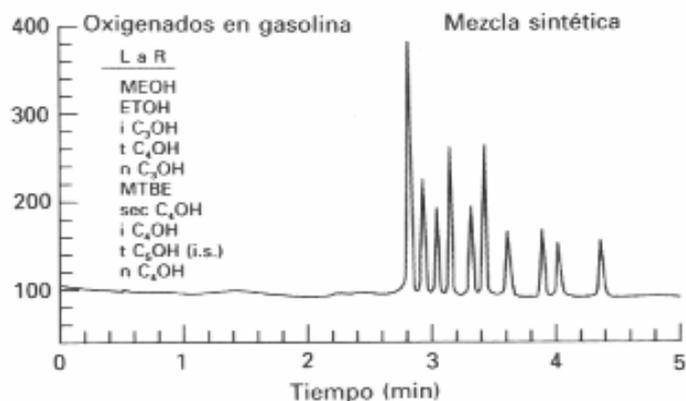


Fig. 8.30. Ejemplo de un cromatograma para una gasolina que contiene una pequeña cantidad de MTBE y varios alcoholes alifáticos. Monitorización de la línea 777 nm para el oxígeno.

8.7. Acoplamiento CG-espectrometría de masas (MS).

La espectrometría de masas (MS) no es un método espectroscópico, pues no se mide la interacción con la radiación electromagnética. Se trata de una técnica de separación, los iones son separados físicamente en función de su relación masa/carga y detectados cualitativamente y cuantitativamente por sus respectivas m/z y abundancias relativas (figura 8.31.). La espectrometría de masas comprende un conjunto de técnicas utilizadas para la medida de la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa. Mediante el acoplamiento entre GC y MS, tras la vaporización y separación de analitos en mezclas complejas el análisis por espectrometría de masas permite obtener información de la masa molecular de los compuestos analizados así como obtener información estructural de los mismos (figura 8.32.).

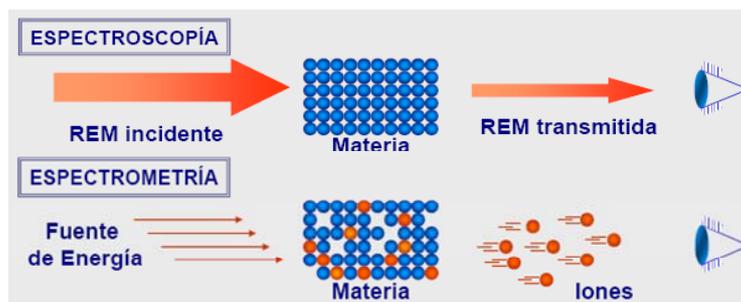


Fig. 8.31. Diferencia entre espectroscopía y espectrometría de masas.

Para ello es necesario ionizar las moléculas y obtener los iones formados en fase gaseosa. Este proceso tiene lugar en una fuente de ionización y actualmente, existen diferentes técnicas que permiten llevarlo a cabo como Impacto Electrónico (EI), Bombardeo con átomos rápidos (FAB), Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization (MALDI) o Electrospray (ESI). Los iones generados son acelerados hacia un analizador como la trampa de iones, cuadrupolo o triple cuadrupolo, y separados en función de su relación (m/z) mediante la aplicación de campos eléctricos, magnéticos ó simplemente determinando el tiempo de llegada a un detector. Los iones que llegan al detector, un multiplicador de electrones, un detector de tiempo de vuelo (TOF), que producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El registro obtenido se denomina Espectro de masas y representa las abundancias iónicas obtenidas en función de la relación masa/carga de los iones detectados.

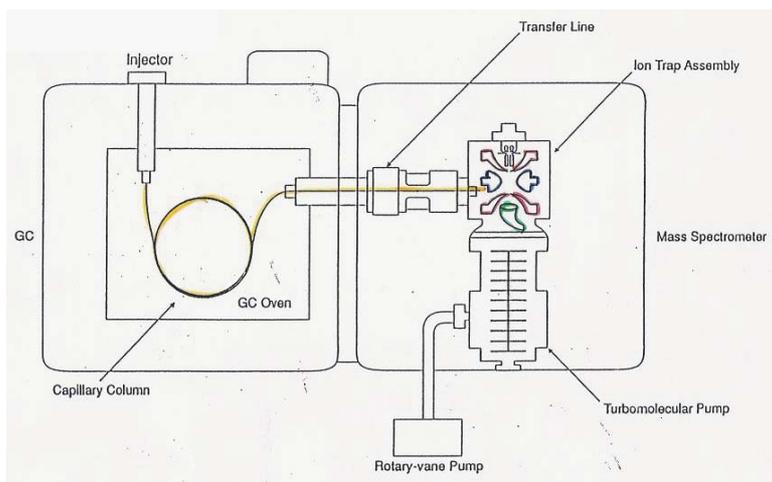


Fig. 8.32. Instrumentación de un equipo GC-MS

8.7.1. Ionización por impacto electrónico.

En la fuente de ionización por impacto electrónico la muestra gaseosa se ioniza entre dos placas cargadas, por bombardeo con un haz de electrones de alta energía. Los electrones son emitidos por un filamento caliente de Renio o Wolframio y se aceleran mediante un potencial de unos 70 V (figura 8.33.).

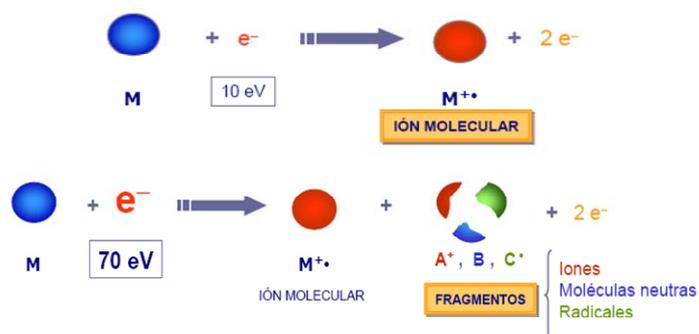


Fig. 8.33. Formación de iones para análisis por MS.

Al incidir un haz de electrones de baja energía (10 eV) sobre una molécula se arranca un electrón y se forma el ión molecular. Cuando el haz de electrones es de alta energía (70 eV) se forma el ión molecular y la fragmentación de la molécula en iones, moléculas neutras y radicales. Los iones formados son extraídos del haz de electrones, acelerados y colimados en un haz de iones que se focalizan utilizando campos eléctricos o rendijas (figura 8.34.)

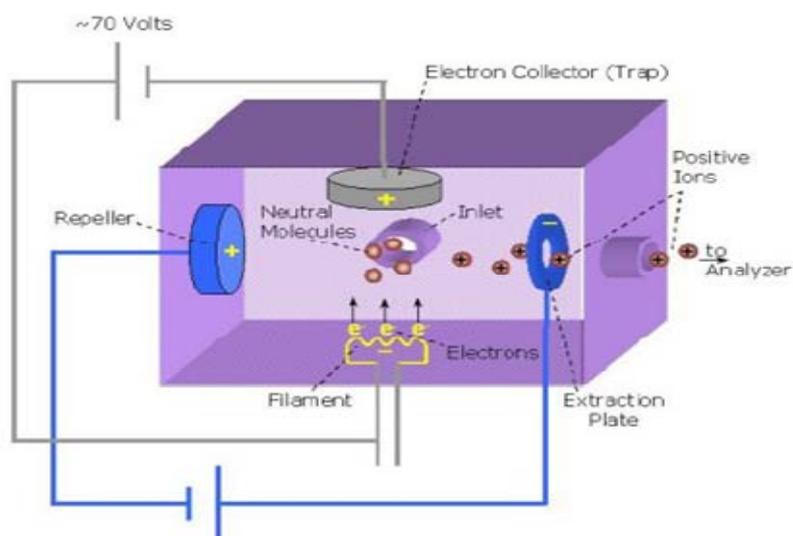


Fig. 8.34. Fuente de ionización por impacto electrónico.

8.7.2. Analizador de trampa de iones

Los iones formados deben ser separados en función de su relación m/z . El analizador de trampa de iones consta de tres electrodos que forman una cavidad en la que se completa la ionización, fragmentación, almacenamiento y filtración de los iones formados.

Los iones del analito procedente de la fuente, penetra a través de una rejilla en el electrodo colector superior. Se realiza un barrido del potencial de radiofrecuencia (aplicado

al electrodo anular) y los iones son atrapados, cuando se desestabilizan, aquellos iones que tengan una m/z determinada abandonan la cavidad del electrodo anular a través de una abertura en el electrodo colector inferior y pasan al detector (figura 8.35.).

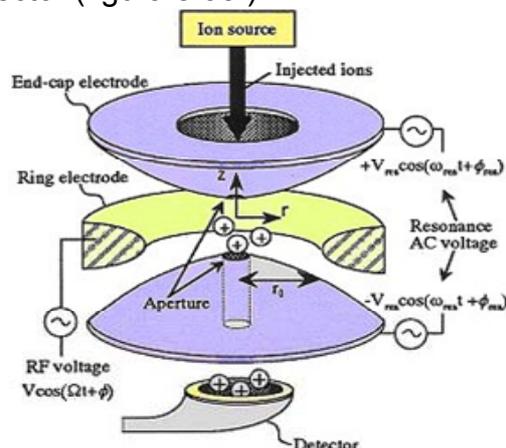


Fig. 8.35. Analizador de trampa de iones.

8.7.3. Analizador de cuadrupolo

El filtro de masas de cuadrupolo consta de cuatro barras cilíndricas paralelas que actúan como electrodos. Las barras opuestas se conectan eléctricamente, un par está unido al polo (+) de una fuente de corriente continua (DC) y el otro par se une al polo (-). Además, se aplica a cada par de barras potenciales variables de corriente alterna de radiofrecuencias (RF) que están desfasados 180° . Estos potenciales de DC y RF se van variando de forma que sólo los iones con cierta relación (m/z) son capaces de atravesar completamente el analizador alcanzando el detector (figura 8.36.).

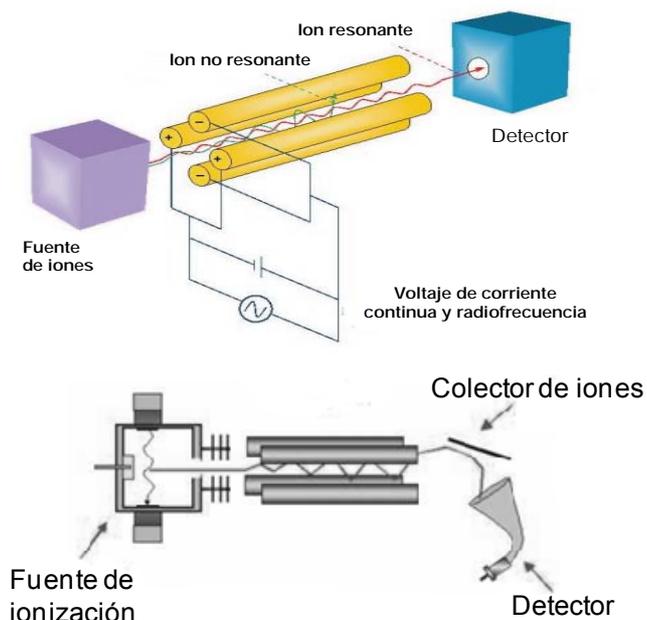


Fig. 8.36. Esquemas de la configuración del analizador de cuadrupolo.

La aplicación a cada par de barras opuestas de un voltaje y una radiofrecuencia posibilita un control de la trayectoria de los iones. Esto permitirá al ión m/z seguir una trayectoria rectilínea y cruzar el túnel alcanzando el detector, mientras que las demás masas, al ser inestables sus trayectorias, no alcanzan el detector, siendo desviadas fuera del conjunto de barras.

8.7.4. Detectores

Uno de los detectores que han sido más utilizados en espectrometría de masas, es el multiplicador de electrones de dínodos. El cátodo y los sucesivos dínodos tienen superficies de Cu/Be de las que se emiten ráfagas de electrones al ser alcanzadas por iones o electrones de elevada energía. Su funcionamiento puede verse en la figura

8.37a. El detector Channeltron es similar al multiplicador de electrones clásico, con la principal diferencia de que no tiene múltiples dínodos discretos, sino que está formado por un tubo de vidrio en forma de corneta, a veces terminado en forma de espiral o caracol (figura 8.37b), cuyo interior está recubierto por un óxido de plomo semiconductor de composición y características especiales.

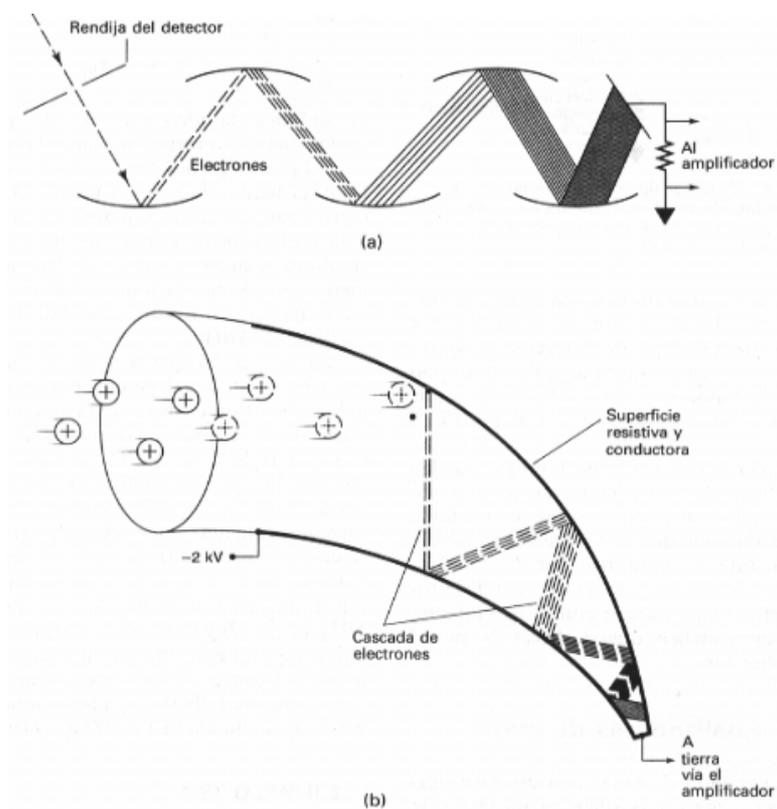


Fig. 8.37. Multiplicador de electrones de dínodos discreto (a). Detector Channeltron (b).

La espectrometría de masas es probablemente de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico la de aplicación más general en el sentido que la técnica es

capaz de suministrar información sobre (1) la composición cualitativa y cuantitativa tanto de analitos orgánicos como inorgánicos en muestras complejas, (2) las estructuras de una amplia variedad de especies moleculares complejas, (3) las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras y (4) la estructura y composición de superficies sólidas.

Para que todos los procesos descritos anteriormente, que ocurren en el interior del espectrómetro de masas, puedan realizarse con éxito, debe hacerse en un ambiente de alto vacío, donde el recorrido libre medio de las moléculas y de los iones formados sea consistente con la longitud de la trayectoria que deben recorrer en su camino hasta el detector. Los principales tipos de bombas que se utilizan para conseguir el alto vacío en espectrometría de masas son las difusoras y las turbomoleculares.

