

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**"FUENTES DE ERROR EN EL ANALISIS  
CUANTITATIVO POR CROMATOGRAFIA  
DE LIQUIDOS DE ALTA EFICIENCIA"**

**T E S I S**

**Para obtener el grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA ANALÍTICA)**

**que presenta:**

**Q. LUCIA DEL CARMEN MARQUEZ ALONSO**

**México, 1994**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

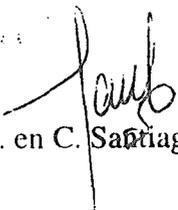
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Química del Instituto Politécnico de Virginia, E. U. A., bajo la asesoría del Dr. Harold M. McNair y del M. en C. Santiago Capella V., con apoyo económico del Instituto de Química de la U. N. A. M. y una beca otorgada por Varian de México.

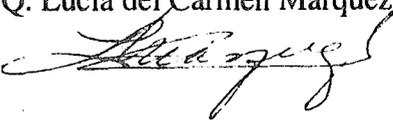
Jurado asignado:

Presidente	Dr. Armando Manjarrez Moreno
Primer vocal	Dr. José Luis Galván Madrid
Secretario	M. en C. Francisco Rojo Callejas
Primer suplente	Dra. Aracelli Peña Alvarez
Segundo suplente	M. en C. Luz Ma. Navarro Angulo

Asesor

  
M. en C. Santiago Capella Vizcaino.

Sustentante

Q. Lucía del Carmen Márquez Alonso.  


### **AGRADECIMIENTOS.**

Agradezco al Dr. Francisco Lara Ochoa Director del Instituto de Química por las facilidades otorgadas para la realización de esta tesis, al Dr. Harold M. McNair, al Dr. Yuri Kazakevich y al M. en C. Santiago Capella por su valiosa asesoría y a los miembros del grupo de investigación del Dr. H. M. McNair, en especial a la Dra. Maha Khaled, a la M. en C. Josette Heng por la ayuda que me brindaron durante mi estancia en el Tecnológico de Virginia.

A Poncho, Paco, Arturo, Alfonso, Carmela, Lil y Laura por su esfuerzo y paciencia,  
gracias a los cuales pude realizar esta tesis.

## RESUMEN.

En el análisis cuantitativo por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, es importante analizar las diferentes fuentes de error presentes en el sistema cromatográfico para obtener resultados confiables. En este trabajo se evalúan los errores que se originan en el inyector y en el detector de UV-visible que influyen en la precisión y exactitud del análisis cuantitativo, así como en la determinación del volumen de retención y especialmente en el volumen muerto de la columna cromatográfica.

Las fuentes de error del inyector que se estudian son la influencia del volumen, la concentración y el disolvente de la muestra. Basados en las áreas de los picos cromatográficos, se compara la repetibilidad de los resultados obtenidos con el inyector automático y con la válvula de inyección Rheodyne.

En cuanto al detector, primero se evalúan sus parámetros característicos como el ruido y el intervalo lineal, para posteriormente examinar la influencia de los grupos cromóforos de la muestra, la velocidad de flujo y la composición de la fase móvil en la precisión del análisis cuantitativo.

Debido a que en los equipos cromatográficos la identificación de los componentes de la muestra se lleva a cabo con los tiempos de retención, se estudia la repetibilidad de éstos y su influencia en la determinación del volumen muerto. En la literatura se han propuesto varias definiciones de volumen muerto, de ellas, se considera que la más apropiada es la que lo define como el volumen total del líquido en la columna. De acuerdo con esta definición se discute la validez de dos de los métodos más empleados para la medición del volumen muerto: el de la sustancia orgánica no retenida y el método de linealización de series homólogas. En esta tesis se demuestra que ninguno de estos dos métodos proporciona un valor de  $V_0$  único, independiente del flujo y de la composición de la fase móvil. Esto no se debe al error en la obtención de los tiempos de retención sino a que con el primer método, la sustancia no retenida es excluida parcialmente de la fase estacionaria, lo que da como resultado volúmenes de retención menores que el volumen

muerto; y con el método de linealización de las series homólogas, la relación entre el coeficiente de retención y el número de átomos de carbono de la cadena del homólogo no es lineal.

## INDICE

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>3</b>
<b>3. ANTECEDENTES Y TEORIA</b>	<b>4</b>
<b>4. EXPERIMENTAL</b>	<b>23</b>
<b>5. DISCUSION</b>	<b>27</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>97</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUCCION.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (CLAE) es una de las técnicas cromatográficas más empleadas, debido a su gran versatilidad y confiabilidad. Una gran variedad de solutos pueden ser analizados con esta técnica, la purificación de los componentes de mezclas complejas es una de las aplicaciones de la CLAE, lo mismo pueden aislarse moléculas de bajo peso molecular que biomoléculas, sin pérdida de la actividad biológica, esto ha traído como consecuencia que los cromatógrafos de líquidos hayan experimentado un rápido desarrollo a partir de la aparición del primer equipo comercial en 1960, y que se empleen en todas las ramas de la ciencia y la industria. Con el desarrollo de bombas más eficientes y detectores más sensibles se han incrementado la reproducibilidad y exactitud de los resultados. Estos avances junto con las columnas de alta eficiencia de que se dispone actualmente, hacen de la CLAE una técnica de separación muy poderosa.

El desarrollo alcanzado en la instrumentación y la teoría de la CLAE han ampliado las aplicaciones a una gran variedad de sustancias que incluyen polímeros, productos farmacéuticos y biológicos.

El objetivo del proceso cromatográfico es la separación de los diferentes componentes de una mezcla para su identificación y cuantificación. Esto se lleva a cabo mediante el desarrollo sistemático de un método, que depende de la naturaleza de la muestra, las propiedades y concentraciones de los compuestos. El desarrollo del método involucra varias etapas que incluyen: tratamiento de la muestra, elección del detector y condiciones de detección, elección de la columna y de la fase móvil. Una vez elegidas las condiciones, se realiza una corrida preliminar y a partir del resultado se estiman las condiciones óptimas para la separación, la cuantificación y finalmente, la validación del método para su empleo en el laboratorio <sup>1</sup>. Como en cualquier otra técnica analítica, cada etapa del proceso cromatográfico está sujeto a errores sistemáticos que deben ser eliminados para obtener resultados confiables. Con un estudio detallado de las fuentes de

error en cada parte del sistema cromatográfico pueden éstos ser controlados y con ello alcanzar altos niveles de precisión y exactitud en la determinación en los parámetros de retención y las áreas de los picos cromatográficos. La exactitud y precisión que se obtienen en los análisis cromatográficos está sujeta a errores en la preparación de la muestra, en la técnica de inyección, en la columna, en la detección y en el procesamiento de los datos.

Las fuentes de error presentes en los cromatógrafos de líquidos, han sido ya objeto de publicaciones en los años 80, pero los avances en el diseño y la fabricación de equipos más precisos y confiables requiere que éstas se revisen sistemáticamente, y se determine la confiabilidad y limitaciones de los cromatógrafos de líquidos actuales.

En la CLAE son muchas las fuentes de error que afectan la reproducibilidad de los resultados del análisis cuantitativo desde que se inyecta la muestra hasta que se obtiene el resultado, por tanto es necesario aislar e identificar la contribución de cada una de las partes del equipo a la precisión de la cuantificación. Una vez logrado este primer objetivo, debe ser posible establecer las condiciones óptimas en las cuales se obtenga mayor precisión que la reportada hasta ahora. En el inyector los parámetros que afectan la repetibilidad son principalmente: el volumen de inyección, la concentración de la muestra y la composición del disolvente de la muestra; en el detector de UV-visible, son importantes los errores debidos a la no linealidad de la respuesta, a la influencia de los grupos cromóforos, a la velocidad de flujo y a la composición de la fase móvil. Debido a que con los equipos modernos la cuantificación de las sustancias se lleva a cabo automáticamente identificando los compuestos en base a sus tiempos de retención, es importante evaluar la repetibilidad, en este aspecto. La falta de precisión de los tiempos de retención es particularmente importante en el cálculo del volumen muerto ( $V_0$ ) de la columna cromatográfica.

## 2. OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo se enlistan a continuación:

- 1.-Estudiar las fuentes de error en el inyector y en el detector de UV-visible.
- 2.-Establecer las condiciones óptimas en las cuales se obtenga mayor precisión que la reportada hasta ahora (desviación estándar relativa menor de 0.5% en cada una de las partes estudiadas).
- 3.-Estudiar los errores en la medición de los tiempos y volúmenes de retención y en particular en el del volumen muerto cuando se emplean los métodos de "la sustancia no retenida" y de "linealización de las series homólogas" (LSH).

### 3. ANTECEDENTES Y TEORIA.

#### 3.1. Exactitud y precisión.

Para los cromatógrafos de líquidos se han publicado reproducibilidades hasta del  $\pm 0.25\%$  de desviación estándar relativa (DER) en condiciones óptimas, sin embargo, en la mayoría de las publicaciones y en el trabajo con muestras reales, el valor promedio de DER no es menor al 1.5%. Este valor puede reducirse significativamente si se identifican y controlan los errores.

Los errores se evalúan a partir de la exactitud y la precisión. La exactitud se define como la diferencia entre el valor real y el experimental y se calcula estadísticamente con la prueba t de Student <sup>2</sup>. Depende de factores que incluyen: el muestreo, la matriz que contiene a la muestra, la sensibilidad del método, la precisión en el funcionamiento del equipo, los patrones y el método de calibración, entre otros.

La precisión está definida como la reproducibilidad y repetibilidad de las medidas y depende del instrumento, del método y de la técnica de medición empleada. Se calcula como la desviación estándar de los datos experimentales. La desviación estándar de un conjunto de mediciones  $S_x$  da un criterio de precisión de los datos y está definida por:

$$S_x = \left[ \frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \right]^{1/2} \quad (1)$$

La precisión también puede ser expresada como la desviación estándar relativa (%DER) también llamado coeficiente de variación, que es la desviación estándar dividida por la media:

$$\%DER = \frac{S_x}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

Para comparar las desviaciones estándar de dos poblaciones de datos se emplea la prueba F en la que se calcula el valor de "F" como el cociente de las dos varianzas muestrales:

$$F_{(n_1, n_2)} = \frac{S_1^2}{S_2^2} \quad (3)$$

donde  $n_1$   $n_2$  son los grados de libertad de cada una de las muestras. Siempre se eligen  $S_1$  y  $S_2$  de tal forma que la razón sea  $\geq 1$ . La hipótesis nula que se propone es que las poblaciones sean normales y que sus varianzas sean iguales, la diferencia con respecto a uno se debe a variaciones aleatorias o bien a que las varianzas son diferentes. Si el valor obtenido de F excede el crítico, la hipótesis nula se rechaza con un nivel de significación<sup>2</sup>. Otra prueba que permite comparar las varianzas de varias muestras a la vez es la de Bartlett<sup>3</sup> en la que se calcula el parámetro "M" :

$$M = \sum_{j=1}^p (x_j - 1) \log_e S^2 - \sum_{i=1}^p (n_i - 1) \log_e S_i^2 \quad (4)$$

$S_i$  es la varianza del procedimiento i con  $n_i$  determinaciones y  $n_i - 1$  grados de libertad y  $S^2$  es:

$$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^p (n_i - 1) S_i^2}{\sum_{i=1}^p (n_i - 1)} \quad (5)$$

M presenta una distribución  $\chi^2$  con p-1 grados de libertad, p es el número de procedimientos que se evalúan. Al igual que en la prueba F un valor de M mayor que el valor crítico de  $\chi^2$  indica que las varianzas son diferentes.

Por último, el error estándar (Ee) o precisión de la media, es una medida de la confianza que se puede tener en la media calculada a partir de un conjunto de medidas <sup>3</sup>. Está definido como:

$$Ee = \frac{S}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

De acuerdo con las reglas de propagación de los errores al azar <sup>2</sup>, si se conoce la precisión de cada etapa del proceso cromatográfico, inyección, detección, integración y separación en la columna, es posible calcular la precisión total del análisis con relaciones matemáticas simples <sup>2</sup>.

La mayor precisión en el análisis cromatográfico se obtiene cuando los picos cromatográficos son estrechos, simétricos y de una altura por lo menos diez veces mayor que el ruido en la línea base. Estos picos ideales sólo se obtienen cuando los cromatógrafos están provistos de sistemas de inyección, bombas y detectores de funcionamiento preciso y cuando se trabaja con columnas de alta eficiencia con conexiones de bajo volumen, y las muestras están en una concentración superior al límite de detección.

La forma de los picos cromatográficos se ve fuertemente afectada por el ensanchamiento de las bandas debido a los volúmenes de las conexiones. Por este motivo el volumen (o longitud) de la tubería que une al sistema de inyección y al detector con la columna debe ser mínimo. Se puede calcular el volumen máximo que puede tener, para que el ancho del pico no se incremente en más de un 5% <sup>4</sup> relacionando el diámetro del tubo, la velocidad de flujo, la difusividad de la fase móvil, el volumen de retención del soluto y la

eficiencia de la columna; las precolumnas también contribuyen a incrementar el ancho del pico cromatográfico. Finalmente, el volumen de la celda del detector produce el mismo efecto en la precisión por el ensanchamiento de los picos cuando éste es mayor al 10% del volumen del pico detectado, pero es insignificante para celdas entre 6 y 10  $\mu\text{L}$ .

### **3.2.Fuentes de error en los inyectores.**

#### **3.2.1.Tipos de Inyectores.**

El objetivo del inyector es introducir una cantidad conocida de muestra en la columna en forma de una banda estrecha sin afectar la eficiencia de la columna. Hay varios tipos de inyectores para CLAE: inyectores con septum, inyectores sin septum, válvulas de inyección e inyectores automáticos. Los errores se presentan en los instrumentos con los que se mide el volumen de inyección por el volumen de las conexiones y por la técnica del operador. En los dos primeros tipos de inyectores, el volumen a introducir es medido con una microjeringa y la máxima reproducibilidad reportada es de 2% de DER <sup>5</sup>. En las válvulas de inyección, el volumen de muestra se puede medir de dos maneras: introduciendo volúmenes parciales del rizo, en cuyo caso, la precisión es la misma que la que se obtiene cuando se usa microjeringa; o bien, usando rizos de inyección de diferentes volúmenes. La reproducibilidad que se puede obtener cuando se introduce el volumen total del rizo de inyección es mayor al 0.2% <sup>5</sup>, ya que con esta técnica, la precisión en la inyección es independiente del operador. En ocasiones, algunas muestras presentan adsorción en la superficie metálica, lo que afecta la reproducibilidad.

Los inyectores automáticos tienen la ventaja de que permiten la introducción de gran número de muestras de forma ininterrumpida sin necesidad de operador. En este tipo de inyectores las conexiones tienen, por lo general, un volumen muerto mayor que las válvulas. Parte de la muestra se queda en estos tubos y ocasionan el problema de residuo de muestra en el rizo de inyección, que afecta la reproducibilidad. Para evitarlo es necesario lavar el inyector después de cada inyección. Este procedimiento mejora la reproducibilidad sobre todo cuando se trabaja con muestras muy diluídas, pero también

incrementa el tiempo de análisis. Rehman et al<sup>6</sup> describe un procedimiento para probar el funcionamiento correcto de los inyectores automáticos, y reporta valores de DER de los tiempos de retención y áreas de los picos cromatográficos del fenol y anisol menores al 0.3% para seis diferentes cromatógrafos de líquidos comerciales.

La precisión en la determinación de las áreas varía con el volumen inyectado cuando se emplean inyectores automáticos. La presión también influye en la reproducibilidad cuando ésta es mayor de 2000 psi .

Para cualquier tipo de inyector, la exactitud en el volumen inyectado depende de la calidad y precisión de los rizos de inyección y de las jeringas, así como del volumen interno del inyector. Por ello, cuando se trabaja con cromatógrafos de líquidos se debe prestar atención al volumen muerto de las conexiones entre el inyector y la columna, entre ésta y el detector y al volumen de la celda del detector.

### **3.2.2. Tamaño de muestra.**

La exactitud del volumen y concentración de la muestra inyectada está sujeta a la exactitud de las diferentes mediciones involucradas en su preparación y en la preparación de los patrones. Los métodos pueden ser muy diferentes de una muestra a otra, lo que hace difícil hacer una generalización.

La reproducibilidad varía también con el tamaño de la muestra, éste debe ser escogido de acuerdo a la linealidad y a la cantidad mínima detectable, que son diferentes según el tipo de detector y a la capacidad de la columna.

Done<sup>7</sup> publicó una relación entre la capacidad relativa (peso de la muestra por gramo de adsorbente) y la eficiencia de la columna cromatográfica. Se ha demostrado que la eficiencia de la columna disminuye cuando la masa inyectada aumenta, por sobrecarga de la misma. La integración de los picos asimétricos y anchos, característicos de estos casos, presenta muchos problemas y es imprecisa. Para evitar una pérdida significativa de eficiencia, el autor<sup>5</sup> recomienda introducir menos de 10 µg de cada compuesto por gramo de adsorbente en las columnas de sílica y fase reversa de tamaño de partícula de 10 µm.

En las columnas de alta eficiencia la cantidad máxima que se puede introducir para obtener resultados reproducibles debe ser determinada experimentalmente.

La mayoría de los cromatógrafos comerciales modernos, equipados con un inyector automático o con una válvula Rheodyne están provistos de conexiones de volumen muerto mínimo, su operación es sencilla y prácticamente independiente del operador, por lo que los parámetros importantes a estudiar para establecer el intervalo de éstos que permita una buena reproducibilidad, son la influencia de la concentración y del volumen de inyección de la muestra. A la combinación del volumen y la concentración de la muestra que se introduce en el equipo, le llamaré "tamaño de la muestra".

### **3.2.3. Disolvente de la muestra.**

Se ha publicado en la literatura<sup>8,9</sup> que el disolvente empleado para diluir la muestra en Cromatografía Líquida en fase reversa (CLFR) afecta tanto la forma y altura de los picos como el tiempo de retención de los solutos. Hoffman<sup>8</sup> observó una disminución gradual de la altura del pico y la aparición de más de un pico para un sólo compuesto cuando el disolvente de la muestra tiene una fuerza eluyente mayor que la que presenta la fase móvil. La altura de los picos se incrementa en compuestos con factores de capacidad ( $k'$ ) mayores a 3 cuando se usa un disolvente más débil que la fase móvil, en el caso de mezclas eluyentes que contengan de 40 a 60% de metanol en agua<sup>9</sup>. Este efecto es muy útil en algunos casos, porque mejora la confiabilidad en la cuantificación, ya que disminuye los errores asociados con la integración de picos pequeños, y se puede aplicar, por ejemplo, al análisis de trazas de compuestos solubles en agua. El análisis cuantitativo de trazas no fue considerado en este estudio ya que la precisión en este tipo de análisis es, en general, muy pobre.

### **3.3.Fuentes de error en la detección por UV.**

#### **3.3.1. Tipos de detectores de UV-visible.**

El detector de UV se eligió para este trabajo por ser el más empleado en CLAE. Los detectores de UV son considerados por algunos autores como casi universales, debido a que muchos compuestos orgánicos que son analizados por CLAE muestran absorción en la región UV-visible del espectro. El uso de estos detectores está limitado a longitudes de onda mayores a los 200 nm, región en la que los disolventes comúnmente empleados como fase móvil son transparentes.

Hay cuatro tipos de detectores de UV-visible:

- a) Detectores de longitud de onda fija.
- b) Detectores de longitud de onda múltiple.
- c) Espectrofotómetros.
- d) Detectores de arreglo de fotodiodos.

Es obvio que el funcionamiento del detector es de gran importancia para la exactitud del análisis por CLAE, la exactitud en la longitud de onda, la vida media de la lámpara, así como las constantes de la celda y su diseño son importantes para la exactitud y repetibilidad del análisis cuantitativo. Para un detector dado, los parámetros que indican su buen funcionamiento son: el ruido, su respuesta y su sensibilidad. La precisión del análisis cuantitativo depende de que la relación entre la respuesta del detector sea lineal, pero en la práctica esta relación no es lineal para todas las concentraciones sino que está restringida a un intervalo llamado intervalo lineal.

#### **3.3.2.Definiciones.**

**Ruido.** Hay tres clases de ruido: el ruido a corto plazo, el ruido a largo plazo y el desplazamiento de la línea base. Las definiciones de la American Society for Testing and Materials (ASTM) <sup>10</sup> son las siguientes:

"Ruido a corto plazo es la amplitud máxima, en unidades de absorción, para todas las variaciones al azar de la señal del detector, de una frecuencia igual o mayor a 1 ciclo por minuto, normalizado a una longitud de celda de 10 mm".

"Ruido a largo plazo es toda variación de la frecuencia en el intervalo comprendido entre 6 y 60 ciclos por hora".

"Desplazamiento de la línea base es la pendiente promedio del ruido expresada en unidades de absorción por hora". El desplazamiento representa la señal que puede ser confundida con un pico ancho a tiempos de retención muy largos.

Respuesta. Es la señal generada por una cantidad de muestra dada. Esta señal depende, de los grupos cromóforos de los componentes de la muestra y de la longitud de onda a la que se obtiene.

Cantidad mínima detectable (CMD). Está definida como aquella concentración que produce un pico con una absorción del doble del nivel del ruido a corto plazo.

Sensibilidad. La sensibilidad de la detección definida como el cociente entre el tamaño de la señal y la cantidad de sustancia detectable. Depende de la absorción molar de los compuestos en la muestra para una cierta longitud de celda. Esta absorción depende a su vez del cromóforo y de la longitud de onda a la que se haga la determinación.

Intervalo lineal. Algunos autores<sup>11</sup> tomaron el término intervalo lineal de los procedimientos establecidos por la ASTM para la evaluación de los detectores que se emplean en Cromatografía de gases y lo trasladaron a los detectores de UV. La ASTM<sup>10</sup> definió el término "intervalo dinámico" como el intervalo de concentraciones de una sustancia que produce un cambio en la señal del detector e intervalo lineal como aquél en el cual la respuesta del detector es lineal con una desviación estándar menor de  $\pm 5\%$ . El límite inferior del intervalo lineal recibe el nombre de (CMD).

### **3.3.3. Métodos y determinaciones.**

Rheman<sup>6</sup> sugiere procedimientos para medir el ruido y el intervalo lineal. El ruido se determina mediante una prueba estática, que se realiza con el detector separado del

cromatógrafo, y otra dinámica, con el disolvente fluyendo en la celda. El funcionamiento del cromatógrafo (bombas, inyector y columna) se evalúa comparando los resultados de la prueba estática con la dinámica. Una vez que se mide el ruido se puede calcular el intervalo lineal y por tanto la cantidad mínima detectable. Para determinar el intervalo lineal<sup>11</sup>, se inyecta una serie de soluciones de diferente concentración de un estándar y se obtienen primero las áreas (respuesta del detector). Se traza una gráfica concentración vs área y se calcula el intervalo lineal aplicando el método de mínimos cuadrados, como recomienda la ASTM. En cuanto a los detectores de longitud de onda fija, recomienda el uso de sustancias que muestren una banda espectral ancha en la vecindad de la longitud de onda escogida para el análisis. El analista debe tener presente que el intervalo lineal es menor si se trabaja con compuestos cuya banda espectral es angosta. En la práctica, es raro encontrar que una longitud de onda coincida en la zona del máximo o en una banda espectral ancha para cada compuesto de la mezcla que se analiza, por tanto, el elegir para esta prueba un compuesto cuya banda espectral sea estrecha, da una idea más precisa de las limitaciones del detector en cuanto a linealidad se refiere<sup>12</sup>.

Hay varios reportes en la literatura<sup>13</sup> que indican que algunos detectores de UV a pesar de mostrar una relación lineal con coeficientes de correlación mayores a 0.99 tienen una respuesta no lineal en alguna zona de su intervalo dinámico, lo que ocasiona, en algunos casos, errores hasta de 4000%. La falta de linealidad de la respuesta del detector conduce a resultados erróneos sólo si ésta no es tomada en cuenta. Cuando se trabaja con un detector no lineal se pueden aplicar algunos tratamientos matemáticos para calcular la concentración de los solutos<sup>14</sup>. Uno de éstos son las curvas de linealidad propuestas por Dorschel<sup>13</sup>. Dichas curvas se obtienen trazando una gráfica del cociente que resulta de dividir la respuesta del detector entre la concentración de cada una de las soluciones, llamada "sensibilidad" "(S)" vs el logaritmo de la concentración de las diferentes

soluciones del estándar. El intervalo lineal se selecciona de acuerdo con la concentración del soluto en la muestra a cuya concentración se desea determinar.

En esta tesis se comparan los intervalos lineales para el benceno, el tolueno y el antraceno, determinados siguiendo el procedimiento propuesto por ASTM y con las curvas de linealidad propuestas por Dorschel para evidenciar una posible fuente de error que afecta de manera importante la exactitud de la cuantificación.

Además de los errores debidos a la linealidad de la respuesta del detector, existen otros como los publicados por Bakalyar en 1976<sup>15</sup>. Este autor encontró que cuando el porcentaje del disolvente orgánico en la fase móvil se incrementa en 1%, las alturas de los picos cromatográficos disminuyen, pero las áreas de los picos permanecen iguales. La dependencia de la altura de los picos en la composición de la fase móvil fue mayor para los tiempos de retención más largos. En otro experimento, el autor encontró que las áreas de los picos aumentaron al disminuir la velocidad de flujo, mientras que las alturas de los picos no cambiaron, ni en el análisis isocrático ni en el que emplea gradientes.

