

FUNDAMENTOS DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL. 3ª RELACIÓN DE PROBLEMAS.

1.- En ausencia de autoabsorción, la intensidad de fluorescencia de una muestra es proporcional a la concentración, solo a concentraciones bajas. Calcular el porcentaje de error que se comete suponiendo que la respuesta es lineal cuando se mide la intensidad relativa de fluorescencia de disoluciones 2.5×10^{-5} y 2.5×10^{-6} M de un compuesto cuya $\epsilon = 4000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ si el valor de b es 1 cm.

Solución: $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$: 11.65 %; $c = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$; 0.88 %

2.- Se desea analizar vitamina B₁ en un preparado comercial de 2.000 g por el método del tiocromo. Se extrae con HCl y fosfatasa y se diluye a 100 mL. Se purifica una alícuota de 15 mL pasándola por una columna cromatográfica, y por causas inherentes al proceso se diluye a 25 mL. De la anterior solución, se forman dos porciones de 5 mL, una de ellas se trata con ferricianuro y ambas se aforan a 10 mL para examen fluorimétrico. Una solución de referencia de 0.2 ppm de tiamina se somete al mismo tratamiento que la muestra problema, con excepción de que la porción introducida en la columna conserva su volumen original. Se toman dos alícuotas de 5 mL y una se oxida y ambas se aforan a 10 mL. Se mide la fluorescencia de ambas muestras dando lugar a intensidades de fluorescencia de 18 y 13 unidades de fluorescencia, respectivamente. Calcular los ppm de vitamina B₁ en la muestra.

Solución: 23 ppm

3.- La forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) es una coenzima importante y muy fluorescente. Tiene un máximo de absorción de 340 nm y un máximo de emisión a 465 nm. Las soluciones patrón de esta sustancia generan las siguientes intensidades de fluorescencia:

Concentración de NADH ($\mu\text{mol/L}$)	Intensidad relativa
0.100	2.24
0.200	4.52
0.300	6.63
0.400	9.01
0.500	10.94
0.600	13.71
0.700	15.49
0.800	17.91

- Trazar la curva de calibración del NADH.
- Determinar la pendiente y ordenada en el origen por mínimos cuadrados para la gráfica del apartado anterior.
- Calcule la desviación estándar de la pendiente y la que corresponde a la regresión de la curva.
- Una solución desconocida tiene una fluorescencia relativa de 12.16. ¿Cuál será su concentración en NADH? Calcular la desviación la desviación estándar relativa del resultado obtenido, así como la desviación estándar relativa del resultado obtenido considerando que el valor de 12.16 es la media de tres medidas.

Solución: b) $I_{\text{rel}} = 22.35 c_{\text{NADH}} + 3.6 \times 10^{-4}$; c) $s_{y/x} = 0.1747$, $s_b = 0.2696$; d) $c = 0.544 \mu\text{M}$, $\text{DER} = 1.86 \%$; $\text{DER (con replicados)} = 1.2 \%$

4.- En algunos métodos fluorimétricos, el amortiguamiento de la fluorescencia es proporcional a la concentración de las especies deseadas, por ejemplo, el metal X puede suponerse que amortigua la fluorescencia del ligando L. En una serie de medidas se obtuvieron los siguientes datos:

Solución		Señal fluorescente
L (M)	X (M)	
	Blanco	0.0
5.0×10^{-6}		84.0
5.0×10^{-6}	1.0×10^{-6}	67.2
5.0×10^{-6}	2.0×10^{-6}	50.5
5.0×10^{-6}	3.0×10^{-6}	33.6
5.0×10^{-6}	4.0×10^{-6}	16.9
5.0×10^{-6}	5.0×10^{-6}	0.50
5.0×10^{-6}	6.0×10^{-6}	0.00

Encuentre: a) La relación molar del complejo formado entre X y L.

b) La concentración de X en una solución, la cual, cuando se trata en la misma forma, da una lectura de 26.8 unidades.