Los espectrómetros de masa pueden operar en modo barrido (scan), detectando todas las señales en un rango de (m/z) dado o en modo de monitorización de un ión seleccionado (selected ion monitoring, SIM). En este último caso, el analizador es capaz de estar mucho más tiempo haciendo un muestreo de cada uno de los valores (m/z) seleccionados. En SIM, si se seleccionan apropiadamente los valores de (m/z) se puede reducir significativamente el ruido de fondo inespecífico.

Las siguientes figuras ilustran dos aplicaciones de GC-MS. La primera es para el análisis de aromas de anchoado en extractos de diclorometano de muestras de anchoas (figura 8.38.). La segunda es una de las muchas aplicaciones medioambientales (determinación de pesticidas en aguas, PAHs en suelos, tóxicos en aire, etc.) de un equipo GC-MS transportable (figura 8.39.).

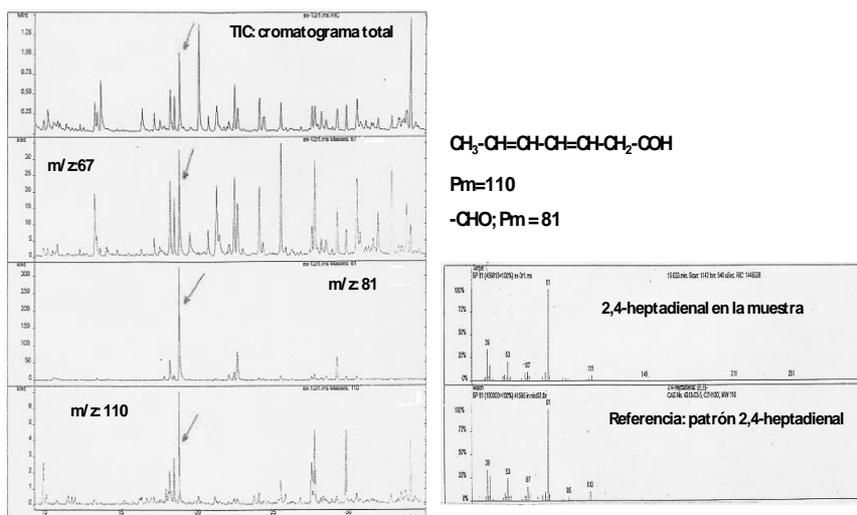


Fig. 8.38. Localización e identificación del pico correspondiente a 2,4-heptadienal, desde el cromatograma total (TIC).

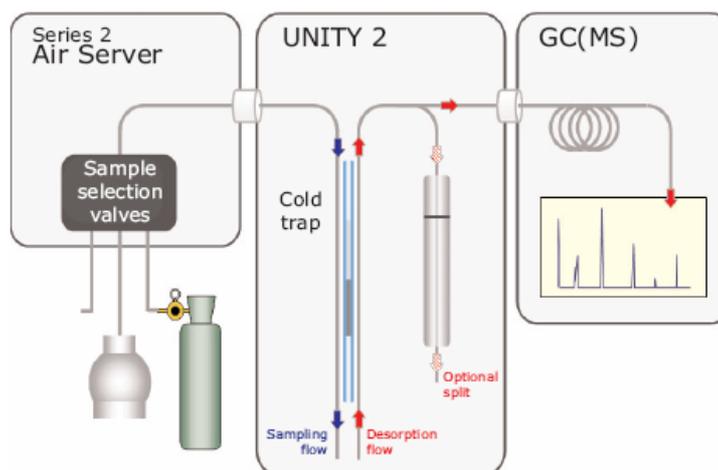


Fig. 8.39. Configuración de GC-MS transportable para control on-line de compuestos orgánicos volátiles (VOCs)

8.8. Bibliografía

D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER and S.R. CROUCH
“Fundamentos de Química Analítica” 8º Ed. Thomson Madrid
(2005).

D.A. SKOOG, F.J. HOLLER and T.A. NIEMAN **“Principios de
Análisis Instrumental”** 5º Ed. Mc Graw Hill Madrid (2001).

R. CELA, R.A. LORENZO, Mª DEL CARMEN CASAIS. **“Técnicas
Analíticas de Separación en Química Analítica”** Ed. Síntesis,
Madrid (2002).

M.V. DABRIO **“Cromatografía y electroforesis en columna”** Ed.
Springer-Verlag Ibérica. Barcelona (2000)

<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>

TEMA 9. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS DE ANÁLISIS II

Objetivos

- ✓ Conocer el fundamento de las separaciones por cromatografía líquida.
- ✓ Adquirir los conocimientos básicos de los diferentes componentes de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución
- ✓ Resaltar los parámetros que afectan al desarrollo de métodos.
- ✓ Mostrar la viabilidad para el análisis cualitativo y cuantitativo de mezclas de compuestos no volátiles mediante cromatografía de gases.
- ✓ Interpretar y aplicar los conocimientos básicos sobre cromatografía líquida al control de procesos

9.1. Fundamento de la cromatografía líquida (LC).

La fase móvil (FM) es un líquido que pasa a través de la fase estacionaria (FE) que es un sólido o líquido retenido en columna. En una primera etapa la cromatografía líquida se realizaba en columnas de vidrio con diámetros de 1 a 5 cm y longitudes de 50 a 500 cm. Se observó que la eficacia aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de los rellenos de columna. Sin embargo, fue a finales de los años sesenta, cuando se desarrolló la tecnología adecuada para producir y utilizar rellenos de tamaño de partícula del orden de los 3 o 10 μm . Esta tecnología requiere una instrumentación sofisticada, que contrasta con las simples columnas de vidrio de la cromatografía de líquidos clásica. Para distinguir estos procedimientos más nuevos de los métodos básicos, que todavía se utilizan con fines preparativos, se emplea la denominación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Ventajas de la cromatografía líquida:

- Aplicada a la separación de compuestos no volátiles solubles en fases líquidas (compuestos biológicos, fármacos,

polímeros sintéticos o naturales) y compuestos no volátiles presentes en el medioambiente.

- Aplicada a la separación de compuestos térmicamente lábiles (fases móviles líquidas y bajas temperaturas).

- La retención de los solutos se basa en su interacción con la FE y FM; es más flexible la optimización de la separación que en GC.

- La mayoría de los detectores no destruyen la muestra.

Desventajas de la cromatografía líquida (LC):

- Mayor ensanchamiento de banda.

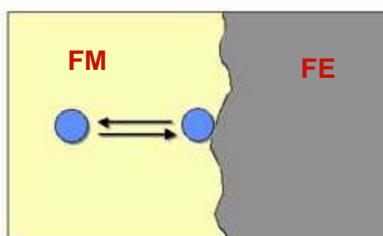
- Menor resolución.

9.2. Clasificación de los métodos de cromatografía líquida.

La Figura 9.1 pone de manifiesto que los distintos procedimientos que utilizan la cromatografía de líquidos tienden a ser complementarios con respecto a los campos de aplicación.

9.2.1. Mecanismos de separación.

a) Cromatografía de adsorción. La fase estacionaria es un sólido. La separación es debida a una serie de pasos de adsorción/desorción.



El fundamento es la separación/retención: diferencias de solubilidad (en FM) y de retención por adsorción (en FE) de la mezcla de solutos sometidos al sistema cromatográfico.

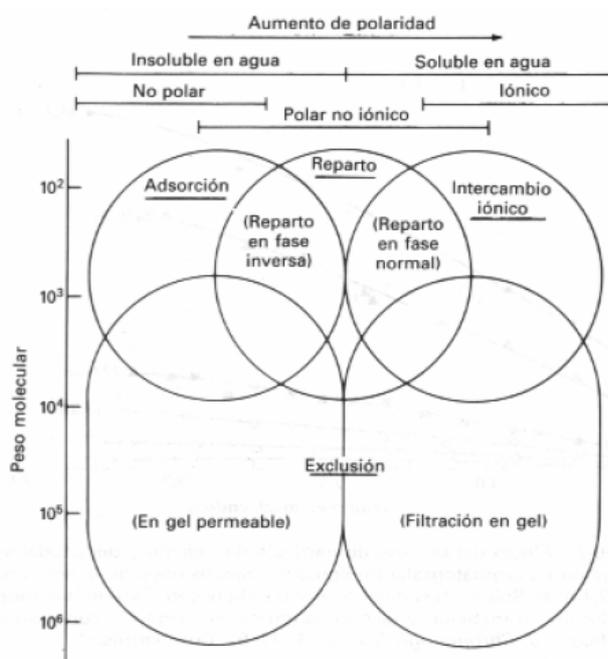


Fig. 9.1. Aplicaciones de la cromatografía de líquidos

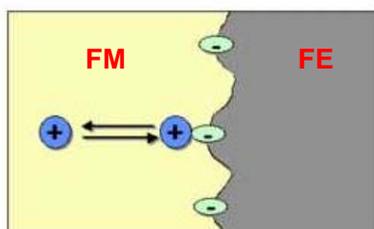
La elución se produce por competencia entre moléculas de soluto y de disolvente por los sitios activos de la superficie del adsorbente (FE) que rellena la columna.

Los grupos funcionales polares de moléculas de soluto o disolvente (FM) interaccionan irreversiblemente con grupos hidroxilo del gel de sílice o alúmina (FE polar). La FM es poco polar (diclorometano, cloroformo, éter dietílico, hexano, etc.) aunque normalmente se utiliza una mezcla de 2 o más disolventes. Se debe tener en cuenta la fuerza eluotrópica del disolvente, que es una medida de la polaridad relativa del disolvente (ordenación de los disolventes de acuerdo con su capacidad relativa para desplazar solutos de un determinado adsorbente) y el Índice de polaridad: utilizado en métodos de fase reversa.

El gradiente de fuerza eluotrópica hace que primero eluyan los solutos menos retenidos (menos polares) con un

disolvente poco polar y, se va mezclando gradualmente un disolvente más polar para ir aumentando la fuerza eluyente. Se aplica en separaciones de compuestos orgánicos no polares o poco polares, solubles en disolventes orgánicos.

b) Cromatografía de cambio iónico. La FE tiene una superficie con carga iónica opuesta a la de los solutos.



El fundamento es que la FE es una resina cambiadora de iones (redes tridimensionales de macromoléculas con cargas electrostáticas) que capta reversiblemente iones de la disolución, cediendo una cantidad equivalente de iones de la misma carga.



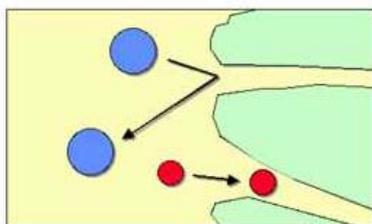
La separación se lleva a cabo en 2 etapas:

1.- Los analitos (B^+) compiten con los cationes de la FM (H^+) por los sitios libres del cambiador (FE), y se unen a él por atracción electrostática y quedan retenidos.



2.- La elución de los analitos se realiza después, modificando el pH de la FM o su fuerza iónica.

c) Cromatografía de exclusión por tamaños. La separación se basa en el tamaño molecular. La FE (gel) es un material con el tamaño de poro controlado.



El fundamento es que los analitos de mayor tamaño no pueden penetrar en los poros de la FE y son excluidos, viajando en el frente de la FM (figura 9.2.). Los analitos más pequeños difunden mejor que los más grandes en los poros de la FE, siguiendo trayectorias más largas (son los últimos en ser eluidos). El orden de elución es inverso del tamaño molecular.

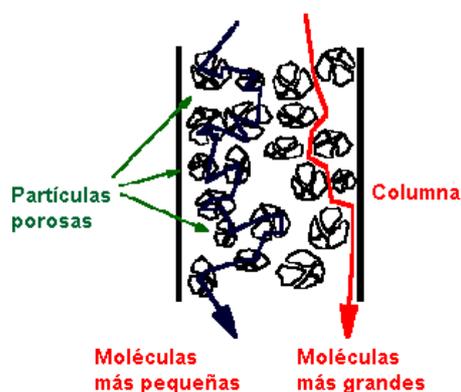
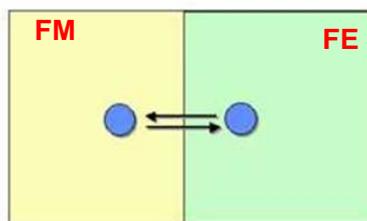


Fig. 9.2. La FE (geles de dextrano, poliacrilamida o sacarosa) retiene moléculas pequeñas son retenidas en función del límite de exclusión y permeabilidad. Las moléculas mayores eluyen con la FM.

Se aplica en bioquímica (separación de proteínas, azúcares, ácidos grasos), en determinación de peso molecular en grandes polímeros, etc.

d) Cromatografía de reparto. La separación se basa en el reparto del soluto entre 2 fases líquidas (en función de la solubilidad).



La FM y la FE deben ser inmiscibles. La solubilidad de la FE en la FM debe ser mínima para evitar la progresiva eliminación de la película de FE. El flujo de la FM debe ser bajo para evitar el arrastre de la FE.

Las especies altamente retenidas tienen una gran afinidad (solubilidad) por la FE comparado con la FM.

La diferencia entre técnicas se basa en cómo está retenida la FE sobre un soporte (sílice):

1. Fase móvil: líquido - Fase estacionaria: líquido adsorbido

La fase estacionaria líquida se retiene sobre la superficie del soporte por adsorción física.

2. Fase móvil: líquido - Fase estacionaria: fase enlazada

La fase estacionaria se une químicamente a la superficie del soporte.

9.3. Cromatografía de líquidos de fase enlazada

En la actualidad los métodos de fase enlazada son los que predominan debido a las desventajas de los sistemas líquido-líquido. Una de esas desventajas es la pérdida de FE por disolución en la FM, lo que hace necesario un periódico recubrimiento de las partículas del soporte. Por otra parte, el problema de la solubilidad de la FE impide el uso de los rellenos de fase líquida en la elución con gradiente.

En cromatografía de reparto, los soportes para casi todos los rellenos con FE unidas químicamente, se preparan con

composiciones constituidas básicamente por sílice. El proceso de anclaje de la FE al soporte de sílice se conoce como reacción de silanización (figura 9.3.). Se introduce una cadena orgánica (o grupo iónico) en la estructura de la sílice por formación del enlace siloxano. Se forma una monocapa de radicales anclados en la superficie de la sílice. Es la naturaleza del radical R la que determina los distintos tipos de cromatografía (reparto, cambio iónico, etc.).

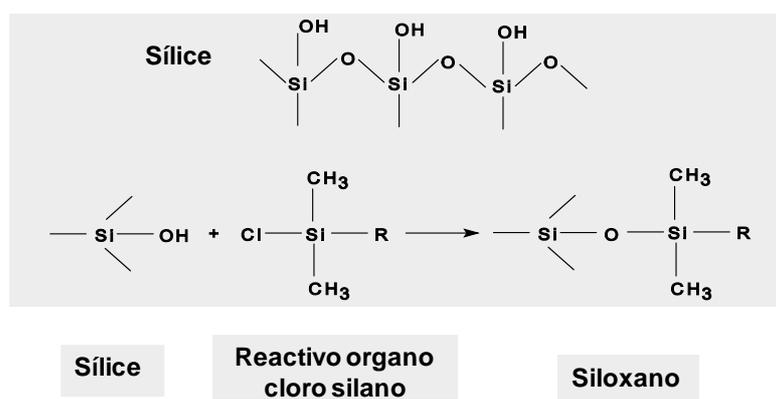


Fig. 9.3. Reacción de silanización.

