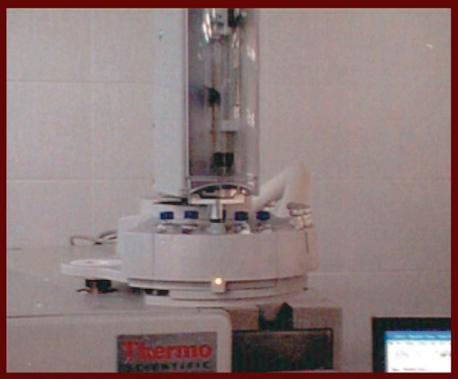
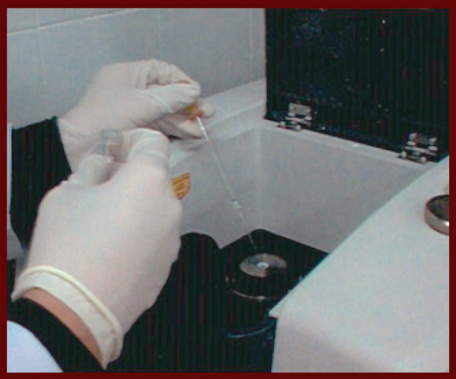
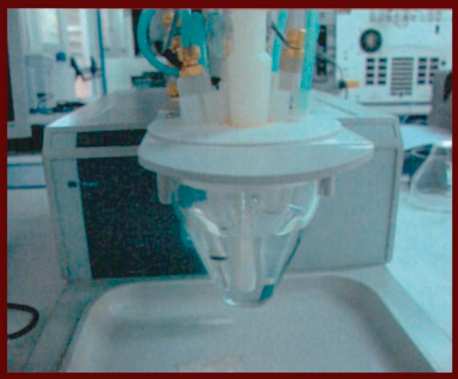
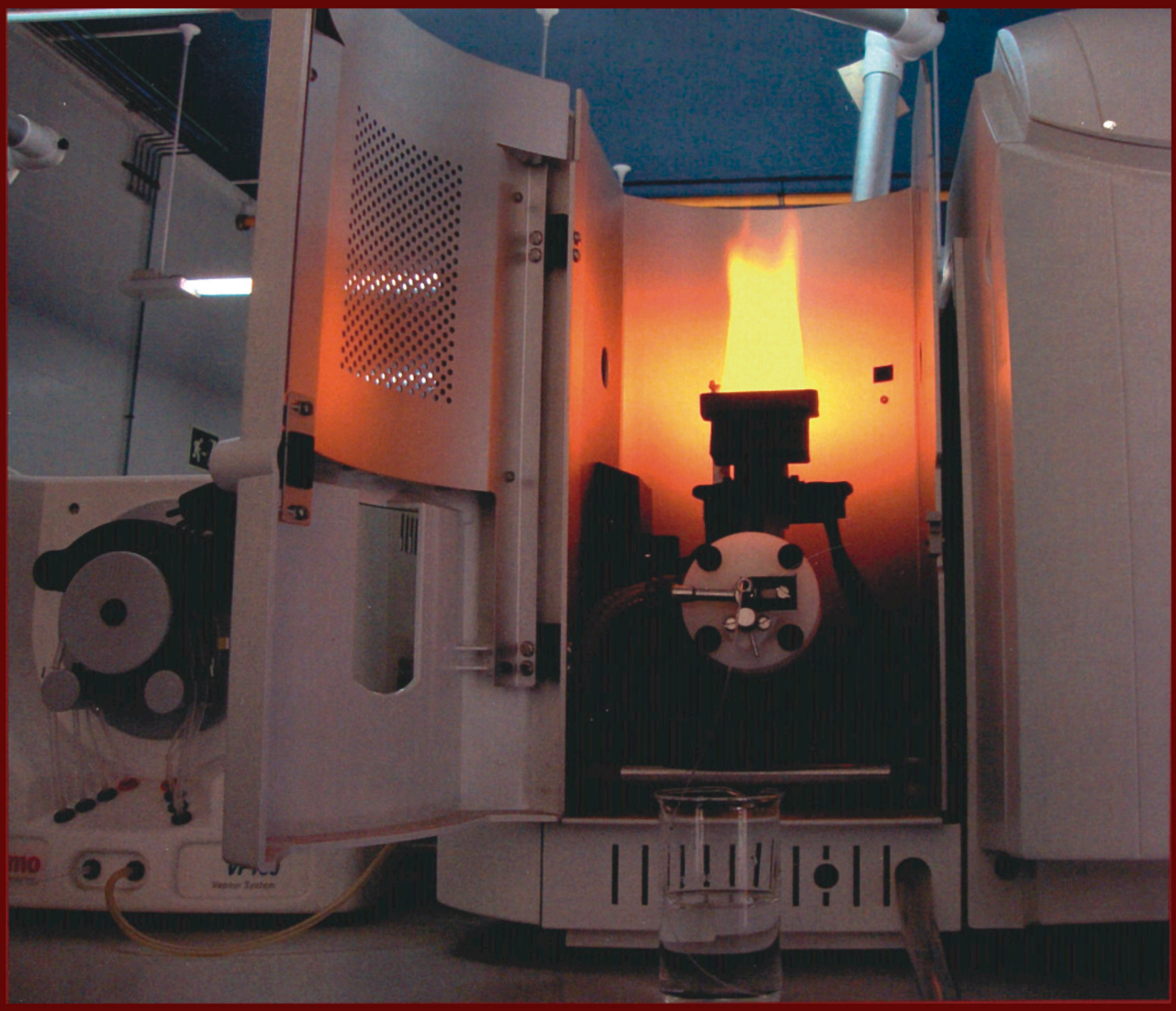






Adela Mauri - María Llobat - Rosa Herráez

LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



PUV

Incluye CD-Rom

LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

Adela Mauri Aucejo
María Llobat Estellés
Rosa Herráez Hernández

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

© Del texto: las autoras, 201O
© De esta edición: Universitat de Valéncia, 2010

Publicacions de la Universitat de Valéncia,201O
Arts Grafiques, 13
46010 Valencia
Tel: (34) 96 386 41 15
Fax: (34) 96 386 40 67
http://puv.uv.es
publicacions@uv.es
ISBN: 978-84-370-7820-5

Editorial Reverté, S.A., 2010
Loreto,13-15, Local B
08029 Barcelona
Tel (34) 93 419 33 36
http://www.reverte.com
reverte@reverte.com
ISBN:978-84-291-7395-6

Edición e-book (PDF), 202
ISBN: 978-84-291-0032-7

Diseño de la cubierta: JPM Ediciones

Reservados todos los derechos. La reproducción total o parcial de esta obra, por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, queda rigurosamente prohibida, salvo excepción prevista en la ley. Asimismo, queda prohibida la distribución de ejemplares mediante alquiler o préstamo públicos, la comunicación pública y la transformación de cualquier parte de esta publicación (incluido el diseño de la cubierta) sin la previa autorización de los titulares de la propiedad intelectual y de la Editorial. La infracción de los derechos mencionados puede ser constitutiva de delito contra la propiedad intelectual (Art. 270 y siguientes del Código Penal). El Centro Español de Derechos Reprográficos (CEDRO) vela por el respeto a los citados derechos.

