Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea

ANALISI KIMIKOA FARMAZIAREN ESPARRUAN: ESPERIMENTAZIORAKO GIDALIBURUA

Egileak

Mª Aránzazu Goicolea Altuna
Alberto Gómez Caballero
Nora Unceta Zaballa

EUSKARAREN ETA ETENGABEKO PRESTAKUNTZAREN ARLOKO ERREKTOREORDETZAREN SARE ARGITALPENA

Argitalpen honek UPV/EHUko Euskararen eta Etengabeko Prestakuntzaren arloko Errektoreordetzaren laguntza izan du

ISSN 2603-8900

HITZAURREA

Kimika Analitikoa Farmaziako Graduan. Irakasgaia ikasket-planaren testuinguruan.

Kimika Analitikoa gaur egungo Kimikaren adar garrantzitsuenetako bat da; Farmazian graduatuen etorkizuneko lanbidearen ardatz nagusietakotzat har daiteke. Zeharkako ikasgai honen garapenarekin, eguneroko bizitzari lotutako auzi analitikoak definitu eta horiei aurre egiteko gaitasunak landuko dira. Ildo honetan, kalitate metrologiko maximoa erdiestea izango da helburu, informazio (bio)kimiko fidagarriaz hornitzeko xedearekin.

Kimika Analitikoa bezalako irakasgai esperimental batean, irakaskuntza-ikaskuntza prozesuan berebiziko garrantzia duten tresna didaktiko bat dira laborategiko praktikak. Ikasleek ikasgaiarekiko izan dezaketen jakin-mina pizten dute, ezagutza ezberdinen bereganatze-prozesuan lagun dezaketen jarrerak eta trebetasunak sustatuz. Kimika Analitikoa zientzia esperimentala izanik, honen esparruan lantzen diren laborategiko praktikak eskola teorikoen maila berean koka litezke. Halaber, praktikek, jakintzagai honetako irakaskuntzan, baliabide didaktiko esanguratsuena suposatzen dute.

Farmaziako Graduko bigarren mailan irakasten den derrigorrezko irakasgaia da Kimika Analitikoa. Kimika moduluan barneratua dago, 5,4 kreditu ECTS eskola magistraletarako, 0,9 ECTS gelako praktiketarako eta 2,7 ECTS laborategiko praktiketarako izanik. Beraz, laborategiko praktikek irakasgaiaren kreditu guztien %30a suposatzen dute.

Aurkeztu den ikasmaterial hau, Farmaziako Graduko Kimika Analitikoko ikasleei zuzendua dago, irakasgaiaren kreditu praktikoen garapenerako lagungarria izan daitekeelakoan. Laborategiko praktikek ikasleen jarduera kognitiboa areagotzea ahalbidetzen dute. Zentzu horretan, saio praktiko bakoitzean landuko diren eduki espezifikoetan sakontzeko garatu da ikasmaterial berri hau, ikasleen ezagutza hedatzearren. Laborategiko praktiken azken helburua da ikasleen lan aktiboa sustatzea, eta, egunez egun, praktikak egiten dituzten heinean, norberak bere ezagutza eraikitzea.

Ikasleak laborategiko lanean trebatu behar dira, eta, hori dela eta, ikasmaterial hau ez da laborategiko praktiketako protokoloen bilduma hutsa; praktika bakoitzarekin lortu beharreko helburuak agerian uzten dituen gidaliburua baizik, irakasgaiaren bibliografia

nabarmenena aintzat hartuta garatu dena. Bilaketa bibliografikoetatik eskuratutako informazioa praktika bakoitzean garatuko den prozedura analitikoan barneratuko da. Behin auzi analitikoa identifikaturik, ikasleak prozedura analitiko osoa garatu beharko du erabilgarri dauden erreaktibo, material eta tresnekin. Kimika Analitikoko laborategiko praktiketan, ikasleek behaketa-ahalmena, datu esperimentalen antolaketa eta beren interpretaziorako gaitasuna gara ditzaten nahi da. Era berean, beren ekimena eta pentsaera kritikoa bultzatu nahi dira, ekipamendu analitiko ezberdina maneiatzeko eskuzko trebetasunen lorpena baztertu gabe.

Planteatutako ikasmateriala bi ataletan egituratuko da. Lehenengoan, Kimikako laborategietan gehien erabiltzen diren materialak eta ohiko prozedurak jorratuko dira, lan esperimentalarekin erlazionatutako arriskuak eta horien prebentzioa ere aipatuz. Bide batez, eskola praktikoetan jarraitu beharreko neurriak ere adieraziko dira atal honetan.

Bigarren atalak hiru azpiatal izango ditu, eta analisi farmazeutikoan erabilitako teknika analitikoetan fokuratua egongo da. Lehendabiziko azpiatalean teknika klasikoak landuko dira, analisi bolumetrikoa eta grabimetrikoa barne. Jarraian, ondorengo bi azpiataletan, teknika instrumental optikoak, elektrokimikoak eta bereizketa-teknika kromatografikoak jorratuko dira.

1. KAPITULUA. KIMIKA ANALITIKAKO LABORATEGIKO OINARRIZKO SEGURTASUN-ARAUAK

1. LABORATEGIKO OHIKO MATERIALA 1

1.1 LABORATEGIKO GAILUAK 1

1.2 BEIRAZKO MATERIALA 3

1.2.1 Beirazko material bolumetrikoa 3

1.2.2 Bestelako beirazko materiala 4

1.2.3 Bestelako laborategiko materiala 6

1.1.4 Materialaren garbiketa 7

1.3 ERREAKTIBOAK 8

1.3.1 Erreaktibo motak 8

1.3.2 Erreaktiboen erabilera 10

1.3.3 Etiketak 10

1.3.4 Arriskuen piktogramak 11

1.4 LABORATEGIKO KOADERNOA 14

1.5 LABORATEGIKO LANERAKO ARAUAK ETA SEGURTASUN-ARAUAK 15

1.6 FARMAZIA FAKULTATEKO LABORATEGIETAN ARITZEKO ARAU OROKORRAK 19

2. KAPITULUA. PROGRAMA ESPERIMENTALA

I. BLOKEA. Analisi-metodo klasikoak

1. SARRERA 23

2. AZIDO-BASE BALORAZIOAK 30

2.1 SARRERA 30

2.2 AZIDO-BASE BALORAZIO-KURBAK 30

2.3 AZIDO-BASE ADIERAZLEAK 36

2.4 DISOLUZIO BALORATZAILEEN PRESTAKETA 40

2.5 AZIDO-BASE BALORAZIOEN APLIKAZIO ANALITIKO GARRANTZITSUENAK 42

2.6 PRAKTIKAK 47

3. KONPLEXUEN BIDEZKO BALORAZIOAK 59

3.1 SARRERA 59

3.2 ADIERAZLE METALOKROMIKOAK 60

3.3 KONPLEXUEN BIDEZKO BALORAZIO MOTAK 63

3.4 APLIKAZIOAK 65

3.5 PRAKTIKAK 67

4. HAUSPEATZE-BALORAZIOAK 74

4.1 SARRERA 74

4.2 HAUSPEATZE-ADIERAZLEAK 75

4.3 APLIKAZIOAK 75

4.4 PRAKTIKAK 81

5. ERREDOX-BALORAZIOAK 87

5.1 SARRERA 87

5.2 ERREDOX-ADIERAZLEAK 89

5.3 APLIKAZIOAK 91

5.4 PRAKTIKAK 100

II. BLOKEA. Analisi-teknika instrumentalak

1 TEKNIKA ESPEKTROSKOPIKOAK 109

1.1 SARRERA 109

1.1.1 Deskribapena eta sailkapena 109

1.1.2 Erradiazio elektromagnetikoa 109

1.2 ABSORTZIO-ESPEKTROSKOPIA 112

1.2.1 Absortzio-espektroskopia molekularra 112

1.2.2 UV/Ik espektrofotometria-praktikak 127

1.2.3 Atomo-absortziozko espektroskopia 132

1.2.4 Atomo-absortziozko espektrofotometria-praktikak 142

1.3 EMISIO-ESPEKTROSKOPIA 146

1.3.1 Molekula-emisiozko espektroskopia 146

1.3.2 Molekula-emisiozko praktikak 152

1.3.3 Atomo-emisiozko espektroskopia 156

1.3.4 Atomo-emisiozko praktikak 158

2. TEKNIKA ELEKTROKIMIKOAK 160

2.1 POTENTZIOMETRIA 160

2.1.1 Zuzeneko potentziometria 160

2.1.2 Balorazio potentziometrikoak 167

2.1.3 Potentziometria-praktikak 171

2.2 VOLTAMPEROMETRIA 175

2.2.1 Teknika voltamperometrikoak 177

2.2.2 Lanerako elektrodoak 179

2.2.3 Voltamperometria-praktikak 180

III. BLOKEA. Bereizketa-teknikak. Kromatografia

1. METODO KROMATOGRAFIKOAK: SARRERA 183

1.1 DEFINIZIOA 183

1.2 SAILKAPENA 183

1.3 KROMATOGRAFIAREN OINARRI TEORIKOAK 186

1.3.1 Kromatogramen interpretazioa 192

1.3.2 Terminologia 193

2. LIKIDO-KROMATOGRAFIA 195

2.1 FASE MUGIKORRAREN EZAUGARRIAK 196

2.2 INSTRUMENTAZIOA 199

2.2.1 Fase mugikorraren sistema 199

2.2.2 Injekzio-sistema 200

2.2.3 Zutabe kromatografikoa 201

2.2.4 Detektagailua 202

2.3 LIKIDO-KROMATOGRAFIAZKO PRAKTIKAK 208

3. GAS-KROMATOGRAFIA 218

3.1 INSTRUMENTAZIOA 218

3.2 GAS-KROMATOGRAFIAZKO PRAKTIKAK 235

IV. BLOKEA. Kuantifikazio-metodoak

1. KUANTIFIKAZIO-METODOAK: SARRERA 241

2. KANPO-KALIBRAZIOA 243

3. BARNE-ESTANDARRAREN METODOA 245

4. ADIZIO ESTANDARREN METODOA 246

BIBLIOGRAFIA 247

1. KAPITULUA

KIMIKA ANALITIKAKO LABORATEGIKO OINARRIZKO SEGURTASUN ARAUAK

1. LABORATEGIKO OHIKO MATERIALA

Edozein praktika egin aurretik, irakasle arduradunak oinarrizkoak edukiak azalduko ditu, baita esperimentu bakoitza ongi burutzeko beharrezkoak diren ezagutzak.

Laborategian arituko diren pertsonek bere funtzioaren eta helburuaren arabera diseinatuak izan diren hainbat tresna erabili beharko dituzte. Gaur egun, laborategietan lana errazago eta azkarrago egiteko baliabide berriak daude. Halere, betiko materiala erabiltzen jakitea ezinbestekoa da.

1.1 LABORATEGIKO GAILUAK

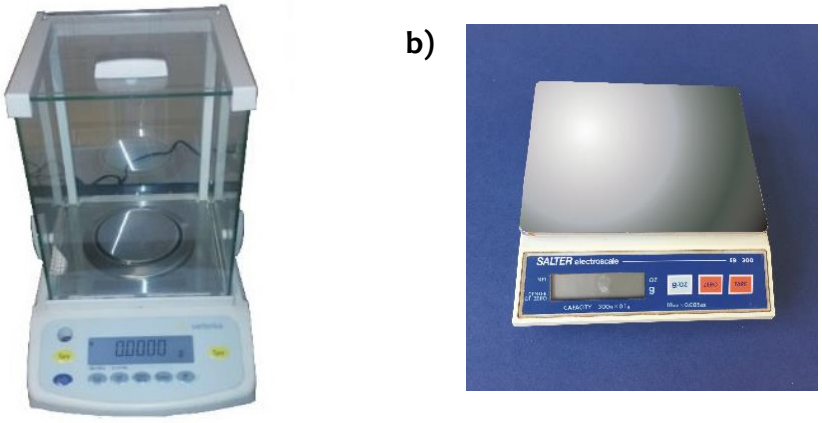
Balantza: masaren neurketarako erabiltzen den tresna.

Balantza granatarioa: Balantza honek 0.1 eta 0.001 g bitarteko ziurgabetasunarekin ematen ditu pisaketen balioak.

Balantza analitikoa. 0,1 eta 0,05 mg bitarteko ziurgabetasunarekin ematen ditu pisaketen balioak.

Pisaketa ez da inoiz balantzaren platertxoaren gainean egin behar, erloju-beira edo beirazko edukiontzi garbi eta lehorra erabiltzea ezinbestekoa da. Lehenengo, edukiontzia pisatu eta balantza zeroan jarriko da (balantzaren pantailan 0 g agertu arte itxaron). Ondoren, espatula baten laguntzarekin pisatu nahi den substantzia edukiontzira bota eta orekan dagoenean pisaketa zehatza idatziko da, balantzak ematen dituen zifra dezimal guztiekin.

a) b)



1.Irudia. (a) Lau zifra esanguratsu dituen balantza analitikoa eta (b) balantza granatarioa.

Berogailua: Termikoki isolatuta dagoen metalezko armairua da, termostato batek kontrolatzen duen erresistentzia elektriko baten bidez berotzen dena. Laborategiko materiala eta erreaktibo solidoak lehortzeko erabiltzen da.

2. Irudia. Labea.

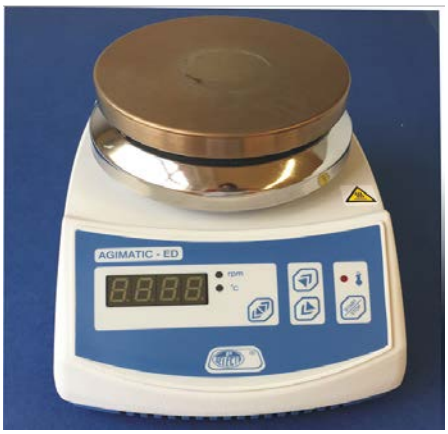
Zentrifugagailua. Biraketa bizkorrek eragindako indar zentrifugoaren bidez dentsitate desberdineko substantziak bereizteko erabiltzen den gailua da. Dentsitate desberdineko likidoak edo partikula solido eta likidoak bereizteko erabiltzen da.

3. Irudia. Zentrifugagailua.

Irabiagailu magnetikoa. Gailu honen plakaren azpian higidura zirkularra duen iman bat du, non errotazio eremu magnetikoak sortzen den. Eremu horrek irabiagailuaren gainean jartzen den barra magnetikoa mugitzen du. Irabiagailu magnetiko batzuetan tenperatura kontrolatu daiteke.

a)

b)



4. Irudia. a) Ohiko irabiagailu magnetiko eta b) tenperatura kontrolatzeko aukera duen irabiagailu magnetikoa.

1.2 BEIRAZKO MATERIALA

Beirazko materialaren barnean, material bolumetrikoa, masa neurtzeko materiala eta iragazteko materiala aurki daitezke. Beira honek oinarrizko ezaugarri batzuk bete behar ditu laborategian erabili ahal izateko: erreaktibo kimikoekiko eta kolpeekiko erresistentea izatea eta baita termikoki egonkorra izatea ere. Beira esmerilatuak beirazko pieza desberdinak lotzeko aukera ematen du.

1.2.1 BEIRAZKO MATERIAL BOLUMETRIKOA

Material hau bolumenaren neurketa zehatza egiteko erabiltzen da, besteak beste, probetak, buretak, pipetak eta matraze aforatuak. Material hau kalibratua izan denez, ezin da berotu. Probeta, pipeta eta buretak botatako bolumena neurtzen dute, matrazeak, aldiz, edukia neurtzen du.

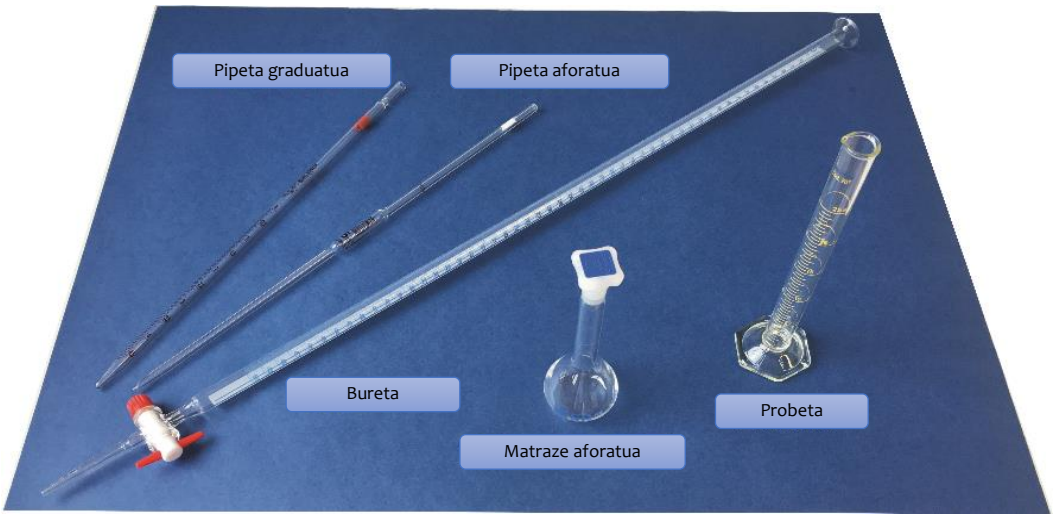
Probeta. Bolumenak neurtzeko erabiltzen den hodi itxurako ontzi luzea da. Oinarri zabala eta eskala graduatua izaten du. Likidoa meniskoa bolumen zehatz batera heldu arte isurtzen da, bolumenen neurketa ez da pipetarekin bezain zehatz neurtzen, ordea. Probeten ohiko edukiera 5,10,25,50,100,250,500 eta 1000 ml-koa da.

Bureta. Beirazko hodi luze eta fina da, diametro berekoa hodiaren puntu ezberdinetan. Mililitro edo mililitro-hamarrenetan graduatua dago eta azpiko muturrean giltza bat izaten du.

Pipeta. Likidoen bolumen zehatzak neurtzeko erabiltzen den material bolumetrikoa da. Bi muturrak irekiak dituen hodia da, muturretako batek kono-itxura izanik. Behe-muturra likidoan sartu eta goi-muturretik xurgatuko da. Goiko muturra itxita dagoelarik, bolumen zehatzak ontzi batetik bestera eramateko erabiltzen da.

Pipeta graduatuak buretaren antzekoak dira, baina giltza gabekoak. Kalibrazio-markak dituenez, nahi den bolumena gehitzeko erabiltzen dira. Pipeta aforatuak, aldiz, bolumen zehatzak isurtzeko erabiltzen dira soilik. Marka bakarra dute, goialdean kokaturik dagoena, erdialdean, aldiz, zabalgune bat dute bolumen handiak hartu ahal izateko. Xurgagailuak erabiliz goialdeko markaraino bete behar izaten dira.

Matraze aforatuak. Hodi-formako estugune batez amaitzen diren eta hondo laua duten ontzi esferiko, koniko edo obalatuak dira. Estugunean kalibrazio-marka bakarra izaten du, likido edo disoluzio bolumen finkoak neurtzeko. Kontzentrazio ezaguneko disoluzioak prestatzeko erabiltzen dira.



5. Irudia: Beirazko material bolumetrikoa.

1.2.2 BESTELAKO BEIRAZKO MATERIALA

Pisaketak, iragazketak eta lehorketak egiteko bestelako beirazko materiala erabiltzen da: Hauspeatze-ontziak, erlenmeyer matrazea, kitasato matrazea, erloju-beira, inbutua, lehorgailua, etab.

Hauspeakin-ontzia. Zilindro-forma eta hondo laua duen ontzia da, goiko ertzean likidoak isurtzeko koska bat duelarik. Likidoak eduki edo nahasteko erabiltzen da, baina ez du bolumenen neurketa zehatza egiteko balio. Ohiko edukierak 50, 100, 250, 500 eta 1000 ml dira.

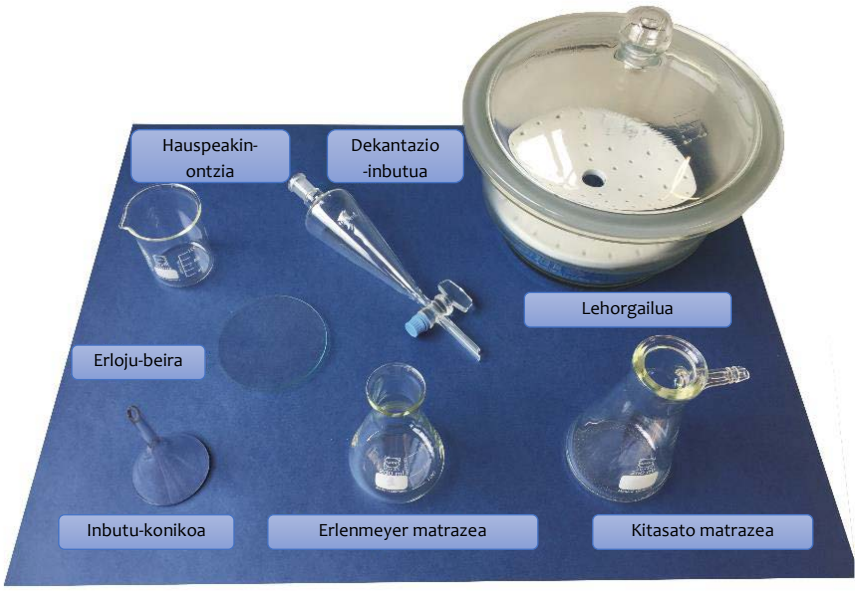
Erlenmeyer matrazea. Beirazko edukiontzia da, hondo laua eta zilindro-formako ahoa duena. Balorazioak egiteko erabiltzen da.

Kitasato matrazea. Erlenmeyer matraze mota bat da, baina goialdean beirazko hodi-itxurako irtenune bat du. Büchner inbutuarekin batera, hutsean iragazteko erabiltzen da.
Erloju-beira. Ahur-forma duen beirazko lamina biribila da. Likidoak lurruntzeko, solidoak pisatzeko edo hauspeakin-ontziak estaltzeko erabiltzen da.

Inbutu konikoa. Atal koniko batez eta hodi luze batez osaturik dagoen tresna da. Likidoak aho estuko ontzietan isuri gabe sartzeko erabiltzen da.

Dekantazio-inbutua. Nahastezinak diren bi likido bereizteko erabiltzen den inbutua da. Kono-forma du eta azpiko muturrean giltza bat izaten du. Goialdean duen zulotik, tapoi batekin ixten dena, likidoa barrura sar daiteke.

Lehorgailua. Beirazko edukiontzia da, tapak ertz esmerilatuak dituena hermetikoki itxi dadin. Barnean lehortzaile bat sartzen da barruko atmosferak hezetasunik izan ez dezan. Zerbaiti hezetasuna kentzeko edota produktu eta substantziak hezetasunetik babesteko balio duen tresna da.



6. Irudia: Bestelako beirazko materiala.

1.2.3 BESTELAKO LABORATEGIKO MATERIALA

Laborategian portzelanaz, plastikoz, gomaz edo burdinez egindako materialak erabiltzen dira:

Flasko ikuzlea. Botila-forma duen plastikozko botila da eta tapak estutzean ura ateratzen uzten hodi bat dauka.

Portzelanazko kapsula. Ertz batean mutur bat duen esferaerdiko edukiontzia.

Koilara-espatula. Produktu kimiko solidoak hartzeko erabiltzen den metalezko koilaratxoa.

Xurgatzaileak. Likidoak pipetarekin xurgatzeko eta botatzeko erabiltzen diren eskuzko pipeteatzaileak.

Büchner inbutua. Hutsean iragazteko erabiltzen den inbutua, portzelanazkoa gehienetan.

Motrailua. Motrailu-esku batekin solidoak birrintzeko erabiltzen den ahur-forma duen edukiontzia. Beirazkoa, agatazkoa edo portzelanazkoa izan daiteke.

Euskailua. Laukizuzen formako oina duen euskarria, non buretak, inbutuak edo bestelako materiala eusteko barra bat kokatzen den.

Irabiatzeko barra magnetikoa. Disoluzioak nahasteko erabiltzen den eta teflonez estalita dagoen barra magnetiko txikia.

7. Irudia. Bestelako laborategiko materiala.

8. Irudia. euskarria eta pintzak.

1.2.4 MATERIALAREN GARBIKETA

Lortzen diren emaitzak fidagarriak izan daitezen, lan-mahaia eta material guztia garbia egon behar da. Materiala garbitzeko hurrengo prozedura jarraitzea gomendatzen da: lehenengo, hondakin solidoak espatularekin kendu behar dira; ondoren, disolbatzaile egokiarekin garbituko da. Ohikoena iturriko urarekin eta, ondoren, ur desionizatuarekin garbitzea da. Noizean behin, zenbait hondakin garbitzeko, azidoak, baseak edo disolbatzaile organikoak

erabili daitezke. Materialaren garbiketa erabili bezain laster egitea gomendagarria da, hondakinak garbitzea errazagoa baita.

Materiala lehorra egon behar bada, pisaketa bat egiteko, horretarako, berogailuan lehor daiteke. Kontuz! material bolumetrikoa ez da inoiz berogailuan sartu behar. Berehala lehortzea beharrezkoa bada, etanol eta azetonarekin garbitu daiteke, edo neurtu behar den disoluzioarekin hiruzpalau aldiz homogeneizatu.

1.3 ERREAKTIBOAK

Analisien zehaztasuna bermatzeko, ezinbestekoa da erreaktiboen purutasuna aintzat hartzea. Laborategian mota desberdinetako erreaktiboak aurkitu daitezke: solidoak, likidoak edo prestatutako disoluzioak. Gainera, produktu bera kalitate desberdinetako erreaktibo bezala merkaturatu daiteke. Horregatik guztiagatik, erreaktiboaren kalitatea egingo den erabileraren arabera aukeratzea funtsezkoa da.

1.3.1 ERREAKTIBO MOTAK

Erreaktiboak purutasun mailaren arabera sailkatu daitezke:

Kimikoki purua (QP). Erreaktibo maila duten produktuak baino kalitate baxuagokoak izendatzeko erabiltzen den kalitate-maila.

Farmazian eta elikagaietarako erabilgarria (USP). Erreaktiboak *United States Pharmacopea* (USP) erakundeak osasunerako kaltegarriak diren ezpurutasun mugak betetzen ditu.

Analisirako erreaktiboa (PA). Erreaktiboaren ezpurutasunen edukiak ez du analisirako metodoek determina ditzaketen ezpurutasun kopuru minimoa gainditzen. Orokorrean %99ko purutasuna dute, hezetasuna kontuan izan gabe.

Erreaktibo analitikoa (ACS). *Americal Chemical Society* erakundeak ezarritako estandarrak betetzen ditu. Espektroskopia, kromatografia eta mikroskopiarako erreaktiboak izan daitezke.

HPLC maila (High Performance Liquid Chromatography). Purutasun maila altuena da eta kromatografia likidoan erabiltzeko egokiak dira.

Patroi primarioa. Patroi edo estandar primario bat purutasun eta egonkortasun handiko konposatua da eta erreferentziazko material bezala erabiltzen da metodo bolumetrikoetan. Metodo hauen zehaztasuna patroi primarioaren propietateen menpe dago. Patroi primario batek hurrengo baldintzak bete behar ditu:

1. Purutasun handiko erreaktiboa izan behar da (≥%99,9).
2. Egonkorra izan behar da giro tenperaturan. Biltegiratzeko baldintza normaletan ez da degradatu behar. Ez da oxidatu behar eta ez du karbono dioxidoarekin erreakzionatuko. Ez da higroskopikoa izan behar, baina atmosferatik ura xurgatuz gero, erreaktiboa lehortzea beharrezkoa da, eta, hori dela eta, berotan eta hutsean egonkorra izan behar da.
3. Ez du hidratazio molekularik izan behar, bere konposizioa hezetasun erlatiboaren aldaketekin aldatu ez dadin.
4. Ezpurutasun maila %0.01-0.02 baino txikiagoa izan behar da.
5. Lortzeko erraza eta merkea izan behar da.
6. Balorazioa egingo den ingurunean disolbagarritasun egokia izan behar du.
7. Masa molar altua izan behar du, pisaketan egin daitezkeen erroreak minimoak izan daitezen.
8. Baloragaiarekin azkar eta estekiometrikoki erreakzionatu behar du, balorazioaren azken-puntua zehaztasun handiagoarekin ikus dadin.

Gutxi dira baldintza horiek betetzen dituzten substantziak, eta gehien erabiltzen direnak hurrengo hauek dira:

- Sodio karbonatoa
- Borax-a
- Potasio biftalatoa
- Azido oxalikoa
- Potasio iodatoa
- Potasio dikromatoa
- Sodio oxalatoa

Ur desionizatua. Kimika Analitikako laborategietan kalitate handiko ura erabili behar da emaitza zehatzak lortzeko. Ikasleen laborategian ur desionizatua erabiltzen da, non ioi-elkartruke bidezko prozesu baten bidez katioi eta anioiak erauzi diren.

1.3.2 ERREAKTIBOEN ERABILERA

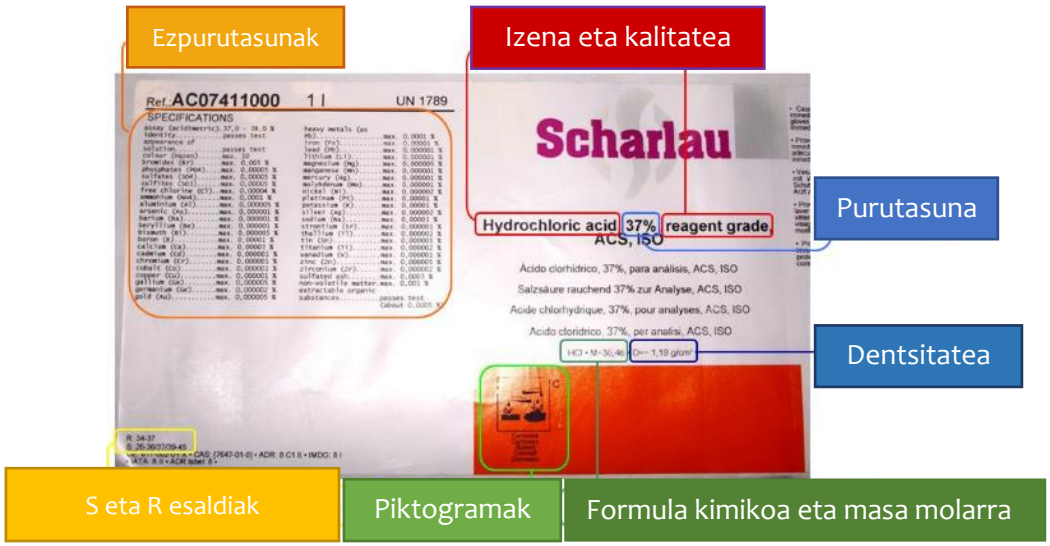
Erreaktiboak erabiltzen direnean, behar diren neurriak hartu behar dira ustekabeko kutsadura gerta ez dadin:

- Erreaktiboaren purutasun maila egokia aukeratu.
- Beharrezkoa den erreaktiboa hartu ostean, ontzia berehala itxi.
- Soberan dagoen erreaktiboa ez da inoiz ontzira bueltatuko.
- Zabalik dauden ontziak ura edo beste likido batzuekin kutsatu daitezkeen lekuetatik urrundu.
- Erori den erreaktiboa edo zipriztinak berehala garbitu.

1.3.3 ETIKETAK

Erreaktiboen ontzien etiketak produktuaren izena eta kalitatea, formula eta pisu molekularra, purutasuna eta ezpurutasunak, dentsitatea erreaktibo likidoetan eta arriskuei buruzko informazioa jaso behar ditu.

9. Irudia: Erreaktibo solido baten etiketa.



10 Irudia. Erreaktibo likido baten etiketa.

1.3.4 Arriskuen piktogramak

Erreaktiboen ontzietan horien arriskuari buruz informazioa ematen duten piktogramak izaten dituzte.

Korrosiboa: Produktu hauen kontaktuak ehun biziak eta zenbait material deuseztatzen ditu. Ezin dira lurrunak arnastu behar, eta larruazalarekin, begiekin eta arropekin kontaktua izatea ekidin.

Lehergaia: Zenbait egoeratan substantzia hauek lehertzeko propietatea dute. Talkak, astinduak, marruskadura, txinpartak, sua eta bero-iturriak saihestu behar dira.

Erregarria: Material sukoien su-hartzea faboratu dezakete erreakzio exotermiko bortitzak ematen baitituzte. Material sukoiekiko kontaktua ekidin behar da.

Sukoia: Giro-tenperaturan eta kanpoko energia iturririk gabe edo substantzia sukoien eraginez sua hartzeko joera duten substantziak dira. Sugar-iturria baztertzen denean ere sutan jarraitu dezake. Material ignitiboekin kontaktua saihestu behar da (ura, airea).

Gasa: Gas hauek ontzi baten barnean daude, 200 kPa-eko edo hortik gorako presioan, edota likidotuak edo likidotu eta hoztuak egon daitezke. Ontziak beroarekin eztanda egin dezake. Ez da sutara bota behar.

Kaltegarria arnastu, irentsi edo larruazalarekin kontaktuan jarriz gero.

Larruazal-narritadura: Larruazal-bidez xurgatzen denean osasunarentzat arrisku larria, akutua edo kronikoa ekar dezake. Giza gorputzarekin kontaktua saihestu behar da.

Toxikoa: Arnastu, irentsi edo larruazalarekin kontaktuan jarriz gero, lesio larriak, baita heriotza ere, ekar dezake. Gorputzarekin kontaktua izatea saihestu behar da.

Osasunarentzat arriskutsua: Arnastu, irentsi edo larruazalarekin kontaktuan jarriz gero arrisku larria edo akutua ekar dezake. Gorputzarekin kontaktua eta arnasketa ekidin behar da.

Ingurumenerako arriskutsua: Epe laburrean edo luzean ingurumenean kalteak sor ditzake. Ekar ditzakeen arriskuak direla eta, ez da hoditeriara, lurrera edo ingurunera isuri behar.

1.4 LABORATEGIKO KOADERNOA

Laborategiko koadernoak momentu jakin batean egin zena jasotzea du helburu, egindakoa ondoren ulertu eta, beharrezkoa bada, errepikatua izan dadin.

Laborategiko koadernoa etengabe erabiltzen den lan-tresna bat da. Koadernoa erabiltzean, ikaslea esperimentuetan lortutako datuak eta behatutako guztia idaztera ohituko da. Esperimentuak bikoteka egiten badira, partekatzen diren datuak berdinak izan arren, behaketa eta interpretazioa desberdina izan daitezke.

Hortaz, laborategiko koadernoa ikasleak egin duen lan praktiko guztiaren erregistroa izango da. Idazteko ezabaezina den boligrafoa erabiliko da, eta akatsak egiten badira, marra bat marraztuko da gainetik oker dagoena ikus dadin.

Laborategiko praktika hasi aurretik, koadernoan hurrengo informazioa jartzea komeni da: esperimentuaren titulua, data, helburua, prozesuan ematen diren erreakzioen formulazioa, erreaktiboen datu aipagarriak (masa molarra, dentsitatean, purutasuna, segurtasun-neurriak, etab.), prozeduraren laburpena eta bibliografia.

Praktika hasten denean, esperimentua errepikatu ahal izateko beharrezkoa den informazio guztia jasoko da: disoluzioak prestatzeko kalkuluak, erreaktibo bakoitzetik erabili den bolumen edo masa zehatza, benetan jarraitu den prozedura, emaitzak, lortutako berreskurapena, erroreak (zifra esanguratsuak ongi adieraziz), ondorioak eta oharrak.

Datu esperimentalak grafiko edo taulen bidez aurkeztu daitezke, eta datu guztien unitateak jarri behar dira.

Neurketa baten balio erreala ezagutzeko, gutxieneko neurketa kopuru bat egingo da (3 gutxienez). Analisi estatistikoaren bidez datu esperimentalen xehetasuna kalkulatuko da. Emaitzen aldagarritasunak banaketa normala jarraitzen dutela kontuan izanik, desbiderapen estandarra datuen dispertsioa adieraziko du. Hortaz, emaitza esperimentalak emateko batezbestekoa eta konfiantza-tartea kalkulatuko dira.

1.5 LABORATEGIKO LANERAKO ETA SEGURTASUN ARAUAK

1.5.1 LABORATEGIKO LANERAKO ARAUAK

Ikasleek laborategira derrigorrezkoa den materiala ekarri behar dute (mantala, segurtasun betaurrekoak, laborategiko koadernoa). Egun horretan egotziko zaion praktikaren gidoia aldez aurretik irakurri beharko du.

Ikasleak praktika burutzeko behar duen material guztia bere lanpostuan izango du. Elkar-erabiltzeko materiala, erreaktiboak eta disoluzioak kokapen zehatz bat izango dute laborategian eta erabiltzen bukatutakoan leku berean utzi beharko dira.

Ikasleek laborategitik irakasleak esaten duenean edo segurtasun arauek horrela agintzen dutenean aterako dira.

Praktika burutzen denean, ikasleak irakasleari lortu dituen emaitzak erakutsiko dizkio. Irakasleak praktika bukatutzat jotzen duenean, ikasleak material guztia garbitu eta lanpostua txukundu beharko du. Beirazko material garbia iragaz paperaren gainean utziko da. Materiala hondatzen edo apurtzen bada, irakaslea ohartarazi behar da material berria jar dezan.

A) SEGURTASUN ARAUAK

- Laborategian erabiliko diren lan-prozedurak dauden baliabideei egokituko dira, beti ere arriskuak saihestuz eta ingurumena errespetatuz.
- Laborategiko praktikak irakasle batek gainbegiratuko ditu eta arriskuan aintzat hartzen duen protokolo bat jarraituko da (Farmazia Fakultateko laborategietan aritzeko arau orokorrak). Aldez aurretik, irakasleak protokoloa azalduko du.
- Laborategian suteak, leherketak, intoxikazioak edo erredurak gerta daitezke, eta horien ondorioak kontrolatzeko beharrezkoak diren baliabideak eskuragarri egon behar dira.
- Erreaktibo bat erabili aurretik segurtasun piktogramak irakurtzea gomendagarria da behar diren neurriak hartzeko. Disoluzioak astintzen edo irabiatzen direnean, zipriztinak saihestu behar dira. Azidoen manipulazioak arreta berezia behar du, kontu handiz eta kanpaian erabili behar dira. Azidoen diluzioak egitean, ez da ura azidoaren gainean bota behar, beti azidoa uraren gainean isuriko da.
- Arduraz jokatu behar da, ez da ezer egin behar irakaslearen baimenik edo gainbegiradarik gabe. Laborategian lasai eta txukun lan egitea komeni da, kideen lana oztopatu gabe.

Segurtasun arau nagusia egin beharrekoak sor ditzakeen arriskuak ezagutzea eta arriskutsua izan daitekeen zerbait ez egitea da.

B) LABORATEGIKO SEGURTASUN BALIABIDEAK

Norbera babesteko ekipamenduak. Lanean segurtasunari edo osasunari mehatxu egin diezaiokeen arriskuetatik babesteko langileak eutsi edo aldean eraman beharreko edozein ekipamendu.

Eskularruak. Korrosiboak, narritagarriak, toxikotasun handikoak edo larruazal-bidez xurgatzen diren substantziak manipulatzeko erabiliko dira. Eskularru mota produktuen ezaugarri eta segurtasun-fitxen arabera aukeratuko da.

Segurtasun-betaurrekoak. Zipriztinak sor daitezkeenean erabiliko dira.

Maskara. Toxikotasun handiko substantzia lurrunkorrak manipulatzen direnean erabiliko da eta substantzia bakoitzarentzat egokiak eta homologatuak izan direnak aukeratuko dira.

Dutxa eta begiak garbitzeko iturria. Laborategiek substantzia kimiko arriskutsu eta toxikoekin istripuak izan ondoren garbitzeko dutxa eta begiak garbitzeko iturriak daude. Dutxa zabaltzeko, kableari konektatuta dagoen plakatik tira egin. Garbitzen denbora asko pasa behar da, 15 minutu inguru. Begiak garbitzeko iturriek bi begiak eta aurpegia garbitzeko bi iturri dituzte eta eskuaren presioa egitean zabaltzen den balbula bat. Begietan jasotako zipriztinak azkar eta modu eraginkorrean garbitzeko aukera ematen dute, kontaminazioa kenduz. Ura ez da zuzenean begi globora bota behar, sudurraren oinarrira baizik. Presio baxuarekin erabili, minik ez egiteko eta materiala berriro begietan sar ez dadin. Betazalak irekiarazi behar dira, betazalen osteko garbiketa ere segurtatzeko.

11. Irudia. Dutxa eta begiak garbitzeko iturria

Ke-erauzgailua. Azido, base edo disolbatzaileekin lan egitean sortzen diren baporeak kanporatzen dituen kanpaia da, laborategiko atmosferaren kutsadura saihesten duena. Beti kanpaiko leihoa itxita dagoela lan egin behar da mugimendu zakarrak saihestuz, eta erreaktiboak 20-25 cm-tara kokatuko dira.

12 Irudia: Ke-erauzgailua.

Su-itzalgailuak. Ikasleen laborategian karbono dioxido (B) eta ABC hautseko bi su-itzalgailu daude.

Suaren kontrako manta. Sute hasiberri eta txikiak itzaltzeko diseinatu diren mantak dira. Suaren gainean jartzean oxigeno ezak sua itzaltzen du. Su-itzalgailuak ez bezala, pertsonetan erabili daitezke.

Hondakinen edukiontziak. Praktikak garatzean sortzen diren hondakinak botatzeko edukiontziak dira. Hondakinen edukiontziak etiketatuta daude hondakinaren arabera: disolbatzaile organiko halogenatuak, ez-halogenatuak, disoluzio azido ez-organikoak, disoluzio basiko ez-organikoak eta hondakin solidoak (adsorbatzaile eta beira).

13. Irudia: Hondakinen edukiontziak.

Isurketen adsorbatzaileak. Laborategian substantzia sukoiak (rotisorb), azidoak (pyracisorb) eta basikoak (basosorb) jasotzeko adsorbatzaile solidoak daude.

14. Irudia. Isurketen adsorbatzaileak.

Botikina. Laborategiko botikina sintoma edo asaldura arinak tratatzeko sendagai eta material sanitarioa dauka (zauriak sendatzeko materiala, antiseptikoak, antiinflamatorioak, antipiretikoak, etab.).

1.6 FARMAZIA FAKULTATEKO LABORATEGIETAN ARITZEKO ARAU OROKORRAK

Laborategian lanean hasi aurretik hurrengo segurtasun elementuen kokapena eta erabilera ezagutu behar da:

- ✓ Laborategiko irteerak eta larrialdietako irteerak.
- ✓ Su-itzalgailu, mangerak, suteen kontrako mantak, are ontziak, dutxak eta begiak garbitzeko dutxak.
- ✓ Hondakinentzako ontzien kokapena.

Norbera babesteko ekipamendua:

- ✓ Mantalaren erabilera derrigorrezkoa da eta lotuta eraman behar da.
- ✓ Segurtasun-betaurrekoak, maskara eta eskularruak derrigorrezkoak dira pertsonen segurtasunean edo osasunean eragina izan dezaketen produktu edo materialak erabiltzen direnean.

Jokabide arauak:

- ✓ Lehenengo aldiz lanean arituko den pertsonalari, larrialdietako plana, erabiliko dituen produktu eta instalazioen arriskua eta lan arauak azaldu behar zaizkio.
- ✓ Laborategian bakarka lan egitea debekatuta dago, bereziki lan-orduetan ez denean edo lan arriskutsuak direnean.
- ✓ Laborategian ezin da erre, jan edo edan.
- ✓ Laborategiko hozkailu eta izozkailuetan bakoitzaren kontsumorako jakiak edo edariak gordetzea debekatuta dago.
- ✓ Produktu kimiko edo biologikoak ezin dira eskuekin ukitu.
- ✓ Esperimentu baten ostean eta laborategitik irtetzean eskuak garbitu behar dira.
- ✓ Ilea lotuta eraman behar da.
- ✓ Lentillak, minifalda, praka motzak, pantyak, sandaliak edo loturarik gabeko kalotxak ez janztea gomendatzen da.
- ✓ Eskumuturrekoak, eraztunak, belarritakoak, mahuka zabalak ez eramatea gomendatzen da.
- ✓ Ezin dira esperimentu berriak egin laborategiko arduradunaren baimenik gabe.

Lanpostuaren egoera:

- ✓ Lanpostua garbi eta txukun egon behar da.
- ✓ Mahaiaren gainean ezin dira gauza pertsonalak utzi (liburuak, poltsak, berokiak, etab.)
- ✓ Produktu bat isurtzen denean berehala batu behar da neurri aproposak hartuz.

Produktu kimiko eta biologikoen erabilera:

- ✓ Pipeta ez da ahoarekin erabili behar, horretarako dauden tresnak erabili behar dira.
- ✓ Pipeta ez da erreakzioa ematen den ontzian sartu behar.
- ✓ Poltsikoetan ezin da beirazko materiala eraman ezta produktu kimiko edo biologikoak ere.
- ✓ Bapore toxiko, korrosibo, narritagarri edo negar-eragileak sortzen dituzten produktuak erauzgailuetan erabili behar dira.
- ✓ Produktu toxiko edo korrosiboak erabiltzeko eskularruak erabili behar dira.
- ✓ Lagin biologikoekin lan egiteko, ekipamendu egokia erabili behar da.
- ✓ Usainak ez dira zuzenean identifikatu behar.

Likidoen beroketa.

- ✓ Guztiz itxita dauden ontziak ezin dira berotu.
- ✓ Saiodia berotzean, honen ahoa ez da lanean dauden beste kideengana zuzendu behar, ezta norberarengana ere.
- ✓ Aurpegia berotzen ari garen ontzitik urrun mantendu behar da.
- ✓ Berotzen ari garen likidoak irakin behar badu, ontzian beirazko edo portzelanazko bolak sartu beharko dira zipriztinak sortu ez daitezen.
- ✓ Likidoa sukoia bada, ezin da erregailurik erabili.

Identifikazioa:

- ✓ Erabiltzen diren produktu guztiak ongi etiketatuak egon behar dira.
- ✓ Produktu bat erabili aurretik etiketa eta segurtasun fitxa ondo irakurri behar da, erabili nahi den produktua hori dela ziurtatuz.
- ✓ Laborategian prestatutako disoluzioak etiketatu behar dira.

Materialaren garbiketa:

- ✓ Materiala behin erabili ezkero garbi eta txukun utzi behar da.
- ✓ Materialaren garbiketa laborategiko arauen arabera egingo da.
- ✓ Material bolumetrikoa (pipetak, matrazeak, etab.), plastikozko materiala eta beirazko giltzak dituen materiala ezin da berogailuetan sartu.

Hondakinak:

Hondakinak botatzeko, laborategian ontzi bereziak egon behar dira:

- ✓ Papera eta kartoia (fakultateko pasilloetan)
- ✓ Hondakin solido inerteak (zakarrontzia)
- ✓ Hondakin solido kutsatuak
- ✓ Gauza zorrotzak.
- ✓ Disolbatzaile organiko kloratu eta ez kloratuen ontziak.
- ✓ Hondakin biologikoak.

Fakultateak laborategietan sortzen diren hondakinak kudeatzeko dituen zerbitzuak:

- ✓ Hirugarren solairuan disolbatzaile kloratu eta ez kloratu, hondakin kimiko solido eta olioen biltegia dago.
- ✓ Farmazia eta Teknologia Farmazeutiko sailean eta Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia sailean hondakin biologikoak botatzeko ontziak daude.

Istripuren bat gertatzen denean:

- ✓ Lasaitasuna mantendu
- ✓ Larrialdietako planaren fitxa jarraitu

2. KAPITULUA

PROGRAMA ESPERIMENTALA

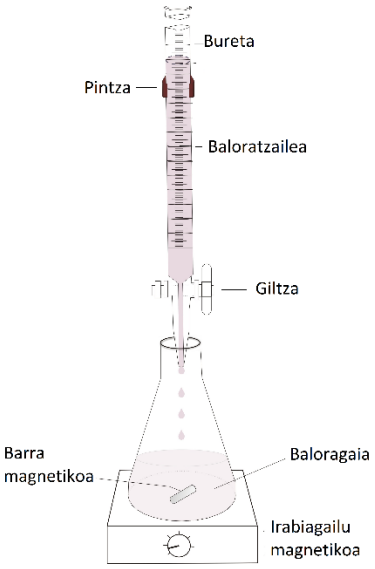
I BLOKEA ANALISI-METODO KLASIKOAK

1. SARRERA

1.1 OROKORTASUNAK

Balorazioak, edo titulazioak, analisi kimiko kuantitatiboan tradizio handia duten metodo analitikoak dira.

Balorazioa erreakzio kimiko (balorazio-erreakzioa) batean oinarritzen den teknika analitikoa da. Helburua lagin batean dagoen substantzia baten (analitoa) kantitatea edo kontzentrazioa determinatzea da eta horretarako analitoarekin erreakzionatuko duen beste substantzia baten (baloratzailea) kantitate jakin bat gehitu behar da. Analito guztiak baloratzailearekin noiz erreakzionatu duen (azken-puntua) ezagutzeko, beharrezkoa da substantzia edo sistema adierazle bat erabiltzea. Analitoarekin erreakzionatu duen baloratzaile kantitatea ezagutzen denean, eta erreakzioaren estekiometrian oinarrituta, laginak duen analito kantitatea kalkulatzea erraza da. Gehienetan, analito kantitatea kalkulatzeko, erreakzioa burutzeko erabili den baloratzailearen bolumen zehatzaren neurketa egiten da eta kasu horietan balorazioari *bolumetria* deritzo.



1. Irudia. Balorazio bat egiteko beharrezkoa den materiala.

Kimika Analitikoan erabiltzen diren balorazio bolumetriko desberdinak hurrengo erreakzioetan dute beraien oinarria:

- Azido-base balorazioak azido-base erreakzioetan oinarritzen dira, eta azido eta base baten artean ematen dira.
- Konplexuen bidezko balorazioak konplexuen formazio-erreakzioetan oinarritzen dira, eta erreakzioa baloratzaile (ligando edo estekatzaile) eta determinatu behar den ioiaren artean ematen da.
- Hauspeatze-balorazioak hauspeatze edo prezipitazio erreakzioetan oinarritzen dira, non erreakzioaren ondorioz fase solido bat sortzen den.
- Erredox-balorazioak oxidazio-erredukzio erreakzioetan oinarritzen dira, non sustantzia oxidatzaile eta erreduktoreen artean elektroiak elkartrukatzen diren.

Balorazio-erreakzio batek baldintza batzuk bete behar ditu emaitza analitiko fidagarriak modu erraz eta azkar batean lortzeko:

- Erreakzioa estekiometrikoa izan behar da, hau da, zehatz-mehatz definitu diren koefizienteen arabera eman behar da.
- Erreakzioaren oreka konstantea handia izan beharra dauka erreakzioa ahalik eta kuantitatiboen izan dadin.
- Erreakzioa azkarra izan behar da, erreakzio adizio berria egin baino lehen burutu dadin.
- Balorazioaren azken puntua erraz detektatu behar da, eta adierazle kimikoak edo sistema instrumentalak erabili daitezke.
- Balorazioa sistemara erreakzioan parte hartzen duten sustantzien kantitate baliokideak (estekiometrikoak) gehitzean burutu behar da, analitoaren kantitatearen kalkulua zuzena izan dadin.

Baliokidetasun-puntua (edo estekiometrikoa) analitoarekin estekiometrikoki erreakzionatzeko beharrezkoa den baloratzaile kantitate zehatza gehitu denean lortzen da. Halere, praktikan, balorazioa sistema-adierazleak disoluzioaren propietate fisiko baten aldaketa adierazten duenean amaitzen da eta puntu horri **azken puntua** deritzo.

Azken puntuaren **sistema adierazleek**, analito guztiak noiz erreakzionatu duen jakitea ahalbidetzen dute, eta kimikoak edo instrumentalak izan daitezke. Adierazle kimikoak balorazio erreakzioan parte hartzen duten sustantziak dira eta azken puntura heltzean bistaz hauteman daitekeen aldaketa bat ematen dute (kolore aldaketa, prezipitatu baten formazioa, etab.). Adierazle instrumentalak disoluzioaren magnitude fisiko-kimiko baten neurketan oinarritzen dira (pHa, potentziala, etab.) azken puntuaren determinaziorako.

Balorazioaren kuantitatibotasuna: Baliokidetasun edo azken-puntuan erreakzionatu gabe gelditzen den analitoaren eta horren hasierako kontzentrazioaren arteko diferentzia hasierako kontzentrazioaren %n denean, balorazioaren kuantitatibotasuna %n izango da. Balorazio bat kuantitatiboa dela esaten da kuantitatibotasuna ≥%99,9 bada. Orokorrean, erreakzioa zenbat eta kuantitatiboagoa izan, baliokidetasun-puntua zehaztasun handiagoarekin determinatuko da.

$$\text{Kuantitatibotasuna}=\frac{C_h-C_{a.p.}}{C_h}\text{x}100 \geq \%99.9 \qquad (1)$$

non C_h analitoaren hasierako kontzentrazioa eta $C_{a.p.}$ analitoaren kontzentrazioa azken puntuan diren.

Balorazioaren erroreak, aldiz, azken puntuan erreakzionatu gabe gelditu den analito portzentajea edo frakzioa adierazten du:

$$\text{Balorazioaren errorea}=\frac{C_{a.p.}}{C_h}\text{x}100 \quad \leq \%0.1 \qquad (2)$$

Adierazlearen errorea baliokidetasun-puntuaren eta azken puntuaren artean ematen den diferentzia da. Azken puntura heltzeko adierazlea eta baloratzailearen artean eman daitekeen erreakzioaren ondorioz gertatzen da:

$$\text{Adierazlearen errorea}=\frac{|C_{b.p.}-C_{a.p.}|}{C_h}\text{x}100 \quad \leq \%1 \qquad (3)$$

non C_h analitoaren hasierako kontzentrazioa, $C_{b.p.}$ analitoaren kontzentrazioa baliokidetasun-puntuan eta $C_{a.p.}$ analitoaren kontzentrazioa azken puntuan diren. Adierazlearen errorea ≤%1 izatea gomendatzen da.

1.2 DISOLUZIO ESTANDARRAK

Disoluzio estandar bat erreaktibo baten disoluzioa da eta bere kontzentrazioa zehatz-mehatz ezagutzen da. Disoluzio estandar bat analisi bolumetrikoetan baloratzaile gisa erabili ahal izateko hurrengo baldintzak bete behar ditu:

- Egonkorra izan behar da, bere kontzentrazio zehatzaren kalkulua behin burutzea nahikoa izan behar da.
- Analitoarekin azkar erreakzionatu behar du baloratzailearen adizioen arteko denbora-tartea murriztu dadin.
- Analitoarekin guztiz erreakzionatu behar du azken puntua argi antzeman dadin.
- Baloratzailearen eta analitoaren arteko erreakzioa selektiboa eta ekuazio sinple batean oinarritu behar da.

Disoluzio baloratzailea prestatzeko estandar analitiko primario edo **patroi primario** bat erabili behar da. Patroi edo estandar primario bat purutasun handiko konposatua da eta erreferentziazko material bezala erabiltzen da metodo bolumetrikoetan. Metodo hauen zehaztasuna patroi primarioaren propietateen menpe dago eta honek 1.3.1 atalean aipatu diren ezaugarriak izan behar ditu.

Patroi primario bat erabiltzeko aukerarik ez dagoenean **patroi sekundario** bat erabil daiteke, zeina patroi primario batekin baloratu baitaiteke. Sarri erabiltzen diren baloratzaile asko, hala nola HCl-a, ez dute patroi primario izateko kalitatezko erreaktiborik. Horren ordez, gutxi gorabeherako kontzentrazioa duen HCl disoluzioa prestatu daiteke eta patroi primario batekin baloratu bere kontzentrazioa zehatz-mehatz ezagutzeko. Prozesu honi **estandarizazioa** deritzo eta behin baloratzailearen kontzentrazio zehatza kalkulatu denean, **disoluzio estadarizatu** bat dela esaten da.

1.3 BALORAZIO MOTAK

Balorazioaren helburua analitoaren kontzentrazioa edo kantitatearen determinazioa da. Orokorrean **balorazio zuzen** batean, analitoa Erlenmeyerrean jartzen da adierazlearekin eta balorazioa egoki burutzeko beharrezkoak diren beste disoluzio batzuekin batera (adibidez, disoluzio indargetzaile bat).

Noizbehinka, **atzerako balorazioa** egitea beharrezkoa izaten da, non analitoaren disoluzioari disoluzio estandarra behar baino gehiago gehitu eta erreakzionatu gabe gelditu den erreaktiboa bigarren erreaktibo estandar batekin baloratzen den. Atzerako balorazioa, balorazio zuzenak baino azken puntu argiagoa duenean edo erreakzioa eman dadin erreaktiboa soberan gehitzea beharrezkoa denean erabiltzen da.

Hirugarren balorazio mota bat **zeharkako balorazioa** da, non analitoak ez duen baloratzailearekin zuzenean erreakzionatzen. Prozedura honetan analitoak beste erreaktibo

batekin estekiometrikoki erreakzionatu eta sortzen den erreaktiboa baloratzailearekin baloratzen da.

1.4 BALORAZIO-KURBAK

Balorazio-kurba erreaktiboen kontzentrazioarekin erlazionatzen den aldagai nagusi baten (pH, potentziala, absorbantzia, etab.) eta gehitutako bolumenaren irudikapen grafikoa da. Aldagai nagusiaren eta erreaktiboen kontzentrazioaren arteko erlazioaren arabera, bi motatako kurbak lor daitezke: kurba linealak (dentsitate optikoa, konduktantzia, neurketa anperometrikoak, etab.) eta kurba sigmoidalak (aldagai nagusia eta erreaktiboak funtzio logaritmiko baten bidez erlazionatzen dira, hala nola pH-a edo potentziala).

Adierazle kimikoak erabiltzen direnean ere gomendagarria da balorazio-kurba teorikoak irudikatzea, horietan oinarrituz balorazioaren zehaztasuna balioztatu, adierazle egokiena aukeratu edo baldintza esperimentalak ezarri daitezke. Kurba teoriko hauen aldagaiak disoluzioaren parametro aldakor bat (pHa adibidez) eta baloratutako frakzioa dira.

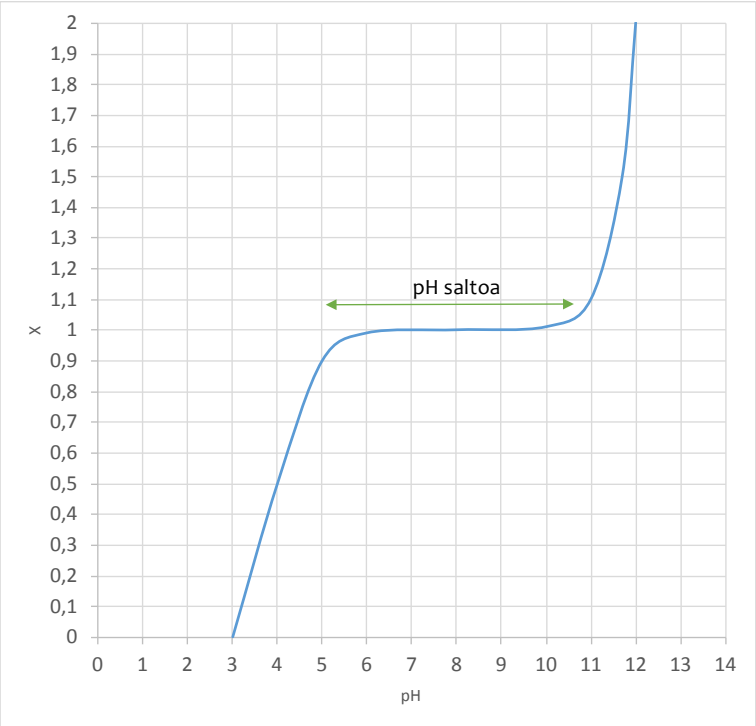
Baloratutako frakzioa (X) honela definitzen da:

$$X=\frac{\text{Gehitu den baloratzailearen kontzentrazioa}}{\text{Oreka lortzeko beharrezkoa den baloratzailearen kontzentrazioa}} \qquad (4)$$

edo,

$$X=\frac{\text{Gehitu den baloratzailearen kantitatea}}{\text{Oreka lortzeko beharrezkoa den baloratzailearen kantitatea}} \qquad (5)$$

Baloratutako frakzioa bateko edo ehuneko hainbeste bezala adieraz daiteke.



2. Irudia. Balorazio-kurba.

Balorazioan zehar, disoluzioaren pHa astiro aldatzen doa, baliokidetasun-puntuan izan ezik, non pHaren aldaketa nabarmenagoa den. Tarte honi **pH-aren saltoa** deritzo.

1.5 KALKULUAK

Aipatu bezala, disoluzio baten kontzentrazio zehatza ezagutzeko beharrezkoa da kontzentrazio ezaguneko disoluzio bat erabiltzea. Horrela, kontzentrazio ezezaguneko (N) analitoaren disoluzio baten bolumen zehatz bat prestatu (V) eta kontzentrazio ezaguneko (N´) disoluzio estandar (baloratzailea) baten bolumena gehitu behar da (V´) balorazioaren azken puntura iritsi arte. Puntu horretan hurrengo berdinketa beteko da:

$$N \times V = N' \times V' \qquad (6)$$

Ekuazio horretan bolumenak eta disoluzio estandarraren normalitatea (N´) ezagunak dira eta analitoaren disoluzioaren kontzentrazioa (N) bakandu daiteke:

$$N = \frac{N' \times V'}{V} \qquad (7)$$

Disoluzio baten normalitateak (N) disoluzio litro batean dauden baliokide (eq) ("unitate erreaktiboen" mol kopurua) adierazten du:

$$N=\frac{eq}{V(L)} \tag{8}$$

non baliokideak mol kopurua bider *n* diren:

$$eq=mol \times n \tag{9}$$

Hortaz, normalitatea molaritatea *n*-rekin biderkatzen ere kalkulatu daiteke:

$$N=n\times M \tag{10}$$

Azido-base erreakzioetan, *n* trukatzen den protoi kopuruari dagokio. Konplexuen formazio erreakzioetan, *n*-ren balioa ioi metalikoarekin ematen den erreakzioaren menpe dago, eta hauspeatze-erreakzioetan trukatzen diren espezie ionikoen arabera kalkulatuko da. Erredox erreakzioetan, *n* espezie horrek eman edo jaso duen elektroi kopurua izango da.

2. AZIDO BASE BALORAZIOAK

2.1 SARRERA

Azido-base balorazioak edo *neutralizazio bolumetriak*, azido edo base propietateak dituzten substantzien analisi kuantitatiboa ahalbidetzen duten metodo klasikoak dira. Balorazio hauetan azido sendo baten (adib. HCl) disoluzio estandarra erabiltzen da baloratzaile gisa base baten determinaziorako; azidoen determinaziorako, aldiz, base sendo baten disoluzio bat erabiltzen da (adib. NaOH).

Azido-base balorazio bat azido eta base baten eta hauen espezie konjokatuen arteko elkarrekintza dela esan daiteke:

$$\textbf{Azido}_1 + \textbf{base}_2 \leftrightarrow \textbf{Base}_1 + \textbf{azido}_2$$

Erreaktiboetako bat azido edo base sendo bat bada, erreakzioa guztiz desplazatuko da eskuinera.

Disoluzioaren pH-a eta kontzentrazioaren logaritmoaren (pH=logC) edo X aldagaiaren (pH=f(x)) menpe grafikoki adieraziz, disoluzioan dauden espezie azido eta basiko guztien kontzentrazioa edota hauen disoziazio konstanteen (Ka) balioak kalkula daitezke. Balorazio-kurba teorikoaren errepresentazioak balorazioa zenbateko zehaztasunarekin burutu daitekeen ebaluatzeko aukera emango du, baita adierazle egokiena hautatzeko aukera ere.

2.2 AZIDO-BASE BALORAZIO-KURBAK

Erreakzioan parte hartzen duten espezien arabera, azido-base balorazio mota desberdinak eman daitezke:

- Azido sendo baten balorazioa base sendo batekin.
- Base sendo baten balorazioa azido sendo batekin.
- Azido ahul baten balorazioa base sendo batekin.
- Base ahul baten balorazioa azido sendo batekin.

- Azido poliprotiko baten balorazioa.
- Azido poliprotiko baten gatzen balorazioa.

Balorazio-kurba teorikoak irudikatzeko, X aldagaia (baloratutako frakzioa) pH-aren funtzioan adieraziko da. Balorazio-kurba irudikatu aurretik, kontzentrazioaren logaritmoa eta pH-aren diagraman X aldagaiaren balioak kokatuko dira. Orokorrean, hurrengo kalkuluak burutu daitezke X aldagaia diagrama logaritmikoan kokatzeko:
Demagun baloragaia azido bat (C_0=0,01 M) eta baloratzailea base sendo bat dela. Balorazio erreakzioa hurrengoa izango litzateke:

$$HA + OH^- \rightarrow A^- + H_2O$$

X=0 denean, ez da baloratzailerik gehitu, hortaz, $X = \frac{0}{0.01} = 0$

Baloragaia azido sendo bat bada, erreakzioa guztiz desplazatuko da eskuinera:

$$HA + H_2O \rightarrow A^- + H_3O^+$$

Eta X=0 puntua $[H^+] = C_0$ denean kokatuko da.

Baloragaia azido ahul bat bada, hurrengo oreka emango da:

$$HA + H_2O \rightleftarrows A^- + H_3O^+$$

Eta X aldagaia baloragaiaren oreka puntuan kokatuko da: $[A^-]=[H^+]$

Orokorrean, X<1 balorazio-erreakzioa ematen ari da, eta balorazioa aurrera doan heinean baloragaiaren kontzentrazioa txikiagotzen doa:

	HA	+	$OH^- \rightarrow$	A^-	+	H_2O
Hasieran	C_0		C_0X			
Bukaeran	$C_0 - C_0X = C_0(1-X)$			C_0X		

$$[HA] = C_0 - C_0X = C_0(1-X)$$

X=0.5 denean, $x = \frac{0.005}{0.01} = 0.5$

	HA	$+ \quad OH^- \rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_0	$C_0 \times 0.5$	
Bukaeran	$C_0 \times 0.5$		$C_0 \times 0.5$

Hortaz, X aldagaia baloragaiaren kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[HA] = C_0 \times 0.5$$

$$\log [HA] = \log C_0 + \log 0.5 = \log C_0 - 0.3$$

X=0.9 denean, $x = \frac{0.009}{0.01} = 0.9$

	HA	$+ \quad OH^- \rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_0	$C_0 \times 0.9$	
Bukaeran	$C_0 \times (1-0.9)$		$C_0 \times 0.9$

Hortaz, x aldagaia baloragaiaren kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[HA] = C_0 \times 0.1$$

$$\log [HA] = \log C_0 + \log 0.1 = \log C_0 - 1$$

X=0.99 denean, $x = \frac{0.0099}{0.01} = 0.99$

	HA	$+ \quad OH^- \rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_0	$C_0 \times 0.99$	
Bukaeran	$C_0 \times (1-0.99)$		$C_0 \times 0.99$

Hortaz, X aldagaia baloragaiaren kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[HA] = C_0 \times 0.01$$

$$\log [HA] = \log C_0 + \log 0.01 = \log C_0 - 2$$

X=1, baliokidetasun-puntuan: $X = \frac{0.01}{0.01} = 1$

Baliokidetasun-puntuan baloragaiaren eta baloratzailearen kontzentrazioak berdindu egiten dira, hortaz: $[HA] = [OH^-]$.