9.4. Modos de operación.

En relación con las polaridades relativas de las fases móvil y estacionaria, se distinguen dos tipos de cromatografía de reparto:

1. *Fase normal*: Inicialmente, se utiliza FE de elevada polaridad tales como grupos funcionales ciano (-C₂H₄CN), diol (-C₃H₆OCH₂CHOHCH₂OH), amino (-C₃H₆NH₂) y los dimetilamino (-C₃H₆N(CH₃)₂) unidos a la estructura de siloxano. La elución se realiza con disolventes (FM) relativamente no polares, tales como el etiléter, el cloroformo y el n-hexano

2. *Fase inversa* (o reversa), la FE es no polar, con frecuencia se trata de un hidrocarburo. Por lo general, el grupo R del siloxano en estos recubrimientos o FE es una cadena C₈ (n-

octilo) o una cadena C₁₈ (n-octadecilo). La elución se lleva a cabo con una FM de elevada polaridad como es el caso de una solución acuosa conteniendo concentraciones diversas de disolventes como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

En cromatografía en fase normal, el componente menos polar eluye primero, debido a que relativamente es el más soluble en la fase móvil y un aumento de la polaridad de la fase móvil provoca un aumento del tiempo de elución. Por contraste, en los métodos en fase inversa, los componentes más polares aparecen primero, y un aumento de la polaridad de la fase móvil disminuye el tiempo de elución.

La mayor parte de HPLC se llevan a cabo con rellenos de fase inversa, ya que muchos de los analitos en las muestras a analizar (alimentos, fármacos, contaminantes, etc.) son de naturaleza hidrofílica y, por tanto, solubles en disolventes (FM) polares.

Ventajas de HPLC en fase reversa:

- Mayor reproducibilidad.
- t_R más cortos (solutos polares).
- Velocidad de muestreo alta.
- No se producen retenciones irreversibles.

Inconvenientes de HPLC en fase reversa:

- pH (2.0 – 7.5) para evitar la hidrólisis del siloxano, lo que originaría la degradación o destrucción del relleno.

Al elegir una columna para una separación cromatográfica de reparto, la polaridad de la fase estacionaria ha de ser bastante similar a la de los analitos, y para la elución se utiliza una fase móvil con una polaridad considerablemente distinta. En fase reversa, la FM suele ser acuosa, pero tiene un débil poder de elución de analitos apolares debido a su alta polaridad. Por eso se utilizan el agua en gradiente con otros disolventes que tiene menor polaridad y por tanto aumentan el poder de elución de analitos apolares. Para conseguir el poder de elución deseado se utilizan mezclas de disolventes teniendo en cuenta la serie eluotrópica siguiente:

hexano < tolueno < cloroformo < diclorometano < acetona < acetato de etilo < etanol < metanol < H₂O

Los analitos son más retenidos en la FE, cuanto menos solubles son en H₂O (menos polares). La retención aumenta con la hidrofobicidad. Los t_R aumentan con el nº de átomos de C en la molécula. Cuando mayor es la proporción de agua en la FM, mayor es la retención de los analitos poco polares. En las siguientes mezclas de disolventes se observa el cambio en el poder de elución a medida que cambia el gradiente en la mezcla:

Hexano: Acetato de etilo, 100: 1	↓ Mayor poder de elución
Hexano: Acetato de etilo, 20: 1	
Hexano: Acetato de etilo, 10: 1	
Hexano: Acetato de etilo, 1: 1	

Las aplicaciones de HPLC en fase reversa son amplias debido a que todas las moléculas orgánicas poseen grupos funcionales hidrofóbicos capaces de interaccionar con la FE. Destacar el control de calidad de productos alimentarios (bebidas alcohólicas y no alcohólicas, leche y derivados, antibióticos en piensos, presencia de aditivos como edulcorantes, ácidos orgánicos, colorantes, detección de fraudes); y el control de contaminación de aguas (PAHs, pesticidas organoclorados y organofosforados, fenoles, etc) (figura 9.4.).

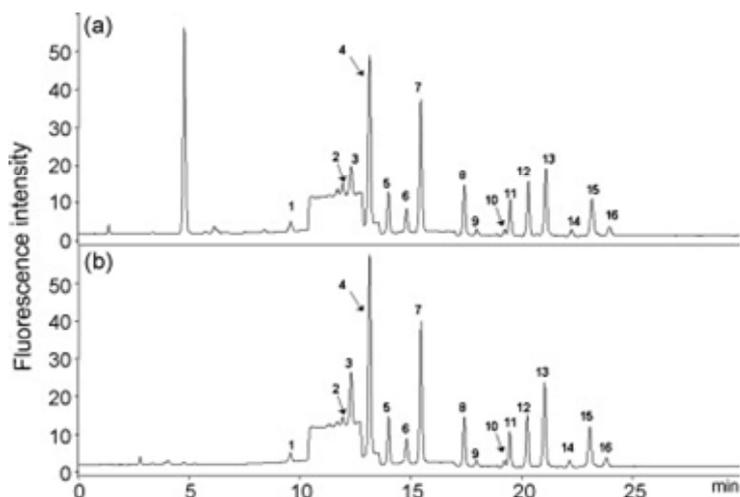


Fig. 9.4. Cromatogramas obtenidos para mezclas de pesticidas en suelos mediante HPLC y detector de fluorescencia. (a) preparación de muestra mediante extracción asistida por microondas (MAE) (b) preparación de muestra mediante dispersión de la matriz en fase sólida (MSPD).

Peak assignment. 1, Naph (39.07 ng g^{-1}); 2, Ace (38.96 ng g^{-1}); 3, Flu (21.54 ng g^{-1}); 4, Phen (138.88 ng g^{-1}); 5, Anth (26.38 ng g^{-1}); 6, Flt (153.95 ng g^{-1}); 7, Pyr (186.91 ng g^{-1}); 8, B[a]A (33.13 ng g^{-1}); 9, Chry (74.16 ng g^{-1}); 10, B[e]P (65.18 ng g^{-1}); 11, B[b]F (76.40 ng g^{-1}); 12, B[k]F (20.59 ng g^{-1}); 13, B[a]P (45.86 ng g^{-1}); 14, DB[a,h]A (10.10 ng g^{-1}); 15, B[g,h,i]P (47.47 ng g^{-1}); 16, I[1,2,3-c,d]P (69.67 ng g^{-1}).

9.5. Instrumentación básica en HPLC

Las Figuras 9.5 y 9.6 muestran esquemas de los componentes fundamentales de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución típico. Cada uno de los componentes se tratará a continuación.

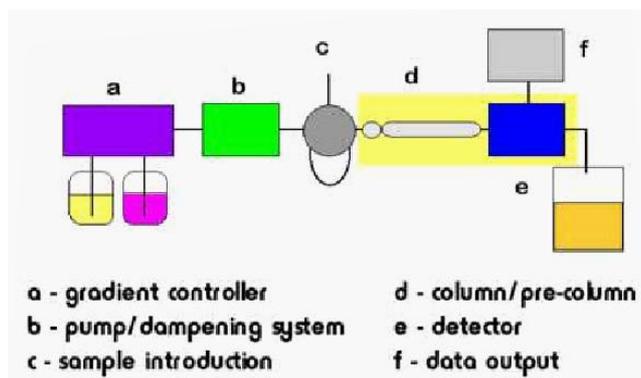


Fig. 9.5. Componentes básicos de un instrumento de HPLC.

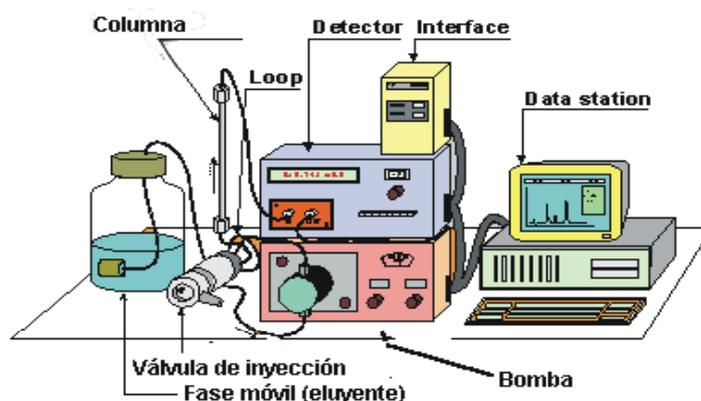


Fig. 9.6. Esquema de un equipo de HPLC.

9.5.1. Fase móvil.

Los disolventes utilizados como FM deben de tener las siguientes características:

- No contener partículas en suspensión, para ello se requiere una filtración previa a su utilización (filtro de 0.2 μm).
- Alta a pureza (grado HPLC), puesto que las impurezas degradan la columna e interfieren en la medida.

- La presencia de gases disueltos (O_2 y N_2) en la FM pueden originar problemas (reacciones indeseables entre los gases y los compuestos de la muestra, irregularidades en el flujo dentro de la columna que reducen la eficacia y la reproducibilidad de la separación, variaciones en las respuestas del detector que produce cambios en la línea base del cromatograma). Por ello la FM debe ser desgasificada mediante alguno de los siguientes sistemas: vacío moderado, ultrasonidos, burbujeo de una corriente de gas inerte (helio) a través del disolvente (figura 9.7.). Este tratamiento elimina los gases además de la materia en suspensión.

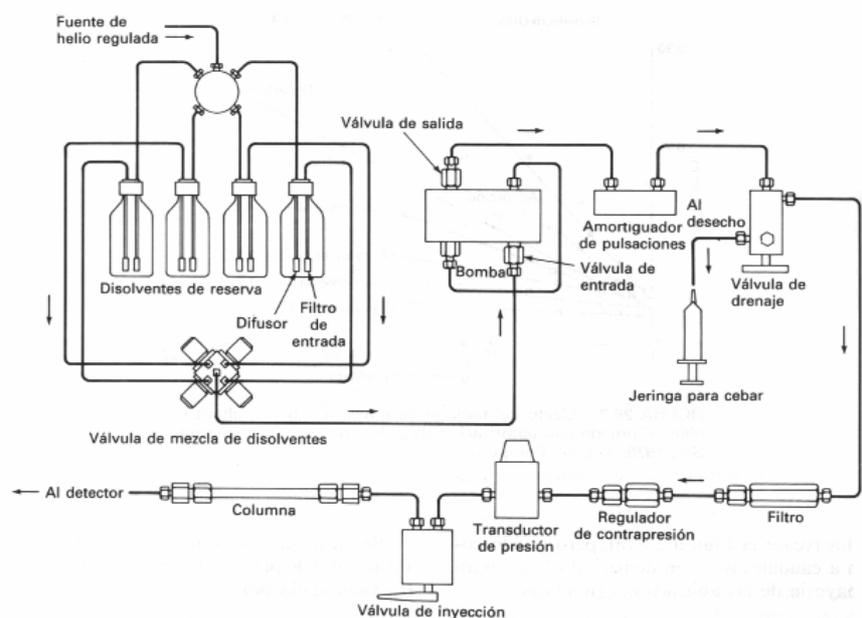


Fig. 9.7. Esquema de HPLC con sistema de difusión que permiten arrastrar los gases disueltos fuera de la solución mediante finas burbujas de un gas inerte de baja solubilidad.

- El material de los recipientes o contenedores suele ser de vidrio, pero en algunos casos puede ser de politetrafluoretileno (PTFE). Con frecuencia estos sistemas también poseen un dispositivo para la filtración del polvo (para partículas mayores de 2-5 μm) y de las partículas sólidas en suspensión de los disolventes, como el mostrado en la figura 9.8.



Fig. 9.8. Tubo de entrada del disolvente (FM) al cromatógrafo provisto de un filtro de poro fino.

9.5.2. Modos de elución.

A diferencia de GC, la variación de la temperatura tiene efectos mínimos en la separación mediante LC. Variaciones en la polaridad del disolvente afectan enormemente a la retención/elución. Esto se logra alterando la FM pura o mezcla de disolventes durante el análisis. Una separación que utiliza un solo disolvente de composición constante se denomina una elución isocrática. Con frecuencia, la eficiencia de la separación se aumenta notablemente por una elución con gradiente. En este caso se utilizan dos (y a veces más) disolventes con una polaridad significativamente distinta. Una vez comienza la elución, se varía la relación de los disolventes de forma programada, a veces continuamente y a veces mediante una serie de etapas escalonadas.

La Figura 9.9. ilustra la ventaja de la utilización de una elución con gradiente en la separación de una mezcla de clorobencenos. El cromatograma (a) muestra la elución con gradiente, que se inicia con una mezcla 40:60 de los dos disolventes y se va aumentando la concentración de metanol

un $8\% \text{min}^{-1}$. El cromatograma (b) corresponde a la elución isocrática con metanol/agua 50:50 (v/v).

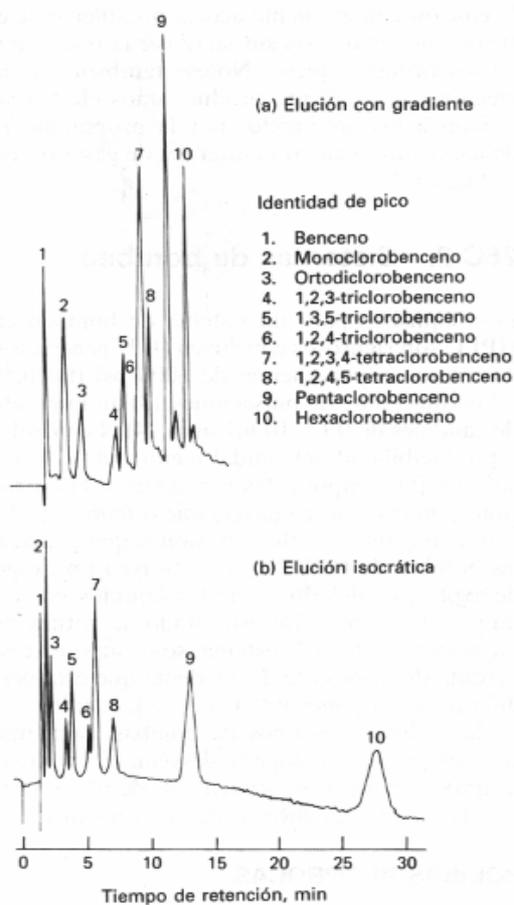


Fig. 9.9. Mejora de la eficiencia de la separación mediante la elución con gradiente. Columna de 1 m x 2.1 mm d.i. de acero inoxidable, relleno 1% Permaphase ODS. Muestra: 5 μL de bencenos clorados en isopropanol. Detector: fotómetro de UV (254 nm). Condiciones: temperatura 60°C , presión 80 kgcm^{-2} . (a) elución con gradiente: metanol 40% / agua 60% e incremento de la proporción de metanol a una velocidad de

un $8\% \text{min}^{-1}$ (b) Elución isocrática con metanol 50% / agua 50%.

Se observa que la elución con gradiente acorta notablemente el tiempo de separación sin sacrificar la resolución de los primeros picos, mejorando su forma y la sensibilidad. Además, la elución con gradiente produce unos efectos similares a los producidos por la programación de temperatura en cromatografía de gases.

Se debe tener en consideración la fuerza desplazante que equivale a la polaridad para disolventes no electrolíticos. Cuanto más polar es el disolvente, mayor poder de elución. No todos los métodos de LC permiten el uso del modo de elución con gradiente:

Cambio iónico	Si
Líquido-líquido	Difícil
Fase enlazada	Si
Exclusión por tamaño	No
Adsorción	Si

9.5.3. Sistemas de bombeo.

Los requisitos para un sistema de bombeo en HPLC son rigurosos e incluyen:

- Operar en un rango amplio de presiones (500-10000 psi).
 - Operar con flujos variables (0,1-10 mL/min).
 - Control y reproducibilidad del flujo (variaciones < 0,5%).
 - Flujo libre de pulsaciones.
 - Componentes inerte químicamente y resistentes a la corrosión (materiales utilizados de teflón, acero inoxidable).
- Se utilizan tres tipos de bombas, cada una con sus propias ventajas y desventajas: bombas neumáticas o de presión constante, bombas de flujo constante y bombas recíprocas.