PRÓLOGO

La Química Analítica es una disciplina que posee una importante vertiente experimental, ya que su principal objetivo es la caracterización cualitativa, cuantitativa y/o estructural de la materia. Por ello, las asignaturas de laboratorio juegan un papel crucial en su enseñanza.

Los grados en Química, Farmacia, Ciencias Medioambientales o Ingeniería Química incluyen diferentes asignaturas de laboratorio relacionadas con la Química Analítica y en ellas, los estudiantes se enfrentan a problemas reales que deben resolver aplicando, tanto procedimientos basados en métodos clásicos de análisis, como procedimientos analíticos que utilizan diferentes técnicas instrumentales.

Este manual se ha centrado en el laboratorio de análisis instrumental ya que, aunque la utilidad de las volumetrías y gravimetrías es indiscutible, actualmente son las técnicas instrumentales las que permiten resolver la mayoría de los problemas con los que se enfrenta un laboratorio de análisis químico. En las clases de laboratorio es donde los estudiantes deben poner en práctica los conocimientos adquiridos en las clases teóricas y además, es el lugar donde, al enfrentarse a problemas reales, asimilan la metodología de trabajo y aprenden a planificar experiencias y tomar decisiones.

Por ello, el laboratorio docente no debe ser el lugar donde simplemente se reproduzcan protocolos previamente diseñados, sino que los estudiantes deben participar activamente en el diseño y planificación de las experiencias, la selección del material necesario para llevarlas a cabo, la preparación de las disoluciones patrón y reactivos necesarios, la optimización de variables instrumentales... De este modo, podrán adquirir los conocimientos necesarios para enfrentarse a problemas reales en el mundo laboral. Por ello, las experiencias están diseñadas con la intención de que el estudiante pueda participar activamente y para ello, se ha obviado el material común necesario así como el procedimiento a seguir para la preparación de las disoluciones patrón, de reactivo, disoluciones para la obtención del calibrado...

La formación en el laboratorio debe incluir además la adquisición de conductas respetuosas con el medio ambiente y de acuerdo con las normas de seguridad e higiene en trabajo que conlleva el manejo de productos químicos. Por ello, en todas las experiencias llevadas a cabo se deben consultar las fichas de seguridad de los compuestos químicos manipulados, considerar la necesidad de recoger los residuos generados y por supuesto, prever la cantidad de reactivos que se deben preparar con el fin de minimizar los residuos generados y disminuir el coste del análisis.

El manual incluye experiencias relacionadas con las técnicas instrumentales más habituales como son los métodos ópticos, los métodos electroanalíticos, y los métodos comatográficos y electroforéticos. Además, se han incluido prácticas destinadas a la optimización de los parámetros instrumentales de las diferentes técnicas o tratamientos previos a realizar, así como procedimientos para la validación del método analítico. Se ha intentado seleccionar las muestras objeto de estudio de tal manera que cubran los diversos campos en los que la Química Analítica posee una innegable importancia como son el Análisis Clínico, Agroalimentario, Industrial y Medioambiental.

El manual está dirigido a estudiantes y profesores de las asignaturas relacionadas con el Análisis Instrumental, tanto de cursos básicos como de cursos avanzados. Para ello, en las experiencias se indica el nivel de dificultad y la duración estimada. Algunas experiencias incluyen los resultados obtenidos en el laboratorio con el fin de facilitar la comprensión y asimilación de los contenidos. Además, el manual se complementa con un CD-Rom que contiene material multimedia y ejercicios de autoevaluación.

Aunque se trata de un material recomendado para asignaturas de laboratorio, cada uno de los capítulos incluye, de forma sintética, el fundamento de las diferentes técnicas instrumentales con el fin de refrescar los conceptos básicos que el estudiante debe conocer para interpretar de forma correcta los resultados obtenidos en las experiencias.

Este libro es el fruto de la experiencia acumulada durante nuestros años de docencia en la Universitat de València. A lo largo del tiempo, hemos podido constatar que en el laboratorio es donde los estudiantes asimilan los conocimientos teóricos y corrigen algunos errores conceptuales y son ellos, los que con sus preguntas e inquietudes nos han animado a elaborar este manual docente.

A todos ellos, GRACIAS.

Las autoras

Estudiar sin pensar es engañoso. Pensar sin estudiar es peligroso
(Confucio)

ÍNDICE GENERAL

El proceso analítico **15**

El trabajo en el laboratorio de análisis químico. Normas generales **23**

Prevención de riesgos **29**

Minimización y gestión de residuos **35**

Métodos ópticos **39**

Experiencia 1
Determinación de cumarina en vainilla adulterada: comparación de resultados mediante espectroscopia derivada y regresión lineal múltiple 52
Experiencia 2
Especiación de cromo en aguas residuales 60
Experiencia 3
Determinación cinético-espectrofotométrica de creatinina con picrato alcalino 63
Experiencia 4
Determinación del contenido en *o*-xileno, *m*-xileno y *p*-xileno en una muestra comercial de xilol mediante espectroscopia infrarroja 67
Experiencia 5
Optimización de variables en fluorescencia molecular: determinación de quinina en agua tónica 70
Experiencia 6
Aplicaciones analíticas del efecto quenching: determinación de cloruro en suero fisiológico 76
Experiencia 7
Optimización de variables en fluorescencia sincrónica 78
Experiencia 8
Determinación quimioluminiscente de hipoclorito sódico en un producto de limpieza doméstico 83
Experiencia 9
Estudio de las variables químicas, físicas e instrumentales que afectan a la señal analítica en atomización en llama 88
Experiencia 10
Determinación de litio en aguas 93
Experiencia 11
Determinación de cromo en aceros mediante espectroscopia de absorción atómica en llama: validación de un método analítico 95
Experiencia 12
Determinación de Ca^{2+}, Mg^{2+}, K^{+} y Na^{+} intercambiables en suelos 100
Experiencia 13
Estudio de las variables químicas, físicas e instrumentales que afectan a la señal analítica en atomización electrotérmica 103
Experiencia 14
Determinación de metales en hojas de tabaco mediante espectroscopia de absorción atómica con atomización en horno de grafito 110
Experiencia 15
Determinación de cadmio en sangre mediante espectroscopia de absorción atómica con atomización en horno de grafito 115
Experiencia 16
Determinación de arsénico mediante generación de hidruros 117

Experiencia 17
Determinación de mercurio en orina mediante la técnica de vapor frío..... 120
Experiencia 18
Determinación de metales mediante ICP en pinturas de mobiliario infantil y juguetes. Norma UNE-EN 71-3..... 124
Experiencia 19
Análisis cualitativo mediante fluorescencia de Rayos X..... 128
Experiencia 20
Determinación de sulfatos en agua mediante turbidimetría y nefelometría: comparación de resultados..... 134
Experiencia 21
Determinación refractométrica del grado de humedad en miel..... 136
Experiencia 22
Determinación polarimétrica y refractométrica de sacarosa en leche condensada..... 139