#### **3.4. Fuentes de error en la determinación de los volúmenes de retención.**

La identificación de los componentes de una muestra, empleando solamente la CLAE no es tarea fácil, requiere de información sobre los componentes que pudieran estar presentes en la muestra y de patrones para comparar los tiempos de retención. Alternativamente, se puede aislar una pequeña cantidad de cada compuesto para ser identificado por métodos espectroscópicos, o aun mejor, se puede llevar la separación a la escala preparativa, para caracterizar los compuestos por métodos químicos. Recientemente, el avance en el desarrollo de instrumentos acoplados a espectrofotómetros de IR, o espectrómetros de masas facilitan el análisis en serie de las bandas correspondientes a los componentes de la muestra. Los tiempos de retención no solamente se emplean para identificar los componentes de una muestra por comparación con patrones sino que son la medida básica de la retención de un compuesto y permiten la optimización de las condiciones para su separación, de aquí la importancia de medirlos con un buen nivel de precisión.

tiempos de retención en CLAE están fuertemente afectados por la velocidad de flujo y la composición de la fase móvil, es obvio entonces, que para comparar los datos de retención de un compuesto, la velocidad de flujo y el la composición del eluyente deban ser controlados estrictamente. En CLAE la comparación directa de los datos obtenidos en diferentes laboratorios es difícil porque los volúmenes de retención de los solutos dependen de la elección del sistema de separación, es decir, de la columna (dimensiones y características del empaque), de la fase móvil, de la velocidad de flujo y de la temperatura. Además, es bien sabido que los tiempos de retención y la resolución varían ampliamente en columnas procedentes de diferentes fabricantes, aún cuando se usen condiciones idénticas. Para evitar estos problemas, en vez de los tiempos de retención, se emplean los factores de retención ( $k'$ ) que permiten la identificación y ayudan a predecir la retención de los solutos, para optimizar el método de análisis. El factor de retención ( $k'$ ) es el parámetro adimensional más útil para la caracterización de los picos durante el desarrollo del método de análisis. El conocimiento del valor del tiempo muerto  $t_0$  o volumen muerto  $V_0$  es indispensable para el cálculo de  $k'$  y de la selectividad ( $\alpha$ ) para la optimización de la separación. La determinación del volumen muerto y su definición han sido objeto de más de 100 publicaciones<sup>16</sup>, pero aún no hay un método ni una definición universalmente aceptados. A continuación se presentan las definiciones y se describen tres de los métodos propuestos por varios autores<sup>16 a 23</sup> para la determinación de  $V_0$  por ser los más frecuentemente empleados: 1) el método estático; 2) los métodos que hacen uso de sustancias no retenidas y 3) el método de linealización de las series homólogas.

#### 3.4.1. Definición de $V_0$

El término volumen muerto fue definido en principio para cromatografía de gases como el volumen de retención de una cantidad infinitesimal del gas no adsorbido por la fase estacionaria que viaja a través de la columna. Esta definición no puede ser directamente trasladada a la cromatografía de líquidos en fase reversa (CLFR) debido a las propiedades de la fase móvil, tan diferentes a las de la fase gaseosa. Estas propiedades incluyen la

difusión de los líquidos que es menor que la de los gases y la interacción que existe entre las fases estacionaria y móvil en la CLAE. Esta interacción provoca la formación de un lecho estacionario formado por el modificador orgánico de la fase móvil que se adsorbe sobre la fase estacionaria <sup>4</sup>, fenómeno que no ocurre en cromatografía de gases. Este lecho cambia de volumen y composición con la composición de la fase móvil. La ausencia de una frontera bien definida entre las fases móvil y estacionaria hace la definición de  $V_0$  muy difícil.

Algunos investigadores <sup>17-19</sup> aceptan que la porosidad total de la columna es el parámetro que tiene un significado físico, pero su determinación es difícil e imprecisa.

Möckel and Freyholdt <sup>20</sup> definen  $V_0$  como el producto del tiempo que pasa una molécula de muestra en la fase móvil por el flujo, cuando éste último es constante. Ellos calculan  $V_0$  como la suma del volumen intersticial y el volumen total de los poros del adsorbente en la columna. En esta aproximación, no se consideró la exclusión parcial o total que presentan algunos compuestos, por tanto Scott y Kucera <sup>22</sup> proponen que se considere sólo el volumen intersticial y de los poros que es accesible a las moléculas de la muestra. Esta proposición implica que, como es común, en una muestra con moléculas de diferente volumen se obtienen varios valores de  $V_0$  para la misma columna. Los mecanismos de exclusión han sido estudiados por Knox <sup>23</sup>, que los diferencia en dos clases: mecanismo entrópico, debido a efectos estéricos y mecanismo entálpico, debido a efectos energéticos. Smith et al <sup>18</sup> proponen que se tome como valor de  $V_0$  el volumen de exclusión total. Laub y Madden <sup>24</sup> establecen que el soluto que se emplee para la determinación de  $V_0$  debe tener el mismo volumen hidrodinámico que el compuesto que se analiza, ya que el valor de  $V_0$  depende del tamaño de la molécula. Como en el caso anterior, esta condición es difícil de cumplir cuando se analizan mezclas complejas ya que ese volumen cambia con la composición de la fase móvil.

Dreyer <sup>16</sup> define  $V_0$  como el volumen accesible a las moléculas no adsorbidas y parcialmente excluidas durante la cromatografía de la muestra. Esta definición es

inadecuada puesto que en CLFR no se dispone de compuestos que no muestren alguna interacción con la fase estacionaria. Cuando se emplean solutos total o parcialmente excluidos para determinar  $V_0$  el problema es el mismo :  $V_0$  no es constante para una columna dada, y en ocasiones puede ser mayor que el tiempo de retención de algunos componentes de la muestra, dando como resultados valores de  $k'$  negativos.

Por último, Kazakevich<sup>25</sup> propone que  $V_0$  debe tomarse como una constante que depende solamente de los parámetros geométricos de la columna cromatográfica. Esta condición es congruente con la descripción termodinámica del proceso de separación, pero es incompatible con la mayoría de las definiciones propuestas, en las que el valor de  $V_0$  depende del compuesto y de la fase móvil empleados para su determinación.

### **3.4.2. Medición de $V_0$ .**

$V_0$ , considerado como el volumen intersticial, puede ser calculado a partir del volumen de los poros del adsorbente, estimando la densidad y la porosidad del empaque, pero los resultados obtenidos de esta forma son imprecisos. En la literatura se han propuesto varios métodos para la medición de  $V_0$ , que pueden ser clasificadas en dos categorías principales: estáticos y dinámicos.

#### **3.4.2.1. Métodos estáticos.**

En uno de estos métodos, se determina el volumen máximo accesible a las moléculas del disolvente. Consiste en dos etapas principales: 1) llenar la columna empacada con un disolvente y 2) pesarla una vez que esté llena. El proceso se repite con otro disolvente de diferente densidad. Para este procedimiento se han empleado diferentes pares de disolventes como acetonitrilo-tetracloruro de carbono<sup>26</sup>, acetonitrilo-metanol<sup>27</sup>, metanol-tetracloruro de carbono<sup>28-30</sup>. Fini<sup>31</sup> propone una variante de éste método, después de pesar la columna con cada uno de los disolventes, la pesa vacía, lo cual es impráctico.

La exactitud en la medición del valor de  $V_0$  con el método estático es baja, y en él no se consideran los efectos de solvatación de los componentes de la muestra, por lo tanto, este

Hay varios métodos dinámicos<sup>38, 51-54</sup> para la determinación de  $V_0$ , aquí sólo se describen los más comúnmente empleados, y se dividieron en dos categorías: métodos que usan compuestos no retenidos y la linealización de las series homólogas.

**3.4.2.2.1. Métodos con compuestos no retenidos.** En Cromatografía de gases el valor de  $V_0$  se calcula como el producto del tiempo de retención de un compuesto no retenido por el flujo. Este método fue trasladado a la CLAE en la que se han empleado diferentes tipos de compuestos. En general, estos compuestos se pueden dividir en cuatro categorías: componentes de la fase móvil, compuestos marcados isotópicamente, compuestos inorgánicos y compuestos orgánicos.

**Componentes de la fase móvil.** Los componentes de la fase móvil han sido empleados para determinar  $V_0$ , en lo que se conoce como el método del pico de perturbación menor<sup>28</sup>. Este procedimiento involucra la inyección de mezclas binarias de los mismos disolventes usados como fase móvil en concentraciones ligeramente diferentes. Los picos correspondientes a cada uno de los disolventes son detectados por índice de refracción. En este método, los volúmenes de retención dependen de la isoterma de adsorción de los componentes de la fase móvil.

**Compuestos marcados isotópicamente.** Estos compuestos han sido utilizados en muchos estudios para determinar el volumen muerto de columnas de CLFR, sin embargo la necesidad de disponer de detectores y técnicas especiales para el manejo de compuestos radiactivos hace que ésta técnica sea poco empleada. Los compuestos más utilizados son los deuterados, y entre ellos principalmente el  $D_2O$ .

En un estudio llevado a cabo por Berendson<sup>29</sup> se comparan los tiempos de retención del agua con sus análogos deuterados empleando mezclas metanol-agua como fase móvil en varias columnas empacadas con fases alquilsilicon químicamente unidas. Así se obtuvieron valores de  $V_0$  consistentes, excepto para muy bajas concentraciones de compuestos deuterados. En este caso, los tiempos de elución para el metanol y el

obtuvieron valores de  $V_0$  consistentes, excepto para muy bajas concentraciones de compuestos deuterados. En este caso, los tiempos de elución para el metanol y el  $CD_3OD$  dependen de la composición de la fase móvil y también, ligeramente, de la temperatura.

Mc Cormick y Karger <sup>28</sup> al probar diferentes fases móviles compuestas por acetonitrilo-agua, tetrahidrofurano-agua y metanol-agua y análogos deuterados de estos tres disolventes, encontraron que la inyección de la fase móvil enriquecida con compuestos deuterados produce dos picos, cuando se usa un detector de índice de refracción. Uno de los picos corresponde al tiempo de retención del disolvente no deuterado y el otro al del deuterado. Cuando se inyecta una fase móvil enriquecida con  $D_2O$ , desaparece el pico. Esto lo explican suponiendo que cuando se establece un equilibrio entre la fase móvil y la estacionaria en una columna de CLFR, el modificador orgánico es prácticamente extraído por la fase estacionaria debido a su hidrofobicidad. Si el equilibrio se desplaza por la inyección de un compuesto, la composición de la fase que contiene el modificador orgánico extraído variará para contrarrestar los cambios en el equilibrio entre la fase móvil y la fase estacionaria. En este caso se observa un desplazamiento o la desaparición de una banda en el cromatograma. La desventaja de este método es la baja respuesta del detector de índice de refracción al  $D_2O$  con ciertas composiciones de la fase móvil, reportada por Billet <sup>32</sup> quien para evitar este problema, recomienda usar un detector de plasma inducido por microondas, que da mejores resultados, pero presenta algunos problemas con fases compuestas de tetrahidrofurano, además su alto costo hace difícil su empleo.

Otra desventaja del uso del metanol deuterado, es que presenta interacciones con los grupos silanol residuales de la fase estacionaria cuando la fase móvil es agua pura. En este caso particular, los valores de  $V_0$  que se obtienen son mayores que la porosidad máxima de la columna.

En conclusión, la identificación del pico del  $D_2O$  es difícil, y en el mejor de los casos éste método da una aproximación del valor de  $V_0$  sólo con algunas composiciones de la fase móvil.

Compuestos inorgánicos. Este método consiste en inyectar soluciones diluídas de sales ionizables en fases móviles acuosas no tamponadas. Se han probado muchas sales inorgánicas con resultados no satisfactorios <sup>29</sup>, las dificultades se presentan a causa de la dependencia del valor de  $V_0$  en el tipo de sal, su concentración en la fase móvil y la poca solubilidad de estas sales en soluciones metanol-agua.

Compuestos orgánicos. Algunos compuestos orgánicos que se han empleado para medir el  $V_0$  son: uracilo<sup>33-35</sup>. Bencensulfonatos <sup>36</sup>, nitrobenzono <sup>37</sup>,  $\beta$ -caroteno <sup>38</sup> tetracloroetano <sup>39</sup>, tartrazina, floroglucinol <sup>40</sup>, acetona <sup>41,42</sup>, ácido benzoico <sup>43</sup>, fructosa <sup>44,45</sup>, fluoreno <sup>42</sup>, citosina <sup>46</sup>, dimetilformamida <sup>47</sup> y algunos alcanos <sup>48</sup>. De éstos, el uracilo es el más frecuentemente empleado, a pesar de que Wells <sup>49</sup> reporta que el valor de  $V_0$  medido por este método depende de la composición de la fase móvil.

**3.4.2.2.2. Linealización de los datos de retención de las series homólogas (LSH).** Se ha encontrado una relación lineal entre el logaritmo natural de  $k'$  y el número de carbonos del soluto para series homólogas. El  $\ln k'$  de un compuesto dado está relacionado con la fracción molar del modificador orgánico en la fase móvil. Esta linealidad puede ser explicada con base en la aditividad de la interacción superficial entre cada átomo o grupo en la molécula del soluto con la fase estacionaria. En este caso, el  $\ln k'$  debe representar la energía libre asociada al sistema soluto-fase estacionaria. Esta proposición debe ser probada experimentalmente, tomando en cuenta y estimando los diferentes errores experimentales en la determinación de  $k'$ . Los mecanismos de retención de un compuesto formado de un núcleo y una sólo cadena hidrocarbonada fueron estudiados por Martin <sup>50</sup>, quien propone una ecuación que predice una relación lineal entre la energía libre ( $\Delta G$ ) involucrada en el paso del compuesto de la fase móvil a la fase estacionaria y el número de átomos de carbono de la cadena. Ya que la energía libre está relacionada con la

retención del soluto, ésta puede relacionarse asimismo, con el factor de retención ( $k'$ ), por medio de una relación lineal entre el  $\ln k'$  y el número de átomos de carbono de la cadena del soluto. La pendiente de la curva obtenida corresponde a la disminución de la energía libre asociada con la adición de cada metileno a la cadena del soluto. Esta linealidad ha sido observada en las fases alquilo químicamente unidas <sup>51</sup>. El principal mecanismo de retención en este caso, es el efecto solvofóbico <sup>52</sup>. La energía libre de transferencia de un soluto de una fase a otra es proporcional a la reducción del área superficial de la molécula de soluto y la cadena químicamente unida a la fase estacionaria inmersa en la fase móvil y resulta de la asociación del soluto con la cadena unida a la fase estacionaria <sup>53</sup>.

El factor de retención representa la proporción del tiempo que la molécula de soluto pasa en la superficie y el que pasa en la fase móvil.  $k'$  puede considerarse proporcional a la constante de equilibrio de la siguiente reacción de intercambio en la superficie:



donde  $M^I$  es la molécula de soluto en la fase móvil, S es la molécula de disolvente y A es el sitio sobre la superficie de la fase estacionaria.

Berendson, basado en el comportamiento lineal de la relación  $\ln k'$  - número de átomos de carbono del soluto, propuso <sup>29</sup> la siguiente ecuación que permite calcular el tiempo muerto conociendo los tiempos de retención de dos miembros consecutivos de una serie homóloga.

$$t_{R(n-1)} = At_{R(n)} - (A-1)t_0 \quad (8)$$

donde  $t_0$  es el tiempo muerto,  $t_R$  es el tiempo de retención y A es una constante. Trabajando con mezclas metanol-agua como fase móvil y fases estacionarias alquilsilil

químicamente unidas, encontró que  $t_0$  disminuye al aumentar el contenido de metanol en la fase móvil. Yonker<sup>54</sup> completó el estudio de Berendson al emplear acetonitrilo y tetrahidrofurano como modificadores orgánicos en la fase móvil, y llegó a la misma conclusión:  $V_0$  depende del modificador orgánico empleado.

Para obtener exactitud aceptable con el método de LSH, se deben hacer varias inyecciones de cada uno de los miembros de la serie homóloga elegida, procedimiento tedioso y largo. Se han llevado a cabo muchos intentos para crear programas de cómputo y procedimientos matemáticos que, basados en pocas mediciones, permitan predecir el comportamiento de toda la serie homóloga<sup>45</sup>.

El comportamiento de las series homólogas en CLFR ha sido estudiado por varios autores. Colin<sup>51</sup> investigó las series de n-alkilbencenos, polimetilbencenos, polimetilfenoles, clorobencenos y nitrobencenos usando diferentes columnas y fases móviles. En este trabajo, las curvas de linealidad de  $\log k'$  contra el número de átomos de carbono del soluto (n) es consistente sólo para la serie de alkilbencenos, pero en un estudio posterior, el mismo autor empleó un mayor número de mezclas binarias conteniendo agua, metanol, tetrahidrofurano y acetonitrilo y también encontró relaciones lineales. Además, encontró que las curvas correspondientes a cada serie homóloga convergían en un punto de intersección, con ligeras desviaciones que fueron ajustadas por el método de mínimos cuadrados para mejorar la convergencia. El sistema acetonitrilo-agua presentó un comportamiento diferente, se obtuvieron dos puntos de intersección uno para las fases móviles con menos de 50% de agua y otro para las que contenían más de 50% de agua. Las diferencias en los puntos de intersección y las pendientes de las diferentes series homólogas no son los únicos problemas que dan como resultado diferentes valores de  $V_0$ , algunos autores<sup>30</sup> encontraron discontinuidades en las gráficas de  $\ln k'$  vs n en el punto en el que la longitud de la cadena unida al adsorbente de la fase estacionaria es igual a la de la cadena del soluto. Este número de carbonos llamado

"crítico", muestra una dependencia en la composición de la fase móvil, pero es independiente del grupo funcional que constituye el núcleo de la serie homóloga.

Cölmsjo<sup>55</sup> obtuvo muy buenos resultados para cinco hidrocarburos poliaromáticos usados como serie homóloga con columnas de sílice, de sílice con grupos ciano y con grupos amino. En contraste, algunos autores<sup>56-58</sup> señalan que la linealidad no se aplica a los miembros inferiores de las series homólogas. En artículos separados, Smith y Burr, Boguez y Anderjan<sup>56,57</sup> reportan estas desviaciones para los n-alquilbencenos y para los nitroalcanos, respectivamente. Recientemente, Yamauchi<sup>58</sup> observó desviaciones de la linealidad para los primeros miembros de la serie de los 4-hidroxibenzoatos. Adicionalmente Krstulovic<sup>26</sup> demostró que el valor de  $V_0$  depende críticamente en el número de estructura de los homólogos seleccionados para la determinación, y que los coeficientes de correlación utilizados por Colin, no pueden ser usados como prueba de convergencia porque dichos coeficientes son mayores si se emplean menos homólogos, lo que es obviamente contradictorio. Estas observaciones fueron corroboradas por otros autores<sup>59,60</sup>.

Basado en los resultados mencionados, Möckel<sup>20</sup> concluyó que deben cumplirse tres condiciones para que la relación  $\ln k'$  vs  $n$  sea lineal:

- 1) La longitud de la cadena de los solutos debe ser menor que la unida a la fase estacionaria.
- 2) Son necesarios por lo menos los datos de retención de cinco homólogos.
- 3) Los datos de retención deben ser muy precisos.

Al igual que Möckel, otros investigadores<sup>16</sup> señalan que la causa principal de la inconsistencia de los valores de  $V_0$  obtenidos con el método LSH es la baja precisión en la que se obtienen los tiempos de retención. Esto hace de la reproducibilidad un factor importante a determinar en este método.

## 4. PARTE EXPERIMENTAL.

### 4.1. Instrumentación.

Se empleó un cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard modelo 1050, (Palo Alto), con inyector automático y detector de longitud de onda múltiple con celda de 8  $\mu$ l. Para las inyecciones manuales se empleó una válvula Rheodyne modelo 7125 (Cotati, CA) con un rizo de 20 $\mu$ l. Las áreas y alturas de los picos se obtuvieron con un integrador Hewlett Packard modelo 3396.

### 4.2. Columnas.

Se eligieron columnas de fase reversa por ser éstas las más empleadas, según se ha publicado recientemente <sup>24</sup>. Las columnas empleadas fueron: Novapak C<sub>18</sub>, 150 x 3.9 mm, tamaño de partícula 4 mm, Waters Assoc., Millford, MA (columna I); Bakerbond C<sub>18</sub>, de 250 x 4.6 mm., tamaño de partícula de 5 mm (columna II) y Bakerbond C<sub>8</sub> de 250 x 4.6 mm., tamaño de partícula de 5 mm, J. T. Baker, Easton, PA (columna III). No se usaron precolumnas, para evitar, en lo posible, el ensanchamiento de las bandas. Las conexiones entre la columna y el detector y el inyector se hicieron con tramos cortos de tubería de acero inoxidable de 0.0254 cm de d.i.

### 4.3. Reactivos.

Metanol y acetonitrilo (Baker Chemicals, Phillipsburg, NJ) y agua (Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ) grado CLAE.

Fenol, benzaldehído, acetofenona, benzoato de metilo y tolueno (Fisher Chemicals, Fair Lawn, NJ) y antraceno (Aldrich Chemical Co. (Milwaukee, Wis) grado reactivo

Metil, etil, propil, amil, heptil, nonil, undecil, tridecil, pentadecil y heptadecilfenona (Aldrich Chemical Co. Inc) grado reactivo.

Metil, etil, propil, butil, amil, heptil, y nonilbenceno, 4-hidroxibenzoatos de metilo, etilo, propilo, butilo, y n heptilo (parabenos) (Sigma Chemical Co) grado reactivo.

Floroglucinol (trihidroxifenol) (Aldrich Chemical Co. Inc. Milwaukee, WI) grado reactivo.

Uracilo de Sigma Chemical Co, (St Louis MO) grado reactivo.

#### **4.4. Procedimiento.**

Todas las corridas fueron isocráticas, con flujo de 1 ml/min para la columna I y de 2 ml/min para la columnas II y III. Los disolventes fueron degasificados y mantenidos bajo una corriente de helio durante las corridas.

La detección se hizo a 280 nm para las pruebas de repetibilidad de la inyección, y a 254 nm para el resto de las pruebas.

En todos los experimentos descritos el % DER se calculó con la ecuación (2) utilizando las áreas de los picos. Se emplearon además de las áreas, las alturas de los picos en las determinaciones de la influencia del flujo y de la composición de la fase móvil.

##### **4.4.1. Errores en la inyección.**

Primero se realizó la prueba recomendada por Rheman <sup>6</sup> para comprobar el buen funcionamiento del inyector automático y de la válvula. Para esta prueba se hicieron treinta inyecciones de 10 µl de una solución que contenía 3.31 mg/ml de fenol y 1.91 mg/ml de benzaldehído en la columna I, con una mezcla de metanol-agua 55:45(v/v) como fase móvil. Después de cada dos inyecciones se introdujo sólo fase móvil para evaluar el residuo de muestra en el rizo de inyección.

Para obtener el ensanchamiento de las bandas producido por las conexiones, se construyó una gráfica el cuadrado del volumen de retención contra el cuadrado del ancho del pico, para cada uno de los componentes de la mezcla acetona, fenol, acetofenona y benzoato de metilo, la raíz cuadrada de la ordenada al origen de esta curva es el volumen de dispersión debido a las conexiones <sup>6</sup>.

Así mismo, se probó la capacidad de las bombas para reproducir el gasto de fase móvil comparando los tiempos de retención de la serie homóloga del benceno.

A continuación se evaluó la influencia del volumen de inyección, del tamaño de la muestra y del disolvente de la muestra en la precisión de la inyección.

##### **4.4.1.1 Influencia del volumen de inyección.**

Para este experimento se usó la muestra de prueba recomendada por ASTM <sup>61</sup> que consta

de fenol 160 ppm, benzaldehído 224 ppm, acetofenona 204 ppm y benzoato de metilo 334 ppm disueltas en la fase móvil. Se inyectaron 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 y 10.0  $\mu\text{L}$  de esta solución (cinco veces cada uno) en la columna I con la mezcla metanol-agua 47:53(v/v) como fase móvil con el inyector automático. Se repitió el mismo experimento inyectando volúmenes correspondientes al 5, 10, 25, 50 y 500% del volumen total del rizo con la válvula de inyección.

#### **4.4.1.2. Influencia del tamaño de la muestra.**

Para esta prueba, se inyectó la misma mezcla en las mismas condiciones descritas, variando la concentración de tal manera que siempre se introdujera la misma cantidad de muestra en la columna. Se inyectó cada mezcla cinco veces.

Para evaluar la influencia de la concentración se inyectaron soluciones de benzaldehído en las siguientes concentraciones 600, 400, 200, 100 y 10 ppm.

#### **4.4.1.3. Influencia del disolvente de la muestra.**

Para esta prueba se inyectaron seis soluciones de benzaldehído en concentración 1.8 mg/ml disueltas en metanol 100% y en mezclas acuosas con 90, 80, 70, 60 y 50% de metanol respectivamente. Se empleó la columna II y metanol-agua 60:40(v/v) como fase móvil.

#### **4.4.2. Errores en la detección por UV-visible.**

Para caracterizar el detector de UV-visible y aislar las contribuciones de los diferentes parámetros en la precisión, se evaluó primero el ruido a corto y a largo plazo, así como el desplazamiento con el método descrito por Wolf<sup>11</sup>, a 210, 254 y 380 nm en las formas estática y dinámica. Una vez determinado el ruido, se calculó el intervalo lineal para el benceno, el tolueno y el antraceno a 254 nm empleando la columna II. Se inyectaron seis soluciones de cada compuesto cuya concentración se escogió de tal manera que se obtuvieran picos de áreas aproximadamente iguales con el mismo valor de atenuación del integrador. Dichas concentraciones fueron para el benceno 1110, 555, 277, 138, 69 y 35 ppm, para el tolueno 4285, 2142, 1071, 535, 267 y 134 ppm; y para el antraceno 99, 49,

25, 12, 6 y 3 ppm. Todas las soluciones fueron preparadas en una mezcla metanol-agua de la misma composición que la fase móvil.