Orokorrean, x>1 denean baloratzailearen kontzentrazioa behar baino handiagoa da eta erreakzionatu gabe gelditzen da disoluzioan:

	HA	$+$	OH^-	$\rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_o		C_oX		
Bukaeran			$C_oX - C_o = C_o(X-1)$		C_o

$$[OH^-] = C_o X - C_o = C_o (X-1)$$

X=1.01 denean; $X = \frac{0.0101}{0.01} = 1.01$

	HA	$+$	OH^-	$\rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_o		$C_o \times 1.01$		
Bukaeran			$C_o \times 0.01$		C_o

Hortaz, X aldagaia baloratzailearen kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[OH^-] = C_o x 0.01$$

$$\text{Log } [OH^-] = \log C_o + \log 0.01 = \log C_o - 2$$

X=1.1 denean; $x = \frac{0.011}{0.01} = 1.1$

	HA	$+$	OH^-	$\rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_o		$C_o \times 1.1$		
Bukaeran			$C_o \times 0.1$		C_o

Hortaz, X aldagaia baloratzailearen kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[OH^-] = C_o \times 0.1$$

$$\log [OH^-] = \log C_o + \log 0.1 = \log C_o - 1$$

X=1.5 denean; $x = \frac{0.015}{0.01} = 1.5$

	HA	$+$	OH^-	$\rightarrow$	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_o		$C_o \times 1.5$		
Bukaeran			$C_o \times 0.5$		C_o

Hortaz, X aldagaia baloratzailearen kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[OH^-] = C_0 \times 0.5$$

$$\text{Log}\,[OH^-] = \log C_0 + \log 0.5 = \log C_0 - 0.3$$

X=2 denean; $x = \frac{0.02}{0.01} = 2$

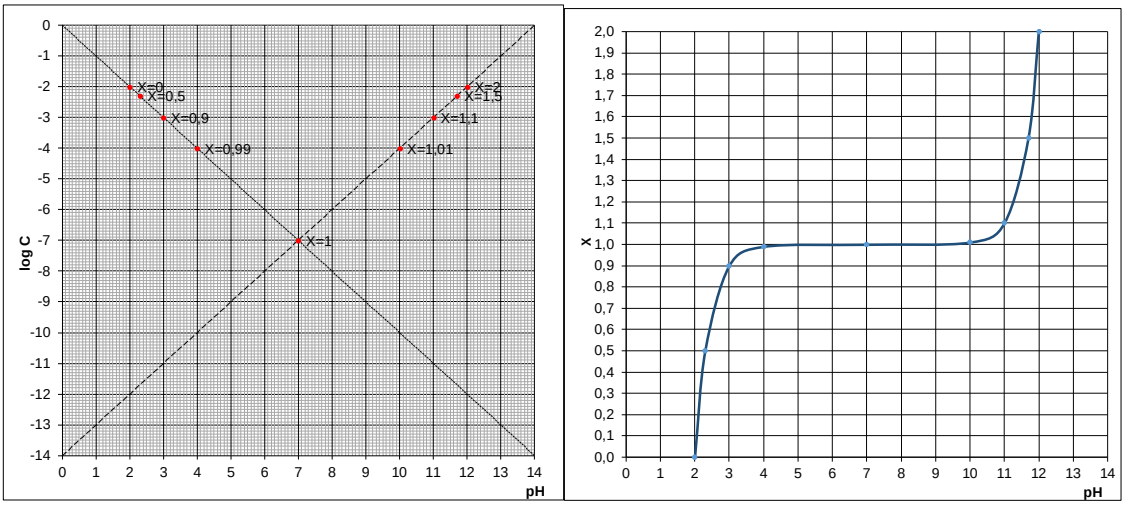
	HA	+	OH^-	→	$A^- + H_2O$
Hasieran	C_0		$C_0 \times 2$		
Bukaeran			C_0		C_0

Hortaz, X aldagaia baloratzailearen kontzentrazioaren hurrengo balioan kokatuko da:

$$[OH^-] = C_0$$

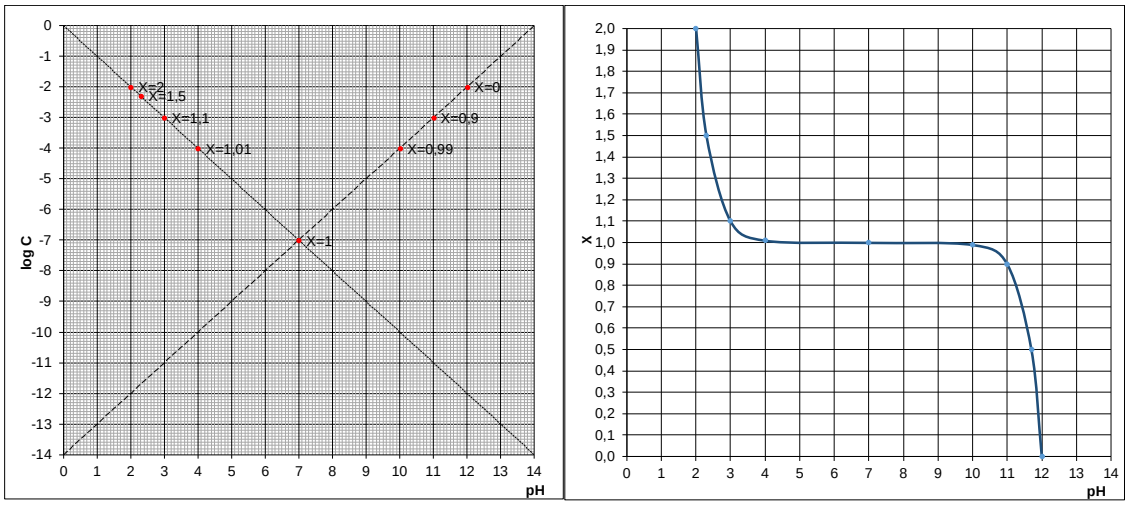
$$\text{Log}\,[OH^-] = \log C_0$$

Kalkuluak burutuz, azido sendo bat base sendo batekin baloratuko balitz hurrengo balorazio-kurba lortuko litzateke:

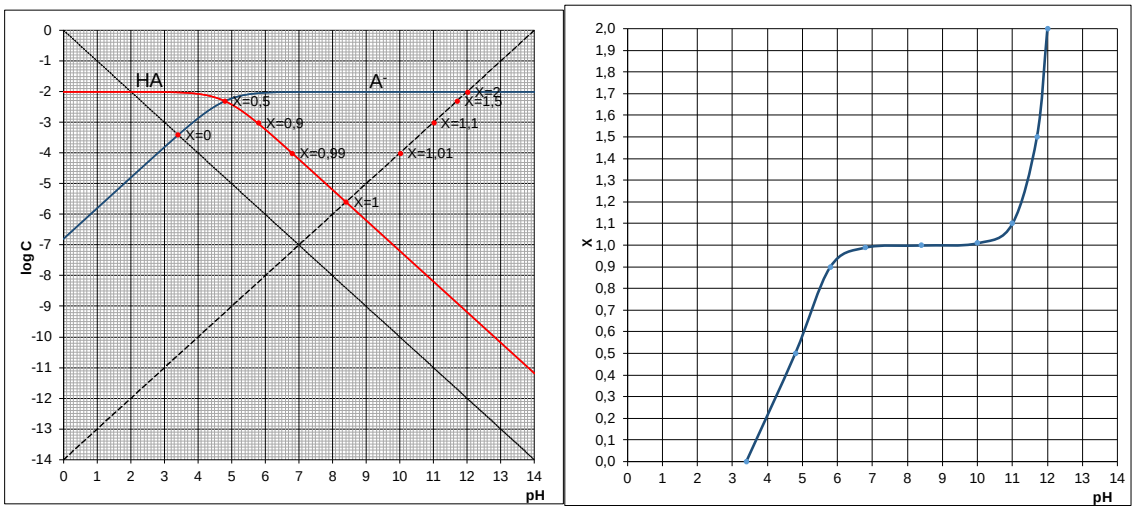


3. Irudia. Balorazio-kurba: azido sendo baten balorazioa azido sendo batekin.

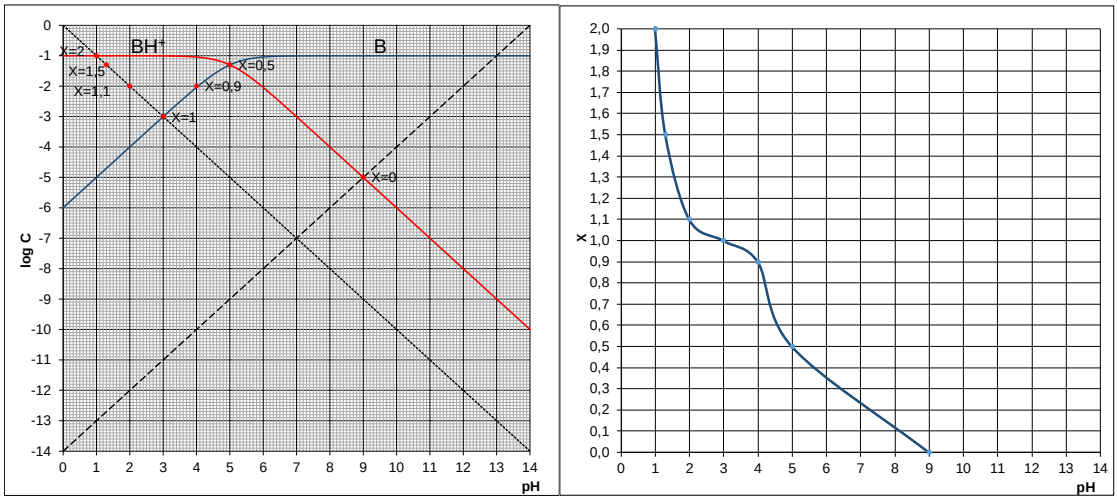
Base sendo bat azido sendo batekin baloratzen bada, balorazio-kurba irudikatzeko egin beharreko kalkuluak antzekoak izango lirateke. Ondorengo balorazio balorazio-kurba lortuko da:



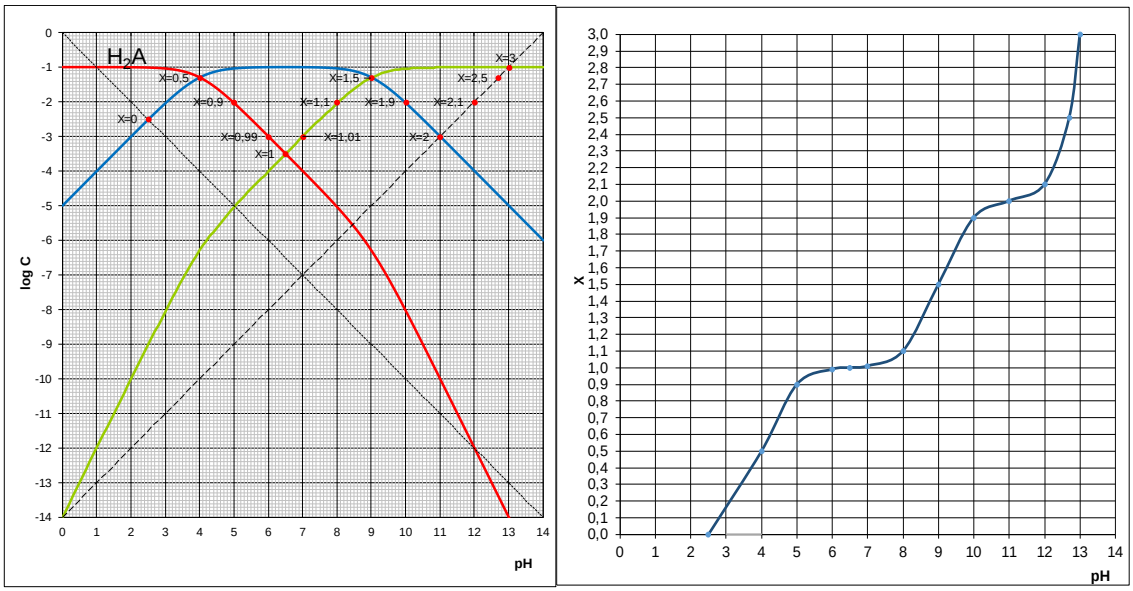
4. Irudia. Balorazio-kurba: base sendo baten balorazioa azido sendo batekin.



5. Irudia. Balorazio-kurba: azido ahul baten balorazioa base sendo batekin.



6. Irudia. Balorazio-kurba: base ahul baten balorazioa azido sendo batekin.



6 Irudia. Balorazio-kurba: Azido diprotiko baten balorazioa base sendo batekin.

2.3 AZIDO-BASE ADIERAZLEAK

Azido-base balorazioetan, adierazle kimikoa, orokorrean, lotura bikoitz konjokatuak dituen konposatu organiko bat da. Adierazleak protoi bat galtzen duenean aldaketa estrukturalak ematen dira eta, ondorioz, elektroien mugikortasuna areagotu edo murriztu daiteke, adierazlearen kolore aldaketa eraginez.

Hortaz, adierazlea azido ahul bat da, eta bere ezaugarri nabarmenena espezie protonatuaren (HIn) eta protoia galtzean ematen duen espeziearen (In^-) koloreak desberdinak izatea da. Ondorioz, adierazlearen kolorea pH-arekin aldatu egiten da.

Beraz, azido ahulak direnez, beraien oreka hurrengo erreakzioaren bidez adieraz daiteke:

$$HIn + H_2O \rightleftarrows In^- + H_3O^+$$

Erreakzio honen oreka konstantea adierazlearen oreka konstantea da (K_{HIn}):

$$K_{HIn}=\frac{[In^-][H_3O^+]}{[HIn]} \qquad (11)$$

Ekuazio honetan protoien kontzentrazioa bakanduz:

$$[H_3O^+] = K_{HIn}\frac{[HIn]}{[In^-]} \qquad (12)$$

Eta logaritmoak aplikatuz:

$$pH = pK_{HIn} + \log\frac{[In^-]}{[HIn]} \qquad (13)$$

Adierazle kimikoetan, adierazleak kolore aldaketa pairatzen duen pH tarteari, **pH-bitartea** deritzo. Tarte hau giza begiak bi kolore desberdintzeko daukan gaitasunaren menpe dago, eta gaitasun hau kolore bakoitzaren kontzentrazioarekin erlazionatzen da. Bi kolore desberdin dituzten espezieak nahasten direnean, giza begiak kolore aldaketa nabarituko du bi espezien kontzentrazioen arteko erlazioa 10 edo 0.1 denean.

Hau da, baldin eta:

$\frac{[In^-]}{[HIn]} \geq 10 \rightarrow \log\frac{[In^-]}{[HIn]} \geq 1$ In^- espeziearen kolorea ikusiko da.

$\frac{[In^-]}{[HIn]} \leq 0.1 \rightarrow \log\frac{[In^-]}{[HIn]} \leq -1$ HIn espeziearen kolorea ikusiko da.

$0.1 < \frac{[In^-]}{[HIn]} < 10 \rightarrow -1 < \log\frac{[In^-]}{[HIn]} < 1$ Bi koloreen nahasketa den kolorea ikusiko da.

Ondorioz, adierazle baten pH-bitartea teorikoki hurrengo pH-bitarteari dagokio:

$$\Delta pH = pK_{HIn} \pm 1 \qquad (14)$$

Hau da, kolore aldaketa adierazlearen pK_a-ren balioaren inguruan ematen da, unitate bat gorago eta beherago hain zuzen ere. Demagun adierazle baten $pK_{HIn} = 5$ dela, eta espezie protonatuaren (HIn) kolorea gorria eta espezie disoziatuaren (In^-) kolorea horia dela. Hurrengoa onartu daiteke:

- pH < 4 denean, disoluzioa gorria da.
- pH > 6 denean, disoluzioa horia da.
- 4 < pH < 6 denean, disoluzioa laranja da (kolore gorriaren eta horiaren arteko nahasketatik sortua).

pH<4.0	4.0<pH<6.0	pH>6.0
Gorria (HIn, forma azidoa)	Laranja	Horia (In^-, forma basikoa)
$pH < pK_{HIn} - 1$	$pH = pK_{HIn} \pm 1$	$pH > pK_{HIn} + 1$

7 Irudia: Adierazleen kolore aldaketa pH-aren arabera.

Halere, adierazlearen pH-bitartea ezartzeko azaldu den prozedura orokortasun bat besterik ez dela nabarmendu behar da, giza begiak ez baitauka kolore guztiak desberdintzeko gaitasun bera. Ondorioz, adierazle guztietan ez da (14) ekuazioan adierazitakoa zehazki betetzen, batez ere bi espezietako bat koloregabea den adierazleen kasuan. Hurrengo taulan azido-base adierazle desberdinen pH-bitarteak adierazten dira:

1 taula. Azido-base adierazleak

Adierazlea	pK_{HIn}	pH-bitartea	Kolore azidoa	Kolore basikoa
Kresol gorria		0.2-1.8	Gorria	Horia
Timol urdina	1.65	1.2-2.8	Gorria	Horia
Metilo laranja	3.46	3.1-4.4	Gorria	Horia
Bromofenol urdina	4.10	3.0-4.6	Horia	Purpura
Bromokresol berdea	4.90	4.0-5.6	Horia	Urdina
Metilo gorria	5.00	4.4-6.2	Gorria	Horia
Bromokresol purpura	6.40	5.2-6.8	Horia	Purpura
Bromotimol urdina	7.30	6.0-7.6	Horia	Urdina
Gorri neutroa	7.40	6.8-8.0	Gorria	Laranja
Fenol gorria	8.00	6.4-8.2	Horia	Gorria
Kresol gorria	8.46	7.0-8.8	Horia	Purpura
m-cresol purpura	8.32	7.4-9.0	Horia	Purpura
Timol urdina	9.2	8.0-9.6	Horia	Urdina
Fenolftaleina	9.6	8.2-9.8	Koloregabea	Purpura
Timolftaleina	9.7	9.3-10.5	Koloregabea	Urdina
Azo morea	12.00	11.0-13.0	Horia	Morea

Balorazioaren azken puntua ezagutzeko oinarrizkoa da baliokidetasun-puntuaren inguruan kolore aldaketa jasaten duen adierazle bat aukeratzea.

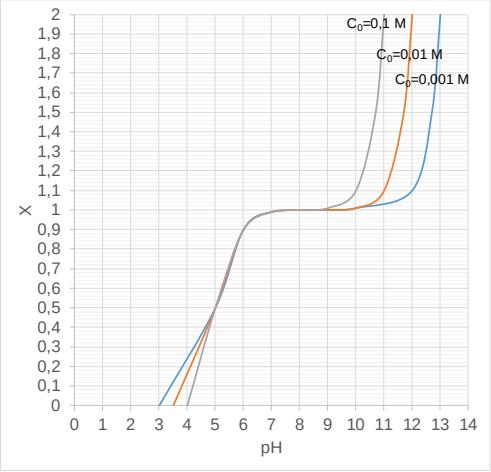
Adierazlea aukeratzeko, irizpide desberdinak aurki daitezke bibliografian. Adierazlearen hautaketa erraztezko eta alderdi subjektiboak baztertzeko asmoz, hurrengo irizpideak ezarriko ditugu:

- pK_{HIn} balioa baliokidetasun-puntuaren pH baliotik hurbilen duen adierazlea aukeratuko da. Adierazlearen pK_{HIn} ezagutzen ez bada, pH bitartean baliokidetasun-puntuaren pH-a barneratzen duen adierazlea aukeratuko da.

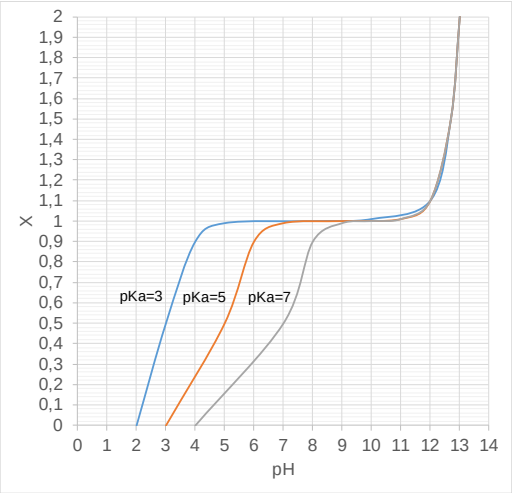
-Aurreko baldintza betetzen duten adierazleen artean, balorazioaren norantzaren arabera pH-bitarteko bigarren kolore aldaketa baliokidetasun-puntutik hurbilen duen adierazlea aukeratuko da. Adierazle monokromatikoetan (fenolftaleina edo timolftaleina) beti kolore aldaketa azidoa aukeratuko da. Salbuespen bezala, kolore aldaketa nabariagoa duen adierazle bat aukeratu daiteke, nahiz eta aurreko baldintza ez bete, adierazlearen errorea onargarria baldin bada.

Balorazioan erabiltzen den adierazle kantitatea arbuiagarria da analitoaren kontzentrazioarekin konparatuz, adierazleak baloragaiarekin erreakzionatu ez dezan. Hori dela eta, adierazlearen disoluzio diluitu baten tanta gutxi batzuk besterik ez dira botako.

Azido-base balorazio-kurba, eta ondorioz adierazlearen hautaketa, analitoaren kontzentrazioarekin eta bere azidotasun konstantearekin alda daiteke. Alde batetik, kontzentrazioa gutxitu ahala, baliokidetasun-puntuaren inguruan ematen den pH-aren saltoa leundu egiten da. Bestalde, azidotasun konstantearen balioa zenbat eta handiagoa izan (pKa balio txikiagoa) sendoagoa da azidoa eta nabariagoa izango da pH-aren saltoa baliokidetasun-puntuan (8. eta 9. Irudiak).



8. Irudia. Azido ahularen kontzentrazioaren eragina balorazio-kurban.



9. Irudia. Azido ahularen azidotasun konstantearen eragina balorazio-kurban.

Balorazioaren errorea % 0.1 baino txikiagoa izatea gomendatzen da, eta horretarako adierazlearen kolore aldaketa baliokidetasun-tartearen barnean eman behar da. Baliokidetasun-tartea baloragaiaren % 99.9 eta % 100.1 balorazioaren tarteari dagokio, hau da, X=0.999 eta X=1.001 artean. Hala ere, azido edo base ahulen edo kontzentrazio baxuko espezien kasuan balorazio-kurbako pH-aren saltoa txikia izaten da eta irizpide hau oso murriztailea da. Kasu horietan %1eko errorea onargarria da eta %99 eta %101 artean dagoen baliokidetasun tartea definitu daiteke.

2.4 DISOLUZIO BALORATZAILEEN PRESTAKETA

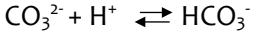
Balorazioaren zehaztasuna bermatzeko, baliokidetasun-puntuaren inguruan ematen den pH-aren saltoa handia izan behar da. Horretarako, disoluzio baloratzailea azido sendo (HCl, H_2SO_4) edo base sendo bat (NaOH) izan behar da base eta azido ahulak baloratzeko hurrenez hurren. Baina erreaktibo hauek disoluzio estandar bezala erabiltzeko, aldez aurretik patroi primario batekin baloratu behar dira.

2.4.1 DISOLUZIO ESTANDAR AZIDOAK

Azido sendo desberdinen artean, gehien erabiltzen dena HCl-a da, disoluzioak egonkorrak direlako eta ez duelako prezipitazio erreakziorik ematen katoi gehienekin. Halere, kloruro ioiak prezipitatuak sortzen baditu, $HClO_4$ edo H_2SO_4 disoluzioak erabili daitezke, hauek ere egonkorrak baitira. HNO_3 disoluzioa, bere propietate oxidatzailea dela eta, oso gutxitan erabiltzen da.

Azido sendoen disoluzioen balorazioa edo estandarizazioa sodio karbonato (Na_2CO_3) patroi primarioaren kantitate ezagunak baloratzen burutzen da gehienetan. Sodio karbonatoa purutasun altuko erreaktiboa da (%99,9999) eta HCl-aren balorazioan erabili ahal izateko 150 °C-tan lehortzearekin nahikoa izaten da.

HCl-a Na_2CO_3-rekin baloratzen denean bi baliokidetasun-puntu ikus daitezke. Lehenengoa pH 8,3 inguru, CO_3^{2-}-a protonatu eta HCO_3^--ra pasatzen denean:



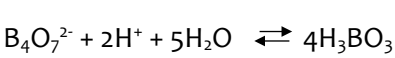
$$CO_3^{2-} + H^+ \rightleftarrows HCO_3^-$$

Bigarrena, pH 11,7 inguru, HCO_3^--a protonatu eta H_2CO_3-ra pasatzen denean:

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftarrows H_2CO_3$$

Estandarizazioan bigarren baliokidetasun-puntua erabiltzen da, bertan pH-aren saltoa nabariagoa baita. Adierazle bezala metilo laranja erabiltzen da eta kolore aldaketa horitik gorrira ematen da. Balorazioaren azken-puntua argiagoa izan dadin, disoluzioa irakiten jar daiteke sortu den CO_2-a kentzeko.

Azido sendoen estandarizazioan erabili daitekeen beste patroi primario bat sodio tetraborato dekahidratatua ($Na_2B_4O_7.10H_2O$) da, eta azido batekin ematen duen erreakzioa hurrengoa da:



$$B_4O_7^{2-} + 2H^+ + 5H_2O \rightleftarrows 4H_3BO_3$$

2.4.2 DISOLUZIO ESTANDAR BASIKOAK

Disoluzio estandar basikoak prestatzeko NaOH-a erabiltzen da gehienetan, baina KOH eta $Ba(OH)_2$ ere erabil daitezke. Patroi primarioak ez direnez, aldez aurretik disoluzio horiek estandarizatzea beharrezkoa da. Gainera, base sendo hauek bai disoluzioan eta bai egoera solidoan karbonatazio efektua pairatzen dute, hau da, atmosferako CO_2-arekin erreakzionatu eta karbonatoa ematen dute:

$$CO_2 + 2OH^- \rightleftarrows CO_3^{2-} + H_2O$$

Sortzen den karbonato horrek basearen baloraziorako gehitzen den azido sendoarekin ere erreakzionatuko du. pH azidoan kolore aldaketa jasaten duen adierazle bat erabiltzen bada, hurrengo erreakzioa emango da:

$$CO_3^{2-} + 2H^+ \rightleftarrows H_2CO_3$$

Kontuan izanik OH^- 2 molek Na_2CO_3 mol bat ematen dutela, eta Na_2CO_3 molak 2 mol HCl-rekin erreakzionatzen duela, karbonatazio efektuak ez du balorazio prozesuan eraginik eta hortaz, ez da errorerik egiten.

Disoluzio basikoen estandarizazioan erabiltzen diren azido gehienak azido organiko ahulak izaten dira eta inguru basikoan kolore aldaketa jasaten duten adierazleak erabiltzen dira. Patroi primario horien artean potasio hidrogenoftalatoa, azido bentzoikoa edo potasio hidrogenoiodatoa aurkitzen dira.

2.5 AZIDO-BASE BALORAZIOEN APLIKAZIO ANALITIKO GARRANTZITSUENAK

Azido-base balorazioek aplikazio ugari dituzte elementuen edota molekulen analisi kuantitatiboan. Ondorengo ataletan horietako batzuk azaltzen dira.

2.5.1 NITROGENODUN KONPOSATUEN DETERMINAZIOA

Ikuspuntu praktikotik, nitrogenodun konposatuen azido-base balorazioak garrantzi handia dauka, konposatu organiko zein ez-organikoen (amonio gatzak, nitrato eta nitritoak) determinazioan.

Nitrogenodun konposatu organikoen determinazioa Kjeldahl metodoa erabiliz egiten da, batez ere proteina eta pentsuen analisian. Kjeldahl metodoa hiru pausotan burutzen da:

a-. Laginaren tratamendua nitrogenodun konposatuak amonio gatzetan eraldatzeko.

b-. Amonio gatzetatik sortzen den amoniakoa destilatu eta disoluzio azido batean jaso (gehienetan azido borikoa %4 disoluzioa).

c-. Sortu den amonio boratoaren balorazioa HCl disoluzio batekin.

Laginaren tratamenduan, laginak nitrogenodun konposatu organikoak baditu, laginaren mineralizazioa beharrezkoa da. Mineralizazio prozesuan laginari azido sulfurikoa, katalizatzaile bat ($CuSO_4$) eta K_2SO_4 anhidroa gehitzen zaizkio eta 20-45 minututan berotzen

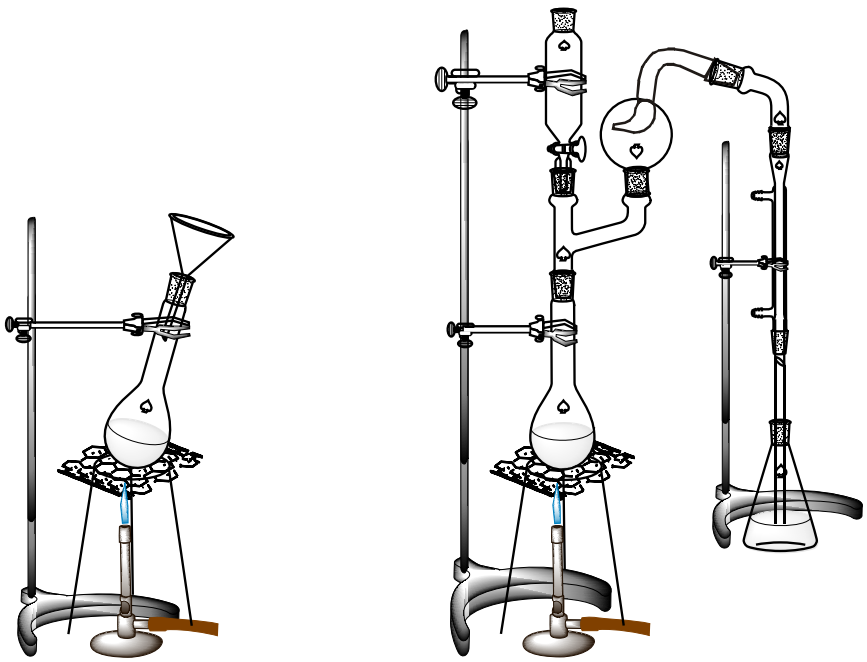
da. Baldintza horietan, konposatu organikoaren karbonoa oxidatu eta CO_2-a sortzen da; nitrogenoa, aldiz, disoluzioan gelditzen da amonio gatz bezala, inguruaren azidotasuna dela eta.

Bigarren pausuan, NaOH-a gehitu ondoren aurreko pausuan sortutako amonio gatzak amoniakora eraldatu eta destilatu egiten da:

$$NH_4R + NaOH \rightarrow NH_3 + NaR + H_2O$$

Laginean nitrato eta nitrito ioiak badaude, amoniakora erreduzitzeko Devarda aleazioa (50% Cu, 45% Al eta 5% Zn) erabiltzen da inguru basikoan eta ondoren NaOH-a gehitzen da.

Destilazioa egiteko lepo luzeko matraze berezi bat erabiltzen da, Kjeldahl matrazea deritzona. Azkenik, destilazioan sortutako amoniakoa azido boriko disoluzioan jasotzen da (ikus 10. Irudia).



10. Irudia. Kjeldahl sistema. a) laginaren mineralizazioa; b) destilazioa eta amoniakoa disoluzio azidoan jaso.

Amoniakoak azido borikoarekin erreakzionatzen duenean sortzen den amonio boratoa HCl-arekin baloratzen da adierazle bezala metilo gorria adierazlea erabiliz:

$$NH_4H_2BO_3 + HCl \rightleftarrows H_3BO_3 + NH_4Cl$$

Lagin batek duen proteina portzentajea kalkulatzeko, kalkulatutako nitrogeno portzentaje faktore enpiriko batekin biderkatu behar da. Faktore enpiriko horren balio proteinak duen aminoazido ugarienaren arabera ezartzen da. Orokorrean, proteinen %16 nitrogenoa dela onartzen bada, faktorearen balioa 6,25 da.

$$\% \text{ Proteina} = \% \text{ Nitrogeno} \times 6{,}25 \qquad (15)$$

Halere, proteinek duten nitrogeno kantitatea %15 eta 18 artean dago, hortaz, laginaren arabera faktore enpirikoaren balioa aldakorra da (6.38 esne eta esnekietan, 5,30 koko eta fruitu lehorretan, etab.).

Gaur egun, nitrogeno organikoaren determinazioa Kjeldahl metodoa erabiliz burutzeko sistema automatizatuak daude. Sistema automatiko hauetan prozeduraren pauso guztiak egin daitezke, laginaren digestioa izan ezik.

11. Irudia. Kjeldahl sistema automatizatua (https://www.buchi.com/en/products/kjeldahl-dumas/kjelflex-k-360 gunean eskuragarri).

2.5.2 ELIKAGAIEN AZIDOTASUNAREN DETERMINAZIOA

Elikagai batek duen azido-edukia edo azidotasun totalaren determinazioan, baloratzaile bezala NaOH-a erabiltzen da eta adierazle bezala fenolftaleina edo bromotimol urdina. Laginaren kolore ilunak azken puntuaren detekzioa galarazten duena, lagina diluitzea edo

adierazle kantitate handiagoa erabiltzea gomendatzen da. Beste aukera bat azken-puntuaren detekzio potentziometrikoa egitea da.

Azidotasun lurrunkorraren determinazioa egiteko, azidotasun totalari lagina lurrundu ondoren lortzen den azidotasuna kendu behar zaio.

Adibide argi bat ozpinak duen azidotasunaren kalkulua da, non azido ahul bat (azido azetikoa) base sendo batekin baloratzen den. Emaitza azido azetiko mg laginaren 100 ml-ko adierazten da.

2.5.3 KONPOSATU EZ-ORGANIKOEN DETERMINAZIOA

Azido-base balorazioen aplikazio ohikoenetako bat karbonato eta bikarbonatoen determinazioa da, batez ere ur laginetan. Lehenengo, karbonatoak baloratzen dira azido sendo batekin, eta ondoren, bikarbonato guztiak (sortutakoak eta laginean zeudenak) baloratzen dira.

$$CO_3^{2-} + H^+ \rightarrow HCO_3^-$$

$$HCO_3^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2O$$

Beste aplikazio garrantzitsu bat atmosferako CO_2-aren determinazioa da. Helburu horrekin airean $Ba(OH)_2$ disoluzio batetatik pasarazten da.

$$Ba(OH)_2 + CO_2 \rightarrow BaCO_3\ (s) + H_2O$$

Sortzen den bario karbonatoa prezipitatu egiten denez, erreakzionatu gabe gelditu den $Ba(OH)_2$-a HCl disoluzio estandarizatu batekin baloratu daiteke fenolftaleina adierazle bezala erabiliz.

2.5.4 TALDE FUNTZIONAL ORGANIKOEN DETERMINAZIOA

Azido-base bolumetrien bidez, propietate azido edo basikoak dituzten talde funtzional organikoak determinatu daitezke molekulak organikoetan: azido karboxilikoak, azido sulfonikoa, hidroxiloak, aminak eta esterrak.

Azido karboxilikoak eta azido sulfonikoak konposatu organiko azidoetan ohikoenak diren talde funtzionalak dira. Azido sulfonikoak base batekin baloratuz determinatu daitezke. Azido karboxiliko gehienak, aldiz, disolbagarritasun txikia daukate uretan eta balorazioa base batekin burutzeko aldez aurretik etanolean disolbatzea beharrezkoa izaten da.

Hidroxilo taldeak dituzten konposatu organikoak esterifikazio erreakzio baten bidez determinatu daitezke, piridinan disolbatu den anhidrido azetiko disoluzio bat erabiliz:

$$(CH_3COO)_2O + ROH \rightarrow CH_3COOR + CH_3COOH$$

Ondoren, lagina berotu egiten da erreakzionatu ez duen anhidrido azetikoa hidrolizatzeko:

$$(CH_3COO)_2O + H_2O \rightarrow 2CH_3COOH$$

Bukatzeko, sortu den azido azetiko guztia NaOH disoluzio batekin baloratuko da.

Amina taldearen barnean, amina alifatikoak, orokorrean, base oso ahulak dira eta azido sendo batekin baloratu daitezke. Amina aromatikoak, ordea, base oso ahulak direnez ezin dira ur disoluzioan baloratu eta azido azetiko anhidroan baloratu behar dira, bertan beraien basikotasuna areagotzen baita.

Ester taldeen determinazioa saponifikazio erreakzio baten bidez egiten da, base sendo baten disoluzioa gehitu eta soberan dagoena azido batekin baloratuz.

$$R_1COOR_2 + OH^- \rightarrow R_1COO^- + HOR_2$$

$$OH^- \text{ (soberan)} + H^+ \rightarrow H_2O$$

2.6 PRAKTIKAK

AZIDO SENDO BATEN ESTANDARIZAZIOA PATROI PRIMARIO BAT ERABILIZ

1-.SARRERA

Azido sendo desberdinen artean, balorazioetan gehien erabiltzen dena HCl-a da, disoluzioak egonkorrak direlako eta ez duelako prezipitazio erreakziorik ematen katoi gehienekin. Azido klorhidrikoa ez da patroi primario bat, baloratzaile bezala erabili ahal izateko aldez aurretik patroi primario batekin estadarizatu behar da.

2-. HELBURUA

Azido klorhidriko disoluzio baten estandarizazioa sodio karbonato patroi primarioa erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
HCl
Sodio karbonatoa
Metilo laranja

4-. PROZEDURA

4.1. HCl 0.1N inguruko kontzentrazioa duen disoluzio bat prestatu.

Beharrezkoa den HCl bolumena hartu, ur desionizatutan disolbatu (lehengo ura gehitu eta ondoren azidoa) eta 250 mL-ko matrazera eraman ur desionizatua gehituz.
4.2. *Prestatu den HCl disoluzioaren estandarizazioa, patroi primario bezala sodio karbonatoa eta adierazle bezala metilo laranja erabiliz.*

Sodio karbonato kantitate zehatz bat pisatu eta erlenmeyer batera eraman. Ur desionizatutan erabat disolbatu (50 mL gutxi gora behera) eta metilo laranja bi tanta gehitu. Balorazioa egiteko buretatik estandarizatu nahi den HCl-a pixkanaka gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioaren kolorea gorria denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatz ezazu.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

Kontuan izan, HCl-a Na_2CO_3-rekin baloratzen denean eta metilo laranja adierazlea erabiltzen denean, bi erreakzio ematen direla. Alde batetik, CO_3^{2-}-a protonatu eta HCO_3^--ra pasatzen da:

$$CO_3^{2-} + H^+ \rightleftarrows HCO_3^-$$

Ondoren, HCO_3^--a protonatu eta H_2O eta CO_2 sortzen da:

$$HCO_3^- + H^+ \rightleftarrows CO_2 + H_2O$$

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. HCl 0.1 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak.

5.2. HCl 0.1 N disoluzioa baloratzeko behar den sodio karbonato kantitatearen estimazioa.

5.3 HCl disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4 HCl disoluzioaren normalitatearen batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala).

BASE SENDO BATEN ESTANDARIZAZIOA PATROI PRIMARIO BAT ERABILIZ

1-. SARRERA

NaOH ez da patroi primario bat, delikueszentea baita, hau da, atmosferako ura eta CO_2 bereganatzeko joera du. Hori dela eta, NaOH disoluzioak gutxi gorabehera prestatzen dira eta ondoren patroi primario batekin, potasio ftalato azidoarekin, baloratzen dira.

2-. HELBURUA

Ikasleak aldez aurretik prestatu duen NaOH 0.1 N disoluzio baten kontzentrazio zehatzaren determinazioa.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
NaOH
Potasio ftalato azidoa (potasio biftalatoa)
Fenolftaleina

4-. PROZEDURA

4.1. NaOH 0.1N inguruko kontzentrazioa duen disoluzio bat prestatu.

Beharrezkoa den NaOH kantitatea pisatu, ur desionizatutan disolbatu eta 250 mL-ko matrazera eraman ur desionizatua gehituz.

4.2. *Prestatu den NaOH disoluzioaren estandarizazioa.*

Potasio ftalato azidoaren kantitate zehatz bat pisatu eta erlenmeyer batera eraman. Ur desionizatutan erabat disolbatu (50 mL gutxi gora behera) eta fenolftaleina bi tanta gehitu.

Balorazioa egiteko buretatik estandarizatu nahi den NaOH-a pixkanaka gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioaren kolorea arrosa denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatz ezazu. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepika ezazu.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. NaOH 0.1 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak.

5.2. NaOH 0.1 N disoluzioa baloratzeko behar den potasio ftalato azido kantitatearen estimazioa.

5.3 NaOH disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4 NaOH disoluzioaren normalitatearen batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala).

AZIDO SENDO BATEN ESTANDARIZAZIOA BASE SENDO BAT ERABILIZ

1-. SARRERA

HCl komertziala ez da erreaktibo primario bat. Hori dela eta, HCl disoluzio bat baloratzaile bezala erabili ahal izateko, aldez aurretik, patroi primario batekin baloratu behar da (adib. Na_2CO_3), edo praktika honetan egingo den bezala, aurretik estandarizatu den NaOH disoluzio bat erabiliz.

2-. HELBURUA

Aldez aurretik prestatutako HCl 0.1 N disoluzio baten kontzentrazio zehatzaren determinazioa.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerra
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
HCl
Baloratutako NaOH disoluzioa
Fenolftaleina

4-. PROZEDURA

4. 1. HCl-tan 0.1 N inguruko kontzentrazioa duen disoluzio bat prestatzeko kalkuluak egin.

HCl 0.1 N disoluzio baten 250 ml prestatzeko beharrezkoa den HCl bolumena kalkulatu.

4.2. *Prestatu den HCl disoluzioa estandarizatu.*

NaOH disoluzioaren 10 mL erlenmeyer batera bota eta fenoftaleina bi tantan gehitu.

Balorazioa egiteko buretatik estandarizatu nahi den HCl-a pixkanaka gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioa koloregabea denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatzi.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. HCl 0.1 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak.

5.2. HCl disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.3. HCl disoluzioaren normalitatearen batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

LAGIN BATEN KARBONATO ETA BIKARBONATOEN KONTZENTRAZIOAREN DETERMINAZIOA

1-. SARRERA

Karbonatoak eta bikarbonatoak dituen lagin bat HCl-arekin baloratzen denean, fenolftaleina adierazlea erabilita, hurrengo erreakzioa ematen da:

$$CO_3^{-2} + H^+ \rightarrow HCO_3^-$$

Fenolftaleinaren kolore aldaketaren ondorioz, disoluzioa kolore arrosatik garden izatera pasatuko da. Kolore aldaketa hau pH-a 8 denean ematen denez, disoluzioan dauden karbonatoak baloratuko dira soilik, bikarbonatoak berdin mantenduz. Lortutako disoluzioa kolorgea denez, honen gain metilo laranja adierazlea gehitzea posiblea da. Horrela, HCl gehiago gehitu ahal izango da hurrengo erreakzioa emanik:

$$HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$$

Horrela baloratutako bikarbonatoa laginean zegoena eta karbonatoaren balorazioaren ondorioz sortutakoa izango da.

2-. HELBURUA

Karbonatoa eta bikarbonatoa dituen lagin baten balorazioa gauzatuko da kontzentrazio ezaguneko HCl disoluzioa erabiliz. Fenolftaleina eta metilo laranja erabiliko dira adierazle bezala.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak

Kontzentrazio ezaguneko HCl disoluzioa

Fenolftaleina

Heliantina

4-. PROZEDURA

4.1 Karbonatoen balorazioa

Laginaren 10 mL erlenmeyer batera bota eta bi tanta fenoftaleina gehitu.

Balorazioa egiteko buretatik kontzentrazio ezaguneko HCl disoluzioa gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioa koloregabea denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatz ezazu.

4.2 Bikarbonatoen balorazioa

Karbonatoak baloratutakoan lortutako disoluzio koloregabeari heliantina edo metilo laranja bi tantan gehitu eta HCl-a erabiliz baloratzen jarraitu. Disoluzioa kolore horitik arrosara pasatzen denean, balorazioa bukatutzat emango da. Erabilitako bolumena idatzi.

Balorazio prozesu osoa gutxienez hiru aldiz errepika ezazu.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Karbonatoen balorazioaren emaitzak.

5.2. Bikarbonatoen balorazioaren emaitzak.

5.3. Karbonato eta bikarbonatoen kontzentrazioa kalkulatu (g/L-tan). Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

OZPINAREN AZIDOTASUNAREN DETERMINAZIOA

1-. SARRERA

Ozpin baten balio komertziala eta legezkotasuna ezagutzeko erabiltzen diren determinazio analitikoen artean azidotasunaren determinazioa dago. Nahiz eta ozpinean azido bat baino gehiago aurkitu, emaitza azido azetiko portzentajea bezala adierazten da, hau baita ozpinaren osagai nagusietako bat.

Ardoaren hartzidura azetikoaren ondorioz lortutako ozpinen azido azetiko ehunekoa %4-7 artean egoten da, nahiz eta denboraren eta airearen eraginaren ondorioz balio hau zerbait gutxitu.

Azido azetikoaren balorazioa base sendo bat erabiltzen da baloratzaile bezala eta adierazle bezala fenoftaleina erabiliz. Hurrengo erreakzio hau ematen da:

$$CH_3COOH + NaOH \rightarrow CH_3COONa + H_2O$$

2-. HELBURUA

Ozpin komertzial baten azidotasunaren determinazioa.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Kontzentrazio ezaguneko NaOH disoluzioa
Fenolftaleina

4-. PROZEDURA

4.1. Azido azetikoaren determinazioa.

Laginaren 10 ml 100 ml-ko matraze batera eramaten dira ur distilatuaz arrasean jarriz. Disoluzio honen 10 ml erlenmeyer batera eramango dira eta fenoftaleina bi tanta gehitzen zaizkio. Balorazioa egiteko buretatik aurreko praktikan baloratutako NaOH-a gehituko da

disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioa larrosa denean bukatuko da. Erabilitako bolumena apuntatu.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

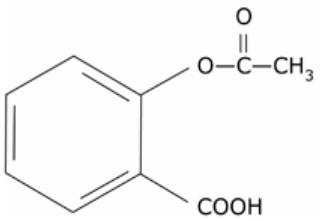
5.1. Ozpinaren diluzioaren disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Ozpinak duen azido azetikoaren portzentajearen batezbestekoa (g/100 ml) kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

SENDAGAI BATEAN DAGOEN AZIDO AZETILSALIZILIKOAREN DETERMINAZIOA.

1-. SARRERA

Azido azetilsalizilikoa gaur egun merkatuan dauden sendagai askoren osagai aktiboak da. Azido azetilsalizilikoa antipiretikoa, analgesikoa eta hantura-kontrako farmakoa da.



Azido azetilsalizilikoaren egitura kimikoa (pKa=3.5) (180 g/mol)

2-. HELBURUA

Analgesiko komertzial batek duen azido azetilsalizilikoaren determinazioa.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa

Bureta

Erlenmeyerrak

Matraze aforatuak

Pipeta graduatuak

Erloju-beira

Motrailua/almaiza

Hauspeakin-ontziak

Baloratutako NaOH disoluzioa

Fenolftaleina

4-. PROZEDURA

4.1. Laginaren prestaketa.

Konprimatu bat pisatu eta motrailuan birrindu. Homogeneizatu ondoren, hauspeakin-ontzi batean kuantitatiboki ipini, ura gehitu eta 10-15 minutuz irabiatu eta berotu. Hoztean,

disoluzioa 100mL-ko matraze batera eraman eta ur desionizatuarekin arrasean jarri. Egokia den bolumena hartu, adierazlea gehitu eta balorazioa burutu baloratzaile aproposa hautatuz. Balorazioa hiru aldiz errepikatuko da.

4.2. Azido azetilsalizilikoaren determinazioa.

Balorazioa egiteko buretatik baloratzailea gehitu etengabe nahastuz. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatuko da.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Azido azetilsalizilikoaren balorazioaren emaitzak.

5.2. Konprimatu batek duen AAS kalkulatu (mg AAS/konprimatu). Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu. Errore erlatiboa kalkulatu.

3. KONPLEXUEN BIDEZKO BALORAZIOAK

3.1 SARRERA

Konplexuen bidezko balorazioen erabilera 1950eko hamarkadaren bukaeran hasi zen hedatzen, azido poliaminokarboxiliko hortz anitzeko estekatzaileen erabilerarekin eta adierazle metalokromikoen garapenarekin batera.

Konplexu baten formazio-erreakzioa katioi metaliko eta estekatzaile baten arteko orekan oinarritzen da, non 1:1 estekiometria duen ML izeneko konplexu egonkor bat sortzen den:

$$M + L \rightleftarrows ML$$

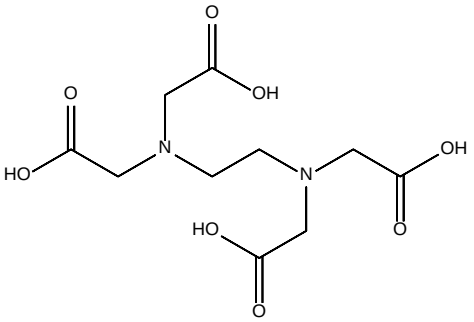
Oreka K'_{ML} baldintzazko konplexuen formazio konstantean oinarritzen da:

$$K'_{ML} = \frac{[ML]'}{[M]'[L]'} = K_{ML} \frac{\alpha_{ML}}{\alpha_M \alpha_L} \qquad (16)$$

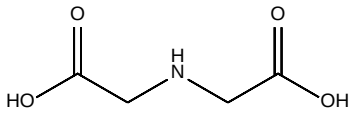
Era berean, baldintzazko formazio konstantea indar ionikoaren eta erreakzio paraleloen koefizienteen (α_M eta α_L) eraginpean egongo da.

Estekatzaile bat ioi metaliko bakarrarekin koordinazio-lotura bat baino gehiago sortzeko gai bada hortz anitzeko estekatzailea deritzo eta kelato izeneko eraztun-egitura bat sortzen du. Zenbat eta eraztun kopuru handiagoa izan, egonkorragoa izango da konplexua.

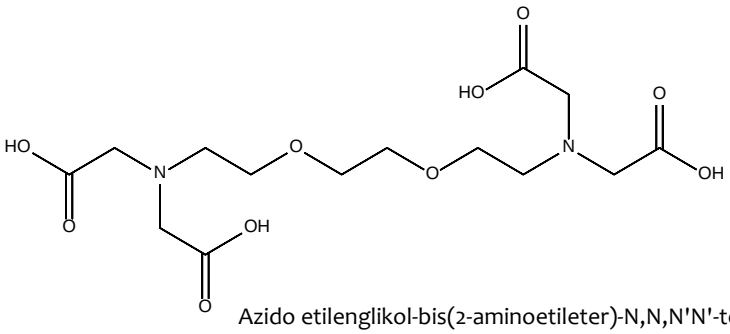
Hortz anitzeko estekatzaileen artean, azido poliaminokarboxilikoak dira konplexuen bidezko balorazioetan gaur egun gehien erabiltzen direnak, eta horien artean azido etilendiaminotetraazetikoa (EDTA) da zabalduena. Azido etilendiaminotetraazetikoa (EDTA) 6 koordinazio-lotura izan ditzakeen estekatzailea da, eta ioi metalikoekin konplexuak sortzean, 5 eraztunetako egiturak sortzen ditu. Atal honetan konplexona hau erabiltzen diren balorazioak aztertuko dira.



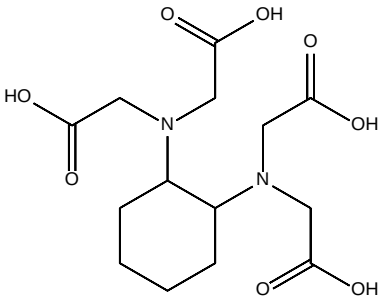
Azido etilendiaminotetraazetikoa (EDTA)



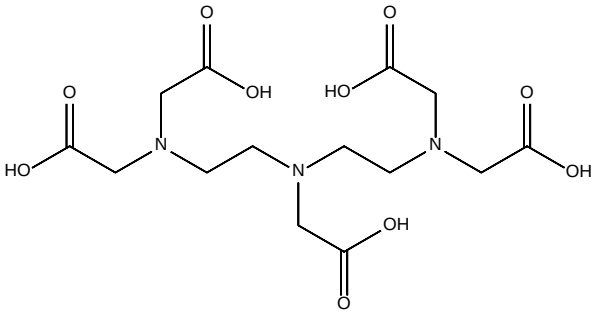
Azido iminodiazetikoa (IDA)



Azido etilenglikol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N'N'-tetraazetikoa



Azido 1,2-diaminoziklohexanotetraazetikoa (DCTA)



Azido dietilentriaminopentaazetikoa (DTPA)

12. irudia. Azido polikarboxiliko motako hortz anitzeko estekatzaile desberdinen egitura kimikoa.

3.2 ADIERAZLE METALOKROMIKOAK

Konplexuen formazioaren bidezko balorazioetan erabiltzen diren adierazle kimikoak adierazle metalokromikoak dira. Adierazle hauek talde elektroi-emaileak (Lewis-en baseak) dituzten konposatu organikoak dira, eta koordinazio-loturak eman ditzakete baloratu behar den ioi-metalikoarekin.

Adierazle metalokromikoen erabilera hurrengo prozesuan oinarritzen da:

a) Adierazleak disoluzioan dagoen metalarekin konplexu bat sortzen du eta bere kolorea aldatu egiten da:

$$M^{z+} + In^{q-} \rightleftarrows MIn^{z-q}$$

1 kolorea **2 kolorea**

b) Baloratzailean gehitzean, metalarekin erreakzionatu eta MY^{z-4} konplexua sortuko du. Ondorioz, adierazlea aske gelditzean bere kolorea aldatuko da eta balorazioaren amaiera adieraziko du:

$$MIn^{z-q} + Y^{4-} \rightleftarrows MY^{z-4} + In^{q-}$$

2 kolorea **1 kolorea**

Erreakzio hau eman dadin, beharrezkoa da disoluzioaren pH-an MY^{z-4} konplexua MIn^{z-q} konplexua baino egonkorragoa izatea ($K_{MIn}<K_{ML}$). Horrela, erreakzioa eskuinera desplazatuko da eta posible izango da balorazioaren amaiera detektatzea.

Hortaz, konplexuen bidezko balorazioetan, bi erreakzio emango dira, balorazio-erreakzioa eta adierazlearen erreakzioa. Sustantzia bat adierazle metalokromiko bezala erabili ahal izateko, In^{q-} eta MIn^{z-q} konplexuak kolore desberdina izan behar dute. Adierazle metalokromikoek, beraien azido-base ezaugarriak direla eta, hidrogeno ioiarekin erreakzionatu dezakete eta horren arabera kolore aldaketa jasan. Hortaz, balorazio disoluzioaren pH-a doitzean funtsezkoa da azken-puntua ongi ikusi ahal izateko.

Demagun kaltzioa EDTA disoluzio batekin baloratzen dela adierazle bezala eriokromo beltza erabiliz:

Balorazio-erreakzioa: $Ca^{2+} + Y^{4-} \rightleftarrows CaY^{2-}$

Adierazlearen erreakzioa: $Ca^{2+} + In^{2-} \rightleftarrows CaIn$

Gorria **Gorria**

$\uparrow\downarrow + H^+$

HIn^-

Urdina

$\uparrow\downarrow + H^+$

H_2In

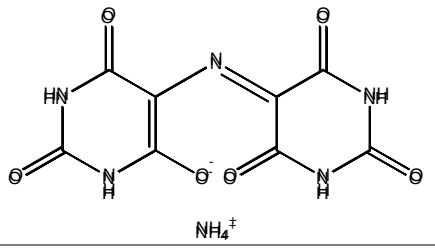
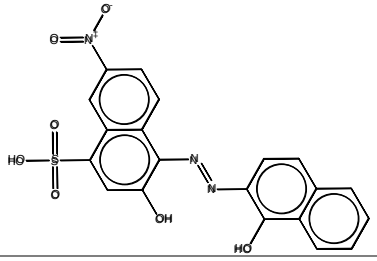
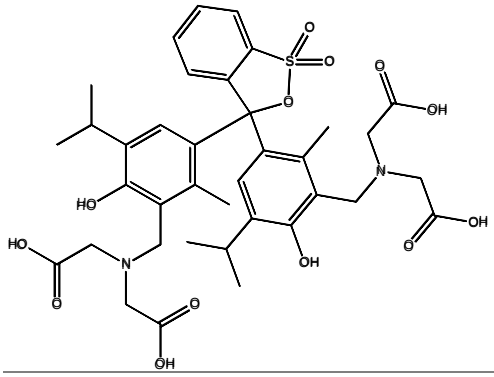
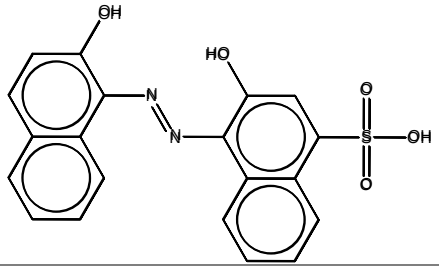
Laranja

Adibide honetatik ondorioztatu daiteke adierazle metalokromiko bat aukeratzean ezinbestekoa da disoluzioaren pH-a doitzea. CaIn konplexuaren eta adierazlearen forma

askearen koloreak ongi desberdindu daitezen, disoluzioaren pH-a doitu beharko da HIn^- espeziea nagusitu dadin.

Hurrengo taulan adierazle metalokromiko erabilien ezaugarriak zehazten dira:

2. Taula. Adierazle metalokromiko erabilienak eta horien ezaugarriak.

Adierazlea	Adierazlearen kolorea	MIn^{2-} konplexuaren kolorea	Oharrak
Murexida 	pH < 9, gorri-morea pH=9-11, morea pH>11, urdina-morea	Ca^{2+}-rekin gorria Cu^{2+}-arekin laranja Ni^{2+}-arekin horia	Kaltzioa baloratu behar bada, pH>11 izatea komeni da gorritik urdin-morerako aldaketa biziagoa baita.
Eriokromo beltza (NeT) 	pH < 6.4 gorria pH=6.4-11.5 urdina pH>11.5 laranja	Ca^{2+}, Zb^{2+} eta Mg^{2+}-arekin gorria da	Inguru basikoan oso erabilia da, NH_3/NH_4OH (pH=10) disoluzio indargetzailearekin.
Metiltimol urdina 	pH < 6.5 horia pH=6.5-11.5 urdina pH>11.5 grisa	Pb^{2+}, Zn^{2+}, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+} eta Cu^{2+}-arekin urdina	pH<6.5 denean erabiltzen da, non kolore aldaketa urdinetik horira den. Ca^{2+}, Cd^{2+} eta Cu^{2+} baloratu behar direnean pH>11.5 bada, urdinetik grisera.
Calcon 	pH < 7.3 gorria pH > 7.3 urdina	Ca^{2+}, Cd^{2+} eta Cu^{2+}-arekin arrosa	Balorazioa inguru basikoan (pH 10-11,5) egin behar da non adierazlearen kolore aldaketa arrosa-urdina den

3.3 KONPLEXUEN BIDEZKO BALORAZIO MOTAK

Ioi metaliko baten balorazioa EDTA konplexonarekin burutzeko, hiru metodologia edo prozedura desberdin jarraitu daitezke:

3.3.1 BALORAZIO ZUZENA

Balorazio zuzenetan baloratzailea EDTA disoluzio bat izaten da, eta baloragaia ioi metalikoa duen disoluzio bat, non aldez aurretik disoluzio indargetzailea eta adierazle egokia gehitu diren. Hurrengo taulan EDTArekin zuzenean baloratu daitezkeen ioi metalikoak eta balorazio baldintzak, adierazlea eta pHa, laburbiltzen dira:

3. Taula. EDTA-rekin baloratu daitezkeen ioi metalikoak.

Ioi metalikoa	Adierazlea	Balorazioaren pHa
Ba^{2+}	MTB	9-12 (NH_3 diluitua)
Bi^{3+}	MTB, XO, PAR	2-3 (HNO_3 diluitua)
Ca^{2+}	Murexida	12,0 (NaOH)
Co^{2+}	MTB, XO	5-6 (hexamina indargetzailea)
	Murexida	8 (NH_4Cl/NH_3 indargetzailea)
Cu^{2+}	XO	5-6 (hexamina indargetzailea)
	Murexida	8,0 (NH_3 diluitua)
Mg^{2+}	NET	9-10 (NH_4Cl/NH_3 indargetzailea)
Ni^{2+}	XO	5-6 (hexamina indargetzailea)
	Murexida	8-9 (NH_4Cl/NH_3 indargetzailea)
Pb^{2+}	XO, MTB	5-6 (hexamina indargetzailea)
	NET	9-10 (NH_4Cl/NH_3 indargetzailea)
Zn^{2+}	XO, MTB	5-6 (hexamina indargetzailea)
	NET	9-10 (NH_4Cl/NH_3 indargetzailea)
XO: xileno laranja: PAR: 1-(2-piridazol)-2-naftol MTB: metiltimol urdina		

3.3.2 ATZERAKO BALORAZIOA

Balorazio zuzena hurrengo arrazoi bategatik erabili ezin daitekenean atzerako balorazioa aplikatzen da. 1) determinatu behar den metalarentzat adierazle egokirik ez dagoenean; 2) disoluzioaren pH balioan ioi metalikoa disolbatuta ez dagoenean, hauspeatzen delako adibidez; 3) ioi metalikoak EDTArekin sortzen duen konplexuaren formazioaren zinetika oso geldoa delako, besteak beste, ioi tri- eta tetrabalenteen balorazioan (Cr^{3+}, Al^{3+}, Fe^{3+}, Zr^{4+}, etab.).

Baloragaiaren disoluzioan (M^{2+}) kontzentrazio ezaguneko EDTA disoluzio baten bolumen ezaguna gehitzen da, beti ere EDTA estekatzailea behar baino gehiago gehitu behar dela kontuan izanik:

$$M^{2+} + Y^{4-} \text{ (soberan)} \rightleftarrows MY^{2-} + Y^{4-} \text{ (erreakzionatu gabe)}$$

Baloragaiarekin erreakzionatu ez duen EDTA, ioi metaliko baten disoluzio estandar batekin baloratzen da, Zn^{2+}, Mg^{2+} edo Pb^{2+}.

$$Pb^{2+} + Y^{4-}\text{(erreakzionatu gabe)} \rightleftarrows PbY^{2-}$$

Orokorrean, pHa basikoa bada (pH=9-10) Zn^{2+} ioi metalikoaren disoluzio patroia erabiltzen da baloratzaile bezala, eta Pb^{2+} disoluzio bat pH-a azidoa bada (pH=5-6). EDTArekin sortzen diren konplexuen estekiometria 1:1 denez, gehitutako EDTA mol kopurua eta erreakzioetan parte hartu duten bi ioi metalikoen batura (M^{2+} eta Pb^{2+}) berdindu daitezke:

$$n_Y = n_M + n_{Pb} \qquad (17)$$

hortaz, M^{2+} analitoaren mol kopurua disoluzioan hurrengoa izango da:

$$n_M = n_Y - n_{Pb} \qquad (18)$$

3.3.3 ORDEZKAPEN BALORAZIOA

Ordezkapen balorazioa atzerako balorazioaren ordez erabili daitekeen beste aukera bat da. Balorazio mota honetan baloragaiaren disoluzioari (M^{2+}) ioi metaliko laguntzaile baten konplexua ($M_{lag}Y^{2-}$) gehitzen zaio (MgY^{2-}, MnY^{2-} edo ZnY^{2-}). M^{2+} analitoak M_{lag}^{2+} ordezkatu eta EDTArekin MY^{2-} konplexua sortuko du. Horretarako, ezinbestekoa da MY^{2-} konplexua $M_{lag}Y^{2-}$ konplexua baino egonkorragoa izatea.

$$M^{2+} + M_{lag}Y^{2-} \rightleftarrows M_{lag}^{2+} + MY^{2-}$$

Ioi metaliko laguntzailea Mg^{2+} bada, aske gelditzen denean EDTA eta eriokromo beltza adierazlea erabiliz baloratu daiteke. Ordezkapen balorazioetan, ioi laguntzailea baloratzeko

erabiltzen den EDTA mol kopurua eta disoluzioan zegoen M^{2+} analitoaren mol kopurua berdina da:

$$n_M=n_{Mg=}n_Y \qquad (19)$$

3.4 APLIKAZIOAK

Konplexuen bidezko balorazio gehienetan EDTA konplexonaren disoluzio bat erabiltzen da baloratzaile bezala. Normalean, $YH_2Na_2.2H_2O$ gatz disodiko eta dihidratatua erabiltzen da, baina ez da patroi primario bezala erabiltzeko beharrezkoa den purutasunarekin merkaturatzen. Hortaz, bere estandarizazioa beharrezkoa da eta horretarako $CaCO_3$ erabiltzen da.

Konplexuen bidezko balorazioen aplikazio nagusietako bat uraren gogortasunaren determinazioa da, hots, Ca^{2+} eta Mg^{2+}-aren determinazioa.

Uraren gogortasuna ioi metalikoen kontzentrazioen batura da, ioi alkalinoak eta hidrogeno ioia izan ezik. Naturako uretan, neurri desberdinean, kaltzio eta magnesioa dira ioi metaliko nagusiak, kareharriaren kaltzio karbonato eta magnesio karbonatotik erauziak. Hortaz, uraren gogortasuna Ca^{2+} eta Mg^{2+} ioien kontzentrazioen batura da, eta $CaCO_3$ mg/L bezala adierazten da. Emaitza gradu frantses (°f) edo gradu hidrotimetrikotan (°H) ere eman daiteke, non gradu frantses edo hidrotimetriko bat 10 mg/L $CaCO_3$ diren.

Uraren gogortasunaren determinazioa balorazio zuzenaren bidez egiten da, eta kaltzio eta magnesioa bereizteko aukera ematen du. Balorazio hau burutzeko, kontzentrazio ezaguneko EDTA patroi primarioaren disoluzio bat prestatu behar da.

Kaltzio ioiari dagokion gogortasuna: balorazio honetan murexida adierazlea erabiltzen da eta pH-a 12 izan behar da. Baldintza horietan, magnesioa ez da baloratzen, $Mg(OH)_2(s)$ bezala hauspeatzen baita. Hortaz, balorazioan erabili den EDTA mol kopurua eta laginean dagoen Ca^{2+} mol kopurua berdindu daitezke.

Gogortasun totala: Gogortasun totala kaltzio eta magnesio ioien balorazioan oinarritzen da eta baloratzailea EDTA disoluzioa da. Balorazioan eriokromo beltza adierazlea erabiltzen da eta pH-a 10 izan behar denez, ez da magnesioaren hauspeaketa ematen, eta ondorioz, EDTA konplexonak kaltzio eta magnesio ioiekin sortuko ditu konplexuak. Hortaz,

balorazioan erabilitako EDTA molak (n_y), kaltzio molen (n_{Ca}) eta magnesio molen (n_{Mg}) baturari dagokio.

$$n_Y = n_{Ca} + n_{Mg} \qquad (20)$$

Magnesio ioiari dagokion gogortasuna: aurreko ataletan komentatutakoaren arabera, magnesio ioiaren kontzentrazioa gogortasun totala eta kaltzio ioiari dagokion gogortasunaren arteko desberdintasuna da.

3.5 PRAKTIKAK

URAREN GOGORTASUNAREN DETERMINAZIOA

1-. SARRERA

Konplexometriak edo konplexuen bidezko bolumetriak ur disoluzio batean dagoen katioiaren eta estekatzailearen artean ematen den erreakzioan oinarritzen dira. Balorazio hauen azken puntuaren determinaziorako adierazle metalokromiko bat erabiltzen da.

EDTA estekatzaile edo konplexonak katioi metalikoarekin erreakzionatzen du 1:1 estekiometrian sortutako konplexuak disolbagarriak, koloregabeak eta egonkorrak direlarik.

$$H_2Y^{2-} + Me^{2+} \rightleftarrows MeY^{2-} + 2H^+$$

Era berean, adierazle metalokromikoek katioi metalikoekin konplexu koloredunak sortzen dituzte. Konplexu hauen egonkortasuna katioi metalikoak konplexonarekin sortzen duen konplexuarena baino txikiagoa izango da. Beraz, konplexonak adierazlea desplazatzean kolore aldaketa emango da.

$$Me\text{-}Ind + Y^{4-} \rightleftarrows MeY^{2-} + Ind$$

Praktika honetan bi adierazle erabili behar dira. Lehenengo pausu batean, kaltzioa eta magnesioa batera baloratuko dira adierazle bezala T eriokromo beltza (NeT) erabiliz eta disoluzioaren pH-a 10ean doituz. Ondoren, bigarren pausu batean, kaltzioa soilik baloratuko da pH-a 12n finkatuz eta murexida adierazlea erabiliz.

2-. HELBURUA

Uraren gogortasunaren determinazioa (kaltzio eta magnesioaren determinazioa) AEDT edo EDTA (azido etilendiaminotetraazetikoa) baloratzaile bezala erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa

Bureta

Erlenmeyerrak

Matraze aforatuak

Pipeta graduatuak

Hauspeakin-ontziak

Erloju-beira

EDTA

NH_4Cl-NH_3 disoluzioa

NaOH

T Eriokromo beltza (NeT)

Murexida

4-. PROZEDURA

4.1. EDTA disoluzioa prestatu.

EDTA 0.1 N disoluzio bat prestatzeko, beharrezkoa den EDTA kantitatea pisatu, ur desionizatutan disolbatu eta 250 mL-ko matraze batera eraman. Vitoria-Gasteizko uraren kaltzio eta magnesio kontzentrazioak 40 mg/L eta 8 mg/L hurrenez hurren direla jakinik, prestatu den EDTA 0.1 N disoluzioaren diluzio egokia burutu.

4.2. Kaltzio eta magnesioaren determinazioa.

Txorrotako uraren 10 mL hartu eta erlenmeyer batera eraman. Ura gehitu ondoren (50 mL gutxi gora behera) prestatuta dagoen NH_4Cl-NH_3 disoluzio indargetzailearen 2 mL eta eriokromo beltza (NET) adierazlearen 2 tanta gehitu. Disoluzioa ondo nahastu ondoren, more bilakatuko da. Balorazioa egiteko buretatik diluitutako EDTA gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa, disoluzioa urdina denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatzi.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

4.3. Kaltzioaren determinazioa.

Txorrotako uraren laginaren beste 10 mL hartu eta erlenmeyer batera eraman. Ura gehitu ondoren (50 mL gutxi gora behera), pH-a 12 izan dadin, 2-3 ale NaOH bota eta ondo nahastu aleak erabat disolbatu arte. Ondoren, murexida kantitate txiki bat gehitu eta disoluzioa ondo nahastu kolore arrosa izan arte. Balorazioa egiteko, buretatik, diluitutako EDTA gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa, disoluzioa morea denean bukatuko da. Erabilitako bolumena apuntatu.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

Adierazleen kolore aldaketa ondo ikus dadin, erlenmeyer batean ur desionizatua, NH_4Cl-NH_3 disoluzio indargetzailea edo NaOH eta laginei bota zaien adierazle kantitate berdina botatzea gomendatzen da. Honela, disoluzio honetan adierazlea aske aurkitzen denez, laginak balorazioa bukatzean izan beharko duen kolorea adieraziko du.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. EDTA 0.1 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak.

5.2. Laginaren balorazioa egiteko EDTA 0.1 N disoluzioaren diluzioaren kalkulua.

5.3. Kaltzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4. Kaltzio eta magnesioaren balorazioaren emaitzak.

5.5. Ur laginak duen kaltzio eta magnesioaren kontzentrazioaren determinazioa (mg/L-tan). Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

5.6. Uraren gogortasunaren kalkulua $CaCO_3$ mg/L bezala eta gradu frantsesetan (1ºf=10 mg/L $CaCO_3$). Bietan batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

KALTZIOAREN DETERMINAZIOA SENDAGAI BATEAN

1-. SARRERA

Kaltzioa hezurren egituran elementu nagusia da eta aktibitate muskularrean eta transmisio neuromuskularrean parte hartzen du. Gaur egun, kaltzioa osteoporosiaren tratamenduan erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Kaltzioaren determinazioa Calcium Sandoz sendagaiaren konprimatu batean.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
Motrailua/almaiza
EDTA
NaOH
Murexida

4. PROZEDURA

Espezifikazio farmazeutikoen arabera, Calcium Sandoz sendagaiak duen kaltzio kantitatea kontuan izanik, aurretratamendu egokia plantea ezazu (beharrezkoa den EDTA disoluzioaren kontzentrazioa kalkulatu). Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepika ezazu.
Hurrengo pausuak ikasleak ondorioztatu beharko ditu lehenengo atalean egindakoa kontuan izanik.

5. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Baloratzailearen kontzentrazioaren kalkulua, Calcium-Sandoz konprimatu baten kaltzioaren determinazioa egiteko.

5.2. Kaltzioaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Konprimatu batek duen kaltzioa kalkulatu (mg Ca/konprimatu). Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera adierazi (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%)eta errore erlatiboa kalkula itzazu.

KALTZIOAREN DETERMINAZIOA RINGER SOLUZIO BATEAN

1-. SARRERA

Ringer laktato soluzio injektagarria elektrolitoen soluzio isotonikoa da eta bere konposizioan sodio kloruroa, potasio kloruroa, kaltzio kloruro dihidratatua eta sodio laktatoa du. Hortaz, soluzio honek ura eta hiru katioi garrantzitsuenak ditu deshidratazioetan elektrolitoen balantzea mantentzeko; laktatoak, aldiz, azidosi metabolikoetan alkalinizatzaile bezala jokatzen du.

2-. HELBURUA

Ringer soluzioan dagoen kaltzioaren determinazioa konplexuen bidezko balorazioa erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
Motrailua/almaiza
EDTA
NaOH

4-. PROZEDURA

Ringer soluzioan kaltzioa $CaCl_2.2H_2O$ bezala aurkitzen da %0.02 kontzentrazioan. Espezifikazio hauen arabera, prozedura egokia plantea ezazu (beharrezkoa den EDTA disoluzioaren kontzentrazioa kalkulatu). Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepika ezazu.
Hurrengo pausuak ikasleak ondorioztatu beharko ditu lehenengo atalean egindakoa kontuan izanik.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Baloratzailearen kontzentrazioaren kalkulua.

5.2. Kaltzioaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Soluzioak batek duen kaltzio portzentajea kalkulatu. Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera adierazi (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) eta errore erlatiboa kalkula itzazu.

4. HAUSPEATZE-BALORAZIOAK

4.1 SARRERA

Hauspeatze-balorazioak eta analisi grabimetrikoak, prezipitazio oreka heterogeneoen aplikazio kuantitatiboak dira. Hauspeatze-balorazioetan, M espeziea A baloratzailea gehitzean hauspeatu eta MA(s) prezipitatu edo hauspeakinaren formazioa emango da:

$$mM + nA \rightleftarrows M_mA_n(s)$$

Disolbagarritasuna (s), hauspeakinaren eta disoluzioaren arteko oreka lortzen denean, disoluzioan egon daitezkeen ioien kontzentrazioa da. Hauspeakin baten eta bere ioien oreka disoluzioan adieraztean kontrakoa idazten da:

$$M_mA_n(s) \rightleftarrows mM + nA$$

Oreka horri dagokion konstantea da disolbagarritasun-biderkadura,

$$Ks = [M]^m[A]^n \qquad (21)$$

Erreakzio honek hurrengo baldintzak bete behar ditu:

- *Kuantitatiboa izatea:* sortzen den hauspeakina disolbaezina izan behar da (Ks balio baxua) balorazioaren baldintzetan, erreakzioa guztiz ematen dela bermatu ahal izateko.
- *Estekiometrikoa:* Sortzen den espeziearen konposizioa ezaguna izan behar da.
- *Azkarra:* Erreakzioa orekara azkar heldu behar da.
- *Sistema adierazle egokia egon behar da:* Prezipitazio balorazioetan erabili daitezkeen adierazle gutxi daude, eta horrek aplikazioak mugatzen ditu.

Baldintza hauek betetzen dituzten hauspeatze-erreakzio gutxi daude. Halere, gaur egun, hauspeatze-balorazioek garrantzi handia daukate zenbait kalitate kontrolerako prozeduratan sistema adierazle fisiko-kimikoei esker, adierazle potentziometriko eta konduktimetrikoak esate baterako.

4.2 HAUSPEATZE-ADIERAZLEAK

Gaur egun, balorazioaren azken-puntua detektatzeko teknika potentziometrikoak erabiltzen dira, batez ere elektrodo ioi-selektiboak. Halere, adierazle kimikoak ere erabil daitezke. Bi motatako adierazle kimikoak daude:

Alde batetik, azken-puntuan hauspeakin edo konplexu koloredunak sortzen dituzten adierazleak daude. Kasu horietan ez da konposatu baten kolorea aldatzen, baizik eta koloredun konposatu bat sortzen da. Erabilienak CrO_4^{2-} eta Fe^{3+} dira. CrO_4^{2-}-ak Ag^+-az errazkzionatzean hauspeakin gorria sortzen du; Fe^{3+}-ak aldiz, SCN^--arekin erreazionatzean konplexu gorria sortuko du. Adierazle horiek Mohr metodoan eta Volhard metodoan erabiltzen dira.

Bestalde, adsortzioa adierazleak kolore desberdina hartzen dute disoluzioan daudenean edo hauspeakinean adsorbatuta daudenean. Adsortzioa hauspeakinak duen azaleko kargaren arabera ematen da. Hauspeatze-balorazioen aplikazioetan azalduko den Fajans metodoan adierazle horien oinarri teorikoa azalduko da.

4.3 APLIKAZIOAK

4.3.1 MOHR METODOA

Mohr metodoa kloruro eta bromuroen balorazio zuzena da, non zilar disoluzio bat gehitzean AgCl(s) eta AgBr(s) hauspeakinak sortzen diren.

Adierazlea bezala potasio kromatoa erabiltzen da. Zilarrak kloruro eta bromuro anioiekin guztiz erreakzionatu duenean kromatoarekin bigarren hauspeakin gorri bat sortzen du balorazioa bukatu dela adieraziz.

Balorazio-erreakzioa:

$$Cl^- + Ag^+ \rightleftarrows AgCl(s) \quad K_S = [Cl^-][Ag^+] = 10^{-9.8}$$

$$Br^- + Ag^+ \rightleftarrows AgBr(s) \quad K_S = [Br^-][Ag^+] = 10^{-12.3}$$

Adierazlearen erreakzioa:

$$CrO_4^{2-} + 2Ag^+ \rightleftarrows Ag_2CrO_4(s)\ K_S = [CrO_4^{2-}]\,[Ag^+]^2 = 10^{-11.9}$$

Bistan denez, zilar kromatoa adierazle bezala erabili ahal izateko, AgBr(s) eta AgCl(s) hauspeakinen disolbagarritasuna Ag_2CrO_4 (s) hauspeakinarena baino txikiagoa izan behar dela.

Bestalde, disoluzioaren pH-a garrantzi handikoa da, eta balorazioa burutzeko neutroa izan behar da. pH-a azidoa bada, kromatoa dikromatora pasatzen da, eta ondorioz, ez da zilar kromatoa sortzen. pH-a basikoa bada, aldiz, zilarra hidroxido prezipitatuak sortzen dira. Kloruro eta bromuro ioiak ez bezala, ioduro ioiak ezin dira Mohr metodoarekin baloratu, zilar ioduro prezipitatuan kromatoen adsortzioa ematen baita.

4.3.2 VOLHARD METODOA

Metodo honen helburua zilarraren balorazio zuzena da. Baloratzaile bezala tiozianato disoluzio bat erabiltzen da, eta adierazle gisa Fe^{3+}-ren gatz bat (adib. alunbre ferrikoa, $NH_4Fe(SO_4)_2$). Balorazioa inguru azidoan burutzen da burdina (III) hidroxido hauspeakina sor ez dadin.

Balorazio-erreakzioa:

$$Ag^+ + SCN^- \rightleftarrows AgSCN_{(S)} \quad \text{(zuria)}$$

Adierazlearen erreakzioa:

$$Fe^{3+} + SCN^- \rightleftarrows Fe(SCN)^{2+}_{(S)} \quad \text{(gorria)}$$

Halere, metodo honen aplikazio nagusia haluroen determinazioa da atzerako balorazio baten bidez. Abantaila nagusia inguru azidoan burutu daitekeela da, inguru neutro edo basikoan zilarrak sor ditzakeen gatz disolbaezinen sorrera saihesten baita.

Metodo honen prozedura disoluzioan $AgNO_3$ disoluzio bat neurriz gain botatzea da. Ondoren, erreakzionatu ez duen zilarra tiozianato disoluzio patroi batekin baloratuko da.

Kloruroen determinazioan, AgCl hauspeakina AgSCN baino disolbagarriagoa denez, tiozianatoak AgCl bezala hauspeatu den zilarrarekin ere erreakzionatuko du eta, ondorioz, lortuko den kloruroen kontzentrazioa benetako balioaren azpitik egongo da.

$$AgCl(s) + SCN^- \rightleftarrows AgSCN(s) + Cl^-$$

Errore hau nitrobentzenoa gehituz ekidin daiteke, honek AgCl(s) hauspeakina estali eta bere berdisoluzioa saihesten baitu. Dena den, nitrobentzenoaren toxikotasuna dela eta, bere erabilera ez da gomendagarria. Beste aukera bat soberan gehitu den zilarraren atzerako balorazioaren aurretik, AgCl(s) hauspeakina iragaztea da.

Beste haluroen kasuan, zilarrarekin sortzen dituzten hauspeakinen disolbagarritasuna AgSCN-arena baino txikiagoa denez, ez da beharrezkoa nitrobentzenoa gehitzea edo hauspeakina iragaztea.

Ioduro anioiaren determinazioan, ingurune azidoa lortzeko azido nitrikoa gehitzen baldin bada ioduroaren oxidazioa eman daiteke. Hori gerta ez dadin, zilarra inguru neutroan gehitzea gomendatzen da eta ondoren, atzerako balorazioa gauzatzeko, disoluzioa azidotu behar da.

Atzerako Volhard metodoa, zilarrarekin prezipitatu disolbaezin bat sortu dezakeen edozein anioiren determinaziorako erabil daiteke.

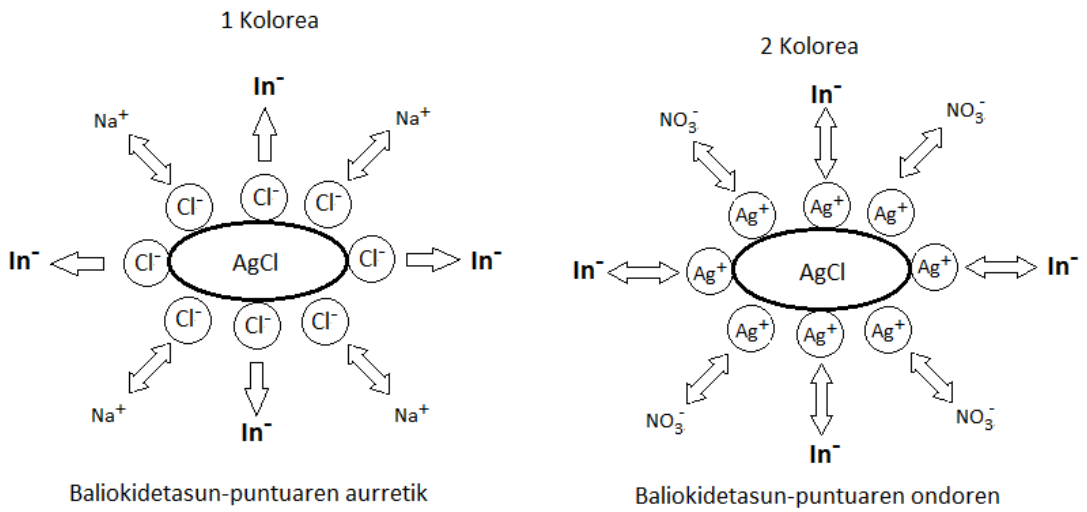
4.3.3 FAJANS METODOA

Metodo hau Fajans eta Hassel-ek 1923. urtean erabiltzen hasi ziren adsortzio-adierazleetan oinarritzen da. Adsortzio-adierazleak konposatu organikoak dira eta azido ahulak (adierazle anionikoak) edo base ahulak (adierazle kationikoak) izan daitezke. Adsortzio-adierazlea elektrostatikoki adsorbatzen dira prezipitatu koloidaletan, eta ondorioz kolorea aldatzen dute.

Adsortzio-adierazleek nola jokatzen duten ulertzeko, hauspeakinak duen karga elektrikoa kontuan izan behar da. Ag^+ disoluzio bat Cl^- disoluzio bati gehitzen zaionean, baliokidetasun-puntura heldu aurretik disoluzioan Cl^- ioiak aurkitzen dira. Hauspeakinek ioiak adsorbatzeko joera dutenez, AgCl hauspeakinaren gainazalean Cl^- ioien adsortzioa emango da, eta hauspeakinak karga negatiboa izango du. Baliokidetasun-puntuaren ostean, disoluzioan dauden Ag^+ ioiak AgCl hauspeakinaren gainazalean adsorbatuko dira, eta hauspeakina positiboki kargatuko da.

Ohiko adsortzio-adierazleak anionikoak dira eta baliokidetasun-puntuaren ostean sortzen den karga positibodun hauspeakinak erakarri egingo ditu. Adierazle anioniko hauek hauspeakinaren gainazalean adsorbatzen direnean kolore aldaketa jasaten dute. Adsortzio-

adierazleak azido edo base ahulak direnez, disoluzioaren pH-ak forma ionizatua nagusitzen dela bermatu beharko du.



13. Irudia. Adsortzio-adierazleen erabileraren oinarria.

Adierazle anionikoak, fluoreszeina eta honen deribatuak adibidez, haluroak zilarrarekin baloratzeko egokiak dira. Esate baterako, kloruroak zilarrarekin baloratzean, baliokidetasun-puntuan diklorofluoreszeina adierazleak fluoreszentzia galtzen du eta kolorea hori-berdexkatik arrosara aldatzen da. Adierazle kationikoak, rodaminen taldekoak, haluroekin prezipitatu koloidalak sortu ditzaketen katioien determinazioan erabiltzen dira.

4. Taula. Adsortzio-adierazleak.

ADIERAZLEA	Kolore aldaketa	Baloragaia	pH
Anionikoak			
Sodio fluoreszeinatoa	Berde horixka-arrosa	Cl^-, Br^-	Neutroa edo pixka bat basikoa
Sodio 2,7-diclorofluoreszeinatoa	Berde horixka-arrosa	Cl^-, Br^-	Pixka bat azidoa
Sodio eosinoatoa	Arrosa-gorria	Cl^-, I^-	Azidoa
Kationikoak			
Rodamina 6G	Gorria-morea	Ag^+-a Br^--ekin	
Fenosafrina	Gorria-urdina	Ag^+-a Br^--ekin	

Hauspeatze-balorazioen aplikazio garrantzitsuenetan zilar ioia erabiltzen da baloratzaile bezala. Arrunki, zilar nitrato 0.1 M disoluzioak prestatzen dira, gatza disolbatuz edo zilar metalikoa (patroi primarioa) azido nitrikoarekin erreakzionaraziz. Zilar nitrato disoluzioa patroi primario egoki batekin estadarizatu behar da aipatutako adierazleak edo detektzio potentziometrikoa erabiliz. Patroi primario hori sodio kloruroa izan daiteke, baina hau aldez aurretik bi orduz 120 °C-tan lehortu behar da.

Hautsak, materia organikoak eta argiak zilar nitrato solido eta bere disoluzioen zilar ioiaren erredukzioa katalizatu dezakete, zilar metalikoa emateko. Hortaz, baldintza egokietan biltegiratuko dira.

4.3.4 GRABIMETRIAK

Analisi grabimetrikoa analito baten kantitatea edota kontzentrazioa lortutako produktu baten pisua ezagutzean datza. Arrunki, erreakzio baten produktu bat edo horren deribatu estekiometriko bat erabiltzen da. Hortaz, metodo grabimetrikoak garatzeko balantza analitikoa beharrezkoa da, zeinen kalibrazioa erreferentziazko pisuekin egiten baita.

Hiru metodo grabimetriko desberdin deskribatu daitezke:

1) *Lurrunketa bidezko metodo grabimetrikoak:* determinatu behar den konposatua lurrunkorra da eta laginarengandik destilazioz bereizten da.
2) *Elektrograbimetriak:* katodo eta anodo baten artean potentzial-diferentzia bat jartzean, ioi metaliko bat bere egoera elementalera erreduzitu daiteke eta katodoaren gainean jarri. Katodoaren hasierako pisuaren eta elektrolisi prozesuaren osteko pisuaren arteko diferentziak analitoaren kantitatea emango du.
3) *Hauspeakinaren formazioan oinarritzen diren metodo grabimetrikoak:* grabimetriak izen generikoarekin ezagutzen diren erreakzioak dira. Hauspeatze-balorazioekin batera, hauspeatze-oreka heterogeneoen aplikazioak dira. Metodo grabimetriko hauen prozedura ondoren zehazten da: analitoa (M) duen laginari erreaktibo hauspeatzaile (X) bat gehitzen zaio baldintza esperimental jakinetan. MX hauspeakinaren formazio kuantitatiboaren ondoren, hau iragazi egin behar da. Hauspeakin horrek, tratamendu termiko baten ostean, pisatuko den espezie kimikoa emango du eta aplikatu den tratamendu termikoaren arabera, hasierakoaren berdina (MX) edo desberdina (MR) izan daiteke.

Prezipitazioaren ostean lortzen den espezieak baldintza batzuk bete behar ditu analisi grabimetrikoan erabili ahal izateko: 1) erreakzioa kuantitatiboa eta selektiboa izan behar da; 2) hauspeakina egonkorra eta propietate mekaniko onak izan behar ditu iragazketa ongi burutu dadin.

Hauspeakinak baldintza horiek betetzen baditu, hezetasuna kentzeko beroa aplikatzen da (80-120 °C). Hauspeakinaren estekiometria definitu ez bada, edo ezegonkorra bada, kaltzinazio prozesu bat aplikatu daiteke konposizio kimiko zehatz eta egonkorra duen hauspeakina lortzeko.

4.4 PRAKTIKAK

ZILAR NITRATO DISOLUZIO BATEN ESTANDARIZAZIOA

1. SARRERA

Hauspeatze-balorazioen aplikazio garrantzitsuenetan zilar ioia erabiltzen da baloratzaile bezala. Zilar nitrato disoluzioak prestatzeko, gehienetan, bere gatza uretan disolbatuz burutzen da. Zilar nitrato disoluzioa ez da patroi primarioa eta, ondorioz, egoki batekin estadarizatu behar da. Patroi primario hori sodio kloruroa izan daiteke, baina hau aldez aurretik bi orduz 120 °C-tan lehortu behar da.

2. HELBURUA

Zilar nitrato 0.01 N disoluzio baten estandarizazioa patroi primario bezala sodio kloruroa erabiliz.

3. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
$AgNO_3$ gatza
K_2CrO_4 disoluzioa
NaCl gatza

4. PROZEDURA

4.1. $AgNO_3$ 0.01Ninguruko disoluzio bat prestatu

$AgNO_3$ 0.01 N disoluzio baten 500 ml prestatzeko beharrezkoa den erreaktibo kantitatea kalkula ezazu. Ondoren, disoluzioa prestatu ezazu.

4.2. Prestatu den $AgNO_3$ disoluzioaren estandarizazioa

Aldez aurretik berogailuan 120 °C-tan lehortu den NaCl kantitate zehatz bat pisatu eta erlenmeyer batera eraman. Ur desionizatutan erabat disolbatu (50 mL gutxi gora behera) eta K_2CrO_4 bi tanta gehitu.

Balorazioa egiteko buretatik estandarizatu nahi den $AgNO_3$ disoluzioa pixkanaka gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioaren kolorea laranja denean bukatuko da. Erabilitako bolumena idatz ezazu. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepika ezazu.

4.3. Balorazioan egindako errorearen estimazioa

Ur distilatuaren 10 ml hartu eta 250 ml-tako erlenmeyer batetara eramaten da eta potasio kromato adierazlearen bi tanta gehituko zaizkio. Buretatik zilar nitrato disoluzioa botako da disoluzioaren kolorea gorria izan arte. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

5. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. $AgNO_3$ 0.01 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak.

5.2. $AgNO_3$ 0.01 N disoluzioa baloratzeko behar den NaCl kantitatearen estimazioa.

5.3 $AgNO_3$ disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4 $AgNO_3$ disoluzioaren normalitatearen batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala).

KLORUROEN DETERMINAZIOA SERUM FISIOLOGIKOAN

1-. SARRERA

Serum fisiologikoa sodio kloruro %0.9 duen soluzio esterila da. Farmazia bulegoetan dosi bakarreko anpuluetan edo bolumen handiagoko flaskoetan aurki daiteke zauriak, sudurra edo begiak garbitzeko.

Serum fisiologikoaren kloruroaren kontzentrazioa, eta, hortaz, sodio kloruroarena, Mohr metodoa erabiliz burutu daiteke. Kloruroek zilar nitratoarekin erreakzionatzean zilar kloruro hauspeakina sortuko dute. Ondoren, zilar nitratoa soberan gehitzean zilar kromato hauspeakin gorria sortuko da.

$$Ag^+ + Cl^- \rightleftarrows AgCl \text{ (zuria)}$$

$$2Ag^+ + CrO_4^{2-} \rightleftarrows Ag_2CrO_4 \text{ (gorria)}$$

Zilar kromatoaren hauspeaketarako behar den zilar nitrato disoluzioaren bolumena ezagutzeko txuri bat egin behar da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua sodio kloruroaren determinazioa burutzea da serum fisiologikoan Morh metodoa erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
$AgNO_3$ 0.01 N disoluzioa
K_2CrO_4 disoluzioa

4-. PROZEDURA

4.1. Laginaren prestaketa

Serum fisiologikoak duen kloruroen kontzentrazioa kontuan izanik, eta $AgNO_3$ 0.01 N disoluzioa erabili behar dela jakinik, diluzio egokia prestatu ezazu.

4.2. Balorazio-erreakzioa

Serum fisiologikoaren 10 ml hartu eta 250 ml-tako erlenmeyer batetara eramango da eta potasio kromato adierazlearen bi tanta gehituko zaizkio. Balorazioa egiteko buretatik aldez aurretik prestatu den zilar nitrato disoluzioa gehituko da disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioa laranja denean bukatuko da. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

4.3. Balorazioan egindako errorearen estimazioa

Ur distilatuaren 10 ml hartu eta 250 ml-tako erlenmeyer batetara eramaten da eta potasio kromato adierazlearen bi tanta gehituko zaizkio. Buretatik zilar nitrato disoluzioa botako da disoluzioaren kolorea gorria izan arte. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Kloruroen balorazioaren emaitzak.

5.2. Txuriaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Serum fisiologikoak duen sodio kloruroaren determinazioa portzentaje bezala. Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

KLORUROEN DETERMINAZIOA ITSASOKO UR HIPERTONIKOAN

1-. SARRERA

Eskuarki, itsasoko ur hipertonikoa sudurreko garbiketak egiteko erabiltzen da gaixoak sudur-kongestio edo rinitisa duenean. Sodio kloruroaren kontzentrazioa %2,3 izaten da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua itsasoko ur hipertonikoak duen sodio kloruro kontzentrazioaren determinazioa da.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
$AgNO_3$ disoluzioa
K_2CrO_4 disoluzioa

4. PROZEDURA

4.1. Laginaren prestaketa

Serum fisiologikoak duen kloruroen kontzentrazioa kontuan izanik, eta $AgNO_3$ 0.01 N disoluzioa erabili behar dela jakinik, diluzio egokia prestatu ezazu.

4.2. Balorazio-erreakzioa

Aurreko praktikan erabilitako prozedura jarraituz, itsasoko ur hipertonikoak duen kloruroen kontzentrazioa determinatu behar da. Itsasoko urak duen kloruroen kontzentrazioa oso handia denez, baloratu aurretik diluitu beharko da. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

4.3. Balorazioan egindako errorearen estimazioa

Ur distilatuaren 10 ml hartu eta 250 ml-tako erlenmeyer batetara eramaten da eta potasio kromato adierazlearen bi tanta gehituko zaizkio. Buretatik zilar nitrato disoluzioa botako da disoluzioaren kolorea gorria izan arte. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZA

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Kloruroen balorazioaren emaitzak.

5.2. Txuriaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Itsasoko ur hipertonikoak duen sodio kloruroaren determinazioa portzentaje bezala. Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

5. ERREDOX-BALORAZIOAK

5.1 SARRERA

Erredox-balorazioak erredox propietateak dituzten konposatu ezorganiko eta organiko anitzen determinazioan interes handia duten metodo klasikoa dira. Edozein erredox-erreakzio hurrengo erreakzioaren bidez adieraz daiteke:

$$nOx_1 + nErred_2 \rightleftarrows nErred_1 + nOx_2$$

non *Ox* espezie oxidatua eta *Erred* espezie erreduzitua den.

Orekan hori eman dadin, bi erdi-erreakzioren arteko elektroien transferentzia eman behar da. Alde batetik, konposatu bat oxidatu eta elektroiak askatuko ditu. Bestetik, beste konposatu batek elektroiak onartuko ditu bera erreduzituz.

Oxidazioa	$Zn \rightleftarrows Zn^{2+} + 2e^-$	$E°_{Zn^{2+}/Zn} = -0.76$ V
Erredukzioa	$Cu^{2+} + 2e^- \rightleftarrows Cu$	$E°_{Cu^{2+}/Cu} = 0.35$ V
	$Zn + Cu^{2+} \rightleftarrows Zn^{2+} + Cu$	

Erdi-erreakzioetako erredox bikote bakoitzaren oxidatzeko edo erreduzitzeko ahalmena erredukzio potentzial estandarrak ematen du (baldintza estandarretan). Horrela, potentzial estandarraren balioa zenbat eta handiagoa izan, handiagoa izango da erredox bikote horren ahalmen oxidatzailea.

Nernst-en ekuazioa baldintza estandarretatik (1 M, 1 atm, 25 °C) kanpo dagoen erdi-erreakzio baten potentziala kalkulatzeko erabiltzen da:

$$E = E° + \frac{0.06}{n} \log \frac{[\text{Oxidatzailea}]^n}{[\text{Erreduktorea}]^n} \qquad (22)$$

Oxidatzailearen eta erreduktorearen kontzentrazioak jakinez gero, eta erredukzio potentziala jakina bada, potentzialaren balioa kalkula daiteke.

Erredox-erreakzio batek hurrengo baldintzak bete behar ditu erredox balorazioetan erabilia izan dadin:

- *Kuantitatiboa:* Balorazio-erreakzioa oreka konstante altua izan behar du, hau da, erreakzioan parte hartzen duten erredox bikoteen potentzialen artean desberdintasuna nabaria izan behar:

$$\log K = \frac{E_0^1 - E_0^2}{0.059} n_1 n_2 \qquad (23)$$

- *Azkarra.* Zenbait erredox-erreakzioren zinetika geldoa izaten da, eta katalizatzaileak erabiltzea, tenperatura kontrolatzea edo atzerako balorazioak erabiltzea beharrezkoa izaten da.
- *Estekiometrikoa:* Baldintza esperimentalek balorazio-erreakzioak aldez aurretik zehazten den estekiometria duela bermatu behar dute, analitoa oxidazio maila bakarrean dagoela ziurtatuz.
- *Sistema adierazle bat izan behar du.* Gaur egun erredox-balorazioen azken-puntuaren detekziorako sistema adierazle kimikoak eta instrumentalak daude. Halere, adierazle kimikoen kopurua urria da azido-base adierazleekin alderatuz.

Aipatzekoa da, sustantzia oxidatzaileen disoluzio patroiak ez bezala, sustantzia erreduktoreen disoluzioak prestatzea zaila dela. Alde batetik, sustantzia erreduktoreen disoluzioak nahiko ezegonkorrak dira, atmosferako oxigenoarekin oxidatzen baitira. Hori dela eta, biltegiratzeko ontzi bereziak beharrezkoak izaten dira. Bestalde, balorazio prozesuan neurri zorrotzak hartu behar dira eta atmosfera inertean lan egitea gomendatzen da, horrek dakartzan eragozpenekin. Azkenik, sistema adierazle kimiko gutxi daude, eta gehienetan teknika potentziometrikoak erabiltzen dira azken-puntuaren detekziorako. Ondorioz, sustantzia erreduktoreen erabilera baloratzaile bezala mugatua da, iodometrietan erabiltzen den sodio edo amonio tiosulfatoa izan ezik. Zorionez, honek guztiak ez du sustantzia oxidatzaileen determinazioa saihesten, atzerako-erredox balorazioak erabili baitaitezke.

5.2 ERREDOX-ADIERAZLEAK

Erredox-adierazle kimikoak sustantzia organikoak dira, eta kolore desberdina duten forma oxidatuan edo erreduzituan egon daitezke. **Erredox-adierazle orokor edo ez-espezifikoen** kolore aldaketa disoluzioaren potentzialaren aldaketaren ondorioz ematen da. Orokorrean, adierazlearen kolore aldaketak ez du analitoaren izaera kimikoarekin inongo erlaziorik, eta balorazioa gertatu ahala ematen den potentzial-aldaketaren menpe besterik ez dago.

Erredox-adierazle baten kolore aldaketa ematen duen erdi-erreakzioa oreka itzulgarri bat da:

$$In_{Ox} + ne^- \rightleftarrows In_{Err}$$

A kolorea B kolorea

Nernst-en ekuazioa oreka horrentzat hurrengoa izango litzateke:

$$E=E^o_{In}+ \frac{0.059}{n} \log \frac{[In_{Ox}]}{[In_{Red}]} \qquad (24)$$

Kolore aldaketa bistaz ikus dadin, ikusten den koloreari dagokion formaren kontzentrazioa 10 aldiz handiagoa izan behar da:

In_{ox} formaren kolorea ikusteko:

$$\frac{[In_{Ox}]}{[In_{Err}]} \geq \frac{10}{1} \qquad (25)$$

In_{err} formaren kolorea ikusteko:

$$\frac{[In_{Ox}]}{[In_{Err}]} \geq \frac{1}{10} \qquad (26)$$

Nerst-en ekuazioan ordezkatuz, kolore aldaketa ikusteko beharrezkoa den potentzial-aldaketa ondorioztatu daiteke:

$$E = E^o_{In} \pm \frac{0.059}{n} \qquad (27)$$

Trukatzen den elektroi kopurua adierazlearen potentzial-tartea baldintzatuko du, zenbat eta elektroi gehiago trukatu, estuagoa izango da tartea. Horrela, ferroina adierazlea (E^o=1.15 V) erabiltzen bada, kolore aldaketa 1.088V eta 1.206V artean ematea espero da.

Zenbait **erredox-adierazle espezifikoak** dira, eta beraien kolore aldaketa analitoaren erredox-bikotearen forma baten eta estekatzaile baten artean ematen den konplexuaren formazioan oinarritzen da. Iodometrietan, adibidez, iodoaren kolore horiaz baliatu gaitezke balorazioa noiz bukatzen den jakiteko. Halere, azken puntutik gertu, hori kolorea oso ahula da, eta horrek balorazioaren errorea handia izateak dakar. Almidoiak iodoarekin konplexu urdin bat sortzen du, eta kolore aldaketa garbiagoa denez, balorazioaren azken puntua zehaztasun handiagoarekin detektatzea ahalbidetzen du.

Erredox-erreakzio autoindikatzaileetan, erredox-balorazioaren azken-puntua adierazlerik gabe antzeman daiteke. Egoera hau baloratzailearen forma batek, oxidatua gehienetan, kolore bat duenean eta beste forma, erreduzitua, gardena denean ematen da. Permanganatoa baloratzaile bezala erabiltzen denean, erlenmeyerrera baloratzailearen tanta bat soberan botatzean disoluzioak argi ikusten den kolore arrosa hartzen du:

$$MnO_4^- + 8H^+ + 5e^- \rightleftharpoons Mn^{2+} + 4H_2O \qquad E^o=1.51\ V$$

Morea Gardena

5. Taula. Erredox-adierazleak.

ADIERAZLEA	FORMA OXIDATUA	FORMA ERREDUZITUA	E^o(V)
Fenosafranina	Gorria	Koloregabea	0,28
Indigo tetrasulfonatoa	Urdina	Koloregabea	0,36
Metileno urdina	Urdina	Koloregabea	0,53
Difenilamina	Morea	Koloregabea	0,75
4-etoxi-2,4-diaminoazobentzenoa	Horia	Gorria	0,76
Azido difenilamino sulfonikoa	Gorria-morea	Koloregabea	0,85
Azido difenilbenzidin sulfonikoa	Morea	Koloregabea	0,87
Erioglauzina A	Urdina-gorria	Horia-berdea	0,98
Fe(II)-1 ,10-fenantrolina (ferroina)	Urdin margula	Gorria	1,15
Azido N-fenilantranilikoa	Urdin-morea	Koloregabea	1,08
5-Nitroferroina	Urdin margula	Gorria	1,25

5.3 APLIKAZIOAK

Esan bezala, erredox-balorazioen aplikazio-esparrua zabala da, batez ere baloratzailea erreaktibo oxidatzaile bat denean. Ahal den neurrian, baloratzailea patroi primario bat izatea gomendagarria da, pisaketaren bidez zuzenean prestatu ahal izateko eta disoluzioak egonkorrak izan daitezen. Potentziala altua izatea komeni da, substantzia kopuru handiagoa oxidatzeko gai izan dadin. Gainera, aurreko atalean aipatu diren adierazleekin bateragarria izan behar du.

Erredox-bolumetrietan gehien erabiltzen diren erreaktibo oxidatzaileak potasio permanganatoa eta potasio dikromatoa dira, baldintza horiek guztiak betetzen dituzten erreaktiboak gutxi baitira. Bestalde, iodo/ioduro sistemak ere aplikazio-eremu zabala dauka.

5.3.1 PERMANGANIMETRIAK

Erredox-balorazioetan erreaktibo oxidatzaile erabiliena potasio permanganatoa ($KMnO_4$) da, MnO_4^-/Mn^{2+} sistemaren potentzial estandarraren balioa altua baita. Patroi primario bat ez denez, $KMnO_4$ disoluzioak aldez aurretik patroi primario batekin, sodio oxalatoa batik bat, estandarizatzea premiazkoa da.

Gainera, $KMnO_4$ disoluzioak nahiko ezegonkorrak direla aintzat hartu behar da, hurrengo erreakzioa eman baitaiteke:

$$4MnO_4^- + 2H_2O \rightleftarrows 4MnO_{2(S)} + 3O_2 + 4OH^-$$

Erreakzio horrek zinetika geldoa du baina argiak, beroak, azidoek, baseek, Mn^{2+}-ak eta MnO_2-ak katalizatu dezakete. Hortaz, biltegiratzen denean neurri bereziak hartuko dira, esate baterako, disoluzioa topaziozko ontzietan giro-tenperaturan gordetzea eta ur destilatutan prestatzea, azido eta baserik gabe. Halere, MnO_2-a $KMnO_4$ disoluzioetan kontzentrazio oso txikietan berez aurki daiteke, baita urak izan ditzakeen ezpurutasun organikoekin eman daitezkeen erreakzioetatik ere. MnO_2-aren presentzia saihesteko, $KMnO_4$ disoluzioa bi ordutan irakin, jalkitzen utzi eta iragazi behar da. Horrela prestatzen diren disoluzioak asteetan zehar egonkorrak izan daitezke.

Inguru azidoan, $KMnO_4$-aren erredukzioa hurrengo erreakzioaren arabera emanen da:

$$MnO_4^- + 8H^+ + 5e^- \rightleftarrows Mn^{2+} + 4H_2O$$
$$E°=1.51\ V$$

Disoluzio ahulki azido, neutro edo basikoetan (3<pH<12), manganeso dioxidora erreduzitzen da:

$$MnO_4^- + 4H^+ + 3e^- \rightleftarrows MnO_{2(S)} + 2H_2O$$
$$E°=1.692\ V$$

Disoluzio oso basikoetan, manganatoa sortzen da:

$$MnO_4^- + 1e^- \rightleftarrows MnO_4^{2-}$$
$$E°=0.6\ V$$

Orokorrean, permanganatoaren erreakzioen zinetika geldoa dela eta, tenperatura kontrolatu eta katalizatzaileak erabiltzen dira erreakzioaren abiadura areagotzeko asmoz. Horrela, permanganatoa sodio oxalatoarekin estandarizatzen denean, disoluzioa berotu egiten da eta Mn^{2+} ioiak berak katalizatzen du:

$$2MnO_4^- + 5\ C_2O_4^{2-} + 16H^+ \rightleftarrows 2Mn^{2+} + 10CO_2 + 8H_2O$$

Inguru azidoa doitzeko azido sulfurikoa erabiltzen da, azido klorhidrikoa erabiliko balitz, permanganatoak, bere potentzial altua dela eta, kloruro ioiak oxidatuko lituzkelako eta behar baino permanganato gehiago gehituko litzateke.

$$2MnO_4^- + 16H^+ + 10Cl^- \rightleftarrows 2Mn^{2+} + 5Cl_2 + 8H_2O$$

Jarraian, permanganimetrien aplikazio garrantzitsuenak azalduko dira:

a) Fe^{2+}-ren balorazio zuzena

Burdinaren balorazioa kuantitatiboki burutu ahal izateko, laginean dagoen burdin guztia Fe(II) bezala egon behar da. Hortaz, laginean dagoen Fe(III) erreduzitzeko H_2S gehituz erreduzitu behar da. Ondoren, permanganatoa gehituz Fe^{2+}-a baloratuko litzateke:

$$MnO_4^- + 8H^+ + 5Fe^{2+} \rightleftarrows Mn^{2+} + 5Fe^{3+} + 4H_2O$$

Inguru azidoa doitzeko Zimmermann-Reinhardt disoluzioa erabili daiteke. Disoluzio hau H_2SO_4, H_3PO_4 eta $MnSO_4$ kontzentratuen nahasketa bat da eta Fe^{3+} aren kolore horia desagertu arte gehitu behar da.

b) H_2O_2-aren determinazioa

Permanganimetrien beste ohiko aplikazio bat hidrogeno peroxidoaren determinazioa da. Balorazioa hurrengo erredox-erreakzioan oinarritzen da:

$$2\ MnO_4^- + 5H_2O_2 + 6H^+ \rightleftarrows 2Mn^{2+} + 5O_2 + 8H_2O$$

Oraingoan ere, ingurunearen azidotasuna azido sulfurikoarekin doituko da. Hidrogeno peroxidoaren kontzentrazioa oxigeno bolumenetan ematea ohikoa da, eta horretarako, hurrengo erdi-erreakzioa aintzat hartu behar da:

$$H_2O_2 \rightleftarrows O_2 + 2H^+ + 2e^-$$

c) Substantzia oxidatzaileen zeharkako balorazioa:

Permanganimetriak substantzia oxidatzaileen balorazioa burutzeko ere erabili daitezke. Oxidatzailea den analitoa duen disoluzioari, aldez aurretik estandarizatua izan den Fe^{2+} disoluzio bat behar baino gehiago gehituko zaio. Beharrezkoa bada, disoluzioa berotu daiteke zinetika azkartzeko. Fe^{2+} gehitzean konposatu oxidatzaileen erredukzioa ematen da:

$$Ox + nFe^{2+}_{soberan} \rightleftarrows Red + nFe^{3+} + Fe^{2+}_{erreakzionatu\ gabe}$$

Ondoren, erreakzionatu ez duen Fe^{2+}-a $KMnO_4$ disoluzio batekin baloratu behar da. Kenketa eginez, hasieran zegoen konposatu oxidatzaileen kontzentrazioa kalkula daiteke.

5.3.2 DIKROMATOMETRIAK

Permanganimetriekin konparatuz, dikromatoaren ($Cr_2O_7^{2-}$) aplikazio-esparrua mugatuagoa da bere ahalmen oxidatzailea baxuagoa baita. Halere, permanganatoa ez bezala, potasio dikromatoa patroi primarioa denez, baloratzaile egokia da zenbait kasutan. Bestalde, nahiz eta dikromato disoluzioek kolore laranja izan, ez da autoindikatzaile bezala erabiltzen . Bere forma erreduzitua, Cr^{3+}, kolore berdea du eta balorazioaren azken-puntuaren determinazio argia galarazten du. Hori dela eta, difenilamina edo ferroina bezalako adierazleak erabiltzen dira.

Dikromatometriak, hortaz, hurrengo erreakzioan oinarritzen dira:

$$Cr_2O_7^{2-} + 14\ H^+ + 6e^- \rightleftarrows 2Cr^{3+} + 7\ H_2O$$
$$E^o=1.33\ V$$

Esan bezala, patroi primarioa denez, kontzentrazio zehatzeko $K_2Cr_2O_7$ disoluzioak zuzenean erreaktiboa pisatuz prestatu daitezke. Gainera, $K_2Cr_2O_7$ disoluzioaren egonkortasuna handia da, 0.1 N kontzentrazioa duen disoluzioa epe luzera egonkorra dela frogatu baita.

Jarraian dikromatometrien aplikazio garrantzitsuenak laburki azaltzen dira:

a) Fe^{2+}-ren balorazio zuzena:

Permanganatoarekin baloratu daitezkeen sustantzia gehienak dikromatoarekin ere baloratu daitezke, baina aplikazio garrantzitsuenetako bat Fe^{2+}-ren balorazio zuzena da:

$$Cr_2O_7^{2-} + 14\ H^+ + 6Fe^{2+} \rightleftarrows 2Cr^{3+} + 7\ H_2O + 6Fe^{3+}$$

Balorazioaren azken-puntua zehaztasun handiagoarekin detektatu ahal izateko, disoluzioari H_3PO_4 gehitzea ohikoa da. Fe^{3+} eta H_3PO_4 erreakzionatzean $FeH_2PO_4^{2+}$ konplexua sortu eta Fe^{3+}/Fe^{2+} sistemaren potentziala txikiagotu egiten da. Alde batetik, azido fosforikoaren gehitzeak baliokidetasun-puntuaren inguruan ematen den potentzialaren aldaketa handitu egiten du. Bestalde, difenilaminaren kolore aldaketaren potentziala H_3PO_4-ren presentzian altuagoa denez, azken-puntuaren detekzioan erabil daiteke.

b) Oxigeno Eskari Kimikoa (OEK)

Oxigeno Eskari Kimikoaren determinazioak (OEK) interes handien duen aplikazioetako bat da. Oxigeno Eskari Kimikoa ur lagin batean dagoen materia erreduktoreak kontsumitzen duen oxigenoaren neurketa da. Materia erreduktore honen izaera gehienetan organikoa da, baina ezorganikoa ere kontuan hartzen da: Fe^{2+}, NO_2^-, NH_3, S^{2-}, etab. Ondorioz, ur lagin baten kutsadura mailari buruzko informazioa ematen du.

Atzerako balorazio bat da eta hurrengo pausoak jarraitu behar dira:

1. Ur laginari $K_2Cr_2O_7$ disoluzioa gehitzen zaio inguru azidoan (H_2SO_4) eta Ag^+ katalizatzailearen presentzian.
2. Bi orduz berotu ondoren, soberan gehitu den dikromatoa Fe(II)-arekin baloratuko da ferroina adierazlea erabiliz.

$$Cr_2O_7^{2-} + 6Fe^{2+} + 14H^+ \rightleftarrows 2Cr^{3+} + 6Fe^{3+} + 7H_2O$$

Oxigeno Eskari Kimikoa ur litro bakoitzeko kontsumitu den O_2 mg bezala adierazten da. Materia erreduktorea oxidatu dadin, beharrezkoa da oxigenoaren erredukzioa:

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightleftarrows 2H_2O$$

Jarraian, Oxigeno Eskari Kimikoaren kalkuluak nola buru behar diren azaltzen da:

eq $Cr_2O_7^{2-}{}_{gehitutakoa}$ - eq Fe^{2+} = eq $Cr_2O_7^{2-}{}_{erabiliak}$ = eq Materia erreduktorea=eq O_2.

$$\frac{(V_{Cr_2O_7^{2-}} \times N_{Cr_2O_7^{2-}} - V_{Fe^{2+}} \times N_{Fe^{2+}})eq_{Cr_2O_7^{2-}}}{V_{lagina}(L)} \times \frac{1eq_{O_2}}{1eq_{Cr_2O_7^{2-}}} \times \frac{1mol_{O_2}}{4eq_{O_2}} \times \frac{32g_{O_2}}{1mol_{O_2}} \times \frac{1000mg}{1g} = mgO_2/L \quad (28)$$

Horregatik guztiagatik, hurrengo ekuazioa ondorioztatzen da:

$$OEK = \frac{(V_{Cr_2O_7^{2-}} \times C_{Cr_2O_7^{2-}} - V_{Fe^{2+}} \times C_{Fe^{2+}}) \times 8}{V_{lagina}(L)} mgO_2/L \quad (29)$$

5.3.3 IODIMETRIAK ETA IODOMETRIAK

Balorazio hauen interesa iodo/ioduro sistemaren potentzialaren tarteko balioan datza:

$$I_2 + 2e^- \rightleftarrows 2I^- \qquad E^o=0.62\ V$$

Iodoaren (I_2) disolbagarritasuna ur disoluzioan eta giro-tenperaturan 0.001 mol/L da. Haatik, ioduro disolbagarrien presentzian, bere disolbagarritasuna areagotu egiten da triioduro konplexua (I_3^-) sortzen baita:

$$I_2 + I^- \rightleftarrows I_3^-$$

Konplexu horren sorrera funtsezkoa da iodoa uretan disolbatu dadin. Gainera, iodoaren lurrunkortasuna gutxitu eta, ondorioz, iodo disoluzioen egonkortasuna hobetzen du.

Triioduroa hurrengo erreakzioaren arabera erreduzitzen da:

$$I_3^- + 2e^- \rightleftarrows 3I^- \qquad E^o=0.54\ V$$

Triioduro/ioduro erredox-bikotearen potentziala baxuagoa da, eta are baxuagoa ioduroaren kontzentrazioa handiagoa denean. Normalean, eta idazkera errazteko asmoz, triioduro (I_3^-) espezieari iodoa deritzo eta I_2 bezala idazten da.

Iodo/ioduro sistema oxidatzaile edo erreduktore bezala erabili daitezke, oxidimetria (iodimetria) edo erreduktimetrietan (iodometria) hain zuzen ere.

a)Metodo zuzenak edo iodimetriak

Iodimetriak sustantzia oso erreduktoreen determinazioan datza, ingurune neutro edo ahulki azidoan, non baloratzailea iodo disoluzio patroi bat den:

$$I_2 + \text{analito erreduktorea} \rightleftarrows 2I^- + \text{oxidazio produktua}$$

Iodimetriak balorazio zuzenak dira. Hauetan, iodo (I_2) disoluzio bat baloratzaile bezala erabiltzen da. Kolore aldaketa horitik (I_2) koloregabera (I^-) da, baina ondo ikusten ez denez, almidoia erabiltzen da adierazle bezala. Almidoiak I_2-rekin kolore urdina duen konplexua sortzen du. Iodo (I_2) guztia iodurora (I^-) pasatzean almidoia aske geratu eta disoluzioa koloregabea da. Iodimetrien bidez determinatu daitezkeen espezieak AsO_3^{3-} , Sb^{3+}, Sn^{2+}, H_2S, SO_3^{2-}, hidrazina dira, besteak beste.

Karl Fischer metodoa

Karl Fischer metodoa elikagai, sendagai eta disolbatzaileetan ur-edukiaren determinazioa egiteko gomendatzen den metodoa da, batez ere ur-edukia %0.1 baino txikiagoa denean.

Laginean dagoen ura metanolean disolbatu eta Karl Fischer-en erreaktiboarekin baloratzen da. Erreaktibo hau piridina (PY) eta metanol nahasketa bat da non SO_2 eta iodoa disolbatu diren. Erreakzio globala hurrengoa da:

$$I_2 + SO_2 + \mathbf{H_2O} + CH_3OH + 3PY \rightleftarrows 2PYH^+I^- + PYHOSO_2OCH_3$$

Karl Fischer-en erreaktiboak duen iodo kontzentrazioa da urarekin erreakzionatuko duen erreaktibo kantitatea mugatzen duena. Karl-Fischer-en erreaktiboa patroi primarioa ez denez, aldez aurretik estandarizatu behar da, baina nahiko ezegonkorra denez, estandarizatu bezain laster erabili behar da. Patroi primario bezala metanolean disolbatutako ura erabiltzen da. Disoluzio hau erlenmeyerrean jarri eta Karl-Fischerren erreaktiboa buretatik gehituz baloratzen da disoluzioak, soberan gehitutako iodoagatik, kolore marroixka izan arte. Metodo honen detekzio limitea 0,3 mg ur da. Gaur egun, metodo hau burutzeko zenbait gailu automatizatu daude, gehienak detekzio anperometrikoan oinarrituak.

b) Zeharkako metodoa edo iodometria

Iodometrietan, iodoa baloratu egiten da zeharkako balorazio baten bidez. Balorazio hauetan, ioduroaren ahalmen erreduktorea erabiltzen da oxidatzaile anitzen zeharkako determinazioa egiteko. Prozesu honek bi atal ditu:

1-. Analito oxidatzailea duen disoluzioari ioduro ioia behar baino gehiago gehitu:

$$2I^-_{soberan} + \text{Analito oxidatzailea} \rightleftarrows I_2 + \text{erredukzio produktua}$$

2-. Sortu den iodoaren balorazioa ahalmen erreduktorea duen disoluzio patroi bat erabiliz, gehienetan, sodio tiosulfatoa baloratzen da:

$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightleftarrows 2I^- + S_4O_6^{2-}$$

Tiosulfato disoluzioa aldez aurretik patroi primario batekin, potasio iodatoa (KIO_3) estandarizatu behar da. Horretarako, potasio iodatoa berogailu batean lehortu behar da 180 °C-tan 12 orduz. Potasio iodatoak, potasio ioduroa (KI) gehitzean, iodoa sortzen du, eta hori izango da tiosulfatoa oxidatuko duena:

$$IO_3^- + 5I^- + 6H^+ \rightleftarrows 3I_2 + 3H_2O$$

Iodometriak $I_2/2I^-$ baino potentzial altuagoa duten sustantzien balorazioan aplikatu daitezke: AsO_4^{3-}, IO_3^-, BrO_3^{2-}, ClO_3^-, Cl_2, NO_2^-, Sb^{5+}, Fe^{3+}, H_2O_2, Cu^{2+}, etc. Aintzat hartu behar da, inguru azidoan, oxigenoaren erredox potentziala altuagoa denez, honek ioduroa iodora oxidatu dezakela:

$$4I^- + O_2 + 4H^+ \rightleftarrows 2I_2 + 2H_2O$$

Zenbait ioi metalikok erreakzio hau katalizatu dezakete, batez ere kobrea, eta, gainera, erreakzio fotokimiko bat da. Horregatik, inguru azidoan burutzen diren iodometrietan sortzen den iodoa lehenbailehen baloratzea gomendagarria da.

Ioduro ioiaren ahalmen erreduktoreaz baliatuz, espezie oxidatzaileen determinazioa burutu daiteke. Honetan oinarrituz, hurrengo aplikazioak azpimarratu daitezke:

Cu^{2+}-aren determinazioa:

Kobrearen determinazio iodometrikoa hurrengo erreakzioan oinarritzen da:

$$2\ Cu^{2+} + 4\ I^- \rightleftarrows 2\ CuI(s) + I_2$$

Esan bezala, sortzen den iodoa ondoren tiosulfato disoluzio batekin baloratu behar da.

Erredox-bikoteen potentzial estandarren balioen arabera, $I_2/2I^-$ ($E° = 0,535$ V) eta Cu^{2+}/Cu^+ ($E°= 0,153$ V), ezinezkoa izango litzateke kobreak ioduroa oxidatzea. CuI prezipitatuaren sorrerari esker, Cu^{2+}/Cu^+ sistemaren potentziala 0,86 V da, ioduroa oxidatzeko nahikoa dena.

Cl_2-aren determinazioa

Kloroaren determinazioa lixiba eta zuritzaileen edo igerilekuetan erabiltzen diren produktuetan iodometriak erabiliz egin daiteke. Prozedura hurrengo erreakzioan oinarritzen da:

$$Cl_2 + 2I^- \rightleftarrows 2Cl^- + I_2$$

Aipatu diren produktuak hipoklorito edo klorito disoluzio alkalinoak edo kloruro eta hipoklorito nahasketak izaten dira. Hortaz, disoluzioa azidotzea beharrezkoa da ioduroarekin erreakzionatu eta balorazioa burutu dadin:

$$ClO^- + 2I^- + 2H^+ \rightleftarrows I_2 + Cl^- + H_2O$$
$$ClO_2^- + 4I^- + 4H^+ \rightleftarrows 2I_2 + Cl^- + 2H_2O$$
$$ClO^- + 2I^- + Cl^- + 2H^+ \rightleftarrows I_2 + 2Cl^- + H_2O$$

Erreakzio horietatik hurrengoa ondorioztatu daiteke:

1. Disoluzioak kloroa badago, hurrengo disoluzioa ematen da:

$$1 \text{ mol } Cl_2 \rightarrow 1 \text{ mol } I_2$$

2. Kloroaren hidrolisi partziala ematen bada hipokloritoa emateko:

$$1 \text{ mol } Cl_2 \rightarrow 1 \text{ mol } ClO^- \rightarrow 1 \text{ mol } I_2$$

3. Kloroak kloritoa ematen badu:

$$2 \text{ mol } Cl_2 \rightarrow 1 \text{ mol } ClO_4^- \rightarrow 2 \text{ mol } I_2$$

Disoluzioan dagoen kloro espezieak edo kloroaren hidrolisi mailak ez du estekiometria baldintzatzen, eta beti 1 mol Cl_2 → 1 mol I_2 izango da. Balorazioa kuantitatiboa dela ziurtatzeko, disoluzioari H_2SO_4 gehitzen zaio.

5.4 PRAKTIKAK

POTASIO PERMANGANATO DISOLUZIO BATEN BALORAZIOA

1-. SARRERA

Erredox-balorazioetan erreaktibo oxidatzaile erabiliena potasio permanganatoa ($KMnO_4$) da, MnO_4^-/Mn^{2+} sistemaren potentzial estandarraren balioa altua baita. Patroi primario bat ez denez, $KMnO_4$ disoluzioak aldez aurretik patroi primario batekin, sodio oxalatoa batik bat, estandarizatzea premiazkoa da. Balorazio honetan ez da adierazlerik erabiliko erreakzioa bera adierazlea delako.

2-. HELBURUA

Ikasleak prestatu duen potasio permanganato 0.01 N disoluzio baten kontzentrazio zehatzaren determinazioa.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Bunsen metxeroa
Potasio permanganato disoluzioa
Sodio oxalatoa
H_2SO_4

4. PROZEDURA

4.1 Sodio oxalato 0.01N disoluzio bat prestatu.
Beharrezkoa den sodio oxalato kantitatea pisatu, ur desionizatutan disolbatu eta 100 mL-ko matrazera eraman ur desionizatua gehituz. Pisatutako kantitatea kontutan izanik disoluzioaren kontzentrazio zehatza kalkulatu.

4.2 Potasio permanganato 0.01 N disoluzio bat prestatu

Beharrezkoa den potasio permanganato kantitatea pisatu, ur desionizatutan disolbatu eta 250 mL-ko matrazera eraman.

4.3 Potasio permanganatoaren balorazioa

Prestatutako sodio oxalatoaren 10 mL hartu, erlenmeyer batera eraman eta azido sulfuriko tanta batzuk gehitu (6-8 tanta) ingurunea azidoa izan dadin. Erreakzioa bizkorrago eman dadin disoluzioa 80-90 °C-raino berotu. Balorazioa egiteko buretatik potasio permanganatoa gehitu disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa, disoluzioa nahastu eta kolore more argia mantentzen denean bukatuko da. Kontuan izan balorazioaren azken puntura heltzean honen tenperatura ez dela 60 °C baino baxuagoa izan behar. Erabilitako bolumena idatzi.

Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1 Prozesuan ematen den erredox erreakzioa doitu

Erdierreakzioa eta erreakzio globala doitu. Zein da espezie oxidatzailea? Zergatik?

$$MnO_4^- \rightleftarrows Mn^{2+}$$

$$C_2O_4^{2-} \rightleftarrows CO_2$$

5.2. $Na_2C_2O_4$ disoluzioaren kontzentrazio errealaren kalkulua.

5.3. $KMnO_4$ 0.01N disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4. $KMnO_4$ disoluzioaren normalitatearen batez bestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

H_2O_2 DISOLUZIO BATEN BALORAZIOA

1-. SARRERA

Hidrogeno peroxidoa edo ur oxigenatua (H_2O_2) oso oxidagarria den peroxidoa da. Likido gardena da, ura baino pixka bat lirdingatsuagoa baina disolbaturik gardena da. Bere ezaugarri oxidagarriak direla eta, askotan lixiba edo garbigarri moduan erabiltzen dute. 10 oxigeno bolumenetako ur oxigenatua zauriak garbitzeko erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Ur oxigenatu disoluzio komertzial baten balorazioa permanganimetria erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa

Bureta

Erlenmeyerrak

Matraze aforatuak

Pipeta graduatuak

Hauspeakin-ontziak

Potasio permanganato disoluzio estandarizatua

Ur oxigenatu disoluzioa

H_2SO_4

4-. PROZEDURA

Ur oxigenatu komertziala erabiliz, ur oxigenatu 0.01 N disoluzio baten 100 mL prestatu. Disoluzioaren 10 mL hartu eta erlenmeyer batera eraman azido sulfuriko tanta batzuk gehituz (6-8 tanta) disoluzioa azidoa izan dadin. Balorazioa egiteko buretatik potasio permanganatoa gehituko da disoluzioa etengabe nahastuz. Balorazioa disoluzioa nahastuz gero arrosa denean bukatuko da. Erabilitako bolumena apuntatu. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

5-.KALKULUAK ETA EMAITZAK

5.1 Prozesuan ematen den erredox erreakzioa doitu

Erdierreakzioa eta erreakzio globala doitu.

$$MnO_4^- \rightleftarrows Mn^{+2}$$

$$H_2O_2 \rightleftarrows O_2$$

5.2. H_2O_2 0.01 N disoluzioa prestatzeko kalkuluak

5.3. H_2O_2 0.01N disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.4. Ur oxigenatuaren dismutazio erreakzioa kontuan izanik, ur oxigenatuaren normalitatea eta ur oxigenatuaren oxigeno bolumena kalkulatu. Bietan batez bestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

SODIO TIOSULFATO DISOLUZIO BATEN BALORAZIOA

1-. SARRERA

Iodometrietan, ioduroaren ahalmen erreduktorea erabiltzen da oxidatzaile anitzen zeharkako determinazioa egiteko. Balorazio hauetan iodoa tiosulfatoarekin baloratu egiten da zeharkako balorazio baten bidez. Horretarako, tiosulfato disoluzioa aldez aurretik patroi primario batekin, potasio iodatoa (KIO_3), estandarizatu behar da.

2-. HELBURUA

Ikasleak aldez aurretik prestatutako sodio tiosulfato 0.1 N inguruko disoluzio baten kontzentrazio zehatzaren determinazioa. Balorazioa potasio iodato patroi primarioarekin egingo da.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Bureta
Erlenmeyerrak
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak
Hauspeakin-ontziak
Sodio tiosulfatoa
Potasio ioduroa
Potasio iodatoa
Almidoi disoluzioa

4-. PROZEDURA

4.1 Sodio tiosulfato-tan 0.1N inguruko kontzentrazioa duen disoluzio bat prestatu.

Beharrezkoa den sodio tiosulfatoaren kantitatea pisatu, ur distilatuarekin disolbatu eta 100 ml-ko matrazera eraman ur distilatuaz arrasean jarriz.

4.2 Prestaturiko sodio tiosulfato disoluzioa estandarizatu, patroi primario bezala potasio iodatoa erabiliz

Prestatuta dagoen potasio iodato 0.1N disoluzioaren 10 ml pipetaz hartu eta 250 ml-ko erlenmeyer batetara eraman eta azido klorhidriko mililitro batzuk eta potasio ioduro solidoa gehitu.

Balorazioa egiteko buretatik estadarizatu nahi den sodio tiosulfatoa pixkanaka gehituko da disoluzioa etengabe nahastuz. Disoluzioaren kolorea hori argia izatera pasatzen denean almidoi tanta batzuk botako zaizkio disoluzioa urdina bihurtuz. Balorazioa disoluzioa koloregabea denean bukatuko da. Erabilitako bolumena apuntatu. Balorazioa gutxienez hiru aldiz errepikatu behar da.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1 Prozesuan ematen den erredox erreakzioa doitu:

Erdierreakzioa eta erreakzio globala doitu. Zein da espezie oxidatzailea? Zergatik?

$S_2O_3^{-2}$ $S_4O_6^{-2}$

I_2 I^-

5.2. $Na_2S_2O_3$ disoluzioaren balorazioaren emaitzak.

5.3. $Na_2S_2O_3$ disoluzioaren normalitatearen batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera eman (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%) kalkulatu.

AZIDO ASKORBIKOAREN DETERMINAZIOA BITAMINA-GEHIGARRI BATEAN.

1-. SARRERA

Azido askorbikoa edo C bitamina, gizakiak, batik bat, barazki, esnea eta fruta zitrikoen bidez lortzen duen bitamina bat da. Gaur egun, C bitamina duten gehigarrien kontsumoa oso zabaldua dago.

Azido askorbikoaren balorazioa iodoarekin baloratuz burutu daiteke. Horrela, iodato eta ioduroaren erreakziotik sortzen den triioduroak izango da erreaktibo baloratzailea:

$$IO_3^- + 8I^- + 6H^+ \rightleftarrows 3I_3^- + 3H_2O$$

Triioduroak azido askorbikoa hurrengo erreakzioaren arabera oxidatuko du:

$$C_6H_8O_6 \rightleftarrows C_6H_6O_6 + 2H^+ + 2\,e^-$$

$$I_3^- + 2e^- \rightleftarrows 3I^-$$

$$C_6H_8O_6 + I_3^- \rightleftarrows C_6H_6O_6 + 3I^- + 2H^+$$

Hortaz, IO_3^- mol bakoitzeko 3 mol azido askorbiko oxidatuko dira.

2-. HELBURUA

Azido askorbikoaren determinazioa bitamina-gehigarri batean erredox-balorazio baten bidez.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa

Bureta

Erlenmeyerrak

Matraze aforatuak

Pipeta graduatuak

Hauspeakin-ontziak

KIO_3 0.01N

HCl 0.1 N

KI erreaktiboa

4.-PROZEDURA

4.1. Laginaren prestaketa

Bitamina-gehigarriaren espezifikazioen arabera, konprimatu batek duen azido askorbiko kantitatea kontuan izanik, konprimatua birrindu eta beharrezkoa den kantitatea pisatu.

4.2. Balorazio-erreakzioa

Pisatutako konprimatu kantitatea erlenmeyer batera eraman eta 1 g KI, 5 ml HCl 0.1 N eta gutxi gorabehera 50 ml ur gehitu. Ondoren, almidoi disoluzioaren tanta batzuk gehituko zaizkio balorazioaren kolore aldaketa argia izan dadin. Baloratzaile bezala buretatik KIO_3 0.01N disoluzioa gehituko da disoluzioak kolore urdin iluna izan arte.

5. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Egin beharreko kalkuluak:

5.1. Laginetik hartu behar den kantitatearen kalkulua.

5.2. Azido askorbikoaren balorazioaren emaitzak.

5.3. Konprimatu batek duen azido askorbiko kantitatea kalkulatu (mg/konprimatu). Batezbestekoa kalkulatu eta ziurgabetasunarekin batera adierazi (konfiantza-tarte bezala). Desbiderapen estandar erlatiboa (%)eta errore erlatiboa kalkula itzazu.

II. BLOKEA. ANALISI-TEKNIKA INSTRUMENTALAK

1 TEKNIKA ESPEKTROSKOPIKOAK

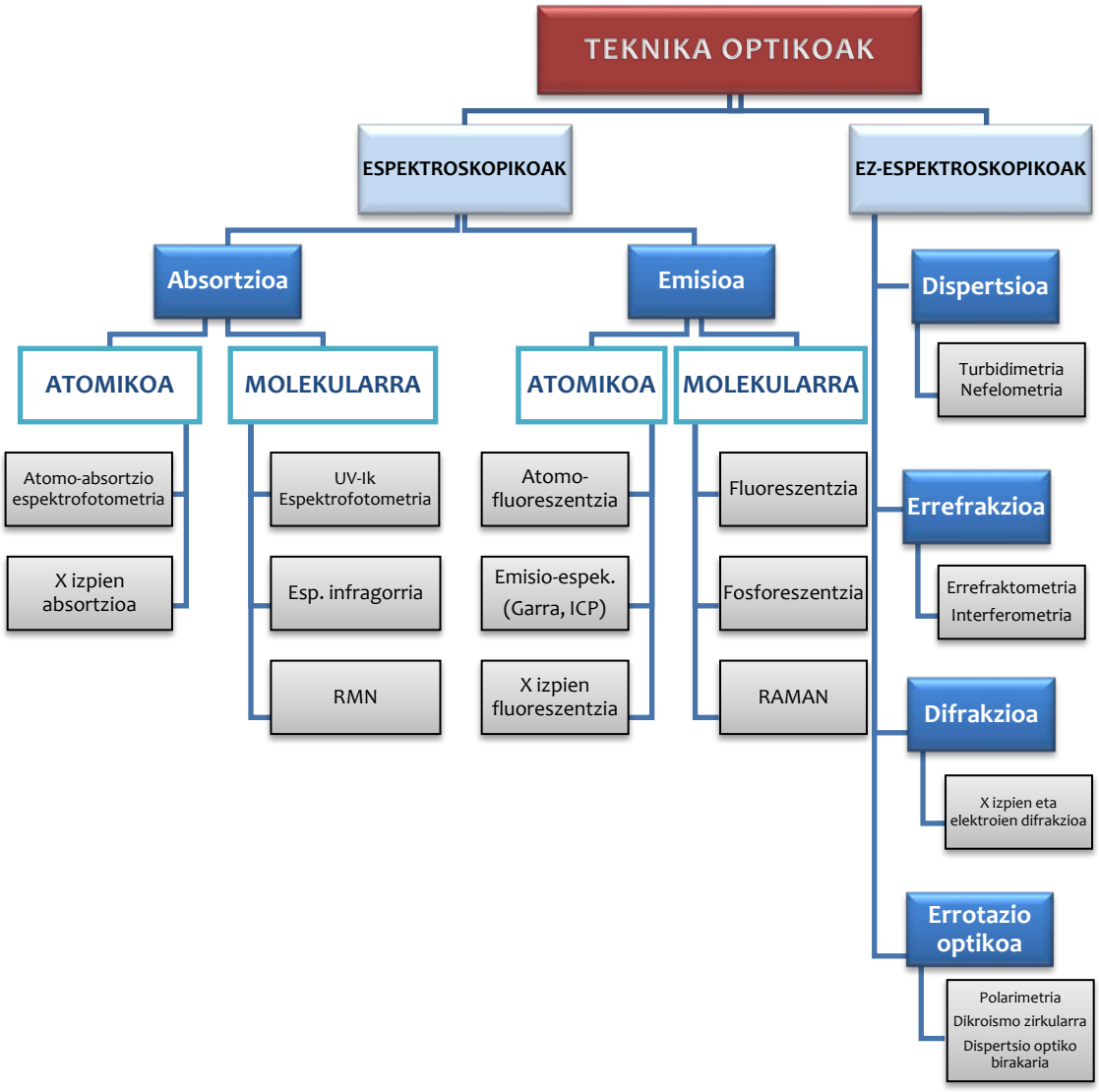
1.1 SARRERA

1.1.1 DESKRIBAPENA ETA SAILKAPENA

Analisi-teknika optikoak materiarekin elkarrekintzak dituen edo materiak igortzen duen erradiazio elektromagnetikoaren (EEM) neurketan oinarritzen dira. Bi taldeetan bana daitezke, hots, teknika espektroskopikoetan eta ez-espektroskopikoetan. Lehenengoak EEMren eta materiaren artean gertatzen den energia-trukean oinarritzen dira; bigarrenetan, ordea, ez da halako trukerik suertatzen. Ondorioz, egoera energetiko ezberdinen arteko trantsizio elektronikorik ez da gertatuko; aitzitik, EEMren norabidearen edo propietate fisikoen aldaketak gertatuko dira. Era berean, teknika espektroskopikoak bi azpimultzotan bana daitezke, erradiazioaren absortzioan fokatutako tekniketan eta erradiazioaren emisioan fokatutakoetan. Horietako azpimultzo bakoitzean, atomoetan eta molekuletan gertatzen diren trantsizio energetikoetan oinarritutako teknikak aurki daitezke. Teknika ez-espektroskopikoen kasuan, erradiazio-materia elkarrekintzaren ondorioz, erradiazioaren dispertsioa, difrakzioa, errefrakzioa eta polarizazioa gerta litezke (1. irudia).

1.1.2 ERRADIAZIO ELEKTROMAGNETIKOA

EEM uhin- eta korpuskulu-propietateak erabiliz defini daitekeen energia mota bat da. Espazioan zehar *c* abiaduran hedatzen diren uhintzat har daiteke; gainera, EEMren propietate optiko ugari, hobe deskribatzen dira EEM uhintzat hartuz, erradiazioaren difrakzioa esaterako. Haatik, absortzioa eta emisioa bezalako EEM-materia elkarrekintzak hobe deskribatzen dira argia partikula edo fotoitzat hartuz. Uhin horiek, fasean dauden eremu elektriko eta magnetiko batez osaturik daude, zeinak elkarren artean eta uhinaren hedapen-norabidearekiko perpendikularrak diren oszilazio sinusoidalak baitituzte. Planoan polarizatutako EEM monokromatiko baten errepresentazioa, alegia, eremu elektriko eta magnetikoaren oszilazio guztiak plano bakarrean daudenean, 2. irudian ikus daiteke.