Métodos electroanalíticos..... 143

Experiencia 23
Influencia de las variables químicas en determinaciones potenciométricas..... 152
Experiencia 24
Determinación de fluoruro en aguas de consumo mediante potenciometría directa..... 158
Experiencia 25
Determinación de nitratos en productos cárnicos..... 161
Experiencia 26
Determinación de agua en leche en polvo mediante el método de Karl-Fischer con detección biamperométrica del punto final..... 165
Experiencia 27
Determinación electrogravimétrica de cobre..... 168
Experiencia 28
Voltamperometría diferencial de impulsos: influencia de variables químicas e instrumentales..... 171
Experiencia 29
Determinación de quinina en bebidas refrescantes mediante voltamperometría diferencial de pulsos..... 177
Experiencia 30
Análisis de trazas metálicas en partículas atmosféricas: muestreo, digestión y determinación mediante polarografía diferencial de impulsos..... 182
Experiencia 31
Determinación de cobre, cadmio y plomo en vino mediante voltamperometría de redisolución anódica..... 186
Experiencia 32
Determinación de níquel y cobalto en agua de mar mediante voltamperometría de redisolución adsortiva..... 189
Experiencia 33
Determinación de selenio mediante voltamperometría de redisolución catódica..... 195

Métodos cromatográficos..... 199

Experiencia 34
Optimización y validación de un método analítico para la determinación de cafeína en refrescos..... 206
Experiencia 35
Análisis de productos naturales en extractos vegetales: determinación de ácido rosmarínico en hojas..... 213

Experiencia 36
Identificación de colorantes alimentarios empleando cromatografía líquida con elución en gradiente y detector de fila de diodos ... 216
Experiencia 37
Determinación de fenoles en aguas mediante cromatografía líquida y extracción en fase sólida ... 221
Experiencia 38
Separaciones quirales: determinación enantiomérica de clortalidona en fármacos y orina ... 227
Experiencia 39
Optimización de variables en cromatografía de gases: identificación de impurezas en bebidas alcohólicas de alta graduación ... 232
Experiencia 40
Determinación de ácido homovanílico y de ácido vanilmandélico en orina mediante cromatografía de gases ... 236
Experiencia 41
Determinación de compuestos orgánicos volátiles mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas tras muestreo con tubos adsorbentes ... 241
Experiencia 42
Determinación de halometanos en agua de piscinas mediante microextracción en fase sólida ... 244

Métodos electroforéticos ... 249

Experiencia 43
Estudio del efecto de las variables experimentales en la migración de vitaminas: determinación de riboflavina en preparados vitamínicos ... 254
Experiencia 44
Determinación de analgésicos mediante electroforesis capilar ... 258
Experiencia 45
Determinación de cafeína en refrescos mediante cromatografía micelar electrocinética ... 260

Análisis de contaminantes atmosféricos a tiempo real ... 263

Experiencia 46
Determinación de contaminantes químicos en atmósferas laborales: tubos colorimétricos y chips ... 265
Experiencia 47
Determinación de oxígeno, monóxido de carbono, ácido sulfhídrico y gases explosivos en atmósfera ... 269

BIBLIOGRAFÍA GENERAL ... 273

ANEXO I ... 275

ANEXO II ... 285

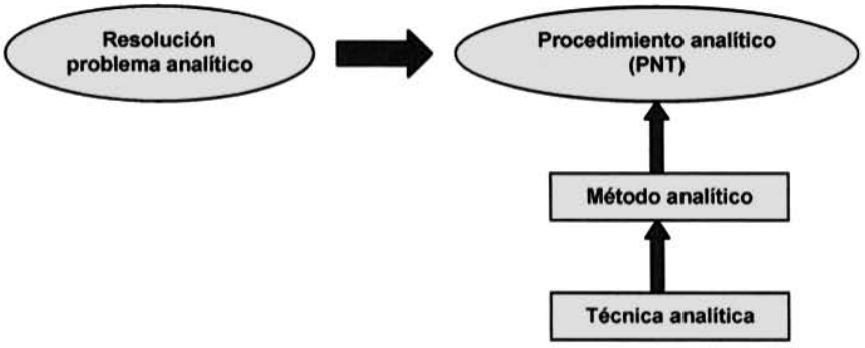
ANEXO III ... 295

INDICE ALFABÉTICO ... 299

EL PROCESO ANALÍTICO

Gran parte de la actividad de los laboratorios de análisis químico, ya sean de control de calidad, de I+D o docentes, consiste en la puesta a punto y aplicación de procedimientos analíticos.

Estos procedimientos describen de forma detallada todas las operaciones a realizar para la obtención de un resultado mediante aplicación de un determinado método analítico y, una vez validados, constituyen los procedimientos normalizados de trabajo o PNT. Por tanto, particularizan a un problema analítico concreto el protocolo de trabajo inherente a un método analítico que, a su vez, implica el empleo de una técnica analítica determinada.



En definitiva, los procedimientos analíticos marcan las pautas para el desarrollo del denominado proceso analítico, entendido éste como *el conjunto de etapas sucesivas que, realizadas mediante operaciones previamente establecidas, permite la caracterización parcial o total de una muestra.*

La resolución de un problema analítico implica la aplicación del proceso analítico adecuado y por tanto, la selección del método a aplicar una vez definido el problema.

Son varios los factores a considerar a la hora de seleccionar el método adecuado. Entre ellos, la complejidad de la muestra, el nivel de concentración esperado, la exactitud requerida, el tiempo y medios disponibles, etc.

Una vez seleccionado el método, se aplica el proceso analítico que consta de las siguientes etapas:

- Muestreo.
- Preparación de la muestra.
- Calibrado y medida de la señal.
- Obtención y evaluación de resultados.
- Elaboración del informe.

1. Muestreo

Con la etapa de muestreo se persigue la obtención de una muestra de laboratorio representativa, es decir, que reproduzca fielmente la composición del material objeto de análisis ya que, de lo contrario, el resultado del análisis no tendrá ninguna validez. En este sentido, es necesario llevar a cabo un diseño de muestreo cuya complejidad depende de la naturaleza de la muestra y del grado de heterogeneidad esperado. Este diseño debe establecer características del muestreo tales como cantidad de muestra, lugar o lugares de muestreo, número de muestras, tiempo de muestreo y dispositivo a utilizar para la recolección de la muestra.

El diseño de muestreo proporciona la denominada *muestra bruta* que, tras su homogenización y reducción, constituye *la muestra de laboratorio* y por tanto, la porción de

muestra que debe ser remitida al laboratorio para ser sometida al resto de las etapas del proceso analítico.

En este punto, cabe resaltar la importancia que poseen las condiciones en las que se transporta y almacena la muestra. Así, debe prestarse especial atención a la posibilidad de que se produzcan pérdidas de componentes volátiles, procesos de oxidación, reacciones fotoquímicas o interacciones con el recipiente utilizado para el transporte y almacenaje. De modo general se recomienda transportar y mantener las muestras bajo refrigeración, protegidas de la luz y debidamente etiquetadas. En cualquier caso, es aconsejable realizar los análisis lo antes posible tras el muestreo.