Para determinar la influencia de la fase móvil en la detección, se inyectó una solución que contenía 200 ppm de cada uno de los miembros de la serie de las alquilfenonas arriba anotados. La columna III fue equilibrada con por lo menos 50 ml de cada una de las diferentes mezclas eluyentes. Se hicieron diez inyecciones de las alquilfenonas en cada una de las siguientes mezclas eluyentes 90:10, 80:20 70:30, 60:40, y 65:35(v/v) de acetonitrilo-agua.

La influencia de la velocidad de flujo en la precisión se evaluó inyectando una mezcla de 500 ppm de benceno y 560 ppm de tolueno disueltos en una mezcla de metanol-agua 80:20(v/v), con los siguientes flujos 0.67, 0.76, 0.83, 0.91, 1.00, 1.11, y 1.23 ml/min.

#### **4.4.3. Errores en el análisis de los parámetros de retención.**

Las fases móviles se prepararon mezclando volúmenes medidos de acetonitrilo y agua. Después de mezclados se desgasificaron con vacío y se mantuvieron bajo un flujo constante de helio durante las corridas. Las columnas I y III se equilibraron con 50 ml de la fase móvil.

Para el estudio del comportamiento del uracilo y del floroglucinol, se hicieron cuatro inyecciones de cada uno de ellos en cada mezcla eluyente. Para la determinación de la repetibilidad del tiempo de retención se inyectó diez veces una solución de las alquilfenonas con la mezcla acetonitrilo-agua 80:20(v/v).

Las tres series homólogas se inyectaron por triplicado en las columnas I y III para la determinación de sus respectivos valores de  $k'$ . Se inyectaron soluciones de 500 ppm de los parabenos y de los alquilbencenos y de 200 ppm de las alquilfenonas.

## 5. DISCUSION .

### 5.1. Fuentes de error en el inyector.

Una fuente de error que se presenta tanto en los inyectores automáticos como en las válvulas es el residuo de muestra en el sistema de inyección, la precisión es muy baja en inyecciones sucesivas sobre todo cuando aumenta la concentración de la muestra. En nuestro caso el residuo representó el 3% del área total del pico de la primera inyección es por esto que se probó lavar el inyector cada dos inyecciones, de esta forma disminuyó hasta un 0.3% . Cuando se aplicó la prueba recomendada por Rehman<sup>6</sup> con una solución de benzaldehido y fenol (3000 ppm de cada uno de ellos) para evaluar el funcionamiento del inyector automático a partir de la reproducibilidad de las áreas se obtuvieron los resultados de la Tabla 6.1.

Cuando se inyectó una solución conteniendo las mismas sustancias pero en concentraciones menores (160 ppm), el residuo de muestra disminuyó hasta un 0.1% del área del pico de la primera inyección, de aquí que en los siguientes experimentos se lavó el inyector cada dos inyecciones y se empleó la muestra de prueba de la ASTM en este orden de concentraciones, para reducir la contribución del residuo de muestra en el inyector a la reproducibilidad.

#### 5.1.1. Influencia del tamaño de la muestra (volumen y concentración).

Como ya se mencionó la precisión depende del volumen inyectado, para determinar el intervalo de volumen óptimo se inyectaron volúmenes diferentes de la muestra de prueba y a partir de las áreas de cada uno de las sustancias se calcularon los valores de DER y se graficaron contra los volúmenes inyectados. Los resultados se encuentran en la Tabla 6.2 y en la Figura 6.1.

Como se observa la inyección de volúmenes muy pequeños, (menores a 1 $\mu$ l) produce una pérdida importante en la precisión, la baja de reproducibilidad puede deberse a la precisión con que el inyector automático mide el volumen, a la respuesta del detector y a errores en la integración de áreas pequeñas. Para determinar la fuente de error más

importante, se inyectó la misma masa de soluto (0.7  $\mu\text{g}$ ) disuelta en diferentes volúmenes con el objeto de obtener picos de área igual y descartar el error debido a la detección y a la integración. Los resultados de este experimento se muestran en la Tabla 6.3 y Figura 6.2.

Cuando se varía el volumen y se mantiene el área del pico constante, la precisión es mejor que la del experimento de la Tabla 6.2 con volúmenes pequeños. Para demostrar que el error es debido al inyector se deben comparar las varianzas de las áreas obtenidas con los diferentes volúmenes inyectados de cada uno de los compuestos por separado. Las varianzas se compararon con la prueba de Bartlett<sup>3</sup>, proponiendo la hipótesis nula de que las varianzas de los datos obtenidos para cada compuesto de la Tabla 6.3 son iguales para un nivel de significación del 5 % . Los valores de  $M$  obtenidos se listan a continuación

Fenol	$M = 1.6409$	$\chi^2 (0.05)_{\text{critico}} = 7.185$ para 3 g.l. corresponden a p-1
Benzaldehido	$M = 1.4056$	
Acetofenona	$M = 5.2818$	
Benzoato de metilo	$M = 26.1247$	

Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula solamente para el benzoato de metilo, lo cual indica que el inyector automático no es el principal responsable de la pérdida de precisión cuando se inyectan volúmenes pequeños. Cuando se comparan las varianzas de la Tabla 6.2 excluyendo las de las dos primeras columnas se encuentra que son iguales para todos los compuestos

Fenol	$M = 5.9239$	$\chi^2 (0.05)_{\text{critico}} = 7.185$ para 3 g.l.
Benzaldehido	$M = 2.4673$	
Acetofenona	$M = 1.1905$	
Benzoato de metilo	$M = 2.7830$	

De lo anterior se desprende que la varianza de las medidas es semejante si se inyectan volúmenes de 1  $\mu\text{l}$  o mayores, pero la máxima precisión, de acuerdo a los valores del %DER se alcanza con inyecciones de 10  $\mu\text{l}$ .

En la Tabla 6.4 Figura 6.3 se muestran los resultados del experimento para mostrar la influencia de las concentraciones bajas de las muestras inyectadas en la precisión de la cuantificación.

Aquí se ve que la precisión disminuye considerablemente sólo cuando las muestras están muy diluídas, por ejemplo la masa de analito de la última columna es igual a la inyectada en 0.5  $\mu\text{l}$  del experimento de la Tabla 6.2. Si se propone como hipótesis nula que las varianzas de ambas inyecciones son iguales y se aplica la prueba F con un nivel de significación del 0.05% se obtiene un valor de  $F_{(4,5)} = 1.6074$ , menor que el valor crítico de F que es 5.192. Por tanto se acepta la hipótesis nula. El valor del %DER es también equivalente, lo que indica que el volumen del disolvente en este caso no tiene una influencia importante en la precisión de la determinación. En cuanto al error en este caso parece deberse más a limitaciones del detector y del integrador.

Cuando el experimento en el que se varía solamente el volumen de inyección se llevo a cabo con la válvula, se encontró que el %DER es relativamente más alto comparado con el obtenido con el inyector automático ( ver la Tabla 6.5 y la Figura 6.4), aún si se inyecta 5 veces el volumen del rizo (20 $\mu\text{l}$ ), que es lo recomendable para obtener la mayor reproducibilidad. Si se comparan las varianzas de las áreas obtenidas al inyectar 10 $\mu\text{l}$  de los cuatro compuestos con la prueba de Bartlett se obtiene el valor de  $M = 6.3979$  para el inyector automático y de 5.0858 para la válvula, ambos menores que el valor crítico de  $\chi^2$  (0.05), de aquí que se aplicara la misma prueba para comparar ambas técnicas. La hipótesis nula se rechazó ya que el valor de  $M = 28.5209$  es mayor que  $\chi^2$  (0.05) crítico que es de 7.185 para 3 g.l. lo que permite asegurar que las varianzas son diferentes y que el inyector automático es más preciso que la válvula, probablemente debido a que el residuo en el rizo de inyección es mayor en ésta que en el inyector automático.

### 6.1.2. Influencia del disolvente de la muestra.

Cuando se varió la composición del disolvente de la muestra no se obtienen diferencias significativas en la precisión, como se muestra en la Tabla 6.6. Esto indica que el aumento en la altura del pico (y como consecuencia el aumento en la precisión) es apreciable sólo cuando se trata del análisis de trazas como se reporta en la literatura<sup>8,9</sup>.

### 5.2. Errores en la detección por UV.

Antes de identificar las fuentes de error en el detector, se determinó el ruido y el desplazamiento de la línea base a 210, 254 y 280 nm con agua y con metanol.

El valor del ruido a largo plazo a 254 nm y agua como eluyente fue de  $8.5 \times 10^{-5}$  UA/cm y el del desplazamiento de  $1.9 \times 10^{-4}$  UA/cm. El valor del ruido a corto plazo es el más útil ya que influye en el valor de la cantidad mínima detectable, en el caso del detector empleado fue de  $2.5 \times 10^{-5}$  UA/cm con agua,  $3.1 \times 10^{-5}$  con metanol a 254 nm (determinado por el método dinámico). Cuando se determina el ruido a 210 nm éste resulta mucho mayor debido a la absorbancia de la fase móvil, con este detector fue de  $1.5 \times 10^{-4}$  UA/cm. El ruido es una limitante cuando se determina la CMD.

#### 5.2.1. Linealidad de la respuesta del detector.

El intervalo lineal para el benceno, el tolueno y el antraceno se calcularon por el procedimiento de ASTM<sup>57</sup>. Los resultados se presentan en las Figuras 6.5, 6.6, 6.7 y 6.8. Como puede observarse, la CMD, definida como la masa que presenta una absorbancia dos veces mayor que el ruido a corto plazo, es diferente para cada uno de ellos, ya que su absorbancia en el UV a una longitud de onda dada, es distinta. La reproducibilidad a este nivel de concentración fue en el mejor de los casos de 10% DER. El intervalo lineal para el benceno y el tolueno se calculó como el cociente entre la concentración más alta que se probó y la CMD, ya que en estas condiciones, la curva correspondiente nunca presentó una meseta, pero para el antraceno, la curva es ligeramente cóncava y al aplicar la regresión lineal a todo el intervalo de concentraciones probadas, el coeficiente de

correlación es bajo (0.981).

Cuando se calculó el intervalo lineal con las curvas de linealidad se observó por ejemplo, que en la curva del benceno ( Figura 6.9) hay una desviación a concentraciones bajas no apreciable en la curva 6.5. Si se aplicara el método ASTM, es posible que se obtuviera un error hasta de 20% cuando se calculan concentraciones por debajo de 300 ppm. El intervalo lineal es de  $10^2$  para el antraceno de acuerdo con la definición ASTM, pero si se examina la curva de linealidad de la Figura 10, la exactitud de la cuantificación cuando se emplea esta curva es pobre a concentraciones menores de 5 ppm, para estas concentraciones, se debe construir una nueva curva y calcular el límite superior del intervalo lineal nuevamente.

Al emplear las curvas de linealidad, el intervalo lineal es menor comparado con el calculado anteriormente pero los resultados que se obtienen son mas exactos. En este tipo de curvas se fija el intervalo de confianza que se requiera para la cuantificación, (en la Figura 8 se fijó en  $\pm 2.5\%$ ). En cuanto a la precisión, como ya se mencionó, ésta disminuye considerablemente a medida que la concentración de la muestra disminuye, ya que depende de la absorbancia de la muestra a la longitud de onda que se use, del nivel del ruido del detector y de la precision del integrador. Por ejemplo, para el tolueno, la reproducibilidad es en promedio mejor que 0.5 % DER para concentraciones mayores de 50 ppm, y disminuye hasta 10% DER para concentraciones de 50 ppb. Por lo tanto, cuando se trabaja con muestras diluídas o que presentan baja absorbancia en el UV a la longitud de onda empleada, es más confiable cuantificar con las curvas de linealidad que con las recomendadas por ASTM, y determinar la CMD de acuerdo con el nivel de confianza que se requiera, en lugar de tomarlo como la concentración que produce una respuesta dos veces el tamaño del ruido.

### 5.2.2. Influencia de la composición de la fase móvil.

En la Figura 6.11 se presenta la variación del área, al cambiar la composición de la fase móvil. El área aumenta al disminuir la cantidad de modificador orgánico en la fase móvil. De aquí es obvio que las curvas de calibración y la concentración de la muestra se deben obtener con la misma fase móvil, pero esto implica que las bombas proporcionen ésta última con idéntica composición a lo largo de todo el análisis, cuando se requiere un alto nivel de exactitud. En cuanto a la altura del pico, esta sufre un cambio mayor con las variaciones en la composición de la fase móvil, por ejemplo, cuando la cantidad de modificador orgánico disminuye, el compuesto es más retenido produciéndose picos más anchos. De aquí que no se recomienda cuantificar usando la altura del pico para compuestos con tiempos de retención largos. La reproducibilidad del área y de la altura del pico no varía significativamente al cambiar la composición de la fase móvil, siempre que se cumplan las condiciones de que el pico sea estrecho, simétrico y tenga un valor de  $k'$  mayor de 2 como se muestra en la Tabla 6.7 y Figura 6.11.

### 5.2.3. Influencia del flujo de la fase móvil.

En la Figura 6.12 se puede apreciar la influencia de los cambios de flujo en el área del pico. Al aumentar el flujo, el área disminuye, por ejemplo, si el flujo varía de un 10%, la diferencia en las áreas es de 14%, en el caso de picos estrechos y simétricos como los del benceno y tolueno. Este fenómeno revela la importancia del buen funcionamiento de las bombas, que deben proporcionar el disolvente a un flujo exacto y constante, y sugiere la necesidad de hacer curvas de calibración regularmente para detectar variaciones de flujo que puedan presentarse en un equipo con el tiempo, o diferencias entre cromatógrafos, para evitar este tipo de errores. En cuanto a las alturas de los picos, las variaciones son menores, la precisión es prácticamente la misma cuando se miden las áreas o las alturas (ver Tabla 6.8 y Figura 6.13).

### 5.3. Errores en la determinación del volumen de retención.

En este trabajo se adopta la definición de volumen muerto como el volumen total de fase líquida en la columna<sup>25</sup>. Esta definición implica la existencia de un único valor de  $V_0$  independiente de la composición de la fase móvil y del soluto empleado para su medición. A partir de esta definición se estudian los errores en la determinación del  $V_0$ , cuando se emplean los métodos de inyección de compuestos "no retenidos" y de linealización de las series homólogas (LSH).

#### 5.3.1. Método del compuesto "no retenido".

Para este método se utilizaron uracilo y floroglucinol. Como valores de  $V_0$  de referencia, se tomaron los calculados por el método propuesto por Kazakevich<sup>25</sup> para cada una de las dos columnas empleadas. El  $V_0$  para la columna I fue de 1.022 ml y para la III de 3.176 ml. A continuación se obtuvieron los tiempos de retención ( $t_0$ ) del uracilo y del floroglucinol en solución, empleando como fase móvil mezclas de acetonitrilo-agua en porcentajes que van de 0 a 100%, variando de 10 en 10% el contenido del modificador orgánico. La reproducibilidad en la determinación de los tiempos de retención fue menor de 0.1 % de DER, para los dos compuestos en las condiciones experimentales empleadas. La precisión en los tiempos de retención no se ve afectada por las variaciones en la composición de la fase móvil. Los valores de los volúmenes de retención ( $V_r$ ) de ambos compuestos obtenidos con las diferentes composiciones de la fase móvil probadas se llevaron a una gráfica en la Figura 6.14 y 6.15.

En estas Figuras se puede observar que el volumen de retención de ambas sustancias varía con la composición de la fase móvil principalmente con fases que tienen alto contenido de agua. El volumen de retención medio para el floroglucinol y para el uracilo en la columna III son 2.71 ml y 2.544 ml respectivamente, y en la columna I siguiendo el mismo orden, son 0.988 ml y 0.964. En ambos casos el volumen de retención es menor que el  $V_0$  de referencia y la diferencia entre ellos excede el 0.1% debido al error experimental.

La diferencia se puede explicar si se toma en cuenta que en las columnas de fase reversa, se forma una capa estacionaria del disolvente orgánico de la fase móvil sobre la fase estacionaria hidrofóbica. Esta capa impide que las moléculas polares penetren en todos los poros, consecuentemente el volumen de retención es menor al volumen total del líquido en la columna. Por otra parte, cuando estas sustancias se eluyen con fases móviles con agua, su volumen de retención es considerablemente mayor, debido a que son retenidas por la fase estacionaria. Es por esto que el volumen de retención de estos compuestos no representa el volumen de la fase líquida en la columna; la diferencia entre el  $V_0$  de referencia y el  $V_0$  promedio determinado con uracilo o con floroglucinol es, en el mejor de los casos, de más del 10%.

Con este método el error en la determinación de  $V_0$  es particularmente importante en el cálculo de parámetros absolutos como los termodinámicos, pero el método es útil en el análisis cualitativo, para el cálculo de los valores de  $k'$  en el desarrollo del método y la optimización de la separación de una muestra dada cuando se mide empleando acetonitrilo como fase móvil.

### **5.3.2. Método de la linealización de las series homólogas.**

Para determinar la influencia de la precisión en la determinación de  $V_0$  por este método, primero se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa de los tiempos de retención de la serie de las alquilfenonas (ver Tabla 6.9), para después inyectar las series homólogas de los parabenos, la acetofenona y el benceno en las columnas I y III. Los tiempos de retención obtenidos para las tres series homólogas se encuentran en las Tablas 6.10 a la 6.14.

La determinación de  $V_0$  por este método se basa en la linealidad de la relación entre el  $\ln$  de  $k'$  y el número de átomos de carbono de la cadena del homólogo, por ello se calcularon los valores de  $k'$  correspondientes a partir de los volúmenes de retención de cada miembro de las tres series homólogas y de valores de  $V_0$  asignados, que van de 0.1 ml a 0.3 ml en incrementos de 0.1 ml para la columna I y de 0.2 ml a 3.2 ml en incrementos de 0.2 ml

para la columna III. Los resultados se presentan en las Tablas 6.15 a 6.45. Con los valores de  $k'$  obtenidos se construyeron las gráficas (Figuras 6.16 a 6.46). En estas gráficas se puede observar que la relación de  $\ln k'$  vs el número de átomos de carbono no es lineal para todos los valores de  $V_O$  asignados ni para todas las composiciones de la fase móvil, las curvas se alejan de la linealidad con valores de  $V_O$  extremos. Es evidente también que las desviaciones son mayores para los miembros de la serie cuya cadena lateral es corta. Este comportamiento ya había sido reportado anteriormente<sup>53</sup>, pero se atribuyó a falta de precisión en la medición del flujo principalmente. En este trabajo se calculó el error estándar para las curvas  $\ln k'$  vs número de átomos de carbono de la cadena, para las tres series homólogas eluidas con las diferentes fases móviles y con los resultados (Tablas 6.46 a 6.50) se trazaron las gráficas 6.47 a 6.51. En ellas se observa que: 1) algunas de las curvas presentan un mínimo que corresponde a la curva de menor error estándar, es decir, la más cercana a la linealidad; 2) los valores del error estándar mínimo son diferentes para las diferentes series homólogas y aún para la misma serie homóloga eluida con diferentes fases móviles. Para hacer más clara esta discrepancia se trazaron las gráficas del valor de  $V_O$  correspondiente al error estándar mínimo vs porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil (Figuras 6.51 a 6.55). Se aprecia en todas ellas que la diferencia entre estos valores de  $V_O$  es mayor del 0.1 % de DER que corresponde a la repetibilidad de los volúmenes obtenida (Tabla 6.9). Es decir, que si se acepta que  $V_O$  tiene un único valor para una columna dada que no depende del soluto ni de la composición de la fase móvil, este método no nos permite determinarlo, aunque se cuente con equipos más precisos que el empleado para este trabajo. Esto se debe a que las desviaciones de la linealidad no se deben a la falta de precisión, sino a que la interacción entre los miembros de las diferentes series homólogas y las fases móvil y estacionaria es distinta en cada caso, porque los grupos funcionales de las sustancias probadas son distintos. La supuesta linealidad de las curvas  $\ln k'$  - número de átomos de carbono descansa en la aditividad de las energías libres asociadas a los grupos metileno de la

cadena lateral del homólogo, es decir, se considera que todos los metilenos de la cadena son equivalentes, pero las desviaciones de la linealidad que presentan los miembros de la serie de cadena corta indica que los metilenos cercanos al grupo funcional experimentan una mayor influencia que aquellos que están más alejados, por tanto, no son equivalentes. Por último, los valores de  $V_0$  de las curvas  $\ln k'$  vs número de átomos de carbono que se ajustan mejor a una recta, no corresponden a los valores de  $V_0$  de referencia

## 6. RESULTADOS.

### 6.1. Errores en la inyección.

Compuesto	%DER <sup>a</sup>
Fenol	0.55
Benzaldehido	0.45

**Tabla 6.1** %DER de las áreas de los picos obtenidas con el inyector automático en la columna I. Fase móvil metanol-agua 55:45 (v/v).. <sup>a</sup> promedio de treinta inyecciones.

Compuesto	Volúmen (μl)					
	0.2	0.5	1.0	2.0	5.0	10.0
Fenol	3.5	1.6	0.5	0.8	0.3	0.1
Benzaldehido	3.1	1.2	0.9	0.9	0.2	0.2
Acetofenona	1.8	1.0	1	0.4	0.1	0.1
Benzoato de metilo	7.3	2.8	1.7	0.5	0.2	0.2

**Tabla 6.2.** % DER de las áreas obtenidas con el inyector automático.y con la columna I, fase móvil metanol-agua 47:53(v/v).

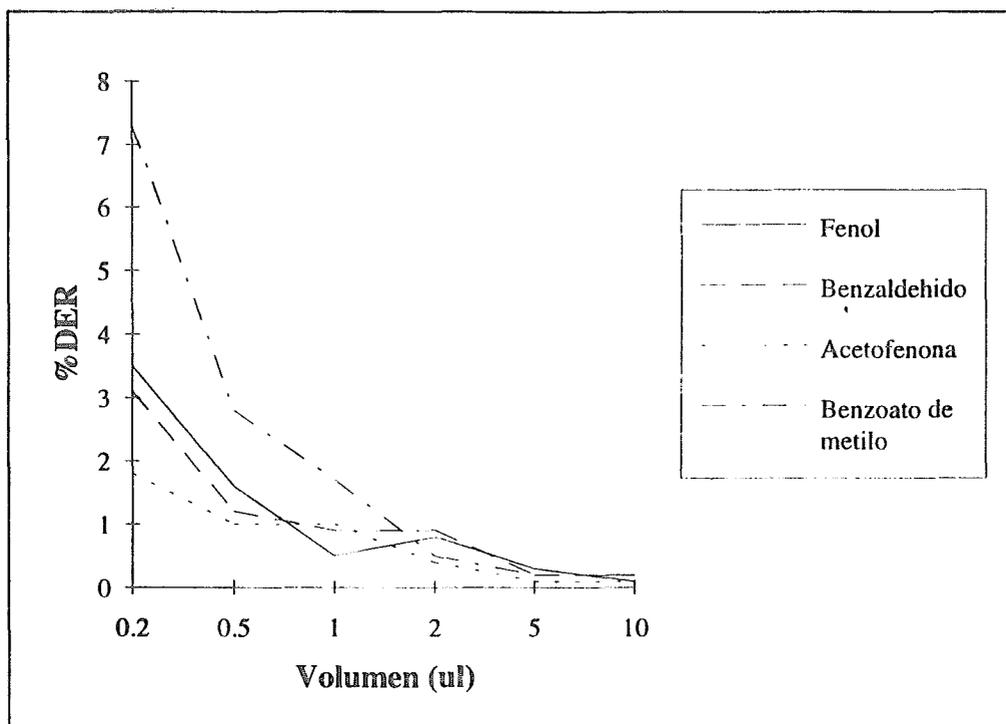
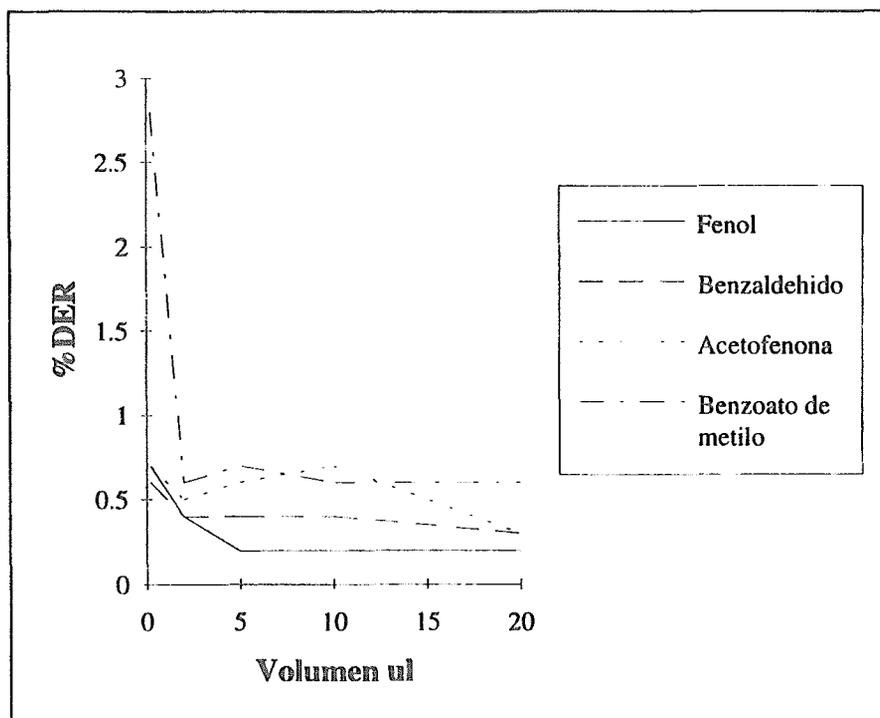


Figura 6.1. Precisión como función del volumen inyectado..(Inyector automático)

Compuesto	Volumen ( $\mu\text{l}$ )				
	0.2	2.0	5.0	10.0	20.0
Fenol	0.7	0.4	0.2	0.2	0.2
Benzaldehido	0.6	0.4	0.4	0.4	0.3
Acetofenona	0.7	0.5	0.6	0.7	0.3
Benzoato de metilo	2.8	0.6	0.7	0.6	0.6

**Tabla 6.3.** % DER de las áreas obtenidas con el inyector automático e igual masa de soluto ( $3\mu\text{g}$ ) disuelta en los volúmenes indicados. Columna I. Fase móvil metanol-agua 47:53(v/v).



