

**PRÁCTICA No DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS EN  
CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

**ELABORÓ: GEORGINA DUARTE L., ADOLFO GARCÍA O., LUCÍA HERNÁNDEZ G. Y SILVIA MENDOZA A.**

**OBJETIVO:**

- La identificación y función de las principales partes instrumentales que constituyen el cromatógrafo de gases.
- La comprensión de la información que se puede obtener de un cromatograma.
- Que el alumno al variar diferentes parámetros cromatográficos infiera la relación que hay entre ellos.
- La relación de estos parámetros con la separación que se logra en cromatografía instrumental.
- Conocer las ventajas y limitaciones de la técnica de cromatografía de gases.

**METAS:**

- Operar un cromatógrafo de gases.
- Manipular las condiciones experimentales en el instrumento para obtener información analítica confiable.
- Conocer la operación general de un integrador.
- Aprender la técnica de inyección en el cromatógrafo de gases.

**ENUNCIADO DEL PROBLEMA:**

**¿Cuales son las condiciones de operación adecuadas en el cromatógrafo de gases para lograr una buena separación de los componentes de la muestra, con una resolución igual o mayor a 1.5?**

**INFORMACION ADICIONAL:**

Columna: Capilar con fase estacionaria de Cabowax 20M (de tendencia polar).

Longitud: 15m.

Diámetro.: 0.32mm.

Espesor de película: 0.25µm.

Componentes por separar: ésteres metílicos del ácido miristoleico (C<sub>14:1</sub>) y del ácido palmitoleico (C<sub>18:1</sub>).

Disolvente: dicloro etano.

**Nota: Los ésteres metílicos se cambiaran cada semestre**

**PREGUNTAS Y EJERCICIOS PREVIOS:**

- 1.-¿Qué es un cromatograma y que información puedo obtener?
- 2.-¿Qué indican los parámetros cromatográficos conocidos como: eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución?
- 3.-¿Cuál es el principio de operación de un detector de ionización de flama y que características importantes presenta?
- 4.-¿Qué son un registrador y un integrador y qué información nos dan?

**LECTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.**

-La bibliografía recomendada es:

Harold M. McNair. Cromatografía de Gases. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C. 1981

Skoog , Holler y Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Ed. Editorial McGraw Hill 2001

**EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:**

Material por equipo de alumnos en el laboratorio.

Cromatógrafo de gases

1 matraz aforado de 10 ml.

2 Perillas de goma para pipeta Pasteur.

1 tapon horadado para matraz kitasato de 500 ml.

Éster metílico del ac. miristoleico (C<sub>14:1</sub>)

1 Jeringa de 10µl para cromatografía de gases.

2 Pipetas Pasteur.

1 Kitasato de 500 ml.

2 Vasos de precipitado de 50 ml.

Éster del ac. palmitoleico (C<sub>16:1</sub>).

**GUÍA EXPERIMENTAL**

1.-Se entregará una disolución de los ésteres metílicos del ácido miristoleico (C<sub>14:1</sub>) y ácido palmitoleico (C<sub>16:1</sub>), aproximadamente al 0.1% (p/v) en dicloro etano (**estas muestras se cambiarán cada semestre**).

2.-Experimentar con las siguientes condiciones para lograr obtener un cromatograma con una buena separación.

**Temperaturas:**

Isotérmica (Horno 150, 180 y 200 °C)

Inyector (200°C)

Detector (200°C)

**Sensibilidad del detector:**

10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup> y 10<sup>3</sup>

**Volumen de muestra inyectada:**

1 y 2µl

**Integrador:**

Atenuación (variado según instrucciones del profesor).

Velocidad del papel (variado según instrucciones del profesor mm/min)

**CUESTIONARIO:**

1.-¿Cuál es el orden de elución de los compuestos que contiene la disolución en la fase estacionaria que se trabajó ?

2.-Realiza una tabla para cada una de las condiciones que se variaron en el cromatógrafo de gases, indicando en cada caso, los valores obtenidos de los parámetros cromatográficos (eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución).

3.-¿Qué relación observaste entre la variación de las condiciones de trabajo y los parámetros cromatográficos (eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución), así como con la separación de los compuestos de la muestra?