2. Preparación de la muestra

La etapa de tratamiento de la muestra suele implicar, en el caso de muestras sólidas, la disolución parcial o total de la misma, ya que la mayoría de las técnicas instrumentales de análisis se aplican sobre muestras en disolución. Para la disolución de la muestra puede recurrirse a distintas estrategias:

- Tratamiento con ácidos minerales o mezclas de ellos, en ocasiones, utilizando horno de microondas.
- Transformación en sales solubles mediante fusión con distintos fundentes.
- Tratamiento con disolventes orgánicos.
- Procesos de combustión.

La selección de la estrategia adecuada depende tanto de la naturaleza de la muestra y analito como del objetivo del análisis.

A menudo no resulta necesario disolver la muestra sino que basta con extraer el componente o componentes a determinar. El proceso mediante el cual se produce esta disolución parcial recibe el nombre de lixiviación, y puede llevarse a cabo utilizando el disolvente adecuado en ocasiones con la ayuda de calefacción, agitación mecánica, sonicación, presurización, etc.

Para muestras gaseosas, y dependiendo del procedimiento de muestreo utilizado, puede ser necesario proceder a la desorción de los analitos ya que, frecuentemente, éstos se encuentran adsorbidos sobre un soporte sólido tras el muestreo. Esta desorción se realiza mediante tratamiento térmico o con disolventes de distinta polaridad dependiendo, tanto de la naturaleza del analito y adsorbente utilizado, como de la técnica instrumental que vaya a ser utilizada posteriormente.

Una vez obtenida la disolución que contiene los componentes a determinar, en ocasiones es necesario proceder a la eliminación de las posibles interferencias.

Existen distintas estrategias para la separación física o enmascaramiento de los posibles interferentes. La separación física puede llevarse a cabo mediante destilación, precipitación de los interferentes, extracción líquido-líquido o mediante extracción en fase sólida. Cabe destacar que la extracción en fase sólida permite, además de la eliminación de interferentes, la preconcentración de los analitos, por lo que constituye un tratamiento previo de gran utilidad en el análisis de trazas.

Una vez eliminadas las interferencias puede ser necesario ajustar el medio o derivatizar el analito con objeto de que se encuentre en la forma adecuada para proporcionar una señal medible mediante la técnica de análisis seleccionada. Estas operaciones constituyen el último paso dentro de la etapa de preparación de la muestra.

3. Obtención de señales

Tras la preparación de la muestra, se procede a la obtención de la señal analítica que posteriormente será transformada en contenido.

Son muchas las técnicas instrumentales de análisis disponibles. Su clasificación suele realizarse en función del tipo de interacción energía-materia que da lugar a la señal. Así, *los métodos ópticos de análisis* implican una interacción energía electromagnética-materia que puede suponer absorción o emisión de radiación y en menor medida modificación en la trayectoria de propagación de la luz incidente. Trabajando en las condiciones adecuadas, la magnitud de la interacción puede ser relacionada con la presencia o contenido del analito en la muestra mediante la construcción de un calibrado.

Las técnicas electroanalíticas constituyen también un conjunto de herramientas analíticas de gran utilidad en la resolución de problemas analíticos. En este caso, la inclusión de la muestra en un circuito eléctrico determina el comportamiento de éste afectando a variables eléctricas tales como intensidad de corriente, voltaje, resistencia eléctrica... Las señales analíticas obtenidas son, por tanto, de naturaleza eléctrica.

Aunque también se han descrito técnicas analíticas basadas en la interacción de la materia con otros tipos de energía como por ejemplo, *los métodos térmicos,* en los que la energía involucrada es térmica, los métodos ópticos y eléctricos son, sin lugar a dudas, los de mayor interés dado su amplio campo de aplicación y versatilidad.

Por otra parte, *los métodos cromatográficos* constituyen un conjunto de métodos de enorme interés analítico ya que implican la separación y detección simultánea de los componentes de una muestra. La separación se produce como consecuencia de las diferencias de velocidad con las que los solutos migran a través de una fase, denominada fase estacionaria, arrastrados por una fase móvil. Bajo las condiciones adecuadas, los solutos abandonan la fase estacionaria de forma independiente alcanzando un detector que proporciona una señal cuya magnitud es proporcional al contenido de soluto en la muestra inicial. Estas diferencias de velocidad surgen como consecuencia de distintas interacciones analito-fase estacionaria y analito-fase móvil, las cuales pueden ser de distinta índole (reparto, adsorción, intercambio iónico...).

Finalmente, en las técnicas electroforéticas la separación de los analitos se produce en virtud de su diferente velocidad de migración en el seno de un campo eléctrico.

4. Calibración

Independientemente de la técnica analítica empleada, la transformación de la señal en contenido se realiza mediante la construcción de un calibrado.

Un calibrado convencional relaciona las señales obtenidas para una serie de disoluciones patrón de concentración variable con el contenido en analito. Bajo condiciones previamente establecidas, la curva de respuesta presenta, en la mayoría de los casos, un intervalo lineal que, una vez establecido, se selecciona como intervalo de trabajo. La interpolación de las señales obtenidas para las muestras en dicho calibrado permite el cálculo del contenido de analito en la disolución de medida.

Para la obtención de resultados válidos mediante calibración convencional es necesario garantizar la ausencia de interferencias directas y también la del denominado efecto matriz. Se entiende por efecto matriz la influencia que sobre el factor de respuesta del analito pueda ejercer cualquier sustancia presente en la disolución de la muestra.

En presencia de efecto matriz, la interpolación de la señal de la muestra en un calibrado convencional es, lógicamente, incorrecta. En estos casos, la determinación del contenido en analito en la muestra debe llevarse a cabo utilizando un calibrado de adición de patrón.

Un calibrado de adición de patrón se obtiene a partir de una serie de disoluciones que contienen un volumen fijo de disolución de muestra y cantidades conocidas y variables de una disolución patrón de analito en un volumen final fijo y preestablecido. Las señales proporcionadas por cada una de estas disoluciones se representan frente al contenido de analito adicionado obteniéndose una recta de ecuación:

$$S = (a_i c_i)_m + a_i c_p$$

siendo a_i el coeficiente de respuesta del analito en presencia de matriz, c_i el contenido de analito aportado por la alícuota de muestra presente y c_p el contenido aportado por cada una de las adiciones de patrón.

Por tanto, el cociente entre la ordenada en el origen y la pendiente de la recta obtenida proporciona el contenido de analito en la muestra diluida. Teniendo en cuenta el factor de dilución aplicado en la preparación de las disoluciones de medida se obtiene la concentración en la muestra.

Mediante este tipo de calibración se corrige el posible efecto matriz ya que la señal correspondiente a los distintos patrones es medida en presencia de matriz y por tanto, se puede suponer que el factor de respuesta para el analito en la muestra y en los patrones es idéntico.