**Figura 6.2.** Precisión en función del volumen inyectado.

Concentración	600	400	200	100	10
% DER	0.1	0.1	0.1	0.1	1.0

Tabla 6.4. %DER obtenido con diferentes concentraciones de una solución de benzaldehído. El volumen de inyección fue 10 $\mu$ l. Columna II, fase móvil metanol-agua 47:53(v/v).

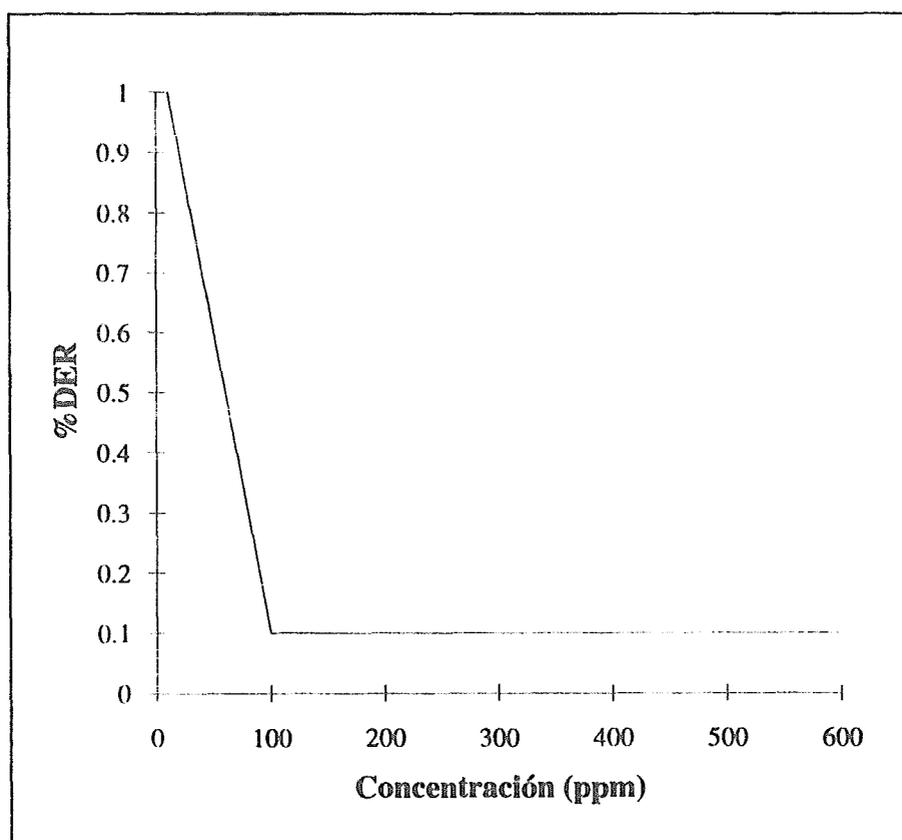
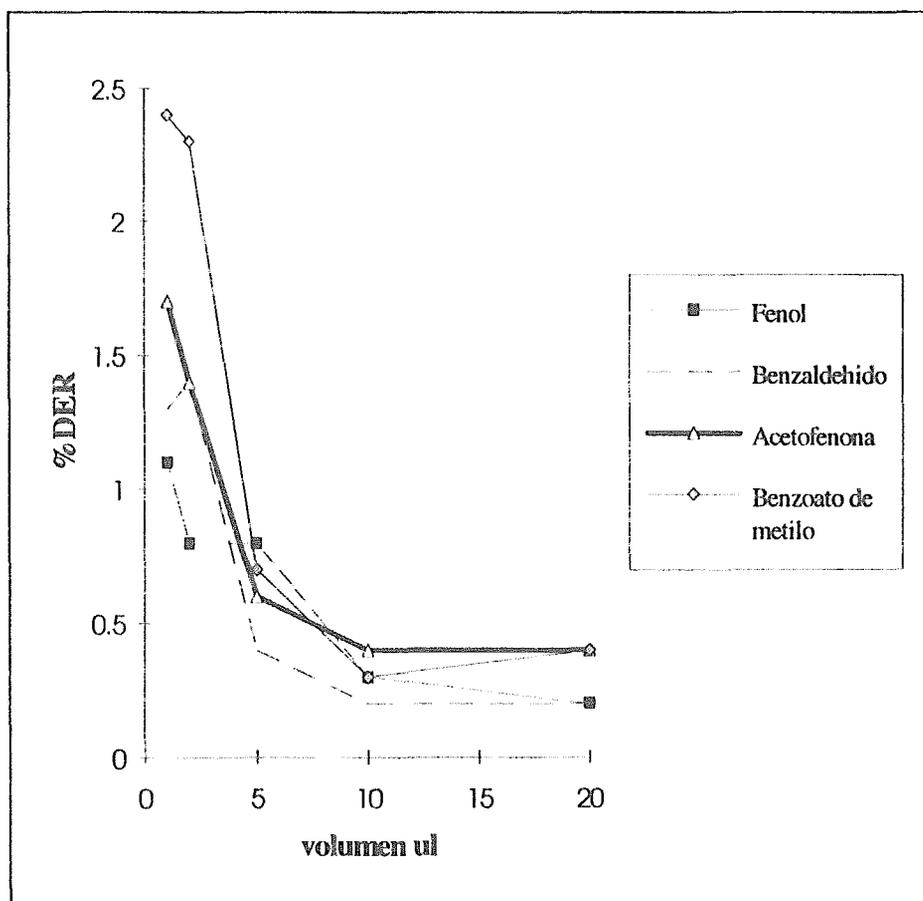


Figura 6.3. Precisión como función de la concentración.

Compuesto	% del volumen total del loop				
	5	10	25	50	500
Fenol	1.1	0.8	0.8	0.3	0.2
Benzaldehido	1.3	1.4	0.4	0.2	0.2
Acetofenona	1.7	1.4	0.6	0.4	0.4
Benzoato de metilo	2.4	2.3	0.7	0.3	0.4

**Tabla 6.5.** %DER obtenidos con la válvula al variar el volumen de inyección con un rizo de 20 $\mu$ l . Columna I, fase móvil metanol-agua 47:53(v/v).



**Figura 6.4.** Precisión como función del volumen inyectado. (Inyección manual).

% metanol	0	10	20	30	40	50
%DER	0.1	0.1	0.1	0.2	0.3	0.2

Tabla 6.6. %DER obtenido al emplear diferentes concentraciones de metanol como disolvente de la muestra. Columna II. fase móvil metanol-agua 60:40(v/v).

## 6.2 Errores en la detección.

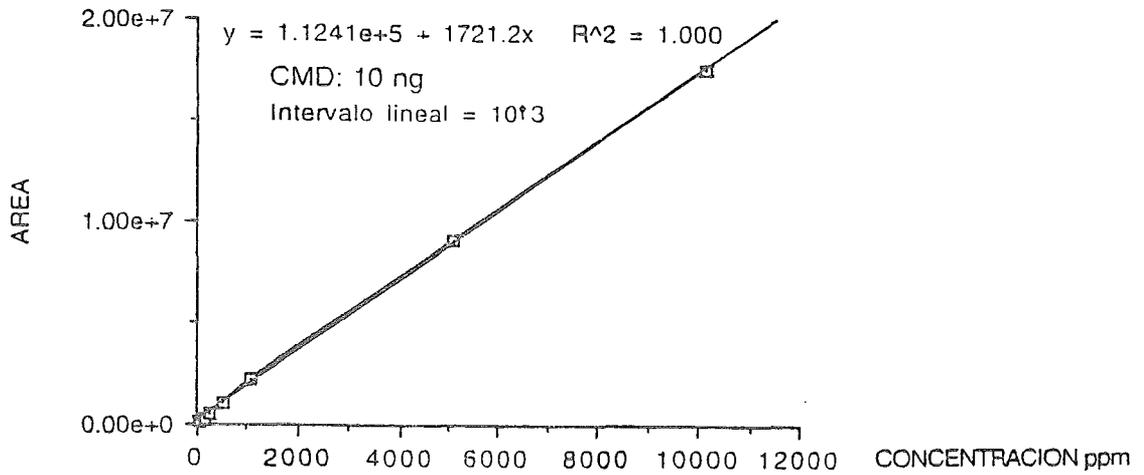


Figura 6.5. Intervalo lineal del benceno. Columna II. fase móvil metanol-agua 80:20(v/v).

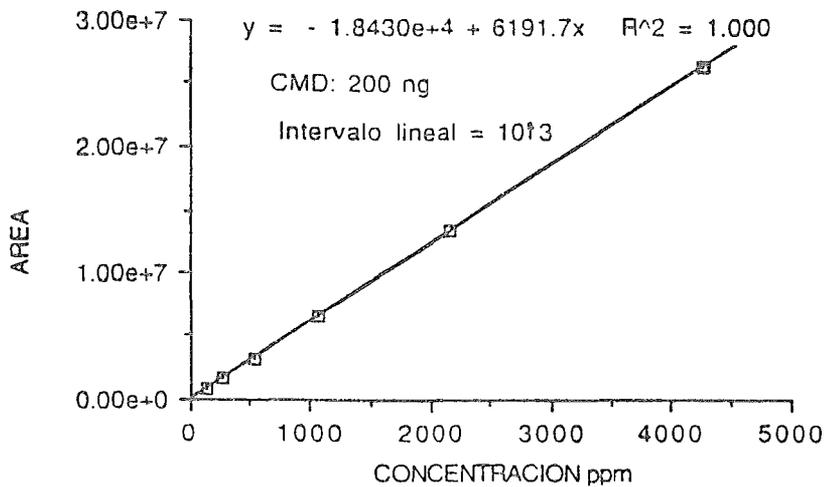


Figura 6.6. Intervalo lineal del tolueno. Columna II. fase móvil metanol-agua 80:20(v/v).

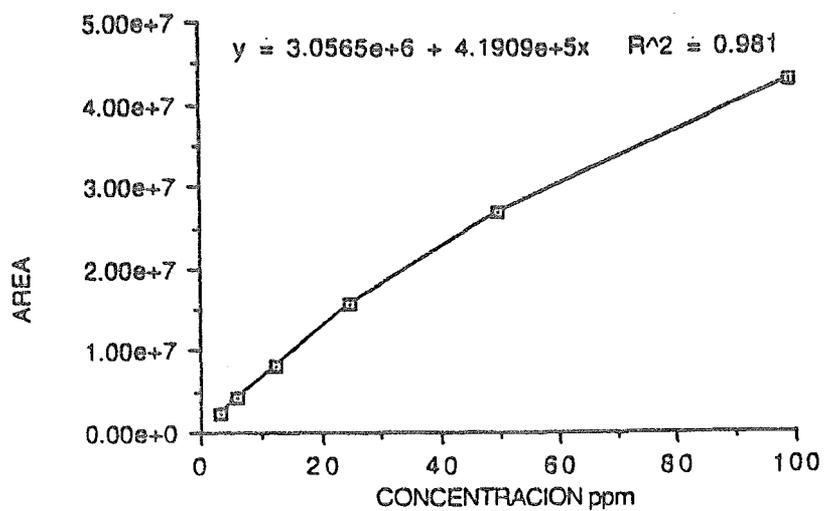


Figura 6.7. Área vs concentración de antraceno. Columna II, fase móvil metanol-agua 80:20(v/v).

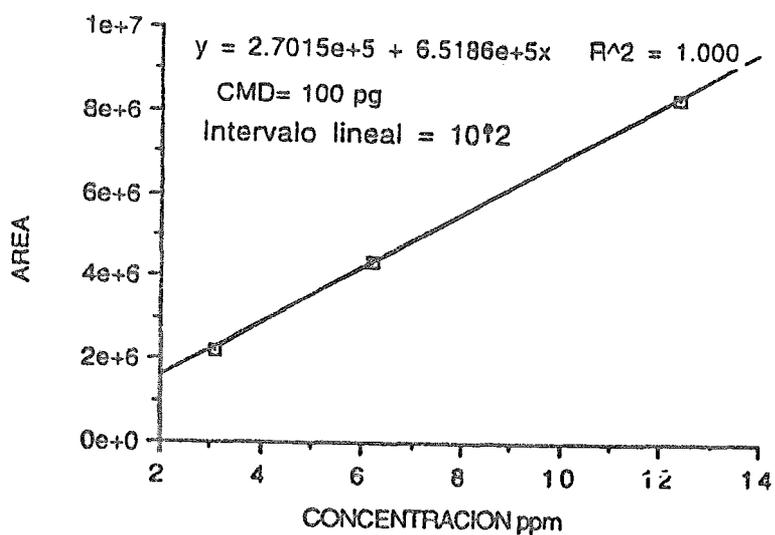


Figura 6.8. Intervalo lineal del antraceno. (tomado de la figura 6.7).

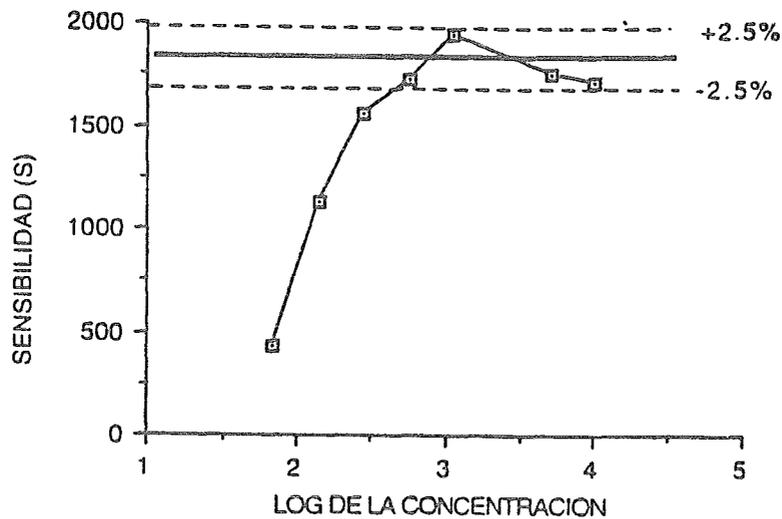


Figura 6.9. Curva de linealidad del benceno. Condiciones como las de la figura 6.6.

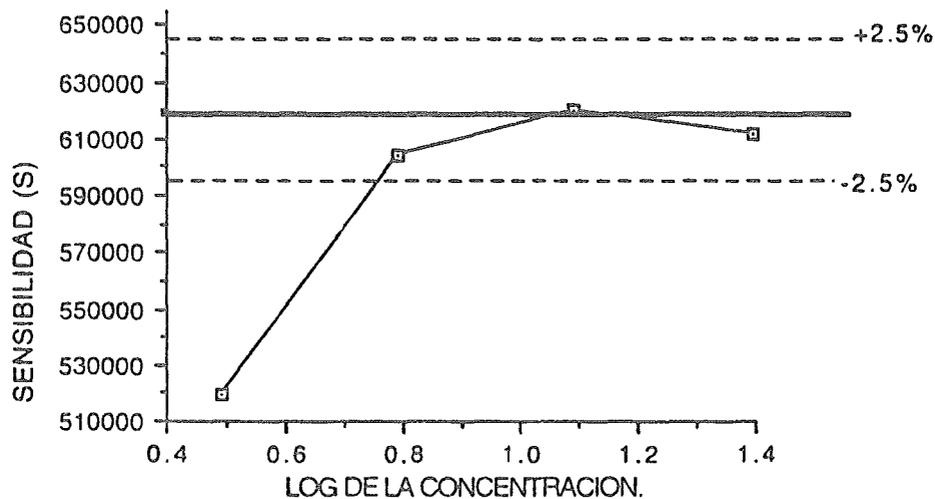


Figura 6.10. Curva de linealidad del antraceno. Condiciones como las de la figura 6.7.

Alquilfenona	%Acetonitrilo				
	90	80	70	67	65
Metil	0.5	0.1	0.1	0.3	0.3
Etil	0.8	0.1	0.1	0.2	0.3
Propil	0.9	0.2	0.1	0.2	0.7
Butil	0.6	0.2	0.1	0.1	0.2
Hexil	0.9	0.1	0.1	0.2	0.2

Tabla 6.7. %DER de las áreas obtenidas variando el contenido de acetonitrilo en la mezcla eluyente en la columna III, fase móvil acetonitrilo-agua (promedio de diez inyecciones).

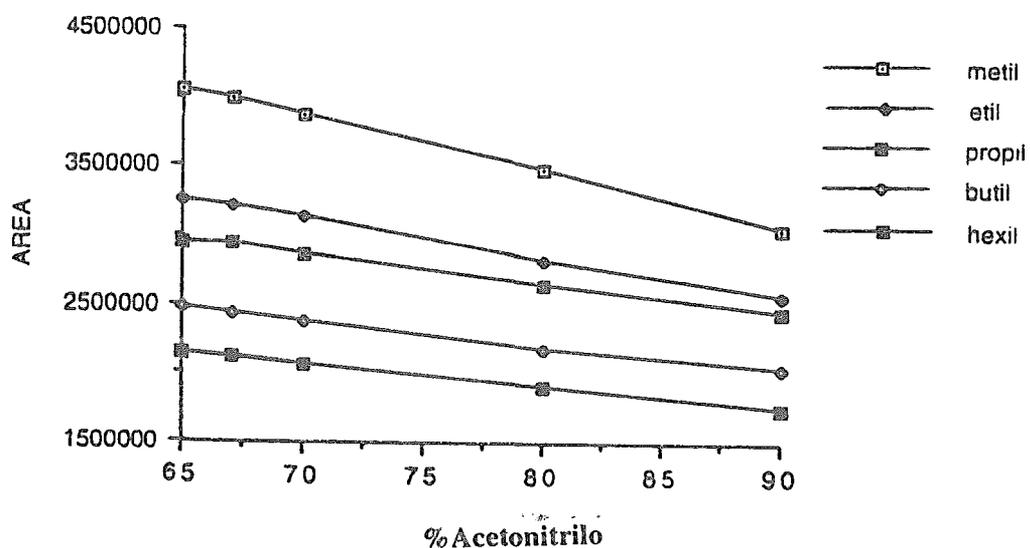
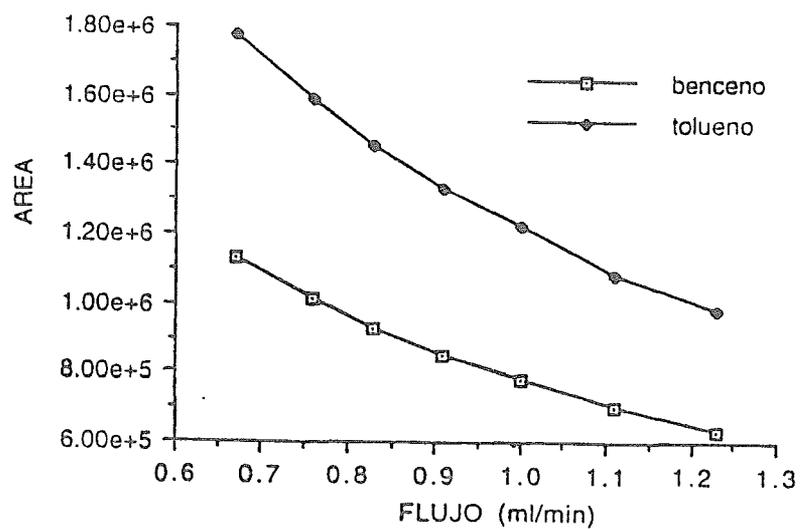


Figura 6.11. Influencia del porcentaje de acetonitrilo en la fase móvil en el área de los picos para la serie de las alquilfenonas

Compuesto	Flujo (ml)						
	0.67	0.76	0.83	0.91	1.00	1.11	1.23
Benceno	0.7	0.6	0.7	0.4	0.8	0.5	0.6
Toluceno	0.6	0.3	0.4	0.2	0.6	0.3	0.5

**Tabla 6.8.** %DER de las áreas obtenidas utilizando la columna II y como fase móvil una mezcla metanol-agua 80:20(v/v).



**Figura 6.12.** Influencia del flujo en las áreas de los picos.

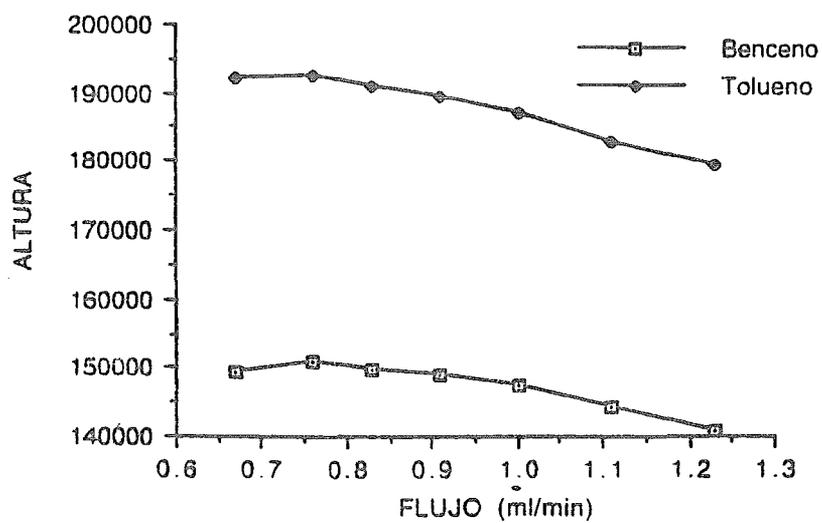


Figura 6.13. Influencia del flujo en las alturas de los picos.

## 6.3. Errores en el análisis de los parámetros de retención.

%Acetonitrilo								
Alquilfenona	80		70		67		65	
	s	%DER	s	%DER	s	%DER	s	%DER
Metil	0.0003	0.024	0.0009	0.064	0.001	0.063	0.0084	0.057
Etil	0.0013	0.086	0.0011	0.066	0.001	0.0511	0.0016	0.090
Propil	0.0014	0.086	0.0013	0.065	0.001	0.041	0.002	0.112
Butil	0.0029	0.122	0.0012	0.094	0.0003	0.010	0.008	0.208
hexil	0.0096	0.204	0.0091	0.134	0.020	0.022	0.028	0.349

Tabla 6.9. Desviación estándar y desviación estándar relativa de los tiempos de retención (promedio de diez inyecciones).Columna III.

%Acetonitrilo	Número de carbonos				
	1	2	3	4	7
70	1.17	1.23	1.37	1.57	3.09
60	1.25	1.41	1.66	2.07	5.49
50	1.44	1.74	2.28	3.22	12.55
40	1.83	2.24	2.95	4.18	16.46

Tabla 6.10. Volúmenes de retención de la serie de los parabenos. Columna I.

%Acetonitrilo	Número de carbonos									
	1	2	3	5	7	9	11	13	15	17
100	1.16	1.16	1.22	1.40	1.65	2.06	2.77	3.94	5.9	9.13
90	1.21	1.32	1.40	1.74	2.41	3.73	6.36	11.57	21.66	42.08
80	1.29	1.45	1.65	2.35	3.90					
70	1.42	1.70	2.05	3.43	6.81					
60	1.72	2.27	3.04	6.39	15.57					
50	2.08	3.05	4.51	11.68	34.01					
40	2.93	5.11	8.86	31.57	122.00					

Tabla 6.11. Volúmenes de retención de la serie de las alquilfenonas Columna I.

% Acetonitrilo	Número de carbonos							
	0	1	2	3	4	5	7	9
100	1.21	1.22	1.28	1.44	1.55	1.70	2.15	2.92
90	1.31	1.44	1.58	1.77	2.05	2.43	3.73	6.26
80	1.56	1.81	2.10	2.59	3.30	4.32	8.16	16.63
70	1.83	2.27	2.83	3.81	5.30	7.55	16.71	39.05
60	2.37	4.31	6.38	9.68	15.00	38.40		

Tabla 6.12. Volúmenes de retención de la serie de los alquilbencenos en función de la composición de la fase móvil. Columna I.

% Acetonitrilo	Número de carbonos							
	0	1	2	3	4	5	7	9
100	3.04	3.04	3.04	3.16	3.24	3.32	3.54	3.84
90	3.18	3.32	3.48	3.70	3.94	4.24	5.10	6.34
80	3.56	3.84	4.18	4.66	5.26	6.02	8.30	12.80
70	4.16	4.70	5.36	6.34	7.64	9.34	14.76	24.60
60	5.42	6.56	8.10	10.52	13.80	18.64	35.14	68.48
50	7.08	9.28	12.44	17.72	25.58	37.36	81.60	
40	9.88	14.30	21.32	33.94				
30	17.38	30.26	54.42					

Tabla 6.13. Volúmenes de retención de la serie de los alquilbencenos Columna III.