Bombas neumáticas o de presión constante. Se aplica presión de gas desde un tanque externo mediante un regulador de presión, no hay pulsos de presión, el depósito es limitado y el coste es bajo. Tiene problemas para introducir el gas en el disolvente y no permite trabajar en modo gradiente (figura 9.10).

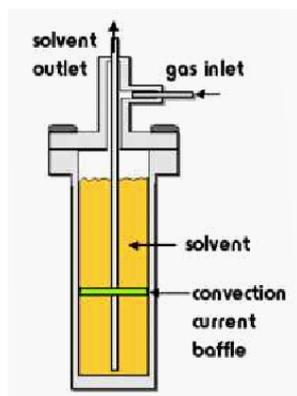


Fig. 9.10. Contenedor cilíndrico que contiene la FM y un tubo por el que penetra un gas a presión que impulsa la FM.

Bombas de flujo constante. De jeringa o desplazamiento. Consta de un depósito cilíndrico que contiene la FM y que es recorrido por un pistón impulsado por un tornillo a cierta velocidad. Sólo se usan en aplicaciones excepcionales (figura 9.11.). Permiten obtener un flujo uniforme, trabajar a presiones y flujos altos y su mantenimiento es sencillo al carecer de válvulas. Sin embargo presenta inconvenientes como su elevado precio o su reducida capacidad volumétrica para contener FM.

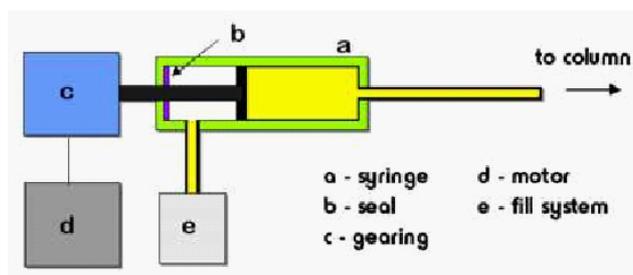


Fig. 9.11. Esquema de jeringa de desplazamiento.

Bombas recíprocas de pistón simple. Las bombas recíprocas, que se utilizan en aproximadamente el 90% de los sistemas de HPLC comercializados, consisten, por lo general, en una pequeña cámara en la que el disolvente es impelido por el movimiento de vaivén de un pistón accionado por un motor. Dos válvulas con cierre de bola, que se abren y cierran alternativamente, controlan el flujo del disolvente hacia dentro y hacia afuera de un cilindro (figura 9.12.). Las bombas recíprocas tienen la desventaja de que producen un flujo con pulsaciones, las cuales se han de amortiguar dado que su presencia se manifiesta como ruido en la línea base en el cromatograma.

Muchos de los detectores utilizados en HPLC son sensibles a variaciones de flujo. Un método sencillo de amortiguación contiene un fuelle flexible o un gas compresible en la porción superior cerrada de un tubo en T para absorber parte de la energía de pulsación. Cuando la bomba se rellena esta energía se libera para ayudar a suavizar la pulsación de presión. Los amortiguadores electrónicos de pulsos proporcionan una carrera hacia delante corta y rápida del pistón, y enseguida la carrera rápida de recarga de la bomba. El pequeño impulso hacia delante amortigua el pulso de flujo llevando disolvente a la presión del sistema. Entre las ventajas de las bombas recíprocas se pueden citar el control estricto de flujo y presión, trabajar con flujos más constantes, presiones de salida elevadas (> 800 atm), fácil adaptación a la elución con gradiente y mantenimiento escaso y sencillo.

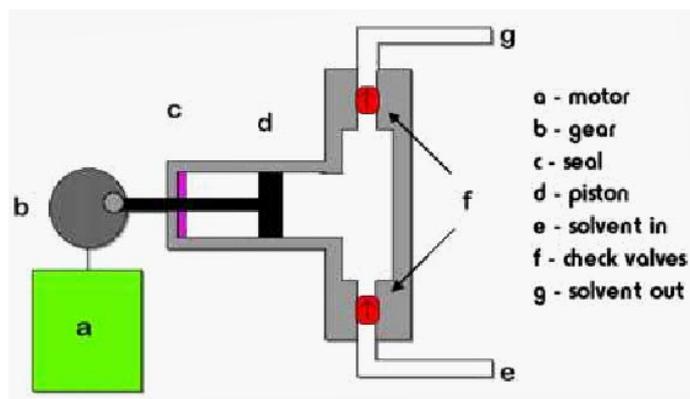


Fig. 9.12. Esquema de una bomba recíproca de pistón simple.

Bombas recíprocas de doble pistón. Para producir un flujo uniforme, libre de pulsaciones llevan dos pistones de zafiro. Según el esquema de la figura 9.13., del depósito de la izquierda pasa disolvente a través de una válvula electrónica de entrada, sincronizada con el primer pistón y diseñada para minimizar la formación de burbujas. La válvula de salida, de resorte, mantiene una presión de salida constante y el amortiguador reduce aun más las variaciones de presión. Cuando el primer pistón absorbe líquido, el segundo impulsa disolvente hacia la cámara y el resto a la columna. La rapidez del flujo se controla reduciendo el camino recorrido por los pistones (cuanto menor sea, mayor será el número de emboladas por tiempo).

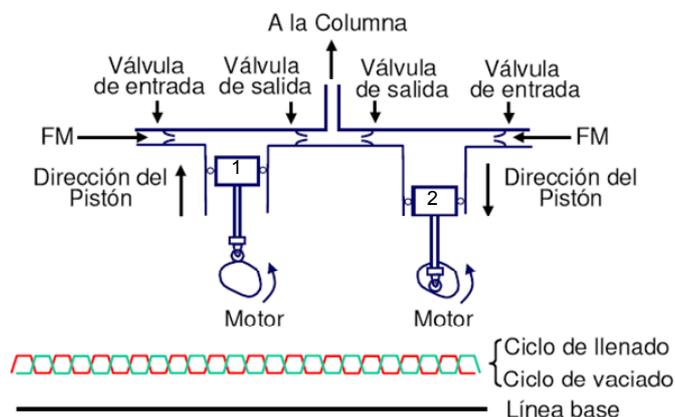


Fig. 9.13. Esquema de funcionamiento de una bomba recíproca de doble pistón.

9.5.4. Control de gradiente.

Como una parte de sus sistemas de bombeo, muchos instrumentos comerciales se equipan con dispositivos controlados por ordenador que permiten medir el caudal mediante la determinación de la caída de presión a través de un restrictor colocado en la salida de la bomba. Cualquier diferencia entre la señal y un valor preestablecido se utiliza para aumentar o disminuir la velocidad del motor de la bomba. Por otro lado, la mayor parte de los instrumentos pueden variar la composición del disolvente bien sea de una forma continua o bien de forma escalonada.

1. Mezcla a alta presión. Los disolventes que formarán parte de la FM se mezclan una vez presurizados (figura 9.14.).
2. Mezcla a baja presión. Se presuriza la FM después de obtener la mezcla de disolventes (figura 9.15.).

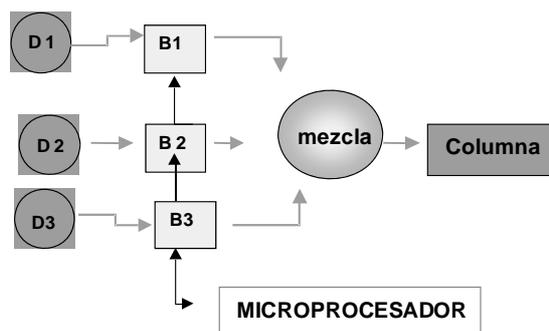


Fig. 9.14. Mezcla de disolventes (FM) a alta presión.

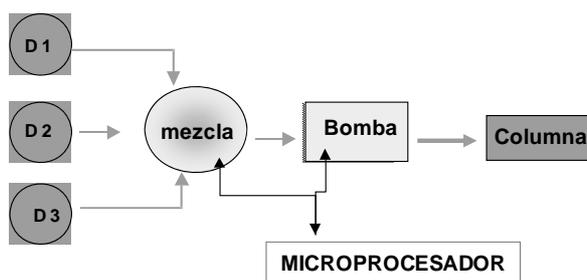


Fig. 9.15. Mezcla de disolventes (FM) a baja presión.

9.5.5. Sistemas de inyección.

Los volúmenes que se emplean han de ser muy pequeños, de unas pocas décimas de microlitro a tal vez 500 μL para conseguir picos estrechos. Además, no se deben alterar las características hidrodinámicas del sistema e introducir la muestra sin despresurizar el sistema y sin interrumpir el flujo de FM. La introducción de la muestra se puede realizar de forma manual o automática, por acoplamiento a un muestreador. En este último caso la inyección puede ser mediante jeringa, mediante válvula rotatoria o de bucle (externo o interno) como muestra la figura 9.16. y mediante válvula con jeringa. Este último dispositivo es versátil, pues admite volúmenes variables, sin necesidad de cambiar el bucle. La inyección se efectúa off-line a presión ambiental, sin

interrumpir el sistema de flujo. La muestra pasa directamente a la columna, evitando la dilución en el disolvente (FM).

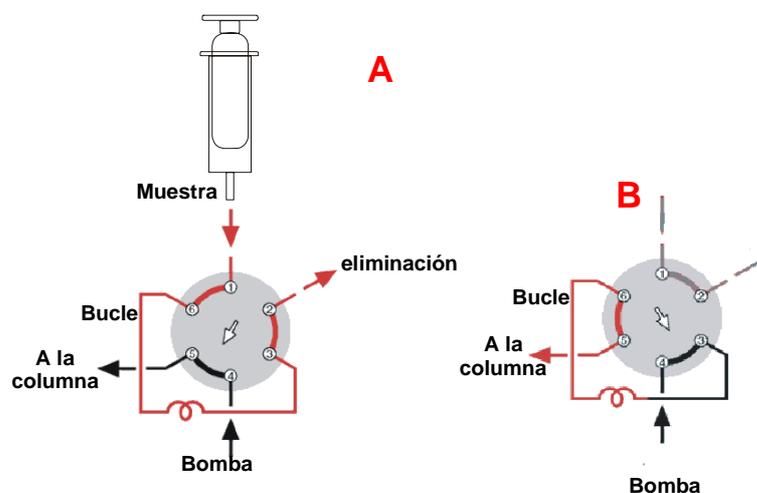


Fig. 9.16. Válvula rotatoria de 6 vías con bucle externo y dos posiciones al girar un rotor: carga o llenado (A) e inyección (B). Para evitar contaminaciones de las muestras, el bucle debe lavarse antes de la inyección de una nueva muestra con disolvente.

9.5.6. Columna

Para aumentar la vida de la columna analítica, se coloca una precolumna que aumenta la vida media de la columna actuando como filtro. Elimina la materia en suspensión y los contaminantes de los disolventes. La composición del relleno de la precolumna debe ser semejante al de la columna; sin embargo, el tamaño de partícula es mayor para minimizar la caída de presión (figura 9.17.).

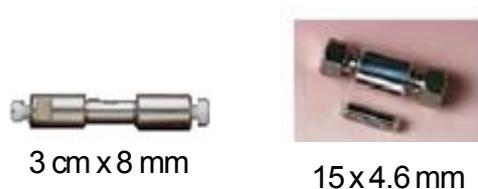


Fig. 9.17. Precolumnas utilizadas en HPLC.

La mayoría de las columnas para cromatografía de líquidos tienen una longitud entre 5 y 25 cm y 4.6 mm de diámetro interno, y empaquetada con partículas de 5 μm . Los tipos de relleno en las columnas convencionales pueden ser:

1. *Empaquetamiento con partículas peliculares* (figura 9.18.). La FE está formada por esferas de vidrio o polímero sobre las que se deposita una película delgada y porosa de sílice (o una resina de intercambio iónico, etc.). Tienen menor resistencia a la presión.

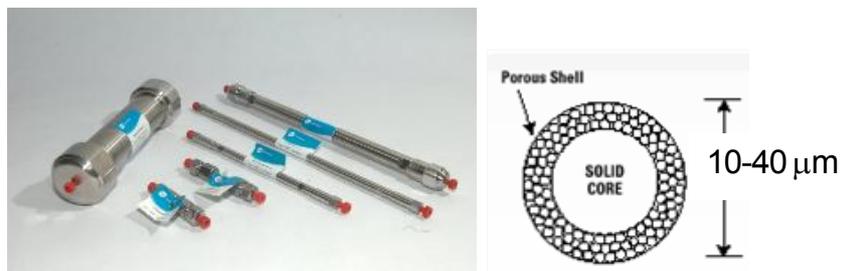


Fig. 9.18. Columnas de HPLC de empaquetamiento con partículas peliculares.

2. *Empaquetamiento con partículas microporosas* (figura 9.19.). Las partículas son de sílice, alúmina o resinas de intercambio iónico o poliestireno, aunque la sílice es el material más común, también pueden ser sílice con una fase ligada. ($d = 3\text{-}10 \mu\text{m}$).

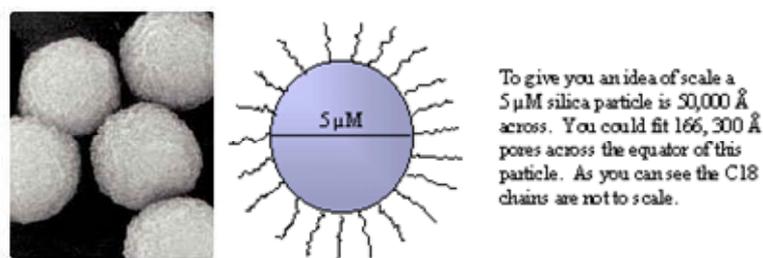


Fig. 9.19. Partículas de sílice para el empaquetamiento de columnas de HPLC con partículas microporosas.

También, se han empezado a fabricar columnas de alta resolución más rápidas, las cuales tienen menores dimensiones que las anteriormente descritas. Las ventajas de la disminución del tamaño de partícula son la mayor capacidad y eficacia (especialmente con partículas esféricas) y soportan mayor presión que las partículas peliculares (figura 9.20.).

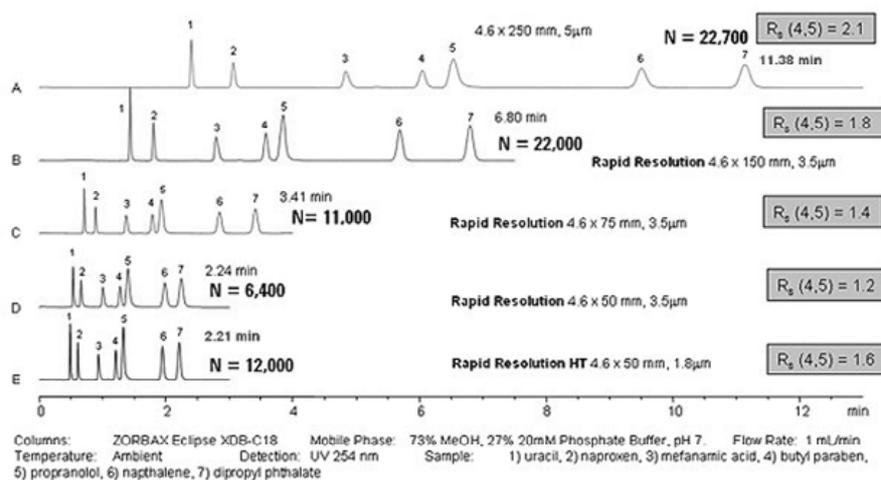


Fig. 9.20. Ejemplo de utilización de columnas HT de resolución rápida. Se reduce el tiempo de análisis un 80% respecto a las columnas convencionales sin perder resolución.