Solución: 3.42×10^{-6} M

5.- A cuatro alícuotas de 10,0 mL de una muestra de agua se adicionaron 0.00, 1.00, 2.00 y 3.00 mL de una solución estándar de NaF que contenía 10.0 ppb de F⁻ tal y como se muestra resumido en la tabla. Se adicionaron a cada una 5.00 mL exactos de una solución que contenía un exceso de complejo de Al con el rojo de Alizarina R, un complejo fuertemente fluorescente, y las disoluciones se diluyeron a 50.0 mL. La intensidad de de fluorescencia de las cuatro disoluciones y de un blanco fueron las siguientes:

mL de Muestra	mL de F ⁻ estándar (10.0 ppb F ⁻)	mL Complejo Al-rojo Alizarina R (exc)	Lectura
Blanco, 0.00	0.00	5.00	73.0
10.00	0.00	5.00	68.2
10.00	1.00	5.00	55.3
10.00	2.00	5.00	41.3
10.00	3.00	5.00	28.8

- Representar los datos y obtener la ecuación de la recta por mínimos cuadrados
- Calcular los ppb de F⁻ en la muestra

1.- En ausencia de autoabsorción, la intensidad de fluorescencia de una muestra es proporcional a la concentración, solo a concentraciones bajas. Calcular el porcentaje de error que se comete suponiendo que la respuesta es lineal cuando se mide la intensidad relativa de fluorescencia de disoluciones 2.5×10^{-5} y 2.5×10^{-6} M de un compuesto cuya $\epsilon = 4000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ si el valor de b es 1 cm.

Solución: $c = 2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$: 11.65 %; $c = 2.5 \times 10^{-6} \text{ M}$: 0.88 %

Teóricamente, la intensidad de fluorescencia, I_F , es proporcional a la eficacia cuántica, Φ , y a la intensidad de radiación absorbida por la muestra ($I_0 - I$), diferencia entre la intensidad incidente y la intensidad transmitida:

$$I_F = K\Phi(I_0 - I)$$

Por otra parte, la Transmitancia se define como la relación entre la Intensidad transmitida, I, y la intensidad incidente I_0 , siendo la Absorbancia, A, el logaritmo decimal de la transmitancia cambiado de signo:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad \therefore \quad I = I_0 * T$$

$$A = \epsilon bc = -\log T \quad \therefore \quad T = 10^{-A} = 10^{-\epsilon bc}$$

Por tanto:

$$I_F = K\Phi(I_0 - I_0 10^{-\epsilon bc}) = K\Phi I_0 (1 - 10^{-\epsilon bc})$$

$10^{-\epsilon bc}$ se puede aproximar, a concentraciones bajas a la serie de Taylor. Para ello es necesario hacer un cambio de base:

$$10 = e^{\ln 10} = e^{2.303}, \text{ por tanto: } 10^{-\epsilon bc} = (e^{2.303})^{-\epsilon bc} = e^{-2.303\epsilon bc}$$

El desarrollo de la serie de Taylor para e^x cuando x tiende a cero es:

$$f(x) = f(0) + \frac{x}{1!} f'(0) + \frac{x^2}{2!} f''(0) + \frac{x^3}{3!} f'''(0) + \dots + \frac{x^n}{n!} f^n(0) = \sum_{i=0}^{\infty} \frac{x^i}{i!} f^i(0)$$

De tal manera que, cuando x tiende a cero (bajas absorbancias):

$$e^x = e^0 + \frac{x}{1!} e^0 + \frac{x^2}{2!} e^0 + \frac{x^3}{3!} e^0 + \dots + \frac{x^n}{n!} e^0 = 1 + x + \frac{x^2}{2!} + \frac{x^3}{3!} + \dots + \frac{x^n}{n!}$$

Entonces:

$$e^{-2.303\epsilon bc} = 1 - 2.303\epsilon bc + \frac{(2.303\epsilon bc)^2}{2!} - \frac{(2.303\epsilon bc)^3}{3!} + \dots + \frac{(2.303\epsilon bc)^n}{n!}$$

Si la absorbancia es pequeña, ($A < 0.05$) se pueden despreciar los términos de orden 2 y superiores, por tanto:

$$e^{-2.303\epsilon bc} \cong 1 - 2.303\epsilon bc$$

y la intensidad de fluorescencia aproximada;

$$I_{F\text{aprox}} = 2.303K\Phi I_0\epsilon bc = K'c \text{ (proporcional a la concentración)}$$