% Acetonitrilo	Número de carbonos				
	1	2	3	4	7
90	2.78	2.78	2.92	3.02	3.44
80	2.88	2.98	3.14	3.32	4.22
70	3.04	3.24	3.52	3.88	5.76
60	3.44	3.84	4.42	5.24	10.12
50	3.94	4.66	5.76	7.42	19.00
40	4.76	6.08	8.38	12.16	44.50
30	7.16	11.00	18.92	34.50	

Tabla 6.14. Volúmenes de retención de la serie de los parabenos Columna III.

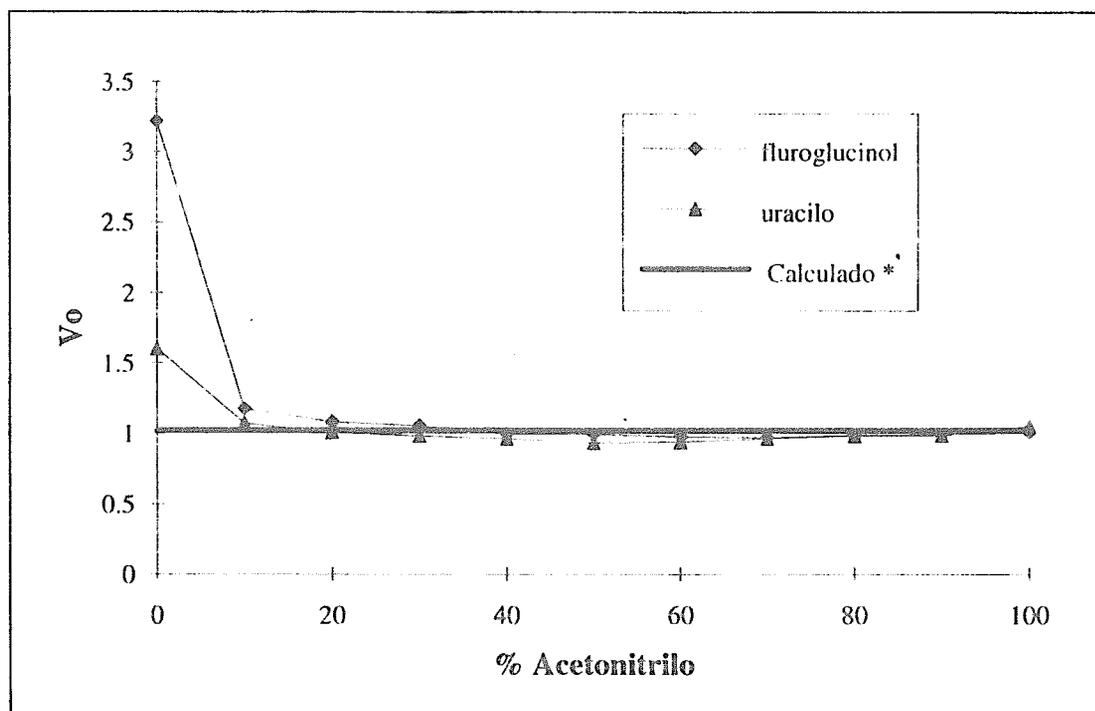


Figura 6.14. Valores de  $V_0$  obtenidos con fluroglucinol y uracilo en la columna I. \*Calculado con el método propuesto por Kazakevich..

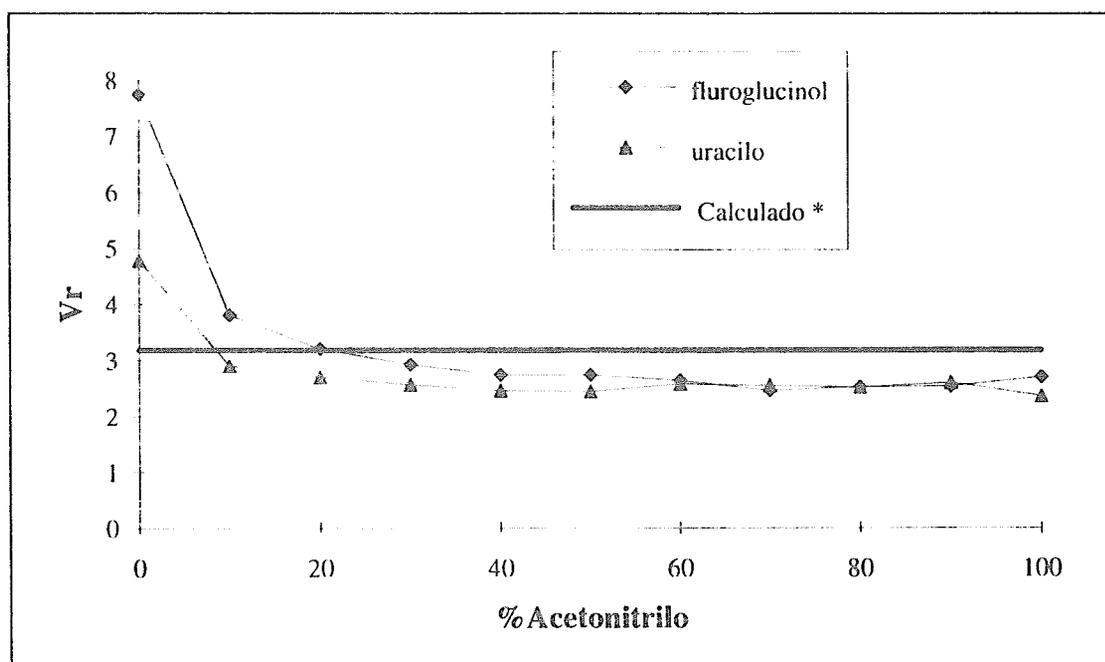


Figura 6.15. Valores de  $V_0$  obtenidos con fluroglucinol y uracilo en la columna III. \*Calculado con el método propuesto por Kazakevich..

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	2.3702	2.4248	2.5416	2.6878	3.3979
0.2	1.5790	1.6390	1.7664	1.9242	2.6707
0.3	1.0647	1.1314	1.2716	1.4430	2.2300
0.4	0.6549	0.7300	0.8858	1.0733	1.9058
0.5	0.2927	0.3784	0.5539	0.7608	1.6448
0.6	-0.0513	0.0488	0.2495	0.4804	1.4231
0.7	-0.3983	-0.2782	-0.0438	0.2174	1.2280
0.8	-0.7711	-0.6208	-0.3390	-0.0382	1.0517
0.9	-1.2040	-1.0033	-0.6497	-0.2951	0.8893
1	-1.7720	-1.4697	-0.9943	-0.5621	0.7372

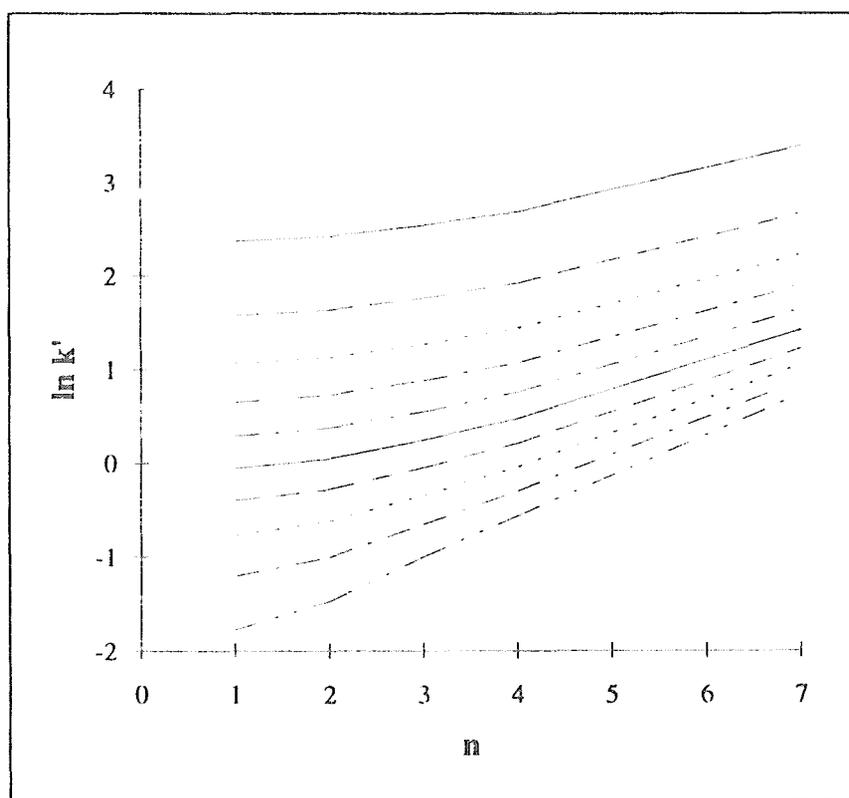
Tabla 6.15.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 70:30(v/v).

Figura 6.16.

Número de carbonos

Vo	1	2	3	4	7
0.1	2.4423	2.5726	2.7473	2.9806	3.9871
0.2	1.6582	1.8001	1.9879	2.2354	3.2753
0.3	1.1527	1.3083	1.5115	1.7750	2.8507
0.4	0.7538	0.9262	1.1474	1.4291	2.5436
0.5	0.4055	0.5988	0.8416	1.1442	2.3006
0.6	0.0800	0.3001	0.5691	0.8961	2.0980
0.7	-0.2412	0.0142	0.3159	0.6715	1.9232
0.8	-0.5754	-0.2712	0.0723	0.4622	1.7686
0.9	-0.9445	-0.5680	-0.1691	0.2624	1.6292
1	-1.3863	-0.8916	-0.4155	0.0677	1.5019
1.2	-3.1781	-1.7430	-0.9589	-0.3216	1.2740

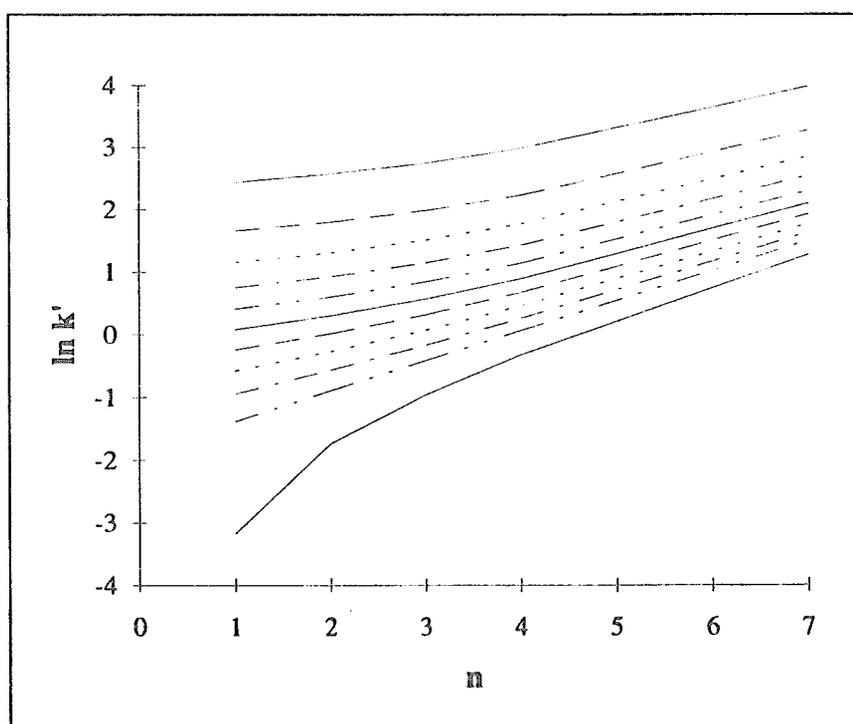
Tabla 6.16.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna .Fase móvil: acetonitrilo-agua 60:40(v/v).

Figura 6.17.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	2.595255	2.797281	3.08191	3.440418	4.824306
0.2	1.824549	2.04122	2.341806	2.714695	4.123094
0.3	1.335001	1.568616	1.88707	2.275556	3.709499
0.4	0.955511	1.20896	1.547563	1.953028	3.41362
0.5	0.631272	0.908259	1.269761	1.693779	3.182212
0.6	0.336472	0.641854	1.029619	1.474	2.991557
0.7	0.05557	0.395896	0.8141	1.280934	2.829003
0.8	-0.22314	0.161268	0.615186	1.106911	2.686997
0.9	-0.51083	-0.06899	0.427444	0.946928	2.560667
1	-0.82098	-0.30111	0.24686	0.797507	2.446685
1.2	-1.60944	-0.79851	-0.10536	0.520776	2.246896
1.3	-2.22848	-1.08334	-0.28257	0.389961	2.158004

Tabla 6.17.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 50:50(v/v).

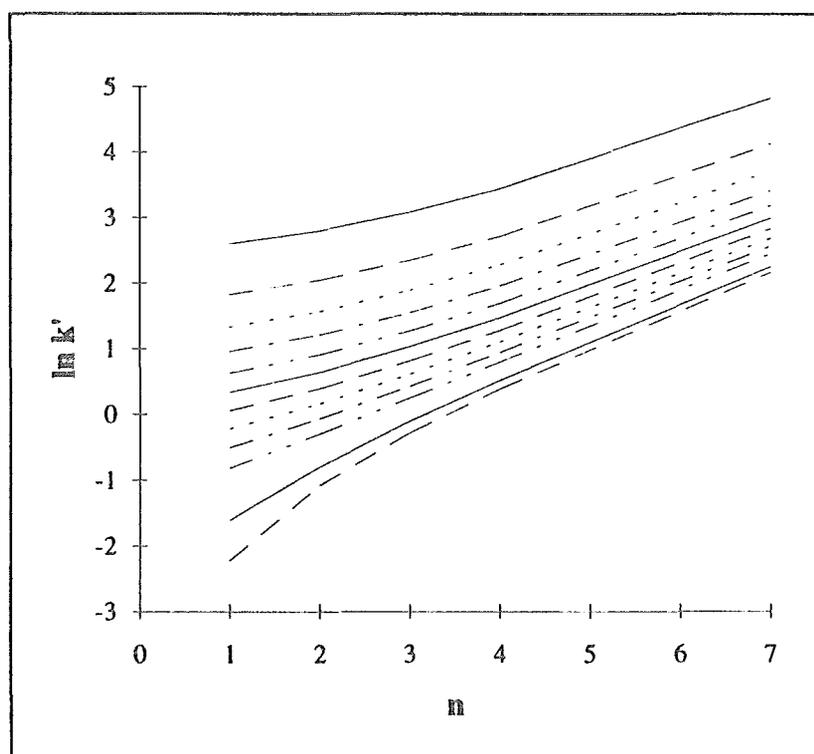


Figura 6.18.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	2.8490	3.0634	3.3489	3.7075	5.0974
0.2	2.0962	2.3224	2.6199	2.9895	4.3981
0.3	1.6273	1.8667	2.1774	2.5585	3.9865
0.4	1.2719	1.5261	1.8512	2.2447	3.6926
0.5	0.9761	1.2470	1.5880	1.9947	3.4632
0.6	0.7154	1.0055	1.3640	1.7848	3.2746
0.7	0.4762	0.7885	1.1663	1.6023	3.1142
0.8	0.2498	0.5878	0.9872	1.4395	2.9743
0.9	0.0296	0.3980	0.8217	1.2917	2.8501
1	-0.1900	0.2151	0.6663	1.1553	2.7383
1.2	-0.6491	-0.1431	0.3756	0.9079	2.5429
1.3	-0.9029	-0.3242	0.2366	0.7937	2.4563

Tabla 6.18.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 40:60(v/v).

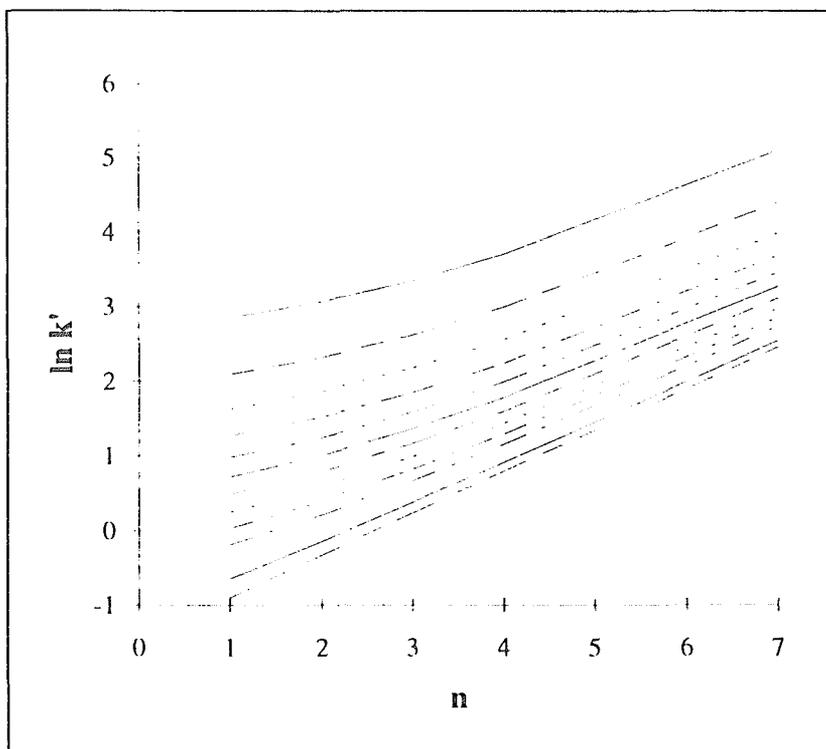


Figura 6.19.

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	5	7	9	11	13	15	17
0.1	2.3656	2.3656	2.4204	2.5657	2.7402	2.9786	3.2843	3.6491	4.0599	4.5032
0.2	1.5738	1.5738	1.6341	1.7926	1.9803	2.2332	2.5530	2.9296	3.3494	3.7990
0.3	1.0589	1.0589	1.1260	1.3002	1.5033	1.7727	2.1078	2.4971	2.9262	3.3822
0.4	0.6484	0.6484	0.7239	0.9173	1.1386	1.4267	1.7788	2.1815	2.6205	3.0832
0.5	0.2852	0.2852	0.3716	0.5889	0.8320	1.1417	1.5125	1.9298	2.3790	2.8485
0.6	-0.0601	-0.0601	0.0408	0.2889	0.5587	0.8934	1.2851	1.7180	2.1780	2.6545
0.7	-0.4090	-0.4090	-0.2877	0.0014	0.3043	0.6686	1.0837	1.5335	2.0048	2.4886
0.8	-0.7847	-0.7847	-0.6325	-0.2860	0.0594	0.4590	0.9007	1.3686	1.8518	2.3431
0.9	-1.2227	-1.2227	-1.0186	-0.5858	-0.1837	0.2589	0.7308	1.2185	1.7142	2.2133
1	-1.8018	-1.8018	-1.4917	-0.9138	-0.4323	0.0639	0.5704	1.0798	1.5886	2.0957

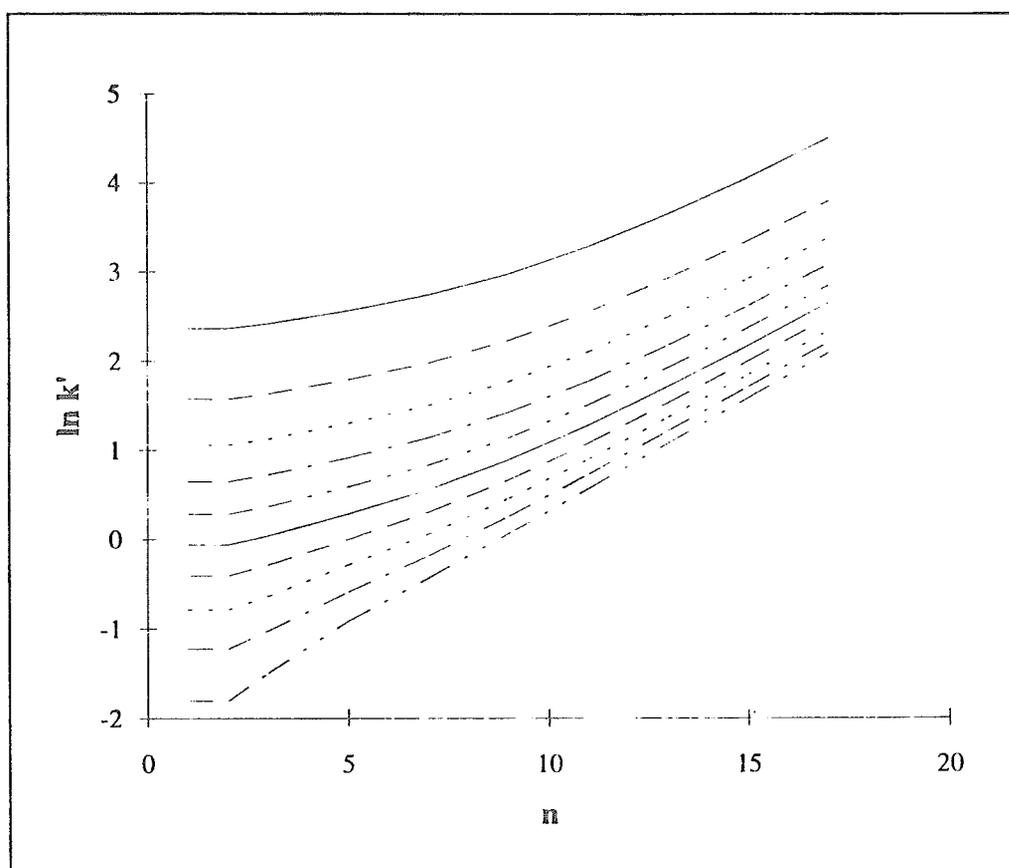
Tabla 6.19.  $\ln k'$  para la serie de las alquilfenonas en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo.

Figura 6.20.

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	5	7	9	11	13	15	17
0.1	2.4087	2.4866	2.5688	2.7973	3.1398	3.5932	4.1372	4.7423	5.3827	6.0398
0.2	1.6214	1.7066	1.7959	2.0412	2.4024	2.8722	3.4280	4.0404	4.6849	5.3442
0.3	1.1119	1.2060	1.3038	1.5686	1.9507	2.4380	3.0062	3.6261	4.2748	4.9364
0.4	0.7080	0.8131	0.9213	1.2090	1.6144	2.1208	2.7019	3.3295	3.9825	4.6463
0.5	0.3535	0.4725	0.5933	0.9083	1.3403	1.8672	2.4618	3.0974	3.7547	4.4208
0.6	0.0198	0.1570	0.2939	0.6419	1.1042	1.6535	2.2623	2.9060	3.5677	4.2360
0.7	-0.3128	-0.1508	0.0071	0.3959	0.8932	1.4669	2.0906	2.7427	3.4088	4.0795
0.8	-0.6636	-0.4660	-0.2794	0.1613	0.6994	1.2999	1.9393	2.5999	3.2705	3.9435
0.9	-1.0594	-0.8059	-0.5778	-0.0690	0.5175	1.1474	1.8034	2.4728	3.1480	3.8233
1	-1.5512	-1.1973	-0.9039	-0.3011	0.3436	1.0061	1.6795	2.3580	3.0378	3.7155
1.2	-4.6052	-2.4651	-1.7671	-0.7985	0.0083	0.7479	1.4592	2.1566	2.8459	3.5283

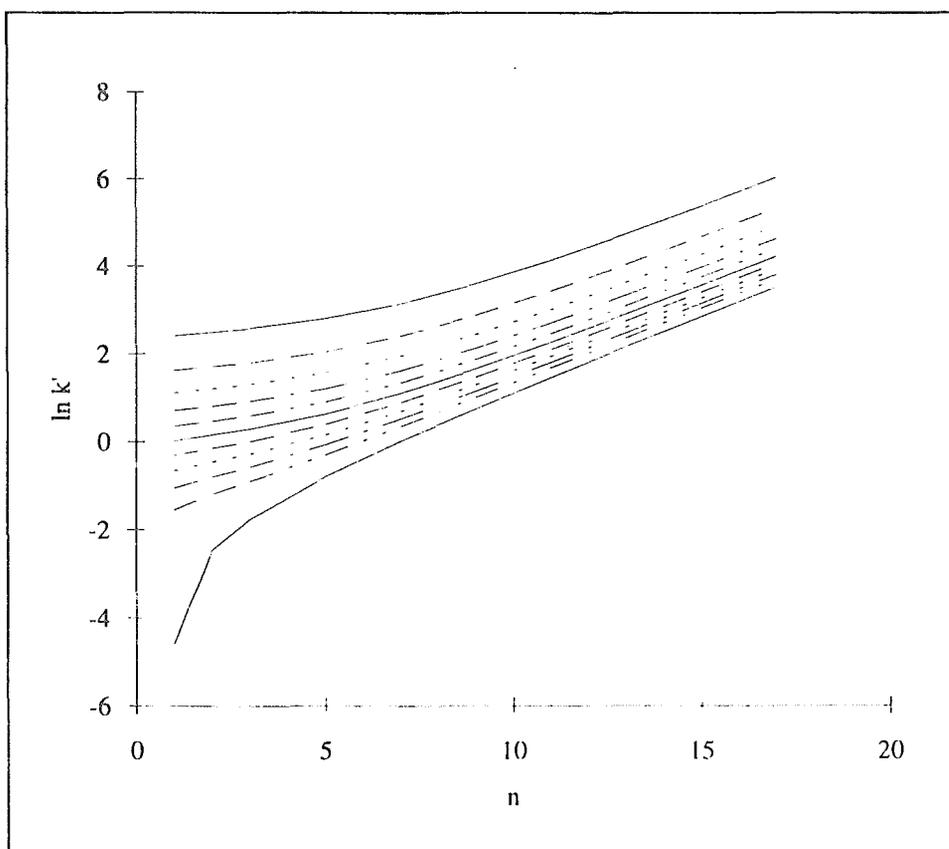
Tabla 6.20 . Ln  $k'$  para la serie de las alquilfenonas en la columna I. Fase móvil:acetonitrilo-agua 90:10(v/v).