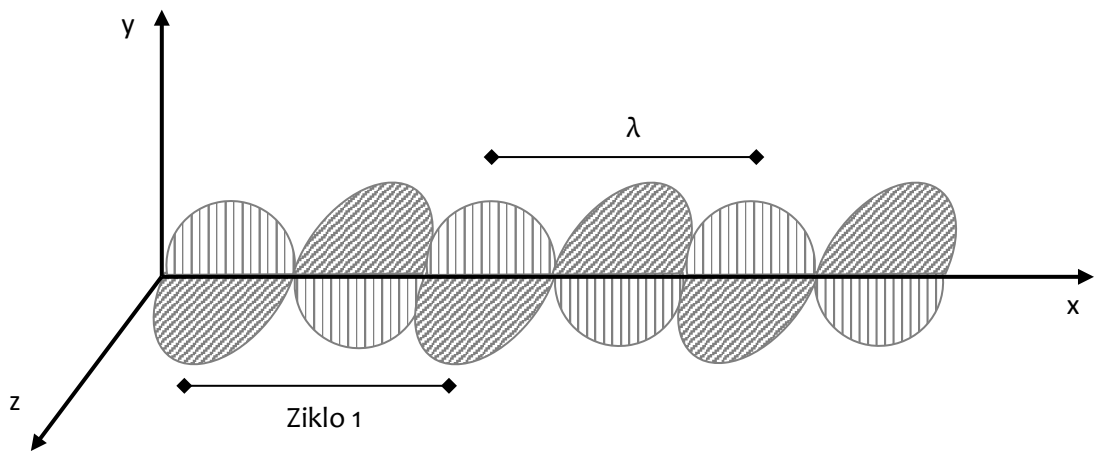
1. irudia. Analisi-teknika optikoen sailkapena.

Uhin baten karakterizazioan honako parametro hauek erabil daitezke:

Uhin-luzera (λ). Ziklo oso bat pasatu duten bi puntuen arteko distantzia uhin batean. Bestela esanda, ondoz ondoko bi maximo edo minimoen arteko distantzia. Edozein luzera unitatetan adierazi daiteke parametro hau; haatik, normalean metrotan, zentimetrotan, Angstrometan (Å), nanometrotan (nm) edo mikrometrotan (µm) adierazi ohi da (1 Å = 0,1 nm).

Periodoa (p). Jarraian dauden maximo edo minimoek, puntu finko batetik pasatzeko behar duten denbora. $p=1/\upsilon$.

Maiztasuna (υ). Uhin baten oszilazio edo ziklo osoen kopurua denbora-unitate (s) bakoitzeko. Maiztasunaren unitatea s^{-1} edo *hertz* (Hz) litzateke.



2. irudia. EEM monokromatikoaren eremu magnetiko (z) eta elektriko (y) oszilatzaileak.

Erradiazio ultramorea (UV) espektro elektromagnetikoaren 10 eta 380 nm-ko uhin-luzera bitartean kokatzen da, urrutiko UVan (10-200 nm bitartean) eta UV hurbilean (200-380 bitartean) banatu ohi dena. Urrutiko UV eremua hutseko UV bezala ere ezagutzen da, oxigenoak uhin-luzera tarte horretan erradiazioa xurgatzen duelako, eta, ondorioz, neurketak hutsean egin behar direlako. Hurbileko UVak UVA (320-380 nm), UVB (280-320 nm) eta UVC erradiazioak (<280 nm) barneratzen ditu. Erradiazio ikusgaiari dagokionez, espektro elektromagnetikoan 380 nm-tik (morea) 780 nm-ra (gorria) doa bere eremua (1. taula).

1. taula. Erradiazio ikusgaia.

Kolorea	***Uhin-luzera (nm)***
Gorria	780–620
Laranja	620–595
Horia	595–575
Berdea	575–495
Urdina	495–455
Morea	455–380

1.2 ABSORTZIO-ESPEKTROSKOPIA

1.2.1 ABSORTZIO-ESPEKTROSKOPIA MOLEKULARRA

EEMak ingurune garden batean disolbaturik dagoen espezie baten gain jotzen duenean, espezie horrek, era selektiboan, erradiazioaren maiztasun batzuk ahuldu ditzake. Lagin batek erradiazioa xurgatzen duenean, sortaren potentzia, hau da, erradiazioaren energia segundoko eta azalera unitateko, gutxitu egiten da.

Teoria kuantikoaren arabera, partikula batek (atomo, ioi edo molekula batek alegia) energia-egoeren multzo errepikaezin jakin bat izaten du; horien artean, energia minimoko egoerari *oinarrizko egoera* deritzo. Molekula batek fotoi bat xurgatzen duenean, molekularen energia igo egiten da, oinarrizko egoeratik egoera kitzikatu batera pasatuz. X espezie baten kitzikadura honela adieraz daiteke:

$$X + h\upsilon \longrightarrow X^* \longrightarrow X + \text{beroa}$$

Berehala, kitzikatutako espeziea erlaxatu egiten da, bere oinarrizko egoerara bueltatuz. Horretarako, gertu dauden atomo eta molekulei pasatuko die molekularen gehiegizko energia, inguruneko tenperatura igoaraziz. Horren ordez, gehiegizko energia askatzea, erradiazioaren emisioz ere suerta liteke, erradiazio fluoreszentea edo fosforeszentea igorriz, alegia. Materia erradiazioa xurgatzeko gai izan dadin, erradiazioaren eremu elektrikoaren eta materiaren karga elektrikoren baten arteko elkarrekintza egon beharko luke. Gainera, materiaren gain jotzen duen erradiazioaren fotoiaren energiak substantziaren energia kuantizatuaren berdina izan behar du, hau da, partikularen oinarrizko egoeraren eta egoera kitzikatuaren arteko diferentziaren berdina.

Molekulek atomoek baino espektro konplexuagoak dituzte, energia-egoera multzo handiago bat izaten dutelako. Molekula baten bandekin erlazionatutako energia honako hauen batura litzateke: energia elektronikoa, alegia lotura elektroien energia-egoera ezberdinetatik datorrena, energia bibrazionala, atomoen arteko bibrazioetatik datorrena, eta errotazionalaren, atomoen errotazio-mugimenduekin erlazionatua dagoena.

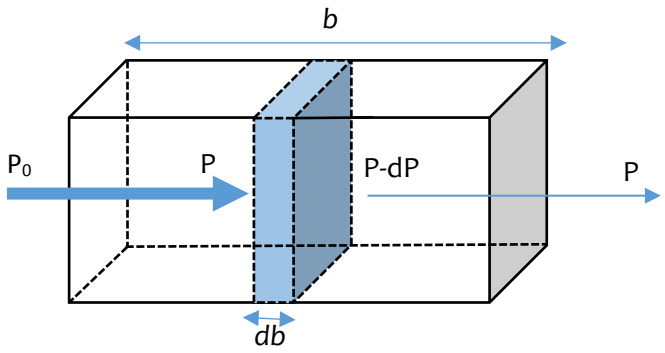
$$E = E_{elektronikoa} + E_{bibrazionala} + E_{errotazionala}$$

Maila elektroniko bakoitzak hainbat maila bibrazional barneratzen ditu, eta, era berean, horietako bakoitzak hainbat maila errotazional. Horregatik guztiagatik, molekula

batek izaten duen energia-mailen kopurua atomo batena baino ugariagoak izan ohi da, azken horrek energia-maila elektronikoak soilik baititu.

A) BEER-LAMBERT-EN LEGEA

Uhin-luzera jakin bateko erradiazio sorta batek *db* lodiera duen eta infinitesimalki estua den geruza zeharkatzen duenean, erradiazioaren potentziak jaitsiera nabarmen bat jasango du, (*dP*) laginaren lodierarekiko eta analitoaren kontzentrazioarekiko proportzionala dena. Uhin-luzera (λ) hautatzeko, erradiazio elektromagnetikoa monokromadore batetik pasarazten da (normalean, prisma edo difrakzio-sare bat) laginaren gain jo aurretik, horrela, erradiazio monokromatikoa lortuko baita.



3. irudia. Erradiazioaren absortzioa.

Laginaren gain jotzen duen erradiazio sortaren potentziaren murrizketa (dP) proportzionala da laginean dagoen espezie absorbatzailearen kontzentrazioarekiko (C), sortaren potentziarekiko (P), eta baita db lodierarekiko ere, K proportzionaltasun konstante bat izanik. Ondorioz:

$$-dP = -k.P.C.db \qquad (1)$$

Berrantolatuz eta integralak kalkulatuz:

$$\frac{-dP}{P} = -k.C.db \qquad (2)$$

$$\int_{P_0}^{P} \frac{-dP}{P} = -\int_{0}^{b} k.C.db \qquad (3)$$

$$\ln\left(\frac{P}{P_0}\right) = -k.C.b \qquad (4)$$

Hau da,

$$\ln\left(\frac{P_0}{P}\right) = k.C.b \qquad (5)$$

$$\log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \frac{\ln\left(\frac{P_0}{P}\right)}{\log 10} = \frac{k.C.b}{2.303} \qquad (6)$$

K/2,303 = ε izanik,

$$\log\left(\frac{P_0}{P}\right) = \varepsilon\ C\ b = -\log \mathrm{T} = A \qquad (7)$$

ondorioz,

$$\boldsymbol{A = \varepsilon.b.C} \qquad (8)$$

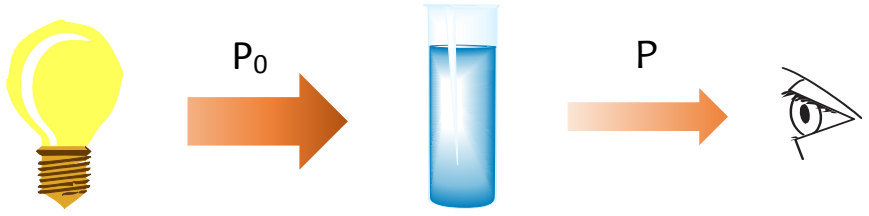
non T transmitantzia baita, A absorbantzia, C kontzentrazioa (mol/L unitatean), b bide optikoa eta ε absortibitate molarra edo iraungitze molarreko koefizientea. Kontzentrazioa mol/L ez den beste unitateren batean adieraziz gero, *absortibitate molar* (ε) terminoa erabili ordez *absortibitate* soilik erabili beharko litzateke (a).

Hori guztia kontuan hartuz, laginaren bolumen totalaren atal infinitesimal bakoitzean (urdinez adierazia 3. irudian) izaten den potentziaren murrizketa laginaren gain jotzen duen erradiazioaren potentziarekiko proportzionala dela esan liteke, eta, horregatik, log(P_0/P) erlazio logaritmikoak (absorbantziak, alegia) gora egiten du kontzentraziok gora

egiten duen heinean. Argiak lagin guztia zeharkatzen duenez (b bide optikoa 3. irudian), potentziaren galera jaitsi egiten da erradiazioak geruza berri bat zeharkatzen duen bakoitzean, geruza horren gain jotzen duen erradiazioaren potentzia ere jaitsi egiten delako.

(8. adierazpen hau Beer-Lambert, Lambert-Beer edo soilik Beer-en lege bezala ezagutzen da, eta IUPACek adierazten duen bezala: «Ingurune isotropiko (bere ezaugarri fisikoak ez daude ingurunea aztertzeko erabilitako norabidearen menpe) homogeneo bat zeharkatzen duen erradiazioaren sorta monokromatiko baten absorbantzia proportzionala da bide optikoarekiko eta kontzentrazioarekiko».

Lagin batek transmititzen duen erradiazioaren potentzia eta bere gain jotzen duen erradiazioaren potentziaren arteko erlazioari *transmitantzia* deritzo (T). Bestela esanda, transmitantzia da lagina zeharkatzea lortu duen erradiazioaren frakzioa.



4. irudia. Erradiazioaren ahultzea lagina zeharkatzerakoan.

Transmitantzia 0 eta 1 bitartean egon daiteke, eta portzentaje bezala ere adierazi daiteke.

$$T = \frac{P}{P_0} \tag{9}$$

$$T\ (\%) = \frac{P}{P_0} x\ 100 \tag{10}$$

Adierazpen horiek ez dituzte ezberdintzen erradiazioa ahultzeko egon daitezkeen forma ezberdinak. Analitoengatik suertatzen den absortzioaz gain, erradiazioaren potentzia garbia ahultzen duten beste fenomeno batzuk ere existitzen dira: erreflexioa, laginaren ontziak duen absortzioa, matrizearen gainontzeko konposatuen absortzioa, eta erradiazioaren dispertsioa, esaterako. Analitoak ez diren bestelako konposatu edo materialek eragindako erradiazioaren galeraren zuzenketa egiteko, analisi-metodoaren zuri bat erabili behar da.

Absorbantzia (A) litzateke transmitantzia baino erabilgarriagoa den beste parametro bat:

$$A = -\log T = -\log \frac{P}{P_0} = \log \frac{P_o}{P} \qquad (11)$$

11. ekuazioan ikus daitekeen bezala, erradiazioaren absortziorik egon ezean (A=0) P_o=P litzateke. Aitzitik, erradiazioaren %90 absorbatuko balitz, T (%) = %10 litzateke, eta, beraz, A=1. Absortzioa %99-koa izango balitz, ordea, T (%) = %1 litzateke, eta, ondorioz, A=2.

Beer-en legea analito bat baino gehiago dituen ingurune batera ere aplika liteke, eta, espezieen arteko elkarrekintzarik egongo ez balitz, horrela adieraz liteke konposatu askotako sistema batek izango lukeen absorbantzia:

$$A_{Tot} = A_1 + A_2 + A_3 \ldots\ldots A_n$$

$$A_{Tot} = \varepsilon_1 . b . C_1 + \varepsilon_2 . b . C_2 + \varepsilon_3 . b . C_3 \ldots\ldots \varepsilon_n . b . C_n$$

Beer-Lambert-en legea honako baldintza hauen pean betetzen da:

- Laginaren gain jotzen duen erradiazioaren sorta monokromatikoa izan behar da.
- Espezie absorbatzaileen kontzentrazioa baxua izan behar da (≤0,01), kontzentrazio altuetan espezieen arteko distantzia txikitu egiten baita, eta, ondorioz, espezieen arteko edota espezie eta ingurunean dauden elektrolitoen arteko elkarrekintzak sustatzen baitira, substantzia absorbatzailearen absortibitate molarra aldatuz.
- Solutua ez litzateke disoziatu edo asoziatu behar disolbatzailearekin, eta ezta horrekin erreakzionatu ere, horren ondorioz, absortzio-espektro ezberdinak dituzten produktuak era daitezkeelako.
- Disoluzioa ez da fluoreszentea izan behar, ezta heterogeneoa ere.
- Solutua fotokimikoki egonkorra izan behar da.

B) TRANTSIZIO ELEKTRONIKOAK

Molekula jakin batek erradiazioa absorbatzen duenean, elektroi baten saltoa gertatzen da orbital batetik bestera, horrek dakarren energia-igoera edo -jaitsierarekin. Momentu

horretan, trantsizio elektroniko bat gertatu dela esaten da. Orokorrean, molekula organikoek honako trantsizio elektroniko hauek paira ditzakete:

σ	$\longrightarrow$	σ^*
n	$\longrightarrow$	σ^*
π	$\longrightarrow$	π^*
n	$\longrightarrow$	π^*

Horiez gain, karga-transferentzia trantsizioak eta eremu-estekatzaile trantsizioak ere gerta litezke. Orbital molekularrekin erlazionatutako lotura sinpleak sigma (σ) orbital bezala ezagutzen dira, eta horiei dagozkien elektroiei *σ elektroi* deritze. Lotura bikoitzetan, aldiz, bi orbital molekular mota aurki daitezke: σ orbital bat, elektroi bikote lotzaile bati dagokiona, eta pi (π) orbital bat, beste elektroi bikotearekin erlazionatutakoa. σ eta π elektroi lotzaileez gain, konposatu askok elektroi ez-lotzaileak ere izaten dituzte, n hizkiarekin adierazten direnak. Horiek ez dute lotura kimikoetan parte hartzen, eta atomo elektronegatiboen inguruan egoten dira, oxigeno, nitrogeno, sufre eta halogenoen inguruan, esaterako.

Elektroi lotzaileak dituen konposatu organiko batek energia absorbatzen duenean, trantsizio elektronikoak suertatuko dira dagozkien orbital molekular antilotzaileetara, σ^* eta π^* alegia. $\sigma \rightarrow \sigma^*$ trantsizioek energia handia behar izaten dute; horregatik, absortzio-bandak urrutiko UVan ikusten dira, eta, ikusi ahal izateko, absortzio-espektroak hutsean erregistratu beharko lirateke. Trantsizio mota horiek hidrokarburo saturatuetan gertatzen dira, C-H loturak besterik ez dituzten hidrokarburoetan, alegia. Horrela, metanoak 125 nm-tan emango luke bere absorbantzia maximoa; etanoak, aldiz, 135 nm-tan. Instrumentuarekin erlazionatutako zailtasunak direla-eta, , banda horiek interes txikia izaten dute ikuspuntu analitiko batetik.

Orbital ez-lotzaileetan dauden bikote elektronikoak dituzten konposatu kimikoen kasuan, hau da, oxigenoa, nitrogenoa, sufrea edota halogenoak dituzten konposatuetan, n $\rightarrow \sigma^*$ trantsizioak gerta daitezke. Elkarrekintza horiekin erlazionatutako bandek $\sigma \rightarrow \sigma^*$ trantsizioek baino energia txikiagoa behar izaten dute, eta 150-250 nm bitartean dagoen esparruan ikusi ohi dira.

Konposatu organikoen absortzio-espektroskopiarekin erlazionatutako aplikazio gehienak n $\rightarrow$ π^* eta π $\rightarrow$ π^* trantsizioetan oinarritzen dira, lortutako absortzio-bandak esperimentalki errazago irits daitekeen espektroaren eremu batean baitaude (200-700 nm). Bi trantsizio horiek π elektroiak dituzten talde funtzionaletan gertatzen dira, kromoforo bezala ezagutzen diren talde funtzionaletan, hain zuzen ere.

Azaldutako trantsizioez gain, karga-trantsizio eta estekatzaile-eremu trantsizioak ere badaude. Karga-trantsizioak espezie emaile eta hartzaile baten arteko transferentzia elektronikoan oinarritzen dira, metal eta estekatzaile batean eratutako konplexuetan, esaterako. Transferentzia horri esker, egoera kitzikatu bat sortzen da barne oxidazio-erredukzio prozesu baten ondorioz. Ikuspuntu analitiko batetik, garrantzitsuak izaten dira karga-trantsizioan oinarriturik dagoen absortzioa aurkezten duten espezieak, horien absortibitate molarra oso altua izaten baita (ε_{max} > 10.000), sentsibilitate oso altuko metodoak lortuz. Adibide gisa, burdinaren (III) konplexu fenolikoa, o-fenantrolinaren eta burdinaren (II) arteko konplexua, edota tiozianatoaren eta burdinaren (III) arteko konplexuak aipa daitezke:

$$Fe(III) - SCN^{2+} + h\upsilon \longrightarrow Fe(II)\text{-}SCN$$

Burdinak eta tiozianatoak eratutako konplexuaren absortzioak, Fe(III) – SCN^{2+}, elektroi baten transferentzia sustatzen du estekatzailetik burdinaren orbital batera. Horrela, egoera kitzikatuan dagoen konplexu bat lortuko litzateke, burdinez (II) eta neutro egoeran dagoen tiozianatoz osaturik legokeena.

D) KROMOFOROAK

Kromoforoak dira uhin-luzera bateko erradiazio ultramore edo ikusgaia (UV/Ik) absorbatzeko gaitasuna duten molekula baten talde funtzionalak. Horiez gain, beste talde funtzional batzuek, nahiz eta erraz lan egin daitekeen uhin-luzeratan (>200 nm) erradiaziorik xurgatzeko gaitasunik ez izan, berezko kromoforoen absortzioa sustatzeko gaitasuna erakusten dute. Talde funtzional horiei *auxokromo* deritze, eta kromoforo batek emandako absortzio-bandaren desplazamendua bultzatzen dute uhin-luzera altuagotara (efektu batokromikoa), eta baita banda horien intentsitatea areagotu ere (efektu hiperkromikoa). Auxokromo bezala, -OH, $-OCH_3$, -Br, -Cl, -OAc eta $-NR_2$ taldeak aipa daitezke, adibide gisa. 2. taulan jasoak daude talde kromoforo ohikoenak eta horien ezaugarriak. Talde funtzionalen

identifikazioa egin nahi izanez gero, kontuan izan beharko litzateke bertan ageri diren uhin-luzera balioak gutxi gorabeherakoak direla, bai egitura molekularrak eta bai konposatuaren disolbatzaileak eragina baitute absortzio uhin-luzeraren maximoan (λ_{max}).

2. taula. Talde kromoforo ezberdinen ezaugarriak.

Kromoforoa	Egitura	Disolbatzailea	λ_{max} (nm)	Trantsizioa
Alkeno	C_6H_{13}—C(H)=CH_2	N-heptanoa	177	$\pi \rightarrow \pi^*$
Alkino	C_5H_{11}—C≡C—CH_3	N-heptanoa	178, 196 eta 225	$\pi \rightarrow \pi^*$
Aldehido	H_3C—C(=O)H	N-hexanoa	180	$n \rightarrow \sigma^*$
			293	$n \rightarrow \pi^*$
Zetona	H_3C—C(=O)—CH_3	N-hexanoa	186	$n \rightarrow \sigma^*$
			280	$n \rightarrow \pi^*$
Karboxilo	H_3C—C(=O)—OH	Etanola	204	$n \rightarrow \pi^*$
Amida	H_3C—C(=O)—NH_2	Ura	214	$n \rightarrow \pi^*$
Azo	H_3C—N=N—CH_3	Etanola	339	$n \rightarrow \pi^*$
Nitro	H_3C—NO_2	Isooktanoa	280	$n \rightarrow \pi^*$
Nitrato	C_2H_5—O—NO_2	Dioxanoa	270	$n \rightarrow \pi^*$

Orokorrean, disolbatzailearen polaritatea areagotzean, uhin-luzeraren (λ) desplazamendua gertatzen da λ baxuagoetarantz (efektu hipsokromikoa), $n \rightarrow \pi^*$ trantsizioen kasurako. $\pi \rightarrow \pi^*$ trantsizioetarako, ordea, desplazamendua λ altuagoetarantz gertatzen da (efektu batokromikoa). Joera hori gertatzen da egoera kitzikatua oinarrizko egoera baino polarragoa izateagatik; hortaz, disolbatzailearen polaritatea handitzen den heinean, egoera kitzikatuak disolbatzailean duen egonkortasuna ere areagotu egiten da. Haatik, $n \rightarrow \pi^*$ trantsizioetan bikote elektroniko ez-lotzailearen disolbagarritasuna handitu egiten da, eta, ondorioz, orbital ez-lotzailearen energia jaitsi egingo litzateke π^* orbitalaren energia baino neurri handiago batean. Hori dela-eta, $n \rightarrow \pi^*$ trantsiziorako energia handiagoaren beharra dago, eta, horregatik, desplazamendu hipsokromiko bat gertatuko da.

Espezie absorbatzailearen gain duen eraginaz aparte, UV/Ik espektrofotometrian erabiliko den disolbatzailea optikoki gardena izan behar da. Espektrofotometria UV teknikan

erabilitako disolbatzaile erabilienen artean daude ura, etanola, azetonitriloa, metanola, isopropanola eta h-hexanoa . Eremu ikusgaian, ordea, kolorgea den edozein disolbatzaile da erabilgarria. 3. taulan jasoak daude disolbatzailearen transmitantzia %60tik behera egotea ahalbidetuko duten uhin-luzerak, alegia, disolbatzaile bakoitzarekin erabil daitezkeen λ minimoak; balio horiek 1 cm-ko bide optikoa kontuan hartuz lortu dira.

3. taula. Uhin-luzera minimoak, UV/IK espektroskopian erabiltzen diren hainbat disolbatzailerekin lan egiteko.

Disolbatzailea	λ_{min} *(nm)*
Ura	190
Azetonitriloa	190
n-Hexanoa	195
Ziklohexanoa	200
Etanola	210
Isopropanola	210
Metanola	215
Tetrahidrofuranoa	245
Kloroformoa	250
Dimetilformamida	270
Karbono tetrakloruroa	280
Bentzenoa, toluenoa, xilenoa	280
Piridina	310
Azetona	330

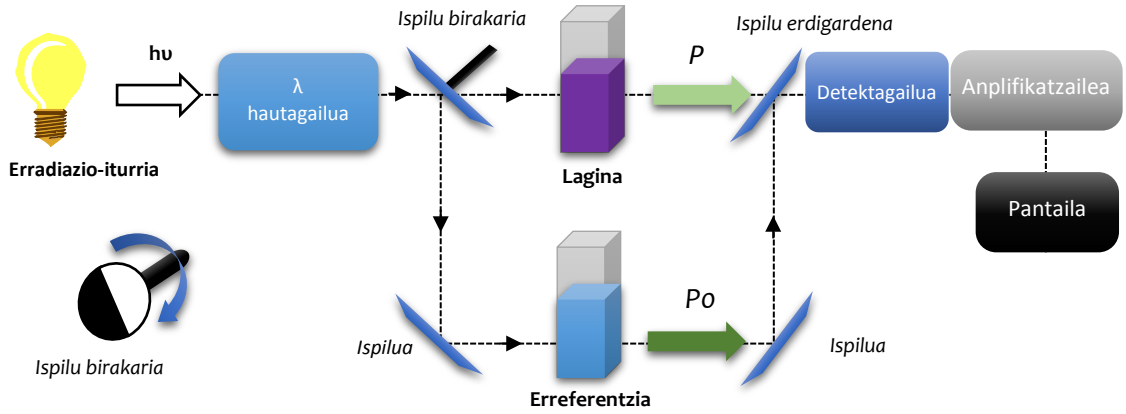
E) INSTRUMENTAZIOA

UV/Ik espektrofotometrian, absorbantzia edo transmitantzia neurtzeko λ-ren arabera, espektrofotometro bezala ezagutzen diren instrumentuak erabiltzen dira. Horiek uhin-luzera hautagailu bezala monokromadore bat izaten dute, eta espektroaren eremu ultramorean eta ikusgaian lan egin dezakete. Gainera, hodi fotobiderkatzaile bat izaten dute detektagailu bezala, fotometro sinpleek erabilitako detektagailuak baino konplexuagoa den elementu bat izanik.

5. irudiak UV/Ik espektrofotometro baten atal nagusiak aurkezten ditu. Sorta bakarreko eta bi sortako instrumentuak existitzen dira. Sorta bakarrekoetan, erradiazioa laginetik pasatu ondoren detektagailura iristen da. Gailu horietan lagina neurtu aurretik, zuri

baten neurketa egin beharko da, erreferentziazko disoluzioa neurketarako erabiliko den kubetan sartuz. Bi sortetako instrumentuetan, ispilu birakari bati eragiten dion motor bati esker, erradiazioa, aldizka, laginetik eta erreferentziazko kubetatik pasatuko da. Ispiluak sorta desbideratzen ez duenean, erradiazioa laginetik pasatuko da, eta detektagailuak P potentzia duen erradiazioa neurtuko du. Ispiluak sorta desbideratzen duenean, aldiz, sorta erreferentziazko kubetatik pasatuko da, eta detektagailuak P_0 erradiazioa neurtuko du (5. irudia).

Erradiazioa hainbat alditan desbideratzen da segundo bakoitzeko, eta zirkuitoak, automatikoki, P eta P_0 konparatzen ditu absorbantzia-balio bat emateko. Horrek guztiak erradiazio-iturriaren intentsitatean izan litezkeen gorabeherekin erlazionatutako erroreak minimizatzen ditu, eta baita detektagailuarekin, ezegonkortasun elektronikoarekin edota sistema optikoan izandako aldaketekin erlazionatutako erroreak ere.



5. irudia. Bi sortako UV/Ik espektrofotometro baten irudikapen eskematikoa.

Espektrofotometroaz gain, beste instrumentu mota sinpleagoak ere existitzen dira; fotometroak edo kolorimetroak, esaterako. Kolorimetroa espektroaren eremu ikusgaian absorbatzen den erradiazioa neurtzeko erabiltzen den fotometro mota bat da. Instrumentu oso sinple bat da, eta erabilgarria da lagin baten kolorea patroi-disoluzio sorta batek emandakoarekin konparatzeko.

UV/Ik espektrofotometro baten atal nagusiak dira erradiazio-iturria, uhin-luzera hautagailua eta detektagailua. Lagina edo neurketarako disoluzioaren absorbantzia neurtzeko, ibilbide optikoan λ hautagailuaren ostean jarriko da.

- ERRADIAZIO-ITURRIA

Molekulen absortzioa eremu UV/Ik-n neurtzeko, ezinbestekoa da uhin-luzera tarte zabal batean erradiazio jarraitua igortzen duen iturria erabiltzea. Gainera, bat-bateko potentziaren aldaketak jasaten ez dituen erradiazioa izan behar da. Erradiazio ez-jarraitua igortzen duten iturriek, ordea, lerroen iturriak esaterako, uhin-luzera zehatzeko erradiazioa igortzen dute, ia monokromatikoa den erradiazioa, alegia.

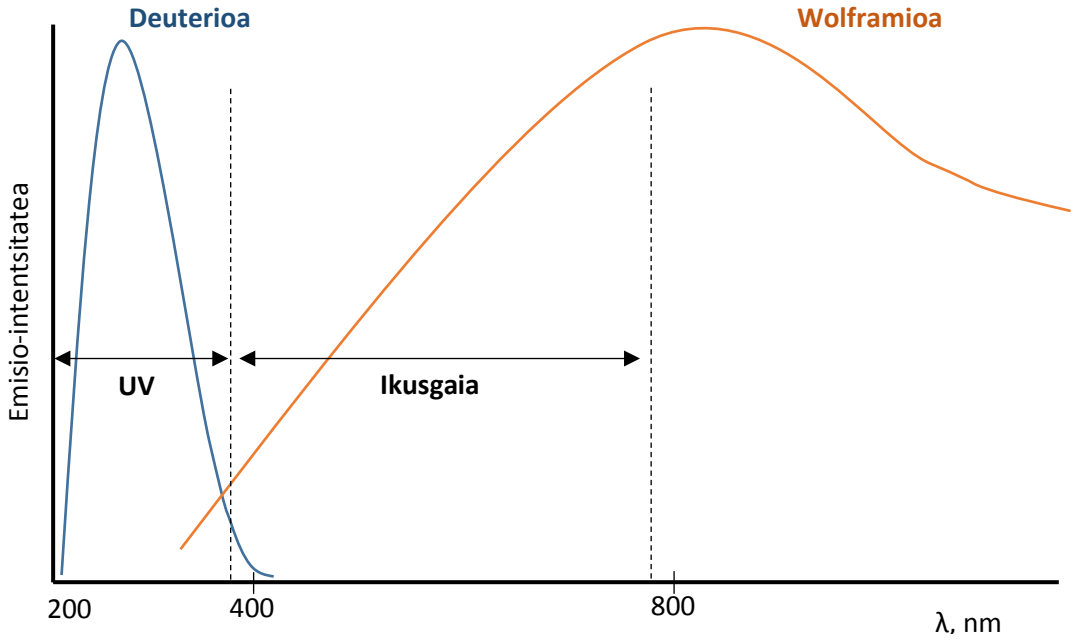
Espektroskopia UV/Ik iturri erabilienak bi motatakoak dira: termikoak eta elektrikoak. Wolframiozko lanpara bezalako iturri termikoek tenperaturaren eraginagatik igortzen dute energia; elektrikoek, aldiz, deuteriozko (De) lanparak esaterako, deuterio-gasez beteriko lanpara batean izandako deskarga elektrikoen eraginagatik.

Wolframiozko harizpia duen lanparak erradiazio jarraitua igortzen du 350-2500 nm bitartean, espektro elektromagnetikoaren eremu infragorrian hain zuzen ere. Iturri horren energia-distribuzioa gorputz beltzetik gertu dago, eta, hori dela-eta, harizpiaren tenperaturaren menpe dago horren materialaren menpe baino gehiago. Gorputz beltzaren erradiazioa sortzen da wolframiozko harizpia bezalako solidoak goritasuneraino berotzen direnean, energia termikoagatik solido kondentsatuan izaten diren oszilazio atomiko eta molekularren ondorioz. Wolframiozko lanpara aproposa da 350 nm-tik behera lan egiteko, alde batetik erradiazioaren potentzia baxua delako, eta, bestalde, lanpararen beirak UV erradiazioa xurgatzen duelako, laginera iristera saihestuz. UV eremuan deuteriozko lanpara bezalako argi-iturriak erabiltzen dira, deuterioaren edo hidrogenoaren kitzikapenak, presio baxuetan, espektro jarraitu bat igortzen baitu eremu horretan (6. irudia).

- UHIN-LUZERA HAUTAGAILUA

Analisi espektroskopikoetan, erradiazio-banda estu eta jarraitu batekin lan egiten da. Banda estuek neurketa analitikoen sentsibilitatea eta selektibitatea hobetzen dute, eta beharrezkoak dira seinale instrumentalaren eta analitoaren kontzentrazioaren arteko erlazio lineal bat lortzeko. Egoera ideal batean, uhin-luzera hautagailu batetik irtendako erradiazioak monokromatikoa izan beharko luke, frekuentzia edo uhin-luzera bakarrekoa, alegia. Haatik, ez dago egoera ideal horri hurbiltzen zaion monokromadorerik, erradiazio-banda estu bat lortuz erradiazio monokromatiko baten ordez. Banda-zabalera uhin-luzera hautagailuaren

kalitatearekiko alderantziz proportzionala da; ildo horretan, zenbat eta estuagoa izan banda-zabalera, orduan eta erresoluzio espektral handiagoa.



6. irudia. Deuterio eta wolframiozko lanparen emisio-intentsitatea uhin-luzeraren arabera.

Uhin-luzera hautagailuen artean iragazkiak eta monokromadoreak izaten dira erabilienak. Iragazkien artean, interferentziakoak eta absortziokoak daude. Lehenengoak espektroaren eremu ikusgairako dira baliagarriak; bigarrenek, aldiz, UV eremuan, ikusgaian eta infragorriaren atal zabal batean ere lan egin dezakete. Absortzio-iragazkiek hainbat eremutan erradiazioa xurgatzen dute, eremu ikusgaian batez ere. Horien artean, koloredun beirak eta beirazko bi plaken artean kokaturiko koloratzaile baten gelatinazko esekidura bat izaten dira erabilienak. Interferentziazko iragazkiak, aldiz, interferentzia optikoetan oinarritzen dira erradiazio-banda estuak sortzeko. Iragazki horiek absortzio-iragazkiek baino banda-zabalera txikiagoko erradiazioa sorrarazten dute, 10-20 nm 30-250 nm-ren aurrean, eta bi xafla metalikoen artean kokatzen den dielektriko garden batez osatuak daude (normalean, CaF_2 edo MgF_2).

Iragazkiek ez dute etengabeko uhin-luzeraren hautaketarik egiten uzten, eskaneatze espektral bat egiteko, adibidez. Gainera, hainbat uhin-luzeratan analisiak egin behar direnean, iragazkiak aldatu behar izaten dira neurketen artean. Hori dela-eta, uhin-luzeraren hautaketarako, monokromadoreak iragazkiak baino askoz hobeak izan ohi dira, purutasun espektral askoz ere handiagoko erradiazioa emanez. Monokromadore bat da iturri batek igorritako erradiazio UV/Ik bere uhin-luzera desberdinetan sakabanatzeko funtzioa duen atal

instrumentala, laginaren gain joko duen erradiazio-banda estu bat hautatuz. Uhin-luzera hautagailu horiek atal ezberdinetan banatzen dira (7. irudia):

(1) Monokromadorera sartuko den erradiazio sorta polikromatikoa hautatzen duen sarrera-zirrikitua.

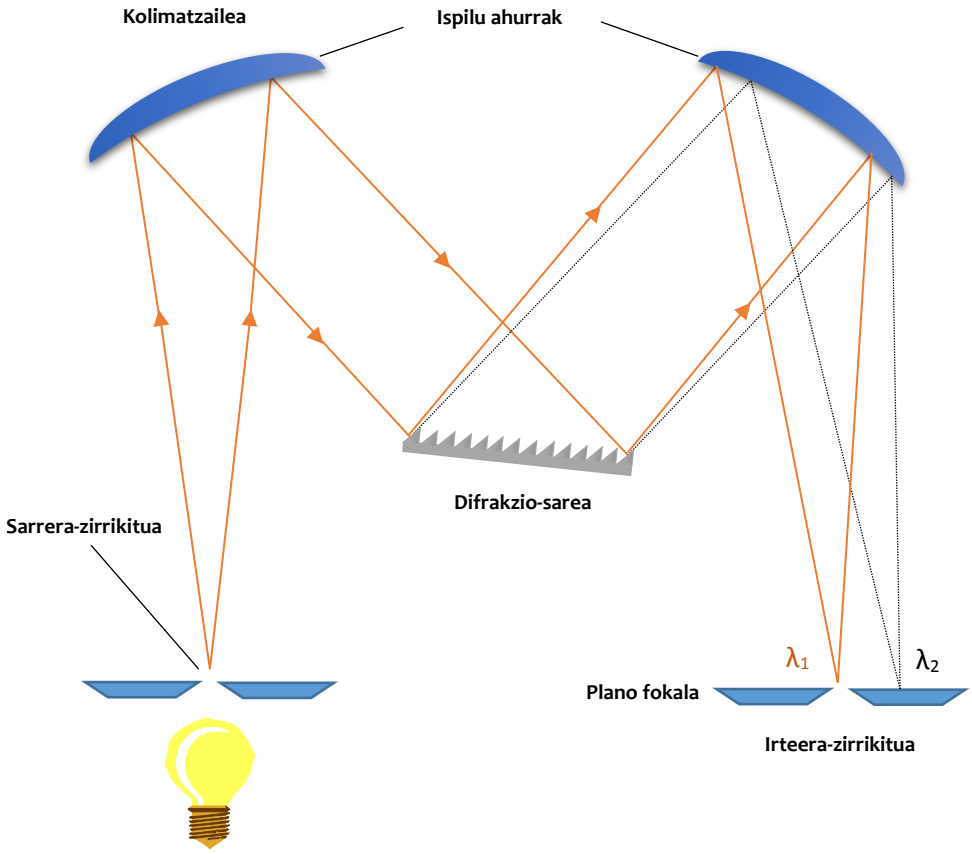
(2) Erradiazio sorta paralelo bat sorrarazten duen ispilu edo lente kolimatzailea. Erreflexio-sare batean emango den difrakzioa kontrolagarria izan dadin, erradiazioa aldez aurretik kolimatua egon behar da.

(3) Erradiazio elektromagnetikoa bere λ ezberdinetan banatuko duen atal dispertsatzaile bat (sare edo prisma bat). Prisma batek sorrarazten duen erradiazioaren dispertsioa errefrakzio-fenomenoan oinarritzen da, erradiazio sorta batek jasaten duen norabidearen aldaketan errefrakzio-indize ezberdinak dituzten ingurune batetik beste batera pasatzean, alegia.

Erreflexio-sareak, bestalde, leundutako gainazal gogor batez osaturik daude, aluminiozkoa dena islatzailea izan dadin. Era berean, aluminioa silizez estalia dago, gainazalaren distira eta, ondorioz, bere erreflektantzia mantentzearren. Aluminiozko gainazalean elkarren artean oso gertu dauden hainbat ildo paralelo daude, eta sareak erradiazioa islatzen duenean, ildo bakoitzak erradiazio-iturri indibidual bezala jokatzen du.

(4) Elementu fokatzaile bat, sarrerako zirrikituko irudia berriro sortzeaz eta plano fokal bezala ezagutzen den gainazal lau batean fokatzeaz arduratuko dena.

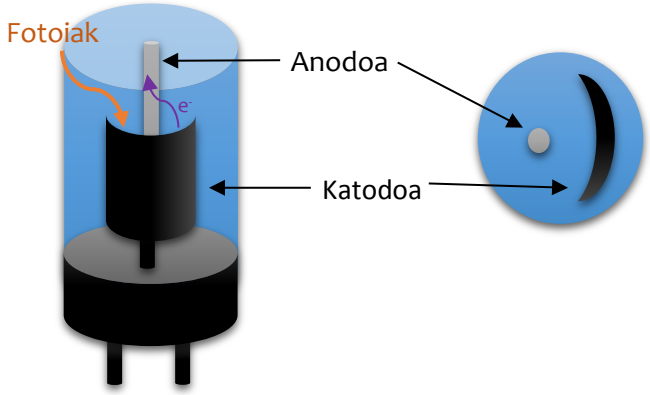
(5) Lanerako erabiliko den λ islatzen duen irteera-zirrikitua.



7. irudia. Czerny-Turner motako monokromadorea.

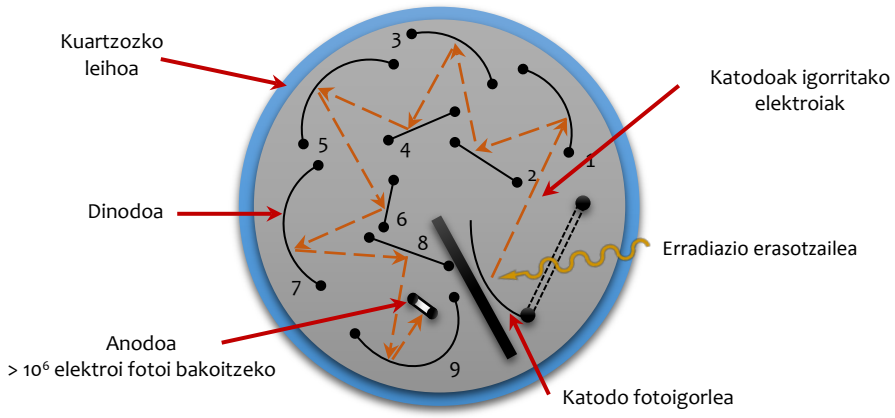
- DETEKTAGAILUA

UV/Ik espektrofotometrian erabilitako detektagailuak dira erradiazioa seinale elektriko bihurtzen duten transduktoreak dira. Ezagunenen artean daude fotohodiak eta hodi fotobiderkatzaileak. Lehenak, hutsean dagoen beirazko edo kuartzozko ontzi baten barnealdean, anodo bat eta material fotosentikor batez estalitako katodo erdi-zilindriko bat ditu. Erradiazioak katodoaren gain jotzen duenean, anodorantz bideratzen diren fotoelektroiak igortzen dira, korronte elektriko bat sorraraziz. Igorritako elektroi kopurua, katodoaren gainazalaren gain jotzen duen erradiazio sortaren potentziarekiko proportzionala izango da.



8. irudia. Hutsezko fotohodi baten irudi eskematikoa.

Hodi fotobiderkatzaileak fotohodiek baino sentsibilitate altuagoa duten detektagailuak dira, katodo fotosentikor batez eta dinodo bezala ezagutzen diren hainbat elektrodoz osaturik daudenak (8. irudia). Dinodo horietako bakoitzari potentzial elektriko ezberdin bat aplikatuko zaio, dinodoz dinodo igoz doan potentzial bat, alegia. Horrela, dinodo bakoitzean hurrengo dinodoan aplikatuko den potentziala baino negatiboagoa den bat aplikatuko da. Fotokatodora iristen den erradiazioak elektroi primarioen igorpena sustatzen du, lehenengo dinodora azeleratuko direnak. Bertan talka egitean, fotoelektroi bakoitzak beste hainbat elektroiren sorrera sustatzen du, 2. dinodora azeleratuko direnak. Horrela, behin eta berriz, elektroien eta jarraian datozen dinodoen arteko talkak gertatuko dira azkeneko anodoan elektroi sorta bat jasoz. Anplifikatu berri den korronte elektriko edo elektroi sorta hori izango da azkenean instrumentuak neurtuko duena. Normalean, hodi fotobiderkatzaileek 9-10 dinodo izaten dituzte, 10^6 eta 10^7 bitarteko elektroi kopurua sorraraziz erradiazioaren fotoi bakoitzeko.



9. irudia. Hodi fotobiderkatzaile baten irudi eskematikoa.

1.2.2 UV/IK ESPEKTROFOTOMETRIA-PRAKTIKAK

BURDINAREN DETERMINAZIOA, ANTIANEMIKO BATEAN ULTRAMORE/IKUSGAI ESPEKTROFOTOMETRIA MOLEKULARRA ERABILIZ

1-. SARRERA

Burdina sistema biologikoetan ezinbestekoa den elementua da, eta hainbat makromolekuletan aurki daiteke; hemoglobinan —oxigenoaren garraiorako ezinbestekoa dena— mioglobinan edota *hemo* egiturak dituzten entzimetan —zitokromo mikrosomikoak eta mitokondrialak, esaterako—. Dietarekin batera gorputzean sartutako burdinaren eta horren galeraren artean desoreka bat gertatuz gero, pertsona batek anemia ferropeniko bat paira lezake eta, ondorioz, gaixoak burdina duen sendagairen bat hartu beharko luke.

Fe^{+2} katioiak ortofenantrolina konposatuarekin koloredun konplexu bat sortzen du, pH eta indar ioniko baldintza konkretu batzuetan. Ondorioz, burdinaren determinazioa erradiazio elektromagnetikoaren tarte ikusgaian egin daiteke, molekula-absortzio espektrofotometria erabiliz.

$$Fe^{2+} + 3(C_{12}H_8N_2) \leftrightarrow [(C_{12}H_8N_2)_3Fe]^{2+}$$

2-. HELBURUA

Praktika honen helburu nagusia da anemiaren kontrako sendagai batek duen burdina kantitatearen determinazioa egitea da.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

UM/Ik espektrofotometroa
Kubetak
Motrailua
Iragazteko sistema
Matraze aforatuak
Pipetak
Hauspeakin-ontziak
Irabiagailu magnetikoa
Balantza analitikoa

Azido azetikoa

Sodio azetatoa

Sulfato ferroso amonikoa

%1 (p/v) den ortofenantrolina-disoluzioa

Sodio kloruroa

4-. PROZEDURA

a) Lehendabizi, honako disoluzio hauek prestatuko dira:

- NaCl 1M den 250 mL-ko disoluzioa.
- 100 mL HAc/Ac^- 1 M den disoluzio indargetzailearen 100 mL-ko disoluzioa.
- 10^{-3} M Fe^{+2} den 100 mL-ko disoluzioa, sulfato ferroso amonikotik abiatuta.

b) Kalibrazioa

Burdinaren kuantifikazioa kanpo-kalibrazioa erabiliz gauzatuko da. Horretarako, bost patroi-disoluzio prestatuko dira, 50 mL-ko bost matraze aforatuetara honako erreaktibo hauek gehituz: presatutako NaCl 1 M disoluzioaren 25 mL, azetiko/azetato 1M indargetzailearen 2,5 mL, eta %1 den ortofenantrolina disoluzioaren 2,5 mL. Gainera, matraze bakoitzari 10^{-3} M Fe^{+2} den disoluziotik beharrezkoa den bolumena gehituko zaio, 10^{-5} M eta 10^{-4} M bitartean kontzentrazio ezberdineko bost disoluzio lortzeko. Azkenik, seigarren matraze batean zuri bat prestatuko da, burdina izan ezik gainontzeko erreaktiboak dituena.

Metodoaren sentsibilitatea maximoa izan dadin, Fe^{+2}-ortofenantrolina konplexuaren espektroa kontuan izanik, eremu ikusgaian, uhin-luzera egokia aukeratu behar da (512 nm). Ondoren, patroi-disoluzioen absorbantzia neurtuko da.

d) Laginaren prestaketa

Sendagaiaren konprimatu bat pisatu, motrailuan birrindu eta homogeneizatu. Ondoren, lortutako hautsa hauspeakin-ontzi batera kuantitatiboki pasatuko da, eta ur desionizatutan disolbatuko da, nahasketa etengabe irabiatuz eta beroa aplikatuz. Azkenik, disoluzioa iragazi eta 100 mL-ko matraze batera eramango da, ur destilatua arraseraino gehituz.

Laborategi farmazeutikoaren espezifikazioak kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatu beharko da, bere kontzentrazioa kalibrazioaren tarte aplikagarriaren barnean egon dadin. Diluzio hori 50 mL-ko matraze batean prestatu beharko da, eta

Fe^{+2}-ortofenantrolina konplexua eratzeko beharrezkoak diren erreaktiboak gehituko zaizkio.

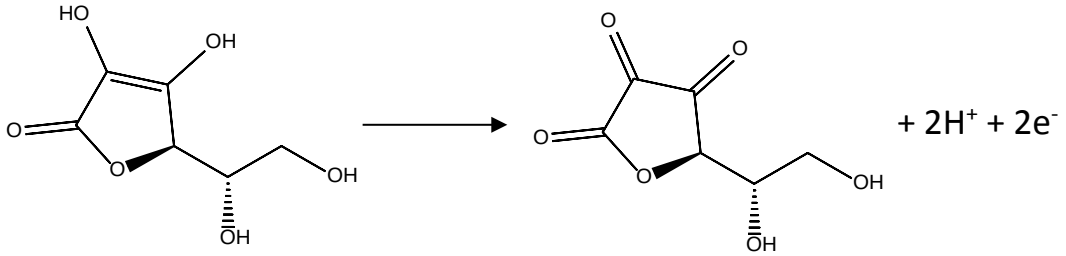
5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Patroi-disoluzioek emandako absorbantzia-balioetatik abiatuz, kontzentrazioaren eta seinale instrumentalaren arteko erlazio lineala ezarriko da, karratu minimoen bidezko erregresio lineala dela medio. Lortutako kalibrazio zuzenaren ekuazioa erabiliz eta laginaren seinale analitikoa aintzat hartuz, burdinaren kontzentrazioa determinatuko da prestatutako azken disoluzioan. Kontzentrazio horretatik abiatuz, sendagaiaren burdina-edukia kalkulatuko da. Bide batez, kalkula bitez osagai aktiboaren portzentajea sendagaian eta baita errore erlatiboa ere.

KONPRIMATUETAN DAGOEN AZIDO ASKORBIKOAREN DETERMINAZIOA, UV/IK ESPEKTROFOTOMETRIA MOLEKULARRA ERABILIZ

1-. SARRERA

Azido askorbikoak (C bitamina), bere forma erreduzituarekin batera ezarritako erredox-sistemari esker, ekintza fisiologiko ugaritan parte hartzen du giza organismoan.



Azido L-askorbikoa Azido L-deshidroaskorbikoa

Azido askorbikoak organismoan gertatzen diren erreakzio askotan parte hartzen du; kolagenoaren sintesian, esaterako. Hori dela eta, konposatu horren gabeziak, azalean, ehun konjuntibo baskularrean, hezurretan eta hortzetan alterazio larriak sorraraz ditzake, eskorbutoak gehien kaltetzen dituen ehunak edota organoak izanik. Gainera, hormona esteroideoen sintesiaren lehen etapetan parte hartzen du, eta baita lipidoen eta farmako askoren metabolismoan ere. Azkenik, bere izaera erreduzitzailea dela eta, erradikal askeen neutralizazioa ere sustatzen du, zelulen estres oxidatiboa gutxituz.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua izango da sendagai batek duen azido askorbiko edukia ezagutzea , horretarako, molekula-absortzio UV/Ik espektrofotometria erabiliko da, espektro elektromagnetikoaren eremu ultramorean lan eginik.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

1 cm-ko bide optikoa duten kuartzozko kubetak

Erloju-beira

Matraze aforatuak

Pipetak

Hauspeakin-ontziak

Motrailua

Inbutua

Azido askorbikoaren estandar solidoa

4-. PROZEDURA

a) Kalibrazioa

Lehenik eta behin, kalibrazio zuzena zehazteko, 1 eta 10 mg/L bitarteko kontzentrazioa duten azido askorbikoaren hainbat patroi-disoluzio prestatuko dira, 100 mL-ko matraze aforatuak erabiliz. Horretarako, azido askorbiko 100 mg/L den bitarteko disoluzio bat erabiliko da, dagokion diluzioa eginik patroi-disoluzio bakoitza prestatzerakoan.

Analisi-metodoak sentsibilitate maximoa izan dezan, espektro elektromagnetikoaren eremu ultramore guztian (200-400 nm) uhin-luzeren eskaneatze bat gauzatuko da, absorbantzia maximoa zein uhin-luzeratan gertatzen den jakiteko. Horretarako, kalibrazio zuzenaren erdialdean dagoen kontzentrazioa duen patroi-disoluzio bat hartu, kubetan ipini, eta eskaneatzea egiteari ekingo zaio. Behin λ finkaturik dagoela, patroi-disoluzio bakoitzaren absorbantzia neurtuko da.

b) Laginaren prestaketa

Sendagaiaren konprimatu bat hartu, pisatu eta birrindu egingo da hauts fin bat lortu arte. Hauts horren kantitate zehatz bat pisatu, disolbatu eta 100 mL-ko matraze aforatu batera isuriko da, ur destilatuarekin arrasean jarriz. Ontzian adierazitako espezifikazio farmazeutikoak kontuan izanik, laginaren diluzio apropos bat egingo da, azido askorbikoaren azken kontzentrazioa kalibrazio zuzenaren erdialdean gera dadin. Azkenik, diluitutako laginaren absorbantziaren neurketari ekingo zaio.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Patroi-disoluzioen neurketatik abiatuta, kontzentrazioaren eta seinale instrumentalaren arteko erlazioa determinatuko da, karratu minimoen metodoa dela medio, erregresio lineal bat eginik. Lortutako zuzena erabiliz, laginak emandako absorbantzia-balioetatik abiatuta azido askorbikoaren kontzentrazioa determinatuko da diluitutako laginean, eta, hori jakinda, askorbikoaren kantitatea kalkulatuko da sendagaian. Bide batez, kalkula bitez osagai aktiboaren portzentajea sendagaian, eta baita errore erlatiboa ere.

1.2.3 ATOMO-ABSORTZIOZKO ESPEKTROSKOPIA

Atomo-absortzio espektroskopia (AAE) da ia edozein lagin motatan metal eta ez-metalen determinazio kuantitatiboa egiteko erabiltzen den analisi-teknika elementala. Atomo-absortzio prozesua gertatzen da oinarrizko egoeran dauden atomo edo ioiek, λ jakin batean, energia xurgatzen dutenean. Bide optikoan dagoen elementu baten atomoen kantitatea handitzen den heinean, xurgapena ere areagotu egingo da.

UV/Ik espektroetan ez bezala, espektro atomikoak ongi definitutako lerroz osaturik daude, energia elektroniko maila ezberdinen artean izaten diren trantsizioei esker. Hori dela eta, lagin batean dauden elementuen espektroen lerroen artean ez da gainezarpenik izaten, analisi-teknika horren selektibitate altua agerian geratuz.

Edozein oxidazio-mailatan dagoen atomo aske bati tenperatura altuak edo UV/Ik eremuko erradiazioa aplikatzen bazaio, kanpoko geruzako elektroiren bat egoera kitzikatu batera pasatuko da, energiaren xurgapenari esker. Atomoa oinarrizko egoerara espontaneoki itzultzen denean, aurretik xurgatutako energia igorriko du fotoi modura. Max Planckek deskribatutako Teoria Kuantikoaren bi funtsezko postulatuetan, atomo, ioi eta molekulak hainbat egoera energetiko diskretutan existi daitezkeela adierazten da, energia kantitate definituz osaturikoetan. Ildo horretan, energia-mailak kuantizatuak daudela esaten da, eta atomo bat oinarrizko egoeratik egoera kitzikatu batera pasatzen bada, xurgatutako energia bi egoera horien arteko energia-diferentziaren berdina izango da. Berdina gertatuko litzateke atomo batek erradiazioa igortzen duenean; oinarrizko egoerara itzultzeko askatuko duen energia, bi egoera energetikoen arteko energia diferentziaren berdina izango da.

Xurgatutako energiaren edo, bestela esanda, bi egoera energetikoen arteko energia-diferentziaren eta materiaren gain jotzen duen erradiazioaren frekuentziaren arteko erlazio matematikoa Plancken ekuazioaren bitartez adierazten da.

$$E = E_1 - E_0 = h\upsilon \qquad (12)$$

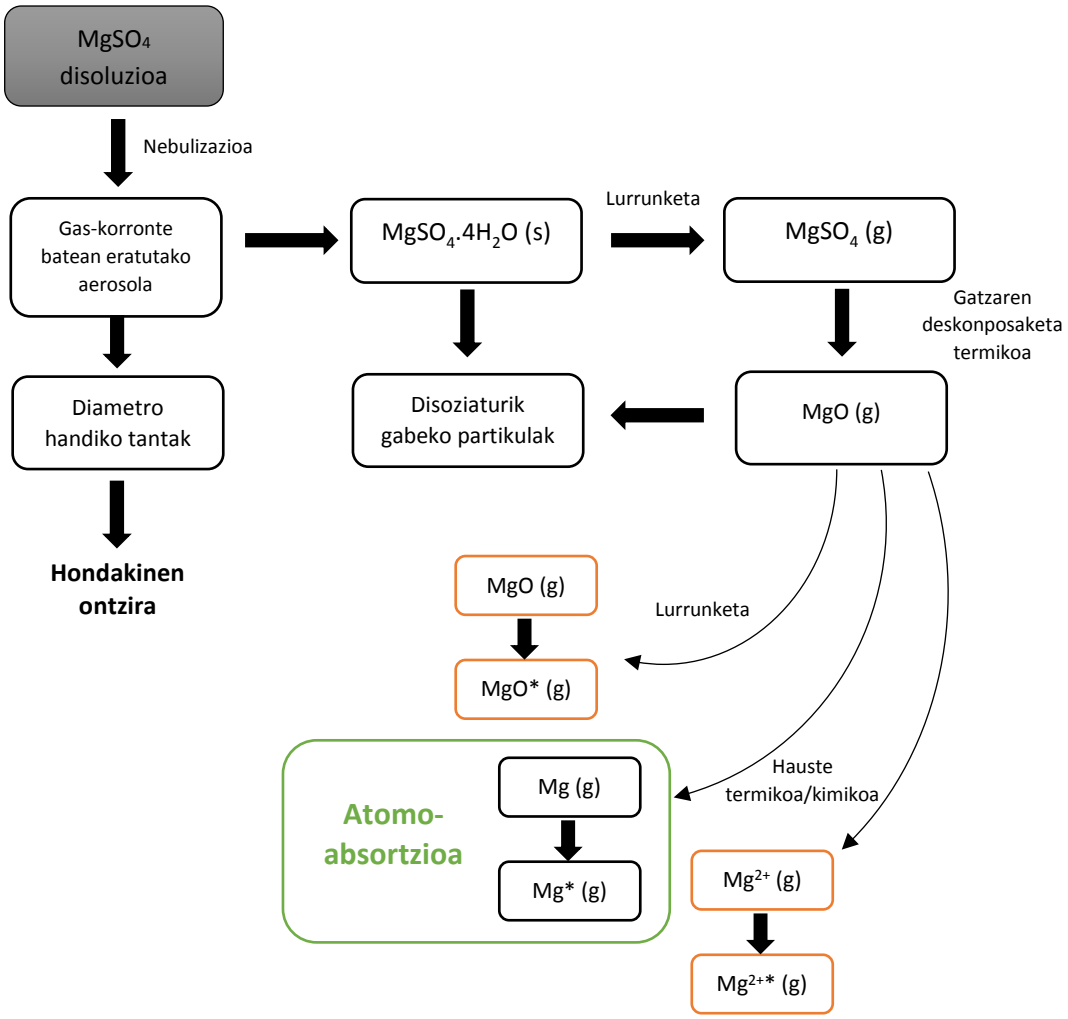
E fotoi baten energia izanik, E_1 eta E_0 egoera kitzikatuaren eta oinarrizko egoeraren energiak, *h* Planck-en konstantea ($6{,}626 \times 10^{-34}$ J s) eta υ erradiazioaren frekuentzia. Halaber, Planck-en ekuazioa uhin-luzeraren funtziopean ere adieraz daiteke:

$$E = h\,\frac{c}{\lambda} \qquad (13)$$

c argiaren abiadura izanik (hutsean, 3 10^8 m/s) eta λ erradiazioaren uhin-luzera. Atomo eta molekulen egoera energetikoei *egoera elektroniko* deritze, eta horien energia elektroiek nukleoaren inguruan deskribatutako mugimendutik dator. Molekulek, ordea, egoera elektronikoez gain, kuantizatutako beste egoera energetiko batzuk ere badituzte, atomoen arteko bibrazioekin (egoera bibrazionalak) eta beren grabitate-zentroaren inguruko errotazio molekularrekin erlazionatuak daudenak (egoera errotazionalak).

A) ATOMIZAZIO PROZESUA

AAEn, atomoak egoera askean lortzeko, ezinbestekoa da atomizazio-sistema bat edukitzea. Horrek, disolbatzailea eliminatzen du, analitoa gas-egoeran dauden atomo bezala askatuz. AAEn erabiltzen diren sistema atomizatzaileen artean, garraren bidezko atomizazioa dago, non lagina 2000-3000 K bitarteko tenperatura batekin kontaktuan jartzen baita, disolbatzailea lurrundu eta partikula solidoak atomizatzeko, horrela, atomo, molekula eta ioiak lortuz (10. irudia). Prozesu hori 10 cm-ko bide optikoa duen gar batean gertatzen da, garraren konoen arteko gunean. Bestalde, argi-iturri batek, ohikoa den katodo hutseko lanparak esaterako, energia elektromagnetikoa igorriko du, analitoek xurgatuko dutena beren kitzikapena eraginez.

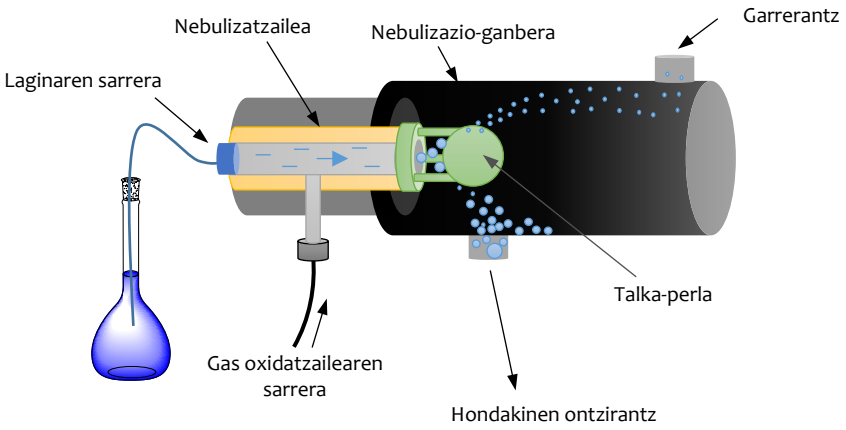


10. irudia. Magnesio sulfato tetrahidratatuaren atomizazio-prozesua gar batean.

Hasierako disoluziotik, gas-egoeran dauden atomo bilakatu arte, analitoaren atomoek hainbat etapa jarraitzen dituzte (10. irudian, hasieran, jo dezagun analitoa $MgSO_4$ bezala dagoela). Lehendabizi, lagina disoluziotik nebulizazio-ganberara garraiatuko da, diametro txikiko hodi kapilar batean barrena (11. irudia). Hodi kapilarra laginean murgildu eta disoluzioaren mugimendua hasiko da irekitako muturretik, laginaren xurgapena gertatuz Venturi efektua dela-eta. Venturi efektuagatik ez ezik, lagina nebulizatzailean injektatzen duten ponpa peristaltikoak edo xiringak ere erabil litezke disoluzioaren mugimendua bultzatzeko.

Kapilarraren kontrako muturrean nebulizatzaile bat kokatzen da, gas oxidatzaile baten sarrera ere izaten duena. Gas oxidatzailearen fluxuaren kontrol zorrotza ezinbestekoa da laginaren xurgapena fluxu konstante eta errepikakorrean gerta dadin. Gas oxidatzailearen fluxuak lagin likidoaren xurgapena bultzatzen du, Venturi efektua dela eta.

Oxidatzailearen abiadura altuagatik, nebulizatzailera iristen den likidoa tanta finez osatutako aerosol bilakatzen da, behin nebulizatzailetik irtenda. Aerosol horren ibilbidean, gainera, talka-perla bat kokatzeko aukera dago (11. irudia), partikulen bigarren haustura bat sustatuz. Horri esker, lagin likidoaren dispertsioa eta, ondorioz, nebulizazio-prozesuaren eraginkortasuna hobetzen da. Nebulizazioaren ondorioz sortutako aerosola gas oxidatzailearekin eta erregaiarekin nahastuko da nebulizazio-ganberan.



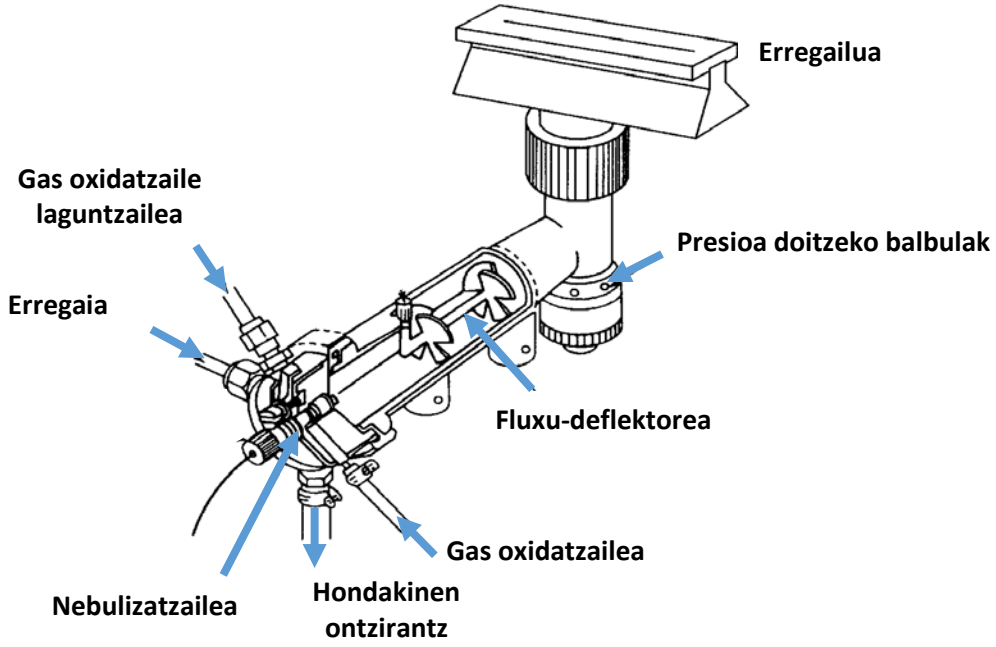
11. irudia. Nebulizazio-prozesuaren irudi eskematikoa.

Nebulizatzaile mota horiekin sortutako tantek 1-25 µm bitarteko diametroa izaten dute; haatik, 10 µm-tik beherakoak soilik pasatuko dira garrerantz. Diametro handiagokoak ez dira neurketa analitikorako aproposak, horien baporizazioa ez baita erabatekoa, garraren tenperatura gutxituz eta zarata instrumentala handiaraziz. Aerosol-oxidatzaile-erregai nahasketa barrera bezala jokatzen duten deflektoreetatik pasatzen da, tamaina handieneko tantak pasatzea saihestuz. Horiek, ganberaren hondoan jasoko dira, eta hodi batean barrena hondakinen ontzira joko dute.

Tamaina txikieneko partikulak sugarrera iritsiko dira, eta bertan disolbatzailea lurrunduko da, analitoa hidratatutako gatz bezala askatuz ($MgSO_4.4H_2O$). Lurrunketaren abiadura garraren tenperaturaren menpe dago, eta baita tanten tamainaren menpe eta garretik aerosol tantetara izaten den beroaren transferentziaren abiaduraren menpe ere. Tantak oso handiak izanez gero, desolbatazioa ez da erabatekoa izango.

Desolbatazioaren ostean, hidratazio-ura eliminatzen da, eta urtutako edo urtu gabeko gatzaren partikula solidoak gas-egoerara pasatuko dira, gas-egoeran dagoen $MgSO_4$ lortuz. Garrean tenperaturak gora egiten duen ahala, gatz-partikulak disoziatu egingo dira,

eta gas-egoeran dauden atomoak lortuko dira. Sublima daitezkeen gatzak edota irakite-puntu baxua dutenak erraz lurruntzen dira; garrean deskonposatzen diren gatzak, ordea, Mg, Al edo Ca-aren oxido egonkorrak ematen dituzte, eta ez dira sugarrean guztiz lurrunduko. $MgSO_4$-ari dagokionez, lehendabizi MgO-ra erreduzituko da, eta, ostean, Mg metalikora, AAE bitartez neurtuko dena.



12. irudia. Fluxu laminarrezko erregailu batez osatutako garra-atomizatzailea.

Adierazitako prozesu orokorra egoera ideal batean oinarriturik dago; haatik, gas-egoeran dauden atomoen formazioa saihesten duten faktore ezberdinak egon litezke. Horietako bat garraren edo atomizatzailearen ezintasuna litzateke molekulen disoziazioa eta, ondorioz, atomoen formazioa sustatzeko. Beste faktore batzuk, aldiz, konposatu errefraktarioen formazioa edota metalaren ioien formazioa lirateke, (0) oxidazio-egoeran dauden elementuak eratu beharrean. Egoera metalikoan dagoen espezie baten eta bere ioiaren absortzio-espektroak oso ezberdinak dira elkarren artean. Horregatik, atomo jakin batek emandako lerro espektral guztiak uhin-luzera ezberdinetan lortzen dira, horren ioiarekin alderatuz gero. Horregatik guztiagatik, atomo-edukia neurtzen ari bagara, ioien formazioa seinale analitikoa jaitsarazten duen interferentzia kimiko bat litzateke.

B) GARREN EZAUGARRIAK

Sugarra gas erretzaile eta oxidatzaile baten arteko erreakzio exotermiko baten ondorioz eratzen da. AAEn erabilitako lehenengo garra airez eta gas naturalez osaturik zegoen, gas oxidatzaile eta erretzaile bezala hurrenez hurren. Hiru atal nagusi bereiz daitezke sugar batean: errekuntza primarioaren gunea edo barne-konoa, kono arteko gunea eta errekuntza sekundarioaren gunea edo kanpo-konoa. Barne-konoak kolore urdina izaten du C2, CH eta bestelako erradikalek igorritako erradiazioaren ondorioz, eta ez da analisi kimikoak egiteko erabiltzen. Kono arteko gunean garraren tenperatura altuenak erdietsiko dira, eta bertan erabatekoa izango da errekuntza. Atomo askeetan aberatsa da, eta espektroskopian gehien erabilitako atala izaten da. Kanpo-konoan kono arteko gunean eratutako atomoen oxidazioa suertatzen da, oxido egonkorrak lortuz. Gune horrek tenperatura baxuagoa izaten du inguruan dagoen airearen erruz, eta ez da analisietarako erabiltzen. 4. taulan adierazi dira gar-espektroskopian gehien erabilitako erregai eta oxidatzaileak, eta baita horiekin lortutako tenperaturak ere.