Además, la obtención de un calibrado de adición de patrón permite evidenciar la existencia de efecto matriz ya que, en ausencia del mismo, las pendientes obtenidas para el calibrado convencional y el calibrado de adición de patrón son significativamente iguales.

Finalmente, por lo que respecta a la etapa de calibración cabe indicar que, en algunas técnicas analíticas, pequeñas modificaciones en las condiciones de trabajo suponen cambios apreciables en la magnitud de las señales por lo que resulta habitual la obtención de calibrados de muy baja precisión. En estos casos, es recomendable utilizar para la calibración el método del patrón interno.

Los calibrados de patrón interno se obtienen a partir de disoluciones que contienen cantidades variables y conocidas del analito a determinar y una concentración fija del llamado patrón interno. Se entiende por patrón interno una sustancia química de características similares al analito que proporciona señales analíticas de magnitud adecuada en las condiciones de trabajo y sin que estas señales interfieran en la medida de las señales debidas al analito.

Para cada una de estas disoluciones se mide la señal debida al o a los analitos y también las señales correspondientes al patrón interno que, en principio, debían ser idénticas dado que el contenido en patrón interno en todas las disoluciones es el mismo.

Considerando que la influencia que ejercen pequeñas variaciones en las condiciones de trabajo afectan del mismo modo a analitos y patrón interno, es evidente que el cociente:

$$\frac{\text{Señal}_{\text{analito}}}{\text{Señal}_{\text{patrón}}}$$

anula o al menos compensa esta influencia, por lo que los calibrados de patrón interno se construyen mediante representación de estos cocientes frente a la concentración de analito siempre que la concentración de patrón interno adicionada sea idéntica en todas las disoluciones de calibrado.

Obtenido el calibrado, la determinación del contenido en analito en las muestras se realiza mediante interpolación del cociente de señales correspondiente a las mismas en el calibrado anterior. Por tanto, las muestras deben contener idéntica cantidad de patrón interno que los patrones por lo que antes de llevar a cabo las medidas debe adicionarse patrón interno a las muestras.

Alternativamente, la representación del calibrado puede realizarse como cociente de señales frente al cociente de concentraciones analito-patrón interno. En este caso se podría interpolar en la recta de calibrado el cociente de señales obtenido para muestras en las cuales la adición de patrón interno no sea idéntica a la utilizada en los patrones de calibrado. El cálculo del contenido en las muestras se realiza, en este caso, multiplicando el resultado de la interpolación por el contenido en patrón interno adicionado a las muestras.

5. Obtención y evaluación de resultados

El proceso analítico finaliza con la obtención y evaluación de resultados y la elaboración del informe.

Para la obtención del resultado final basta con considerar todas las diluciones a que ha sido sometida la muestra inicial y a partir del contenido obtenido en la disolución de medida realizar los cálculos pertinentes. En principio, si el proceso analítico ha sido desarrollado de forma adecuada, el resultado puede considerarse exento de errores sistemáticos y por tanto, correcto. Sin embargo, es necesario considerar que todo proceso de medida lleva implícita una incertidumbre asociada y en este sentido, nunca puede afirmarse que el valor encontrado corresponda al valor buscado con una seguridad del 100%. Esta incertidumbre surge como consecuencia de la imposibilidad de controlar todas las variables que influyen en el proceso analítico y por tanto, el resultado obtenido debe ser considerado como una estimación del valor buscado.

Puesto que las fluctuaciones que afectan al resultado de la medida se producen al azar, cuanto mayor sea el número de observaciones realizadas, mayor será la seguridad en la estimación si se considera como resultado la media de las observaciones realizadas.

Así, considerando una distribución gaussiana, se puede afirmar que el máximo de la distribución corresponde al valor buscado, valor que, además, sería el obtenido experimentalmente como media de infinitas réplicas.

Ante la imposibilidad de realizar un número infinito de réplicas todo resultado experimental debe ir acompañado de su imprecisión, parámetro que estima el intervalo de valores en el que existe una probabilidad prefijada de que se encuentre la media estadística o máximo de la distribución.

La imprecisión de un resultado experimental puede evaluarse a partir de la desviación estándar definida del siguiente modo:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \left(x_i - \bar{x}\right)^2}{n}}$$

donde x_i representa cada uno de los valores experimentales, $\bar{x}$ el valor medio y n el número de medidas realizadas.

En este punto cabría indicar que los valores de x_i considerados para el cálculo de σ deben pertenecer a la distribución. Por tanto, cualquier valor discrepante obtenido como resultado de alguna operación incorrecta debe ser eliminado del cálculo. Para discernir si un determinado valor debe ser considerado discrepante existen una serie de herramientas estadísticas. Entre ellas, el test de Dixon está especialmente recomendado para series de pocos datos.

Una vez obtenido el valor de σ se puede afirmar que existe una probabilidad del 66,7% de que la media estadística de la distribución se encuentre en el intervalo de valores comprendido entre $\bar{x} - \sigma$ y $\bar{x} + \sigma$. Por otra parte, la t de Student permite ampliar el nivel de confianza ampliando, lógicamente, el intervalo de valores. Para ello, la imprecisión se evalúa

como el producto t σ siendo el valor de t el tabulado para un determinado número de grados de libertad y un nivel de confianza establecido.

Desde el punto de vista práctico y atendiendo a criterios de tiempo y coste, el número de réplicas en un análisis oscila entre 3 y 5, por lo que n es un valor muy pequeño. En estas condiciones, la estimación de la desviación estándar se realiza utilizando una expresión ligeramente modificada:

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

y, una vez estimado el valor de s, el resultado analítico debe expresarse como $\bar{x} \pm \frac{s}{\sqrt{n}}$ o $\bar{x} \pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$ si se desea ampliar el intervalo de confianza.

Otro parámetro muy utilizado para evaluar la precisión de un resultado es el coeficiente de variación definido como la desviación estándar relativa en % y que, por tanto puede ser calculado mediante la siguiente expresión:

$$\text{coeficiente de variación} = \frac{s}{\bar{x}} 100$$

Por tanto, la obtención de un resultado analítico válido conlleva la necesidad de utilizar un procedimiento que incluya un muestreo y tratamiento de la muestra adecuado a las características de la muestra y el analito, que considere la posible existencia de interferencias y su eliminación, que incluya una calibración adecuada y la realización de al menos tres réplicas del proceso analítico en su totalidad con objeto de valorar la precisión del resultado.

En ocasiones, la imprecisión de un resultado puede ser estimada de forma teórica sin disponer de series de datos experimentales con los que calcular la desviación estándar. Esta posibilidad consiste en valorar con la ayuda de la estadística como repercute en la imprecisión del resultado final la imprecisión de cada una de las operaciones realizadas para la obtención del resultado.

Así, si se supone un resultado obtenido a partir de una expresión matemática que incluye distintas medidas experimentales:

$$R = f(a, b, c, \ldots)$$

la imprecisión o desviación estándar asociada puede calcularse mediante la expresión:

$$s_R = \sqrt{\left(\frac{\partial R}{\partial a}\right)^2 (s_a)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial b}\right)^2 (s_b)^2 + \left(\frac{\partial R}{\partial c}\right)^2 (s_c)^2 + \ldots}$$

6. Elaboración del informe

La finalización de un análisis implica la elaboración de un informe final que recoja todos los datos de interés respecto al resultado obtenido.