Figura 6.21.

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	5	7
0.1	2.4765	2.6034	2.7344	3.1122	3.6386
0.2	1.6956	1.8334	1.9741	2.3735	2.9189
0.3	1.1939	1.3446	1.4966	1.9203	2.4860
0.4	0.7998	0.9660	1.1314	1.5826	2.1702
0.5	0.4574	0.6429	0.8242	1.3067	1.9181
0.6	0.1398	0.3495	0.5500	1.0687	1.7060
0.7	-0.1710	0.0703	0.2948	0.8556	1.5211
0.8	-0.4902	-0.2061	0.0488	0.6595	1.3558
0.9	-0.8362	-0.4907	-0.1957	0.4749	1.2053
1	-1.2379	-0.7963	-0.4463	0.2979	1.0661
1.2	-2.5903	-1.5646	-1.0033	-0.0452	0.8124

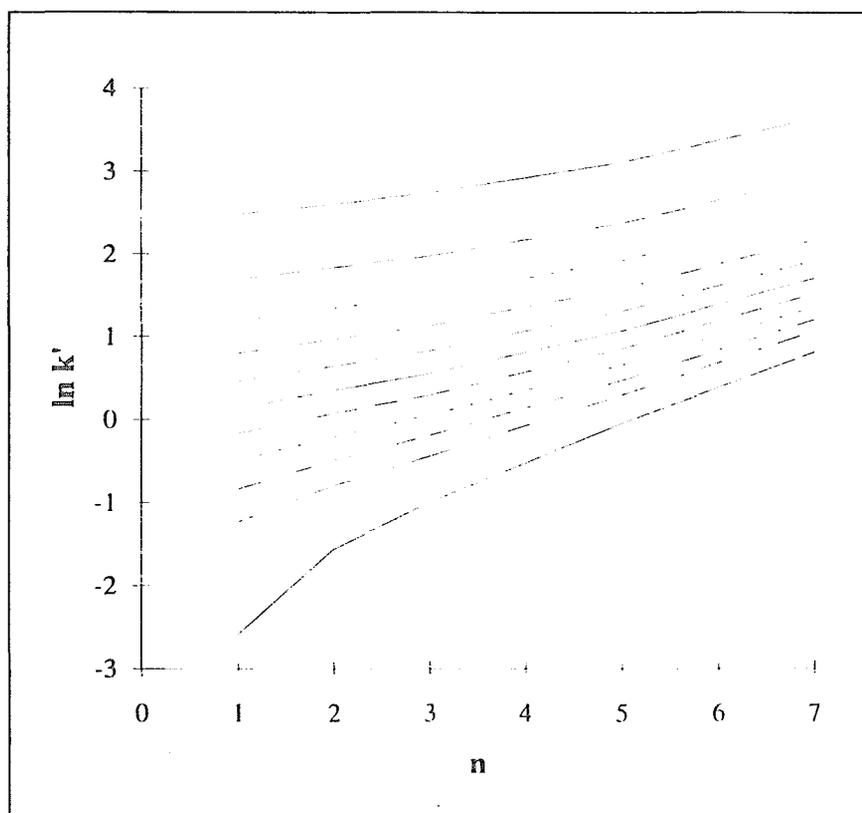
Tabla 6.21.  $\ln k'$  para la serie de las alquilfenonas en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 80:20(v/v).

Figura 6.22.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	5	7
0.1	2.5840	2.7745	2.9730	3.5068	4.2063
0.2	1.8124	2.0169	2.2273	2.7832	3.4982
0.3	1.3218	1.5426	1.7664	2.3463	3.0775
0.4	0.9410	1.1810	1.4201	2.0262	2.7743
0.5	0.6152	0.8780	1.1346	1.7695	2.5354
0.6	0.3185	0.6089	0.8858	1.5525	2.3371
0.7	0.0351	0.3597	0.6605	1.3624	2.1668
0.8	-0.2469	0.1211	0.4503	1.1916	2.0167
0.9	-0.5390	-0.1140	0.2495	1.0352	1.8822
1	-0.8557	-0.3524	0.0535	0.8895	1.7598
1.2	-1.6740	-0.8695	-0.3390	0.6215	1.5424
1.3	-2.3418	-1.1712	-0.5434	0.4956	1.4444

Tabla 6.22 . Ln  $k'$  para la serie de las alquilfenonas en la columna I.Fase móvil: acetonitrilo-agua 70:30(v/v).

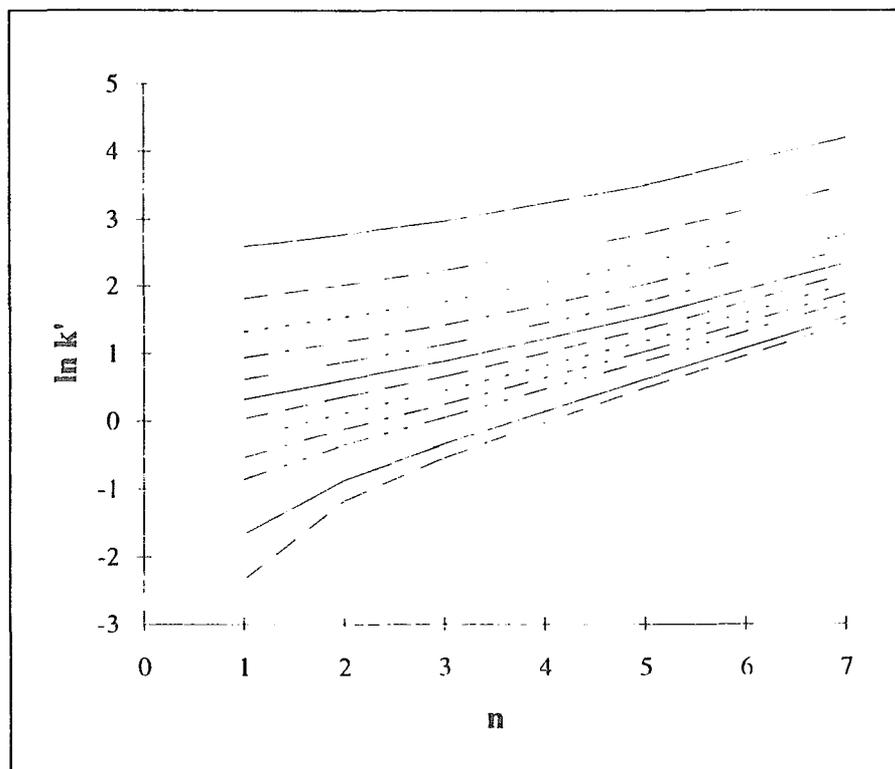


Figura 6.23.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	5	7
0.1	2.7850	3.0796	3.3813	4.1419	5.0412
0.2	2.0281	2.3394	2.6536	3.4327	4.3416
0.3	1.5546	1.8845	2.2123	3.0109	3.9296
0.4	1.1939	1.5449	1.8874	2.7067	3.6353
0.5	0.8920	1.2669	1.6257	2.4667	3.4056
0.6	0.6242	1.0266	1.4032	2.2673	3.2166
0.7	0.3765	0.8109	1.2073	2.0957	3.0558
0.8	0.1398	0.6118	1.0301	1.9445	2.9155
0.9	-0.0931	0.4238	0.8666	1.8087	2.7909
1	-0.3285	0.2429	0.7134	1.6849	2.6787
1.2	-0.8362	-0.1100	0.4280	1.4648	2.4825
1.3	-1.1299	-0.2877	0.2921	1.3653	2.3955

Tabla 6.23.  $\ln k'$  para la serie de las alquilfenonas en I. Fase móvil:acetonitrilo:agua 60:40(v/v).

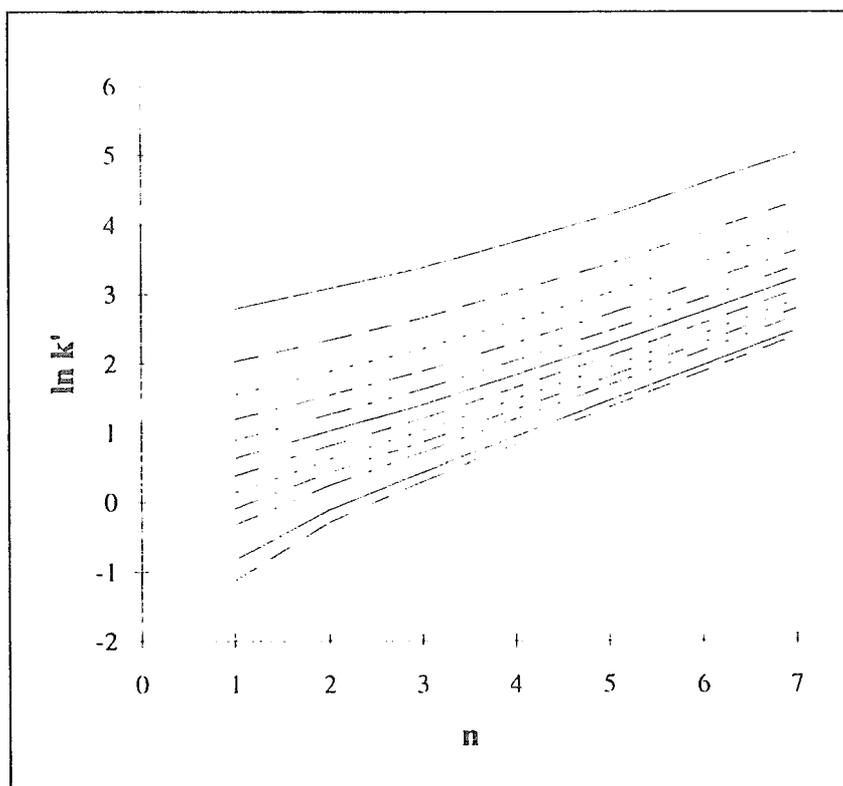


Figura 6.24.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	5	7
0.1	2.9867	3.3861	3.7876	4.7519	5.8264
0.2	2.2418	2.6585	3.0715	4.0500	5.1303
0.3	1.7817	2.2174	2.6426	3.6358	4.7219
0.4	1.4363	1.8927	2.3309	3.3393	4.4312
0.5	1.1518	1.6312	2.0832	3.1073	4.2051
0.6	0.9042	1.4090	1.8756	2.9160	4.0198
0.7	0.6802	1.2132	1.6956	2.7528	3.8627
0.8	0.4716	1.0363	1.5355	2.6101	3.7261
0.9	0.2726	0.8732	1.3905	2.4831	3.6053
1	0.0788	0.7203	1.2570	2.3684	3.4969
1.2	-0.3079	0.4356	1.0161	2.1671	3.3085
1.3	-0.5083	0.3001	0.9055	2.0775	3.2254

Tabla 6.24.  $\ln k'$  para la serie de las alquifenonas en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 50:50(v/v).

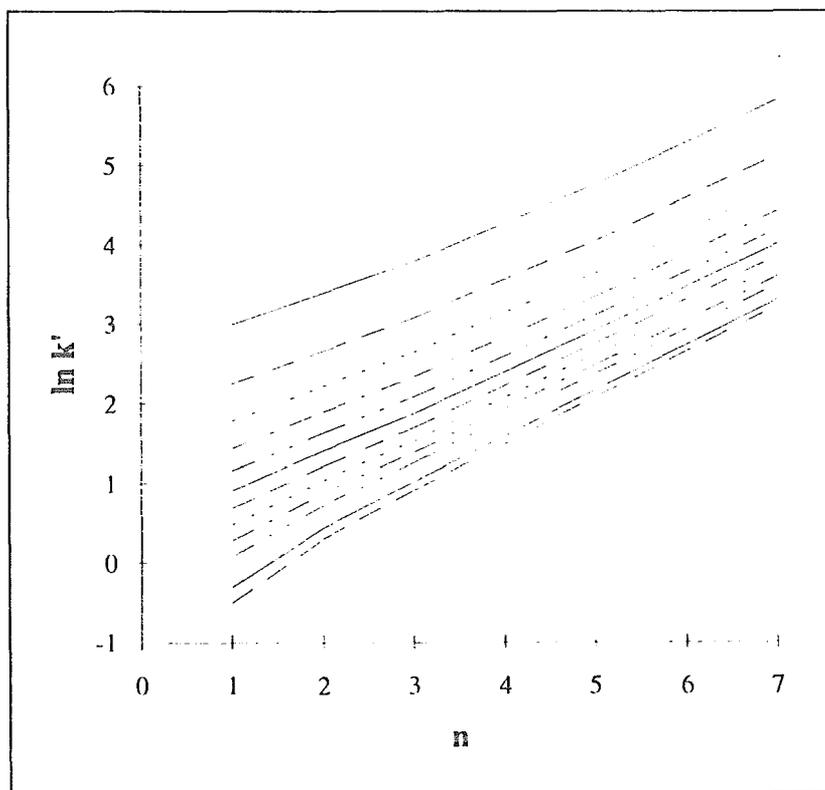


Figura 6.25.

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	5	7
0.1	3.3436	3.9140	4.4731	5.7516	7.1058
0.2	2.6145	3.2007	3.7685	5.0553	6.4118
0.3	2.1717	2.7747	3.3514	4.6466	6.0055
0.4	1.8453	2.4660	3.0520	4.3557	5.7170
0.5	1.5819	2.2214	2.8170	4.1294	5.4931
0.6	1.3576	2.0171	2.6226	3.9438	5.3099
0.7	1.1596	1.8405	2.4563	3.7865	5.1549
0.8	0.9802	1.6841	2.3104	3.6497	5.0206
0.9	0.8144	1.5428	2.1802	3.5286	4.9020
1	0.6586	1.4134	2.0622	3.4200	4.7958
1.2	0.3670	1.1812	1.8541	3.2311	4.6118
1.3	0.2274	1.0753	1.7609	3.1478	4.5309

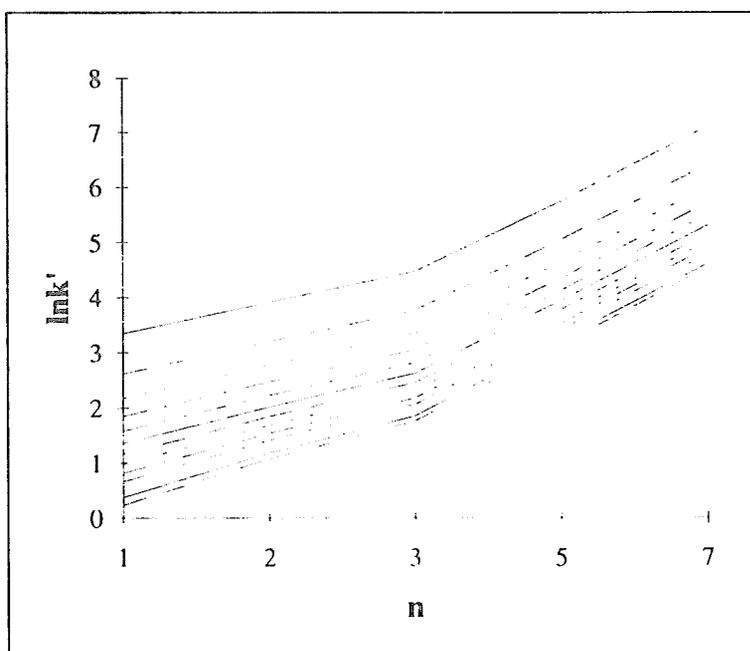
Tabla 6.25.  $\ln k'$  de la serie de las alquilfenonas con la columna I. Fase móvil acetonitrilo-agua 40:60(v/v).

Figura 6.26

## Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.5	0.3577	0.3716	0.4511	0.6270	0.7438	0.8755	1.1969	1.5773
0.6	0.0247	0.0408	0.1325	0.3317	0.4616	0.6061	0.9523	1.3528
0.7	-0.3069	-0.2877	-0.1795	0.0501	0.1965	0.3567	0.7317	1.1546
0.8	-0.6563	-0.6325	-0.5005	-0.2294	-0.0619	0.1178	0.5269	0.9750
0.9	-1.0498	-1.0186	-0.8492	-0.5183	-0.3224	-0.1178	0.3325	0.8090
1	-1.5371	-1.4917	-1.2553	-0.8301	-0.5942	-0.3567	0.1441	0.6528
1.1	-2.2581	-2.1748	-1.7827	-1.1860	-0.8894	-0.6061	-0.0418	0.5041
1.2	-4.3820	-3.8712	-2.6474	-1.6262	-1.2264	-0.8755	-0.2284	0.3606

Tabla 6.26.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo.

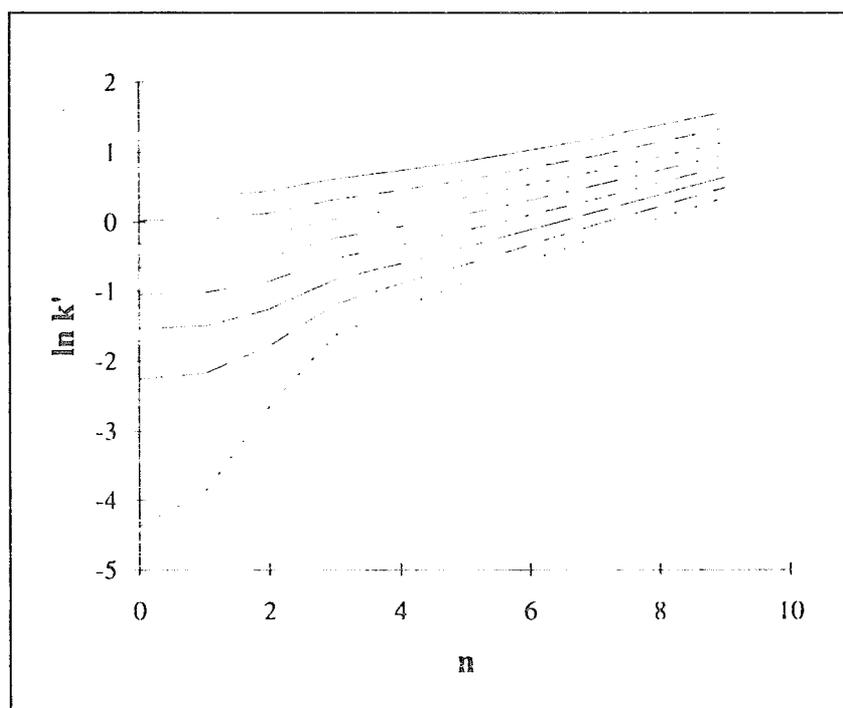


Figura 6.27.

Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.6	0.1726	0.3329	0.4876	0.6695	0.8831	1.1157	1.6519	2.2442
0.7	-0.1327	0.0515	0.2254	0.4262	0.6575	0.9054	1.4652	2.0723
0.8	-0.4443	-0.2278	-0.0292	0.1947	0.4471	0.7123	1.2981	1.9206
0.9	-0.7789	-0.5164	-0.2847	-0.0316	0.2460	0.5313	1.1456	1.7843
1	-1.1616	-0.8278	-0.5499	-0.2588	0.0497	0.3584	1.0043	1.6601
1.1	-1.6418	-1.1830	-0.8355	-0.4928	-0.1456	0.1906	0.8717	1.5456
1.2	-2.3627	-1.6220	-1.1578	-0.7409	-0.3437	0.0255	0.7459	1.4390

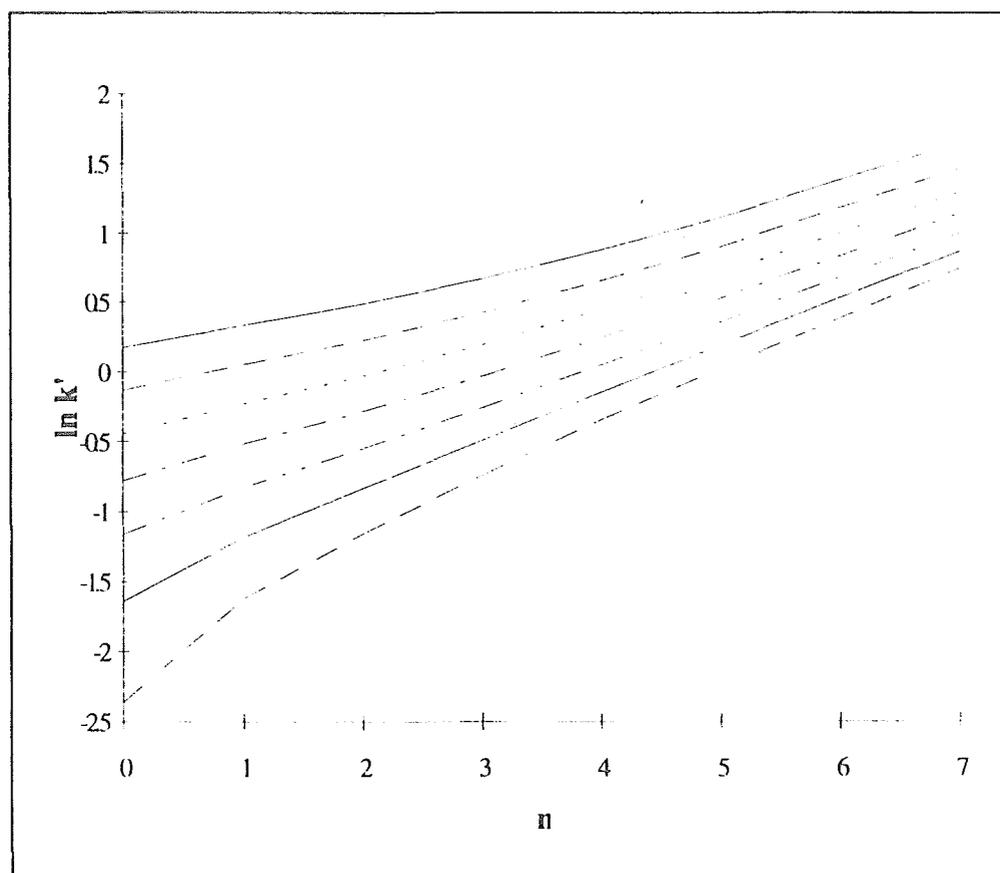
Tabla 6.27.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 90:10(v/v).

Figura 6.28.

Número de carbonos

Vo	0	1	2	3	4	5	7	9
0.6	0.4752	0.7039	0.9183	1.2015	1.5030	1.8243	2.5337	3.2851
0.7	0.2116	0.4637	0.6953	0.9959	1.3110	1.6429	2.3662	3.1247
0.8	-0.0447	0.2361	0.4878	0.8081	1.1382	1.4813	2.2192	2.9849
0.9	-0.3026	0.0143	0.2902	0.6330	0.9796	1.3347	2.0877	2.8607
1	-0.5709	-0.2070	0.0980	0.4669	0.8316	1.1997	1.9685	2.7490
1.1	-0.8610	-0.4336	-0.0923	0.3068	0.6918	1.0738	1.8591	2.6473
1.2	-1.1902	-0.6717	-0.2844	0.1506	0.5582	0.9552	1.7579	2.5538

Tabla 5.28. Ln k' para la serie de los alquilbencenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 80:20(v/v).

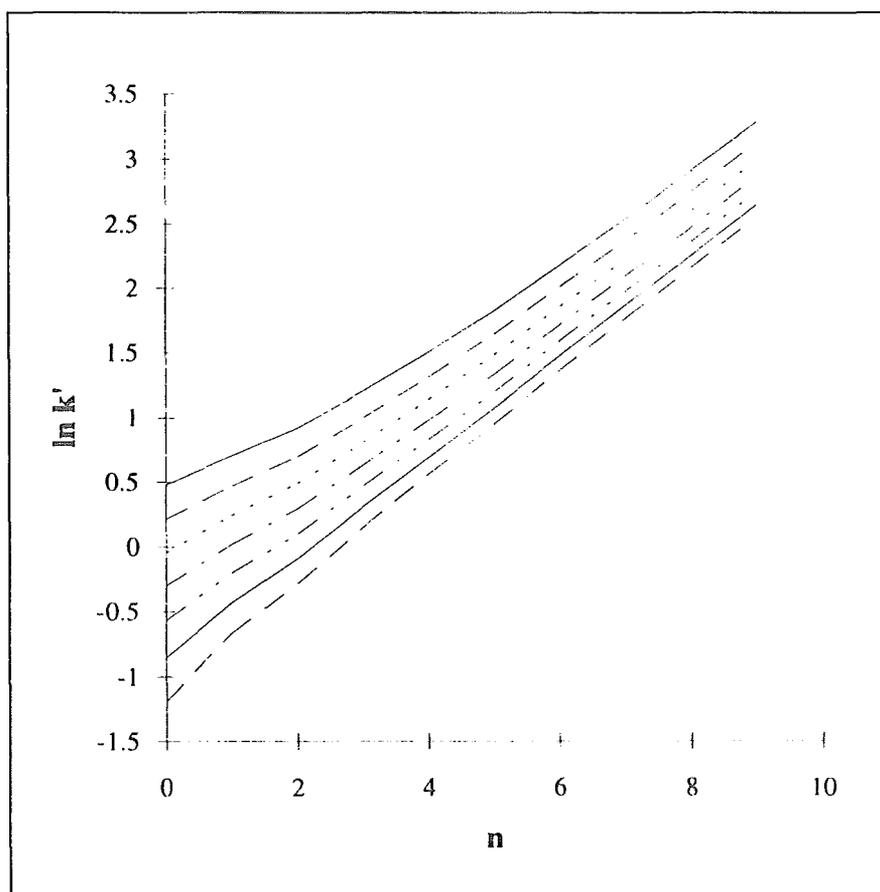


Figura 6.29.