4.- Escribe las mejores condiciones de operación que encontraste en el cromatógrafo de gases, con las cuales se logró una óptima separación (resolución igual o mayor de 1.5) de los analitos en la muestra y que requieran menos tiempo de análisis:

Temperatura del horno:	
Temperatura del detector:	
Temperatura del inyector:	
Volumen de muestra inyectado:	
Atenuación:	
Velocidad del papel:	

**Nota: los compuestos de los ésteres metílicos variaran cada semestre.**

**ENSEÑANZA EXPERIMENTAL  
QUÍMICA ANALÍTICA INSTRUMENTAL II (1656)**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**PRÁCTICA No DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS EN  
CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA.**

**ELABORÓ: GEORGINA DUARTE L., ADOLFO GARCÍA O., LUCÍA HERNÁNDEZ G. Y SILVIA  
MENDOZA A.**

**OBJETIVO:**

- La identificación y función de las principales partes instrumentales que constituyen el cromatógrafo de líquidos.
- La comprensión de la información que se puede obtener de un cromatograma.
- Que el alumno al variar diferentes parámetros cromatográficos infiera la relación que hay entre ellos.
- La relación de estos parámetros con la separación que se logra en cromatografía instrumental.
- Conocer las ventajas y limitaciones de la técnica de cromatografía de líquidos.

**METAS:**

- Operar un cromatógrafo de líquidos.
- Manipular las condiciones experimentales en el instrumento para obtener información analítica confiable.
- Conocer la operación general de un integrador.
- Aprender la técnica de inyección en el cromatógrafo de líquidos.

**ENUNCIADO DEL PROBLEMA:**

**¿Cuáles son las condiciones de operación adecuadas en el cromatógrafo de líquidos para lograr una buena separación de los componentes de la muestra, con una resolución igual o mayor a 1.5?**

**INFORMACIÓN ADICIONAL:**

Columna: Empacada con fase estacionaria C18 (octadecil de tendencia no polar).

Longitud: 5 cm.

Diámetro: 1/4 de pulgada.

Componentes por separar: ácido acetilsalicílico (0.5 mg/ml) y cafeína (0.03 mg/ml).

Disolvente: metanol.

**Nota: La columna se cambiara cada dos semestres, pregunta al profesor .**

**PREGUNTAS Y EJERCICIOS PREVIOS:**

- 1.-¿Qué es en cromatografía de líquidos una separación por técnica de fase inversa y por fase normal ?
- 2.-¿Cuál es el principio de operación de un detector UV-VIS para CLAE y qué características importantes presenta?
- 3.-¿Qué tipo de bombas se utilizan en los Cromatógrafos de Líquidos?

**LECTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.**

-La bibliografía recomendada es:

Harold M. McNair. Cromatografía de Gases. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C. 1981

Skoog , Holler y Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Ed. Editorial McGraw Hill 2001

**EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:**

Material por equipo de alumnos en el laboratorio.

Cromatógrafo de líquidos.

1 matraz aforado de 25 ml.

2 Perillas de goma para pipeta Pasteur.

1 tapón horadado para matraz kitasato de 500 ml.

Espátula

Sistema de filtrado Millipore

1 Jeringa de 100 ul para cromatografía de líquidos

2 Pipetas Pasteur

1 Kitasato de 500 ml.

2 Vasos de precipitado de 50 ml.

2 Naves para pesar.

Ac. acético 1% (filtrado).

Cafeína

Metanol (filtrado).

Ac. Acetilsalicílico

**GUÍA EXPERIMENTAL**

1.-Se preparará una disolución de una mezcla de ac. acetilsalicílico a una concentración de 0.50 mg/ml y cafeína a una concentración de 0.030 mg/ml utilizando como disolvente metanol.

2.-Experimenta con las siguientes condiciones para lograr obtener un cromatograma con una buena separación.

**Fase móvil:**

Composición de la fase móvil:

Composición 1: 65% Ácido Acético al 1% en agua  
35% Metanol.

Composición 2: 55% Ácido Acético al 1% en agua  
45% Metanol.

Composición 3: 35% Ácido Acético al 1% en agua  
65% Metanol.