Entre los datos que deben figurar en el informe se encuentran los siguientes:

- *Tipo de muestra*
  - Debe especificarse la naturaleza del material objeto de análisis. Por ejemplo agua residual, tierra de cultivo, preparado farmacéutico, producto alimentario (leche, acelgas, mermelada...), acero, material de construcción, atmósfera laboral...
- *Lugar de procedencia y fecha de muestreo*
  - Estos datos resultan indispensables en muestras que pueden presentar elevada heterogeneidad o sufrir transformaciones durante el transporte y almacenamiento.
- *Naturaleza y aspecto de la muestra remitida al laboratorio*
  - Debe indicarse el estado físico de la muestra. Para muestras sólidas puede señalarse el grado de agregación, el aspecto pulvurento o cristalino, el color, la presencia de humedad, etc. Para muestras líquidas, la existencia de turbidez, el color o la viscosidad.
- *Sustancia o sustancias analizadas*
  - En este punto se especifica si se realiza un análisis cualitativo o cuantitativo y los analitos a identificar o determinar. En caso necesario se indica si el resultado hace referencia a contenido total y si incluye especiación.
- *Fecha de la realización del análisis*
- *Técnica y método analítico utilizado*
  - Si el procedimiento analítico utilizado corresponde a un método oficial de análisis se incluye la referencia.
- *Instrumentación empleada*
  - Se detallan las especificaciones de los equipos utilizados.
- *Resultados obtenidos en el análisis de las distintas réplicas*
  - Puede resultar de interés indicar el procedimiento de calibración empleado, aportando además datos respecto al patrón de calibración e intervalo de concentración considerado.
- *Cálculo de la precisión*
  - Valor de la desviación estándar y coeficiente de variación en su caso, especificando el nivel de probabilidad para el que han sido obtenidos.
- *Resultado final*
  - Debe expresarse junto al intervalo de confianza asociado indicando claramente las unidades y con el número de cifras significativas adecuado.
- *Observaciones*
  - Se informa acerca de cualquier circunstancia o incidencia ocurrida durante la realización de los análisis que pueda tener repercusión sobre el resultado obtenido.
- *Firma del responsable*

EL TRABAJO EN EL LABORATORIO DE ANÁLISIS QUÍMICO. NORMAS GENERALES

El laboratorio es el lugar donde, una vez obtenida la muestra de laboratorio, se desarrollan cada una del resto de las etapas del proceso analítico. Todo laboratorio químico debe reunir unas condiciones mínimas que garanticen que su actividad puede realizarse con éxito. Aunque el equipamiento disponible puede ser desde muy modesto hasta muy sofisticado, cabe destacar que, en cualquier caso, la limpieza y el orden son imprescindibles para la obtención de buenos resultados.

Particularmente, en un laboratorio de análisis químico donde muy a menudo es necesario realizar determinaciones a nivel de trazas, la necesidad de limpieza y orden es absolutamente incuestionable.

Además, el material debe manipularse de la forma adecuada y la instrumentación debe mantenerse en condiciones operativas, lo que incluye la calibración periódica.

En este sentido, a continuación se indican pautas generales de trabajo que deben ser observadas en un laboratorio de análisis químico.

1. El laboratorio de análisis químico

La infraestructura mínima en un laboratorio de análisis incluye elementos comunes a todo laboratorio químico como son: mesa o banco de trabajo provista de pila para la limpieza del material, vitrina con sistema de extracción, conexión a corriente estabilizada, suministro de distintos gases como aire o nitrógeno, mobiliario para el almacenamiento de material o reactivos y diversos elementos de seguridad, como ducha, lavaojos o manta ignífuga.

En cuanto al equipamiento específico cabe destacar la presencia de pequeña instrumentación entre la que se encuentran balanzas analíticas, agitadores magnéticos, centrífugas, baños termostatizados, baños de ultrasonidos, hornos de microondas, pH-metros... y la presencia de distintos equipos analíticos que permiten la obtención y tratamiento de las señales correspondientes a las distintas técnicas analíticas.

En este espacio, como ya se ha indicado, se llevan a cabo las distintas operaciones que conducen a la obtención de un resultado analítico y que comienzan con la planificación de las experiencias.

2. Planificación de las experiencias

El protocolo de trabajo o procedimiento operativo debe estar perfectamente establecido antes del inicio de las experiencias. Es indispensable disponer de un cuaderno de laboratorio donde deben detallarse cada una de las operaciones realizadas e incidencias que puedan producirse durante el transcurso de las experiencias y en el que, además, deben figurar todos aquellos cálculos previos referentes a la preparación de muestras, patrones y disoluciones de reactivos.

Estos cálculos deben contemplar el orden de magnitud de los contenidos esperados en las muestras y también el número de análisis a realizar con el fin de preparar el volumen de disoluciones de reactivos necesario, sobre todo en el caso de reactivos de estabilidad limitada, tóxicos o de elevado precio. En cualquier caso, debe ajustarse el volumen a las necesidades previstas con objeto de disminuir el consumo de reactivos y la cantidad de residuos generada.

Una vez realizados los cálculos pertinentes se selecciona el material necesario que se dispone sobre la mesa de trabajo en las condiciones adecuadas para su utilización, es decir, limpio y preferentemente seco.

3. Limpieza y manejo del material de vidrio

La limpieza del material de vidrio se realiza habitualmente con agua y jabón. En ocasiones puede ser necesario emplear ácidos, bases o disolventes orgánicos para la eliminación total

de los residuos. Una vez limpio se enjuaga un mínimo de tres veces con agua desionizada utilizando cada vez un volumen de agua bastante inferior a su capacidad y mediante agitación manual para bañar todas las superficies. Si se observa que el material queda engrasado, se mantiene durante 24 horas sumergido en una mezcla etanol-clorhídrico y posteriormente se vuelve a enjuagar.

Es recomendable realizar la limpieza del material inmediatamente después de su uso y almacenarlo perfectamente limpio ya que, de esta forma, siempre se dispone de material limpio y seco.

Este material debe ser utilizado únicamente para realizar las operaciones para las que ha sido diseñado. Así, las pipetas, bien sean graduadas o aforadas, han de utilizarse para verter volúmenes que deben ser medidos con la máxima precisión mientras que, en caso contrario, está indicado el uso de probetas. Para aspirar y verter reactivos se deben emplear siempre propipetas. La adición de pequeños volúmenes de reactivos que no sea necesario conocer con precisión puede realizarse simplemente con cuentagotas, mientras que las micropipetas deben ser utilizadas cuando se impone una elevada precisión.

Los matraces aforados están calibrados para contener volúmenes conocidos con un alto grado de precisión. Por tanto, se utilizan para la preparación de muestras y patrones. En algún caso pueden estar también indicados en la preparación de disoluciones de reactivos aunque generalmente, basta con llevar a un volumen aproximado en vaso de precipitados. En los matraces aforados no deben introducirse sustancias sólidas para su posterior disolución. Además, al tratarse de material calibrado no deben introducirse en la estufa ni almacenar a bajas temperaturas.