Se puede trabajar a temperatura ambiente o con alta temperatura (con aire en un horno, desde temperatura ambiente hasta 200 °C) en el desarrollo de métodos más rápidos.

Con la termostatación se logra:

-Disminuir la viscosidad de la FM. Esto permite trabajar con mayor flujo, separaciones más rápidas, mayor eficacia y el uso de columnas con 2 µm.

-La transferencia de masa es más rápida que permite mejorar la eficacia y disminuir el tiempo de análisis con separaciones más rápidas sin pérdida de resolución.

-Puede cambiar la selectividad optimizando la resolución.

FE para cromatografía de adsorción

Alúmina. FM: hexano, cloroformo, 2-propanol.

Ej. de aplicación: aminas.

Sílice. FM: hexano, cloroformo, 2-propanol.

Ej. de aplicación: éteres, ésteres, porfirinas, vitaminas liposolubles.

FE para cromatografía de reparto.

Fase normal: materiales polares enlazados a soporte amino, ciano, diol

Fase reversa: materiales no polares enlazados a soporte C₂, C₈, C₁₈

Fase intermedia

FE para cromatografía de cambio iónico.

Catión fuerte: grupo ácido sulfónico.

Anión fuerte: amina cuaternaria.

Anión débil: amina primaria.

Catión débil: grupo ácido -COOH.

FE para cromatografía de exclusión por tamaño.

Geles orgánicos o acuosos.

Partículas de vidrio o sílice de poro controlado.

9.5.7. Sistemas de detección.

Un detector ideal para cromatografía de líquidos debería poseer todas las propiedades listadas en relación con la cromatografía de gases (sensibilidad y respuesta lineal, insensible a los cambios de composición de la FM y de las condiciones ambientales de presión, caudal, temperatura), con la excepción de que un detector para cromatografía de líquidos no es necesario que sea sensible en un intervalo tan grande de temperaturas. Además, un detector de HPLC debe tener un volumen interno mínimo a fin de reducir el ensanchamiento de banda.

En HPLC se suelen adaptar a la situación dinámica de circulación de la FM instrumentos de medida como refractómetros, espectrofotómetros, etc. Para obtener máxima información en continuo sobre los analitos en muestras muy complejas, la tendencia actual se dirige hacia la hibridación instrumental: HPLC-MS, HPLC-RMN, HPLC-AAS.

Detectores de absorbancia.

Utilizan celdas de flujo en forma de Z con volumen bajo (1-10 μL), y longitud de 2-10 mm (figura 9.21.). La FM debe absorber la mínima radiación a la longitud de onda seleccionada para los analitos. La detección no debe afectarse por las fluctuaciones del flujo de FM ni de temperatura.

Muchos detectores de absorbancia son dispositivos de doble haz, en los que uno de los haces pasa por la cubeta de flujo y el otro a través de un filtro que reduce su intensidad. Para comparar las intensidades de los dos haces se utilizan detectores fotoeléctricos. También se utilizan instrumentos de un solo haz. Los detectores de absorción UV más simples son los fotómetros de filtros con una lámpara de mercurio como fuente. Lo más común en estos casos es aislar la línea intensa a 254 nm por medio de filtros, pero carecen de flexibilidad para cambiar de zona de absorbancia (figura 9.22.). En algunos equipos también se pueden utilizar las líneas a 250, 313, 334 y 365 nm empleando otros filtros. Este

tipo de detector se utiliza de forma restringida para aquellos solutos que absorben a alguna de estas longitudes de onda.

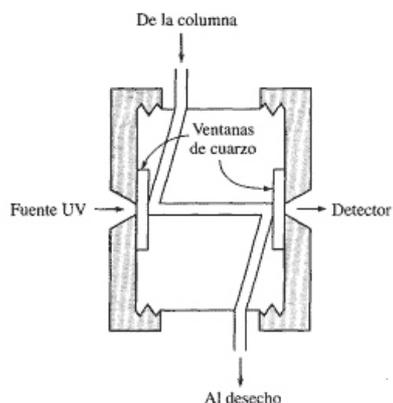


Fig. 9.21. Celda del detector de absorbancia UV en HPLC.

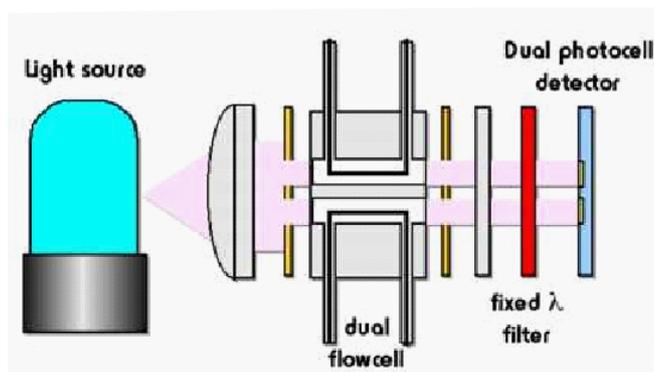


Fig. 9.22. Detector de HPLC basado en un fotómetro de filtros de longitud de onda fija

La mayoría de los fabricantes de instrumentos de HPLC ofrecen detectores que consisten en un espectrofotómetro de barrido con óptica de red de difracción. Algunos se limitan a la radiación UV; mientras que otros abarcan la radiación UV y la

visible. Son espectrofotómetros de longitud de onda variable que poseen una mayor selectividad. Los detectores de barrido están basados en series de diodos (DAD) y son los instrumentos más potentes (figura 9.23.).

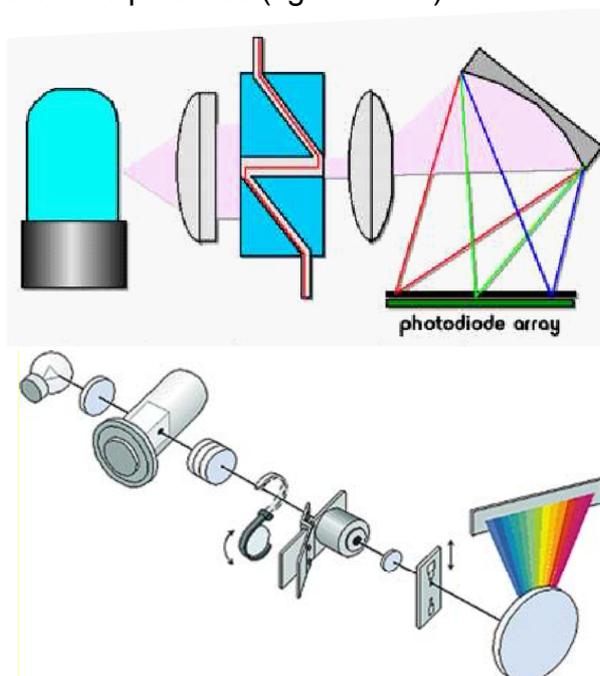


Fig. 9.23. Detector de HPLC basado en un espectrofotómetro multicanal de serie de diodos.

No existe un monocromador antes de la celda de flujo. La muestra recibe la radiación lumínica total. Lleva una red de difracción para dispersar la radiación después de pasar por la muestra. El detector posee entre 200 y 1000 diodos. Se detectan varias longitudes de onda, permitiendo la detección simultánea de varios compuestos sin repetir la inyección. Algunos fabricantes ofrecen este tipo de instrumentos, que permiten recoger los datos de un espectro completo en aproximadamente un segundo. De esta forma, los datos espectrales para cada pico cromatográfico se pueden recoger

y almacenar a medida que van saliendo de la columna. Una de las formas de presentación de los datos espectrales, que resulta útil para la identificación de las especies y para elegir las condiciones de la determinación cuantitativa, consiste en un gráfico tridimensional tal como el que se muestra en la figura 9.24.

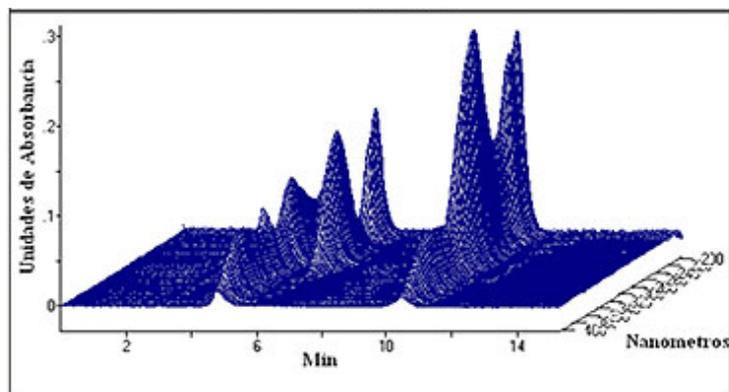


Fig.9.24. Espectro tridimensional (absorbancia/longitud de onda/tiempo).

Detectores de fluorescencia.

Los detectores para HPLC son semejantes en diseño a los fluorímetros y espectrofluorímetros. En la mayoría de ellos, la fluorescencia se detecta por medio de un detector fotoeléctrico colocado perpendicularmente respecto al haz de excitación. Los detectores más sencillos utilizan una fuente de excitación de mercurio, y uno o más filtros para aislar la radiación fluorescente. Los futuros desarrollos en los detectores de fluorescencia probablemente se basarán en el uso de fuentes de láser sintonizables, las cuales permiten una mayor sensibilidad y selectividad.

Una ventaja inherente a los métodos de fluorescencia es su alta sensibilidad, que resulta ser más de un orden de magnitud mayor que la de los sistemas de absorbancia. En cromatografía de líquidos se ha aprovechado esta ventaja

para la separación y determinación de los componentes fluorescentes de las muestras.

Detectores electroquímicos.

Los fabricantes de instrumentos proporcionan en la actualidad varios tipos de detectores electroquímicos. La electroquímica abarca los procesos químicos y físicos que implican la transferencia de carga:

1. De constante dieléctrica: Medida del cambio de polaridad de la FM que pasa a través de la célula.
2. Voltamperométrico: Medida de la corriente con fines analíticos a potencial controlado.
3. Conductimétrico: Medida de la conductividad del disolvente (FM) (disolución de iones).
4. Polarográfico: Medida de corriente entre electrodo de trabajo de Hg y electrodo auxiliar inerte. El voltaje se mide y controla entre electrodo de Hg y electrodo de referencia.
5. Potenciométrico: Medida del potencial de célula electroquímica en ausencia de corriente apreciable.
6. Coulombimétrico: Medida de los electrones consumidos para llevar a cabo una reacción química, a potencial controlado.

9.6. Acoplamiento de LC y espectrometría de masas (MS).

El factor limitante para el desarrollo del acoplamiento LC-MS ha sido la obtención de interfases que permitieran la introducción directa del flujo de LC en el detector de MS. Había varios problemas a resolver:

1. Un flujo de FM alto (1 mL min^{-1}), para vaporizar en MS.
2. Características de la FM (disolventes orgánicos, acuosos, sales inorgánicas no volátiles...) incompatibles con MS.
3. Características de los compuestos eluidos: moléculas complejas de peso molecular alto, de baja volatilidad, alta polaridad, o termolábiles.

Las primeras interfases utilizadas eliminaban el disolvente, con el fin de simular el proceso de evaporación del analito y posterior ionización, como ocurría en el acoplamiento GC-MS.

Es el caso de la interfase de haz de partículas. Sin embargo se observó que la presencia de disolvente no tenía porque perturbar el análisis por MS e incluso podía ayudar a la ionización de los analitos. Las interfases más utilizadas actualmente son la nebulización térmica (termospray) la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la electronebulización o electrospray (ESI).

9.6.1. *Termospray.*

La muestra se calienta y se produce un chorro de vapor mediante un nebulizador que es conducido al vacío. Las gotas formadas reducen su tamaño por desolvatación y se produce una carga estática. Las partículas cargadas entran en el MS (figura 9.25.)

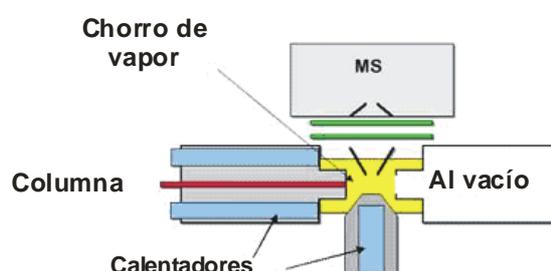


Fig. 9.25. Esquema de nebulización térmica o termospray

9.6.2. *Ionización química a presión atmosférica (APCI).*

El flujo de LC procedente del sistema cromatográfico se nebuliza en un tubo vaporizador de sílice fundida caliente donde el disolvente es evaporado prácticamente en su totalidad. La mezcla de gas-vapor entra en la fuente a presión atmosférica, donde la ionización química es iniciada por los electrones generados en una aguja (corona) por descarga. El vapor de disolvente actúa como gas reactivo. Los iones generados son transferidos por el alto vacío del detector MS (figura 9.26.).

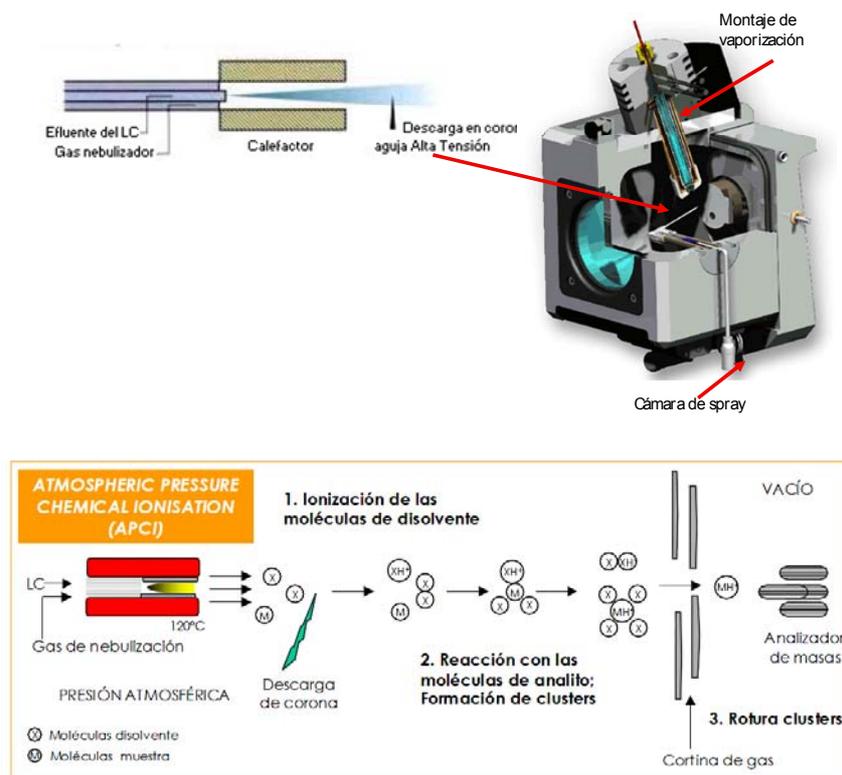


Fig. 9.26. Esquema de de interfase APCI (arriba). Mecanismo de formación de iones (abajo).