**Sensibilidad del detector:**

1 y 0.01

**Volúmen de muestra inyectada:**

10, 20, y 30  $\mu$ l

**Flujo de la fase móvil:**

1 y 0.8 mL/min

**Longitud de onda:**

254nm y 300nm

**Integrador:**

Atenuación (variarlo según instrucciones del profesor)

Velocidad del papel (variarlo según instrucciones del profesor mm/min)

**CUESTIONARIO:**

1.-En cada cambio de fase móvil ¿cuál fue el orden de elución de los compuestos que contiene la disolución que se preparó?.y explique por qué eluyen de esa manera.

2.-Realiza una tabla para cada uno de las condiciones que variaste en el cromatógrafo de líquidos, indicando en cada caso los valores obtenidos de los parámetros cromatográficos (eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución).

3.-¿Qué relación observaste entre la variación de las condiciones de trabajo y los parámetros cromatográficos (eficiencia, selectividad, factor de capacidad y resolución)? Así como con la separación de los compuestos de la muestra.

4.- Escribe las mejores condiciones de operación que encontraste en el cromatógrafo de líquidos, con las cuales se logró una óptima separación de los analitos en la muestra y que requieran menos tiempo de análisis::

Flujo fase móvil:	
Longitud de onda :	
Sensibilidad del detector:	
Composición de la fase móvil:	
Volumen de muestra inyectado:	
Atenuación:	
Velocidad del papel:	

**PRÁCTICA No DETERMINACIÓN DEL GRADO ALCOHÓLICO EN BEBIDAS POR  
CROMATOGRAFÍA DE GASES.**

**ELABORÓ: GEORGINA DUARTE L., ADOLFO GARCÍA O., LUCÍA HERNÁNDEZ G .Y SILVIA  
MENDOZA A.**

**OBJETIVO:**

- Que el alumno aprenda a realizar análisis cuantitativos por cromatografía utilizando los métodos de estándar externo e interno.
- Que el alumno deduzca las limitaciones y ventajas de estos métodos.

**METAS:**

- Encontrar las condiciones experimentales adecuadas para obtener información analítica confiable.

**ENUNCIADO DEL PROBLEMA:**

**¿Cuál es el contenido de etanol en las muestras analizadas (con estándar externo e interno) y con cuál de los dos métodos cuantitativos se obtiene una mayor precisión?**

**INFORMACIÓN ADICIONAL:**

Columna Capilar con fase estacionaria Carbowax 20 M.  
Longitud: 15 M.  
Diámetro: 0.32 mm  
Espesor de la película: 0.25µm  
Componente por cuantificar: etanol  
Estándar interno: acetona  
Muestra: bebida alcohólica (mezcal, aguardiente, tequila, brandy, etc)

**PREGUNTAS Y EJERCICIOS PREVIOS:**

- 1.-¿En qué se basan los métodos conocidos como estándar externo y estándar interno para realizar un análisis cuantitativo de un compuesto en una muestra por cromatografía?
- 2.-¿Qué cualidades se deben buscar en un compuesto para utilizarlo como estándar interno?
- 3.-¿Qué son y cómo se calculan el factor de respuesta (Fr) y el factor de respuesta relativo (Frr)?
- 4.-Indica los cálculos para preparar a una curva patrón de 2%, 4%, 6% , 8 % y 10% (v/v) en matraces de 10 mL. (Toma en cuenta para el cálculo el material volumétrico que se indica en la parte de material y equipo).

**LECTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.**

-La bibliografía recomendada es:  
Harold M. McNair. Cromatografía de Gases. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos (OEA) Washington, D.C. 1981  
Skoog , Holler y Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Quinta Ed. Editorial McGraw Hill 2001

**EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:**

Material por equipo de laboratorio.

Cromatógrafo de gases.

5 matraces aforados de 10 mL.

Pipetas volumétricas de 1, 2, 3, 4, 5, y 10 mL.

1 Jeringa de 10  $\mu$ l para cromatografía de gases.

1 tapón horadado para matraz kitasato de 500 mL.

3 Pipetas Pasteur.

2 Perillas de goma para pipeta Pasteur.

2 matraz aforado de 50 mL

1 Kitasato de 500 m.

1 Pipeta volumétrica de 2 mL

Propipeta.

2 Vasos de precipitado de 50 mL

Etanol (Grado R.A)

Acetona. (Grado R.A)

**GUÍA EXPERIMENTAL**

1.- Ajusta el cromatógrafo en condiciones adecuadas para llevar a cabo la separación de los analitos.