Para disolver se utilizan los vasos de precipitados. Además, las disoluciones preparadas con la ayuda de calefacción no se deben pipetear ni introducirse en matraces aforados hasta que alcancen la temperatura ambiente. Por otra parte, si las características del analito lo requieren puede ser necesario proteger de la luz o guardar bajo refrigeración hasta el momento de su utilización.

Especial precaución debe tenerse con el uso de las varillas agitadoras. En caso de ser utilizadas no deben extraerse de la disolución antes de finalizar la operación para la cual están siendo utilizadas, y siempre tras su lavado con el disolvente adecuado.

Para el análisis de trazas metálicas deben tomarse precauciones especiales. En estos casos el material debe ser lavado en primer lugar con agua y jabón, y después de enjuagarlo convenientemente con agua, tratado con HNO_3 1:1 durante unas horas. Por último, antes de ser utilizado se enjuaga con agua ultrapura.

4. Preparación de muestras, patrones y reactivos

La preparación de muestras sólidas comienza por la pesada de la cantidad de muestra de laboratorio que ha de someterse al tratamiento posterior y que constituye la muestra de análisis. Ésta debe establecerse atendiendo al contenido esperado y características del procedimiento de medida seleccionado. Habitualmente se realizan tres réplicas y la pesada se realiza en balanza analítica con una precisión de décimas o centésimas de miligramo.

Para llevar a cabo la disolución de la muestra o la lixiviación de los analitos se emplean vasos de precipitados o reactores si el tratamiento se realiza en horno de microondas y finalmente, la disolución obtenida se lleva a volumen en matraz aforado. La preparación de la muestra puede incluir una serie de operaciones que merecen especial atención.

Así, la disolución de muestras sólidas suele requerir calefacción. La calefacción debe siempre iniciarse de forma lenta y cubriendo parcialmente el vaso de precipitados con un vidrio de reloj para evitar salpicaduras. Como norma general es aconsejable utilizar las condiciones menos drásticas que garanticen una recuperación máxima de los componentes de la muestra a determinar.

La muestra, una vez disuelta, se deja enfriar y se trasvasa al matraz aforado lentamente con la ayuda de un embudo de vidrio o directamente haciéndola fluir por las paredes del matraz que se mantiene ligeramente inclinado.

Una vez finalizado el trasvase, el vaso se enjuaga diversas veces con pequeñas cantidades de disolvente que se adicionan al matraz antes de proceder al aforo del mismo con disolvente limpio.

Si el tratamiento de la muestra se ha llevado a cabo en horno de microondas y mediante el empleo de reactores, éstos no pueden abrirse hasta que se encuentren a temperatura ambiente y para su trasvase al aforado en su caso, se trabaja de modo análogo al indicado anteriormente.

Es posible que la preparación de la muestra incluya una filtración. Esta operación debe también realizarse con sumo cuidado para evitar pérdidas. Si se utilizan embudos de vidrio y filtros de papel es importante colocar el filtro en el embudo sin que se formen bolsas de aire que dificultarán la filtración, por lo que es conveniente humedecer el filtro una vez introducido en el embudo para que quede perfectamente acoplado a las paredes del mismo.

El recipiente de recogida debe situarse próximo al vástago del embudo y la muestra debe introducirse en el embudo poco a poco y con la ayuda de una varilla que ha de mantenerse dentro del vaso mientras dure el proceso de filtración. El nivel de disolución en el embudo debe permanecer en todo momento como mínimo a un centímetro aproximadamente por debajo del borde del filtro. Una vez filtrada la muestra, se lava varias veces el vaso y las aguas de lavado se introducen también en el embudo.

La preparación de la muestra puede incluir también otras operaciones como extracción líquido-líquido o extracción en fase sólida con columnas que requieren cierta manipulación de la misma. En el primer caso, debe garantizarse el establecimiento del equilibrio de distribución mediante agitación enérgica y posteriormente esperar a que la separación de las fases sea completa antes de proceder al trasvase de la fase de interés. Por lo que respecta a la extracción en fase sólida, las columnas deben activarse y acondicionarse antes de la introducción de la muestra y su posterior elución. Ambas operaciones deben realizarse empleando una velocidad de flujo que permita que se produzca tanto la interacción muestra - fase sólida responsable de la retención como el proceso que conlleva la elución.

Por lo que respecta a la preparación de disoluciones patrón, las precauciones a considerar son similares a las indicadas para la preparación de las muestras. Estas disoluciones deben prepararse a partir del reactivo sólido de la pureza adecuada mediante pesada de la cantidad necesaria en balanza analítica, posterior disolución y dilución con disolvente de elevada pureza empleando siempre material volumétrico. Para análisis de rutina se suele disponer de disoluciones patrón debidamente almacenadas a partir de las cuales se preparan las disoluciones de trabajo por dilución. Cabe destacar que estas disoluciones, si son muy diluidas, presentan una estabilidad limitada por lo que es aconsejable preparar las disoluciones de trabajo inmediatamente antes de su utilización. Las disoluciones acuosas se preparan generalmente con agua de elevada pureza. Es importante recordar que toda disolución preparada por dilución debe ser adecuadamente homogenizada por agitación antes de su utilización.

Por lo que respecta a los reactivos, si las cantidades a pesar son elevadas no es necesario el empleo de balanza analítica y en ocasiones tampoco es necesario el empleo de matraces aforados. Las disoluciones de reactivos se almacenan en botellas de vidrio o plástico dependiendo de su composición, debidamente etiquetadas indicando la fecha de preparación, y bajo refrigeración o protegidas de la luz en caso necesario.

5. Preparación de disoluciones de medida

Los métodos instrumentales de análisis implican generalmente la obtención de curvas de respuesta o calibrados que permiten la transformación de las señales en contenido. Para ello es necesario preparar una serie de disoluciones que contenga cantidades conocidas y variables del analito o analitos a determinar, y que además se encuentren en un entorno químico lo más similar posible al de la disolución de muestra cuya señal va a ser medida.

Por tanto, estas disoluciones se preparan cubriendo el intervalo de concentración previamente establecido y en presencia de los reactivos necesarios para simular en lo posible la matriz de la muestra.

Puesto que el contenido en patrón debe ser perfectamente conocido, las disoluciones se preparan por dilución de una disolución patrón de mayor concentración previamente obtenida.

A este respecto cabe recordar que, atendiendo a la concentración de la disolución patrón de partida, la etapa de planificación de las experiencias incluye el cálculo de los volúmenes de dicha disolución que deben ser utilizados para la obtención de las disoluciones de medida.

Así, por ejemplo, consideremos la preparación de patrones de calibrado de 2,4, 6, 8 y 10 mg L^{-1} a partir de una disolución patrón de 102,7 mg L^{-1} en matraces aforados de 50 mL. Como puede observarse en la tabla siguiente los volúmenes que deben ser adicionados no pueden ser fácilmente medidos con el material volumétrico habitual.