Los iones primarios (N_2^+ ; O_2^+ H_2O^+ y NO^+ del aire) reaccionan con el disolvente para formar iones reactivos secundarios ($[X+H]^+$, en modo positivo y $[X-H]^+$ en modo negativo), donde X son las moléculas de disolvente de la fase móvil. Los iones reactivos reaccionan con los analitos para formar iones (positivos o negativos, dependiendo del modo) que son dirigidos a la óptica del MS. La interfaz APCI es efectiva para la ionización de compuestos térmicamente estables, de baja a media polaridad, como por ejemplo pesticidas o esteroides.

9.6.3. Electrospray (ESI).

El flujo procedente de la LC, en el que están disueltos los analitos, pasa a través de un capilar a presión atmosférica, manteniendo a alto voltaje que dispersa la corriente de líquido, formándose gotas altamente cargadas (nebulización) que son desolvatadas, a medida que pasan a través de la región a presión atmosférica de la fuente del espectrómetro de masas. La desolvatación es asistida por una corriente de gas caliente (nitrógeno). A medida que disminuye el tamaño de las gotas se alcanza un punto en el cual las fuerzas repulsivas entre las cargas en la superficie de las gotas son suficientes para superar las fuerzas cohesivas de tensión superficial. Se producen por explosión, gotas más pequeñas hasta que se alcanza un punto en el cual los iones pasan a fase gas, siendo transferidos a través de una serie de lentes focalizadoras hacia el analizador del espectrómetro de masas. La ionización tiene lugar directamente en la disolución y las moléculas térmicamente lábiles pueden ser ionizadas sin degradación (figura 9.27.).

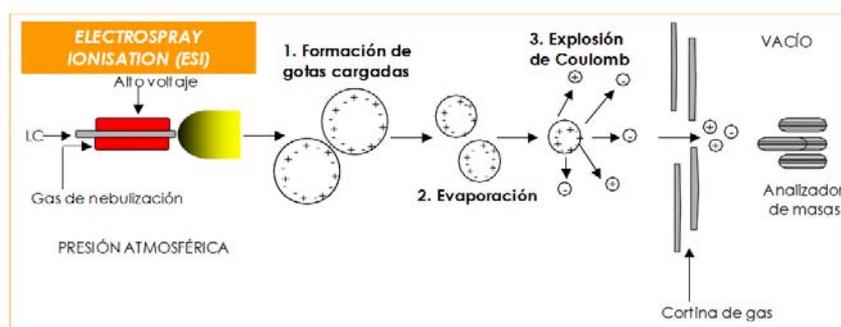


Fig. 9.27. Mecanismo de formación de iones mediante ESI.

Aunque la interfase ESI es la más indicada para compuestos iónicos o muy polares y la APCI para los menos polares, hay un amplio rango de polaridades en las que ambas interfases pueden trabajar aceptablemente, dependiendo la elección de

una u otra en función de la sensibilidad alcanzada y de la matriz de la muestra. En general ESI es más efectiva, por lo que suele dar lugar a determinaciones más sensibles.

9.6.4. *Analizador de triple cuadrupolo.*

Se puede obtener información adicional a la requerida por los iones generados en el proceso de ionización, a partir de la fragmentación de estos iones (MS en tándem). En el caso de filtro cuadrupolar, el uso de MS/MS implica la adición de dos cuadrupolos extra a un instrumento de cuadrupolo lineal, como se muestra en la figura 9.28. La fragmentación se produce por colisión del ion seleccionado (ion precursor) con moléculas de gas inerte (generalmente argón). Este proceso, llamado disociación inducida por colisión (CID) se produce en dos pasos: en primer lugar, la energía transicional del ión se convierte en energía interna tras colisionar con las moléculas del gas inerte; en segundo lugar, esta energía interna se utiliza para romper el ion en varios fragmentos (iones producto). En el primer cuadrupolo se puede aislar un ion de m/z determinada que pasa al segundo cuadrupolo, usado como celda de colisión. El ion se fragmenta en función de la estructura del analito. La transmisión de los iones desde la celda de colisión al tercer cuadrupolo debe ser lo más efectiva posible para que se pueda realizar un barrido de los iones o seleccionar uno de ellos con el fin de obtener una transición selectiva del analito. La geometría de la celda puede ser un hexápolo o un octapolo para favorecer la transmisión.

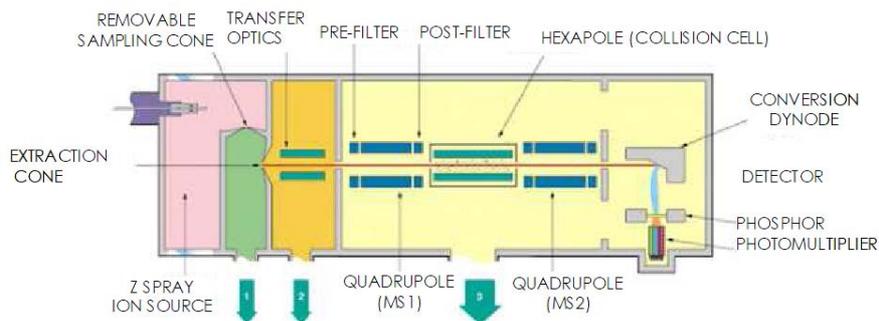


Fig. 9.28. Esquema de un triple cuadrupolo en un equipo LC-MS/MS

Se pueden utilizar distintos modos de barrido en función del objetivo final del análisis. En modo MS se puede realizar un barrido de todos los iones (full scan). En este caso, todos los iones que alcanzan el detector son monitorizados. Se generan cromatogramas en tres dimensiones (tiempo de retención, intensidad y relación m/z). También se puede seleccionar un ion concreto para ser monitorizado (selected ion monitoring, SIM) (figura 9.29.).

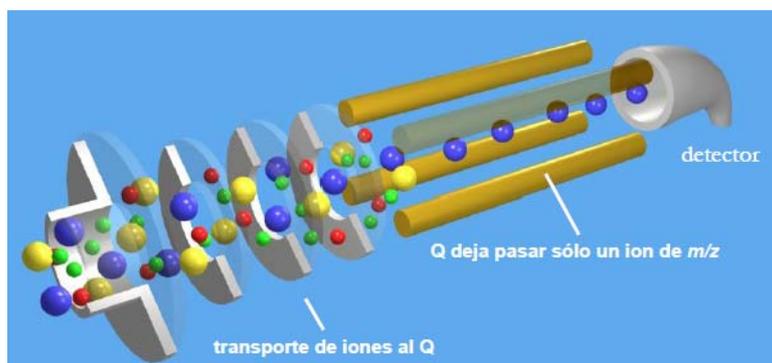


Fig. 9.29. Monitorización selectivo de iones (SIM).

Cuando se trabaja en MS/MS se pueden realizar barridos de iones producto, barridos de iones precursores, de pérdidas neutra o la monitorización de una transición concreta, la fragmentación de un determinado ión precursor para dar un determinado ion producto (selected reaction monitoring, SRM) aumentando la sensibilidad y la selectividad.

9.6.5. Analizador de tiempo de vuelo (TOF).

Los iones son separados en función del tiempo que tardan en atravesar un tubo de vuelo de longitud conocida, que depende de la relación m/z . Como todos los iones inician su viaje en un intervalo de tiempo suficientemente corto, los iones más ligeros llegan al detector antes que los más pesados. Por eso los iones que llegan de la interfase pasan mediante un pulso al TOF (operando en modo discontinuo). Esto se consigue mediante la aceleración ortogonal de los iones y muestreando una fracción de este haz de iones (el 25% de los generados). Mediante la introducción de reflectrones o espejos iónicos, que reenfocan los iones de la misma masa sobre el detector, se aumenta notablemente la resolución del analizador TOF (figura 9.30.).

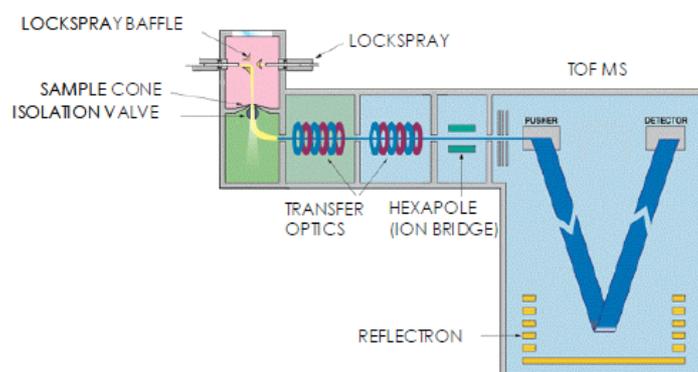


Fig. 9.30. Esquema de un analizador TOF con reflectrón.

9.6.6. Analizador híbrido cuadrupolo tiempo de vuelo (QTOF).

En este caso, el trabajo en modo MS/MS se realiza con dos analizadores distintos, un cuadrupolo y un TOF, constituyendo un instrumento híbrido. Es un diseño similar al triple cuadrupolo, en el que se ha sustituido el último cuadrupolo por un TOF (figura 9.31.). Una vez fragmentado el ion precursor en la celda de colisión, todos los iones producto son determinados mediante el TOF (Product ion mode). La posibilidad de obtener el espectro de iones producto con masa exacta aumenta la calidad de los datos.

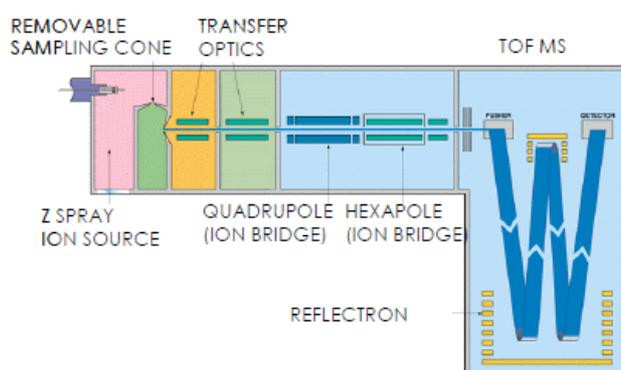


Fig. 9.31. Esquema de un analizador QTOF con doble reflectrón.

9.6.7. Cromatografía líquida en el control de procesos.

Presenta algunas diferencias significativas con la LC de laboratorio:

- Bombas neumáticas
- Columnas múltiples
- Detectores utilizados: UV, de índice refracción, MS, MS/MS.

Las figuras 9.32. y 9.33 muestran esquemas generales de LC en el control de proceso.

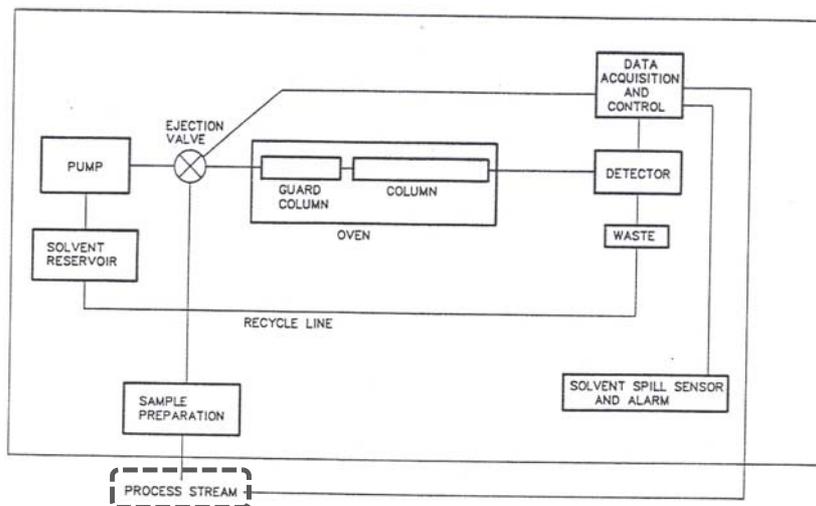


Fig. 9.32. Sistema de LC para el control de procesos en la industria farmacéutica

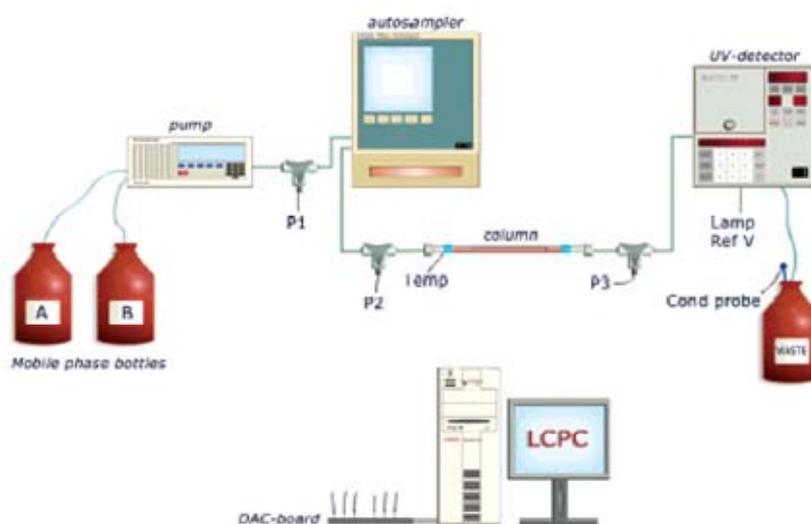


Fig. 9.33. Control de procesos on-line mediante cromatografía líquida con elución en gradiente. Sensores de presión (P1, P2 y P3).

Otro interesante ejemplo de la aplicación de LC en el control de procesos es la determinación de acrilamida en patatas fritas mediante extracción en fase sólida y determinación por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (SPE-LC-MS). La acrilamida es un compuesto con propiedades potencialmente cancerígenas, que se forma durante la fabricación y procesado a altas temperaturas de alimentos ricos en almidón (patatas fritas, cereales, snacks). La figura 9.34. muestra dos cromatogramas obtenidos mediante la metodología propuesta.

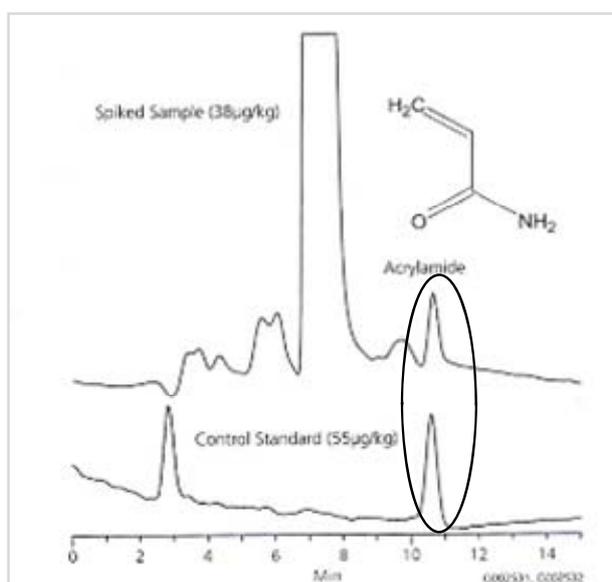


Fig. 9.34. Cromatogramas de una muestra con adición de acrilamida (arriba) y de un patrón (abajo).

9.7. Bibliografía

D.A. SKOOG, D.M. WEST, F.J. HOLLER and S.R. CROUCH “**Fundamentos de Química Analítica**” 8º Ed. Thomson Madrid (2005).

D.A. SKOOG, F.J. HOLLER and T.A. NIEMAN “**Principios de Análisis Instrumental**” 5º Ed. Mc Graw Hill Madrid (2001).