Garraren funtzioa oinarrizko egoeran dauden atomoak ematea izango da; horretarako, aire-azetileno nahasketa batek elementu gehienen atomizazioa gauzatzeko energia nahikoa emango luke, tenperatura altuegiak eta, ondorioz, elementuen ionizazioagatik egon litezkeen interferentzien sorrera sustatu gabe. Gas horiek emandako garra gune espektral zabal batean optikoki gardena da, eta baldintza estekiometrikoetan edo arinki oxidatzaileetan lor daiteke. Hala ere, aire-azetileno sugarraren tenperatura baxuegia da gutxienez taula periodikoko 30 elementuetarako, horien oxido egonkorrak eratzen baitira. Horien artean daude V, Ti, Zr, Ta eta baita hainbat lantanido ere. Konposatu erregogorragoak ematen dituzten elementu horientzat, nahiago dira, oxido nitrosoz eta azetilenoz elikatutako sugarrak, tenperatura altuagoak ematen baitituzte elementu horien guztien atomizazioa ahalbidetuz.

4. taula. Gas ezberdinak erabiliz sortutako garren tenperaturak.

Oxidatzailea	***Erretzailea***	***Tenperatura (°C)***
Airea	Gas naturala	1700-1900
Airea	Hidrogenoa	2000-2100
Airea	Azetilenoa	2100-2400
Oxigenoa	Hidrogenoa	2550-2700
Oxigenoa	Gas naturala	2700-2800
Oxigenoa	Azetilenoa	3050-3150
Oxido nitrosoa	Azetilenoa	2600-2800

AAEn gas oxidatzailearen eta erretzailearen fluxuen kontrol zorrotza gauzatu behar da. Gasen fluxua errekuntzaren abiadura baino handiagoa balitz, garra itzaliko litzateke; baxuagoa izanez gero, ordea, garraren atzerapena ikus liteke (*strike back*) eztanda-arriskua areagotuz. Orokorrean, oxidatzailea eta erretzailea proportzio estekiometrikoan nahasten dira. Oxido egonkorrak ematen dituzten metalen neurketarako, ordea, aproposagoa izaten da erregai gehiago erabiltzen duen garra.

D) INSTRUMENTAZIOA

Atomo-absortzio espektrofotometro batek honako atal hauek izaten ditu:

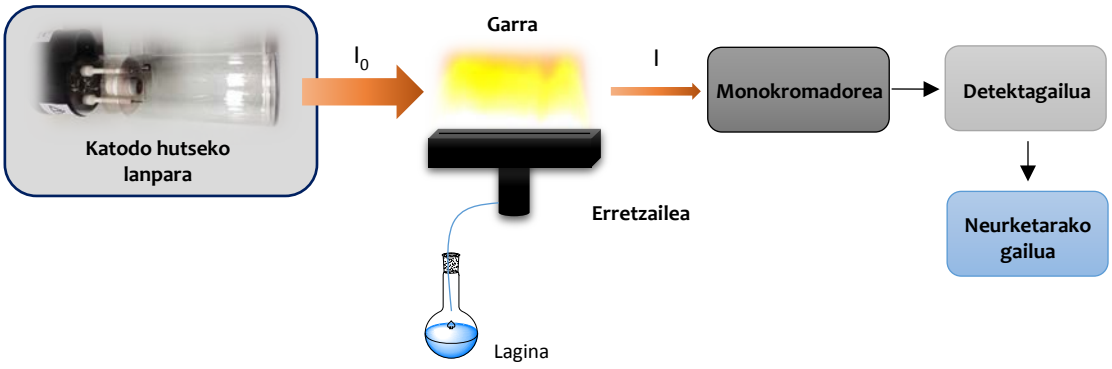
a) Lerro-espektro bat igortzen duen erradiazio-iturria.

b) Molekulen disoziazioa gauzatuko duen atomizazio-sistema bat.

c) Analisirako aproposa den uhin-luzera hautatuko duen monokromadore bat. Interesatzen zaigun uhin-luzera argi-iturriak edota sugarrean egon litezkeen beste elementuek igorritako uhin-luzeretatik isolatzen dituen atala da.

d) Erradiazio elektromagnetikoa energia elektrikoan bihurtuko duen detektagailua. Normalean, hodi fotobiderkatzaile bat izaten da.

13. irudian adierazten dira atomo-absortzio espektrofotometro baten atal nagusiak.



13. irudia. Atomo-absortzio espektrofotometro baten atal nagusiak. I_0: iturriak igorritako erradiazioaren intentsitatea, I: erradiazioaren intentsitatea, garrean ahuldua izan eta gero.

- ERRADIAZIO-ITURRIA

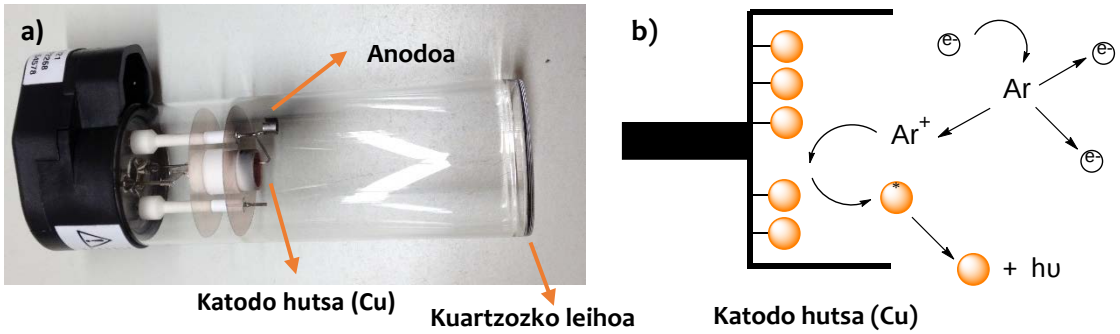
Katodo hutseko lanparak AAEn gehien erabilitako erradiazio-iturriak dira, nahiz eta bestelako lanparak ere existitzen diren, elektrodorik gabeko deskarga-lanparak esaterako. Bigarren horiek katodo hutsekoak baino gehiago erabiltzen dira lurrunkortasun altua duten elementuen neurketarako; As, Se eta Te neurtzeko, alegia.

Elementuen energia-igorpena erradiazioaren absortzioa gertatzen den uhin-luzera beretan gertatuko denez, AAE-rako lanparak analizatu nahi den elementuaren kantitate txiki bat izaten dute beren barnealdean. Horregatik guztiagatik, lanpara jakin bat existitzen da analizatu nahi den elementu bakoitzarentzat, eta taula periodikoko ia edozein elementuren neurketa egiteko lanparak daude merkatuan. Elementu bat baino gehiago determinatzeko lanparak ere badaude, Ca-Mg edo Fe-Cr-Ni lanparak, esaterako. Horien katodoak antzeko propietateak dituzten metal ezberdinez osaturik egoten dira. Orokorrean, elementu bakarreko lanparek baino kostu baxuagoa dute; hala ere, beren errendimendua baxuagoa izaten da.

AAEn erabilitako erradiazio-iturriak uhin-luzera diskretuetan energia igortzen duten lerro-iturriak dira; espektroskopia molekularrean, ordea, uhin-luzera tarte zabal batean igortzen duten iturri jarraituak erabiltzen dira. Katodo hutseko lanparek eta baita elektrodorik gabeko deskarga-lanparak ere erradiazio monokromatikoa igortzen dute uhin-luzera ezberdinetan. Horien ordez iturri jarraituak erabiliko balira, deuteriozko lanparak esaterako, monokromadore bat ere erabili beharko litzateke iturriaren eta garraren artean, lanerako aproposa den uhin-luzera egokia hautatzeko. Haatik, kalitate handieneko monokromadoreak erabilita ere, lortutako erradiazioa ez da monokromatikoa izango, uhin-luzera tarte estuko erradiazioa baizik. Gainera, erradiazio horren banda-zabalera efektiboa

atomoen absortzio-lerro bakoitza baino handiagoa izango da; horregatik, laginak monokromadorearen irteera-zirrikitutik datorren erradiazioaren atal txiki bat xurgatuko du soilik, linealak ez diren kalibrazio zuzenak lortuz eta, ondorioz, sentsibilitatea txikiagoa izanik.

Katodo hutseko lanparak hermetikoki itxia dagoen beirazko hodi zilindriko batez osaturik daude, eta horren barnean, wolframio edo zirkoniozko anodo bat eta katodo huts bat daude (14. irudia). Katodoa determinatu nahi den metalaren geruza batez estalia dago. Lanparak neona edo argona bezalako gas noble bat izaten du bere barnealdean, presio baxutan (1-5 torr). 300-500 V bitarteko potentziala aplikatzen denean elektrodoen artean, barneko gas noblea ionizatu egiten da 5-30 mA-ko korrontea eratuz. Aplikatutako potentziala egokia denean, gas noblearen ioiek energia zinetiko nahikoa izango dute katodoaren gainazalean dauden atomo metalikoak askatzeko eta atomo metalikoz osatutako laino atomikoa eratzeko. Askatutako atomo metalikoen atal txiki bat kitzikatua egongo da, eta oinarrizko egoerara itzultzean erradiazioa igorriko dute metalaren uhin-luzera propioetan. Azkenik, atomo metalikoak berriro ere katodoaren gainazalera itzuliko dira, bertan edo bestela, beirazko zilindroaren paretetan jalkiz. Hala ere, lanparak itxura zilindrikoa izateagatik, txikiagoa da bigarren aukera hori gertatzeko probabilitatea.



14. irudia. (a) Cu elementua neurtzeko erabiltzen den katodo hutseko lanpara baten fotografia. (b) Katodoko atomoen kitzikapena, ionizatutako argonaren talkaren ondorioz.

- MONOKROMADOREA

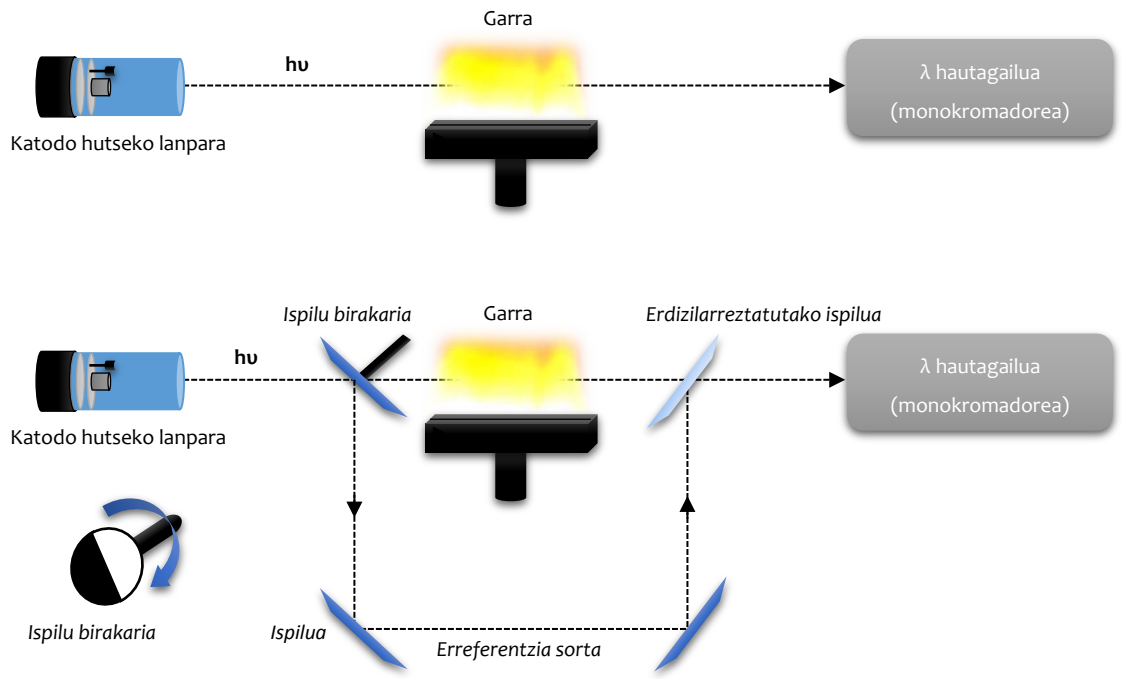
Atomo-absortzio espektrofotometro batean, ezinbestekoa da garrak igorritako erradiazioaren ondorioz sortutako interferentziak eliminatzea. Gehienak monokromadore bat erabiliz eliminatzen dira, analizatuko den elementuaren erresonantzia-lerroa islatuz. Normalean, Czerny-Turner edo Ebert motako monokromadoreak erabiltzen dira, distantzia fokal baxu (0,3±0,4 m) edo banda-zabalera ertainarekin (0,1 nm baino txikiagoa ez dena).

- DETEKTAGAILUA

AAEn gehien erabilitako detektagailua hodi fotobiderkatzailea da, gainontzeko detektagailuek ez baitute sentsibilitate bera teknika honetan erabilitako uhin-luzeretan.

E) SORTA BAKARREKO ETA BI SORTETAKO INSTRUMENTUAK

Sorta bakarreko instrumentuetan iturritik datorren erradiazio sortaren intentsitate-aldaketa neurtzen da, gas-egoeran dauden elementuekin dituen elkarrekintzen ondorioz. Bi sortakoetan, ordea, iturritik datorren sorta bitan banatuko da, ispilu birakari bat erabiliz. Horrela, erradiazioaren erdia sugarretik pasatuko litzateke, eta beste erdia ez. Ondoren, bi sortak elkartuko dira, erdizilarreztatutako ispilu bat erabiliz eta bien arteko diferentzia neurtuz. Bi sortetako gailuek ahalbidetzen dute iturriak igorritako erradiazioaren potentziaren gorabeherak zuzentzea. Hala ere, erreferentziazko erradiazio sorta sugarretik pasatzen ez denez, ezin liteke zuzendu erradiazioaren absortzioaren eta dispertsioaren erruz sugarrean gertatzen den potentziaren galera.



15. irudia. (a) Sorta bakarreko eta (b) bi sortetako espektrofotometroak.

1.2.4 ATOMO-ABSORTZIOZKO ESPEKTROFOTOMETRIA-PRAKTIKAK

KALTZIOAREN DETERMINAZIOA SENDAGAI BATEAN, ATOMO-ABSORTZIOZKO ESPEKTROFOTOMETRIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Osteoporosiaren tratamenduan erabiltzen den elementua da kaltzioa. Hezurren egituran elementu nagusia da, eta parte hartzen du ekintza muskularrean eta transmisio neuromuskularrean.

2-. HELBURUA

Kaltzioaren determinazioa Caosina sendagaian, atomo-absortziozko espektrofotometria erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Atomo-absortziozko espektrofotometroa
Matraze aforatuak
Pipeta aforatuak eta graduatuak
Irabiagailu magnetikoa
Motrailua
Balantza analitikoa
Kaltzio nitratoa
Azido klorhidrikoa

4-. PROZEDURA

Kaltzioaren kuantifikazioa adizio estandarren metodoa erabiliz gauzatuko da. Lehenik eta behin, sendagaiaren espezifikazio farmazeutikoak kontuan izanik, laginaren disoluzio bat prestatu beharko da. Horretarako, sendagaiaren sobre oso bat pisatuko da eta, hortik, lagin masa jakin bat hartuko da, eta hartutako kantitate zehatz hori idatziko. Jarraian, solidoaren gain ur desionizatua eta HCl tanta batzuk botako dira guztiz disolbatu arte; disoluzioa gardena izan arte, alegia. Azkenik, nahasketa 100 mL-ko matraze batean isuriko da, eta ur destilatua gehituko, arraseraino. Disoluzio horren bolumen jakin bat 100 mL-ko lau matraze aforatu ezberdinetan isuriko da, Ca^{2+}-ren kontzentrazio hurbildua matraze

bakoitzean **2 mg/L inguru** egon dadin (ez itzazu oraindik matrazeak arraseraino bete). Kontzentrazio hurbildu horretatik abiatuta, kalkula ezazu zein izan beharko den sobretik hartu beharreko masa zehatza.

Bestalde, kaltzio nitrato erreaktiboaren kantitate zehatz bat pisatu, ur desionizatutan disolbatu, 1mL HCl gehitu, eta 100 mL-ko matraze batean isuriko da, ur destilatua gehituz arraseraino. Ostean, aurretik erabilitako lau matrazeei kaltzio nitrato disoluzioaren bolumen jakin bat gehituko zaie, Ca^{2+} adizioak 0 mg/L, 2 mg/L, 4 mg/L eta 6 mg/L izateko, hurrenez hurren, matraze bakoitzean. Matrazeak arrasean jarri aurretik, bakoitzari 1 mL HCl gehituko zaio. Azkenik, matraze bakoitzean prestatutako disoluzioaren absorbantzia neurtuko da.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Seinale analitikoaren eta gehitutako kaltzio-kontzentrazioaren arteko erlazio lineala determina ezazu, karratu minimoen metodoa erabiliz. Zuzenaren estrapolazioa eginik abzisen ardatzarekin gurutzatzen deneraino, kalkula ezazu kaltzioaren kontzentrazioa analisirako laginean. Hortik abiatuta, kalkula ezazu, halaber, sendagaiak duen kaltzio-edukia eta baita portzentajea ere. Bide batez, analisiaren errore erlatiboa ere determina ezazu.

BURDINAREN DETERMINAZIOA ANEMIAREN KONTRAKO SENDAGAI BATEAN, ATOMO-ABSORTZIOZKO ESPEKTROFOTOMETRIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Burdina sistema biologikoetan ezinbestekoa den elementua da, eta makromolekula ezberdinen egituran parte hartzen du; besteak beste, hemoglobinan, mioglobinan eta *hemo* egiturak dituzten entzimetan —zitokromo mikrosomiko eta mitokondrialak, katalasak eta peroxidasak, esaterako—. Hartutako eta galdutako burdinaren artean oreka mantentzen ez bada, anemia ferropeniko bat paira lezake pertsona batek, eta burdina hartu beharko luke osagarri bezala.

2-. HELBURUA

Praktika honetan, ikasleak formulazio farmazeutiko batek duen burdina kantitatea eta baita portzentajea ere determinatu beharko ditu, teknika analitiko bezala atomo-absortziozko espektrofotometria erabilita.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Atomo-absortziozko espektrofotometroa
Matraze aforatuak
Pipeta graduatuak eta aforatuak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
Irabiagailu magnetikoa
Motrailua
Balantza analitikoa
Sulfato ferroso amonikoa
Azido nitrikoa

4-. PROZEDURA

Burdinaren determinazioa kanpo-kalibrazioa erabiliz gauzatuko da. Horretarako, 100 mg/L Fe^{2+} den 100 mL-ko bitarteko disoluzio bat prestatuko da, sulfato ferroso amonikotik abiatuta. Burdinaren adsortzioa beirazko matrazearen paretetan gerta ez dadin, matrazea arraseraino betetzerakoan, %2 den HNO_3 erabiliko da. Jarraian, bitarteko disoluzioa

diluituz, 0,5 eta 10 mg/L bitartean bost patroi-disoluzio prestatuko dira 100 mL-ko matrazeetan. Horietan ere, %2 den HNO_3 erabiliko da matrazeak arrasean jartzeko.

Bestalde, sendagaiaren konprimatu bat pisatu, birrindu eta hauspeakin-ontzi batera pasatuko da kuantitatiboki. Solidoa disolbatzeko %2 den HNO_3 disoluzioa gehituko da, nahasketa irabiatuz eta berotuz prozesua errazteko. 15 minuturen ostean, nahasketa iragaziko da Buchner inbutua erabiliz; jarraian, iragazia jaso eta 100 mL-ko matraze batean isuriko da, %2 den HNO_3 disoluzioa gehituz arraseraino. Laborategi farmazeutikoak adierazitakoaren arabera, kalkula ezazu zein izango litzatekeen burdinaren gutxi gora-beherako kontzentrazioa disoluzio honetan, eta, horren arabera, proposa ezazu diluzio egoki bat bere kontzentrazio hurbildua kalibrazio zuzenaren tartearen erdialdean egon dadin.

Behin lagina diluitua eta patroi-disoluzioak prestaturik daudenean, guztien neurketa gauzatuko da atomo-absortzio espektrofotometro bat erabiliz. Neurketak egin aurretik absorbantzia zeron finkatuko da, zuri bezala %2 den HNO_3 disoluzioa erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Seinale analitikoaren eta Fe^{2+}-aren kontzentrazioaren arteko erlazio lineala determina ezazu. Laginaren seinalea kalibrazio zuzenaren ekuazioan ordezkatuz, kalkula ezazu burdina kontzentrazioa analisirako laginean. Hemendik abiatuta, determina ezazu burdina-edukia prestakin farmazeutikoan. Kalkula bitez burdina-portzentajea eta baita errore erlatiboa ere.

1.3 EMISIO-ESPEKTROSKOPIA

1.3.1 MOLEKULA-EMISIOZKO ESPEKTROSKOPIA

Erradiazio elektromagnetikoa (EEM) xurgatzen duen konposatu kimiko bat oinarrizko egoera batetik egoera kitzikatu batera pasatuko da. Horren ostean, molekula hori berriro ere oinarrizko egoerara itzuliko da, ondoko molekula edo atomoekin izandako talken ondorioz beroa igorriz. Energia igortzeko era bakarra ez da beroa izango, ordea. Konposatu batzuk, UV erradiazioarekin kitzikatuak izan eta gero, beren oinarrizko egoerara itzuliko dira, beren energiaren atal txiki bat bero bezala igorriz eta beste atal bat EEM moduan. Igorritako EEMren uhin-luzera kitzikapenerako erabilitako uhin-luzeraren ezberdina izango da. Erradiazioaren igorpen-prozesu horri *lumineszentzia* deritzo, *fotolumineszentzia* konkretuki, molekulen kitzikapena fotoiak direla medio gertatu baita. Fluoreszentzia eta fosforeszentzia dira luminiszentziaren bi adibide.

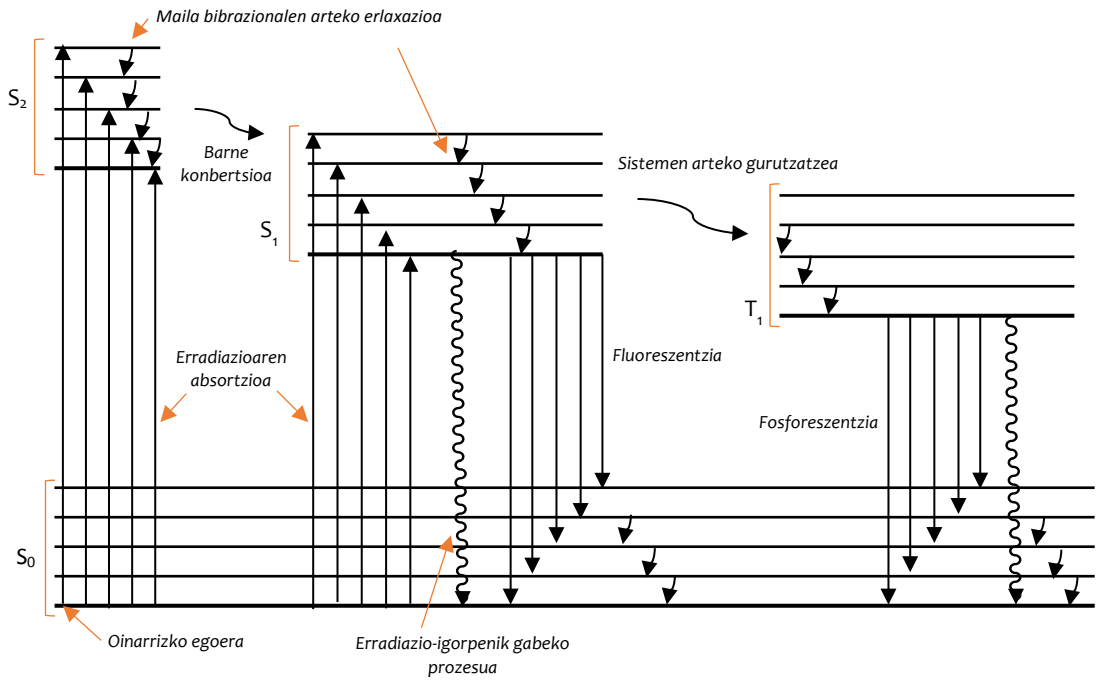
$$X + h\upsilon \longrightarrow X^* \longrightarrow X + \text{Beroa} + h\upsilon'$$

A) FOTOLUMINESZENTZIA

EEM-ak molekula baten gain jotzen duenean, horrek energia xurgatuko du egoera kitzikatu batera pasatuz. Xurgapen-espektroskopiarako gertatzen diren trantsizioen artean, $\pi \rightarrow \pi^*$ orbitalen artean gertatutakoak dira interesgarrienak prozesu lumineszenteetan. Molekulak, lehendabizi, oinarrizko egoeran agertuko dira (singletea, S_0), eta, EEM xurgatu ostean, egoera kitzikatuaren (S_1) barnean dauden egoera bibrazionaletako (V_1) batera pasatuko dira (16. irudia). Energiaren xurgapena oso azkar gertatuko da 10^{-15} eta 10^{-14} segundo bitartean.

Kitzikapenaren ostean molekula erlaxatu egingo da, berriro ere oinarrizko egoerara itzuliz. Prozesu hori etapa ezberdinetan gertatzen da, eta hauetako bitan, fluoreszentzian eta fosforeszentzian, erradiazio-fotoi bat askatzen da. Gainerako etapek erradiaziorik igortzen ez den erlaxazio-prozesuak barneratzen dituzte. Energia bibrazionalaren gehiegizkoa berehala galduko da erlaxazio bibrazionalagatik. Horiez gain, molekulek ere oso bizkorrak diren beste erlaxazio-prozesu batzuk (10^{-12} s) jasan ditzakete energia-maila baxuagotara itzultzeko erradiaziorik igorri gabe. Egoera kitzikatutik oinarrizko egoerara itzultzeko biderik egokiena izango da, lehenengoaren erdibizitza minimizatzen duena. Hau

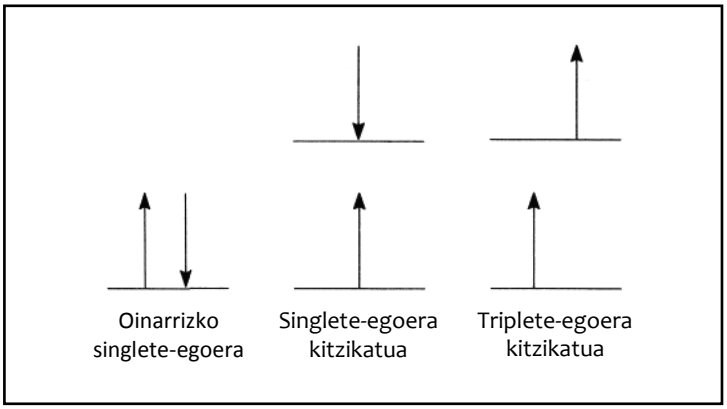
da, fluoreszentziagatik gertatutako desaktibazioa erradiazio-igorpenik gabeko prozesuak baino azkarragoa bada, fluoreszentzia ikusiko da. Erradiazio-igorpenik gabeko prozesua azkarragoa bada, ordea, fluoreszentzia desagertu edo ahuldu egingo da.



16. irudia. Sistema fotolumineszente bateko maila energetikoen diagrama. S: singletea, T: tripletea.

Igorpen fosforeszentea fluoreszentea baino konplexuagoa izaten da. Horrela, kitzikatutako molekula baten elektroietako bat maila energetiko altuago batera pasatzen denean, singlete- edo triplete-egoera bat eratzen da. Igorpena fosforeszentea izan dadin, triplete-egoera bat sortu beharko da; osterantzean, fluoreszentzia igorriko da. Singlete-egoera kitzikatuan, goratu den elektroiaren spinak parekatua jarraituko du oinarrizko egoeran dagoenarekin; triplete-egoeran, ordea, desparekatu egiten dira, elkarren artean paraleloak izanik (17. irudia). Triplete-egoeraren formazioak elektroiaren spinaren aldaketa behar du, eta, horretarako, erlaxazioek aski motelak behar dute izan. Horregatik, oinarrizko egoerara pasatzeko gertatzen den erlaxazioa atzeratua egongo da triplete-egoeraren kasuan, spinaren inbertsioa behar baitu hasierako egoerara itzultzeko. Triplete-egoera kitzikatuaren batez besteko erdibizitza 10^{-4} segundotatik hainbat segundotara bitartekoa da; singlete baten kasuan, aldiz, 10^{-8} eta 10^{-5} s bitartekoa. Horregatik guztiagatik, igorpen fosforeszenteak 10^{-4}-10 s edo gehiagoko denborak behar ditu, eta horrelako energia-

trantsizioek eragindako igorpenek denbora jakin batez iraun dezakete irradiazioa eten ostean.



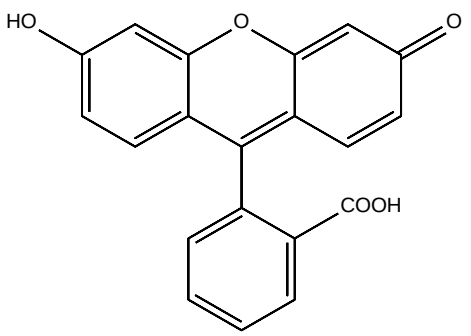
17. irudia. Singlete- eta triplete-egoerak.

B) FLUORESZENTZIAN ERAGINA DUTEN FAKTOREAK

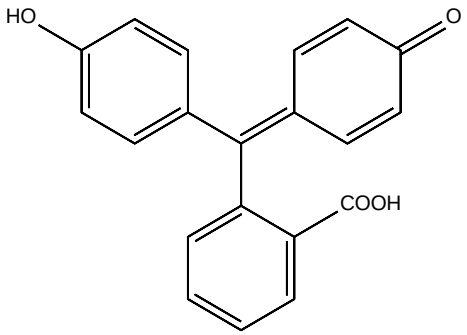
Molekula batek igorritako fluoreszentzia bere egitura kimikoaren eta baita disolbaturik dagoen ingurunearen baldintzen menpe dago.

Konposatu kimiko batek fluoreszentzia eman dezan, erradiazioa xurgatzeko gai izan behar du. Gainera, ikusi da fluoreszentzia $\pi \rightarrow \pi^*$ trantsizioak jasaten dituzten molekuletan gertatzen dela, konposatu aromatikoetan eta lotura bikoitzak dituzten konposatuetan esaterako, batez ere hainbat eraztun aromatiko eta gogortasun estrukturala baldin badituzte. Haatik, pirrola, tiofenoa, furanoa eta piridina bezalako zikloek ez dute fluoreszentziarik ematen. Gainera, halogenoek eta karboxilo taldeek, ordezkatzaile bezala talde aromatikoetan, fluoreszentzia-intentsitatearen murrizketa eragiten dute.

Gogortasun edo zurruntasun estrukturala parametro erabakigarria da konposatu kimiko jakin batek fluoreszentzia emango duen ala ez jakiteko. Ildo horretan, fluoreszeinak fluoreszentzia bizia agertuko du disoluzioan; fenolftaleinak, ordea, ez, nahiz eta oso antzeko egitura kimikoak izan. Efektu hori gertatzen da egitura gogorrek bibrazioak mugatzen dituztelako, talken ondorioz izan daitekeen degradazioa eta sistemen arteko gurutzatzea minimizatuz.



Fluoreszeina



Fenolftaleina

18. irudia. Fluoreszeinaren eta fenolftaleinaren egitura kimikoak.

Tenperaturak ere eragin negatiboa dauka fluoreszentziaren intentsitatean. 1ºC batean tenperatura igotzean, fluoreszentziak %1ean egingo du behera, gutxi gorabehera. Horren funtsa tenperatura igotzerakoan izaten diren molekulen arteko talken areagotzean dago, erradiazio-igorpenik gabeko erlaxazioak faboratuz. Era berean, tenperatura igotzean txikitu egiten da disolbatzailearen biskositatea, lehen adierazitako molekula-talkak sustatuz, baita ere.

pH-a eta disolbatutako oxigenoa ere erradiazio fluoreszentearen igorpenean eragin nabarmena duten bi faktore dira. Alde batetik, pH-ak igorritako uhin-luzeren desplazamendua sustatzen duelako, eta, bestalde, disolbatutako oxigenoak disoluzio baten fluoreszentziaren intentsitatea bortizki jaitsarazten duelako, sistemen arteko gurutzatzeak direla-eta triplete-egoera kitzikatura iritsi arte. Haatik, horrek ez du esan nahi fosforeszentziaren intentsitateak gora egingo duenik, erradiazio-igorpenik gabeko erlaxazioak direla-eta fosforeszentzia ere ahuldu egingo baita.

c) INSTRUMENTAZIOA

Fotolumineszentziaren neurketarako erabiltzen diren instrumentuen atal ezberdinak UV/Ik fotometroetan edo espektrofotometroetan daudenen antzekoak dira:

a-. Erradiazio-iturria

Espektrofluorimetroek De eta W lanparek baino intentsitate handiagoko erradiazioa igortzen duten lanparak behar dituzte. Horretarako, 250 eta 1300 nm bitartean erradiazio jarraitua igortzen duten xenonezko lanparak erabiltzen dira.

b-. λ hautagailua (iragazki edo monokromadore bat)

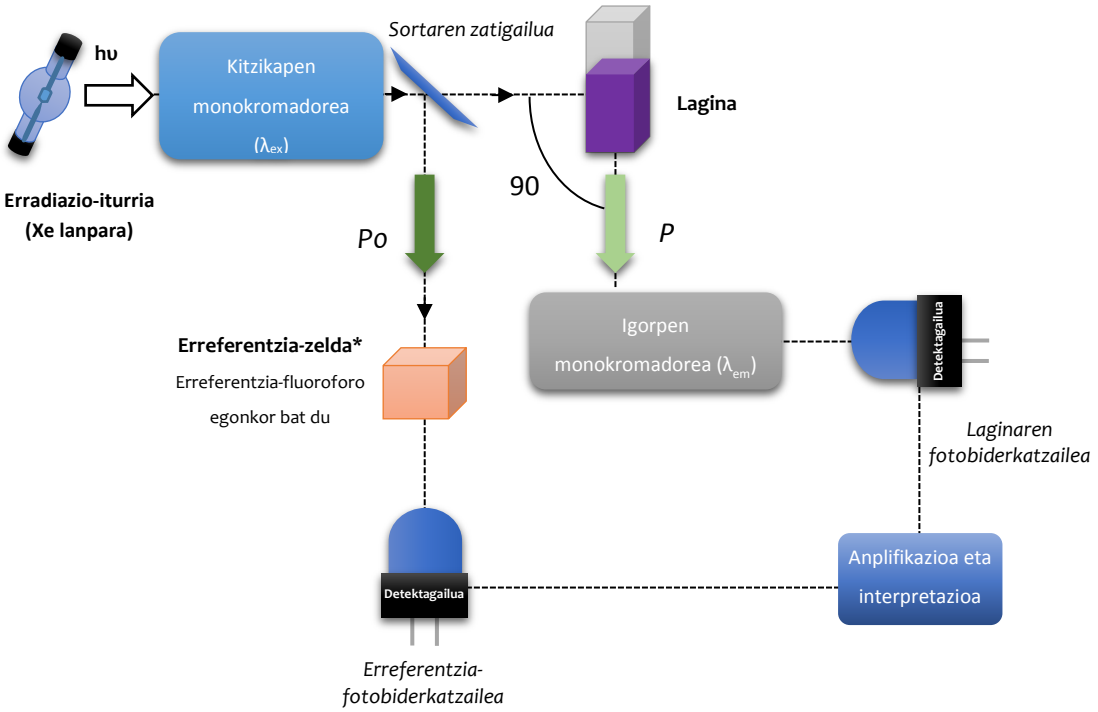
Normalean, sare monokromadoreak erabiltzen dira.

c-. Laginerako kubeta

Normalean, kuartzozko kubeta zilindrikoak erabiltzen dira, alde guztiak gardenak dituztenak, igorpen luminiszentea 90°-ko angeluan kuantifikatzen baita laginaren gain jotzen duen erradiazioarekiko.

4-. Detektagailua

Fluoreszentziarako gailuetan gehien erabiltzen diren detektagailuak hodi fotobiderkatzaileak izaten dira. 19. irudian espektrofluorimetro baten eskema orokorra aurkezten da.



** Ez da instrumentu guztietan agertzen.*

19. irudia. Espektrofluorimetro baten eskema orokorra.

Ia espektrofluorimetro guztiak bi sortakoak izaten dira, erradiazio-iturriaren potentziaren gorabeherak zuzentzea ahalbidetzen dutelarik. Xenonezko lanparak igorritako erradiazioa lehenengo monokromadore batetik pasatuko da, bertan kitzikapen uhin-luzera hautatuz. Ostean, EEMk erradiazio-zatigailu batera joko du, sorta bitan banatuz: bata erreferentzia zeldarantz, eta bestea laginaren kubetarantz. Zatigailua kuartzo gardenezko atal bat da, eta bertara iritsiko den erradiazioaren %4 islatuko du erreferentzia-zeldarantz. Zelda horrek kontagailu kuantiko bat izaten du, normalean etilenglikoletan disolbaturik dagoen rodamina b (3 g/L) konposatu fluoreszentea. Kontagailu kuantiko horrek bertara iristen den erradiazio guztia xurgatuko du 220 eta 600 nm uhin-luzera bitartean. Aldiz, ostean igorriko duen erradiazioa ia uhin-luzera bakarrekoa izango da (640 nm), bere intentsitatea Xe lanpararekiko proportzionala izanik. Uhin-luzera horrek erreferentzia-fotobiderkatzailerantz joko du, eta aproposa izango da erradiazio-iturrian suertatzen diren gorabeherak zuzentzeko, laginak eta erreferentzia-zeldak igorritako seinale fluoreszenteen zatiketa dela medio.

Erreferentzia-zeldarantz bideratu ez den erradiazioak laginaren kubetaren gain joko du analitoa kitzikatuz, eta, ondorioz, fluoreszentzia igorriz. Sortutako fluoreszentzia norabide guztietan hedatuko da; hala eta guztiz ere, aproposena litzateke laginaren gain jotzen duen sortarekiko 90°-tan sortutako fluoreszentziaren neurketa egitea. Beste angelu guztietan, disoluzioak eta kubetako paretek sortutako dispertsioa handiagoa da, eta, ondorioz, analitoak igorritako fluoreszentziaren neurketan interferentziak sor ditzakete.

Espektrofluorimetroek UV/Ik espektrofotometrian erabilitako De eta W lanparek baino intentsitate handiagoko EEM igortzen duten lanparen beharra izaten dute. Horretarako, Xe lanpara batez hornituak egoten dira, gutxi gorabehera 250 eta 1300 nm bitartean espektro jarraitu bat igortzen duten erradiazio-iturriak izanik.

1.3.2 MOLEKULA-EMISIO PRAKTIKAK

KONPRIMATUETAN DAGOEN LORATADINA KANTITATEAREN DETERMINAZIOA, FLUORESZENTZIA-ESPEKTROSKOPIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Loratadina bigarren belaunaldiko antihistaminikoen artean agertzen da, zeinak ezagunak baitira H_1 hartzailearekiko selektibitate handiagoa izateagatik. Barrera hematoenzefalikoa zeharkatzen ez duenez, eragin txikia du nerbio-sistema zentralean, eta ez da agertzen lehen belaunaldiko antihistaminikoetan ohikoak diren efektu antikolinergiko edo sedaziorik.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da antihistaminiko batek duen loratadina-edukia ezagutzea (mg/konprimatu), farmakoak igorritako fluoreszentzia-intentsitatea neurtuz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

1 cm-ko bide optikoko kubetak
Matraze aforatuak
Pipetak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
Motrailua
Loratadinaren estandar solidoa

4-. PROZEDURA

a) Kalibrazioa

Lehenik eta behin, kalibrazio zuzena eraikitzeko, farmakoaren hainbat patroi-disoluzio prestatuko dira 0,5 eta 1 mg/L bitartean, 100 mL-ko matrazeetan. Horretarako, azetonitrilotan prestatutako 25 mg/L loratadina den bitarteko disoluzio batetik abiatuko gara, eta bertatik bolumen ezberdinak hartuko dira patroi-disoluzio bakoitza prestatzeko.

Jarraian, kitzikapen eta igorpen uhin-luzerak finkatuko dira. Helburu horrekin, lehendabizi, kitzikapen uhin-luzera 290 nm-tan finkatuko da, eta igorpen-espektroa 300 eta 500 nm bitartean jasoko da espektrofluorimetroan. Jasotako espektroan oinarrituz, igorpen-

seinale maximoa ematen duen uhin- luzera hautatuko da. Jarraian, igorpenaren uhin-luzera finkaturik dugula, kitzikapen-espektroa jasoko da 200 eta 400 nm bitartean, seinale maximoa ematen duen λ hautatuz kitzikapenerako.

Behin uhin-luzera ezberdinak finkaturik ditugula, patroi-disoluzio ezberdinen neurketara joko dugu, bakoitzak emandako fluoreszentzia-seinalea idatziz.

b) Laginaren prestaketa

Sendagai batek duen loratadina-edukia ezagutzeko, konprimatu bat pisatu, birrindu eta lortutako hauts fina uretan disolbatuko da, ondoren, 100 mL-ko matraze batean isuri eta ur destilatua gehituz arraseraino. Disoluzioa erraztearren, nahasketa irabiatu eta berotu egingo da 15 minutuz, irabiagailu magnetiko bat erabiliz.

Ontzian adierazitako ezaugarri farmazeutikoetan oinarriturik, presta ezazu farmakoaren disoluzioaren diluzio egoki bat, lortutako azken kontzentrazioa prestatutako kalibrazioaren tartearen erdialdean egon dadin. Azkenik, ekin iezaiozu analisirako laginaren fluoreszentzia neurtzeari.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Seinale analitikoaren eta kontzentrazioaren arteko erlazio lineala determina ezazu, karratu minimoen metodoa erabiliz. Ondoren, analisirako laginak emandako fluoreszentzian oinarrituz, kalkula ezazu loratadinaren kontzentrazioa. Hortik abiatuta, kalkula ezazu, halaber, sendagaiak duen loratadina-edukia eta baita portzentajea ere. Bide batez, analisiaren errore erlatiboa ere determina ezazu.

CLORPROMAZINA NEUROLEPTIKOAREN DETERMINAZIOA PLASMAN, FLUORESZENTZIA-ESPEKTROSKOPIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Tratamendu psikiatrikoan erabilitako eragin handiko fenotiazina bat da clorpromazina. Hasiera batean lasaigarri bezala garatu bazen ere, ondoren, eskizofrenian zuen eragina frogatu zen, sintomatologia positiboan batez ere.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua izango da prestakin farmazeutiko batek duen clorpromazina-edukia determinatzea, horretarako, emisio-espektroskopia erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Kuartzozko kubetak

Matraze aforatuak

Pipetak

Hauspeakin-ontziak

10 mL-ko bialak

Erloju-beira

Azetonitriloa

Karbonato eta bikarbonato sodikoa

Kloruro sodikoa

Zerio eta amonio sulfatoa

Azido sulfurikoa

Clorpromazinaren estandar solidoa

4-. PROZEDURA

a) Deribatizatzailearen prestaketa. 10^{-3} M den zerio eta amonio sulfato disoluzio bat prestatuko da, 0,25 M den azido sulfurikoa erabiliz disolbatzaile bezala. Zerioa fenotiazina eraztunaren oxidatzaile bezala erabiliko da, seinale luminiszente askoz ere handiagoa duten sulfona eta sulfoxidoak lortuz.

b) Laginaren prestaketa. Analisi-metodoa plasman aplikatzeko, laginaren aldez aurreko likido-likido erauzketa bat gauzatu beharko da interferentziak eliminatzeko. Horretarako, 2

mL plasma hartu eta, bere gain, 1 mL $NaCl_{sat}$ eta 1 mL HCO_3^-/CO_3^{2-} indargetzaile (pH 10,5) gehituko dira. Ostean, erauzle bezala 2 mL etilo azetato gehituko dira. Erauzketaren etekina hobetzeko, nahasketa irabiatuko da irabiagailu horizontal batean 10 minutuz eta 500 *strokes*/min potentzia aplikatuz. Distribuzio-orekara heldu ostean, fase organikoaren 1 mL hartu eta lurrunduko da, hondar lehorra 0,5 mL azetonitrilotan birdisolbatuz. Erauzketa-prozesuaren etekina %97,5ekoa litzateke.

d) Patroi-disoluzioen prestaketa. Farmakoaren kontzentrazioaren eta seinalearen arteko erlazio lineala ezagutzeko, clorpromazinaren patroi-disoluzio ezberdinak prestatuko dira ur desionizatutan: 0,1 mg/L, 0,25 mg/L, 0,5 mg/L, 1,0 mg/L eta 2,5 mg/L-ko disoluzioak, alegia. Horien prestaketarako, 100 mg/L den bitarteko disoluzioa prestatu beharko da lehendabizi, dagokion clorpromazina pisatu eta 100 mL ur desionizatutan disolbatuz.

e) Deribatizazio-erreakzioa. Erauzketa-prozesuaren ostean, patroi-disoluzioaren edo laginaren 0,5 mL hartu eta beste 0,5 mL deribatizatzailerekin nahastuko dira 3 mL-ko bial batean. Erreakzioaren etekina hobetzeko, nahasketa irabiatuko da 10 minutuz 100°C-tan. Denbora horren ostean, nahasketa hozten utzi, eta fluoreszentzia neurtuko da bolumen txikiko eta 10 mm-ko bide optikoa duen kuartzozko kubeta batean. Kitzikapen eta emisio uhin-luzerak 254 eta 355 nm dira, hurrenez hurren.

Era berean, zuri bat prestatu beharko da, 0,5 mL ur desionizatu beste 0,5 mL deribatizatzailerekin nahastuz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

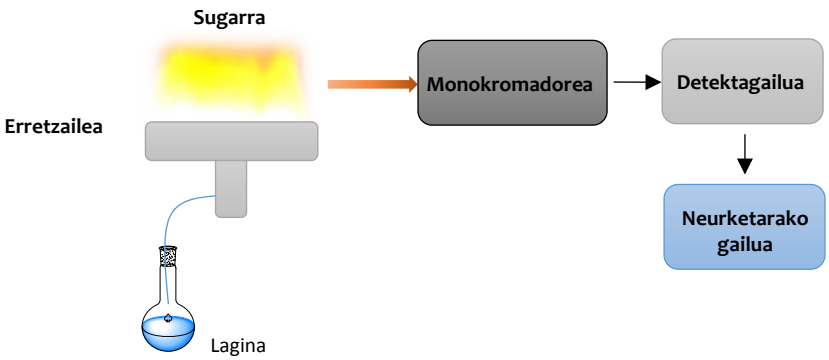
Seinale analitikoaren eta patroi-disoluzioen kontzentrazioaren arteko erlazio lineala determina ezazu, karratu minimoen metodoa erabiliz. Ondoren, analisirako laginak emandako fluoreszentzian oinarrituz, clorpromazinaren kontzentrazioa kalkula ezazu. Hortik abiatuta, laginaren prestaketa-prozedura kontuan izanda, determina ezazu analitoaren kontzentrazioa giza plasman.

1.3.3 ATOMO-EMISIOZKO ESPEKTROSKOPIA

Espezie atomikoek, maila energetiko altuagotara kitzikatuak izan eta gero, igorriko duten erradiazioaren kuantifikazioan du bere funtsa atomo-emisioan oinarritutako analisiak. Hainbat iturritatik etor daiteke atomoen kitzikapenerako beharrezkoa den energia, eta horren arabera sailka daitezke atomo-emisioaren teknikak.

Atomizaziorako eta kitzikapenerako gailu ezberdinen artean, plasman oinarritutakoak dira nagusi, akoplamendu induktiboko plasma edo ICP (*Inductively Coupled Plasma*) batez ere. Haatik, atomoen kitzikapenerako, badaude arkua eta txinparta bezalako metodo elektrikoak, eta baita erradiazio elektromagnetikoa edo sugar baten energia erabiltzen dituzten teknikak ere.

Energia-iturritzat sugar bat erabiltzen duen teknikari *gar-fotometria* deritzo. Iturri horrek energia txiki samarra izaten du, emisio-lerro gutxi sorraraziz eta, ondorioz, beste kitzikapen-iturri batzuk erabiltzen dituzten teknikek baino espektro sinpleagoak emanez. Hori dela-eta, interferentzia espektral gutxiago lortzen dira, eta ez dago erresoluzio altuko monokromadoreen beharrik. Honako irudi honetan adierazi dira gar-fotometrian erabilitako instrumentu baten atal nagusiak.



20. irudia. Gar-fotometrian erabilitako instrumentuen atal nagusiak.

Ikus daitekeen bezala, emisio-espektrofotometroak atomo-absortzioan erabiltzen direnen antzekoak dira, erradiazio-iturria izan ezik, emisio-espektroskopian erabiltzen ez dena. Horren ordez, gar-fotometrian sugarrak emandako energia erabiliko da atomoen kitzikapenerako.

Gar-fotometria erabiltzen da kaltzioaren eta sodioa, potasioa eta litioa bezalako metal alkalino ezberdinen determinaziorako. Hala ere, teknika hori ez da gehiegi erabiltzen errealitatean, absortzio-espektrofotometriak gar-fotometriak bezain emaitza onak eta hobeak ere ematen dituelako zehaztasunari, sentsibilitateari eta detekzio-mugari dagokienez.

1.3.4 ATOMO-EMISIOZKO PRAKTIKAK

SENDAGAIEN POTASIO-EDUKIAREN DETERMINAZIOA, SUGARRAREN BIDEZKO ATOMO-EMISIOZKO ESPEKTROSKOPIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Potasioa da zelula-barneko katioi ugariena, eta indar ionikoa zelula-barneko bolumenean mantentzen laguntzen du. Gainera, ezinbestekoa da nerbio-inpultsuaren garraioan eta transmisio neuromuskularrean. Elektrolito hori maila fisiologikotik behera dagoenean — adibidez, potasioaren galera sustatzen duten sendagai diuretikoak denbora luzez hartzen direnean—, ioi horren nutrizio-gehigarriak har daitezke.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da, potasioaren beharrak asetzeko bideratua dagoen sendagai batean, elektrolito horren edukia determinatzea.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Matraze aforatuak

Hauspeakin-ontziak

Pipeta graduatuak eta aforatuak

Potasio nitratoa

Azido nitrikoa

Erloju-beira

4-. PROZEDURA

Lehendabizi, bost patroi-disoluzio prestatuko dira 0,5 mg/L eta 10 mg/L bitartean. Horretarako, 100 mg/L potasio den disoluzioa prestatuko da, dagokion potasio nitrato kantitatea hartu, disolbatu, eta 100 mL-ko matraze batean ur desionizatua gehituz arraseraino.

Bestalde, sendagaiaren konprimatu bat pisatu, birrindu, eta lortutako hauts solidotik kantitate zehatz bat hartuko da; ondoren, uretan disolbatu eta 100 mL-ko matraze aforatu batera eramango da, ur desionizatua gehituz arraseraino. Beharrezkoa

izango balitz, laginaren diluzio bat prestatu beharko da, potasioaren kontzentrazioa kalibrazio zuzenaren tartearen erdialdean egon dadin.

Behin patroi-disoluzioak eta lagina prest daudenean, gar-fotometria bitartez neurtuko dira, potasioaren emisioaren intentsitatea neurtuz 404 nm-ko uhin- luzeran.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Seinale analitikoaren eta potasio-kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa determina ezazu, karratu minimoen metodoa erabiliz. Analisirako laginak emandako seinalean oinarrituz eta kalibrazio zuzena erabiliz, kalkula ezazu K^+ kontzentrazioa diluitutako laginean. Hortik abiatuta, kalkula ezazu potasio kantitatea formulazio farmazeutikoan. Determina ezazu, halaber, potasio-portzentajea sendagaian, eta baita errore erlatiboa ere.

2. TEKNIKA ELEKTROKIMIKOAK

2.1 POTENTZIOMETRIA

2.1.1 ZUZENEKO POTENTZIOMETRIA

Zuzeneko potentziometria disoluzio batean murgildurik dauden bi elektrodoen arteko potentzial-diferentziaren neurketan oinarritzen da; horietarako bati *elektrodo adierazle* deritzo, besteari, aldiz, *erreferentzia-elektrodo*. Neurketa hori oreka-egoeran gauzatzen da, korrontea zero izanik. Neurtutako potentzial diferentzia disoluzioan dauden espezie kimikoen aktibitateen menpe dago, eta ez horien kontzentrazioaren menpe. Erabilitako elektrodo-adierazlearen arabera, potentzial-diferentziaren neurketa bi eratan egin liteke:

a-. Alde batetik, potentzialaren neurketa elektrodo adierazle metaliko bat erabilita gauzatu liteke; platinozko elektrodo bat, esaterako. Elektrodo horietan neurtutako potentzial-diferentzia elektrodo-disoluzio interfasean gertatzen diren oxidazio-erredukzio oreketan oinarritzen da, Nernsten legea jarraituz:

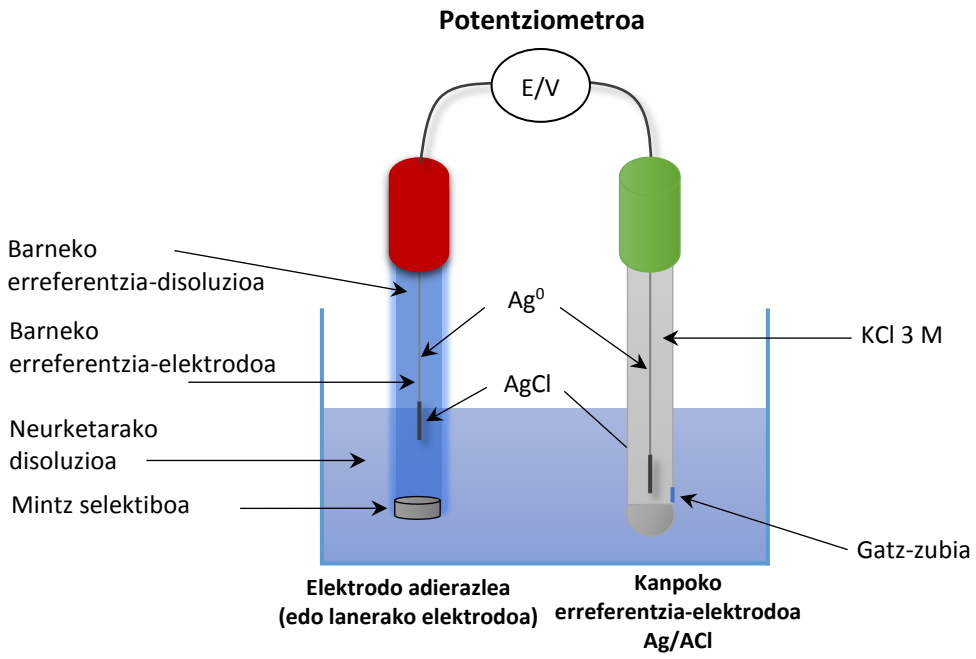
$$E = E^{o} + \frac{0{,}059}{n} \log \frac{a_{ox}}{a_{erred}}$$

non E neurtutako potentziala baita , E^{o} erreferentzia-elektrodoaren potentzial estandarra, a espezie oxidatzailearen edo erreduzitzailearen aktibitatea eta n prozesuan parte hartzen duten elektroi kopurua. Neurketa mota horiek selektibitate baxua izaten dute, eta, hori dela eta, analitoaz gain disoluzioan egon litezkeen beste ioi batzuek ere potentzialean eragina izan lezakete.

b-. Beste aukera bat litzateke mintz selektibo batean zehar gertatzen den potentzialaren diferentzia neurtzea, mintzaren bi aldeetan dauden espezie kimikoen aktibitateek eragina izango luketelarik. Horretarako, elektrodo ioi-selektiboak erabiltzen dira (ISE, *ion selective electrodes*), ioi jakin batentzako erantzun selektiboa aurkezteko gaitasuna izaten dutenak beste ioi batzuen presentzian.

A) ELEKTRODO IOI-SELEKTIBOAK

Elektrodo ioi-selektibo bat (ISE) ioi batekiko selektiboa den mintz batez osatutako sentsore kimiko bat da (21. irudia). Mintza euskarri elektrodiko baten oinean kokatzen da, eta ioi jakin batekin kontaktuan dago bere bi aldeetan. Elektrodo metalikoetan ez bezala, ISE elektrodoetan ez da erredox-erreakziorik gertatzen.



21. irudia. ISE elektrodo batez osatutako zelula elektrokimiko bat.

Determinazio potentziometrikoa zero korrontepean gauzatzen da, neurtu nahi den ioiaren disoluzioan bi elektrodoak murgilduta dauden bitartean. Elektrodo horietako bat, esan bezala, ISE elektrodo bat da; bestea, aldiz, zilar eta zilar kloruroz (Ag/AgCl) osaturik dagoen kanpoko erreferentzia-elektrodo bat (KEE). Mintzak masa-garraioa aldatzen du, eta, ondorioz, potentzial-diferentzia bat ezartzen lagunduko du, mintzaren bi aldeetan dagoen ioiaren aktibitatearen menpekoa izango dena. Zelda elektrokimikoaren potentziala izango da elektrodo adierazlearen eta kanpoko erreferentzia-elektrodoaren arteko diferentzia gehi mintzaren potentziala (E_{mintza}) eta lotura likidoko potentziala (E_j). Lotura likidoko potentziala litzateke gatz-zubiaren presentziagatik sortzen den potentziala. Erreferentzia-elektrodoaren gatz-zubia zeramikazko frita porotsu bat izaten da, eta neurketarako disoluzioaren eta

elektrodoaren barneko KCl 3M disoluzioaren arteko kontaktua ahalbidetzen du. Neurtutako potentziala honako ekuazio honen bidez adieraz daiteke:

$$E_{zelda} = E_{Erref\,(barne)} - E_{Erref\,(kanpo)} + E_{mintza} + E_j \qquad (1)$$

ISE elektrodoekin, honako hau litzateke zelda elektrokimikoaren deskribapen eskematiko orokorra:

$$Erref_{(kanpo)} \| [A]_{lagina} | [A]_{barne} | Erref_{(barne)}$$

Analitoaren kontzentrazioa (A) ezberdina bada mintzaren bi aldeetan, mintz-potentzial bat sortuko da analitoaren eta mintzaren arteko elkarrekintzaren ondorioz. Sortutako potentzial hori Nernsten ekuazioaren antzekoa den honako adierazpen honen bitartez defini daiteke:

$$E_{mintza} = E_{asimetria} - \frac{RT}{z_i F} \ln \frac{[A]_{barne}}{[A]_{lagina}} \qquad (2)$$

$[A]_{lagina}$ eta $[A]_{barne}$ ioiaren kontzentrazioak[1] izanik barne-disoluzioan eta laginean, hurrenez hurren, z_i ioiaren karga, R gasen konstantea (8,314 $J.K^{-1}.mol^{-1}$), T tenperatura absolutua (K) eta F Faraday-ren konstantea (96485 $C.mol^{-1}$). Egoera ideal batean, E_{mintza}-k 0 izan beharko luke analitoaren kontzentrazioa berdina balitz mintzaren bi aldeetan. Haatik, mintzaren egitura berdin-berdina ez denez bi aldeetan, alegia asimetrikoa denez, asimetria potentzial bat definitu beharko litzateke ($E_{asimetria}$). Horrela, 1 eta 2 ekuazioak konbinatuz, honako hau lortuko litzateke:

[1] Berez, ioiaren kontzentrazioa izan beharrean, ioiaren aktibitatea izan beharko luke. Hala ere, disoluzio diluituetan aktibitatea eta kontzentrazioa berdinak dira aktibitate koefizientea bat delako. Hortaz, aktibitate hitza erabili beharrean *kontzentrazio* hitza erabili da, baina berdintasun hori soilik disoluzio diluituetan gertatuko da.

$$E_{zelda} = E_{Erref(barne)} - E_{Erref(kanpo)} + E_j + E_{asimetria} - \frac{RT}{Z_i F} \ln \frac{[A]_{barne}}{[A]_{lagina}} \quad (3)$$

$E_{Erref\ (barne)}$, $E_{Erref\ (kanpo)}$, E_j, $E_{asimetria}$ eta ISE elektrodoaren barne-disoluzioan ioiaren kontzentrazioa konstanteak direnez, 3. ekuazioa honela laburtu liteke:

$$E_{zelda} = K + \frac{RT}{z_i F} \ln [A]_{lagina} \quad (4)$$

edo bestela esanda:

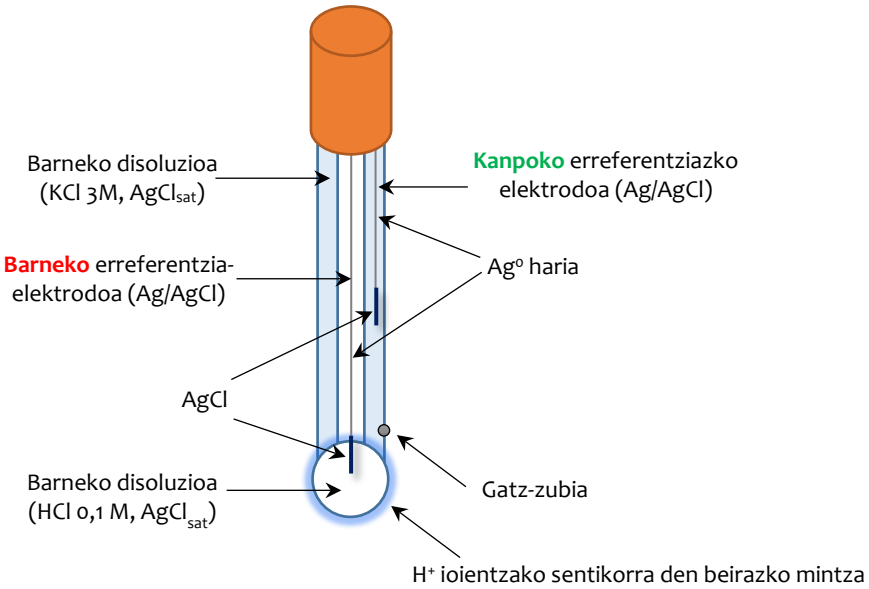
$$E_{zelda} = K + \frac{0{,}059}{z_i} \log [A]_{lagina} \quad (5)$$

Adierazpen hori aplikagarria da edozein ISE elektrodotan. Horrela, fluoruroa bezalako anioientzako selektiboak diren elektrodoetan, potentzialaren aldaketa -0,059 V-koa izango da ioiaren kontzentrazioa 10 aldiz handitzen den bakoitzean. Kontuan izan 5. adierazpen horrek zuzen baten ekuazioaren itxura duela, E_{zelda} aldagai independentea izanik (y), log $[A]_{lagina}$, aldiz, (x) aldagaia, eta $0{,}059/z_i$ ekuazioaren malda. Horren harira, anioiak neurtzean, fluoruroenganako selektiboa den ISE elektrodoarekin esaterako, potentzialaren eta log[A]-ren artean malda negatiboko erantzun lineala lortuko da; katioien kasuan, aldiz, malda positiboko zuzenak lortuko dira.

B) pH ELEKTRODOA

pH elektrodoa H^+ ioientzako selektiboa den elektrodoa da, eta lehendabizikoa izan zen ISE elektrodoen artean. Elektrodo horren atal sentikorra beirazko erraboil mehe bat da, sentsorearen beheko muturrean kokaturik dagoena. Barnealdean, 0,1 M den azido klorhidrikozko disoluzio bat izaten du, eta baita Ag/AgCl erreferentzia-elektrodo bat ere. Gatz-zubia elektrodoaren beheko muturreko albo batean kokatzen da, eta frita porotsu bat izaten da. Frita hori nahitaez disoluzioan murgildua egon behar da, pH-aren neurketa egokia izan dadin.

Kasu askotan, pH elektrodo konbinatuekin lan egiten da. Horiek, kanpoko eta barneko erreferentzia-elektrodoa euskarri elektrodiko berean barneraturik izaten dute (22. irudia). Hala ere, pH elektrodo sinpleak ere badaude eskuragai merkatuan horiek kanpoko erreferentzia-elektrodo baten beharra izaten dute, 21. irudian ikus daitekeen bezala.



22. irudia. H$^+$ ioiekiko sentikorra den beirazko elektrodo baten deskribapen eskematikoa.

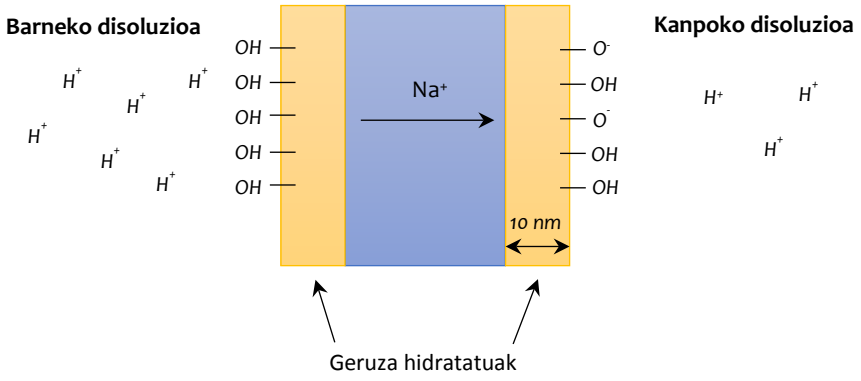
pH elektrodoak erabiltzean, honako hau litzateke osatutako zelda elektrokimikoaren eskema orokorra :

Ag|AgCl(sat), KCl(3M) || Lagina | Beirazko mintza | HCl(0,1M), AgCl(sat) | Ag

Elektrodo horien funtzionamendua egokia izan dadin, beirazko mintza hidratatua egon behar da aldez aurretik. Horretarako, elektrodo horiek ur-disoluzio batean murgildu beharko dira hainbat ordutan, mintzaren kanpoaldeko 10 nm-ak, gutxi gorabehera, hidratatuz. Mintzaren hidratazioa disoluzioan dauden H$^+$ ioien eta mintzaren beirazko sareak dituen katioi monobalenteen arteko ioi-trukearen ondorioz gertatzen da. Era horretan, H$^+$ ioi batek silanol talde bat osatzen duenean beirazko sarean, Na$^+$ ioi bat saretik kanporatuko da disoluziorantz, sarearen elektroneutraltasuna mantentzearren (23. irudia). Prozesu horretan

mintzaren katioi monobalenteek parte hartuko dute, katioi dibalente eta tribalenteak mintzaren silikatozko egiturari sendo loturik baitaude. 23. irudian deskribatzen da mintzaren eta disoluzioaren arteko ioi-truke erreakzioa, eskematikoki.

$$H^+ (ur) + V^-\text{-}Na^+ (m) \longleftrightarrow V^-\text{-}H^+ (m) + Na^+ (ur)$$



23. irudia. Beirazko mintz baten zeharkako irudia.

ISE elektrodoetan erabiltzen den edozein mintz selektibo, elektrikoki neutroa izan behar da; hau da, korrontea pasatzen utzi behar du. Hidratatutako eremuan korrontea H^+ ioien mugimenduari esker pasatzen da; mintzaren atal lehorretan, ordea, karga garraiatzaileak Na^+ ioiak izango lirateke. pH elektrodo bat ur-disoluzio batean murgiltzean, disoluzioan dauden protoiak mintzerantz mugitzen dira, eta beirari Na^+ ioiak baino era sendoago batean lotzen zaizkio, horiek ordezkatuz. Neurtutako potentziala eta protoien kontzentrazioa honako adierazpen hau jarraituz erlaziona litezke:

$$E_{zelda} = K + 0{,}05916 \log[H^+] \qquad (6)$$

edo, bestela esanda:

$$E_{zelda} = K - 0{,}05916 \text{ pH} \qquad (7)$$

Horrela, pH-aren balioak gora egiten duen unitate bakoitzeko, potentzialak 0,05916 V egingo luke behera. pH-aren neurketa mintz horiekin 0,5 eta 9 bitartean soilik da fidagarria. 9tik gorako pH-etan jaitsi egiten da mintzaren selektibitatea, eta beste ioi batzuei hobe erantzuten die, Na^+ eta K^+ ioiei esaterako. Hala ere, badaude pH elektrodo bereziak, Li_2O eta BaO-zko beiraz eginikoak, ohiko Na_2O eta CaO sarekoak izan beharrean. Elektrodo berezi horiekin, 12tik gorako pH-ak ere neurgarriak izan litezke.

c) FLUORURO-ELEKTRODOA

Beirazko elektrodoez gain, pH elektrodoa esaterako, beste elektrodo mota batzuk ere badaude eskuragarri: mintz likidozko elektrodoak, PVC (polibinil kloruro) mintzezko elektrodoak eta kristalezko mintzezko elektrodoak, esaterako. Azken horien artean, fluoruro-elektrodoa litzateke adibiderik ezagunena.