Vo	Número de carbonos							
	0	1	2	3	4	5	7	9
0.5	0.3577	0.3716	0.4511	0.6270	0.7438	0.8755	1.1969	1.5773
0.6	0.0247	0.0408	0.1325	0.3317	0.4616	0.6061	0.9523	1.3528
0.7	-0.3069	-0.2877	-0.1795	0.0501	0.1965	0.3567	0.7317	1.1546
0.8	-0.6563	-0.6325	-0.5005	-0.2294	-0.0619	0.1178	0.5269	0.9750
0.9	-1.0498	-1.0186	-0.8492	-0.5183	-0.3224	-0.1178	0.3325	0.8090
1	-1.5371	-1.4917	-1.2553	-0.8301	-0.5942	-0.3567	0.1441	0.6528
1.1	-2.2581	-2.1748	-1.7827	-1.1860	-0.8894	-0.6061	-0.0418	0.5041
1.2	-4.3820	-3.8712	-2.6474	-1.6262	-1.2264	-0.8755	-0.2284	0.3606

Tabla 6.29. Ln k' para la serie de los alquilbencenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 70:30(v/v).

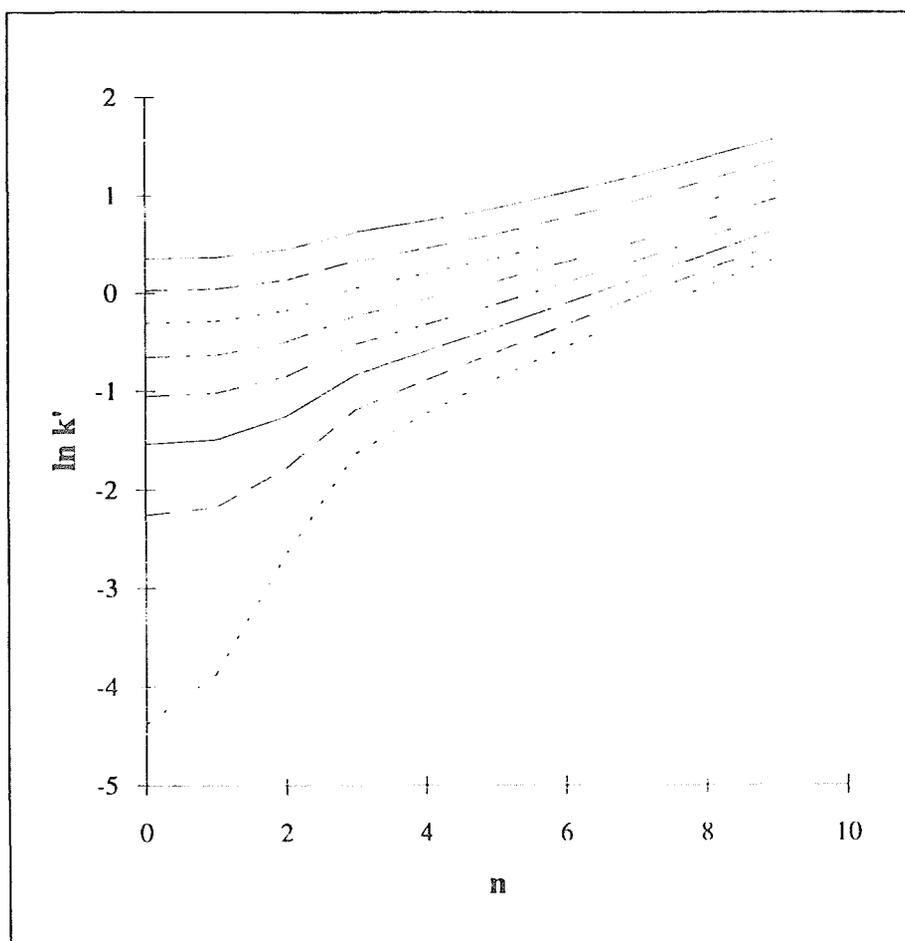


Figura 6.30.

Número de carbonos						
$V_0$	0	1	2	3	4	5
0.1	3.1224	3.7400	4.1400	4.5623	5.0039	5.9480
0.2	2.3842	3.0229	3.4308	3.8586	4.3041	5.2523
0.3	1.9315	2.5928	3.0090	3.4426	3.8918	4.8442
0.4	1.5943	2.2798	2.7047	3.1442	3.5973	4.5539
0.5	1.3191	2.0308	2.4647	2.9102	3.3673	4.3281
0.6	1.0818	1.8219	2.2652	2.7169	3.1781	4.1431
0.7	0.8695	1.6404	2.0936	2.5517	3.0169	3.9863
0.8	0.6742	1.4788	1.9423	2.4069	2.8764	3.8501
0.9	0.4906	1.3321	1.8065	2.2778	2.7515	3.7297
1	0.3148	1.1969	1.6827	2.1610	2.6391	3.6217
1.2	-0.0253	0.9523	1.4625	1.9554	2.4423	3.4340
1.3	-0.1947	0.8396	1.3629	1.8635	2.3550	3.3513

Tabla 6.30.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna I. Fase móvil: acetonitrilo-agua 60:40(v/v).

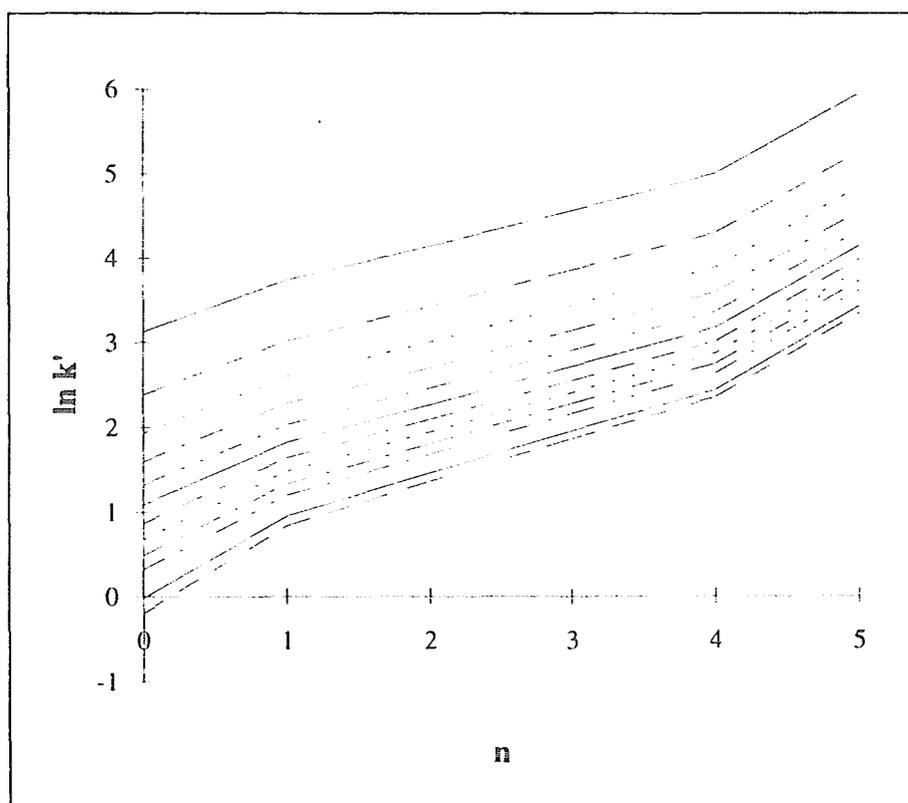


Figura 6.31.

Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.2	2.6532	2.6532	2.6532	2.6946	2.7213	2.7473	2.8154	2.9014
0.4	1.8871	1.8871	1.8871	1.9315	1.9601	1.9879	2.0605	2.1518
0.6	1.4028	1.4028	1.4028	1.4508	1.4816	1.5115	1.5892	1.6864
0.8	1.0296	1.0296	1.0296	1.0818	1.1151	1.1474	1.2311	1.3350
1.0	0.7129	0.7129	0.7129	0.7701	0.8065	0.8416	0.9322	1.0438
1.2	0.4274	0.4274	0.4274	0.4906	0.5306	0.5691	0.6678	0.7885
1.4	0.1582	0.1582	0.1582	0.2288	0.2733	0.3159	0.4243	0.5555
1.6	-0.1054	-0.1054	-0.1054	-0.0253	0.0247	0.0723	0.1927	0.3365
1.8	-0.3727	-0.3727	-0.3727	-0.2803	-0.2231	-0.1691	-0.0339	0.1252
2.0	-0.6539	-0.6539	-0.6539	-0.5447	-0.4780	-0.4155	-0.2614	-0.0834
2.2	-0.9628	-0.9628	-0.9628	-0.8293	-0.7492	-0.6751	-0.4958	-0.2938
2.4	-1.3218	-1.3218	-1.3218	-1.1499	-1.0498	-0.9589	-0.7444	-0.5108
2.6	-1.7765	-1.7765	-1.7765	-1.5353	-1.4018	-1.2840	-1.0174	-0.7404
2.8	-2.4567	-2.4567	-2.4567	-2.0513	-1.8506	-1.6835	-1.3307	-0.9904
3.0	-4.3175	-4.3175	-4.3175	-2.9312	-2.5257	-2.2380	-1.7148	-1.2730

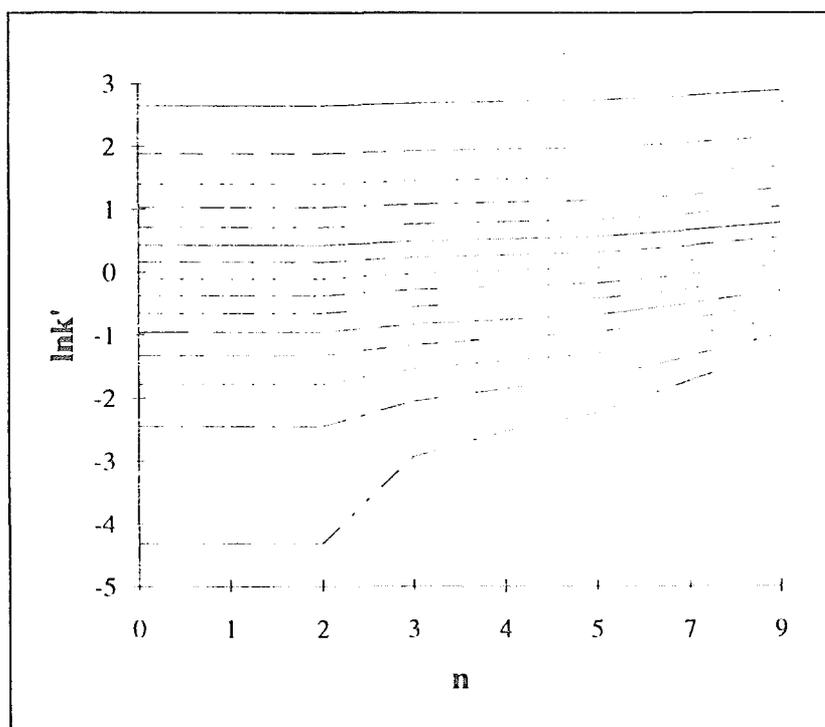
Tabla 6.31.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo.

Figura 6. 32.

Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.2	2.7014	2.7473	2.7973	2.8622	2.9285	3.0057	3.1987	3.4243
0.4	1.9387	1.9879	2.0412	2.1102	2.1804	2.2618	2.4639	2.6980
0.6	1.4586	1.5115	1.5686	1.6422	1.7168	1.8028	2.0149	2.2583
0.8	1.0902	1.1474	1.2090	1.2879	1.3674	1.4586	1.6818	1.9351
1.0	0.7793	0.8416	0.9083	0.9933	1.0784	1.1756	1.4110	1.6752
1.2	0.5008	0.5691	0.6419	0.7340	0.8256	0.9295	1.1787	1.4547
1.4	0.2401	0.3159	0.3959	0.4964	0.5957	0.7073	0.9719	1.2609
1.6	-0.0126	0.0723	0.1613	0.2719	0.3801	0.5008	0.7828	1.0860
1.8	-0.2657	-0.1691	-0.0690	0.0541	0.1730	0.3042	0.6061	0.9251
2.0	-0.5276	-0.4155	-0.3011	-0.1625	-0.0305	0.1133	0.4383	0.7747
2.2	-0.8087	-0.6751	-0.5416	-0.3830	-0.2346	-0.0755	0.2763	0.6322
2.4	-1.1239	-0.9589	-0.7985	-0.6131	-0.4437	-0.2657	0.1178	0.4957
2.6	-1.5002	-1.2840	-1.0833	-0.8602	-0.6628	-0.4608	-0.0392	0.3636
2.8	-1.9972	-1.6835	-1.4153	-1.1350	-0.8986	-0.6650	-0.1967	0.2345
3.0	-2.8134	-2.2380	-1.8326	-1.4553	-1.1605	-0.8835	-0.3567	0.1074

Tabla 6.32.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo:agua 90:10(v/v).

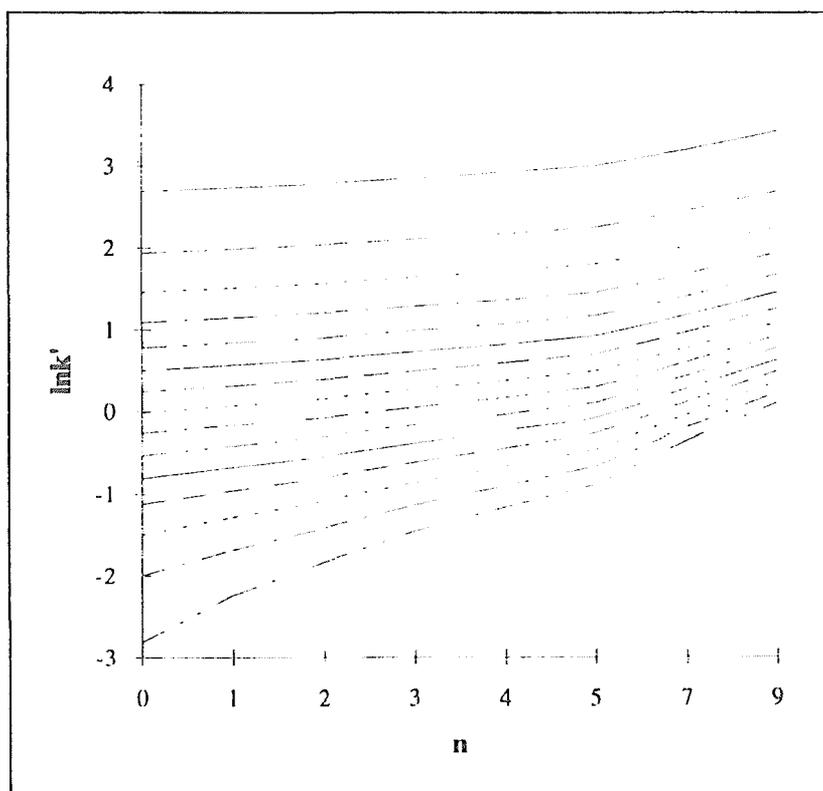


Figura 6.33.

Número de carbonos

Vo	0	1	2	3	4	5	7	9
0.2	2.8214	2.90141	2.9907	3.1046	3.2308	3.3707	3.7013	4.1431
0.4	2.0669	2.1518	22.2460	2.3656	2.4973	2.6426	2.9832	3.4340
0.6	1.5960	1.6864	13.7862	1.9120	2.0498	2.2009	2.5520	3.0123
0.8	1.2384	1.3350	1.44410	1.5738	1.7183	1.8756	2.2380	2.7081
1.0	0.9400	1.0438	1.15569	1.2975	1.4493	1.6134	1.9879	2.4681
1.2	0.6763	0.7885	0.90796	1.0589	1.2189	1.3905	1.7778	2.2687
1.4	0.4336	0.5555	0.6860	0.8453	1.0142	1.1939	1.5950	2.0971
1.6	0.2029	0.3365	0.4778	0.6484	0.8275	1.0161	1.4321	1.9459
1.8	-0.0225	0.1252	0.2793	0.4630	0.6535	0.8520	1.2840	1.8101
2.0	-0.2485	-0.0834	0.0862	0.2852	0.4886	0.6981	1.1474	1.6864
2.2	-0.4810	-0.2938	-0.1054	0.1117	0.3300	0.5518	1.0198	1.5724
2.4	-0.7270	-0.5108	-0.2989	-0.0601	0.1754	0.4110	0.8995	1.4663
2.6	-0.9963	-0.7404	-0.4981	-0.2328	0.0228	0.2741	0.7850	1.3669
2.8	-1.3041	-0.9904	-0.7075	-0.4090	-0.1295	0.1398	0.6751	1.2730
3.0	-1.6784	-1.2730	-0.9331	-0.5918	-0.2832	0.0066	0.5691	1.1838
3.2	-2.1848	-1.6094	-1.1834	-0.7847	-0.4404	-0.1264	0.4661	1.0986

Tabla 6.33. Ln k' para la serie de los alquilbencenos en la columna III..Fase móvil: acetonitrilo:agua 80:20(v/v)

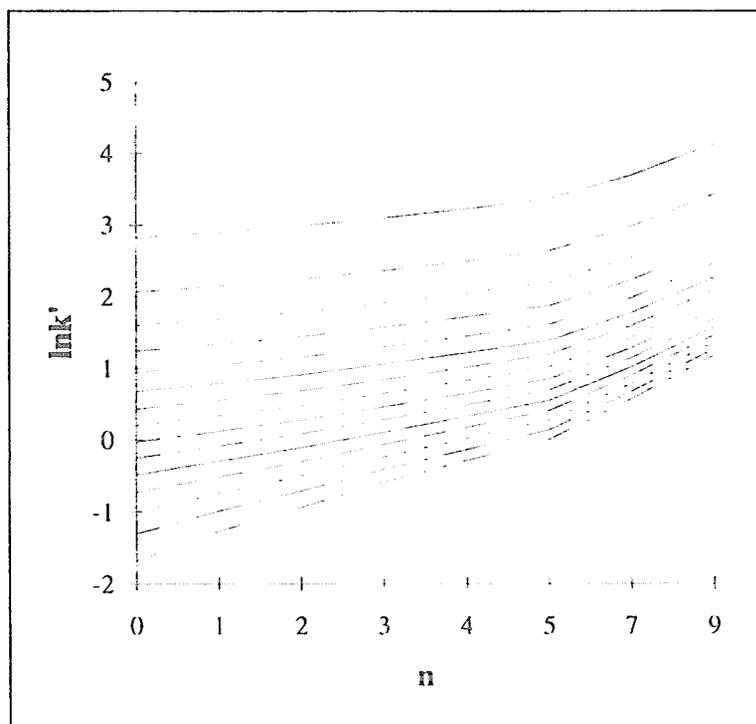


Figura 6.34

Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.2	2.9857	3.1135	3.2504	3.4243	3.6163	3.8221	4.2877	4.8040
0.4	2.2407	2.3749	2.5177	2.6980	2.8959	3.1068	3.5807	4.1026
0.6	1.7806	1.9218	2.0711	2.2583	2.4624	2.6787	3.1612	3.6889
0.8	1.4351	1.5841	1.7405	1.9351	2.1459	2.3679	2.8593	3.3928
1.0	1.1506	1.3083	1.4725	1.6752	1.8931	2.1211	2.6218	3.1612
1.2	0.9029	1.0704	1.2432	1.4547	1.6802	1.9145	2.4248	2.9704
1.4	0.6788	0.8575	1.0398	1.2609	1.4945	1.7354	2.2558	2.8077
1.6	0.4700	0.6614	0.8544	1.0860	1.3284	1.5764	2.1072	2.6655
1.8	0.2709	0.4769	0.6820	0.9251	1.1769	1.4324	1.9741	2.5390
2.0	0.0770	0.3001	0.5188	0.7747	1.0367	1.3002	1.8532	2.4248
2.2	-0.1155	0.1278	0.3621	0.6322	0.9053	1.1773	1.7421	2.3206
2.4	-0.3102	-0.0426	0.2097	0.4957	0.7809	1.0618	1.6390	2.2246
2.6	-0.5108	-0.2136	0.0597	0.3636	0.6619	0.9525	1.5426	2.1355
2.8	-0.7221	-0.3878	-0.0896	0.2345	0.5473	0.8483	1.4519	2.0523
3.0	-0.9502	-0.5680	-0.2400	0.1074	0.4361	0.7483	1.3661	1.9741
3.2	-1.2040	-0.7577	-0.3930	-0.0189	0.3275	0.6517	1.2844	1.9002

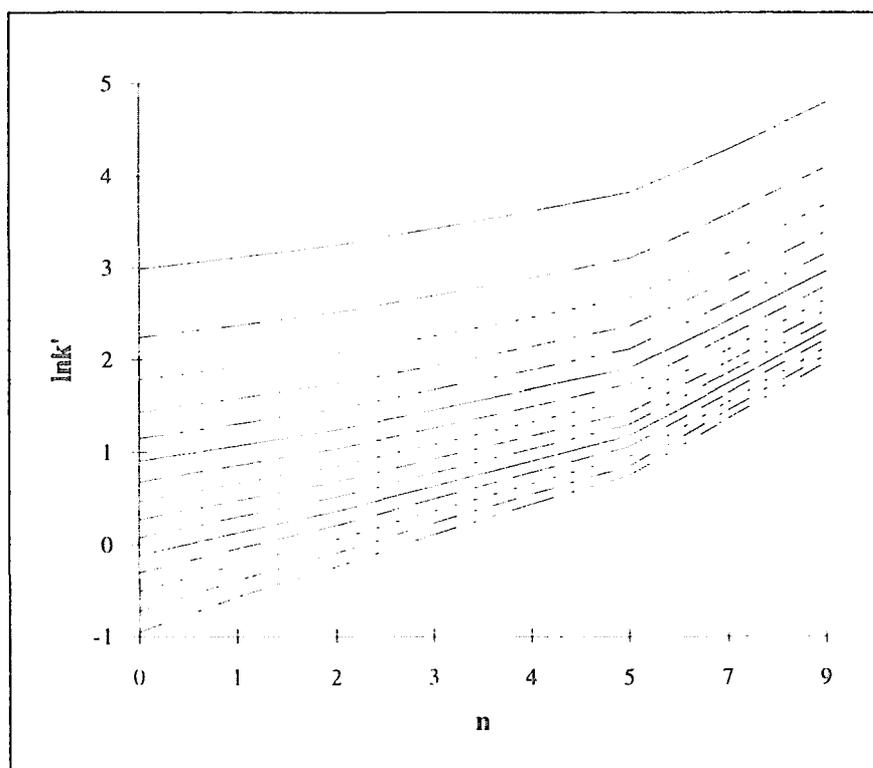
Tabla 6.34.  $\ln k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna. Fase móvil: acetonitrilo:agua 70:30(v/v).

Figura 6.35.

Número de carbonos

$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	9
0.2	3.2619	3.4595	3.6763	3.9435	4.2195	4.5240	5.1631	5.8331
0.4	2.5297	2.7344	2.9575	3.2308	3.5115	3.8199	4.4642	5.1370
0.6	2.0836	2.2959	2.5257	2.8054	3.0910	3.4034	4.0529	4.7286
0.8	1.7535	1.9741	2.2110	2.4973	2.7881	3.1046	3.7595	4.4379
1.0	1.4861	1.7156	1.9601	2.2534	2.5494	2.8702	3.5305	4.2118
1.2	1.2575	1.4966	1.7492	2.0498	2.3514	2.6764	3.3423	4.0265
1.4	1.0548	1.3045	1.5656	1.8740	2.1812	2.5108	3.1822	3.8694
1.6	0.8702	1.1314	1.4018	1.7183	2.0314	2.3656	3.0427	3.7329
1.8	0.6987	0.9725	1.2528	1.5778	1.8971	2.2360	2.9190	3.6121
2.0	0.5365	0.8242	1.1151	1.4493	1.7750	2.1187	2.8076	3.5038
2.2	0.3809	0.6840	0.9865	1.3302	1.6625	2.0113	2.7062	3.4054
2.4	0.2298	0.5500	0.8650	1.2189	1.5581	1.9120	2.6131	3.3154
2.6	0.0812	0.4207	0.7492	1.1139	1.4604	1.8196	2.5270	3.2323
2.8	-0.0664	0.2948	0.6381	1.0142	1.3683	1.7329	2.4467	3.1552
3.0	-0.2148	0.1711	0.5306	0.9190	1.2809	1.6512	2.3715	3.0831
3.2	-0.3656	0.0488	0.4261	0.8275	1.1977	1.5738	2.3007	3.0155

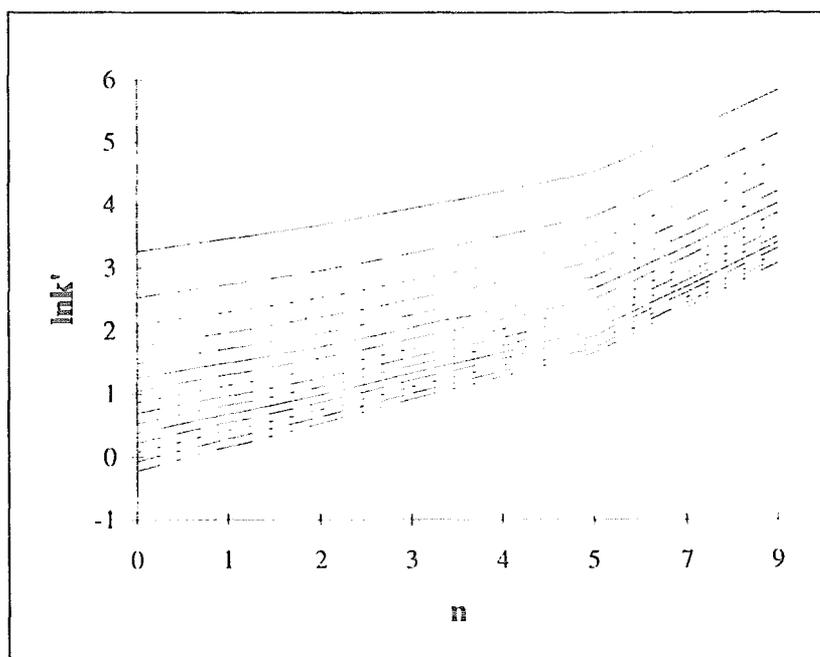
Tabla 6.35.  $\ln k'$  para los alquilbencenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo:agua 60:40(v/v).