2.- Prepara una disolución de etanol a la concentración necesaria para que, por medio de pipetas volumétricas puedas tomar alícuotas adecuadas para preparar disoluciones estándar del orden de 2,4,6, 8 % y 10% (v/v) en matraces de 10 mL.

3.- Prepara una disolución de acetona que le permita por medio de una pipeta volumétrica, agregar una alícuota adecuada a los matraces mencionados en el punto anterior para obtener una concentración de acetona del 6% (v/v) en cada uno de ellos.

4.- Prepara la muestra a analizar a la concentración adecuada para que ésta se ajuste a los intervalos de concentración de la curva patrón. Agrega la acetona como estándar interno a la misma concentración que la de las disoluciones.

5.- Inyecta 1  $\mu$ l de cada una de las disoluciones estándar, así como de la disolución problema de la bebida comercial que se preparó.

**CUESTIONARIO:**

1.- Realiza la siguiente tabla de resultados con cada uno de los estándares de la curva patrón.

Inyección	$C_{\text{ETOH}}$	$C_{\text{ACET}}$	$A_{\text{ETOH}}$	$A_{\text{ACET}}$	$C_{\text{ETOH}}/C_{\text{ACET}}$	$A_{\text{ETOH}}/A_{\text{ACET}}$
1						
2						
3						
Promedio						

$C_{\text{ETOH}}$  = concentración de etanol.

$C_{\text{ACET}}$  = concentración de acetona.

$A_{\text{ETOH}}$  = área de la señal de etanol.

$A_{\text{ACET}}$  = área de la señal de acetona.

2.- Realiza la siguiente tabla de resultados para cada una de las disoluciones de la muestra I comercial:

Inyección	$A_{\text{ETOH}}$	$A_{\text{ACET}}$	$A_{\text{ETOH}}/A_{\text{ACET}}$
1			
2			
3			
Promedio			

3.- Muestras:

a) **Muestra (1): Bebida Comercial**

Datos de la muestra:

Muestra No.

Marca:

Lote:

Contenido del grado alcohólico reportado en la etiqueta:

4.- Grafica la curva patrón para el método de estándar externo ( $A_{\text{ETOH}}$  vs  $C_{\text{ETOH}}$ ) y realiza el cálculo de regresión lineal. Explica si hay tendencia lineal en los datos.

5.- Indica el valor del factor de respuesta del etanol ( $F_r$ , es la pendiente de la recta) en el método de estándar externo, y su respectivo intervalo de confianza.

6.- Grafica la curva patrón para el método de estándar interno  $A_{\text{ETOH}}/A_{\text{ACET}}$  vs  $C_{\text{ETOH}}/C_{\text{ACET}}$  y realiza el cálculo de regresión lineal. Explica si hay tendencia lineal en los datos.

7.- Indica el valor del factor de respuesta relativo del etanol ( $F_{rr}$ , es la pendiente de la recta) en el método de estándar interno, y su respectivo intervalo de confianza.

8.- Calcula y reporta el grado alcohólico de la muestra I comercial por :

Método de estándar externo: \_\_\_\_\_

Método de estándar interno: \_\_\_\_\_

9.- ¿Qué diferencias encuentras entre la precisión del método de estándar externo y del interno y por qué?

10.- ¿A qué conclusiones llegas con la utilización de método cuantitativo con estándar externo y por qué?

11.- ¿A qué conclusiones llegas con la utilización de método cuantitativo con estándar interno y por qué?



**PRÁCTICA No ANÁLISIS DE CAFEÍNA Y ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN CAFIASPIRINA.**

**ELABORÓ: GEORGINA DUARTE L., ADOLFO GARCÍA O., LUCÍA HERNÁNDEZ G. Y SILVIA MENDOZA A.**

**OBJETIVO:**

- Determinar cuantitativamente (por el método de estándar externo) el contenido de cafeína y ácido acetilsalicílico en un analgésico mediante cromatografía líquida de alta eficiencia.
- Demostrar las ventajas de la técnica en el análisis para el control de calidad.

**METAS:**

- Encontrar las condiciones experimentales adecuadas para obtener información analítica confiable.