R. CELA, R.A. LORENZO, Mª DEL CARMEN CASAS. “**Técnicas Analíticas de Separación en Química Analítica**” Ed. Síntesis, Madrid (2002).

M.V. DABRIO “**Cromatografía y electroforesis en columna**” Ed. Springer-Verlag Ibérica. Barcelona (2000)

K.A. BAKEEV (Ed.) “**Process Analytical Technology**” Blackwell Publishing .Oxford (2005)

http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=en_US&cid=511505

<http://niobio.grasa.csic.es/jrios/weblab/grafesiapci.html>

http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=es_ES&cid=10046886

<http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8249/4/T5masas.pdf>

<http://tdx.cat/bitstream/handle/10803/10536/ibanyez2.pdf?sequence=1>

TEMA 10. SENSORES ELECTROANALÍTICOS

Objetivos

- ✓ Conocer el fundamento de los sensores electroanalíticos.
- ✓ Distinguir los diferentes sensores en función de su clasificación.
- ✓ Adquirir los conocimientos básicos de los diferentes componentes de un electrodo.
- ✓ Mostrar las aplicaciones más importantes de los diversos sensores electroanalíticos.

10.1. Fundamento de los sensores electroanalíticos (ISE).

Un sensor electroquímico es un dispositivo químico que responde a cambios específicos en el potencial o en la corriente eléctrica como consecuencia de la presencia de una especie química que interactúa de manera muy selectiva con él (ion selective electrodes, ISE). Son dispositivos muy simples y fácilmente miniaturizables, lo que permite hacer medidas en pequeños volúmenes de muestras o en zonas de dimensiones reducidas.

Consta esencialmente de dos partes: el elemento de reconocimiento que interactúa con el analito y concede selectividad al sensor y el transductor que permite convertir esa interacción en una señal analítica. Cuando el transductor es un electrodo, el sensor será un sensor electroquímico y cuando en el elemento de reconocimiento intervienen especies biológicas (enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc) estaremos en presencia de un biosensor.

Tanto los ISE como los biosensores utilizan transductores que se basa, fundamentalmente en métodos electroquímicos de interfase.

Los métodos electroquímicos de interfase, la señal medida depende de los fenómenos que se producen en la interfase

entre un electrodo y la disolución en contacto que se halla con él. Estos métodos se dividen en:

-Estáticos, cuando no pasa corriente entre los electrodos y las concentraciones de las especies permanecen constantes en la célula electroquímica. Es el caso de los *sensores potenciométricos*, en los cuales la señal primaria, fruto de la interacción entre el analito y el elemento de reconocimiento, es un potencial eléctrico, cuya medida se realiza normalmente a intensidad nula y frente a un elemento adicional denominado electrodo de referencia.

-Dinámicos, en los que fluye la corriente y las concentraciones cambian como consecuencia de una reacción redox. Dentro de estos, están los métodos a potencial controlado, como los *biosensores amperométricos*, que requieren de un amperímetro como sistema de medición en el que se aplica un potencial constante durante el análisis.

La célula electroquímica consiste en dos o más electrodos y los componentes electrónicos asociados que permiten controlar y medir la corriente y el potencial. La más sencilla consta de dos electrodos: El potencial de uno de ellos es sensible a la concentración del analito de interés (*electrodo indicador o de trabajo*). El segundo electrodo (*contraelectrodo*) sirve para completar el circuito eléctrico y proporciona un potencial de referencia contra el que se mide el potencial del electrodo indicador.

En los métodos dinámicos, el paso de corriente puede alterar el potencial del contraelectrodo. Para evitar esto, se sustituye el contraelectrodo por dos electrodos:

- un *electrodo de referencia*, a través del cual no pasa corriente y cuyo potencial permanece constante,
- un *electrodo auxiliar* que completa el circuito, a través del cual pasa corriente.

10.2. Clasificación de los sensores potenciométricos

Los sensores potenciométricos pueden definirse como electrodos con una membrana cuyo potencial indica la actividad del analito. Pueden considerarse como medias celdas electroquímicas que están formadas por un adecuado sistema electrodo de referencia/disolución de referencia, separado de la muestra por una membrana. Aunque frecuentemente los sensores potenciométricos contienen un electrodo de referencia interno y una disolución interna de referencia, a veces sólo es necesario un contacto metálico, como ocurre con algunos sensores de estado sólido.

La naturaleza de la membrana determina el ión al cual el sensor es sensible. La membrana tiene una respuesta originaria del intercambio de uno de los iones entre la fase sólida y la disolución externa. Este intercambio crea una variación en la carga eléctrica de la membrana y una diferencia de potencial de potencial de la interfase que depende directamente de la actividad en la disolución del ión al que es sensible.

Los sensores potenciométricos suelen clasificarse dependiendo de la membrana donde se encuentra el material selectivo. En la Figura 10.1. se muestra un esquema con esta clasificación. En primer lugar se distinguen dos grupos bien diferenciados los sensores primarios y los sensores compuestos.

Los sensores potenciométricos compuestos utilizan dos membranas, una selectiva a iones y otra que puede ser permeable a gases pero capaz de retener líquidos, o selectiva a moléculas de naturaleza enzimática. La elección de esta segunda membrana depende de si el sensor es sensible a gases o sensible a un sustrato enzimático (biosensor).

Los sensores potenciométricos primarios se dividen dependiendo de la naturaleza de la membrana en cristalinos o no cristalinos. Los sensores cristalinos contienen unos sitios fijos cargados de un signo, e iones móviles de carga puesta. Esta estructura se consigue mediante el empleo de

ciertas sales inorgánicas. Si solamente utilizan un único compuesto se denominan membranas homogéneas, en caso contrario se denominan membranas heterogéneas.

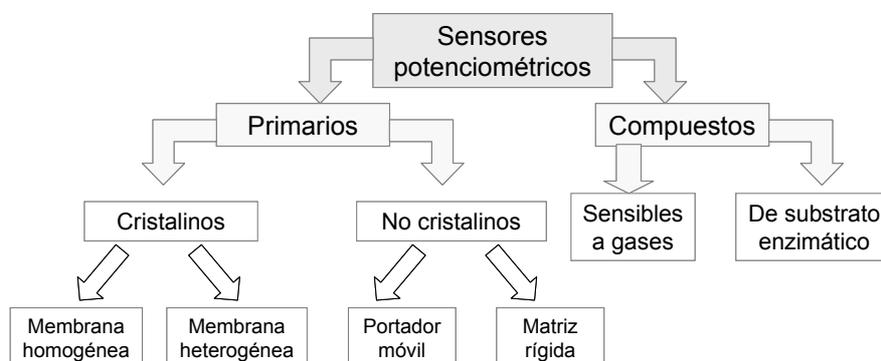


Fig. 10.1. Clasificación de los sensores potenciométricos según el tipo de membrana.

Los sensores potenciométricos no cristalinos presentan una membrana selectiva formada a partir de una matriz soporte que aloja sitios activos capaces de coordinar con el analito de la muestra en la interfase membrana/disolución. Pueden utilizarse múltiples soportes que se clasifican dando lugar a sensores potenciométricos de portador móvil o líquido, donde se incluyen los de membrana polimérica y sensores potenciométricos de matriz rígida, tales como el electrodo de vidrio.

10.3. Electrodo de vidrio para medir pH

La categoría de electrodos no cristalinos de matriz rígida incluye principalmente las membranas de vidrio silíceo.

En 1906 se desarrolló el primer ESI para medir la acidez y alcalinidad utilizando como elemento selectivo un bulbo de vidrio formado por SiO_2 , R_2O y MO ó M_2O_3 , siendo R un metal alcalino y M un ion metálico (alcalinotérreo o de tierras

raras) en composición determinada. Un modelo típico es el formado por un electrodo indicador y un electrodo de referencia como en la Figura 10.2. Se usa una escala denominada escala de pH. Esta escala posee valores comprendidos entre 0 y 14. Las soluciones ácidas presentan valores menores de 7, mientras que las soluciones alcalinas presentan valores superiores a 7. El valor pH igual a 7 indica un medio neutro.

La disolución de referencia contenida en el electrodo es en general una disolución 0.1 M de ácido clorhídrico. El electrodo interno de referencia es el de Ag/AgCl o el de calomelanos saturado. La notación taquigráfica de la célula electroquímica sería:

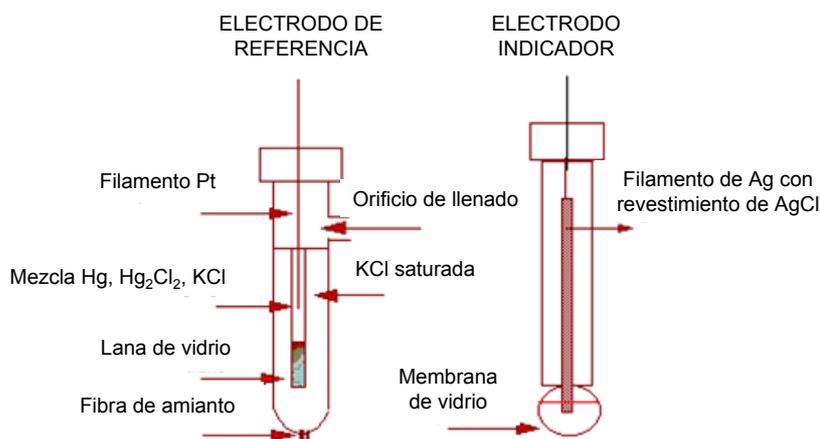
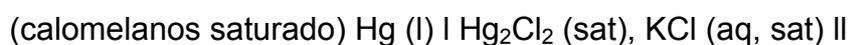


Fig. 10.2. Diagrama esquemático del electrodo de referencia de calomelanos saturado y un electrodo indicador de vidrio.

La membrana del electrodo de vidrio separa dos líquidos de diferentes concentraciones de iones H^+ ; en los lados de la

membrana se desarrolla un potencial proporcional a la diferencia de pH entre los dos líquidos, que se mide en relación con un potencial de referencia. El electrodo indicador y el electrodo de referencia pueden estar combinados en un solo electrodo de vidrio (Figura 10.3.) simplificando la medida de pH. Si la actividad del ion hidrógeno es mayor o menor en la solución procesada que dentro del electrodo, existirá una diferencial de potencial mayor o menor en la extremidad del vidrio.

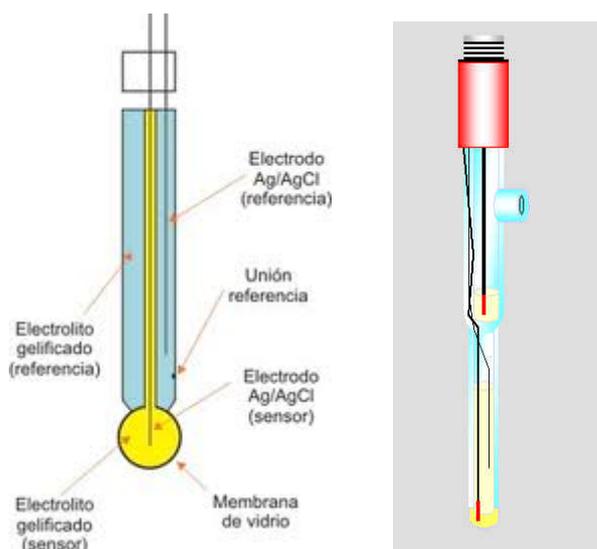


Fig. 10.3. Componentes de un electrodo de vidrio combinado. El electrolito gelificado es AgCl, KCl.

10.3.1. Errores en la medida de pH con electrodo de vidrio.

Como el espesor de la membrana es de unos 50 μm , deben de ser manipuladas con cuidado para evitar roturas. Antes de utilizar el electrodo debe ser acondicionado, sumergiéndolo durante varias horas en una disolución que contenga el analito. No deben dejarse secar para que no se destruya la capa hidratada de la membrana. Si un electrodo

de vidrio se seca, habrá que reacondicionarlo antes de utilizarlo de nuevo. La composición de la membrana de vidrio cambia con el tiempo, alterando el rendimiento del electrodo, aunque la vida media de un electrodo son varios años. Algunos errores en la medida pueden ser:

- a) Error alcalino. A pH mayores que 10 el electrodo de vidrio ordinario se hace algo más sensible al ion Na^+ . En una disolución 1M de Na^+ se obtiene un error negativo de casi una unidad de pH a un pH 12. Existen diseños para reducir este error.
- b) Error ácido. A pH menor que cero tienden a ser algo más altos los valores obtenidos con un electrodo de vidrio.
- c) Deshidratación. Cuando el agua que contiene el vidrio se elimina por secado al aire o por tratamiento durante períodos prolongados con un agente deshidratante, se pierde la sensibilidad del electrodo para el pH y no se obtienen valores de pH reproducibles.
- d) Errores en disolución neutra no regulada. Debido al tiempo necesario para que se establezca el equilibrio entre la capa superficial del electrodo y la disolución.
- e) Error en el pH de la disolución reguladora. Puesto que el electrodo de vidrio debe ser calibrado regularmente, cualquier inexactitud en la preparación o cambios en la concentración de la disolución reguladora serán reflejados como errores en las medidas de pH.

10.4. Electrodo de vidrio selectivos de iones.

Además del electrodo convencional de vidrio para el pH, se incluyen dispositivos sensibles a las bases que son mejorados para ser electrodos selectivos a otros iones como Li^+ , Na^+ , K^+ , o NH_4^+ .

Los primeros electrodos de vidrio se fabricaron usando Corning 015, un vidrio con una composición de alrededor del 22% de Na_2O , 6% de CaO y 72% de SiO_2 . Cuando se introducen en una disolución acuosa durante varias horas, se hidrata la membrana de vidrio dando lugar a lugares de carga negativa en la estructura de silicio. Los iones Na^+ ,

capaces de moverse a través de la capa hidratada, actúan como contrapones. Los H^+ de la disolución difunden hacia la membrana, uniéndose con fuerza al vidrio y desplazando los iones Na^+ . Así se produce la selectividad de la membrana para H^+ . El transporte de carga a través de la membrana depende de los iones Na^+ . Sustituyendo Na_2O y CaO por Li_2O y BaO se amplían los límites útiles de pH de los electrodos de membrana de vidrio hasta valores de pH superiores a 12.

La respuesta de la membrana de vidrio Corning 015 a los cationes monovalentes distintos de H^+ a pH alto llevó al desarrollo de membranas de vidrio que poseyeran mayor selectividad para otros cationes. Variando la composición del vidrio se puede hacer que el electrodo sea más sensible a un catión que a otro:

Composición de 11% de Na_2O , 18% de Al_2O_3 y 71% de SiO_2 se utiliza como electrodo selectivo de Na^+ .

Composición de 15% de Li_2O , 25% de Al_2O_3 y 60% de SiO_2 se utiliza como electrodo selectivo de Li^+ .

Composición de 27% de Na_2O , 5% de Al_2O_3 y 68% de SiO_2 se utiliza como electrodo selectivo de K^+ .

10.5. Electrodos selectivos de iones en estado sólido cristalizado.

Se han diseñado electrodos selectivos de iones en estado sólido utilizando membranas formadas por sales inorgánicas policristalinas escasamente solubles.

En la Tabla 10.1. se citan varios ejemplos de electrodos selectivos de iones policristalinos. La selectividad depende de la solubilidad. Estos IES son todavía poco selectivos y se buscan nuevos elementos más selectivos a los analitos de interés.

Tabla 10.1. Electrodo selectivo de iones policristalinos.