Fluoruro-elektrodoaren mintza lantano fluoruroz (LaF_3) osaturik dago nagusiki, europio difluoruro (EuF_2) kantitate txiki bat ere gehitu zaiolarik. Kantitate txiki horrek hutsik dauden gune anionikoak sorrarazten ditu kristalezko mintzean, fluoruroaren mugimendua ahalbidetuko dutenak mintzean zehar. Gune edo tarte anioniko horiek Eu^{2+} ioiaren kargaren erruz eratzen dira, La^{3+} ioiak baino karga bat gutxiago baitu, kristalezko sarean hutsuneak eratuz. Mintzean suertatzen den ioi-truke mekanismoa pH elektrodoan gertatzen zenaren antzekoa litzateke; ildo horretan, mintzaren barnealdean eta kanpoaldean honako oreka hau ezartzen da:

$$LaF_3 \text{ (solidoa)} \longleftrightarrow LaF_2^+ \text{ (solidoa)} + F^- \text{ (disoluzioan)}$$

Elektrodo honekin neurtutako potentzialak honako ekuazio hau jarraituko luke:

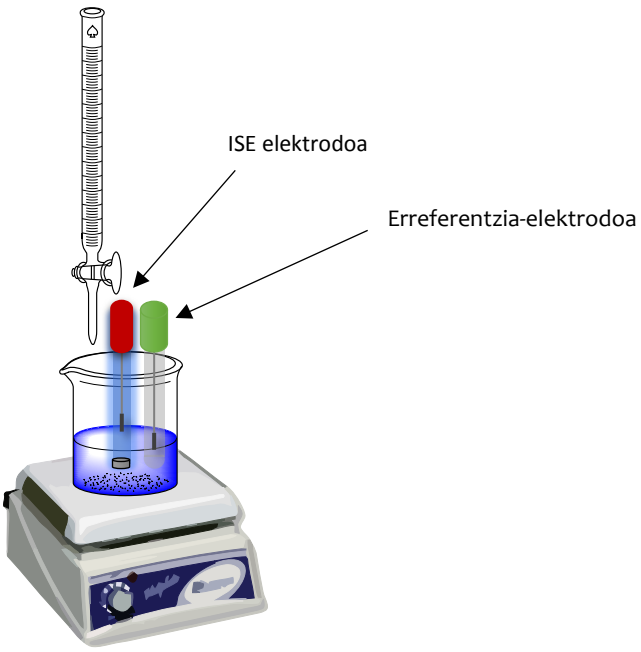
$$E_{zelda} = K - 0{,}05916 \log[F^-]$$

Fluoruro-elektrodoak selektibitate handia izaten du; hala ere, OH^- ioienganako erantzuna ere ematen du gailuak (selektibitate-koefizientea, K_{F^-/OH^-}: 0,1). Hori dela-eta, fluoruroen neurketa 8-tik beherako pH-etan egin beharko litzateke, pH hauetan baztergarria baita OH^- ioien kontzentrazioa. Bestalde, pH<3 balioetan fluoruroa HF forma kimikoan agertzen da nagusiki (pKa:3,17), eta, kasu horretan ez du mintz potentzialean inongo eraginik. Horregatik, F^--aren analisia 4tik gorako pH-etan gauzatu behar da nahitaez.

2.1.2 BALORAZIO POTENTZIOMETRIKOAK

Balorazio potentziometrikoetan elektrodo adierazle bat erabiltzen da ioi jakin baten jarraipena egiteko lagin likido batean. Horretarako, bureta batetik baloratzaile baten bolumen txikiak gehitzen dira, adizio bakoitzaren ostean neurketa potentziometriko bat eginez. Adibide gisa, azido-base balorazio batean pH elektrodo bat erabiltzen da pH-aren aldaketak kontrolatzeko, gehitutako baloratzailearen bolumenaren arabera. Era berean, konplexuen formazio-balorazioetan, Ca^{2+}-aren balorazioan AEDTarekin esaterako, metalaren kontzentrazio askearen jarraipena egiteko Ca^{2+}-arekiko selektiboa den elektrodo bat erabili daiteke.

Balorazio potentziometrikoetan lagin likido batean murgiltzen dira ISE elektrodo bat eta erreferentzia-elektrodo bat, disoluzioa etengabe nahastuz eta irabiagailu magnetiko bat erabiliz. Baloratzailea, aldiz, buretatik gehituko da tantaka, eta adizio bakoitzaren ostean pH-aren edo, dagokionean, potentzialaren balioak jasoko dira (24. irudia).

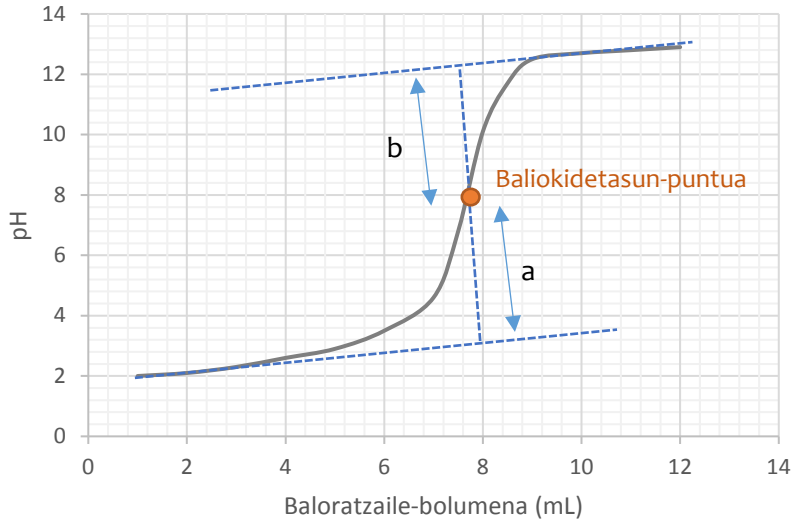


24. irudia. Potentzialaren edo pH-aren jarraipena egiteko beharrezkoa den materiala, balorazio potentziometriko batean.

Neurtutako potentzialaren (edo pH-aren) balioak irudikatzen badira gehitutako baloratzailearen bolumenaren arabera, balorazio-kurba bat lortuko litzateke, eta horrek aukera emango luke baliokidetasun-puntua ezagutzeko. Metodo ezberdinak daude baliokidetasun-puntua kalkulatzeko balorazio-kurba batetik abiatuta; horien artean daude tangenteen metodoa, lehenengo deribatuaren metodoa eta bigarren deribatuaren metodoa.

A) TANGENTEEN METODOA

Metodo honetan, elkarren artean paraleloak diren bi zuzen irudikatuko dira, balorazio-kurbaren zona lauenekiko tangenteak. Jarraian, bi zuzen horiekiko perpendikularra den zuzen bat irudikatuko da, eta zuzen horrek balorazio-kurba moztuko du bi tangenteekiko distantzia bera duen puntu batean (a eta b berdinak izan beharko dira 25. irudian). Puntu hori baliokidetasun-puntua izango litzateke.



25. irudia. Tangenteen metodoaren bitartez kalkulatutako baliokidetasun-puntua.

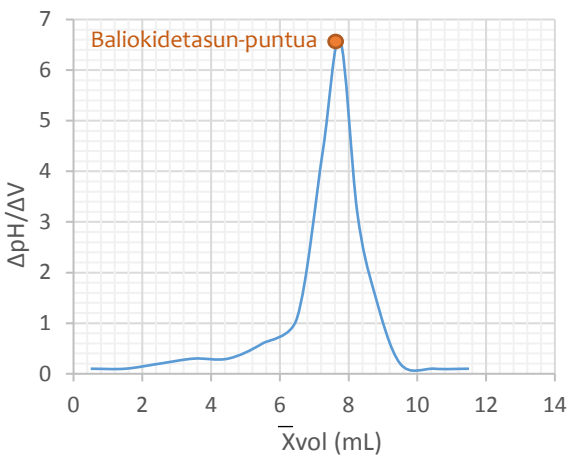
B) LEHENENGO DERIBATUAREN METODOA

Balorazio-kurbatik abiatuta, ordenatuen ardatzean, pH-aren (edo potentzialaren) gehikuntza irudikatuko da gehitutako baloratzailearen bolumenaren gehikuntzarekiko; abzisen

ardatzean, aldiz, adizio bakoitzean gehitutako bolumenaren eta aurretik zegoen bolumenaren batezbestekoa, hau da:

$$\bar{X}_{vol(baloratzaile)}, \frac{\Delta pH}{\Delta V}$$

pH	vol (mL)	ΔpH/ΔV	$\bar{X}_{Vol}$ (mL)
1,9	0	-	-
2	1	0,1	0,5
2,1	2	0,1	1,5
2,3	3	0,2	2,5
2,6	4	0,3	3,5
2,9	5	0,3	4,5
3,5	6	0,6	5,5
4,6	7	1,1	6,5
6,8	7,5	4,4	7,25
10,1	8	6,6	7,75
11,7	8,5	3,2	8,25
12,5	9	1,6	8,75
12,7	10	0,2	9,5
12,8	11	0,1	10,5
12,9	12	0,1	11,5



26. irudia. Lehenengo deribatuaren metodotik lortutako baliokidetasun-puntua.

non ΔpH pH-aren aldaketa baita jarraian egindako bi adizioen ostean, eta ΔV bolumenaren aldaketa. Lehenengo deribatuaren maximoak baliokidetasun-puntua adieraziko luke.

c) BIGARREN DERIBATUAREN METODOA

Kasu honetan, honako hau irudikatuko litzateke:

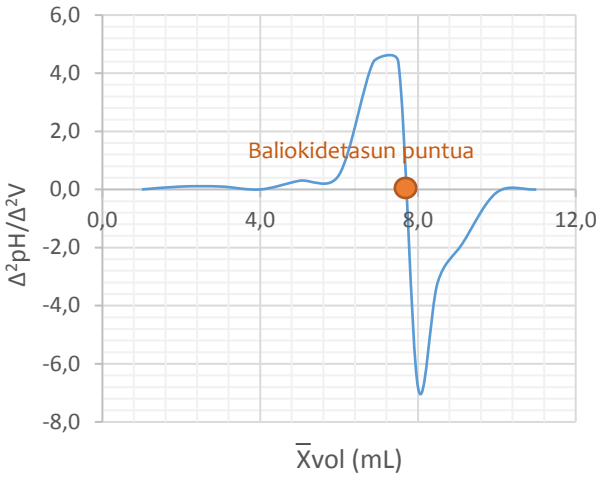
$$\bar{X}_{vol(baloratzaile)}, \frac{\Delta^2 pH}{\Delta^2 V}$$

Δ^2pH/Δ^2V lehenengo deribatuaren datuetatik abiatuta kalkulatuko da, honako espresio hau erabiliz:

$$\frac{\Delta^2 pH}{\Delta^2 V} = \frac{\Delta(\Delta pH/\Delta V)}{\Delta V} \qquad (8)$$

27. irudiko taulan agertzen diren bolumenen balioak lehenengo deribatuaren metodotik eskuratu dira, alegia, 26. irudiko $\bar{X}_{Vol}$ (mL) datuetatik. Horiek erabili beharko dira (8) ekuazioaren izendatzailean ageri den ΔV kalkulatzeko.

pH	vol (mL)	Δ^2pH/Δ^2V	$\bar{X}_{Vol}$ (mL)
1,9	-	-	-
2	0,5	-	-
2,1	1,5	0,00	1,0
2,3	2,5	0,10	2,0
2,6	3,5	0,10	3,0
2,9	4,5	0,00	4,0
3,5	5,5	0,30	5,0
4,6	6,5	0,50	6,0
6,8	7,25	4,40	6,9
10,1	7,75	4,40	7,5
11,7	8,25	-6,80	8,0
12,5	8,75	-3,20	8,5
12,7	9,5	-1,87	9,1
12,8	10,5	-0,10	10,0
12,9	11,5	0,00	11,0



27. irudia. Baliokidetasun-puntuaren kalkulua, bigarren deribatuaren metodoa erabiliz.

2.1.3 POTENTZIOMETRIA-PRAKTIKAK

FLUORUROAREN DETERMINAZIO POTENTZIOMETRIKOA SENDAGAI BATEAN, ELEKTRODO IOI-SELEKTIBO BAT ERABILIZ

1-. SARRERA

Fluorra hortz-esmalteko kanpoko geruzari atxikia geratzen zaio, hori gogortuz eta desmineralizazioaren aurrean erresistenteago bilakatuz. Gainera, hezurretan ere jalki daiteke, bere formazioa sustatuz; betiere, kaltzioaren, fosfatoen eta D bitaminaren mailak egokiak badira organismoan. Horregatik guztiagatik, fluoruroa txantxarraz babesteko neurri profilaktiko bezala erabiltzen da, edateko uren fluorazioa gauzatuz; hala nola, gelen edota kolutorioen erabilpena sustatuz.

2-. HELBURUA

Fluoruroen determinazioa kariearen prebentzioan erabiltzen den Fluor-Lacer sendagaian, elektrodo selektiboko potentziometriaren bidez.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Fluoruro ioiekiko selektiboa den elektrodoa
Erreferentzia-elektrodoa
Potentziometroa
Iragazteko sistema
Matraze aforatuak
Pipetak
Motrailua
Irabiagailu magnetikoa
Hauspeakin-ontziak
Balantza analitikoa
Sodio fluoruroa
TISAB disoluzioa

4-. PROZEDURA

Fluoruroaren determinazio potentziometrikoa erraz egin daiteke hainbat ioi metalikoren presentziak eragin ditzakeen interferentziak eliminatzen badira. Gehienetan, interferentzia horiek ioi metalikoek eta fluoruroak eratutako konplexuei zor zaizkie. Hori dela-eta, neurketa potentziometrikoak pH eta indar ioniko egokian gauzatu behar dira, eta baita estekatzaileen presentzian ere, horrela fluoruroa era askean egongo baita metodoaren sentsibilitatea ahalik eta handiena izanik. Baldintza horiek finkatzen dituen disoluzioari TISAB deritzo (Total Ionic Strength Adjustment Buffer); horrek fluoruroaren neurketa egokirako azetiko/azetato disoluzio indargetzaile bat eta azido etilendiaminotetraazetikoa (AEDT) bezalako estekatzaile bat izaten ditu.

a) Kalibrazioa. Fluoruroaren kuantifikazioa kanpo-kalibrazioaren bitartez gauzatuko da. Horretarako, NaF erreaktibotik abiatuta, 100 mg/L (ppm) fluoruro den hasierako disoluzioa eta, hori diluituz, 0,5 eta 20 mg/L bitarteko sei patroi-disoluzio prestatuko dira 100 mL-ko matrazeetan. Azkenik, hauspeakin-ontzi batean, 20 mL disoluzio estandar eta 20 mL TISAB nahastuko dira, eta potentziala neurtuko da hiru aldiz jarraian. Disoluzioa etengabe nahasten den heinean egin beharko da neurketa potentziometrikoa.

b) Laginaren prestaketa. Espezifikazio farmazeutikoak kontuan izanik, sendagaiaren diluzio egoki bat presta ezazu, fluoruroaren kontzentrazioa kalibratu zuzenaren barnean egon dadin. Jarraian, disoluzio horren 20 mL eta TISAB disoluzioaren beste 20 mL hauspeakin-ontzi batean nahastu, eta potentziala neurtuko da hiru aldiz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehendabizi, karratu minimoen metodoa jarraituz, erregresio lineal bat gauzatuko da, patroi-disoluzio ezberdinek emandako seinale instrumentalen (E, V) eta fluoruroen kontzentrazioen logaritmoen arteko erlazio matematikoa ezagutzeko. Horretarako, kontuan izan, Nernsten legearen arabera, seinale analitikoa ioiaren kontzentrazioaren logaritmoarekiko proportzionala dela; beraz, log $[F^-]$ hartu beharko da zuzenaren ekuazioa lortzeko.

Bestalde, laginaren potentziala kontuan hartuta eta gauzatutako kalibrazio zuzenean oinarrituz, fluoruroaren kontzentrazioa determinatuko da prestatutako azken disoluzioan. Hortik abiatuta, laginari egindako diluzioak aintzat hartuta, sendagaiak duen fluoruroaren kontzentrazioa kalkulatu beharko da.

KARBONATOAREN ETA BIKARBONATOAREN KONTZENTRAZIOEN DETERMINAZIOA UR-LAGIN BATEAN, BALORAZIO POTENTZIOMETRIKO BAT EGINIK

1-. HELBURUA

Praktika honen helburua da balorazio potentziometriko baten bitartez ur-lagin batek duen karbonatoaren eta bikarbonatoaren kontzentrazioen determinazioa egitea. Horretarako, pH elektrodo bat erabiliko da elektrodo adierazle bezala.

2-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

pH-metroa

pH elektrodo konbinatua

Bureta

Pipetak

Erlenmeyer matrazeak

Hauspeakin-ontziak

Karbonato sodikoa

Azido klorhidrikoa

Fenolftaleina

3-. PROZEDURA

HCl komertziala ez da patroi primario bat; beraz, baloratzaile bezala erabili ahal izateko, erreaktibo horren disoluzio baten kontzentrazio zehatza ezagutu beharko da aldez aurretik. Horretarako, 0,1 M den 250 mL-ko HCl disoluzio bat prestatuko da, eta, ostean, Na_2CO_3 bezalako patroi primario batekin baloratuko da. Horretarako, gatzaren hiru alikuota pisatuko dira erloju-beiretan, horietako bakoitzaren pisu zehatza idatziz. Jarraian, alikuota bakoitza kuantitatiboki pasatuko da Erlenmeyer matraze batera, ur pixka bat gehituz solidoa guztiz disolbatu arte. Azkenik, tanta bat edo bi heliantina botako dira disoluzioan, eta balorazioa hasiko da, aurretik prestatutako HCl-aren disoluzioa pixkanaka gehituz buretatik. Adierazlearen kolore-aldaketa horitik gorrirakoa izango da, eta pH 3,1 eta 4,4 bitartean ikusiko da, erreakzioa amaitutzat emanez puntu horretan. Baldintza horietan gertatzen den erreakzioa honako hau litzateke:

$$CO_3^{2-} + 2H^+ \longrightarrow CO_2 + H_2O$$

Hurrengo pausoa izango da pH-metroaren kalibrazioa egitea, horretarako pH=7,02 eta pH=4,0 indargetzaileak erabiliz. Jarraian, laginaren 20 mL-ko alikuota bat hartu eta bere pH-a neurtuko da. Azkenik, aurretik prestatutako HCl-a gehituko da pixkanaka-pixkanaka buretatik eta pH-a idatziko da adizio bakoitzaren ostean. Baloratzailea gehitzen jarraitu beharko da, disoluzioaren pH-a 2 izan arte gutxi gorabehera.

4-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Balorazio-kurbaren errepresentazioa egin, neurtutako pH balioak gehitutako baloratzailearen bolumenarekiko irudikatuz. Determina itzazu baliokidetasun-puntu ezberdinak, balorazio-kurbaren lehen eta bigarren deribatuak marraztuz.

1-. Lehen deribatuan, kalkulatutako $\Delta pH/\Delta V$ balio ezberdinak irudikatuko dira segidan gehitutako HCl-aren bi adizioen batezbesteko bolumenarekiko.

2-. Bigarren deribatuan, aldiz, segidako $\Delta^2 pH/\Delta^2 V$ balioak irudikatuko dira gehitutako HCl-aren bi adizioen batezbesteko bolumenarekiko.

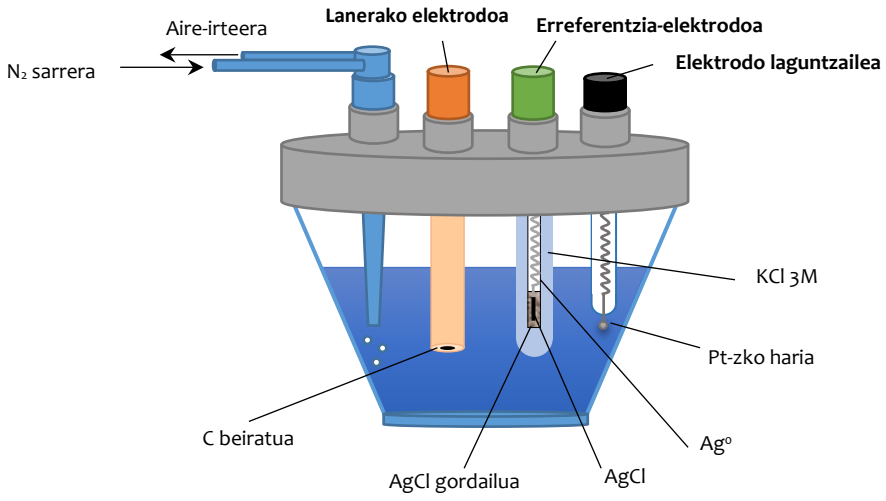
Lortutako baliokidetasun-puntuetatik abiatuta, karbonato eta bikarbonatoaren kontzentrazioak kalkulatuko dira, emaitza g/L unitatean adieraziz.

2.2 VOLTAMPEROMETRIA

Teknika voltamperometrikoak, aplikatutako potentzialaren arabera, zelda elektrokimiko batetik pasatzen den korrontearen neurketan oinarritzen dira. Potentzial hori erreferentzia-elektrodo baten (normalean, Ag/AgCl elektrodo bat) eta elektrodo adierazle baten artean aplikatzen da, honako erreakzio global hau emanez:

$$Ox + ne^- \longleftrightarrow Red$$

Korrontea erreferentzia-elektrodotik pasa ez dadin, hirugarren elektrodo bat erabiltzen da, elektrodo laguntzailea. Pt-a bezalako metal preziatu batez edo metalezkoak ez diren materialez, karbonoa esaterako, osaturik egon daiteke hori. Neurketa elektrokimikoak egiteko, 28. irudian ageri den zeldaren eskema jarraitu ohi da.

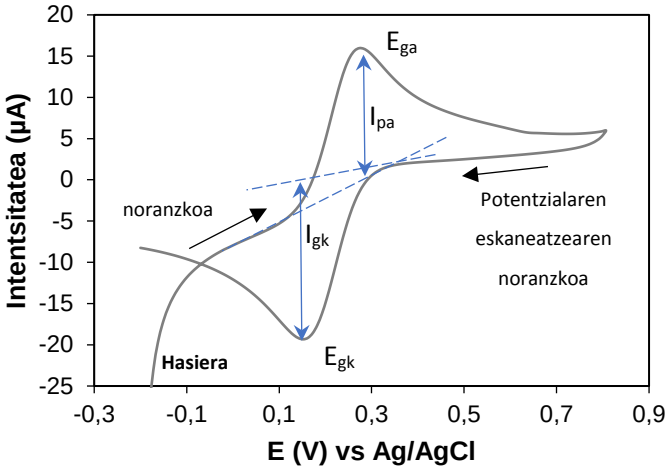


28. irudia. Hiru elektrodoz osaturiko zelda elektrokimiko baten eskema orokorra.

Aplikatutako potentzialaren ondorioz, zelda elektrokimikoan erredox-erreakzioak suertatzen dira, eta lanerako elektrodoaren eta laguntzailearen artean pasatzen den korronte elektriko bat sortzen dute, korronte faradaikoa. Aplikatutako potentziala kontrolatzeko eta sortu berri den korronte faradaikoa neurtzeko, *potentziometro* deritzon instrumentu bat erabiltzen da.

Disoluzioan dagoen analitoaren erredukzioaren ondorioz sortzen den korronteari, *korronte katodiko* deritzo, eta balio positiboa ematen zaio, hala adostu delako. Era berean, analitoaren oxidazioaren ondorioz sortutako korronteari *korronte anodiko* deritzo, eta bere balioa negatiboa da.

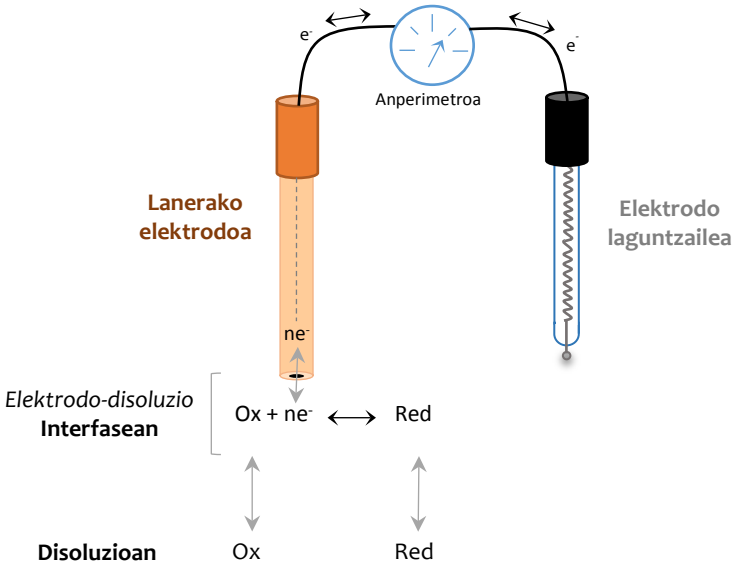
Potentziala tarte jakin batean eskaneatzen denean eta lanerako elektrodoaren eta laguntzailearen artean pasatzen den korrontea neurtzen denean, 29. irudian ageri den grafika moduko bat lortzen da, intentsitate-potentzial kurba edo voltamperograma bezala ezagutzen dena.



29. irudia. Karbono beiratuzko elektrodo batekin jasotako voltamperograma ziklikoa. ga: gailur anodikoa (oxidazioa), gk: gailur katodikoa (erredukzioa).

Eskaneatzen ari den potentziala balio jakin batera iristen denean, disoluzioan dagoen espezie kimiko bat erreduzitu edo oxidatu egingo da, eta, ondorioz, lanerako elektrodoa eta elektrodo laguntzailea lotzen dituen zirkuito elektrikotik pasatzen den korrontea, bat-batean, igo edo jaitsi egingo da. Espezie kimikoa oxidatzen hasten denean, korrontearen intentsitatea nabarmen igotzen da hasierako korrontearekin alderatuz, eta maximo bat erregistratzen da gailur moduan, korronte anodikoa (I_{pa}). Gailur hori erregistratzen den potentzialari *gailur anodikoaren potentzial* deritzo (E_{ga}). Voltamperometria ziklikoan, beste teknika voltamperometrikoetan ez bezala, potentziala ziklikoki eskaneatzen da, eta horren noranzkoa alderantzizkoa izango da balio maximo batera iristen denean (0,8V esaterako, 29. irudian), hasierako potentzialera bueltatuz, -0,2 V-tara, alegia.

Potentziala hasierako baliora bueltatzen den heinean, aldez aurretik oxidatu den espezie kimikoa (E_{gk}) erreduzitu egingo da, korrontearen balioa bat-batean jaitsiz eta gailur katodiko bat erregistratuz (I_{pk}). 30. irudian ikus daiteke gainazal elektrodikoan gertatzen den erredox-prozesua.



30. irudia. Lanerako elektrodoan gertatzen diren erredox-prozesuak.

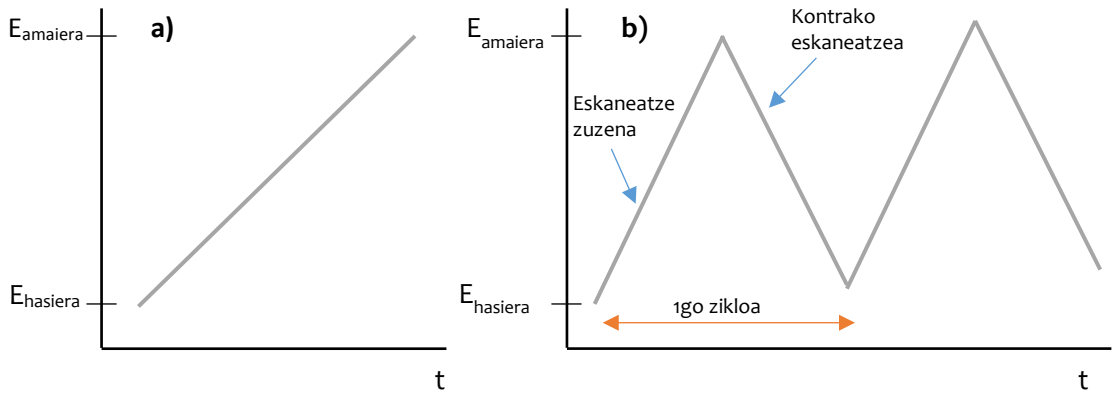
Potentziala eskaneatzen den heinean, oxidatu edo erreduzitzen diren espezieen kantitatea baztergarria da analitoaren kontzentrazio totalarekiko; hortaz, analitoaren kontzentrazioak ez du aldaketarik jasango prozesu elektrokimikoan.

2.2.1 TEKNIKA VOLTAMPEROMETRIKOAK

Teknika voltamperometriko sinpleena eskaneatze linealeko voltamperometria da, non potentzialaren eskaneatze bat gauzatzen baita aldez aurretik ezarritako potentzial-tarte batean. Potentzialak linealki egingo du gora (edo behera) denboran zehar, horren ondorioz sortutako korrontea erregistratuz.

Voltamperometria ziklikoa (VZ), aldiz, eskaneatze linealeko voltamperometriaren antzekoa da, baina zuzeneko eta kontrako eskaneatzeak barneratzen ditu, elkarren artean aurkako norabidea dutenak. Kasu honetan, aplikatutako potentzialaren programak triangelu itxura dauka (31. irudia). VZ erabiliz, voltamperograma ziklikoak jasotzen dira emaitza modura, neurtutako korrontea irudikatzen dutenak aplikatutako potentzialaren funtziopean

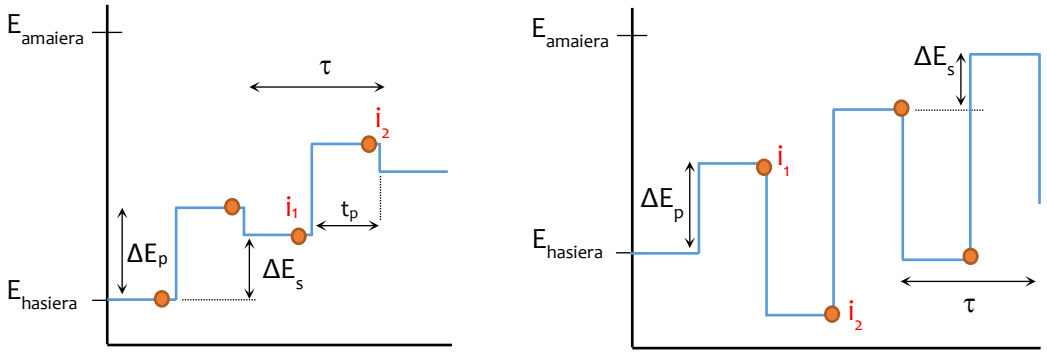
(29. irudia). Eskaneatze linealeko voltamperogramak ziklikoen antzekoak dira, baina norabide bakarreko eskaneatzeak erakusten dituzte; nolabait, voltamperograma ziklikoek bi eskaneatze linealeko voltamperograma barneratzen dituztela esan liteke.



31. irudia. (a) Eskaneatze linealeko voltamperometrian eta (b) voltamperometria ziklikoan aplikatutako potentzialaren programak.

Teknika linealez gain, inpultsuetan oinarritutako teknikak ere badaude, inpultsuen voltamperometria diferentziala eta uhin karratuko voltamperometria bezala. Lehenengoak potentzial-inpultsuetan oinarritzen dira, ziklo tenporal bat τ, inpultsu-denbora bat t_p, anplitude bat ΔE_p eta potentzial-salto bat ΔE_s dituzten inpultsuetan, alegia. Potentzialaren eskaneatzea egiten den ahala, korrontearen bi neurketa gauzatzen dira, bata inpultsua hasi aurretik (i_1) eta bestea inpultsua amaitutakoan (i_2) (32. irudia). Korrontearen diferentzia inpultsu bakoitzeko (Δi) aplikatutako potentzial-diferentziaren funtzioan erregistratuko da, voltamperograma bat lortuz. Horrek gailur itxura izango du, eta gailurraren altuera kontzentrazioarekiko proportzionala izango da.

Uhin karratuko voltamperometria inpultsuen voltamperometriaren antzekoa da, azkartasun eta sentsibilitate altuagoa erakutsiz. Kasu honetan, zuzeneko eta kontrako (i_1 eta i_2) inpultsu bakoitzaren ostean neurtzen da korrontea, eta aplikatutako potentzialak eskailera itxura izaten du (32. irudia).



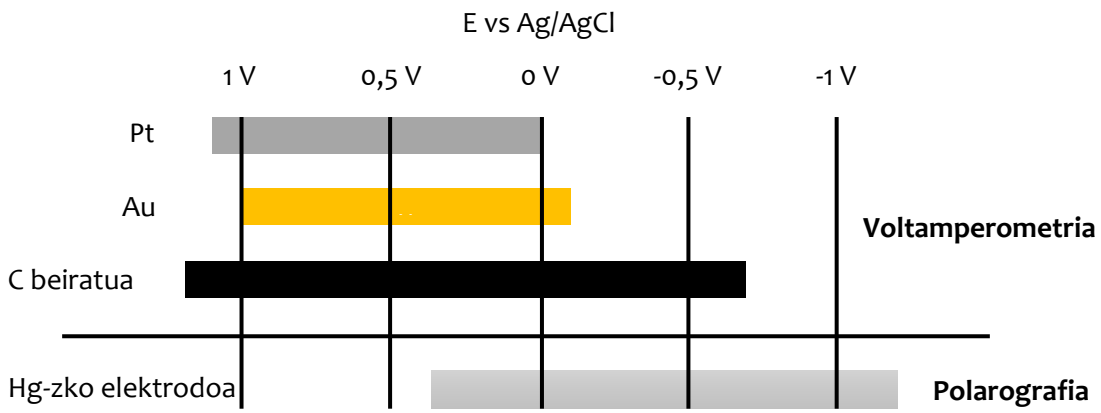
32. irudia. (a) Inpultsuen voltamperometria diferentzialean eta (b) uhin karratuko voltamperometrian aplikatutako potentzial-programak.

2.2.2 LANERAKO ELEKTRODOAK

Voltamperometrian gehien erabiltzen diren lanerako elektrodoak karbono beiratuzkoak, urrezkoak edo platinozkoak izaten dira. 33. irudian daude adierazita elektrodo horiekin aplika daitezkeen potentzial-tarteak. Irudian ikus daitezkeen potentzial-mugak uraren erred-ox-erreakzioak ezartzen ditu, potentzial positiboagoetan uraren oxidazioa emanez eta negatiboagoetan, aldiz, erredukzioa:

Uraren oxidazioa: $H_2O \longleftrightarrow \frac{1}{2} O_2 + 2H^+ + 2e^-$

Erredukzioa: $2H_2O + 2e^- \longleftrightarrow H_2 + 2OH^-$



33. irudia. Lanerako elektrodo ezberdinen potentzial-tarte aplikagarriak, H_2SO_4 1 M den disoluzio bat erabilita.

2.2.3 VOLTAMPEROMETRIA-PRAKTIKAK

PARAZETAMOLAREN DETERMINAZIOA SENDAGAI BATEAN, UHIN KARRATUKO VOLTAMPEROMETRIA ERABILIZ

1-. SARRERA

Parazetamol-ak eragin analgesikoa eta antitermikoa du, azido azetilsalizilikoaren (AAS) maila berean. Hala ere, ez du hanturaren aurkako eraginik, eta, hori dela-eta, AASk baino eraginkortasun txikiagoa izaten du hanturak eragindako minetan. Merkaturaturik dauden analgesikoetatik seguruenetako bat da, eta aurkako erreakzio gutxiago izaten ditu, beste sendagai batzuekin alderatuta. Haatik, gaindosifikazioak koadro toxiko bat eragiten du, eta hartutako dosiaren arabera heriotza ekar lezaken gibeleko nekrosia ager liteke.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da sendagai analgesiko batek duen parazetamolaren edukia ezagutzea.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Karbono beiratuzko elektrodoa
Ag/AgCl erreferentzia-elektrodoa
Matraze aforatuak
Pipetak
Hauspeakin-ontziak
Erloju-beira
Motrailua
di-Sodio hidrogenofosfato anhidroa
Sodio dihidrogenofosfato monohidratatua
Parazetamolaren estandar solidoa

4-. PROZEDURA

Uhin karratuko voltamperometria bitartez egingo diren neurketa elektrokimikak, 25 mL fosfato indargetzaile dituen zelda elektrokimiko batean gauzatuko dira. Horretarako, gatz monosodikotik eta disodikotik abiatuta, 0,1 M den fosfatozko disoluzio indargetzaile bat prestatuko da, kontuan izanda bere pH-a 7 izan beharko dela.

a) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako, lehendabizi, parazetamoletan 0,01 M den hasierako disoluzio bat prestatuko da 25 mL-ko matraze aforatu batean. Disoluzio horretatik abiatuta, 10^{-5} eta 10^{-3} M bitartean dauden zazpi parazetamol patroi-disoluzio prestatuko dira, hasierako disoluziotik bolumen egokiak hartuz eta 25 mL fosfato indargetzaile dituen zelda elektrokimiko batera zuzenean gehituz. Patroi-disoluzio bakoitza prestatu ostean, neurketa eletroanalitikoa gauzatuko da uhin karratuko voltamperometria erabiliz: potentzial tartea 0-1 V izanik, inpultsuaren anplitudea 50 mV, maiztasuna 50 Hz, eta eskaneatze-abiadura 250 mV/s.

Neurketa elektrokimikoa egin aurretik, zeldatik oxigeno guztia eliminatu beharko da. Horretarako, zeldan dagoen disoluziotik, purutasun altuko N2 gasa pasaraziko da 10 minutuz gutxienez.

b) Laginaren prestaketa. Sendagaiaren konprimatu bat hartu, pisatu, eta motrailuan birrinduko da hauts fin bat osatu arte. Jarraian, solidoa hauspeakin-ontzi batera pasatu eta bertan disolbatuko da ur desionizatua gehituz. Prozesua erraztearren, disoluzioa irabiatu eta berotu egingo da, arinki, irabiagailu magnetiko batean. Azkenik, disoluzioa iragazi eta 100 mL-ko matraze batera eramango da, ur desionizatuarekin arrasean jarriz.

Bestalde, zelda elektrokimikora 25 mL fosfato indargetzaile gehituko dira, eta, gainera, enpresa farmazeutikoak adierazitakoaren arabera, disolbatutako farmakoaren bolumen egoki bat gehituko zaio, parazetamolaren kontzentrazioa kalibratu zuzenaren tartearen erdialdean egon dadin, gutxi gorabehera.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren (i, μA) eta parazetamolaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako korronte-intentsitatea aintzat hartuz, eta egindako diluzioan kontuan izanik, sendagaiak duen parazetamolaren kantitatea kalkulatuko da.

III. BLOKEA. BEREIZKETA METODOAK. KROMATOGRAFIA

1. METODO KROMATOGRAFIKOAK: SARRERA

1.1 DEFINIZIOA

Kromatografia teknikak deritze nahasketa konplexuetan oso antzekoak diren konposatu kimikoen bereizketa fisikoa ahalbidetzen duten teknikei; konposatu kimikoen identifikazioa eta kuantifikazioa da horien helburu nagusia. Nahasketan dauden konposatuek fase geldikor solido edo likido batean zehar mugitzean dituzten abiadura ezberdinetan oinarritzen da bereizketa kromatografikoa. Horretarako, konposatu kimikoak fase mugikor baten laguntzaz (gas bat, likido bat edo fluido superkritiko bat) mugiarazi egingo dira fase geldikorretik, eta bereizketa kromatografikoa konposatu kimikoen fase mugikorraren eta geldikorraren arteko distribuzio konstante ezberdinetan oinarrituko da.

Nahasketan dauden konposatu ezberdinak fase mugikorrak eramaten ditu, eta fase geldikorrean sakabanatzen dira. Analitoaren eta fase geldikorraren arteko elkarrekintzen indarraren arabera, konposatu kimikoak gehiago edo gutxiago atxikiko dira adsorbatzailean. Horrela, atxikipena sendoa denean, konposatuak motelago mugituko dira fase geldikorrean zehar; atxikipen ahuletan, ordea, desplazamendua bizkorragoa izango da. Mugikortasunean izaten den ezberdintasun horrek konposatuen bereizketan laguntzen du, eta horietako bakoitzak denbora zehatz bat behar izaten du fase geldikor osoa zeharkatzeko, *erretentzio-denbora*.

1.2 SAILKAPENA

Teknika kromatografikoak irizpide ezberdinen arabera sailka daitezke:

1.2.1 FASEEN IZAERAREN ARABERA ETA ELKARREKINTZA MOTEN ARABERA

a) Fase mugikorraren izaeraren arabera:

Likido-kromatografia, gas-kromatografia edo fluido superkritikoen kromatografia ditugu.

b) Fase geldikorraren izaeraren eta elkarrekintza motaren arabera:

Adsortzio-kromatografia. Lagin bateko konposatuek gainazal-azalera handiko solido aktibo baten gain duten adsortzioan oinarritzen da bereizketa kromatografikoa. Fase geldikor bezala parte hartzen duen solido honek konposatu kimikoak atxikitzen ditu adsortzio kimikoagatik eta baita adsortzio fisikoagatik ere. Horretarako, Van der Waals elkarrekintzak suertatzen dira konposatuaren eta fase geldikorraren artean.

Banaketa-kromatografia. Bereizketa kromatografikoa laginean dauden konposatuen banaketa- edo distribuzio-orekan oinarritzen da, fase mugikorraren eta fase geldikor likido baten artean izaten den banaketa-orekan, hain zuzen ere.

Esklusio-kromatografia. Nahasketa batean dauden konposatuak tamainaren arabera bereiziko dira kromatografia mota honetan. Fase geldikorra material porotsu bat izaten ohi da, molekulak atxikitzen dituena beren tamainaren arabera. Molekula txikienak fase geldikorraren partikulen poroetan barrena sartuko dira, ibilbide luzeagoak deskribatuz zutabe kromatografikoa zeharkatu aurretik. Molekula handienak, aldiz, tamainagatik ez dira poro txikietan sartuko, eta lehenago kanporatuko dira disolbatzaileak bultzatuta.

Ioi-truke kromatografia. Likido-kromatografia mota bat da, non konposatu kimikoen bereizketa elkarrekintza elektrostatikoak direla-eta gertatzen baita. Fase geldikorra kargaturik dauden partikulez osaturik egoten da, aurkako karga duten konposatuak atxikitzeko.

Afinitate-kromatografia. Bereizketa kromatografikoa fase geldikorraren gainazalean immobilizaturik dagoen hartzaile biologiko bati esker gertatuko da; antigorputz bat edo entzima bat, esaterako. Kromatografia mota hori erabiltzen da substantzia biologikoen purifikazio eta isolamendurako, entzima-substratu eta antigorputz-antigeno loturei esker, besteak beste.

1.2.2 PROZESU KROMATOGRAFIKOA AURRERA ERAMATEKO MODUAREN ARABERA

Kromatografia laua. Euskarri lau batean zehar banatzen den fase geldikor batean oinarritutako bereizketa-teknika da. Fase geldikorra laua da, papera edo geruza mehe bat esaterako; eta fase mugikorra bertatik mugituko da kapilaritateagatik, grabitateagatik edo biengatik, beheranzko kromatografia laua, esaterako.

Zutabe-kromatografia. Kasu honetan, fase geldikor solido edo likidoa itxita dagoen zutabe kromatografiko baten barnean kokatzen da, homogeneoki sakabanatuta. Fase geldikorra likidoa denean, euskarri solido geldo baten gainean immobilizatu beharko da, prozesu kromatografikoaren gain eraginik ez duen euskarri baten gainean, hain zuzen ere. Beste aukera bat, fase likidoa zutabearen paretetan immobilizatzea litzateke, gas-kromatografiarako zutabeetan egiten den bezala.

1.2.3 KROMATOGRAMA GARATZEKO MODUAREN ARABERA EDO FASE BATEN GARRAIOA BESTE FASEAN ZEHAR AURRERA ERAMATEKO ERAREN ARABERA

Lagina kromatografora sartzen den moduaren arabera eta haren desplazamenduaren arabera, fase geldikorrean zehar, bereizketa era ezberdinak daude:

Garapen-kromatografia. Kromatografia lauan erabilitako metodoa da. Disolbatzailearen frontea fase geldikorra duen euskarriaren amaierara iristen denera arte garatuko da kromatograma. Horrela, laginaren osagaiek ohantzearen gainean jarraituko dute, behin bereizketa amaitu denean.

Kromatografia frontala. Kromatografia mota honetan, lagin likido edo gaseosoa era jarraituan barneratuko da sistema kromatografikoan, fase geldikorrarekin etengabeko elkarrekintzak izanik. Behin zutabea saturatzen denean, solutua kanporatzen hasiko da, eta horretarako beharrezkoa den denbora edo bolumenari *haustura-denbora* edo *haustura bolumen* deritzo.

Eluzio-kromatografia. Helburu analitikoa duten bereizketa-teknika kromatografikoetan erabilitako metodoa da. Teknika honetan, fase mugikor bat etengabe pasatuko da fase geldikorrean zehar, eta, momentu konkretu batean, laginaren bolumen txiki bat sisteman barneratuko da. Fase mugikorrari esker, laginaren osagaiak zutabean zehar pasatuko dira bereizketa kromatografikoa emanez. Azkenean, konposatu kimiko ezberdinak banan-banan kanporatuko dira ohantze kromatografikotik.

Desplazamendu bidezko kromatografia. Fase geldikorrarekiko, laginean dagoen edozein konposatuk baino afinitate handiagoa duen substantzia bat erabiltzean datza, desplazatzaile bezala ezagutzen dena. Lagina zutabean sartu eta jarraian fase mugikorra pasaraziko da, desplazatzailea bertan disolbatuta egonik. Konposatu honek afinitate txikiagoa duen beste

bat desplazatuko du, eta berak afinitate txikiagoa duen beste bat. Horrela, segidan, desplazamendu ezberdinak suertatuko dira, eta solutu ezberdinak banan-banan aterako dira zutabetik.

1.3 KROMATOGRAFIAREN OINARRI TEORIKOAK

Kromatografia analitikoa da konposatu kimikoen bereizketa eta kuantifikazioa ahalbidetzen duen teknika, zutabearen ostean, lerrokaturik, detektagailu bat kokatzen delako. Atal horrek zutabeak gauzatutako bereizketa fisiko-kimikoari lotutako informazioa seinale neurgarri bilakatzen du. Detektagailuak eluzio-denboraren funtziopean (pasatu den fase mugikorraren bolumenarekiko, alegia) emango du bere seinalea, eta baita analitoaren kontzentrazioaren arabera zutabetik irtetean ere, *kromatograma* deritzon irudikapena eskuratuz. 1. irudiko kromatogramari erreparatuz, konposatu bakoitza denbora-tarte jakin batean ikus daitekeen banda batekin adierazten da, gailur kromatografiko bezala ezagutzen den banda batekin, hain zuzen ere. Sistema kromatografikoan laginaren injekzioa egiten denetik solutua detektagailura iristen denera arteko denbora-tarteari *erretentzio-denbora* deritzo (t_R). Erretentzio-denborak informazio kualitatiboa emango du, eta konposatu jakin bat lagin batean dagoen ala ez jakin ahal izango dugu.

Lagina sisteman injektatu ostean, gailur bat ikusiko da denbora gutxira, zutabe kromatografikoan atxiki ez diren konposatuekin erlazionaturik egongo dena. Gailur horri *injekzio-gailur* deritzo, eta laginaren disolbatzailea izango da, batez ere, seinale horren erantzule. Laginaren injekziotik injekzio-gailurra ikusten denera arteko denborari *denbora hil* deritzo (t_o), eta denbora hiletik konposatu baten gailurra ikusten denera arteko denborari, aldiz, *erretentzio-denbora zuzendu* (t_R').

$$t'_R = t_R - t_o \qquad (1)$$

Bestalde, konposatu bakoitzarentzat erretentzio-edo kapazitate-faktorea (k) defini daiteke:

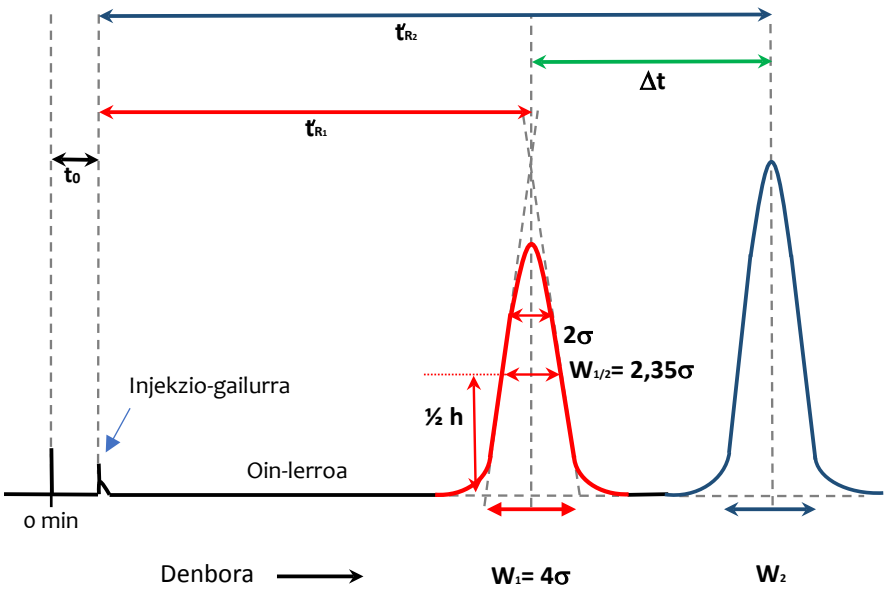
$$k = \frac{t_R - t_o}{t_o} = \frac{t'_R}{t_o} \qquad (2)$$

Faktore hori adimentsionala da, eta fase geldikorrak konposatu baten atxikipenean duen eraginkortasunaren berri emango du, fase mugikorraren fluxua edozein izanda ere. Praktikoki, konposatu ezberdinek 1 eta 15 bitarteko k balioak izan beharko dituzte; 1etik

behera egonez gero, fase geldikorrean izaten den atxikipena ez litzateke nahikoa izango; 15etik gora egonez gero, ordea, atxikipena gehiegizkoa litzateke, banda oso zabalak lortuz.

Konposatu kimiko bat baino gehiago bereizi behar direnean, atxikipen erlatibo koefizientea edo bereizketa-koefizientea (α) definitu beharko litzateke. Zenbat eta balio altuagoa izan, bi konposaturen arteko bereizketa hobea litzateke.

$$\alpha = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} = \frac{k_2}{k_1} \qquad (3)$$



1. irudia. Konposatu ezberdinen kromatograma eta beren parametro kromatografikoak.

Kromatograma batean, konposatu baten banda-zabalera ezagutzeko erarik aproposena litzateke gailurraren altueraren erdialdean ($w_{1/2}$) eta gailurraren oinean (w) banda-zabaleraren neurketa egitea. w neurtzeko, gailurreko malda handieneko guneetatik tangenteak marraztuko dira, eta aintzat hartuko dira oin-lerroarekin mozten duten puntuak.

K bereizketa-faktoreak bi konposaturen arteko bereizketaren berri ematen digu, gailurren erpinak kontuan hartuz bereizketa egokia den ala ez ezagutzeko. Bereizketaren berri ematen digun beste parametro bat da erresoluzioa (R_s); horrek, gailurren maximoez gain, kontuan hartzen ditu beren oinak ere. Erresoluzioak bereizketaren berri hobe ematen digu bereizketa-faktoreak baino, askotan, erpinak ondo bereizita egon daitezkeelako (k>1) baina gailurren oinak, ordea, ez. Kuantifikazioa era egokian egin ahal izateko, onargarria den

R_s balio minimoa 1 da, ondoz ondoko bi gailur kromatografikoen gainezartzea %2 izanik. Hala ere, orokorrean, R_s balioak 1,5-2 bitartetik gora egotea hobesten da.

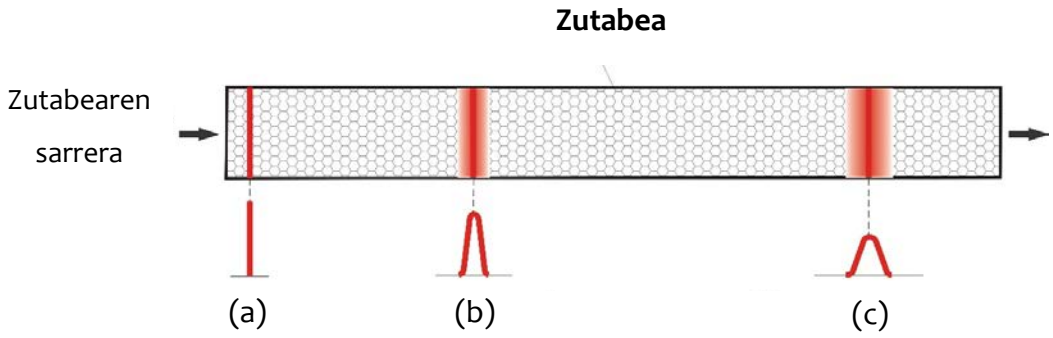
$$R_S = \frac{t'_{R2} - t'_{R1}}{0,5\ (w_1+w_2)} = \frac{\Delta t_R}{\overline{w}} \qquad (4)$$

Bi gailur kromatografikoen erabateko bereizketa lortzeko, ahalik eta α eta R_s balio altuenak beharko lirateke. Ildo horretan, R_s balioak zutabearen eraginkortasuna handituz hobe daitezke; α balioak, aldiz, konstanteak dira sistema kromatografiko bakoitzean. Horregatik, α igoarazteko fase geldikorra edota fase mugikorra aldatu beharko lirateke, ez baita emaitzarik hobetuko zutabearen eraginkortasunaren handitze hutsarekin.

Zutabe kromatografikora sartzean (2. irudia), bereizketa-prozesuaren hasieran, nahasketa baten osagai ezberdinek zabalera finitua duen banda mehe bat osatzen dute (a). Solutu bakoitzak zutabe kromatografikoa zeharkatzen duen heinean, aldiz, banda-zabalera handituz doa (b), *banda-zabalkuntza* izeneko fenomenoa gertatuz. Solutu batek zenbat eta denbora gehiago egin zutabearen barnean, orduan eta banda kromatografiko zabalagoa izango du, eta zutabetik irtetean banda-zabalera gaussiarra emango du (c). Solutu baten hedapen-banda baten desbiderapen estandarra honako hau litzateke:

$$\sigma = \sqrt{2Dt} \qquad (5)$$

Non D hedapen koefizientea baita, eta t denbora.



2. irudia. Solutu baten banda-zabalkuntza, zutabe kromatografiko bat zeharkatzen duen heinean.

Banda-zabalkuntzaren arrazoi bat molekulen difusio termodinamikoa da, bolumen guztian zehar era uniformean sakabanatuz. Horren harira, difusio-koefizienteak substantzia baten mugimenduaren abiadura adieraziko du, kontzentrazio altuko gune batetik

kontzentrazio baxuko batera. Difusio-prozesua denboraren menpe dagoenez, bandaren sakabanaketak gora egingo du eluzio-denborak gora egiten duen heinean.

Gailur kromatografiko baten kalitatea adierazteko, erretentzio-denbora eta banda-zabalera aintzat hartzen dituen parametro bat erabiltzen da (t_R/σ). Praktikan, zatiki horren karratua erabiltzen da zutabearen eraginkortasunaren berri izateko, eta *plater teoriko kopuru* (N) deritzo.

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \qquad (6)$$

$4\sigma = w$ dela kontuan izanda, honako hau lortuko litzateke:

$$N = 16\left(\frac{t_R}{w}\right)^2 \qquad (7)$$

Horrela, plater teoriko kopurua zuzenean kromatogramatik lor liteke w neurtuta. Banda-zabalera altueraren erdialdean neurtuko balitz, ordea, honako espresio hau lortuko litzateke:

$$N = \left(\frac{t_R}{w_{1/2}/2{,}35}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t_R}{w_{1/2}}\right)^2 \qquad (8)$$

Plater teoriko eraginkorren kopurua, ordea, erretentzio-denbora zuzendua erabiliz kalkulatuko litzateke.

$$N = \left(\frac{t_R'}{w_{1/2}/2{,}35}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{t_R'}{w_{1/2}}\right)^2 \qquad (9)$$

Platerren teoriak zutabe kromatografikoa geruza mehe ezberdinez osaturik egongo balitz bezala hartzen du; horietako bakoitzean, distilazio zatikatuan gertatzen den bezala, solutuaren bereizketa gertatuko litzateke fase mugikorraren eta geldikorraren artean. Horrela, plater bakoitzean, konposatuaren distribuzio-oreka bat ezarriko litzateke fase mugikorraren eta geldikorraren artean, eta zutabean zehar izango den solutuaren desplazamendua fase mugikorraren transferentziatzat hartuko litzateke plater batetik

hurrengo plater teorikora. Zutabe baten plater teorikoen kopurua kalkula daiteke kromatogramaren gailurretako baten zabalera erabiliz; normalean, kromatograman ikusten den azkena erabiltzen da.

Zutabe baten plater kopurua (N) bere luzeraren menpe dago (L), horrekiko proportzionala izanik. Hori dela-eta, zutabe ezberdinen eraginkortasuna konparatzeko, *plater-altuera baliokide* terminoa erabiliko da. Hori horrela izanik, honako espresio hau izango genuke:

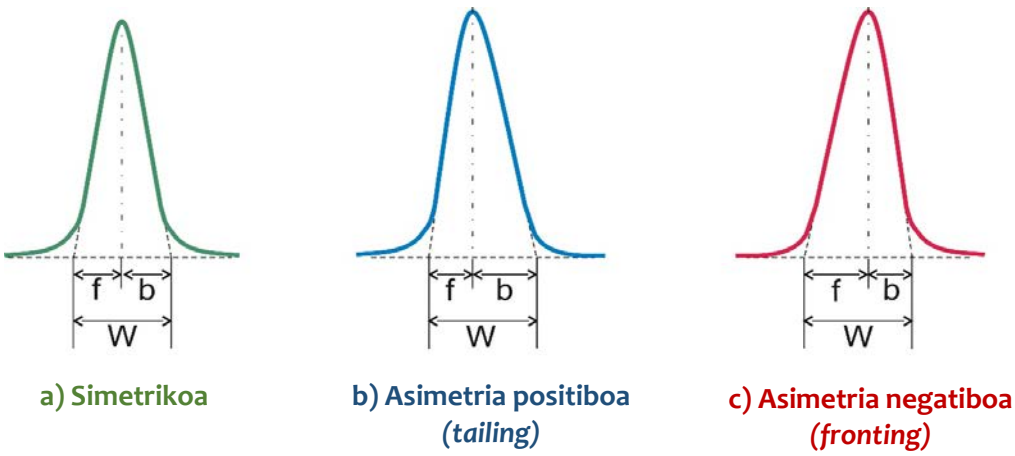
$$N = \frac{L}{H} \qquad (10)$$

non H plater teoriko batekiko baliokidea den altuera baita. Beraz:

$$H = \frac{L}{N} = \frac{Lw^2}{16t_R^{\,2}} \qquad (11)$$

Zenbat eta plater-altuera txikiagoa izan, orduan eta banda kromatografiko meheagoa. Aldiz, L/H balio altuenek erresoluzio hobeak ematen dituzte. Hori guztia horrela izanda, zutabearen eraginkortasuna maximoa izateko, L/H terminoa optimizatu egin beharko da, analisi-denbora gehiegi luzatu gabe.

Solutuak zutabea zeharkatzen duen heinean, sistema kromatografikoak banda zabalarazten duela onartu da, Gaussen itxura duen gailur bat lortuz. Hala ere, normalean, gailur kromatografikoak ez dira erabat gaussiarrak izaten, asimetrikoak baizik. Kasu horietan, asimetria positiboa (*tailing* efektua) edo negatiboa (*fronting* efektua) izan dezakete (3. irudia).



3. irudia. Gailur kromatografiko simetriko eta asimetrikoak.

Gailurretako buztanak edo, bestela esanda, *tailing* efektua adsortzio fenomenoengatik gertatzen da, batez ere. Baita fase geldikorraren gune batzuek solutua indar handiagoz atxikitzen dutenean ere beste gune batzuek baino. Frontea edo *fronting* efektua, aldiz, analito gehiegi egoteagatik izaten den gehiegizko karga dela-eta gertatzen da, edo, bestela, prozesu kromatografikoan zehar izan daitezkeen analitoaren erreakzioengatik. Horren harira, analito basiko askok, aminek esaterako, beren gailur kromatografikoetan buztanak izaten dituzte fase geldikorraren silanol taldeekin izaten dituzten elkarrekintzen erruz.

Gailur kromatografiko baten asimetria-faktorea honako ekuazio honen arabera kalkula daiteke:

$$A_s = \frac{(f + b)}{(f + b) - \Delta w} \qquad (12)$$

non $\Delta W = |f - b|$ baita.

Asimetria-faktorea gailur kromatografiko baten simetria-maila neurtzeko erabiltzen da $w_{0,1}$ denean, $w_{0,1}$ gailurraren zabalera altueraren %10ean izanik. Hori dela-eta, honako espresio hau ere erabil daiteke A_s faktorearen kalkulua egiteko:

$$A_s = \frac{b}{f} \qquad (13)$$

Asimetria-faktore oso handiak saihestu ezean, kuantifikazioan erroreak egon daitezke, eta baita gailurren erresoluzioa kaskarra izan ere. Asimetria-faktorea 1,1 duen gailur batek %10eko eraginkortasuna galduko luke. Gailurren asimetria gerta daiteke faktore instrumentalak edo kromatografikoak direla-eta, hala nola, fase mugikorraren aktibitate altuarengatik, konposatuaren eta fase geldikorraren arteko erreakzio kimikoengatik, bolumen hilak direla-eta, edota laginaren injekzio oker bat egiteagatik.

Laginaren injekzioa. Laginaren gehiegizko masa edo bolumen bat injektatzeak zutabearen gainkarga bat bultza dezake, zutabearen bereizketa-kapazitatea jaitsaraziz eta asimetria-faktore altuak lortuz.

Lagin-bolumen jakin bat injektatzean, horrek, zutabearen buruan bolumen jakin bat beteko du. Hasierako banda hori zabaltzen joango da zutabetik pasatzen den heinean. Horregatik guztiagatik, agerikoa da bolumen egokiak injektatu behar direla kalitatezko injekzio-sistemak erabiliz. Kalitate hori adierazteko, K parametroa erabiltzen da, injektatutako bolumenarekin (V_o) eta injekzioaren ondorioz sortutako solutu-bandaren desbiderapen estandarrarekin (σ_i) erlazionatua dagoena.

$$\sigma_i = \frac{V_o}{K} \qquad (14)$$

Injekzioa hobea izango da zenbat eta K handiagoa izan, hau da, zenbat eta bolumen txikiagoa injektatu.

Bolumen hilak. Fase geldikorrak betetzen duen bolumena izan ezik, *bolumen hila deritzo* solutuaren injekzio-puntutik horren detekzioa egiten denera arte dagoen bolumenari. Sistema kromatografikoan solutua eta fase mugikorra dauden edozein puntu hilak analitoaren difusioan eta banden zabaleran eragin dezake, eta, horregatik, bolumen hilak minimizatu beharko lirateke. Horretarako, kromatografian erabiltzen diren kapilarrak eta lotura-elementuen neurriak ahal den heinean txikitu beharko dira, diametro eta luzera txikiko kapilarrak erabilita, esaterako.

1.3.1 KROMATOGRAMEN INTERPRETAZIOA

Metodo kromatografikoek lagin konplexu batean dauden konposatu kimikoen kopuruari eta horien kontzentrazioari buruzko informazioa eman dezakete.

A) ANALISI KUALITATIBOA

Atxikipen-parametroak (atxikipen-denbora edo atxikipen-bolumena) konstante mantenduko dira, betiere baldintza kromatografikoak mantentzen badira. Hori dela-eta, lagin baten analisitik lortutako gailur kromatografikoen atxikipen-parametroak patroi-disoluzio ezberdinek emandakoekin alderatuz gero, analisi kualitatiboak egin litezke.

Konparaketak egiterako garaian, zuzendutako atxikipen-denbora edo bolumena, kapazitate-faktoreak eta atxikipen-denbora erlatiboak erabiltzen dira. Lehenengo biek bolumen hilen erruz suertatzen diren atxikipen-denboren arteko ezberdintasunen zuzenketak egitera ahalbidetzen dute. Atxikipen-denbora erlatiboa, bestalde, identifikazio kualitatiboak egiteko erabiltzen da, datu bibliografikoetan adierazitako parametro honen balioekin alderaketak eginez. Horren kalkulua egiteko, honako ekuazio hau erabiltzen da:

$$t_{erl} = \frac{t}{t_p} \qquad (15)$$

non t konposatuaren atxikipen-denbora baita, eta t_p barne-estandar bezala hartutako konposatuaren atxikipen-denbora.

Adierazitako guztiarekin, agerian utzi da kromatografia erabili daitekeela lagin batean konposatu ezberdinen presentziaren berri jakiteko. Hala ere, konposatu horien presentzia konfirmatu egin beharko litzateke, masa-espektrometria bitartez, esaterako. Kromatografia soilik erabilita konposatu zehatz bat laginean dagoela ziurtasunez baiezta ezin badaiteke ere, kromatograma bati erreparatuta, ziurtagenezake, erabat, konposatu jakin bat ez dagoela analizatutako laginean, betiere berari legokiokeen gailur kromatografikoa ikusiko ez balitz.

B) ANALISI KUANTITATIBOA

Kromatografiak nahasketa konplexuen bereizketak egitea ahalbidetzen du, nahiz eta bereizi beharreko konposatuak antzeko ezaugarriak izan. Sistema kromatografikoari akoplatutako detektagailuek analitoaren kontzentrazioarekin edo kantitatearekin erlaziona daitekeen seinale instrumental bat emango dute.

Kromatograma batean agertzen diren gailurren azalerak analisi kuantitatiboak egiteko neurtuko dira. Altuera ere erabil liteke kuantifikazio helburuekin, baina solik gailur oso zorrotzak estuak eta simetrikoak direnean. Oro har, azaleraren neurketa izaten da analisi kuantitatiboak egiteko erabiltzen den prozedura nagusia.

1.3.2 TERMINOLOGIA

Zutabe kromatografikoa. Fase geldikorra homogeneoki banatua duen hodi zurruna. Altzairu herdoilgaitzez (batez ere likido-kromatografian, LK) edo poliimidaz (gas-kromatografian, GK) osaturik egon ohi da.

Fase mugikorra. Sistema kromatografiakoan zehar analitoak garraiatzen dituen fluidoa da. Likido (LK), gas (GK) edo fluido superkritiko bat izan daiteke (fluido superkritikoen kromatografian).

Fase geldikorra. Elkarrekintza molekularrak direla medio, analitoak atxikitzen dituen fase solido edo likidoa.

Fluxua edo emaria. Denbora unitateko, zutabe kromatografikotik pasatzen den fase mugikorraren bolumena.

Eluzioa. Analitoek zutabea zeharkatu eta bertatik irteteko prozesuari deritzo.

Kromatograma. Denboraren edo fase mugikorraren bolumenaren funtziopean, detektagailuak emandako seinalearekin eratutako irudikapen grafikoa.

Oin-lerroa. Kromatograma batean, gailur kromatografikorik ikusten ez den seinale lauari deritzo. Fase mugikorrak emandako seinaleari dagokio.

Gailur kromatografikoak. Konposatu ezberdinak, zutabean bereiziak izan eta gero, detektagailuan neurtzeagatik eskuratzen diren seinale ezberdinak.

Denbora hila. Atxikia izan ez den konposatu baten eluziorako beharrezkoa den denbora.

Bolumen hila. Atxikia izan ez den konposatu baten eluziorako beharrezkoa den fase mugikorraren bolumena.

Atxikipen-denbora. Laginaren injekziotik gailur kromatografikoaren puntu maximora iristeko igaro den denbora.

Atxikipen-bolumena. Konposatu baten eluziorako beharrezkoa den fase mugikorraren bolumena.

Atxikipen-denbora erlatiboa. Bi konposaturen arteko atxikipen-denboren erlazioa, garapen kromatografiko batean.

Plater teoriko kopurua. Zutabe kromatografikoaren eraginkortasuna neurtzeko baliagarria den parametroa.

Atxikipen edo kapazitate faktorea. Fase geldikorraren eta mugikorraren artean banatutako substantzia kantitatearen erlazioa. Fase geldikorraren atxikipen-ahalmenaren berri emango digu.

Erresoluzioa. Zutabe batean bi konposaturen bereizketari buruzko informazioa ematen duen parametroa.

Bereizketa-faktorea. Ondoz ondoko bi gailur kromatografikoentzat kalkulatutako atxikipen erlatiboa.

Simetria-faktorea. Banda-zabalkuntzaren berri ematen duen faktorea, Gaussen itxurarik ez duten gailur kromatografikoak identifikatzeko.

2. LIKIDO-KROMATOGRAFIA

Likido-kromatografia (LK) lurrunkortasun baxuko substantzia disolbagarriak eta termolabilak bereizteko erabiltzen den teknika da. Lagina mota ezberdineko bi faseen artean banatuko da, bata mugikorra eta bestea geldikorra. Fase mugikorra likido baten edo likido ezberdinen nahasketa bat izango da; geldikorra, aldiz, solido bat (likido-solido kromatografia edo adsortzio-kromatografia) edo fase mugikorrarekin nahastezina den likido bat geldoa den solido baten gainazalari kobalenteki lotua (banaketa-kromatografia).

Lagin likidoa sistema kromatografikoan injektatuko da, eta konposatu ezberdinek sistema kromatografikoan zehar aurrera egingo dute abiadura ezberdinetan, fase mugikorrak garraiatuta. Bereizketa kromatografikoa gertatuko da fase mugikorrean disolbaturik dauden konposatuen eta fase geldikorraren arteko elkarrekintza ezberdinei esker. Elkarrekintza sendoenak izaten dituzten konposatuek astiroago zeharkatuko dute zutabea; ahulenak dituztenak, aldiz, lehenago iritsiko dira zutabearen bestaldera, atxikipen-denbora laburragoak aurkeztuz.

Fase mugikorraren konposaketa bera erabiltzen denean prozesu kromatografiko guztian zehar, bereizketa modu isokratikoa erabili dela esaten da. Bereizketa modu hori erabiltzen da oso konplexuak ez diren nahasketak bereizteko. Konposatu ezberdin ugari dituzten nahasketa konplexuen bereizketarako, eluzio gradiente bat erabiltzen da, non fase mugikorraren konposaketa analisian zehar aldatuz baitoa (bereizketa gradiente moduan).