Disolución	$C_{disolución\ medida}$ (mg L^{-1})	$V_{patrón\ calculado}$ (mL)	$V_{patrón\ adicionado}$ (mL)	$C_{obtenida}$ (mg L^{-1})
1	2,00	0,974	1,00	2,05
2	4,00	1,947	2,00	4,11
3	6,00	2,921	3,00	6,16
4	8,00	3,895	4,00	8,22
5	10,00	4,868	5,00	10,27

En estos casos se recomienda utilizar los volúmenes más próximos a los teóricos que puedan ser medidos con suficiente precisión y posteriormente, realizar el cálculo de la nueva concentración obtenida tras dicha dilución.

Una curva de calibrado es tanto más precisa cuanto mayor sea el número de puntos experimentales obtenidos. En este sentido se recomienda preparar series de, al menos, cinco disoluciones aunque para procedimientos muy contrastados puede bastar con series de cuatro disoluciones.

Las series de calibrado deben incluir un blanco, es decir, una disolución idéntica a las de calibrado pero que no contenga patrón.

Además de las disoluciones patrón, deben también prepararse las disoluciones de medida de la muestra previamente acondicionada. En ocasiones, basta con realizar una dilución para que el contenido en analito se sitúe dentro del intervalo de concentración del calibrado pero habitualmente esta dilución va acompañada de la adición de reactivos para fijar variables de entorno químico o la formación de derivados. Como ya se ha indicado anteriormente es conveniente realizar al menos tres réplicas de la muestra.

6. Obtención de las señales

Antes de proceder a la medida de las señales debe confirmarse que el instrumento o equipo de medida se encuentra en condiciones óptimas de empleo. En este sentido, cabe recordar que, dependiendo de la técnica analítica empleada, puede ser necesario conectar el equipo

minutos antes de su utilización. Así, por ejemplo, en técnicas espectroscópicas debe estabilizarse la fuente de radiación, lo que puede llevar varios minutos. En técnicas cromatográficas, concretamente en cromatografía gaseosa, la temperatura de inyector, columna y detector debe ser adecuada y estable para lo cual pueden ser necesarios también varios minutos. Además, es aconsejable purgar la columna durante bastante tiempo, bien para su limpieza, bien para garantizar la presencia de la fase móvil de trabajo en todo el circuito y acondicionar la fase estacionaria en el caso de la cromatografía líquida.

Con el equipo en condiciones se procede a la medida de señales. En primer lugar, se ajusta el cero con la disolución del blanco y posteriormente se realiza la medida de las señales correspondientes a las disoluciones de calibrado. Finalmente se miden las muestras y se comprueba que las señales obtenidas se encuentran dentro del intervalo cubierto por las disoluciones de calibrado. En caso contrario se valora la posibilidad de realizar una mayor o menor dilución de la muestra con objeto de obtener señales dentro del intervalo de trabajo. En algunos casos es conveniente realizar medidas adicionales del blanco para descartar una posible deriva de la línea base.

Una vez realizadas las medidas los equipos deben quedar en perfectas condiciones para su posterior utilización y, por tanto, sin restos de las disoluciones que hayan podido ser introducidas en el mismo durante el proceso de medida.

Independientemente de estas indicaciones generales, cada técnica analítica o equipo implica un protocolo específico de trabajo que debe ser conocido y respetado con el fin de obtener resultados válidos y mantener en buenas condiciones la instrumentación disponible en el laboratorio.

PREVENCIÓN DE RIESGOS

El trabajo en el laboratorio analítico conlleva la utilización de numerosos productos químicos, instalaciones, equipos y utensilios. Ello da lugar a múltiples riesgos que pueden ser de origen y consecuencias muy variados tales como la inhalación de sustancias tóxicas, heridas, quemaduras o la exposición a radiaciones, por citar algunos.

Para eliminar o reducir los riesgos en el laboratorio es necesario, en primer lugar, respetar unas normas básicas, tales como trabajar con orden y limpieza, llevar ropa adecuada y gafas de seguridad, o utilizar únicamente los reactivos y cantidades indicados en los procedimientos de trabajo, tal como se ha resaltado en el apartado anterior. Además, antes de realizar cada experiencia es necesario llevar a cabo una evaluación de los posibles riesgos, con especial atención a la naturaleza de los productos químicos que vayan a utilizarse. Asimismo, es necesario identificar los riesgos intrínsecos de la instrumentación analítica y del material básico de laboratorio necesarios para realizar la experiencia. Una vez identificados, se establecen las medidas a adoptar para poder llevar a cabo la experiencia de una forma segura.

En todo caso, antes de proceder a realizar cualquier tarea experimental en el laboratorio, es necesario conocer la ubicación y funcionamiento de los elementos a utilizar en caso de emergencia (extintores, lavaojos, salidas).

1. Manipulación de productos peligrosos

En un laboratorio analítico se utilizan de forma habitual productos químicos muy diversos, y por ello, de diferente grado de peligrosidad. El conocimiento del grado de peligrosidad es fundamental para evitar accidentes que pueden variar desde una simple irritación cutánea hasta una intoxicación severa.

Para conocer las características de peligrosidad de un producto ha de consultarse el envase en el que es suministrado. El envase de un producto debe estar etiquetado de forma que, además de su composición y de los datos del productor o del distribuidor, se informe de su posible peligrosidad. Para ello se utilizan símbolos o pictogramas de identificación de los peligros, así como la descripción de los riesgos (*frases R*) y consejos de seguridad (*frases S*) en relación con su uso. Si un producto es no peligroso no llevará ningún símbolo ni frase R o S. Este sistema de etiquetado se modificará en breve con la ampliación de los pictogramas de peligro, la incorporación de palabras de advertencia, y la inclusión de indicaciones de peligro o *frases H* y consejos de prudencia o *frases P* (anexo I) en sustitución de las actuales frases R y frases S, respectivamente[1]. Este nuevo sistema entrará en vigor el 1 de diciembre de 2010 para las sustancias, y el 1 de junio de 2015 para las mezclas.

Para disponer de mayor información debe consultarse la ficha de datos de seguridad del producto, suministrada por la empresa que fabrica o distribuye dicho producto en la primera entrega. La ficha de datos de seguridad contiene información exhaustiva relativa a la identificación del producto, peligrosidad, propiedades físico-químicas, estabilidad, reactividad, medidas a adoptar en caso de vertido accidental y de incendio, información toxicológica, ecológica, instrucciones para su eliminación, etc.. Por tanto, la ficha de datos de seguridad es fundamental para conocer las medidas a adoptar en caso de accidente, y también, como se abordará en el punto siguiente, para establecer la forma de proceder con los residuos generados hasta su eliminación.

La información relativa a la peligrosidad de un producto químico debe conservarse mientras el laboratorio disponga de dicho producto. Por otra parte, resulta evidente que el correcto etiquetado tanto de los productos puros como las mezclas preparadas a partir de éstos es fundamental para minimizar el riesgo asociado a su manipulación, debiendo

[1] Reglamento CE 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.