Analito	Material selectivo	Interferencias
F^-	Cristal de LaF_3	OH^-
Cl^- , S^{2-}	AgCl	Halogenuros, CN^- , NH_4^+ , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, S^{2-}
Br^-	AgBr	CN^- , S^{2-}
I^-	AgI	CN^- , S^{2-}
CN^-	AgI	I^- , S^{2-}
S^{2-}	AgSCN , Ag_2S	Ag^+
Ag^+	Ag_2S	S^{2-}
Cd^{2+}	CdS	H^+ , Mn^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} , $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$
Pb^{2+}	PbS	Cu^{2+} , Cd^{2+}
Cu^{2+}	CuS	Cu^+
S^{2-}	Ag_2S en hule de silicón	ninguna
Cs^+	Tungstoarsenato de Cs en resina epóxica	ninguna
Tl^+	Molibdofosfato de talio en resina epóxica	ninguna

El elemento activo de un electrodo de membrana cristalina homogénea tiene un material sólido como LaF_3 , AgCl , Ag_2S o una mezcla. La disolución interna contiene el ion primario en actividad constante en contacto con un electrodo de referencia, de modo que el potencial del electrodo varía solamente con la actividad de los iones de la disolución externa. Destacar el electrodo de fluoruro que sólo se ve afectado por OH^- , por lo que las disoluciones a medir deberán ser ligeramente ácidas.

La selectividad de los electrodos de membrana cristalina depende principalmente de la solubilidad de las sales involucradas.

Los electrodos de membrana heterogénea se preparan incorporando los cristales activos pulverizados, dentro de una matriz inerte como el fluoruro de polivinilo o los elastómeros silíceos. La naturaleza flexible de la membrana es útil pues resiste a la ruptura.

Las membranas de haluros de plata están muy extendidas, no sólo por responder a los iones haluro, sino también a otros iones que forman precipitados poco solubles con la plata como el sulfuro, o los agentes formadores de complejos como el cianuro.

10.6. Electrodos selectivos de iones de matriz líquida.

Son electrodos selectivos de iones en los que se incorpora un agente quelante a una membrana hidrófoba, por ejemplo de cloruro de polivinilo (PVC). Los electrodos de membrana líquida intercambiadora de especies catiónicas son importantes, pues son sensibles a muchos aniones. Destacar los electrodos de ClO_4^- y NO_3^- , aunque son poco selectivos. También se han fabricado electrodos que responden a aniones como trifluoroacetato, maleato y ftalato. Estos electrodos contienen un intercambiador de iones que tiene forma líquida; se trata de una sustancia que tiene capacidad de entrar en equilibrio heterogéneo con el ion de interés al ser disuelto en un disolvente orgánico. Un material sólido poroso se impregna con la fase orgánica formando una membrana separadora entre las disoluciones interna y externa. Los equilibrios de extracción sustituyen a los equilibrios de solubilidad de las membranas cristalinas, al determinar la selectividad.

Algunos de estos electrodos se han construido utilizando derivados del o-fenantroleno y compuestos de cadena larga de iones de amonio sustituidos. La principal desventaja es que son poco selectivos.

Los electrodos de membrana líquida intercambiadora de especies aniónicas son similares a los anteriores, pero el intercambiador contiene un anión voluminoso que hace que el electrodo sea sensible a cationes como Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^{2+} . El anión puede ser borato de tetraclorofenilo o derivado de ácido didecilsulfónico. Tampoco tiene una selectividad excelente pero como ventaja, los electrodos de transportador móvil poseen una resistencia relativamente baja, lo que facilita la miniaturización necesaria con fines biológicos o clínicos.

Los electrodos de membrana líquida intercambiadora de especies catiónicas y aniónicas han sido adaptados a los contactos metálicos por recubrimiento de alambre con el material activo, proporcionando buenos resultados con las ventajas de bajo coste, sencillez y resistencia, aunque tiene poca durabilidad.

Los electrodos de membrana líquida neutra se basan en una gran molécula neutra que puede inducir a la formación de un complejo con el ion de interés o diana para formar un agregado que sea soluble en un disolvente orgánico. La disolución así formada se carga en un sólido poroso, que puede ser una resina epóxica, pasta de carbón o un polímero (Figura 10.4.). El transportador puede ser un compuesto macrocíclico o un compuesto de cadena abierta. Muchas de las moléculas transportadas neutras tienen actividad biológica. Un ejemplo de electrodo IES de membrana líquida neutra está basado en un antibiótico (valinomicina, cuya estructura se muestra en la Figura 10.5.) en difenil éter, que es capaz de atrapar iones de K^+ .

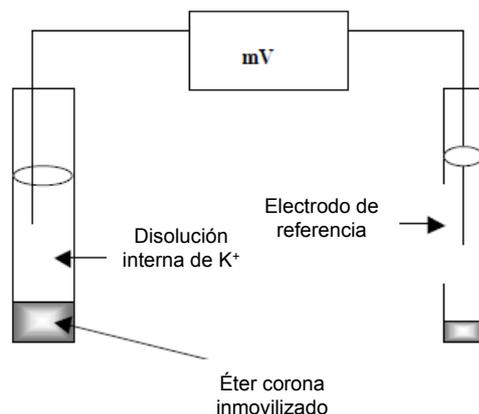


Fig. 10.4. Diagrama esquemático de un ISE de membrana líquida neutra.

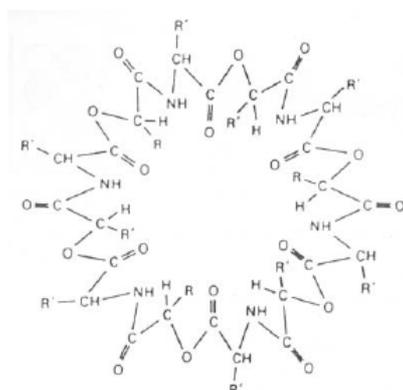


Fig. 10.4. Estructura macrocíclica de la valinomicina.

10.7. Electrodo selectivo de iones sensibles a gases.

Los electrodos sensibles a los gases son importantes por su sensibilidad natural ya que se utilizan dos membranas para generar la respuesta. Su diseño se basa en de una delgada membrana que separa la muestra (por ejemplo gases de combustión) de una disolución interna que contiene un electrodo selectivo de iones. La membrana es permeable al

analito gaseoso, pero no a los compuestos no volátiles de la muestra. Un electrodo sensible a CO_2 consta de un electrodo de vidrio para determinar pH, en contacto con una delgada capa de NaHCO_3 (Figura 10.4). La membrana externa, fabricada con un polímero orgánico, es hidrófoba y los líquidos acuosos no pueden penetrarla. La disolución de bicarbonato está localizada en el estrecho espacio entre las membranas de polímero y de vidrio.

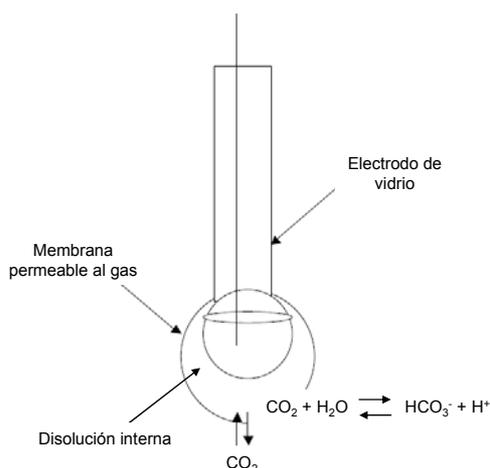
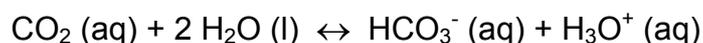


Fig. 10.4. Sensor de gases con electrodo de vidrio, sensible a CO_2 .

El CO_2 reacciona en la disolución interna así:



Tiene interferencias para SO_2 , NH_3 , ácido acético y vapor de agua, que podría atravesar la membrana cambiando la concentración de la capa de bicarbonato. Este inconveniente puede ser eliminado mediante el uso de un regulador de fuerza osmótica para igualar las presiones.

Se han desarrollado electrodos sensibles a varios gases. La composición de la disolución interna cambia según el uso.

Deben guardarse en una disolución similar a la interna para reducir al mínimo su exposición a los gases atmosféricos.

10.8. Biosensores.

Los electrodos potenciométricos puede utilizar biomoléculas que reaccionan muy selectivamente con diversos analitos. Se fabrican de forma similar a los sensores de gases. El uso de enzimas o anticuerpos, en forma pura o en forma de extractos crudos, células o tejidos completos, permite construir biosensores altamente selectivos hacia moléculas de interés bioquímico (Figura 10.5.). El electrodo enzimático tiene una enzima atrapada o inmovilizada en la superficie de un ESI. La reacción entre el analito de interés y la enzima da lugar a un producto que puede medirse con un ESI.

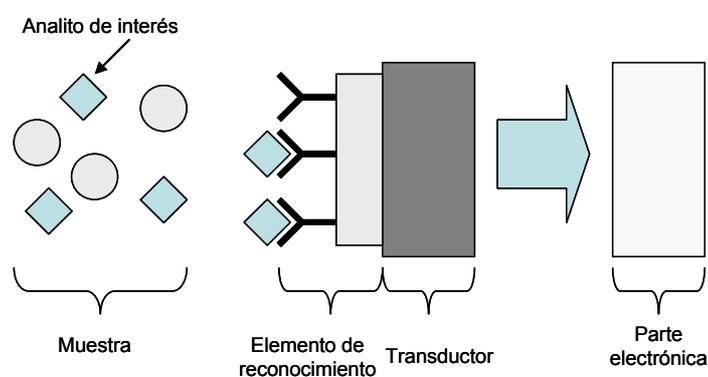


Fig. 10.5. Esquema de de un biosensor y su funcionamiento.

Un problema a resolver en los diseños es la forma de inmovilizar la biomolécula seleccionada sin que pierda su actividad biológica. Esto se podría resolver mediante: la adsorción sobre un soporte (conductor metálico), una unión química covalente sobre un sustrato (carbón vítreo), una unión química a una red inerte, atrapamiento sobre un gel o polímero conductor, encapsulamiento dentro de una membrana de diálisis, pastas de carbón formadas

mezclando la biomolécula con polvo de carbón conductor con un aglomerante inerte como el aceite mineral o una disolución salina a pH controlado.

Son pocos los biosensores potenciométricos comercializados, pero existen adaptaciones de los ESI y sensibles a gases.

10.9. Aplicaciones de los sensores potenciométricos.

Entre los requisitos ideales que deberían cumplir los sensores potenciométricos se encuentran el ser de fácil manipulación, robustos, duraderos y no contaminantes, dar resultados reproducibles y significativos y tener tiempos de respuesta cortos.

Pueden actuar como electrodos indicadores en valoraciones, sin tener en cuenta el color o la turbidez de la muestra, sin afectar a la disolución de análisis, y el hecho de que tales determinaciones requieran equipamientos relativamente baratos y portátiles.

Se han utilizado en análisis de rutina en investigaciones médicas y para procesos de control de calidad en la industria farmacéutica (drogas, jabones y pastas de dientes) y de comestibles (productos lácteos, cereales, azúcar, bebidas y caramelos), y para ensayos minerales de rocas, arcillas y otros procesos de refinado, residuos industriales y mineros. Otras aplicaciones industriales importantes implican baños de electrochapado, estampado en madera, pinturas, pigmentos, algicidas, fungicidas, pesticidas, fertilizantes, cerámicas, vidrio, fotografía, explosivos, emisión de gases de combustión por chimenea, tabaco, plásticos, resinas y aceites lubricantes.

Los sensores potenciométricos también tienen aplicaciones en el análisis de aguas de ríos, estuarios, lagos, aguas residuales, fangos y lodos. En los análisis de estas aguas tienen gran importancia los sensores de fluoruro, nitrato y amonio. Además, en los últimos años han surgido electrodos de enzimas que han causado un gran impacto en los análisis

de rutina de aguas y pueden encontrar grandes aplicaciones en el control de la contaminación.

El control de acidez y alcalinidad es de vital importancia en algunas disoluciones como agua potable, agua de piscinas, en plantas de tratamiento de aguas, residuos industriales. Para la determinación del ion H^+ de una disolución se utilizan IES como el electrodo de vidrio.

10.10. Sensores amperométricos.

La amperometría consiste en aplicar un potencial constante AL electrodo de trabajo y medir La corriente em función Del tiempo. Una aplicación es el sensor destinado a medir el O_2 disuelto en la sangre. En la figura 10.6 se muestra el diseño de un sensor amperométrico, propuesto por Clark, similar a los electrodos de membrana potenciométricos.

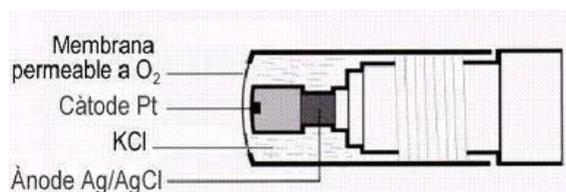
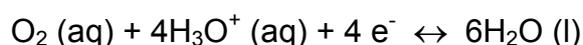
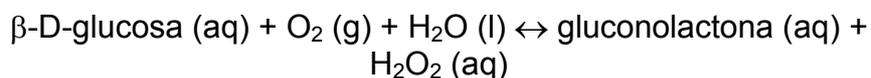


Fig. 10.6. Sensor amperométrico de Clark para la determinación de O_2 disuelto.

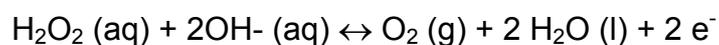
A través del extremo del sensor se estira una membrana permeable al gas que se mantiene separada del electrodo de trabajo y del contraelectrodo por una delgada capa de disolución de KCl. El electrodo de trabajo es un disco catódico de Pt y el contraelectrodo es un ánodo formado por un anillo de Ag. Aunque por la membrana pueden difundirse varios gases (O_2 , N_2 y CO_2), sólo el oxígeno se reduce en el cátodo:



Otro ejemplo de sensor amperométrico es el biosensor de glucosa. En este caso, la membrana única del sensor de Clark se sustituye por tres membranas. La más externa es de policarbonato, permeable a la glucosa y al O_2 . La segunda contiene una preparación inmovilizada de glucosa oxidada que cataliza la oxidación de la glucosa a gluconolactona y peróxido de hidrógeno:



El peróxido de hidrogeno difunde a través de La membrana más interna, compuesta por acetato de celulosa, y se oxida en el ánodo de Pt:



El oxígeno actúa como mediador, transportando electrones al electrodo. La Figura 10.7. muestra un biosensor amperométrico para glucosa.

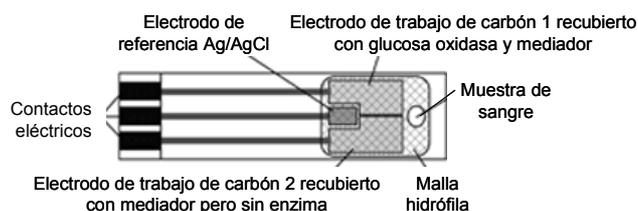


Fig. 10.7. Biosensor amperométrico para glucosa.

10.11. Bibliografía

D. HARVEY **"Química Analítica Moderna"** McGraw-Hill/Interamericana Madrid (2002).

D. C. HARRIS. **"Análisis Químico Cuantitativo"** 3ª Ed. Ed. Reverté S.A. Barcelona (2007).

http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Articulo_Sensores_y_Bio_sensores_2085.pdf



La Química Analítica es una ciencia de medición que utiliza métodos químicos e instrumentales aplicables en muchos campos tecnológicos para obtener información de la composición química de un material o muestra.