Konposatuen eta fase geldikorraren arteko elkarrekintza edo atxikipen-mekanismoen arabera, LK teknikak ondoren adierazten den bezala sailka daitezke:

- **Adsortzio-kromatografia.** Kromatografia likido-solidoa. Fase geldikorra solidoa izaten da, eta analitoak atxikiak geratuko dira bertan adsortzioa dela-eta. Polaritate baxuko eta uretan disolbagaitzak diren konposatuentzat erabil daiteke.
- **Banaketa-kromatografia.** Likido-likido kromatografia. Ionikoak ez diren konposatuentzat erabiltzen den kromatografia mota da. Fase geldikor likido bat erabiltzen da, silizezko euskarri solido baten gainazalari lotua dagoena.
- **Ioi-truke kromatografia.** Uretan disolbagarriak diren konposatu ionikoentzat erabiltzen den KL mota bat da. Fase geldikorra kargaturik dagoen ioi-truke erretxina bat da.
- **Esklusio-kromatografia.** Tamainaren araberako analitoen bereizketak gauzatzeko baliagarria den KL teknika bat da. Fase geldikor bezala, gel itxurako polimero solido bat erabiltzen da, poroetan likidoa duena.

Bestalde, prozesu kromatografikoan parte hartzen duten faseen ezaugarrien arabera, fase normaleko LK eta alderantzizko faseko LK genituzke.

Fase normaleko LK. Teknika honetan, fase geldikorra polarra da; mugikorra, aldiz, apolarra, hexanoa izanik gehien erabilitako disolbatzailea. Hori dela-eta, polaritate altueneko konposatu organikoak indar handiagoz atxikiko dira fase geldikorrean konposatu apolarrenak baino. Atxikipenerako izaten diren elkarrekintza nagusiak hidrogeno-zubiak dira; haatik, faktore esterikoek ere eragina izaten dute atxikipenaren indarrean. Horregatik, KL mota hau erabilita, isomeroen bereizketa gauzatu liteke. Fase mugikorraren konposaketan disolbatzaile organiko polarraren portzentajea handituz gero, konposatu kimikoen atxikipen-denbora jaitsaraziko litzateke, kontrako efektua lortuz disolbatzaile apolarraren kantitatea igoz gero.

Alderantzizko faseko LK. Kromatografia mota honetan fase geldikor apolar bat erabiltzen da, fase mugikorra geldikorra baino polarragoa izanik. Analitoen bereizketa elkarrekintza hidrofobikoak direla-eta gertatuko da, disolbatzaile polar baten, polaritate ertaineko edo baxuko konposatu baten, eta fase geldikor apolar baten artean sortutako London-en dispertsio-indarren ondorioz, alegia. Konposatu apolarrenak sendoago atxikiko dira fase geldikorrean; polarrenak, aldiz, lehenago zeharkatuko lukete zutabea. Solutuen eluzioa lortu ahal izateko, fase mugikor urtsuari disolbatzaile organiko baten portzentaje bat gehitzen zaio, metanola, isopropanola edo azetonitriloa, esaterako.

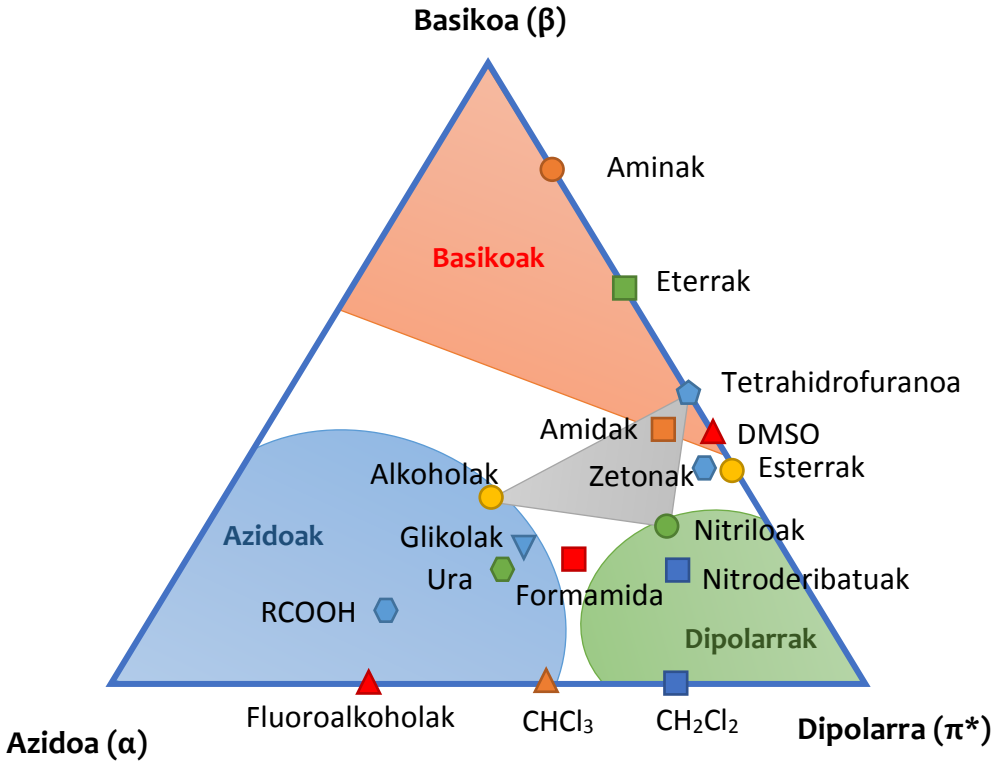
Elkarrekintza hidrofiliko kromatografia (HILIC). Analito oso polarrak ezin daitezke bereizi alderantzizko faseko LK erabiliz. Horregatik, kromatografia modu berri bat sortu zen, HILIC kromatografia hain zuzen ere (*Hydrophilic Interaction Chromatography*). Fase normaleko kromatografia mota bat da, non fase mugikor organiko bat eta fase geldikor polar bat erabiltzen baitira (silize hutsa edo silizeari lotutako fase ezberdinak erabiliz). Fase mugikorrak ur kantitate txiki bat izan ohi du (prozesuaren hasieran %2 inguru), analisian zehar handitu daitekeena, eta disolbatzaile organikoa urarekin nahaskorra izan behar da.

2.1 FASE MUGIKORRAREN EZAUGARRIAK

Fase mugikorra purutasun eta indar eluotropiko altuko eta biskositate baxuko likido edo likidoen nahasketa batez osaturik dago, indar eluotropiko altua izateagatik nahasketaren osagai ezberdinen erabateko eluzioa ahalbidetuz. Fase mugikorrean egon litezkeen ezpurutasunek, eragina izan lezakete indar eluotropikoaren gain; horregatik, kalitate kromatografikoa duten disolbatzaileak erabili beharko dira.

Fase mugikorraren hautaketarako, bereizi beharreko konposatuen ezaugarri fisiko-kimikoei erreparatu beharko diegu, polaritateari batez ere. Polaritateaz gain, kontuan hartu beharreko faktoreak lirateke detektagailuarekin duen bateragarritasuna eta baita bere selektibitatea eta toxikotasuna ere.

Disolbatzaileak hiru koordenatutako diagramak erabiliz sailka daitezke: azidotasuna, basikotasuna eta izaera dipolarra kontuan izanik. Diagrama horiei *disolbatzaileen selektibitate-hiruki* deritze (4. irudia). Ia edozein disolbatzaile irudian adierazitako talderen batean (basikoak, azidoak eta dipolarrak) barneratu ahalko litzateke.



4. irudia. Disolbatzaileen selektibitate-hirukia.

Azidotasunak adierazten du disolbatzaile batek analito basikoekin hidrogeno-zubiak eratzeko ahalmena, basikotasunak, aldiz, analito azidoekin. Izaera dipolarrak, bestalde, disolbatzailearen ahalmena adieraziko du dipolo-dipolo loturak eratzeko.

Selektibitate normalizatuak hiru parametro horiek (hidrogeno-zubien azidotasun eta basikotasuna eta izaera dipolarra) barneratzen ditu, solutu-disolbatzaile elkarrekintzarekin erlazionatutakoak.

1. taulan disolbatzaile ezberdinen ezaugarriak adierazten dira. Bertan, selektibitate normalizatua, polaritatea eta konstante dielektrikoa adierazi dira; azken horrek disolbatzaileak duen gaitasuna adierazten du, solutu ionizatuak disolbatzeko edo indargetzaileekin nahasteko.

1. taula. Disolbatzailearen polaritatea eta selektibitatea.

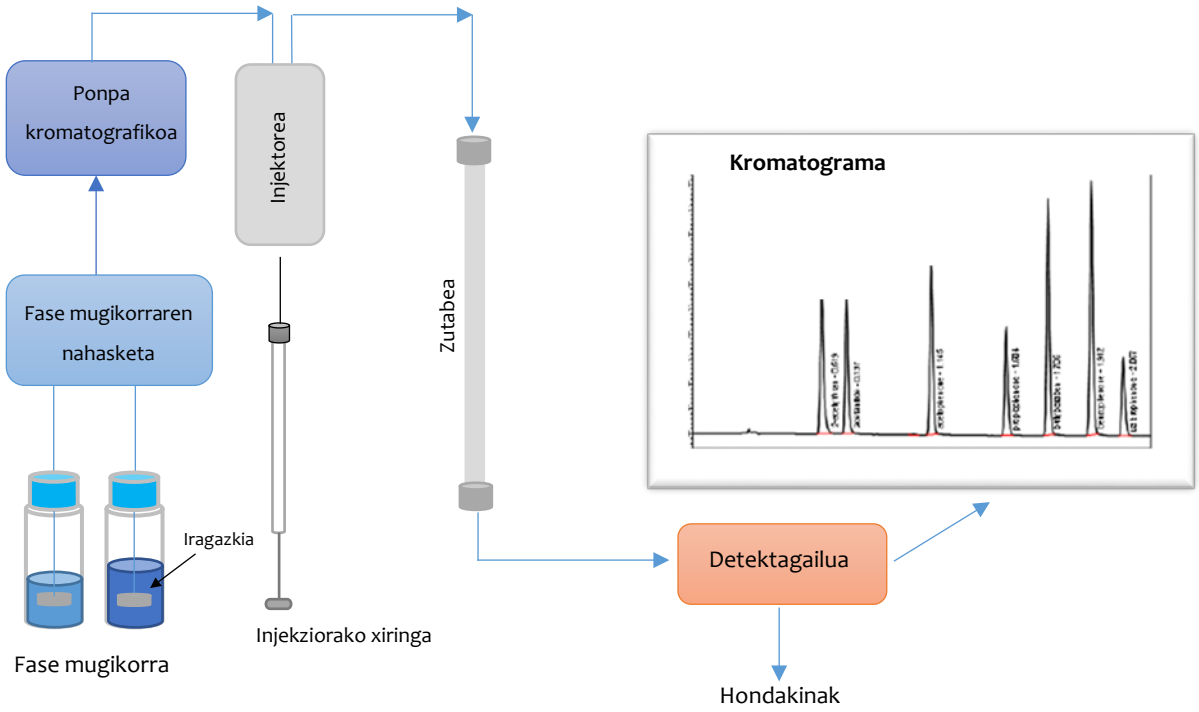
SELEKTIBITATE NORMALIZATUA

DISOLBATZAILEA	**HZ azidotasuna**	**HZ basikotasuna**	**Izaera dipolarra**	**P**	**ε**
	α	**β**	**π***		
AZETONA	0,06	0,38	0,56	5,1	20,7
AZETONITRILOA	0,15	0,25	0,60	5,8	37,5
AZIDO AZETIKOA	0,54	0,15	0,31	6,0	6,2
URA	0,43	0,18	0,45	10,2	80,0
BENTZENOA	0,14	0,86	0,00	2,7	2,3
DIKLOROMETANOA	0,27	0,00	0,73	3,1	8,9
DIETIL ETERRA	0,00	0,64	0,36	2,8	4,3
DIMETILSULFOXIDOA	0,00	0,43	0,57	7,2	4,7
ETANOLA	0,39	0,36	0,25	4,3	24,6
ETILO AZETATOA	0,00	0,45	0,55	4,4	6,0
FORMAMIDA	0,33	0,21	0,46	9,6	182,0
GLIKOLA	0,38	0,23	0,39	6,9	37,7
HEXANOA	0,00	0,00	0,00	0,1	1,9
ISOPROPANOLA	0,22	0,35	0,43	3,9	19,9
KLOROFORMOA	0,43	0,00	0,57	4,1	4,8
METANOLA	0,43	0,29	0,28	5,1	32,7
METILO AZETATOA	0,05	0,40	0,55	5,0	6,7
N,N-DIMETILFORMAMIDA	0,00	0,44	0,56	6,4	36,7
PIRIDINA	0,42	0,58	0,00	5,3	12,4
TETRAHIDROFURANOA	0,00	0,49	0,51	4,0	7,6
TOLUENOA	0,17	0,83	0,00	2,4	2,4

HZ azidotasuna/basikotasuna: hidrogeno-zubiak eratzeko ahalmena konposatu basiko/azidoekin.
P: polaritatea.
ε : konstante dielektrikoa.

2.2 INSTRUMENTAZIOA

5. irudian erakusten da likido kromatografoaren atal ezberdinen irudi eskematikoa.



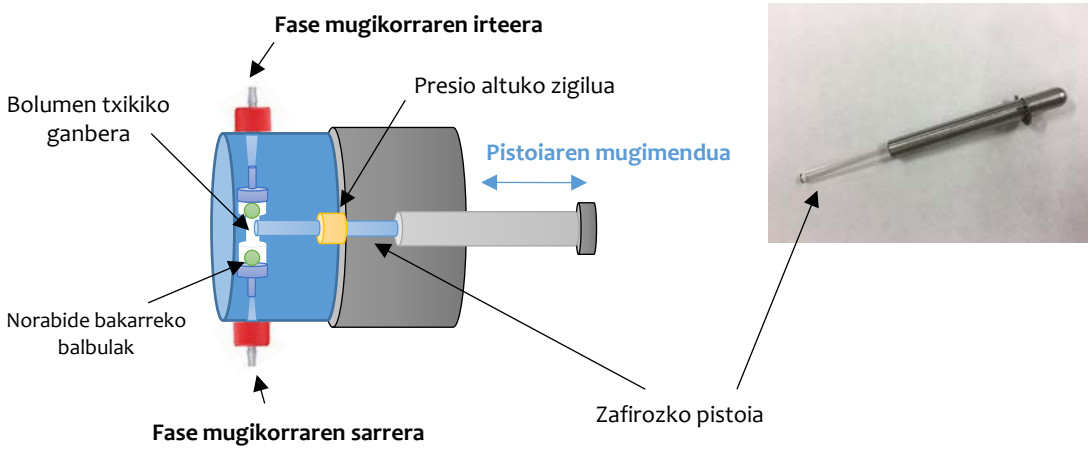
5. irudia. Likido-kromatografo baten atal nagusiak.

2.2.1 FASE MUGIKORRAREN SISTEMA

Disolbatzaileen gordailua. Likido kromatografoak beirazko hainbat ontzi ditu fase mugikorra bertan edukitzeko. Erabili aurretik, disolbatzaile horietan disolbaturik dagoen gasa eliminatu beharko da, helio gasarekin burbuilak sortuz. Bestalde, esekiduran dauden partikulak sistema kromatografikoan sar ez daitezen, iragazki bat jartzen da fase mugikorraren xurgapenerako hodien hasieran.

Ponpa. Ponpa kromatografikoek fase mugikorra mugiarazten dute sistema kromatografiko guztian zehar, presio konstantean eta pultsaziorik gabeko emariarekin, fluxuaren aldaketek detektagailuak emandako seinalearen gorabeherak sorraraz baititzakete, zarata instrumentala handituz eta sentsibilitatea jaitsaraziz.

Ponpa fase mugikorrarekiko inerteak diren materialez osaturik dago. Ohikoenak zafirozko bi pistoiz osatutako ponpak dira, bolumen txikiko ganbera baten barnean kokaturik egoten direnak. Gordailuan dagoen disolbatzailearen xurgapena ahalbidetzen dute horiek, fase mugikorra zutabe kromatografikorantz bideratuz.

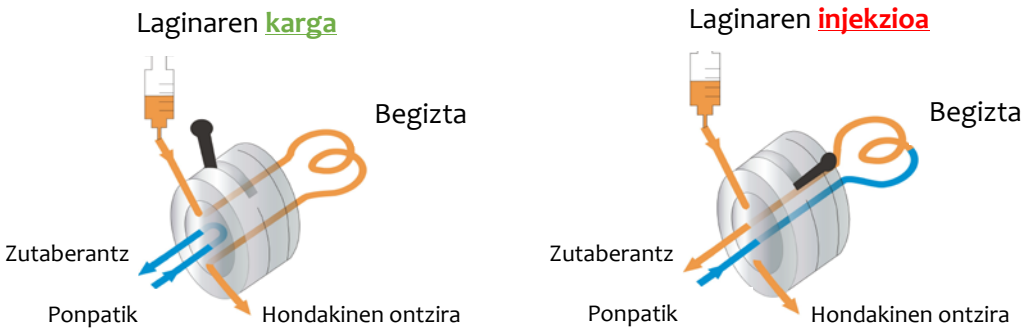


6. irudia. Ponpa kromatografiko baten eta zafirozko pistoi baten irudiak.

2.2.2 INJEKZIO-SISTEMA

Kromatografian erabiltzen den injekzio-sistemak lagina kromatografoan sartzera ahalbidetzen du, fluxuaren etenik egon gabe. Mikroxiringa baten bitartez egindako eskuzko injekzioan Reodhyne® balbula bat erabiltzen da, eta bi posizio ditu, karga posizioa eta injekzio posizioa (7. irudia). Balbularen atzealdean bolumen finkoko begizta edo *loop* bat izaten du, lagina gordetzeko injekzioaren aurretik. Bolumen ezberdinetako begiztak merkaturaturik daude, µL gutxi batzutatik hasita, 10 µL edo 20 µL esaterako, bolumen handiagoko begiztetara, 100 µL edo 500 µL-koak esaterako. Prozesuaren errepikakortasuna ziurtatzeko, begiztaren bolumena baino handiagoa den lagin kantitatea sartuko da, *loop* guztia beteta gera dadin.

Balbula karga posizioan dagoela egingo da laginaren injekzioa. Horretarako, xiringaren orratza balbularen gune zentralean dagoen zulo batetik sartuko da; bertan xiringa hustu eta, berehala, laginak balbularen atzealdera joko du, begiztan gordez. Momentu horretan, balbulari eragingo zaio injekzio-posiziora mugituz. Horri esker, fase mugikorra begiztan sartuko da, eta bertan zegoen lagina mugiaraziko du zutabe kromatografikorantz (7. irudia).



7. irudia. Eskuzko injekzioa likido-kromatografian.

2.2.3 ZUTABE KROMATOGRAFIKOA

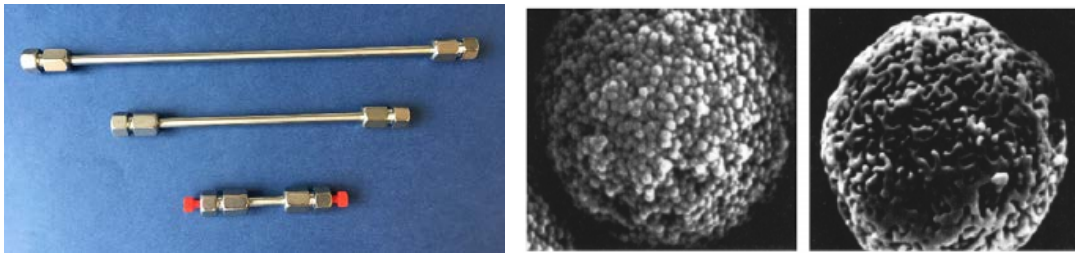
LKn erabiltzen diren zutabeak altzairu herdoilgaitzez eginak egoten dira, eta 5 eta 30 cm bitarteko luzera eta 2-5 mm bitarteko diametroa izaten dute. Zutabearen barnealdean, fase geldikorra paketaturik egoten da, era homogeneo batean sakabanatua zutabe guztian zehar. Paketatutako material hori tamaina zehatzeko partikulez osaturik dago, erresistentzia mekaniko altua izan behar du, eta baita kimikoki egonkorra ere. LK-n erabilitako fase geldikorrak bi motatakoak izan daitezke: geruza mehe batez inguratutako mikropartikuladunak eta partikula mikroporotsuak dituztenak gainazalean.

Geruza mehez inguratutako mikropartikulez osatutako fase geldikorrak 30-40 µm bitarteko diametroko beirazko edo polimerozko partikula ez-porotsu esferikoak izaten dituzte euskarri gisa. Bestalde, horien gainazala 1-3 µm diametroko partikula porotsuez inguratua dago, eta partikula txiki horiek, halaber, geruza likido batez inguratuak daude.

Partikula mikroporotsuz osatutako fase geldikorrak 3-10 µm-ko diametroa duten silizezko, aluminazko edo trukatzaile ionikozko partikulez osaturik egoten dira. Horiek, era

berean, geruza organiko likidoez inguratuak egon daitezke, adsortzioz atxikia edo kobalenteki lotua egon daitekeena partikulen gainazalean. Orokorrean, kimikoki lotutako fase likidoak erabiltzen dira silize partikulen gainazalean.

Oro har, zutabeen eraginkortasuna hobea izaten da partikula tamaina txikiagoa den heinean; haatik, sistema kromatografikoan presioa handitu egiten da partikula txikiak erabiltzean. Gainera, disolbatzailearen biskositatea handia bada, sistemaren presioa are gehiago handituko da. Horregatik, biskositatea jaitsarazteko, zutabea eta fase mugikorra berotu daitezke fluxua erraztuz. Berotze horrek, analitoen eta fase geldikorraren arteko elkarrekintzak ahultzen ditu, eta horrek, fluxua erraztearekin batera, gailur kromatografikoen atxikipen-denborak aurreratzen ditu. Hori guztia dela-eta, gailur kromatografikoen erresoluzioa hobetzen da solutu ezberdinen difusio-abiadura azkartzen delako. Halere, tenperatura igotzeak fase geldikorraren degradazioa bizkortzen du, eta, ondorioz, denbora gutxiagoz egongo da erabilgarri. Giro-tenperatura baino pixka bat altuagoa aplikatuz zutabeen berogailuan, atxikipen-denboren errepikakortasuna hobetzen da, eta baita analisi kuantitatiboaren doitasuna ere.



8. irudia. Zutabe kromatografikoak eta horien betekin ezberdinak.

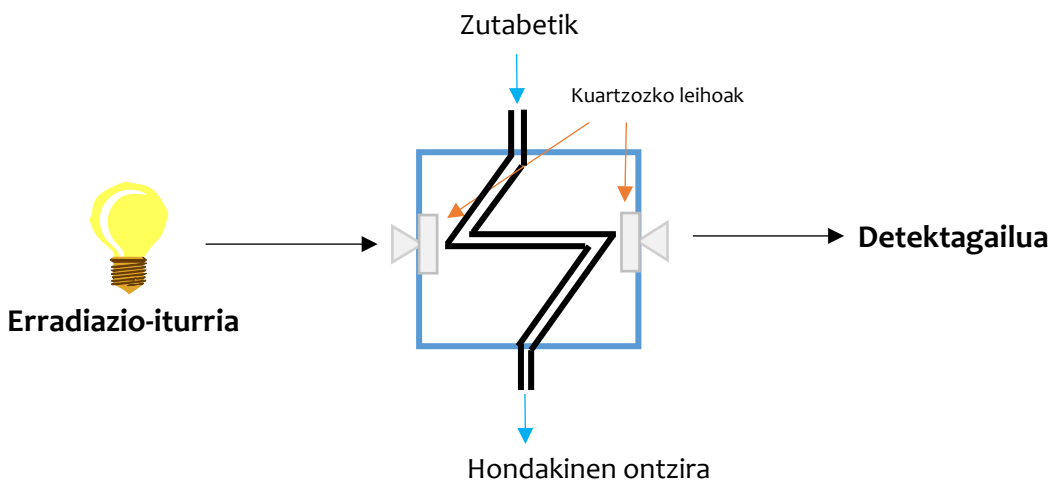
2.2.4 DETEKTAGAILUA

Detektagailuak bertatik pasatzen den nahasketaren konposaketari buruzko informazioa emango digu etengabe. Solutu bakoitza, zutabetik irtetean, detektagailura iritsi, eta horrek seinalea emango du, solutuaren kontzentrazioaren menpekoa izango dena. Kromatografian erabilitako detektagailu idealak erantzuna emango du analitoaren kontzentrazio txikien aurrean; gainera, linealtasun zabaleko erantzuna izango da, zarata instrumental minimoa emanez. Bestalde, presio, fluxu eta fase mugikorraren aldaketen aurrean tinko jarraitu beharko du.

Detektagailuan egon ohi den fluxu-zelda bolumen txikikoa izan beharko da, laginaren sakabanaketa eta, ondorioz, banda-zabalkuntza saihesteko. Bolumen txikiko zeldek, gainera, erantzute-denbora azkarra izaten dute.

A) UV/Ik DETEKTAGAILUA

UV/Ik detektagailua erradiazio elektromagnetikoaren eta materiaren arteko elkarrekintzan oinarritzen da, espektroaren eremu ultramore eta ikusgaian. Era estatikoan erabiltzen den espektrofotometroaren tankerakoa da, ezberdintasun bakarra detektagailu honetan erabiltzen den fluxu-zelda izanik, ohiko kubeta bat izan beharrean. Fluxu-zeldek 1 eta 10 µL-ko bolumena izaten dute, eta gaitasuna izan behar dute sistema kromatografikoan lortzen diren presioei eusteko (9. irudia).



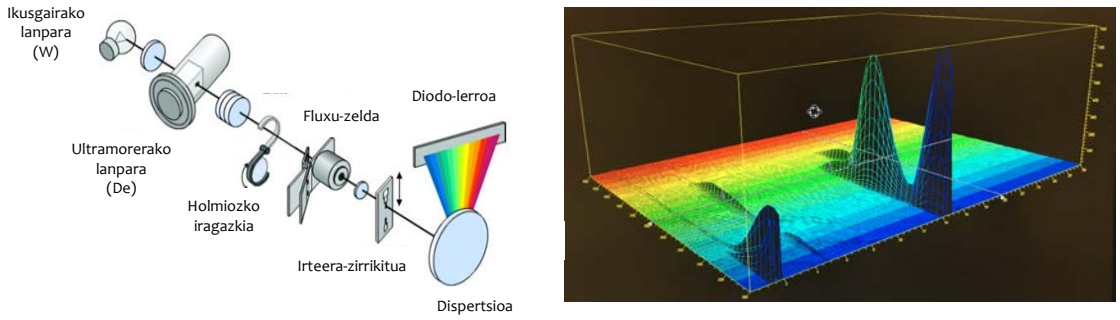
9.irudia. UV/Ik detektagailu baten fluxu-zelda.

UV detektagailu sinpleena **uhin-luzera finkoko detektagailua** da, merkuriozko lanpara bat eta hainbat iragazki dituena 254 nm-ko uhin-luzeran lan egiteko. Berez, absorbantzia soilik uhin-luzera horretan neur liteke; halere, iragazkiak aldatuz gero, beste uhin-luzera batzuetan ere egin litezke neurketak.

Uhin-luzera aldakorreko detektagailua. Seinale kromatografikoen bereizketa egokia denean, neurketa instrumentala uhin-luzera ezberdinetan egin daiteke, konposatu bakoitzari dagokion gailur kromatografikoa uhin-luzera ezberdin batean neurtuz. Horretarako, wolframiozko, hidrogenozko/deuteriozko edo xenonezko lanpara bat erabiliko da, eta baita monokromadore bat ere.

Fotodiodo-lerro detektagailuak edo DAD detektagailuak (*diode array detector*) une oro uhin-luzera guztietan lan egiten du 200-400 nm bitartean, horien hautaketarik egin beharrik izan gabe. Analito bakoitzaren datu espektral guztiak gorde egiten dira ordenagailuaren memorian, eta horiekin guztiekin hiru dimentsiotako espektroak lor daitezke, absorbantzia, denbora eta uhin-luzera diagrama berean irudikatuz (10. irudia).

Uhin-luzera guztietan absorbantzia neurtzeko gaitasuna izateagatik, konposatu bakoitzaren gailur kromatografikoa, absorbantzia maximoa lortzen den uhin-luzeran jaso daiteke, horrela, sentsibilitate maximoa lortuz. Gainera, konposatu bakoitzaren absorbantzia-espektro osoa jasotzeko aukera egongo da.



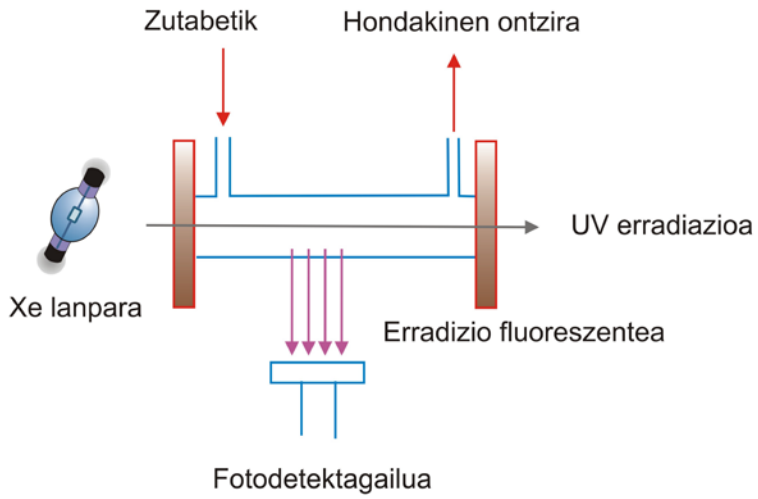
10. irudia. Fotodiodo-lerro detektagailua eta horrek emandako hiru-dimentsiotako irudikapena (https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G1315-90015_DAD-MWD-CD_USR_EN.pdf webgunean eskuragarri dagoen irudian oinarritua).

B) FLUORESZENTZIA-DETEKTAGAILUA

Sentsibilitate altuko detektagailu optikoa da. Laginean dauden analito ezberdinek igorritako energiaren neurketan oinarritzen da. Horretarako, uhin-luzera jakin bateko UV erradiazioa xurgatzeagatik kitzikatuak izan diren analitoak (kitzikapen λ) beren oinarrizko egoera energetikora itzuliko dira, 10^{-9} eta 10^{-5} segundo bitartean, erradiazio elektromagnetikoa fluoreszentzia moduan igorriz. Igorpen maximoa deneko uhin-luzera (igorpen λ) hautatuko da neurketa instrumentala egiteko. Ohikoena da espektrofluorimetroak bi monokromadore izatea: kitzikapen-monokromadorea eta igorpen-monokromadorea; eta, energia-iturri bezala, xenonezko lanpara bat.

Deuteriozko edo xenonezko argi-iturritik datorren erradiazio-banda zabaletik, uhin-luzera ia monokromatikoko banda estu bat finkatuko da (absorbantzia maximoa jasotzen deneko λ, alegia) kitzikapen-monokromadoreari esker. Behin λ finkaturik dugula, konposatu

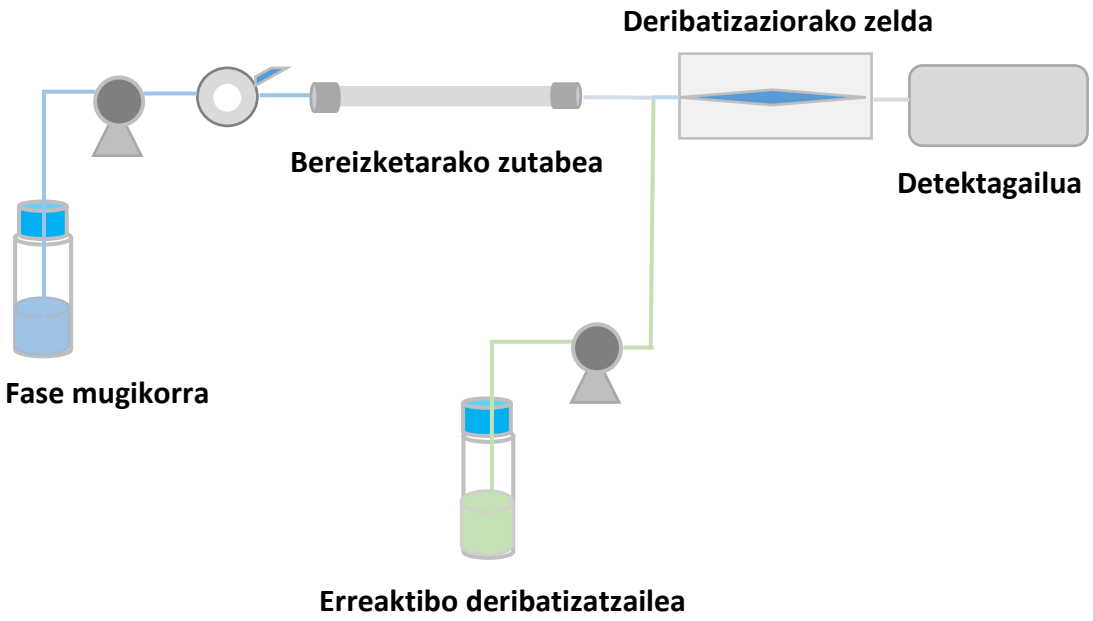
bakoitzaren igorpen λ maximoa hautatuko da, igorpen-espektro ezberdinei erreparatuta. Fluoreszentziaren neurketarako, laginaren gain jo duen argi sortarekiko perpendikularrean kokatutako detektagailu bat erabiliko da (11. irudia).



11. irudia. Fluoreszentzia detektagailuaren atal ezberdinak.

Azaldutako prozedura hau fluoreszenteak diren konposatuentzat da soilik aplikagarria. Fluoreszenteak ez diren konposatuen kasuan, deribatizazio-erreakzio bat gauzatu beharko litzateke erreaktibo fluoreszente bat erabiliz. Horrela, eratutako produktuak fluoreszentzia aurkeztuko luke. Deribatizazio-erreakzioa bereizketa kromatografikoaren aurretik (deribatizazio ez-jarraitua edo zutabearen aurretiko deribatizazioa) edo bereizketaren ostean gauzatu daiteke, zutabetik atera eta detektagailura iritsi aurretik. Bigarren kasu horretan, 12. irudian adierazten den prozedura jarraitu beharko litzateke.

Deribatizazio ez-jarraituaren erreakzioaren ondorioz, analitoak tamaina handiko konposatuekin erreakzionatzen dute produktu fluoreszente bat emateko. Hori dela eta, analitoen ezaugarri fisiko-kimikoak aldatzen dira, beren arteko ezberdintasunak txikituz eta, ondorioz, bereizketa kromatografikoari negatiboki eraginez, erresoluzio kaskarragoak lortuz. Zutabearen osteko deribatizazioetan, ordea, halakorik ez da gertatuko, deribatizazioa konposatuak zutabetik irtetzean suertatzen baita. Kasu horretan, konposatuen bereizketarako erabiltzen diren baldintza esperimentalak (pH-a, indar ionikoa…) deribatizazio-erreakzioan erabilitako baldintzen oso ezberdinak izan daitezke, eta, horregatik, bereizketarako eta deribatizaziorako egokiak diren baldintzak hautatu beharko dira.



12. irudia. Fluoreszentziaren detekziorako egiten den zutabearen osteko deribatizazioa.

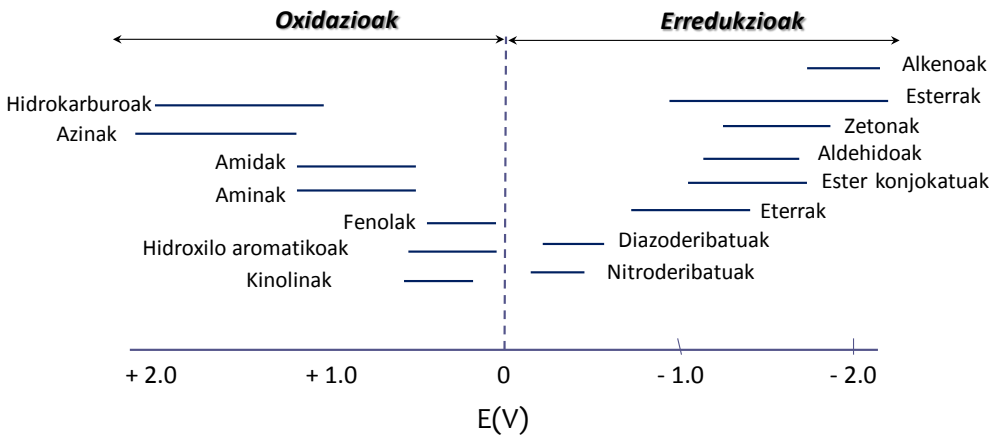
D) DETEKTAGAILU ELEKTROKIMIKOA

Detektagailu horrek beste batzuek baino sentsibilitate, espezifitate eta aplikagarritasun zabalagoak ditu. Elektrodo baten gainazalean oxidatu edo erreduzitu daitekeen edozein substantzia elektrokimikoki determinatua izan daiteke, fenolak, amina aromatikoak, peroxidoak, zetonak, aldehidoak eta nitroderibatuak, esaterako (13. irudia). Teknika elektrokimiko erabilienak anperometria, voltamperometria eta culonbimetria dira.

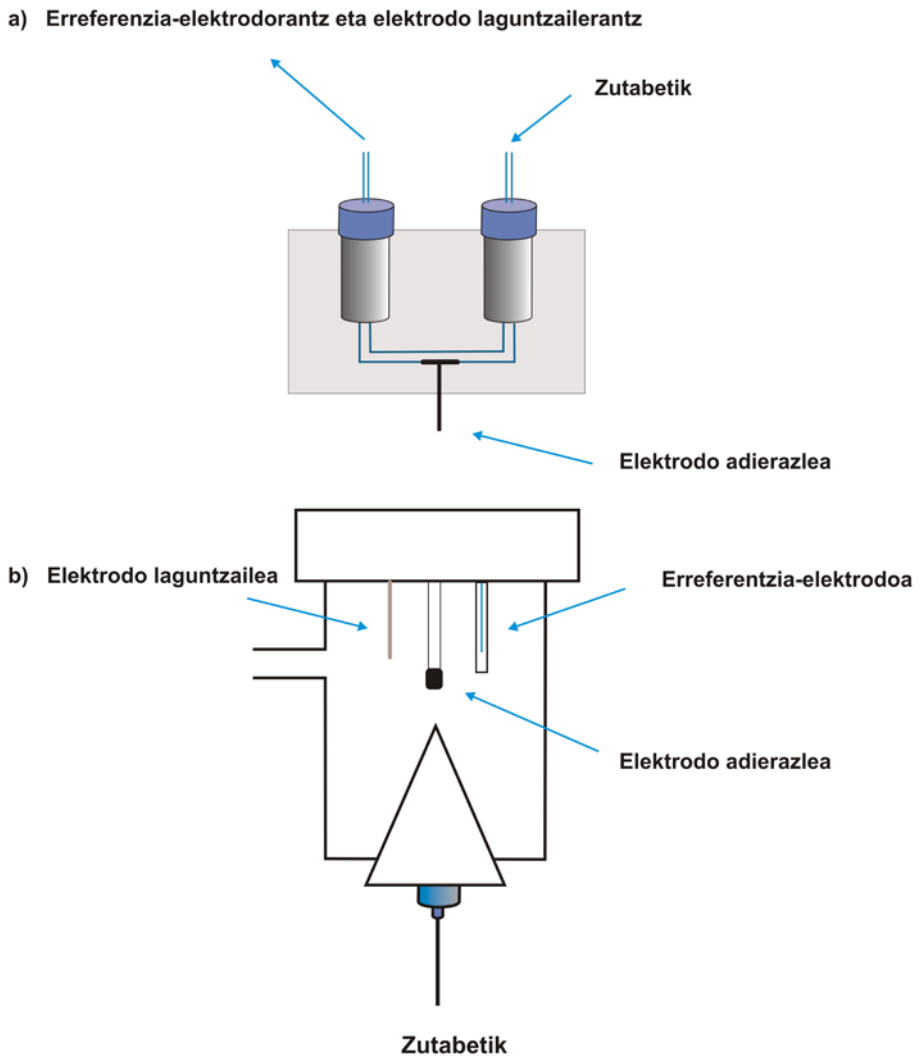
Detektagailu elektrokimiko batean dagoen zeldak hiru elektrodo izaten ditu: lanerako elektrodoa edo elektrodo adierazlea, erreferentzia-elektrodoa eta elektrodo laguntzailea. Zeldaren diseinua bi eratakoa izan daiteke (14. irudia); horietako batean, fase mugikorraren fluxua elektrodoaren gainazalarekiko paraleloa izaten da (*thin layer* zelda); bestean, ordea, fluxua perpendikularra da elektrodoaren gainazalarekiko (*wall-jet* zelda).

Detekzio voltanperometriko eta anperometrikoetan gehien erabiltzen diren elektrodoak honako hauek dira:

- Erreferentzia-elektrodoa: ia beti Ag/AgCl elektrodoa edo kalomel elektrodoa.
- Laguntzailea: Pt edo karbono beiratuzko elektrodoa.
- Lanerako elektrodoa: Hg-zkoa, erredukzioetarako batez ere; karbonoa, ordea, oxidazio-prozesuetarako (C pasta, C beiratua, grafito pirolitikoa edo karbono-zuntzezkoa).



13. irudia. Detektagailu elektrokimikoan oxidatu edo erreduzitu daitezkeen talde funtzionalak eta oxidazio/erredukzio potentzialak.



14. irudia. Detekzio elektrokimikorako zeldak: a) thin-layer eta b) wall-jet.

2.3 LIKIDO-KROMATOGRAFIAZKO PRAKTIKAK

PARAZETAMOLAREN ETA AZIDO AZETILSALIZILIKOAREN DETERMINAZIOA, LIKIDO-KROMATOGRAFIA ETA DIODE ARRAY DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Azido azetilsalizilikoa eta parazetamola gaur egun merkatuan dauden sendagai askoren osagai aktiboak dira. Azido azetilsalizilikoa antipiretikoa, analgesikoa eta hantura-kontrako farmakoa da; parazetamola, aldiz, antipiretikoa eta analgesikoa soilik.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean parazetamol eta azido azetilsalizilikoaren determinazio kuantitatiboa egitea, likido-kromatografiari akoplatutako *diode array* detektagailua (DAD) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Likido-kromatografoa eta *diode array* detektagailua (LC-DAD)
Zutabe kromatografikoa: C18 (15x0.4 cm, 5 µm)
Aurrezutabea: C18 (1x0,4 cm)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
Motrailua
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola
Azido azetikoa
Parazetamol eta azido azetilsaliziliko patroi solidoak

Prestakin farmazeutikoak: parazetamol (600 mg) konprimatuak, azido azetilsaliziliko (500 mg) konprimatuak.

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Konprimatu bat pisatu eta almaizean txikitu ondoren, metanoletan disolbatuko da 15 minutuz irabiatuz. Ondoren, suspentsioan dauden partikulak baztertzeko disoluzioa iragaziko da, eta metanolarekin 50 mL-ra eramango da. Laborategiaren espezifikazio farmazeutikoak eta kalibrazioaren kontzentrazio-tarte aplikagarria kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatuko da. Ondoren, disoluzioaren 20 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Parazetamolaren eta azido azetilsalizilikoaren bereizketa kromatografikoa egiteko, C18 (15x0.4 cm, 5 µm) zutabe kromatografikoa eta ezaugarri berdinak dituen aurrezutabea erabiliko dira. Fase mugikorra azido azetiko 0,01 M:metanol (60:40) nahasketa izango da. Fase mugikorraren fluxua 1 mL/min izango da, eta sistema kromatografikoan 20 µl injektatuko dira. Absorbantziaren neurketa 280 nm-tan egingo da.

c) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako, kanpo-kalibrazioa erabiliko da. Lehendabizi, parazetamol eta azido azetilsaliziliko 1000 mg/L hasierako bi disoluzio prestatuko dira metanolean. Ondoren, bi disoluzio horietatik abiatuta, parazetamola eta azido azetilsalizilikoa dituzten 2 eta 50 mg/L bitarteko bost disoluzio estandar prestatuko dira, horiek ere metanolean. Disoluzio estandar bakoitza prestatu ostean, neurketa analitikoa gauzatuko da LC-DAD erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren eta parazetamolaren edo azido azetilsalizilikoaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz, hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen parazetamol edo azido azetilsaliziliko kantitatea kalkulatuko da.

ZITALOPRAMAREN DETERMINAZIOA LIKIDO-KROMATOGRAFIA ETA DIODE ARRAY DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Zitalopram Serotoninaren Birkaptazioaren Inhibitzaile Selektiboa (SBIS) da, eta depresioaren, antsietatearen eta nahasmendu obsesibo-konpultsiboaren tratamenduan erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean zitalopramaren determinazio kuantitatiboa egitea, likido kromatografiari akoplatutako *diode array* detektagailua (DAD) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Likido-kromatografia - *diode array* detektagailua (LC-DAD)
Zutabe kromatografikoa: Extrasyl ODS2 (15x0.4 cm, 5 µm)
Aurrezutabea: C18 (1x0,4 cm)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
Motrailua
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola.
Tetrametilamonio kloruroa
Zitalopram patroi solidoa
Prestakin farmazeutikoak: escitalopram (10mg) konprimatuak

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Konprimatu bat pisatu eta almaizean txikitu ondoren, metanoletan disolbatuko da 15 minutuz irabiatuz. Ondoren, suspentsioan dauden partikulak baztertzeko disoluzioa iragaziko da, eta urarekin 50 mL-ra eramango da. Laborategiaren espezifikazio farmazeutikoak eta kalibrazioaren kontzentrazio-tarte aplikagarria kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatuko da. Ondoren, disoluzioaren 20 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa egiteko, Extrasyl ODS2 (15x0,4 cm, 5 µm) zutabe kromatografikoa eta ezaugarri berdinak dituen aurrezutabea erabiliko dira. Fase mugikorra tetrametilamonio kloruroa %0,4:azetonitriloa (60:40) nahasketa izango da. Fase mugikorraren fluxua 1 mL/min izango da, eta sistema kromatografikoan 20 µl injektatuko dira. Absorbantziaren neurketa 240 nm-tan egingo da.

c) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako kanpo-kalibrazioa erabiliko da. Lehendabizi, zitalopram 1000 mg/L hasierako disoluzioa prestatuko da metanolean. Ondoren, disoluzio horretatik abiatuta, zitaloprama 2 eta 50 mg/L bitarteko bost disoluzio estandar prestatuko dira ur desionizatutan. Disoluzio estandar bakoitza prestatu ostean, neurketa analitikoa gauzatuko da LC-DAD erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren eta zitalopramaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen zitalopram kantitatea kalkulatuko da.

DIKLOFENAKOAREN DETERMINAZIOA, LIKIDO-KROMATOGRAFIA ETA *DIODE ARRAY* DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Diklofenakoa azido fenilazetikoaren eratorkina den antiinflamatorio ez-esteroideoa (AIEE) da. Antiinflamatorio ez-esteroideo gehienek ziklooxigenasa-1 (COX-1) eta ziklooxigenasa-2 (COX-2) inhibitzen dituzte, prostaglandina eta tronboxanoen sintesia oztopatuz. Hortaz, hantura, sukarra eta mina tratatzeko erabiltzen dira.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean diklofenakoaren determinazio kuantitatiboa egitea likido-kromatografiari akoplatutako *diode array* detektagailua (DAD) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Likido-kromatografia - *diode array* detektagailua (LC-DAD)
Zutabe kromatografikoa: C18 (15x0.4 cm, 5 µm)
Aurrezutabea: C18 (1x0,4 cm)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
Motrailua
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen azetonitriloa.
Sodio dihidrogenofosfatoa
Diklofenako patroi solidoa
Ibuprofeno patroi solidoa (barne-estandarra)
Prestakin farmazeutikoak: diclofenaco (50mg) konprimatuak

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Konprimatu bat pisatu eta motrailuan txikitu ondoren, metanoletan disolbatuko da 15 minutuz irabiatuz. Ondoren, suspentsioan dauden partikulak baztertzeko disoluzioa iragaziko da, eta urarekin 10 mL-ra eramango da. Laborategiaren espezifikazio farmazeutikoak eta kalibrazioaren kontzentrazio-tarte aplikagarria kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatuko da fase mugikorrean. Disoluzio horrek ibuprofeno barne-estandarra 2,5 mg/L-ko kontzentrazioan izan beharko du. Ondoren, disoluzioaren 20 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa egiteko, C18 (15x0,4 cm, 5 µm) zutabe kromatografikoa eta ezaugarri berdinak dituen aurrezutabea erabiliko dira. Fase mugikorra acetonitrilo:NaH_2PO_4 0,01 M disoluzioa (pH=2,5, azido fosforikoarekin doitua) (60:40) nahasketa izango da. Fase mugikorraren fluxua 1 mL/min izango da, eta sistema kromatografikoan 20 µl injektatuko dira. Absorbantziaren neurketa 254 nm-tan egingo da.

c) Kalibrazioa. Kuantifikaziorako barne-estandarraren metodoa erabiliko da. Lehendabizi, diklofenako 1000 mg/L hasierako disoluzioa prestatuko da metanolean. Ondoren, disoluzio horretatik abiatuta, diklofenakoa duten eta 2 eta 20 mg/L bitartean dauden bost disoluzio estandar prestatuko dira ur desionizatutan. Disoluzio estandar bakoitzak ibuprofeno barne-estandarra 2,5 mg/L-ko kontzentrazioan izan beharko du. Disoluzio estandar guztiak prestatu ondoren, neurketa analitikoa gauzatuko da LC-DAD erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, diklofenakoaren eta ibuprofenoaren seinale instrumentalen zatiketa eta diklofenakoaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginaren analisian diklofenakoak eta ibuprofenoak emandako seinaleen intentsitateak eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen diklofenako kantitatea kalkulatuko da.

FUROSEMIDAREN DETERMINAZIOA, LIKIDO-KROMATOGRAFIA ETA FLUORESZENTZIA-DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Furosemida sulfonamiden taldeko diuretikoa da. Kloruro ioiaren birxurgapena inhibitzen du Henle-ren lakioaren goranzko hodian. Hipertentsio, edema edo gutxiegitasun kardiakoaren tratamenduan erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean furosemidaren determinazio kuantitatiboa egitea, likido-kromatografiari akoplatutako fluoreszentzia-detektagailua (FLD) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Likido-kromatografoa eta fluoreszentzia-detektagailua (LC-FLD)
Zutabe kromatografikoa: C18 (15x0,4 cm, 5 µm)
Aurrezutabea: C18 (1x0,4 cm)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
Motrailua
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen azetonitriloa
Sodio dihidrogenofosfatoa
Azido fosforikoa
Furosemida patroi solidoa
Imipramina patroi solidoa (barne-estandarra)
Prestakin farmazeutikoak: Furosemida Alter (40mg) konprimatuak

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Konprimatu bat pisatu eta almaizean txikitu ondoren, metanoletan disolbatuko da 15 minutuz irabiatuz. Ondoren, suspentsioan dauden partikulak baztertzeko, disoluzioa iragaziko da eta urarekin 10 mL-ra eramango da. Laborategiaren espezifikazio farmazeutikoak eta kalibrazioaren kontzentrazio-tarte aplikagarria kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatuko da fase mugikorrean. Disoluzio horrek imipramina barne-estandarra 2,5 mg/L-ko kontzentrazioan izan beharko du. Ondoren, disoluzioaren 20 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa egiteko C18 (15x0,4 cm, 5 µm) zutabe kromatografikoa eta ezaugarri berdinak dituen aurrezutabea erabiliko dira. Fase mugikorra metanola:azido perkloriko 0,1 M eta trietilamina 0,02 M den disoluzioaren (30:70) nahasketa izango da. Fase mugikorraren fluxua 1 mL/min izango da, eta sistema kromatografikoan 20 µl injektatuko dira. Eszitazio eta emisiorako uhin-luzerak 300 nm eta 450 nm izango dira, hurrenez hurren.

c) Kalibrazioa. Kuantifikaziorako barne-estandarraren metodoa erabiliko da. Lehendabizi, furosemida 100 mg/L hasierako disoluzioa prestatuko da metanolean. Ondoren, disoluzio horretatik abiatuta, furosemida 0,05 eta 10 mg/L bitarteko bost disoluzio estandar prestatuko dira ur desionizatuan. Disoluzio estandar bakoitzak imipramina barne-estandarra 2,5 mg/L-ko kontzentrazioan izan beharko du. Disoluzio estandar bakoitza prestatu ostean, neurketa analitikoa gauzatuko da LC-FLD erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, furosemidaren eta imipraminaren seinale instrumentalen zatiketaren eta furosemidaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz, hain zuzen ere. Ostean, laginaren analisian furosemidak eta imipraminak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen furosemida kantitatea kalkulatuko da.

NORFLOXAZINOAREN DETERMINAZIOA, LIKIDO-KROMATOGRAFIA ETA FLUORESZENTZIA-DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Norfloxazinoa kinolonen taldeko antibiotikoa da, eta gernubidearen infekzioen tratamenduan erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean norfloxazinoaren determinazio kuantitatiboa egitea, likido kromatografiari akoplatutako fluoreszentzia-detektagailua (FLD) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Likido-kromatografia - fluoreszentzia-detektagailua (LC-FLD)
Zutabe kromatografikoa: C18 (15x0,4 cm, 5 µm)
Aurrezutabea: C18 (1x0,4 cm)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
Motrailua
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola
Azido perklorikoa
Trietilamina
Norfloxazino patroi solidoa
Prestakin farmazeutikoak: norfloxazino (400 mg) konprimatuak

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Konprimatu bat pisatu eta almaizean txikitu ondoren, metanoletan disolbatuko da 15 minutuz irabiatuz. Ondoren, suspentsioan dauden partikulak baztertzeko disoluzioa iragazi beharko da, eta urarekin 100 mL-ra eramango da. Laborategiaren espezifikazio farmazeutikoak eta kalibrazioaren kontzentrazio-tarte aplikagarria kontuan izanik, disoluzio horren diluzio egokia prestatuko da fase mugikorrean. Ondoren, disoluzioaren 20 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa egiteko, C18 (15x0,4 cm, 5 µm) zutabe kromatografikoa eta ezaugarri berdinak dituen aurrezutabea erabiliko dira. Fase mugikorra azetonitriloa:NaH_2PO_4 0,005 M disoluzioa (pH=3, azido fosforikoarekin doitua) (70:30) nahasketa izango da. Fase mugikorraren fluxua 1 mL/min izango da, eta sistema kromatografikoan 20 µl injektatuko dira. Eszitazio eta emisiorako uhin-luzerak 270 nm eta 440 nm izango dira, hurrenez hurren.

c) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako kanpo-kalibrazioa erabiliko da. Lehendabizi, norfloxazino 100 mg/L hasierako disoluzioa prestatuko da uretan. Ondoren, disoluzio horretatik abiatuta, norfloxazino 0,05 eta 25 mg/L bitarteko bost disoluzio estandar prestatuko dira ur desionizatuan. Disoluzio estandar bakoitza prestatu ostean, neurketa analitikoa gauzatuko da LC-FLD erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren eta norfloxazinoaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz, hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako seinalearen intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen norfloxazino kantitatea kalkulatuko da.

3. GAS-KROMATOGRAFIA

Gas-kromatografia (GK) da erraz lurruntzen diren eta termikoki egonkorrak diren konposatuen bereizketarako erabiltzen den teknika. Lurrundutako konposatuak zutabe kromatografikoan injektatzen dira, geldoa den gas garraiatzaile bat fase mugikorra izanik. Gas horrek ez du elkarrekintzarik izango nahasketaren konposatu ezberdinekin, horien garraioan parte hartuz soilik. Hori dela-eta, konposatuen abiadura fase mugikorraren izaerarekiko independentea izango da zutabean zehar.

Fase geldikorra solido bat (gas-solido kromatografia) izan daiteke, analitoen atxikipena konposatu bakoitzaren adsortzio-afinitatearen arabera suertatuz. Solidoa ez ezik, fase geldikorra irakite-puntu altuko likido bat ere izan daiteke, zutabearen barneko paretei kobalenteki loturik dagoena, geruza mehe bat osatuz (banaketa-kromatografia). Kromatografia mota horretan, irakite-puntuaren arabera eta analitoek fase geldikorrarekin dituztenen elkarrekintzen indarren arabera gertatuko da konposatuen bereizketa. Horren harira, konposatu ezberdinen eluzio-ordena irakite-puntuen menpekoa dela ondoriozta daiteke; hala ere, irakite-puntu antzekoa duten bi konposaturen arteko bereizketa fase geldikorrean duten disolbagarritasunaren arabera gertatuko da.

3.1 INSTRUMENTAZIOA

Gas-kromatografo batean elkarri lotuta dauden modulu ezberdinak aurki ditzakegu, eta horien funtzioen artean honako hauek daude: gas-garraiatzailearen fluxu konstante bat lortzea, lurrunen edo likidoen injekzioa ahalbidetzea, zutabea tenperatura apropos batean mantentzea, nahasketan dauden konposatuen detekzioa egitea, eta neurgarria den seinale bat ematea.

3.1.1 GAS-GARRAIATZAILEA

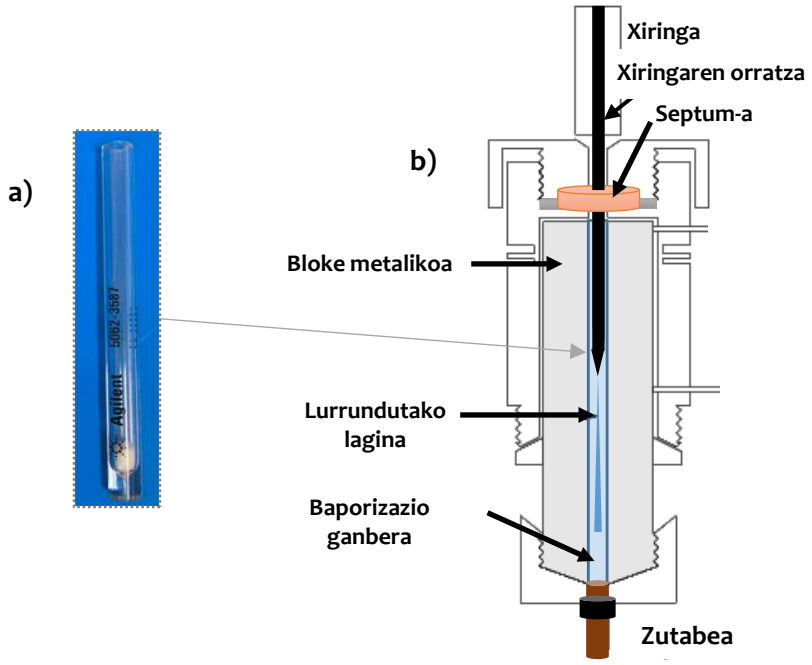
Gas-kromatografian, fase mugikor bezala, geldoa den gas bat erabiltzen da, purutasun altuko (>%99,999) helioa, argona edo nitrogenoa esaterako, ohikoena helioa izanik. Gas-garraiatzailea presio altuko botiletan saltzen da, gasaren irteera-fluxua bi manometrorekin kontrolatuz: lehenengoak botilaren barne-presioa erregulatuko du, eta bigarrenak, aldiz,

zutabera bideratzen den gas-garraiatzailearen presioa. Hala eta guztiz ere, manometro horiek ez dute gas-fluxua erabateko zehaztasunez kontrolatzen; horregatik, presio-erregulatzaileak ere erabiltzen dira sistema kromatografikoan, gas-garraiatzailearen fluxu konstante bat ziurtatzeko. Kontrol horrek berebiziko garrantzia du zutabearen eraginkortasunean eta baita konposatu kimikoen atxikipen-denboran ere.

Nahiz eta purutasun altuko gasa izan, gas-garraiatzaileak ezpurutasunak ere izan ditzake; oxigenoa, ura edo hidrokarburoak, esaterako. Horregatik, zutabean sartu aurretik, gas-garraiatzailea iragazki edo tranpa ezberdinetatik pasaraziko da, ezpurutasun horiek atxiki ditzaten.

3.1.2 LAGIN LIKIDOAK INJEKTATZEKO SISTEMA

Lagin likidoak gas-kromatografoan sartzen direnean, 1 μL-tik beherako bolumena izaten dute. Horretarako erabiliko den teknikak ziurtatu beharko du bolumen guztia zutabearen burura banda mehe bezala iritsiko dela, laginaren kutsadurarik edota galerarik egon gabe. Injekzio erarik arruntena injekzio zuzena da, non lagina xiringa baten bidez injektore batean sartzen baita. Injekziorako, xiringaren orratzak silikonazko mintz bat (*septum* bezala ezagutzen dena) zulatuko du, eta, jarraian, enboloa zanpatuko da xiringaren edukia beirazko hodi baten (*liner*) barnean husteko. Hodi hori inguratuz beroa aplikatzen duen bloke metaliko bat dago, lagina bat-batean lurrunaraziko duena ostean gas-garraiatzaileak zutabearen burura mugi dezan. Termostatizaturik dagoen blokeak tenperatura aski altuak aplikatuko ditu laginaren bat-bateko lurrunketa gerta dadin. Normalean, lurrunkortasun baxueneko konposatuaren irakite-tenperatura baino 50°C altuagoak diren tenperaturak aplikatuko dira (15. irudia).



15. irudia. (a) *Liner*-a eta (b) injektorearen irudiak gas-kromatografian.

Gas-kromatografian µL inguruko bolumenekin lan egiten bada ere, zutabe kapilarrekin lan egitean, injektatutako laginaren bolumena txikitu behar izaten da zutabearen saturazioa saihesteko. Era zehatz batean 0,1 µL-tik beherako bolumenak har ditzakeen xiringarik existitzen ez denez, injektoreek lurrundutako lagin totalaren atal bat zutaberantz bideratzeko gai izan behar dira, gainerako guztia sistematik kanporatuz.

A) INJEKZIOA FLUXUAREN ZATIKETA EGINIK. INJEKZIOA *SPLIT* ERAN.

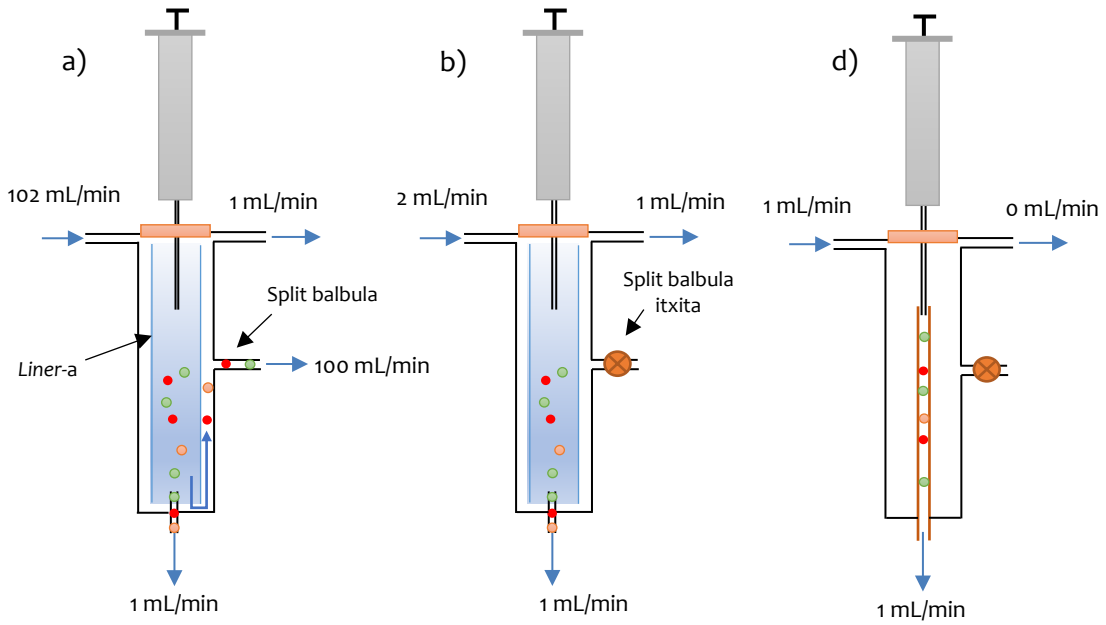
Kasu honetan, injektoretik pasatzen den gas-garraiatzailearen fluxua bitan banatzen da; bietako atal bat zutabean sartuko da eta bestea sistematik kanporatu egingo da (15. irudia). Zatiketa-erlazioa enpirikoki determinatuko da, gailur kromatografikoaren itxuraren eta metodoaren sentsibilitatearen artean konpromiso bat lortu arte. Zutabean sartutako laginaren konposaketa hasieran zegoenaren guztiz berdina ez izatea da injekzio modu honen desabantaila bat. Gainera, modu hori ez da aztarna-mailan analisiak egiteko aproposa izaten.

B) FLUXUAREN ZATIKETARIK GABEKO INJEKZIOA. INJEKZIOA *SPLITLESS* ERAN.

Teknika honetan, *liner*ean lurrundutako lagin guztia zutabe kromatografikora bideratzen da, osagai lurrunkorrenaren irakite-puntutik beheragoko tenperaturan mantenduko dena, analito ezberdinak zutabearen buruan kondentsa daitezen (16c.irudia.). Denbora jakin bat igaro ostean, injektorearen balbula bat zabalduko da lurrundutako disolbatzailea sistematik kanporatzeko. Azkenik, bereizketa kromatografikoari ekingo zaio, dagokion tenperatura-programa labean aplikatuz. Injekzio modu horretan, laginaren zatiketarik ez dagoenez, sentsibilitatea hobetzen da, analisi kimikoak aztarna-mailan egitea ahalbidetzen delarik.

D) INJEKZIOA ZUTABEAN ZUZENEAN. *ON-COLUMN* INJEKZIOA

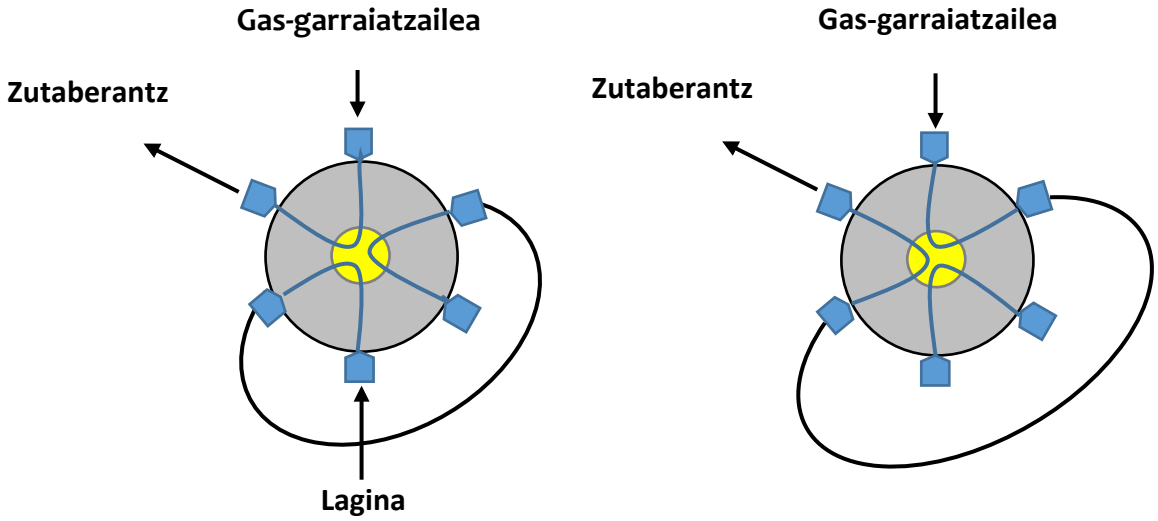
Irakite-tenperaturatik gora deskonposatzen diren konposatuen bereizketarako erabiltzen den injekzio modua da, zutabe kromatografikoan zuzenean injekzioa egiten delarik, baporizazio-ganbera batean egin beharrean. Injekzio modu honek lurrunketarako tenperatura baxuagoak erabiltzen uzten du *split/splitless* injekzioak baino.



16. irudia. Lagin likidoen injekzio moduak zutabe kapilarretan. a) Fluxuaren zatiketa eginik, b) fluxuaren zatiketarik gabe, eta d) zutabean zuzenean.

3.1.3 GAS-LAGINAK INJEKTATZEKO SISTEMA

Lagin likidoak ez bezala, gas-laginak prestaketarik egin gabe injekta daitezke kromatografia-sisteman. Horien injekziorako, balbula birakariak eta bolumen ezaguneko begiztak erabiltzen dira, 0,1 eta 10 mL bitartekoak, alegia. Gainera, injekzio-sistema horren diseinuari esker, balbula birakaria karga-posiziotik injekzio-posiziora aldatzean egon litezkeen presio-aldaketak minimoak izaten dira (17. irudia).



17. irudia. Gas-laginen injekzioa sei bidetako balbulak erabiliz. A) karga-posizioa eta b) injekzio-posizioa.