El porcentaje de error que se comete:

$$\%E = 100 * \frac{I_{F\text{aprox}} - I_F}{I_F} = 100 * \left(\frac{I_{F\text{aprox}}}{I_F} - 1 \right) = 100 * \left(\frac{2.303\epsilon bc}{1 - 10^{-\epsilon bc}} - 1 \right) = 100 * \left(\frac{2.303A}{1 - 10^{-A}} - 1 \right)$$

- Si la concentración es 2.5×10^{-5} M:

$$\epsilon bc = 4000 * 1 * 2.5 \times 10^{-5} = 0.1 \text{ que supera el valor de } 0.05$$

$$\%E = 100 * \left(\frac{2.303 * 0.1}{1 - 10^{-0.1}} - 1 \right) = 11.95\%$$

- Si la concentración es 2.5×10^{-6} M:

$$\epsilon bc = 4000 * 1 * 2.5 \times 10^{-6} = 0.01 \text{ que está por debajo del umbral de } 0.05 \text{ de absorbancia.}$$

$$\%E = 100 * \left(\frac{2.303 * 0.01}{1 - 10^{-0.01}} - 1 \right) = 1.17\%$$

2.- Se desea analizar vitamina B₁ en un preparado comercial de 2.000 g por el método del tiocromo. Se extrae con HCl y fosfatasa y se diluye a 100 mL. Se purifica una alícuota de 15 mL pasándola por una columna cromatográfica, y por causas inherentes al proceso se diluye a 25 mL. De la anterior solución, se forman dos porciones de 5 mL, una de ellas se trata con ferricianuro y ambas se aforan a 10 mL para examen fluorimétrico. Una solución de referencia de 0.2 ppm de tiamina se somete al mismo tratamiento que la muestra problema, con excepción de que la porción introducida en la columna conserva su volumen original. Se toman dos alícuotas de 5 mL y una se oxida y ambas se aforan a 10 mL. Se mide la fluorescencia de ambas muestras dando lugar a intensidades de fluorescencia de 18 y 13 unidades de fluorescencia, respectivamente. Calcular los ppm de vitamina B₁ en la muestra.

Solución: 23 ppm

Como el tratamiento del patrón y de la muestra problema son idénticos, salvo la dilución de 15 a 25 mL en la columna cromatográfica, hacemos referencia a la concentración de patrón de 0.2 ppm de tiamina, que da una fluorescencia de 13 unidades. Por tanto, 18 unidades de fluorescencia se corresponden a una concentración de tiamina de:

$$18 \cdot 0.2 / 13 = 0.2769 \text{ ppm}$$

Esta concentración debe ser corregida por la exclusiva dilución cromatográfica que sufre la muestra problema. Luego la concentración de tiamina en los 100 mL es:

$$0.2769 \cdot 25 / 15 = 0.4615 \text{ ppm (mg/L)}$$

Para obtener los mg de tiamina en la muestra, se multiplica la concentración por el volumen expresado en litros:

$$\text{mg de tiamina en 100 mL o 2 gramos de muestra} = 0.4615 \text{ (mg/L)} \cdot 0.1 \text{ L} = 0.04615 \text{ mg.}$$

Para obtener los ppm (mg analito / Kg muestra) de tiamina en la muestra:

$$\text{ppm de tiamina en la muestra} = 0.04615 \text{ (mg)} / 2 \times 10^{-3} \text{ Kg} = 23.1 \text{ ppm (mg/Kg o } \mu\text{g/g)}$$

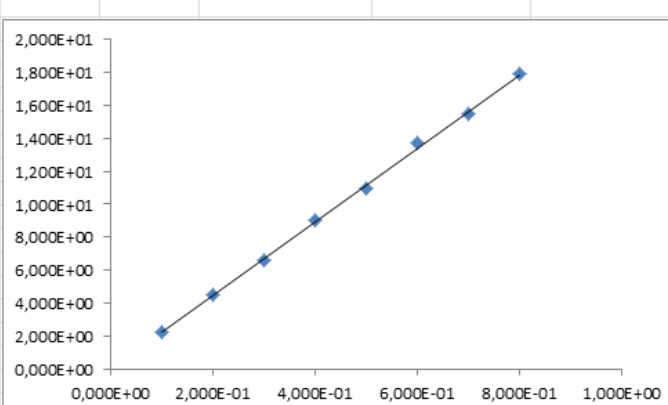
3.- La forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH) es una coenzima importante y muy fluorescente. Tiene un máximo de absorción de 340 nm y un máximo de emisión a 465 nm. Las soluciones patrón de esta sustancia generan las siguientes intensidades de fluorescencia:

Concentración de NADH ($\mu\text{mol/L}$)	Intensidad relativa
0.100	2.24
0.200	4.52
0.300	6.63
0.400	9.01
0.500	10.94
0.600	13.71
0.700	15.49
0.800	17.91

- Trazar la curva de calibración del NADH.
- Determinar la pendiente y ordenada en el origen por mínimos cuadrados para la gráfica del apartado anterior.
- Calcule la desviación estándar de la pendiente y la que corresponde a la regresión de la curva.
- Una solución desconocida tiene una fluorescencia relativa de 12.16. ¿Cuál será su concentración en NADH? Calcular la desviación la desviación estándar relativa del resultado obtenido, así como la desviación estándar relativa del resultado obtenido considerando que el valor de 12.16 es la media de tres medidas.

Solución: b) $I_{\text{rel}}=22.35 \text{ } c_{\text{NADH}} + 3.6 \times 10^{-4}$; c) $s_{y/x}=0.1747$, $s_b=0.2696$; d) $c=0.544 \mu\text{M}$, $\text{DER}=1.86 \%$; $\text{DER (con replicados)}=1.2 \%$

REGRESION LINEAL POR MÍNIMOS CUADRADOS									
	xi	yi	xi2	xiyi	(xi-xm)2	yical	(yi-yical)2 residuales	(yi-ymedia)2	(ycali-ymedia)2
	1,000E-01	2,240E+00	1,000E-02	2,240E-01	1,225E-01	2,235E+00	2,500E-05	6,109E+01	6,117E+01
	2,000E-01	4,520E+00	4,000E-02	9,040E-01	6,250E-02	4,470E+00	2,536E-03	3,065E+01	3,121E+01
	3,000E-01	6,630E+00	9,000E-02	1,989E+00	2,250E-02	6,704E+00	5,518E-03	1,174E+01	1,124E+01
	4,000E-01	9,010E+00	1,600E-01	3,604E+00	2,500E-03	8,939E+00	5,051E-03	1,095E+00	1,248E+00
	5,000E-01	1,094E+01	2,500E-01	5,470E+00	2,500E-03	1,117E+01	5,456E-02	7,810E-01	1,248E+00
	6,000E-01	1,371E+01	3,600E-01	8,226E+00	2,250E-02	1,341E+01	9,107E-02	1,335E+01	1,124E+01
	7,000E-01	1,549E+01	4,900E-01	1,084E+01	6,250E-02	1,564E+01	2,337E-02	2,953E+01	3,121E+01
	8,000E-01	1,791E+01	6,400E-01	1,433E+01	1,225E-01	1,788E+01	1,056E-03	6,168E+01	6,117E+01
n datos	8,000E+00								
Sum	3,600E+00	8,045E+01	2,040E+00	4,559E+01	4,200E-01		1,832E-01	2,099E+02	2,097E+02
media	4,500E-01	1,006E+01							
b=	2,235E+01			estimación de x					
a=	3,571E-04			y =?	1,216E+01				
r2=	9,991E-01			replicados y=	1,000E+00				
syx =	1,747E-01			x=	5,441E-01				
sb =	2,696E-01			sx=	8,371E-03				
sa =	1,361E-01			der %=	1,538E+00				
t(a=0)	2,623E-03								
sya=	9,913E-03			replicados y=	3,000E+00				
tya(a=0)	3,603E-02								
				sx=	5,414E-03				
				der %=	9,950E-01				



5.- A cuatro alícuotas de 10,0 mL de una muestra de agua se adicionaron 0.00, 1.00, 2.00 y 3.00 mL de una solución estándar de NaF que contenía 10.0 ppb de F⁻ tal y como se muestra resumido en la tabla. Se adicionaron a cada una 5.00 mL exactos de una solución que contenía un exceso de complejo de Al con el rojo de Alizarina R, un complejo fuertemente fluorescente, y las disoluciones se diluyeron a 50.0 mL. La intensidad de de fluorescencia de las cuatro disoluciones y de un blanco fueron las siguientes:

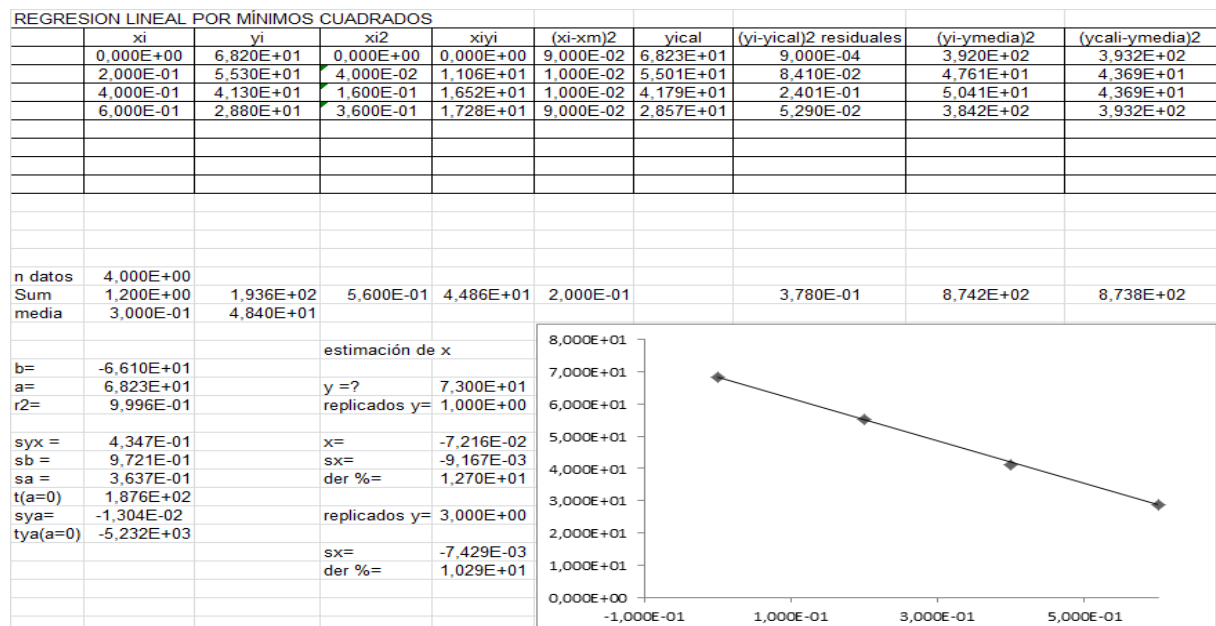
mL de Muestra	mL de F ⁻ estándar (10.0 ppb F ⁻)	mL Complejo Al-rojo Alizarina R (exc)	Lectura
Blanco, 0.00	0.00	5.00	73.0
10.00	0.00	5.00	68.2
10.00	1.00	5.00	55.3
10.00	2.00	5.00	41.3
10.00	3.00	5.00	28.8

- c) Representar los datos y obtener la ecuación de la recta por mínimos cuadrados
- d) Calcular los ppb de F⁻ en la muestra

El fluoruro destruye el complejo entre el aluminio y el rojo de Alizarina por formación de AlF₆³⁻. Esto provoca por tanto una disminución de la fluorescencia que puede servir, por tanto, para la determinación de F⁻. En este caso, para amortiguar el efecto matriz se propone el método de la adición estándar. Debido a que se produce una disminución de la fluorescencia, se ha de buscar el punto de corte entre la recta de calibrado y 73 (señal del blanco).

La concentración de F⁻ en la disolución de medida cuando se añade, por ejemplo, 1 mL de patrón de 10 ppb sobre un volumen final de 50 mL:

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2; C_2 = C_1 V_1 / V_2 = 10 \cdot 1 / 50 = 0.2 \text{ ppb. Con 2 mL } 0.4 \text{ ppb y, con 3 mL } 0.6 \text{ ppb.}$$



Como la muestra problema se diluye 5 veces, $[F^-] = 5 \cdot 7.22 \times 10^{-2} = 0.361 \text{ ppb.}$