**ENUNCIADO DEL PROBLEMA:**

**¿Cuál es el contenido de cafeína y del ácido acetilsalicílico en el medicamento analizado?**

**INFORMACION ADICIONAL:**

Columna: Empacada con fase estacionaria químicamente unida C<sub>18</sub>

Longitud: 5 cm.

Diámetro: 1/4 de pulgada.

Componentes por cuantificar: cafeína y ácido acetilsalicílico.

Muestra: Cafiaspirina®

**PREGUNTAS Y EJERCICIOS PREVIOS:**

1.- Calcula las cantidades de cafeína y ácido acetilsalicílico necesarias para preparar las disoluciones estándar a una concentración de:

Cafeína = 0.030 mg/mL.

Ácido acetilsalicílico = 0.50 mg/mL. Toma en cuenta para el cálculo, el material volumétrico que se indica en la parte de material y equipo.

2.-¿Cuál es el sistema de introducción de muestra que se utiliza en los cromatógrafos de líquidos de alta eficiencia?

3.-¿Cómo funciona el inyector de un cromatógrafo de líquidos para introducir la muestra al sistema?

4.-¿Qué ventajas y desventajas presenta este tipo de inyector?

**LECTURAS Y ACTIVIDADES COMPLEMENTARIAS.**

-La bibliografía recomendada es:

Harold M. McNair. Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

Skoog and Leary. Análisis Instrumental

**EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS:**

Material por equipo de laboratorio.

Cromatógrafo de líquidos

Matraces aforados

1 Embudo de vidrio de tallo largo

1 Kitasato de 500 mL.

1 Mortero con pistilo

1 Tapón horadado para matraz kitasato de 500 mL.

2 Vasos de precipitado de 50 ml.

2 Perillas de goma para pipeta Pasteur.

Propipeta.

3 Naves para pesa

1 Jeringa de 100 µl para cromatografía de líquidos.

Metanol (Grado R.A)

Papel filtro de filtración rápida (Whatman 2 ó 4)

Pipetas volumétricas

1 Sonicador

2 Pipetas Pasteur

Ácido acetilsalicílico (Grado R.A)

Disolución acuosa de ácido acético al 1% (v/v)

Estándar de cafeína

Espátula.

**GUÍA EXPERIMENTAL**

1. Ajusta el cromatógrafo en condiciones adecuadas para llevar a cabo la separación de tu muestra.
- 2.- Prepara una disolución estándar de cafeína (0.030 mg/mL) y ácido acetilsalicílico (0.50 mg/mL) en metanol.
- 3.- Calcula el peso promedio por tableta del medicamento a analizar.
- 4.- Muele 10 tabletas en un mortero, toma el peso aproximado de 5 tabletas en polvo, extrae los principios activos con 250 mL de metanol durante 30 minutos (realiza esto en la campana), filtra la disolución y el filtrado colócalo en un matraz aforado de 500 mL. Lleva la disolución a su aforo con metanol siendo esta la disolución de madre, de ahí tiene que realizar otra disolución para que quede a la misma concentración que el estándar de cafeína y ac. acetilsalicílico.
- 5.- Inyecta cada una de las disoluciones estándar así como la disolución problema que se preparó por triplicado.

**CUESTIONARIO:**

- 1.- Realiza la siguiente tabla de resultados con cada uno de los estándares de la curva patrón y la muestra.

**DISOLUCIONES ESTÁNDAR**

Inyección	$C_{\text{CAFEÍNA}}$	$C_{\text{ACET}}$	$A_{\text{CAFEÍNA}}$	$A_{\text{ACET}}$
1				
2				
3				
Promedio				

**MUESTRA**

Inyección	$A_{\text{CAFEÍNA}}$	$A_{\text{ACET}}$
1		
2		
3		
Promedio		
Desviación Estándar		

- 2.- Indica los valores del Factor de respuesta (Fr) que obtuviste para la cafeína y el ácido acetilsalicílico.
- 3.- ¿Cuál es la concentración de cafeína por mg/tableta?, calculando el intervalo de confianza a un nivel de significancia de 95%
- 4.- ¿Cuál es la concentración del ácido acetilsalicílico por mg/tableta?, calculando el intervalo de confianza a un nivel de significancia de 95%.
- 5.- ¿Qué ventajas y desventajas se observó durante la realización de esta práctica por el método de estándar externo, y el no realizarlo por estándar interno?