A) ESKUZKO INJEKZIOA, GASEN XIRINGA BAT ERABILIZ

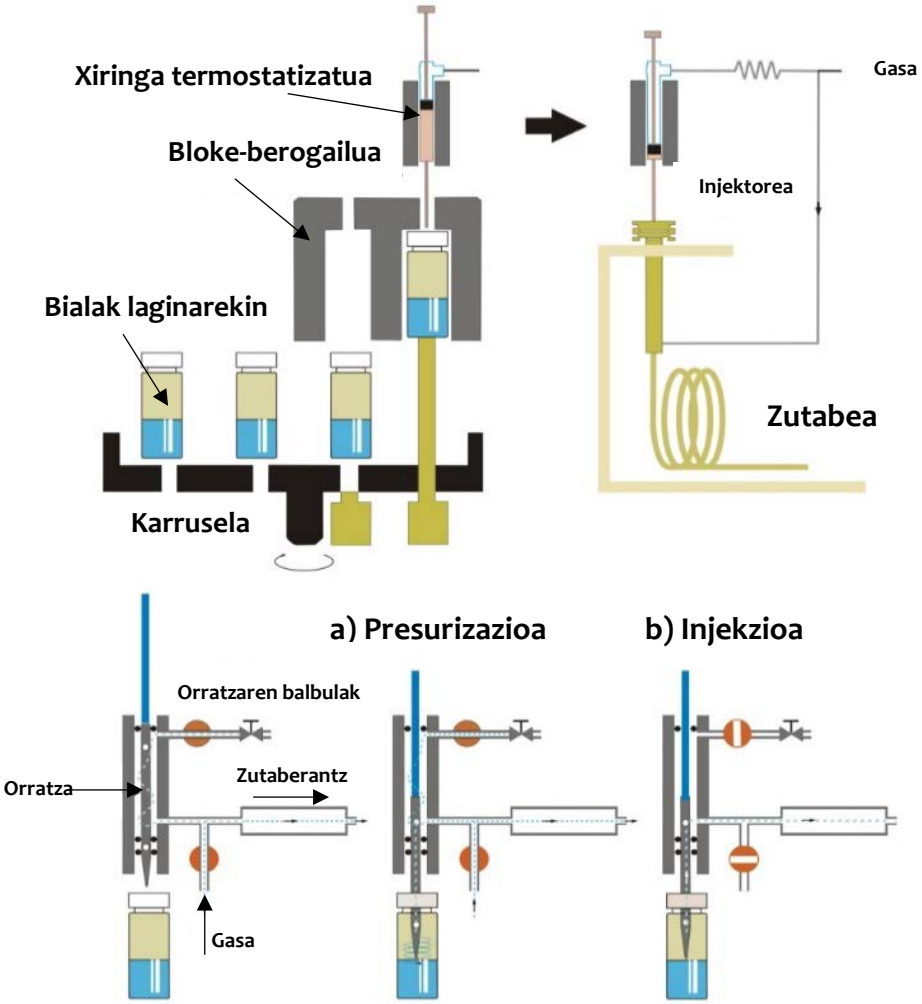
Gasen xiringak balbula bat izaten du, lagin-bolumen jakin bat hartu ostean itxi daitekeena. Orratza injektorean sartuko da *septuma* zulatuz, eta ondoren balbula hori irekiko da xiringaren edukia sisteman sar dadin. Kondentsazioak saihesteko, xiringaren tenperaturak gas-lagina duen ontziarena baino altuagoa edo, asko jota, horren berdina izan beharko luke (18. irudia).

18. irudia. Gasen eskuzko injekziorako xiringa.

B) INJEKZIOA BURUGUNEAN

Ontzi itxi batean lagin likidoarekin kontaktuan dagoen gasari *burugune* deritzo, eta sistemaren tenperatura kontrolaturik egon beharko da injekzio modu hori aurrera eramateko. Buruguneko injekzioa lagin solidoekin eta likidoekin egin daiteke, baina, beti ere, analitoen kontzentrazioa gas fasean nahikoa izateko, distribuzio-koefiziente nahiko altuak beharko dira. Laginaren prestaketa-prozeduraren beharrik ez da egongo, eta lortuko den kromatograman ez dugu disolbatzaileari dagokion gailur kromatografikorik ikusiko. Lagina burugunetik hartuko da termostatizaturiko xiringa bat erabiliz, eta jarraian injekzio-sisteman sartuko da (19. irudia).

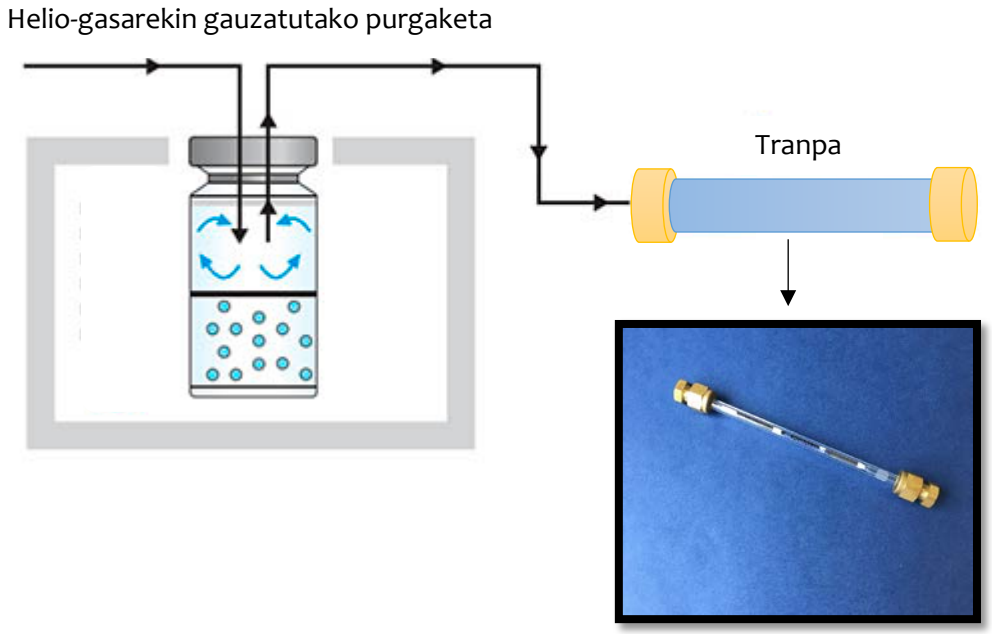
Injekzioa modu dinamikoan egiten denean, buru-gunean dauden konposatuak gas garraiatzaileak arrastatuko ditu eta, ostean, tranpa hotz batean metatuko dira (tranpa kriogenikoa). Jarraian, metatutako konposatuak termikoki desorbatuko dira zutabearen buruan sartuz.



19. irudia. Buruguneko injekziorako sistema.

D) PURGAKETA ETA TRANPA BIDEZKO INJEKZIOA

Lagin solido edo likido batean dauden konposatu lurrunkorrak gas geldo baten korronte bati esker (helioa edo nitrogenoa) arrastatuko dira, ondoren adsorbatzaile batean (tranpa izenekoa) metatuz. Tranpak konposatu jakin batzuk espezifikoki atxikitzeko gaitasuna erakutsiko du; horretarako, adsorbatzaile ezberdinak jarriko dira bertan, atxikipen-indarraren arabera ordena gorakorra izanik (20. irudia). Jarraian, tranpak desortzio termiko bidezko injekzio-prozesu bat jasango du, fokatze kriogenikoa erabiliz.

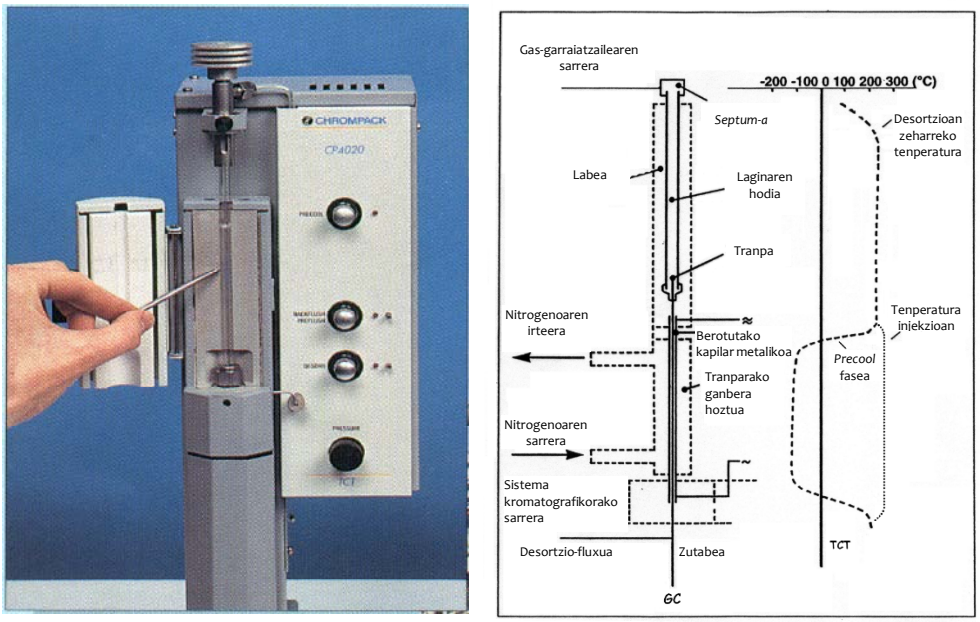


20. irudia. Purga eta tranpa bidezko injekzio-sistema. Adsorbatzaile ezberdinak dituen tranpa baten argazkia.

E) DESORTZIO TERMIKO BIDEZKO INJEKZIOA, FOKATZE KRIOGENIKOA ERABILIZ

Desortzio termikoa ohiko laginaren prestaketa-prozeduren ordezko bat da. Lagin solidoentzat erabil daiteke, edota likido edo gasetan dauden analitoentzat, betiere lehendabizi adsorbatzaile solido espezifikoetan atxikitzen badira.

Laginaren kontrolpeko beroketan oinarritutako prozedura bat da, gas-garraiatzaile baten korronte bat aplikatzen den bitartean. Horri esker, laginetako konposatuak lurrundu eta kriogenikoki hoztuta dagoen tranpa solido batera bideratuko dira, bertako adsorbatzaileetan atxikiz. Ondoren, tranpa hori bat-batean berotu eta analitoen desortzioa gertatuko da, analito ezberdinak sistema kromatografikoan barneratuz.



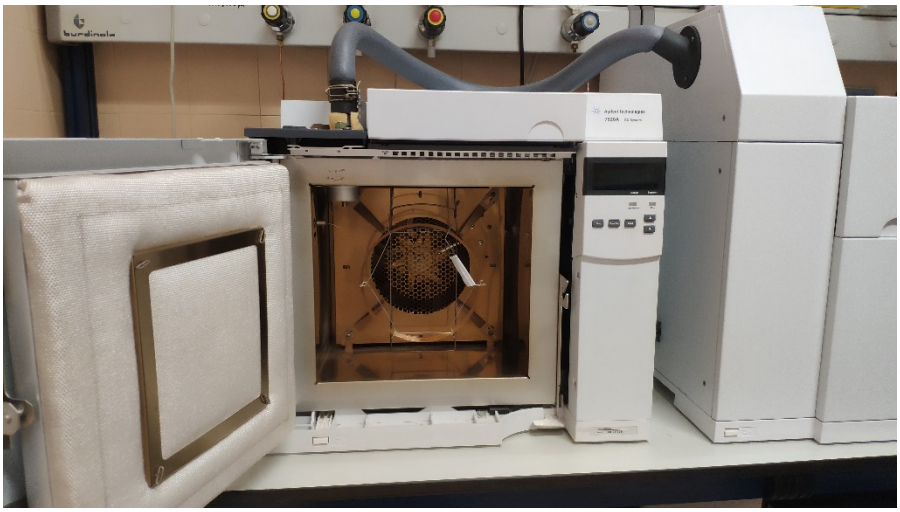
21. irudia. Desortzio termiko bidezko injekzioa, fokatze kriogenikoa erabiliz.

3.1.4 KROMATOGRAFOAREN LABEA

Labearen helburua da zutabea termostatizaturik mantentzea, bereizketa kromatografikoan zehar tenperaturaren kontrola izanik, hori konstante mantenduz edo aldatuz. Zutabea labearen barnealdean kokaturik egoten da, paretak ukitu gabe, sarrera injektoreari lotua dagoelarik eta irteera detektagailuari (22. irudia).

Bereizketa kromatografikoan zehar tenperatura konstante mantentzen bada, prozesu kromatografikoa era isotermoan egin dela esaten da. Modu isotermoa polaritate oso antzekoak dituzten konposatuen bereizketarako erabiltzen da. Polaritate ezberdinak dituzten konposatuen bereizketarako, ordea, tenperatura-programak erabiltzen dira, tenperatura-gradienteak aplikatzen dituztenak. Prozesu kromatografikoaren hasieran tenperatura baxua aplikatzen da, analitoak zutabearen buruan kondentsa daitezen injekzioaren ostean. Jarraian tenperatura igo egiten da, era konstantean, nahi den tenperatura maximora iritsi arte. Horri *tenperatura-malda* deritzo eta labea programatu egin daiteke, *tenperatura-malda* bakarrarekin edo hainbat maldarekin, nahi den tenperatura maximoa erdiesteko. Tenperatura-gradienteak erabiltzean, gailur kromatografikoen zabalera txikitzen da detekzio-mugak hobetuz. Gehienetan malda anitzeko tenperatura-programak erabiltzen dira, horietako bakoitzean tenperatura-gradiente ezberdinak erabiliz, tenperaturen goranzko abiadura ezberdinak erabiliz, alegia. Malda edo gorakada ezberdinen

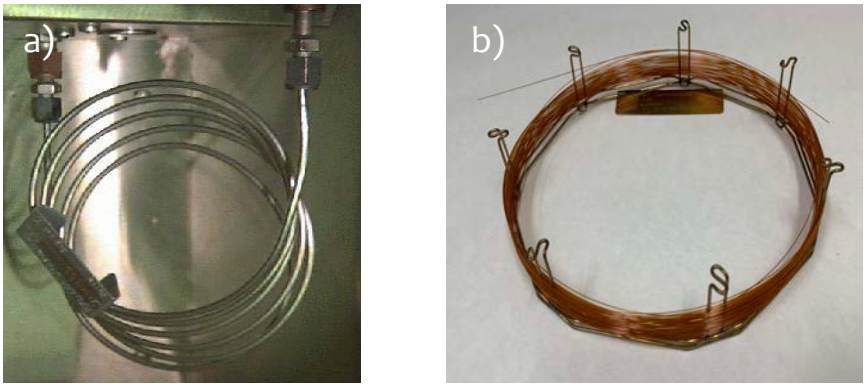
artean tenperatura konstante mantendu daiteke, gailur kromatografikoen gainezartzeak saihesteko.



22. irudia. Tenperaturaren kontrola gas-kromatografo batean.

3.1.5 ZUTABEA

Zutabe kromatografikoa sistemaren atal garrantzitsuena da, eta bertan fase geldikorra dago lagineko osagai ezberdinen bereizketa gauzatzeko. Zutabearen aukeraketa txar batek, hondaturik dagoen zutabe batek edota lanerako baldintza desegokiek ez lukete utziko emaitza kromatografiko onik lortzen. Bi zutabe mota nagusi daude: zutabe paketatuak eta zutabe kapilarrak (23. irudia).



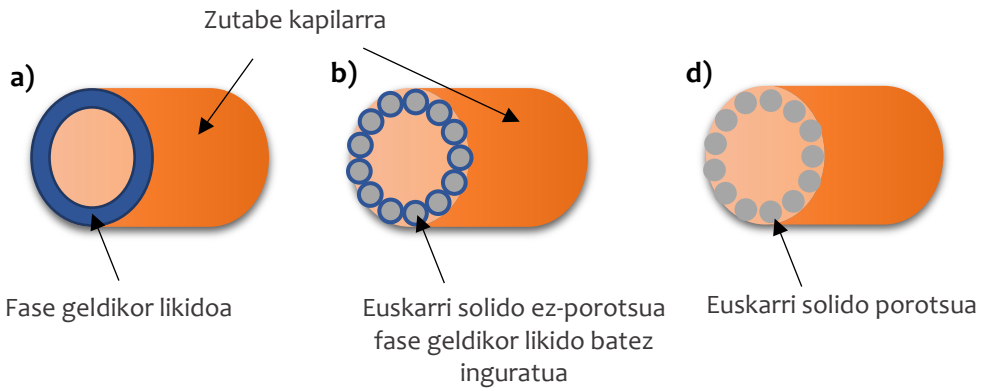
23. irudia. Zutabe kromatografiko a) paketatuak eta b) kapilarrak (a irudia https://www.indiamart.com/proddetail/gc-packed-column-5736591173.html webgunetik eskuratua).

A) ZUTABE PAKETATUAK

Altzairu herdoilgaitzez eginiko hodiak dira, 2 eta 5 mm bitarteko barne-diametroa eta 1-15 m bitarteko luzera dutenak. Barnean fase geldikorra izaten dute, solido bat (gas-solido kromatografia edo adsortzio-kromatografia) edo partikula-tamaina txikiko material solido geldo baten gainazalari lotua dagoen likido bat (gas-likido kromatografia edo banaketa-kromatografia). Partikula-tamaina hodiaren diametroa baino 10 aldiz txikiagoa izan behar da, homogeneoki banatua egon dadin zutabe osoan zehar. Zutabe horiek gas-garraiatzailearen 30 eta 100mL/min bitarteko fluxuekin lan egin dezakete.

B) ZUTABE KAPILARRAK

Gehien erabiltzen diren zutabeak dira, eta purutasun altuko silizezko hodi batez osaturik daude, 5 eta 100 m bitarteko luzera eta 0,1-0,5 mm bitarteko barne-diametroa izanik. Hodiaren barnean fase geldikorra egoten da, orokorrean geruza mehe bezala hodiaren barne-paretei lotua dagoena. Zutabe horiek gas garraiatzailearen 0,5 eta 3 mL/min bitarteko fluxuekin lan egiten dute. Fase geldikorra zutabean kokatzeko eraren arabera, hiru zutabe mota daude(24. irudia):



24. irudia. Zutabe kapilar mota desberdinak.

a) Barne-pareta estalirik duen zutabea. Fase geldikor likidoak zutabearen barne-pareta estaltzen du, 0,1 µm eta 25 µm bitarteko lodierak izanik. Kapazitate txikiko zutabeak izaten dira.

b) Geruza likido batekin inguratutako euskarri solidoa duen zutabea. Zutabearen barne-paretak fase geldikor likidoz inguratutako partikula solido ez porotsuak izaten ditu, geruza

mehe bat osatuz. Lehenengoak baino gainazal-azalera handiagoa izaten dute, eta, ondorioz, karga-kapazitate altuagoa ere bai.

d) Geruza porotsua duten zutabeak. Zutabe horien barne-paretak material porotsu baten geruza mehe bat izaten du, kasu batzuetan fase geldikor likido batez inguratua egon daitekeena.

Zutabe kapilarrek, luzera handiagoa izateagatik, plater teoriko gehiago izaten dituzte, eta, horregatik, erresoluzioa hobea izaten da. Analisi-denbora ere txikiagoa da, baina detekzio-mugak, ordea, zutabe paketatuen antzekoak izaten dira.

3.1.6 DETEKTAGAILUAK

Bereizketa kromatografikoari esker, zutabetik banan-banan irteten diren konposatuak detekta daitezke. Horretarako, kromatografia-sistemarekin lerrokaturik kokatzen den detektagailu baten beharra izaten da, zutabeak gauzatutako bereizketa fisiko-kimikoa seinale neurgarri bihur dadin. Detektagailuak gas-garraiatzailea gas-garraiatzaile - analito nahasketetatik ezberdinduko duen propietate baten neurketa burutzen du. Ezberdintasun horri *detektagailuaren seinale* deritzo, eta zutabetik ateratako konposatu baten molekula kantitatearekiko proportzionala izango da; detekzio-zeldan bertan, neurketa egiten den garaian, istant zehatz batean dauden molekulekiko proportzionala, alegia.

Momentu konkretu batean detektagailuak ematen duen seinalea izango da, zutabetik kanporatutako konposatuaren, gas-garraiatzailearen seinalearen eta laginean dauden ezpurutasun-seinaleen batuketa. Zutabetik konposaturik ateratzen ez denean, detektagailuak neurtutako seinaleari *hondo-zarata instrumental* deritzo.

Detektagailu on batek erantzute-denbora motza, sentikortasun altua eta erantzun lineal zabala izan behar ditu. Gainera, fluxu- eta tenperatura-aldaketen aurrean tinko jarraitu beharko luke, ahal den neurrian bederen, seinale egonkorrak eta errepikakorrak lor daitezen.

Gas-kromatografian erabilitako detektagailuak detektagailu unibertsaletan eta espezifikoetan bana daitezke. Unibertsalek ia edozein konposaturentzat izango dute seinale analitikoa; detektagailu espezifikoek, ordea, baldintza berezi batzuk betetzen dituen analito multzo bati erantzungo die soilik.

A) GARRAREN BIDEZKO IONIZAZIO-DETEKTAGAILUA (FID, *FLAME IONIZATION DETECTOR*)

Detektagailu hauek gasen eroankortasun elektrikoan oinarritzen dira. Presio eta tenperatura normaletan gasak isolatzaileak dira; gas-garraiatzailean atomoak, kargatutako molekulak edota elektroi askeak badaude, ordea, eroankortasunaren gorakada bat gertatuko da.

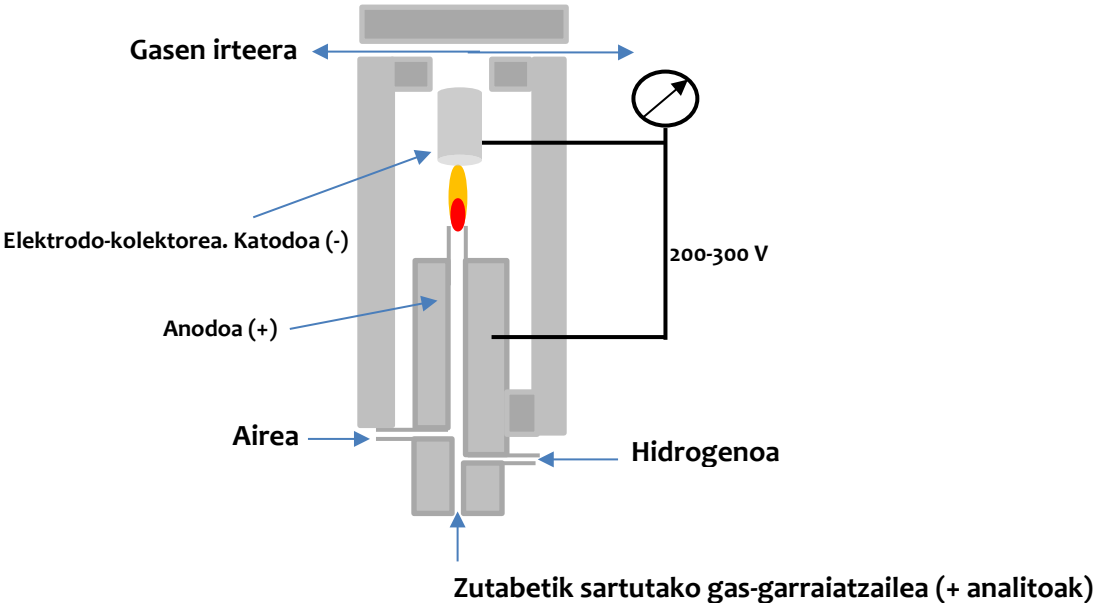
FID detektagailuak erregailu bat izaten du, sugar bat sorraraziko duena bertara iritsiko den hidrogeno-aire nahasketa bati esker. Zutabean bereizitako konposaturik iristen ez denean, ioi oso gutxi sortuko dira sugarrean; analitoak heltzean, aldiz, sugarrean horien pirolisia gertatuko da eta CHO^+ katioi ugari sortuko dira, eroankortasun elektrikoa nabarmen igoz. Mekanismo orokorra honako hau litzateke:

$$CH + O \longleftrightarrow CHO^+ + e^-$$

Zutabetik datorren analitoa sugarrean pirolizatuko da, katioiak eta elektroiak sortuz. Elektroi horiek sugarraren gainean dagoen kolektore batek jasoko ditu, bertan aplikatutako eremu elektriko bati esker (200-300 V), eta korronte elektrikoaren neurketa gauzatuko da. Eremu elektrikoa aplikatzeko, elektrodo-kolektoreak katodo bezala jokatuko du, erregailua bera, ordea, anodoa izanik. Neurtutako korrontearen intentsitatea sugarrean sortuko diren elektroiekiko proportzionala izango da, eta, era berean, detektagailura iritsiko den konposatu bakoitzaren substantzia kantitatearekiko proportzionala. Konposatu horien karbono kopurua zenbat eta handiagoa izan, orduan eta sentikortasun altuagoa erakutsiko du detektagailuak.

FID detektagailua gas-kromatografian erabiltzen den detektagailu ohikoenetako bat da. Gainera, hondo-zarata txikia erakusten du, analitorik ez dagoenean sugarraren erresistentzia elektrikoa handia baita. Detektagailu horrek erantzun ia unibertsala ematen du hidrokarburo guztientzat, karbonilo, karboxilo eta eter talde funtzionalek, ordea, ez dute seinalerik emango. Halaber, hidroxilo eta amino taldeei lotutako karbonoentzat sentsibilitate baxua agertuko du. Gainera, erre ezin daitezkeen konposatuek ere —N_2, nitrogeno edo sufre oxidoak, H_2S, CO, CO_2 eta H_2O, esaterako— ez dute seinalerik emango. Horregatik guztiagatik, detektagailua aproposa da konposatu organikoentzat.

Oro har, sentikortasun eta linealtasun altuak dituen detektagailua da; hala ere, detektagailu suntsitzailea da, analitoak ezin daitezkeelako berreskuratu detekzioaren ostean.



25. irudia. Sugarraren bidezko ionizazio-detektagailua.

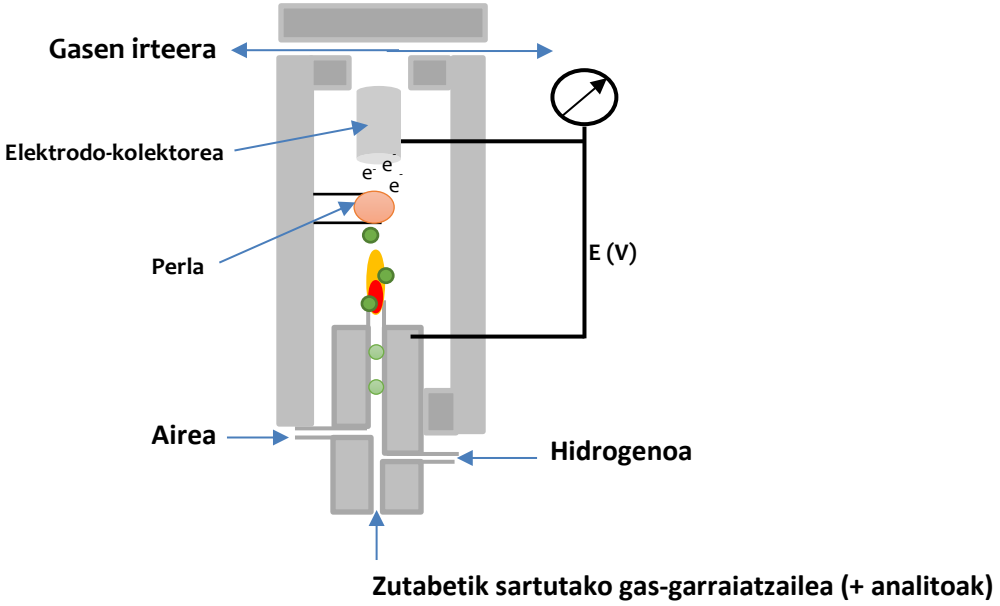
B) NITROGENO-FOSFORO DETEKTAGAILUA

Sugar alkalinoko detektagailu bezala ere ezagutzen da. Sugarraren bidezko detektagailuaren antzekoa da; honen ezberdintasun bakarra da metal alkalinoen gatz bat izatea. Gatz horri esker, nitrogeno organikoa edo fosforoa duten konposatuen pirolisia errazten da, konposatu horien aurreko erantzun instrumentala karbonoarekiko baino 10^4-10^6 aldiz handiagoa izanik.

Sugarraren eta elektrodo kolektorearen artean gatz alkalino batez (normalean, zesio edo rubidio silikatoa) inguratua dagoen beirazko perla bat egoten da, erresistentzia bati esker elektrikoki berotuko dena. Horri esker, perlaren inguruan aire/hidrogeno nahasketaren plasma bat eratuko da, N edo P duten konposatu ezberdinen ionizazioa gailenduz atomo horiek ez dituzten konposatuen aurrean. Ionizazio horren ondorioz, inguruan eratutako elektroi kopurua igoko da, eta korronte elektrikoaren gorakada gertatuko (26. irudia).

Sentikortasun altuko detektagailua da, eta selektiboa da nitrogenoa edo fosforoa duten elementuen neurketarako. Detektagailu horren arazo nagusietako bat da bere

erantzunaren ezegonkortasuna, kutsaduragatik edo perlaren jardueraren galera dela-eta. Horregatik guztiagatik, nahiko sarri burutu beharko da kalibrazioa.

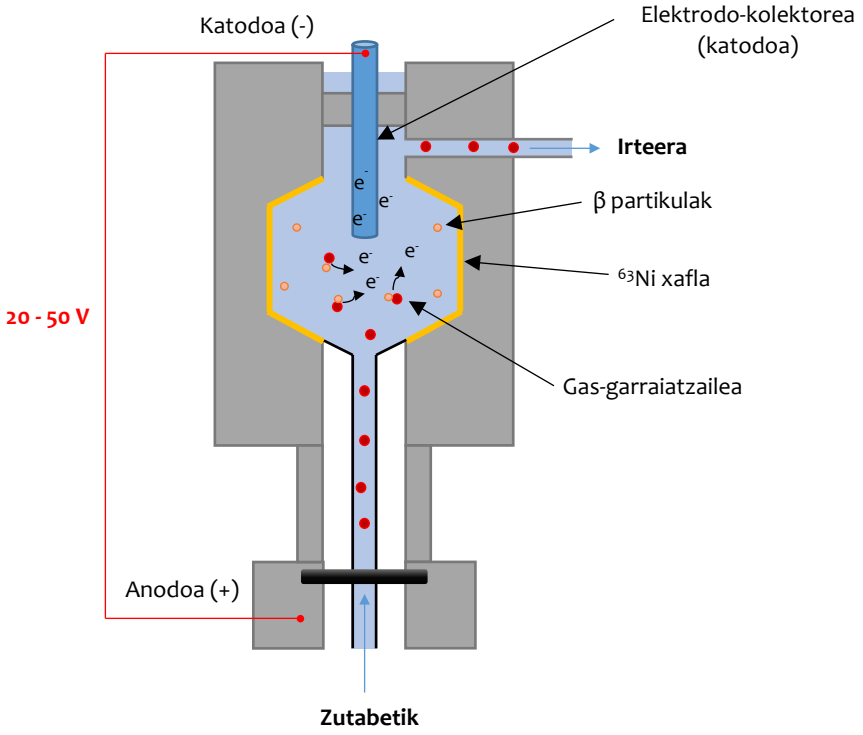


26. irudia. Nitrogeno-fosforo detektagailua.

D) ELEKTROI-HARRAPAKETA DETEKTAGAILUA

Detektagailu honetan, ganbera baten barnean kokaturik egoten dira anodo bat eta katodo bat. Bien artean, ^{63}Ni isotopoaz osaturik dagoen xafla erradioaktibo bat dago, β partikulak igorriko dituena (27. irudia). Iturri erradiaktibo honek igorritako partikulek gas-garraiatzailea ionizatuko dute; ondorioz, elektroiak askatu eta, aplikatutako potentzialari esker, katodora bideratuko dira, korronte elektriko bat sorraraziz (korronte basala). Talde funtzional elektronegatiboak dituen konposatu bat detektagailuaren ganberara sartzen denean (halogenoak, sufredun konposatuak, nitriloak, nitro taldedun konposatuak, karbonilo konjugatuak eta konposatu organometalikoak, esaterako), bertan sortutako elektroiak bereganatu eta katodora iritsiko diren elektroi kopurua jaitsi egingo da; ondorioz, korronte elektrikoaren beherakada bat nabarmenduko da. Detektagailua, orduan, korronte elektrikoaren beherakada horri aurre egiten saiatuko da, katodoaren eta anodoaren artean aplikatutako potentzial-diferentziaren inpultsuen frekuentzia aldatuz, korrontea konstante manten dadin. Detektagailuak emandako seinalea proportzionala izango da aplikatutako pultsuaren frekuentziarekiko.

Esan bezala, detektagailu hori oso sentikorra da talde elektronegatiboak dituzten konposatuentzat. Hidrokarburoentzat, alkoholentzat eta zetonentzat, ordea, ez du erantzunik emango. Oro har, sentikortasun altuko detektagailua da, linealtasun-tarte zabala izaten du, eta ez da suntsitzailea.



27. irudia. Elektroi-harrapaketa detektagailua.

E) BERO-EROANKORTASUN DETEKTAGAILUA

Detektagailu honek bi gasen bero-eroankortasunaren konparaketa egiten du: gas-garraiatzaile puruarena (erreferentzia-eroankortasuna) eta gas-garraiatzailearekin nahasturik dauden konposatuena, zutabetik ateratzen diren heinean. Erantzunaren magnitudea gas-garraiatzailearen eta gas-garraiatzaile - analito nahasketaren arteko bero-eroankortasun diferentzian oinarrituko da.

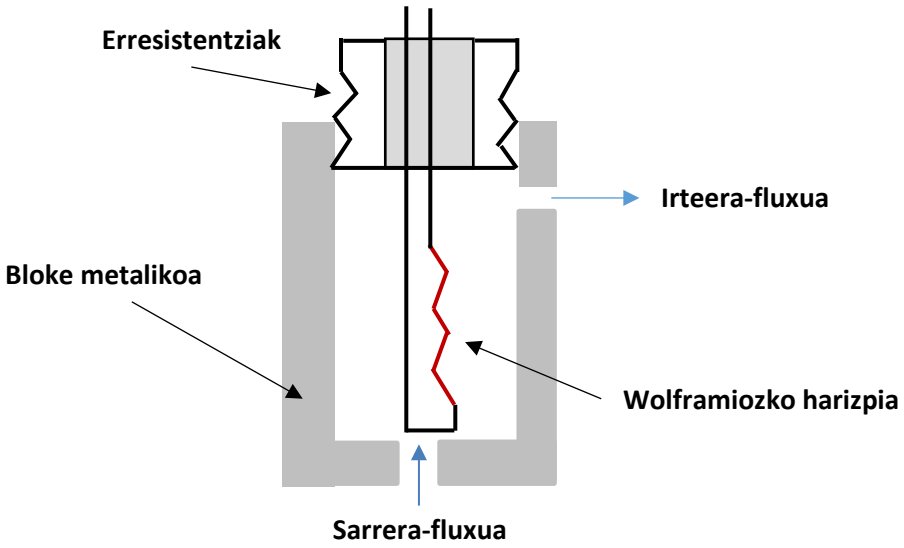
Detektagailu horiek termostatizatutako bloke metaliko batez osaturik daude. Horren barnean, kanpotik isolatua dagoen ganbera itxi bat dago, eta ganberaren barnean wolframiozko harizpi bat kokatzen da (sentsorea), termikoki berotua izango dena. Harizpi horren tenperatura, potentzia elektrikoa konstante mantentzen den bitartean, ganberatik pasatzen den gasaren konposaketaren menpekoa izango da. Gas-nahasketak bero-

eroankortasun altua badu, harizpiaren beroa bloke metalikorantz garraiatuko da, bere tenperatura jaitsiz. Gas-nahasketak bero-eroankortasun baxua izanez gero, ordea, harizpiak bero egoten jarraituko du.

Gehienetan, detektagailu horiek bi ganbera izaten dituzte. Batetik, soilik gas garraiatzailea pasatuko da (erreferentzia-zelda), eta bestetik gas garraiatzailearen eta konposatu bakoitzaren nahasketak, zutabetik banan-banan irteten diren heinean. Detektagailuak bi harizpien arteko tenperatura-diferentzia neurtuko du, eta seinale analitikoa horren araberakoa izango da. Beraz, zenbat eta diferentzia termikoa handiagoa izan, seinale analitiko altuagoa lortuko da. Horretarako, gas-garraiatzaile bezala bero-eroankortasun altuko gasak erabiltzen dira, helioa eta hidrogenoa esaterako.

Ganberara gas-garraiatzailea soilik iristen denean, bere bero-eroankortasun altua dela-eta, filamentuak tenperatura konstante bat lortuko du. Zutabetik irten berri den konposatu bat iristean, aldiz, eroankortasun termikoaren jaitsiera gertatuko da, eta hori dela-eta harizpiaren tenperatura igo egingo da; azkenik diferentzia termiko hori neurgarri izango den seinale elektriko bihurtuko da (28. irudia).

Detektagailu unibertsala da, eta ez suntsitzailea. Gainera, linealtasun zabala du, 5-7 magnitude-ordenakoa.



28. irudia. Bero-eroankortasun detektagailua.

3.2 GAS-KROMATOGRAFIAZKO PRAKTIKAK

KARBAMAZEPINAREN DETERMINAZIOA, GAS-KROMATOGRAFIA ETA SUGARRAREN BIDEZKO IONIZAZIO-DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Karbamazepina da praktika klinikoan krisi epileptikoak kontrolatzeko erabiltzen den sendagaia. Karbamazepinaren beste erabilera batzuk dira maniaren tratamendua eta asaldura bipolarraren prebentzioa, eta alkoholaren abstinentzia-sindromean eta trigeminoaren eta glosofaringeoaren neuralgian ere erabiltzen da.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean karbamazepinaren determinazio kuantitatiboa egitea, gas-kromatografiari akoplatutako garraren bidezko ionizazio-detektagailua (FID) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Gas-kromatografia eta sugarraren bidezko ionizazio-detektagailua (GC-FID)
Zutabe kromatografikoa. Zutabe kapilarra HP-5 0,25mm-ko lodiera duena (25m x 0,32cm ID)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola
Karbamazepinaren estandar solidoa
Prestakin farmazeutikoa: tegretol edo karberol (200 mg) konprimatuak.

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Prestakin farmazeutikoaren konprimatu bat pisatu eta motrailuan txikitu ondoren, metanolean disolbatuko da 15 minutuan giro-tenperaturan irabiatuz. Ondoren, disoluzioa iragazi eta 10 mL-ko matrazera eramango da metanolarekin. Laborategi farmazeutikoaren espezifikazioen arabera diluituko da disoluzioa, bere kontzentrazioa kontzentrazio-tarte aplikagarriaren barnean egon dadin. Ondoren, disoluzioaren 2 µl injektatuko dira sistema kromatografikoan.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa gauzatzeko fase geldikor bezala fenilmetilpolisiloxanoa %5 duen HP-5 zutabe kapilarra (0,32 mm x 25 µm) aukeratu da. Injekzioa Split 5:1 moduan egingo da, gas-garraiatzaile bezala nitrogenoa 2 mL/min-ko fluxuan erabiliz. Garraren bidezko ionizazio-detektagailuan, gas laguntzaile bezala hidrogenoa 44 mL/min eta aire sintetikoa 400 mL/min-ko fluxuan erabiliko dira. Injektorearen eta detektagailuaren tenperatura 270 °C da.

Labearen tenperaturari dagokionez, hasiera batean 100 °C-tan mantenduko da 1,7 minutuz; ondoren, 100 °C/min-ko abiaduran igoko da 220 °C-ra iritsi arte, eta 10 minutuz mantenduko da; bukatzeko, 270 °C-ra igoko da 10 °C/min-ko abiaduran.

c) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako kanpo-kalibrazioa erabiliko da. Lehendabizi, karbamazepina 1000 mg/L hasierako disoluzio bat prestatuko da metanolean. Disoluzio horretatik abiatuta, 2 eta 50 mg/L bitartean dauden bost karbamazepina-disoluzio estandar prestatuko dira, horiek ere metanolean. Disoluzio estandar guztiak GC-FID erabiliz analizatuko dira.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren eta karbamazepinaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen karbamazepina kantitatea kalkulatuko da.

DEXTROMETORFANOAREN DETERMINAZIOA, GAS-KROMATOGRAFIA ETA GARRAREN BIDEZKO IONIZAZIO-DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

Dextrometorfanoa eztul ez-emankorraren kontrako opioidea da. Kodeina bezain eraginkorra da, baina ez dauka propietate analgesiko edo lasaigarririk.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean dextrometorfanoaren determinazio kuantitatiboa egitea, gas-kromatografiari akoplatutako garraren bidezko ionizazio-detektagailua (FID) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Gas-kromatografoa eta garraren bidezko ionizazio-detektagailua (GC-FID)
Zutabe kromatografikoa. Zutabe kapilarra HP-5 0,25mm-ko lodiera duena (25m x 0,32cm ID)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola
Dextrometorfano patroi solidoa
Dokosano estandar solidoa (barne-estandarra)
Sodio karbonatoa
Sodio bikarbonatoa
Hexanoa
Prestakin farmazeutikoa: jarabea (2 mg/ml dextrometorfano)

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Dextrometorfanoa disolbatzaile egokian egon dadin, jarabeak duen osagai aktiboaren likido-likido erauzketa bat egingo da. Lehengo, jarabearen 1:100 diluzioa egingo da ur desionizatua erabiliz. Diluzio horren 2 mL hartu eta 50 mL-ra eramango da HCO_3^- /CO_3^{-2} 0,1 M eta pH=10 disoluzio indargetzailearekin. Disoluzio horren 10 mL hartu eta saio-hodi batera isuriko dira. Ondoren, 10 mL hexano gehituko zaizkio, eta irabiagailu mekanikoan irabiatuko da 10 minutuz.

Erauzketa bukatu denean, saio-hoditik 2 mL hartu eta aire-korronte batean lurrundu ondoren, lortzen den hondakina metanolean prestatu den dokosano 1 mg/L disoluzioaren 1 mL-rekin berdisolbatuko da. Kromatografiarako bialetan jarri ondoren, disoluzioaren 2 µl kromatografoan injektatuko dira.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa gauzatzeko fase geldikor bezala fenilmetilpolisiloxanoa %5 duen HP-5 zutabe kapilarra (0,32 mm x 25 µm) aukeratu da. Gas-garraiatzaile bezala nitrogenoa erabiliko da 2,8 mL/min-ko fluxuan. Garraren bidezko ionizazio-detektagailuan, hidrogenoa 44 mL/min eta aire sintetikoa 400 mL/min-ko fluxuan erabili dira gas laguntzaile bezala. Injektorearen eta detektorearen tenperatura 260 °C da.

Labearen tenperaturari dagokionez, hasiera batean 100 °C-tan mantenduko da, eta 35 °C/min-ko abiaduran igoko da 280 °C-ra iritsi arte. Tenperatura hori minutu batez mantenduko da.

c) Kalibrazioa. Kuantifikaziorako, barne-estandarraren metodoa erabiliko da. Horretarako, dextrometorfano 100 mg/L hasierako disoluzioa metanolean prestatuko da. Disoluzio horretatik abiatuz, 0,5 eta 5 mg/L bitarteko bost disoluzio estandar prestatuko dira metanolean. Arrasean jarri aurretik, disoluzio estandar bakoitzari dokosano 10 mg/ml disoluzioaren 1 mL gehituko zaizkie. Bukatzeko, disoluzio guztiak GC-FID teknika erabiliz analizatuko dira.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, dextrometorfanoaren eta dokosanoaren seinale instrumentalen zatiketa eta dextrometorfanoaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko dira, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen dextrometorfano kantitatea kalkulatuko da. Lagin ezezagunean dextrometorfanoaren eta dokosanoaren azaleren arteko erlazioa jakinik, kalkulatutako zuzenaren ekuazioa eta laginaren aurretratamendua kontuan izanik, jarabeak duen dextrometorfano kontzentrazioa kalkulatuko da (mg/5ml).

17-ß-ESTRADIOLAREN DETERMINAZIOA, GAS KROMATOGRAFIA ETA GARRAREN BIDEZKO IONIZAZIO-DETEKTAGAILUA ERABILIZ

1-. SARRERA

17-ß-estradiola estrogenoen taldeko hormona bat da, eta menopausian oso erabilia da ordezko terapia hormonal gisa.

2-. HELBURUA

Praktika honen helburua da prestakin farmazeutiko batean 17-ß-estradiolaren determinazio kuantitatiboa egitea, gas-kromatografiari akoplatutako garraren bidezko ionizazio-detektagailua (FID) erabiliz.

3-. MATERIALA ETA ERREAKTIBOAK

Balantza analitikoa
Gas-kromatografoa eta garraren bidezko ionizazio-detektagailua (GC-FID)
Zutabe kromatografikoa. Zutabe kapilarra HP-5 0,25mm-ko lodiera duena (25m x 0,32cm ID)
Injekziorako xiringa
Hutseko iragazketa-tresneria
0,22 µm-ko iragazkiak
10, 25, 50 eta 100 mL-ko matraze aforatuak
0,5, 1, 2, 5 eta 10 mL-ko pipetak
Hauspeakin-ontziak
Kromatografiarako kalitatea duen metanola.
17-ß-estradiol patroi solidoa.
Prestakin farmazeutikoa: estrofem (2 mg) konprimatuak.

4-. PROZEDURA

a) Laginaren prestaketa. Prestakin farmazeutikoaren konprimatu bat pisatu eta almaizean txikitu ondoren, metanolean disolbatuko da 15 minutuan giro-tenperaturan irabiatuz. Ondoren, disoluzioa iragazi eta 10 mL-ko matrazera eramango da metanolarekin. Laborategi

farmazeutikoaren espezifikazioen arabera, disoluzioa diluituko da bere kontzentrazioa kontzentrazio-tarte aplikagarriaren barnean egon dadin.

b) Lan-baldintzak. Bereizketa kromatografikoa gauzatzeko fase geldikor bezala fenilmetilpolisiloxanoa %5 duen HP-5 zutabe kapilarra (0,32 mm x 25 µm) aukeratu da. Gas garraiatzaile bezala, nitrogenoa 2 mL/min-ko fluxuan erabiliko da. Garraren bidezko ionizazio-detektagailuan, gas-laguntzaile bezala hidrogenoa 44 mL/min eta aire sintetikoa 400 mL/min-ko fluxuan erabili dira. Injektorearen eta detektorearen tenperatura 250 °C eta 300 °C dira, hurrenez hurren.

Labearen tenperaturari dagokionez, hasiera batean 150 °C-tan mantenduko da 1,5 minutuz; ondoren, 50 °C/min-ko abiaduran igoko da 260 °C-ra iritsi arte, eta 5 minutuz mantenduko da; bukatzeko, 270 °C-ra igoko da 10 °C/min-ko abiaduran, eta 3,3 minututan mantenduko da.

c) Kalibrazioa. Metodoaren kalibraziorako kanpo-kalibrazioa erabiliko da. Lehendabizi, 17-ß-estradiol 1000 mg/L hasierako disoluzio bat prestatuko da metanolean. Disoluzio horretatik abiatuta, 0,5 eta 50 mg/L bitartean dauden bost disoluzio estandar prestatuko dira, horiek ere metanolean. Disoluzio estandar bakoitza prestatu ostean, neurketa analitikoa gauzatuko da GC-FID erabiliz.

5-. KALKULUAK ETA EMAITZAK

Lehenik eta behin, karratu minimoen metodoaz egindako erregresio lineala erabiliz, seinale instrumentalaren eta 17-ß-estradiolaren kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa ezarriko da, kalibrazio zuzenaren ekuazioa lortuz hain zuzen ere. Ostean, laginak emandako intentsitatea eta egindako diluzioa kontuan izanik, sendagaiak duen 17-ß-estradiola kantitatea kalkulatuko da.

IV. BLOKEA KUANTIFIKAZIO-METODOAK

1. KUANTIFIKAZIO-METODOAK: SARRERA

Kimika Analitikoa emaitza analitikoak lortzeko parametro desberdinen neurketan oinarritzen den zientzia da. Emaitza horiek kalitatezkoak izan daitezen, erreferentzia edo estandar egokiekin konparatu behar dira. Estandar edo patroi analitikoak kimikoki puruak diren substantziak dira, eta edozein parametro fisiko, kimiko edo biologikoren neurketa egiteko oinarria dira. Metodo klasikoetan ez bezala, metodo instrumentalak erabiltzen direnean, analitoaren estandarrak beharrezkoak dira kalibraketa gauzatzeko.

Kalibrazioa, analitoaren kantitate ezezagunen aurrean prozedura analitikoak ematen duen seinale edo erantzuna interpretatzeko, analitoaren kantitate ezagunen (estandar edo patroi) aurrean prozedurak duen erantzunaren neurketan datza. IUPACek (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) horrela definitzen du: instrumentu batek ematen duen seinalearen edo erantzunaren eta analitoaren kantitate edo propietate baten arteko erlazioa determinatzen duen prozesua. Kalibrazioaren helburua da funtzio matematikoen bidez erantzun instrumentalaren eredu bat ezartzea, seinale analitikoaren eta analitoaren kontzentrazio edo kantitatearen arteko korrelazio egokiena ematen duena. Kalibrazioak edo kuantifikazio-metodoek kanpo-estandarrak (kanpo-kalibrazioa) edo laginari gehitzen zaizkion estandarrak (barne-estandarraren metodoa edo adizio estandarren metodoa) erabil ditzakete.

Kuantifikazio-metodo desberdinak azaldu aurretik, beharrezkoa da kalibrazioan garrantzizkoak diren zenbait parametro ezagutzea.

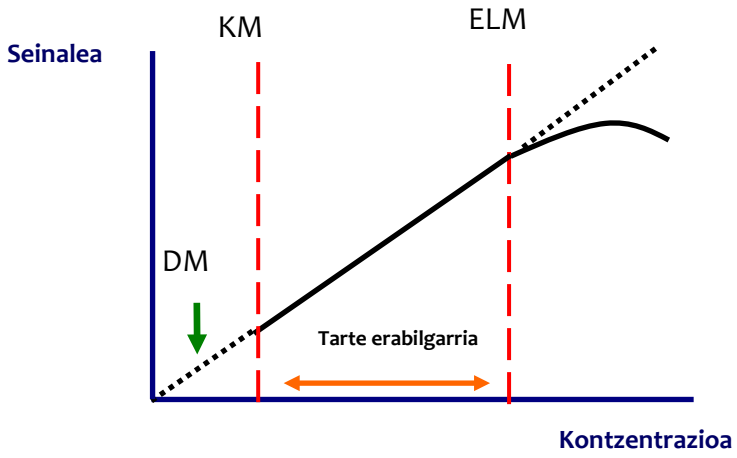
– **Linealtasuna.** Metodoak analitoaren kontzentrazioarekiko zuzenki proportzionalak diren seinalean emateko duen gaitasuna da. Kalibrazio-kurbatik zuzenaren ekuazioa lortuko da. Linealtasuna bermatzeko, gutxienez kontzentrazio desberdineko bost disoluzio estandar neurtu beharko dira, eta horietako bakoitza hiru aldiz analizatu beharko da.

– **Sentikortasuna.** Analito baten bi kantitate edo bi kontzentrazio antzekoen arteko bereizketa egiteko gaitasuna da. Kalibrazio zuzenaren maldak emango digu sentikortasunaren balioa. Sentikortasuna bi faktorek mugatzen dute: kalibrazio-kurbaren maldak eta sistemaren doitasunak. Doitasun berdina duten bi metodoren artean, malda handiena duen metodoak izango du sentikortasun handiena. Argitu

beharra dago analito baten kalibrazio-kurbaren malda matrizearen arabera aldatu daitekeela.

– **Kalibrazioaren sentikortasuna.** Zuzenaren ekuazioaren maldaren balioa da.

– **Kontzentrazio-tarte aplikagarria**. Zuzenaren ekuazioa aplikagarri den kontzentrazio-tartea da. Kontzentrazio-tarte aplikagarria kuantifikazio mugaren (KM) eta erantzun linealaren mugaren (ELM) artean kokatzen da.



1. irudia. Kontzentrazio-tarte aplikagarria.

–**Kuantifikazio-muga.** Kalibratu zuzenean, tarte linealeko muga txikiena bezala onartu daitekeen analitoaren kontzentrazioa (IUPAC 1987). Ziurgabetasun onargarri batekin ***(RSD<%20)*** determina daitekeen eta, ondorioz, kalibrazio-tarte aplikagarriaren muga baxuena bezala ezar daitekeen analitoaren kontzentrazioa (EURACHEM).

Kuantifikazio-mugaren seinalea $y_{KM} = x_z + k\ S_z$ bezala adieraz daiteke, non k=10 eta S_z neurtutako hamar zuriren seinaleen desbiderapen estandarra baitira. Zuzenaren ekuazioa $y = x_z + bx$ dela kontuan izanik, kuantifikazio-mugaren seinalea bertan ordezkatuz, $x_z + 10\ s_z = x_z + b\ x_{KM}$ lortzen da. Hortaz, kuantifikazio-muga $x_{KM} = 10\ s_z/b$ izango da.

–**Detekzio-muga.** Metodo analitiko baten bitartez zentzuzko ziurtasun batekin detekta daitekeen analitoaren kontzentrazio baxuena da. Kasu horretan, detekzio-mugan lortzen den seinalea $y_{DM} = x_z + k\ S_z$ bezala adieraz daiteke, non k=3 baita. Zuzenaren ekuazioa $y = x_z + bx$ bada, detekzio-mugaren seinalea bertan ordezkatuz, $x_z + 3\ s_z = x_z + b\ x_{DM}$ lortzen da. Hortaz, detekzio-muga $x_{DM} = 3\ s_z/b$ izango da.

2. KANPO-KALIBRAZIOA

Kanpo-estandarra laginetik at prestatzen da. Matrizearen konposizioak edo prozeduran erabiltzen diren erreaktiboek analitoaren determinazioa eragozten ez dutenean edo konstanteak diren interferentzia ezagunak daudenean erabiltzen den kuantifikazio-metodoa da.

Kanpo-kalibrazioan analito bakoitzaren hasierako disoluzio estandarrak prestatzen dira, ziurtatutako purutasuna duen patroi solidoaren pisaketatik abiatuz. Disoluzio horretatik, diluzioz, eta lagina disolbatzen den disolbatzailea erabiliz, kontzentrazio ezaguneko disoluzio estandarrak prestatzen dira.

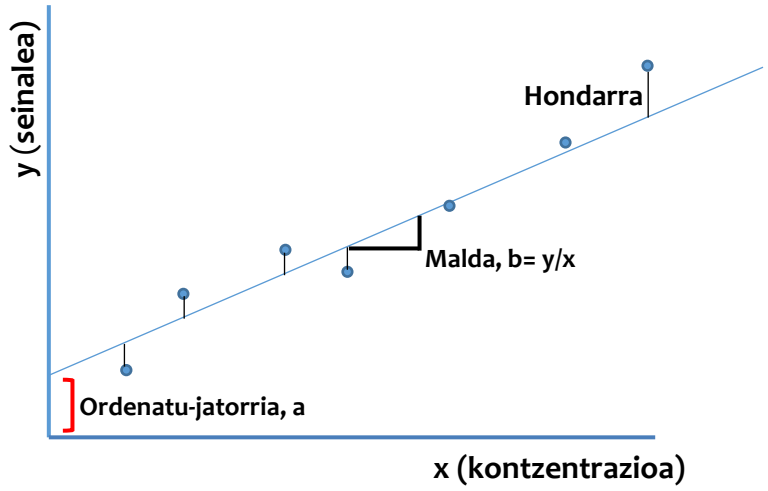
Disoluzio estandarren kopurua aztertu nahi den kontzentrazio-tartearen menpe dago: zenbat eta puntu esperimental gehiago erabili, kalibrazioaren baliozkotasuna handiagoa izango da.

Disoluzio estandarrak neurtu baino lehen, analitorik ez duen lagina, hau da, lagin «zuri» bat analizatuko da. Ondoren, disoluzio estandarren seinalea neurtu behar da, eta horien eta kontzentrazioaren arteko erlazio matematikoa lortu (kalibrazio-kurba). Bukatzeko, laginak emandako seinalea ekuazioan ordezkatuz, kontzentrazioa kalkulatuko da.

Ohikoena da aldagai independenteak (x, analitoaren kontzentrazioa) eta mendeko aldagaiak (y, seinale instrumentala) definitzen dituzten puntu esperimentaletara hobekien egokitzen den korrelazioa lineala izatea.

Zuzenaren ekuazioa osatzen dute ordenatu-jatorriak (a) maldak (b) eta aldagaien arteko korrelazioa adierazten duen Pearson-en korrelazio-koefizienteak (r) edo determinazio-koefizienteak (R^2). Ekuazioaren kalkulua gauzatzeko metodo erabiliena minimo karratuen metodoa da. Metodo horrek puntu esperimental bakoitzaren eta zuzenaren arteko hondarraren karratuaren batura balio minimora edo zerora hurbiltzen du. Aldagaien arteko erlazioa lineala dela onartuko da, $r>0,99$ edo $R^2>0,98$ denean. Halere, $r<0,98$ izateak honako hau adieraz dezake: analizatu den estandarretako bat ez dela zuzena, tarte lineal bat baino gehiago dagoela, edo erlazioa ez dela lineala (kuadratikoa, polinomiala, esponentziala).

Gainera, gomendagarria da puntu esperimental bakoitzaren eta zuzenaren arteko hondarrak grafikoki gainbegiratzea, honako irudi honetan adierazten den bezala:



2 irudia. Kalibrazio-kurba eta puntu esperimental bakoitzaren hondarrak.

Korrelazio lineala egokia dela esateko, hondarren grafiko horretan honako hau bete behar da: hondar positibo eta negatiboen kopurua antzekoa dela, hondarrek balio absolutu antzekoa dutela, eta hondarren sakabanaketa zorizkoa izan behar dela, inongo joerarik adierazi gabe.

Matrize-efektua da analitoaz gain matrizean dauden beste konposatu guztiek analitoaren neurketan duten eragina. Analitoaren kontzentrazio berdina duten disoluzio estandar batek edo lagin batek, gehienetan, seinale analitiko desberdina emango dute. Hortaz, disoluzio estandarra disolbatzaile batean (kanpo-kalibrazioa) edo laginean bertan (kalibrazioa matrizean edo adizio estandarren metodoa) prestatzen direnean, metodoaren sentikortasuna alda daiteke.

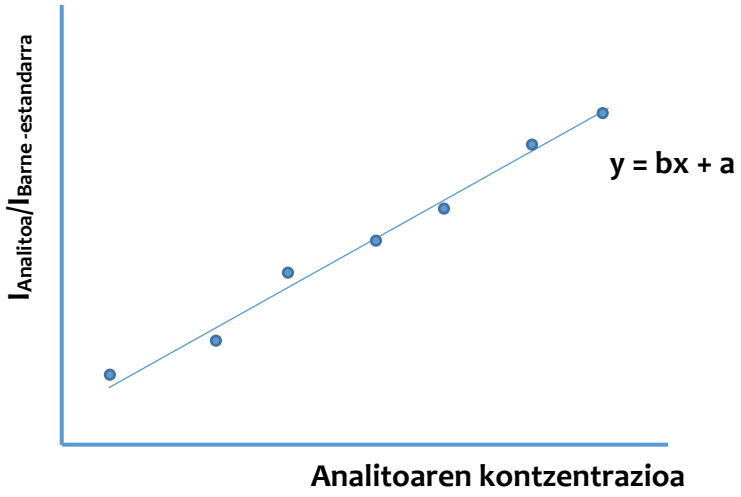
Arazo hori saihesteko, **kalibrazioa matrizean** presta daiteke. Kalibrazioa egiteko erabiliko diren disoluzio estandarrak analitorik ez duen lagin batean (lagin «zuria») prestatuko dira. Disoluzio horiei laginari aplikatuko zaion aurretratamendu berbera aplikatuko zaie, eta analizatu egingo dira. Lortzen den seinale analitikoaren eta analitoaren kontzentrazioaren arteko korrelazioa kalkulatuko da. Horrela, korrelazio horrek matrize-efektua barneratuko du, eta, laginaren seinalea lortutako ekuazioan ordezkatzean, laginak duen analitoaren kontzentrazioa lortuko da.

3. BARNE-ESTANDARRAREN METODOA

Barne-estandarraren kuantifikazio-metodoa erabiltzen da teknika analitikoak berak ematen duen seinalearen aldakortasuna zuzentzeko. Teknika kromatografikoekin erabiltzen da, laginaren injekzioaren ondorioz izan daitezkeen erroreak zuzentzeko, eta baita instrumentuaren seinalearen aldakortasuna zuzentzeko hainbat tekniketan ere.

Metodo hori laginari eta disoluzio estandarrei barne-estandar baten kantitate ezagun bat gehitzean datza, barne-estandarraren eta analitoaren arteko erlazioa konstantea mantentzen delarik. Barne-estandarra analitoaren propietate fisiko-kimiko antzekoak dituen substantzia bat izan behar da, baina laginean ez dagoena .

Kalibraziorako disoluzio estandar bakoitzari barne-estandarraren kantitate ezagun bat gehitzean datza. Ondoren, laginari barne-estandarraren kantitate berdina gehituko zaio. Disoluzio estandarren eta laginaren neurketa egin ondoren, analitoaren seinalearen eta barne-estandarraren seinalearen arteko erlazioaren ($I_{Analitoa}/I_{Barne\text{-}estandarra}$) eta analitoaren kontzentrazioaren arteko korrelazioa edo ekuazio matematikoa kalkulatuko da. Ondoren, laginaren $I_{Analitoa}/I_{Barne\text{-}estandarra}$ ekuazioan ordezkatuz, laginak duen analito-kontzentrazioa kalkulatuko da.



3. irudia. Barne-estandarraren kuantifikazio-metodoa.

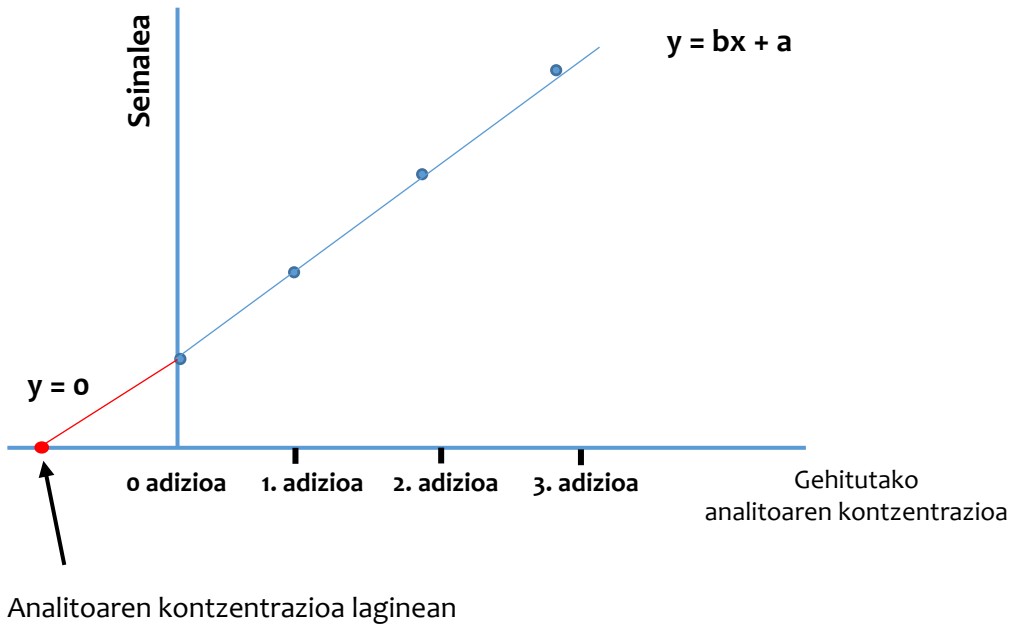
4. ADIZIO ESTANDARREN METODOA

Analitoarekin batera seinalea ematen duen interferentzia bat agertzen denean edota matrize-efektua saihesteko erabiltzen da. Baita analitorik gabeko laginik ez dagoelako matrizean kanpo-kalibrazioa egiteko aukerarik ez dagoenean ere.

Metodo hori laginari analitoaren kontzentrazio handiko disoluzio estandar baten bolumen txikiak (mikrolitroak) gehitzean datza, matrizearen konposizioa aldatzen ez den bitartean.

Lehenengo, laginaren bolumen ezagun batean (V_L) dagoen analitoak ematen duen seinale analitikoa neurtzen da. Ondoren, analizatu den laginari analitoaren kontzentrazio ezaguneko disoluzio estandar baten (C_p) bolumen ezagun bat (V_p) gehituko zaio (bolumen-aldaketa arbuiagarria izan behar da), eta berriz analizatuko da. Prozesu hori birritan errepikatuko da. Bukatzeko, analitoaren seinalearen intentsitatea adieraziko da **gehitu den** analitoaren kontzentrazioarekiko, eta ekuazio matematikoa kalkulatuko da. Laginak duen analitoaren kontzentrazioa izango da zuzena abzisa-ardatzera estrapolatuz (y=0) lortuko den kontzentrazioaren balore absolutua .

Nabarmentzekoa da, aldez aurretik, metodoaren linealtasun-tartea ezagutzea beharrezko dela lortzen diren emaitzak tarte horren barnean egon daitezen.



4. irudia. Adizio estandarren metodoa.

AMINI, Hossein eta AHMADIANI, Abolhassan. "Rapid determination of loratadine in small volume plasma samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004. 809 lib., 2. zk, 227–230. DOI 10.1016/j.jchromb.2004.06.022.

BASTERRETXEA, Francisco, ZABALA, Gorka, MIJANGOS, Fernando, IZURIETA, Itziar, ETXEBARRIA, Nestor eta MARTINEZ DE MARIGORTA, Edorta. *Kimika Orokorra*. 2. arg. Bilbo: Udako Euskal Unibertsitatea, 1996. ISBN: 84-86967-71-6.

BRETT, Cristopher M. A. eta BRETT, Ana Maria Oliveira. *Electroanalysis*. 1. arg. New York: Oxford Universisty Press, 1998. ISBN 9780198548164.

BROEKAERT, José A. C. *Analytical Atomic Spectrometry with Flames and Plasmas*. 1. arg. Weinheim: Wiley, 2006. ISBN 9783527606771.

CELA, Rafael, LORENZO, Rosa Antonia eta CASAIS, Maria del Carmen. *Técnicas de separación en Química Analítica*. 1. arg. Madril: Síntesis, 2003. ISBN 9788497560283.

DONG, Michael W. *Modern HPLC for Practicing Scientists*. 1. arg. Hoboken: Wiley, 2006. ISBN 9780471973096.

GAUGLITZ, Günter eta VO-DINH, Tuan. *Handbook of Spectroscopy*. 1. arg. Weinheim: Wiley, 2006. ISBN 9783527605026.

EBDON, Les, EVANS, E. Hywel, FISHER, Andrew S. eta HILL, Steve J. *An Introduction to Analytical Atomic Spectrometry*. 1. arg. Chichester: John Wiley & Sons, Inc., 1998. ISBN 047197417X.

FLOREZ, Jesús, ARMIJO, Juan Antonio eta MEDIAVILLA, África. *Farmacología Humana*. 4. arg. Bartzelona: Masson, 2003. ISBN 9788445812907.

GUITERAS, Jacinto, RUBIO Roser eta FONRODONA, Gemma. *Curso experimental en Química Analítica*. 1. arg. Madril: Síntesis, 2003. ISBN 84-9756-072-8.

HARRIS, Daniel C., BERENGUER, Vicente eta BERENGUER, Ángel. *Análisis químico cuantitativo*. 3. arg. Bartzelona: Reverté, 2006. ISBN 9788429172249.

HARVEY, David. *Modern Analytical Chemistry*. 1. arg. New York: McGraw-Hill, 2000. ISBN 9780072375473.

HERNÁNDEZ, Lucas eta GONZÁLEZ, Claudio. *Introducción al análisis instrumental*. 1. arg. Bartzelona: Ariel Ciencia, 2002. ISBN 9788434480438.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. *Compendium of Chemical Terminology. Gold Book.* [online]. 2014. Hemen eskuragarri: https://goldbook.iupac.org/pdf/goldbook.pdf

LAKOWICZ, Joseph R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. 1. arg. New York: Springer, 2006. ISBN 9780387312781.

MCMASTER, Marvin C. *HPLC: A Practical User's Guide*. 1. arg. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007. ISBN 9780470079089.

MOHAMED, Fardous A., MOHAMED, Horria A., HUSSEIN, Samiha A. eta AHMED, Sameh A. "A validated spectrofluorimetric method for determination of some psychoactive drugs". *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2005. 39. lib, 1–2 zk., 139–146. DOI 10.1016/j.jpba.2005.03.024.

NEUE, Uwe D. "Theory of peak capacity in gradient elution". *Journal of Chromatography A*. 2005. 1079. lib, 1–2 zk., 153-161. DOI 10.1016/j.chroma.2005.03.008.

OWEN, Tony. *Fundamentals of UV-visible spectroscopy: Workbook* [online]. Germany: Agilent Technologies, 2000. ISBN 9788578110796. Hemen eskuragarri: https://www.agilent.com/cs/library/primers/public/59801397_020660.pdf

POLO DIEZ, Luis María. *Fundamentos de Cromatografía*. 1. arg. Madril: Dextra, 2015. ISBN 978-84-16277-57-7.

ROUESSAC, Francis eta ROUESSAC, Annick. *Análisis químico: métodos y técnicas instrumentales modernas*. 1. arg. New York:McGraw-Hill, 2003. ISBN 9788448137854.

RUBINSON, Keneth A. eta RUBINSON Judith F. *Análisis instrumental*. 1. arg. Madril: Pearson Educación, 2001. ISBN 9788420529882.

SÁNCHEZ BATANERO, Pedro eta GÓMEZ DEL RÍO, María Isabel. *Química analítica general: Equilibrios en fase homogénea y métodos analíticos.* 1. arg. Madril: Síntesis, 2006. ISBN 9788497563864.

SETTLE, Frank A. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*. 1. arg. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1997. ISBN 0131773380.

SILVA, Manuel eta BARBOSA, José. *Equilibrios iónicos y sus aplicaciones analíticas*. 1. arg. Madril: Síntesis, 2002. ISBN 9788497560252.

SKOOG, Douglas A., HOLLER, F. James eta NIEMAN, Timothy A. *Principios de análisis instrumental*. 5. arg. New York: McGraw Hill, 2008. ISBN 9789706868299.

SKOOG, Douglas A., WEST, Donald M., HOLLER, F. James eta COUCH, Stanley R. *Fundamentos de Química Analítica*. 8. arg. Madril: Paraninfo, 2005. ISBN 970-686-369-9.

YAÑEZ-SEDEÑO, Paloma, PINGARRÓN, José Manuel eta MANUEL DE VILLENA RUEDA, Francisco Javier. *Problemas resueltos de química analítica*. 1. arg. Madril: Síntesis, 2003. ISBN 9788497560719.