Figura 6.36

		Número de carbonos						
$V_0$	0	1	2	3	4	5	7	
0.2	3.5381	3.8155	4.1141	4.4728	4.8434	5.2247	6.0088	
0.4	2.8154	3.1001	3.4045	3.7682	4.1423	4.5261	5.3132	
0.6	2.3795	2.6718	2.9823	3.3511	3.7289	4.1152	4.9053	
0.8	2.0605	2.3609	2.6776	3.0516	3.4332	3.8221	4.6151	
1	1.8050	2.1138	2.4371	2.8166	3.2019	3.5935	4.3895	
1.2	1.5892	1.9071	2.2372	2.6223	3.0114	3.4056	4.2047	
1.4	1.4005	1.7279	2.0651	2.4559	2.8491	3.2459	4.0481	
1.6	1.2311	1.5686	1.9132	2.3101	2.7072	3.1068	3.9120	
1.8	1.0761	1.4244	1.7768	2.1798	2.5811	2.9834	3.7917	
2	0.9322	1.2920	1.6525	2.0618	2.4673	2.8724	3.6839	
2.2	0.7967	1.1688	1.5378	1.9537	2.3634	2.7715	3.5860	
2.4	0.6678	1.0531	1.4311	1.8537	2.2678	2.6787	3.4965	
2.6	0.5441	0.9436	1.3309	1.7605	2.1791	2.5930	3.4139	
2.8	0.4243	0.8391	1.2363	1.6731	2.0963	2.5131	3.3373	
3	0.3075	0.7388	1.1463	1.5906	2.0185	2.4383	3.2658	
3.2	0.1927	0.6419	1.0604	1.5124	1.9450	2.3679	3.1987	

Tabla 6.36.  $\ln k'$  para los alquilbencenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo:agua 50:50(v/v).

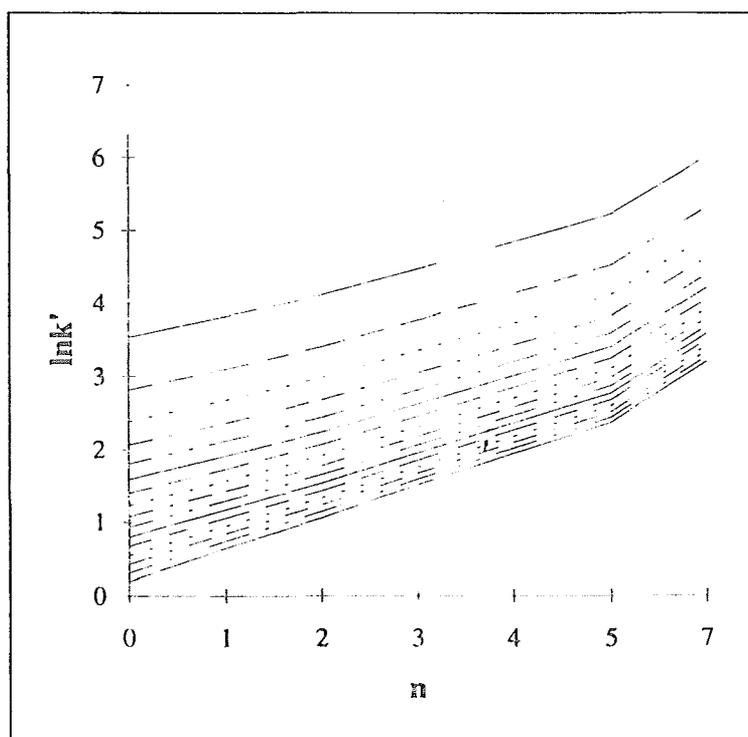


Figura 6.37.

Número de carbonos				
$V_0$	0	1	2	3
0.2	3.8795	4.2556	4.6597	5.1281
0.4	3.1655	3.5482	3.9570	4.4290
0.6	2.7387	3.1282	3.5419	4.0176
0.8	2.4292	2.8258	3.2445	3.7239
1	2.1838	2.5878	3.0116	3.4947
1.2	1.9787	2.3903	2.8194	3.3063
1.4	1.8012	2.2208	2.6553	3.1460
1.6	1.6438	2.0716	2.5116	3.0063
1.8	1.5016	1.9379	2.3837	2.8823
2	1.3712	1.8165	2.2680	2.7707
2.2	1.2502	1.7047	2.1623	2.6691
2.4	1.1368	1.6011	2.0648	2.5758
2.6	1.0296	1.5041	1.9741	2.4894
2.8	0.9277	1.4127	1.8892	2.4089
3	0.8300	1.3262	1.8094	2.3334
3.2	0.7360	1.2438	1.7339	2.2624

Tabla 6.37.  $\ln k'$  para los alquilbencenos en CHH. Fase móvil: acetonitrilo:agua 40:60(v/v).

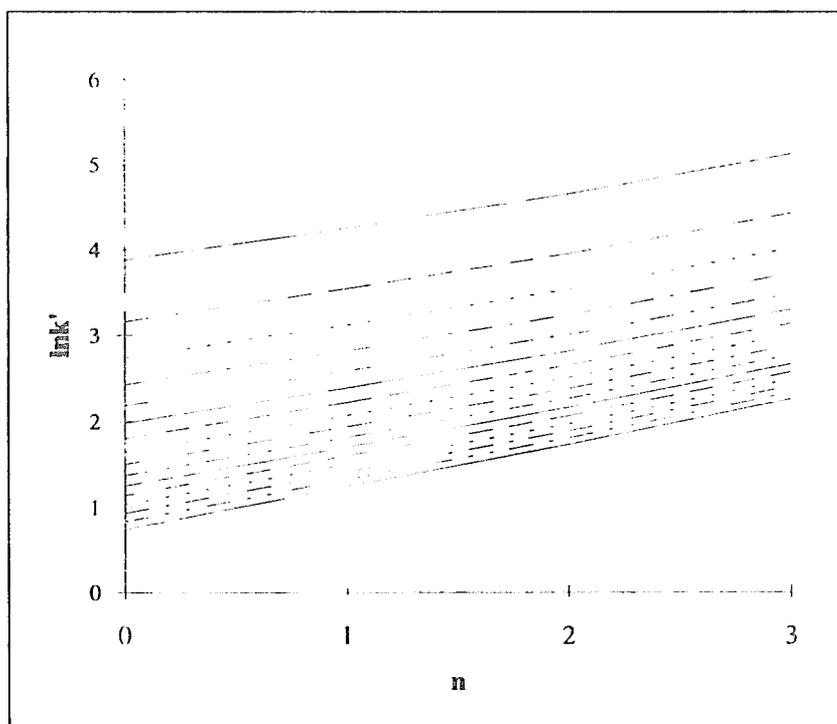
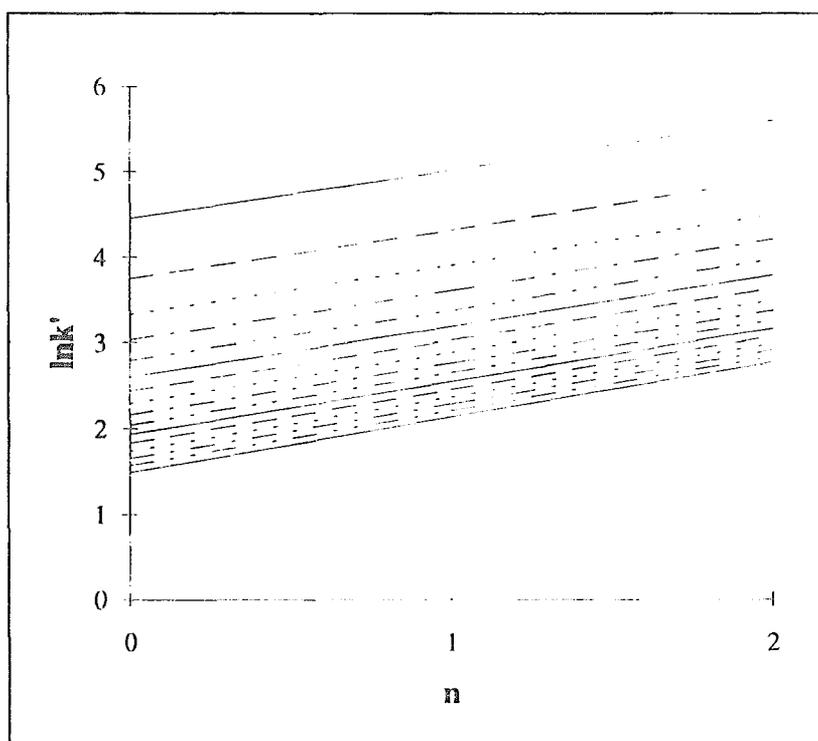


Figura 6.38.

$V_0$	0	1	2
0.2	4.4532	5.0126	5.6025
0.4	3.7483	4.3128	4.9056
0.6	3.3310	3.9006	4.4965
0.8	3.0313	3.6062	4.2051
1	2.7961	3.3762	3.9782
1.2	2.6015	3.1870	3.7921
1.4	2.4349	3.0260	3.6342
1.6	2.2887	2.8855	3.4969
1.8	2.1582	2.7607	3.3753
2	2.0399	2.6483	3.2661
2.2	1.9315	2.5459	3.1670
2.4	1.8312	2.4517	3.0762
2.6	1.7378	2.3645	2.9923
2.8	1.6500	2.2831	2.9143
3	1.5672	2.2068	2.8414
3.2	1.4887	2.1349	2.7730

**Tabla 6.38.** . Ln  $k'$  para la serie de los alquilbencenos en la columna III.Fase móvil: acetonitrilo-agua 30:70(v/v).



**Figura 6.39.**

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	3.2884	3.2884	3.3393	3.3742	3.5086
0.2	2.5572	2.5572	2.6101	2.6462	2.7850
0.3	2.1122	2.1122	2.1671	2.2046	2.3482
0.4	1.7834	1.7834	1.8405	1.8795	2.0281
0.5	1.5173	1.5173	1.5769	1.6174	1.7716
0.6	1.2902	1.2902	1.3524	1.3946	1.5546
0.7	1.0890	1.0890	1.1542	1.1982	1.3646
0.8	0.9062	0.9062	0.9746	1.0207	1.1939
0.9	0.7366	0.7366	0.8085	0.8568	1.0375
1.0	0.5766	0.5766	0.6523	0.7031	0.8920
1.2	0.2751	0.2751	0.3600	0.4165	0.6242
1.3	0.1297	0.1297	0.2201	0.2800	0.4984

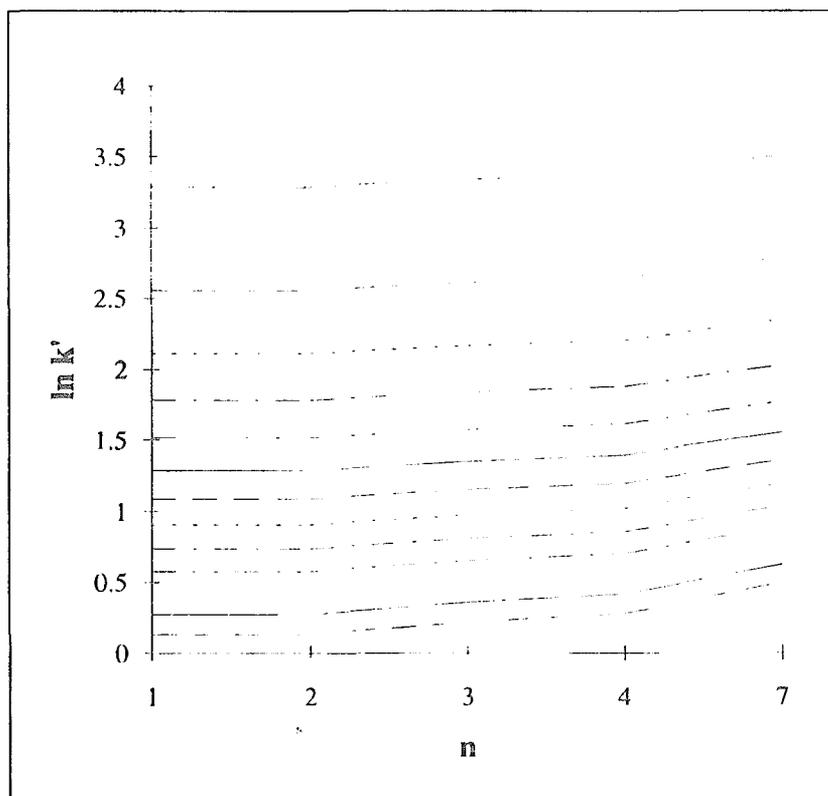
Tabla 6.39.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 90:10(v/v).

Figura 6.40

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	3.3250	3.3604	3.4144	3.4720	3.7184
0.2	2.5953	2.6319	2.6878	2.7473	3.0007
0.3	2.1518	2.1898	2.2478	2.3092	2.5701
0.4	1.8245	1.8641	1.9242	1.9879	2.2565
0.5	1.5602	1.6014	1.6639	1.7299	2.0069
0.6	1.3350	1.3779	1.4430	1.5115	1.7973
0.7	1.1360	1.1809	1.2487	1.3198	1.6151
0.8	0.9555	1.0025	1.0733	1.1474	1.4528
0.9	0.7885	0.8377	0.9118	0.9891	1.3053
1	0.6313	0.6831	0.7608	0.8416	1.1694
1.2	0.3365	0.3943	0.4804	0.5691	0.9229
1.3	0.1951	0.2564	0.3474	0.4407	0.8092

Tabla 6.40.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 80:20(v/v).

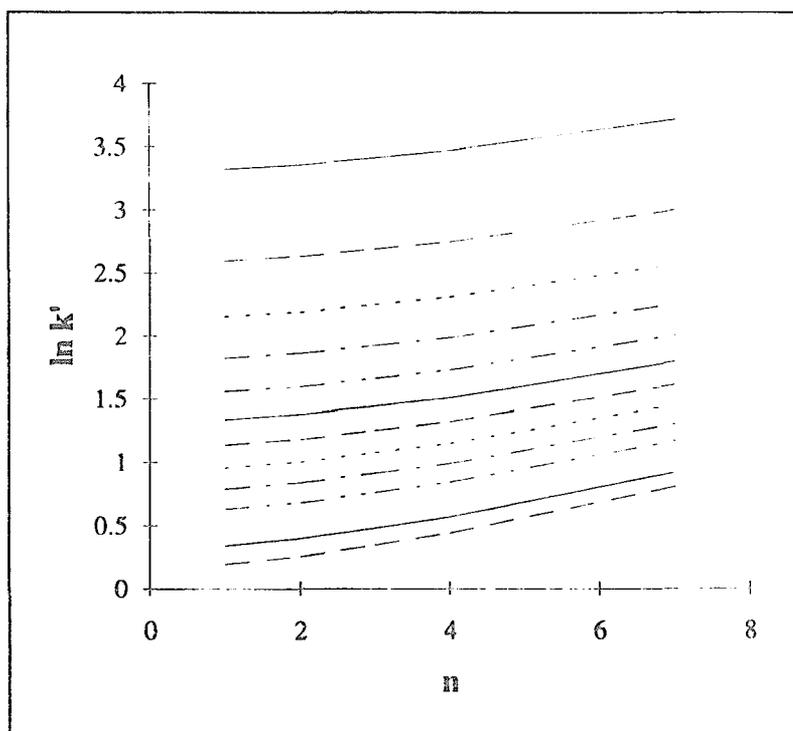


Figura 6.41.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	3.3810	3.4468	3.5322	3.6323	4.0360
0.2	2.6532	2.7213	2.8094	2.9124	3.3250
0.3	2.2119	2.2824	2.3734	2.4793	2.9014
0.4	1.8871	1.9601	2.0541	2.1633	2.5953
0.5	1.6253	1.7011	1.7984	1.9110	2.3533
0.6	1.4028	1.4816	1.5824	1.6987	2.1518
0.7	1.2068	1.2888	1.3934	1.5136	1.9780
0.8	1.0296	1.1151	1.2238	1.3481	1.8245
0.9	0.8662	0.9555	1.0685	1.1973	1.6864
1	0.7129	0.8065	0.9243	1.0578	1.5602
1.2	0.4274	0.5306	0.6592	0.8035	1.3350
1.3	0.2915	0.4003	0.5351	0.6854	1.2328

Tabla 6.41.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 70:30(v/v).

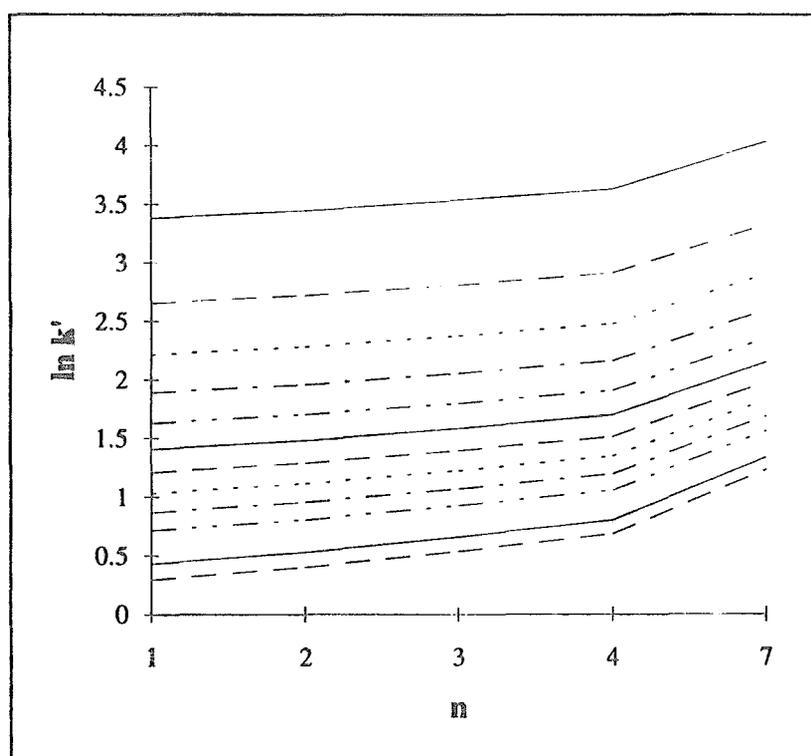


Figura 6.42.

Número de carbonos

Vo	1	2	3	4	7
0.1	3.5086	3.6217	3.7658	3.9396	4.6072
0.2	2.7850	2.9014	3.0493	3.2268	3.9040
0.3	2.3482	2.4681	2.6198	2.8013	3.4884
0.4	2.0281	2.1518	2.3076	2.4932	3.1905
0.5	1.7716	1.8991	2.0592	2.2492	2.9570
0.6	1.5546	1.6864	1.8511	2.0455	2.7642
0.7	1.3646	1.5009	1.6704	1.8696	2.5995
0.8	1.1939	1.3350	1.5096	1.7138	2.4553
0.9	1.0375	1.1838	1.3638	1.5732	2.3267
1	0.8920	1.0438	1.2296	1.4446	2.2105
1.2	0.6242	0.7885	0.9871	1.2139	2.0060
1.3	0.4984	0.6698	0.8755	1.1088	1.9147

Tabla 6.42. Ln k' para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 60:40(v/v).

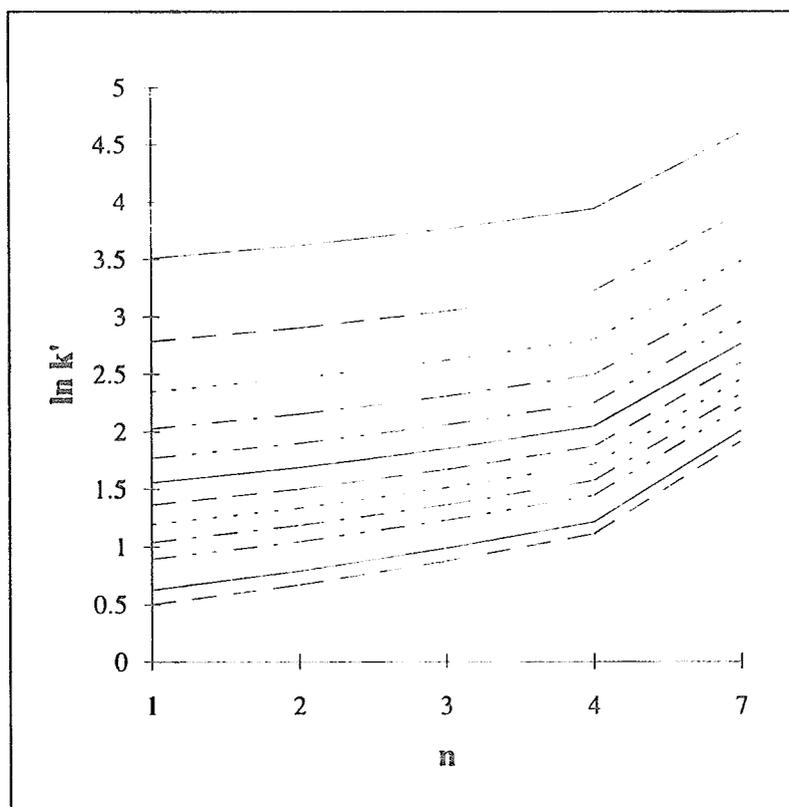


Figura 6.43.

Número de carbonos

$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	3.6481	3.8199	4.0360	4.2932	5.2417
0.2	2.9285	3.1046	3.3250	3.5863	4.5433
0.3	2.4960	2.6764	2.9014	3.1669	4.1325
0.4	2.1804	2.3656	2.5953	2.8651	3.8395
0.5	1.9286	2.1187	2.3533	2.6276	3.6109
0.6	1.7168	1.9120	2.1518	2.4307	3.4232
0.7	1.5322	1.7329	1.9780	2.2618	3.2636
0.8	1.3674	1.5738	1.8245	2.1132	3.1246
0.9	1.2172	1.4298	1.6864	1.9802	3.0013
1	1.0784	1.2975	1.5602	1.8594	2.8904
1.2	0.8256	1.0589	1.3350	1.6454	2.6969
1.3	0.7084	0.9496	1.2328	1.5492	2.6112



QUÍMICA  
D.F.

Tabla 6.43.  $\ln k'$  para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 50:50(v/v).

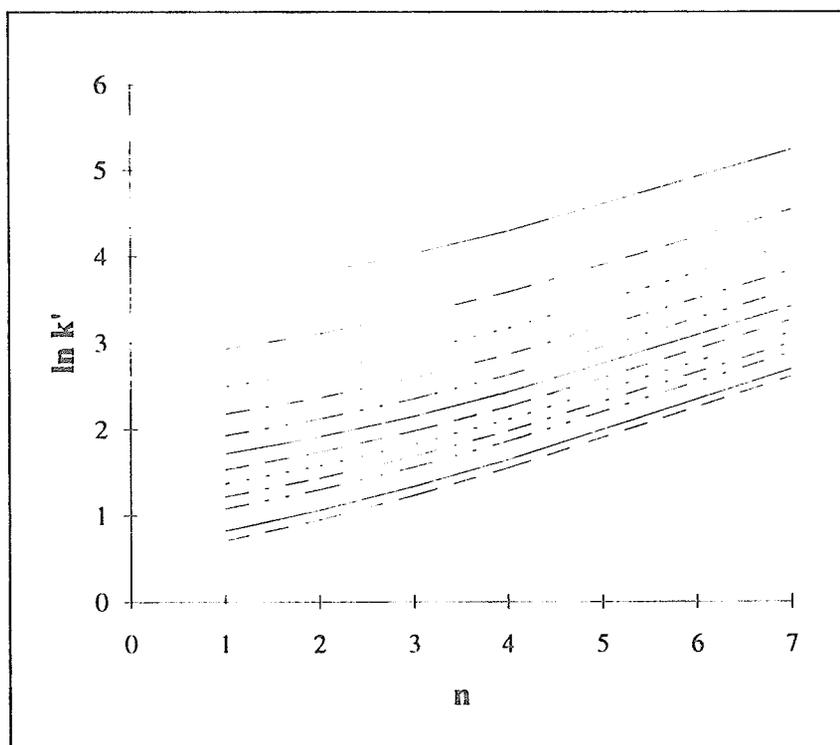


Figura 6.44.

Número de carbonos					
$V_0$	1	2	3	4	7
0.1	3.8416	4.0910	4.4164	4.7925	6.0958
0.2	3.1268	3.3810	3.7111	4.0910	5.4004
0.3	2.6991	2.9584	3.2934	3.6771	4.9927
0.4	2.3888	2.6532	2.9932	3.3810	4.7028
0.5	2.1424	2.4123	2.7575	3.1493	4.4773
0.6	1.9363	2.2119	2.5624	2.9584	4.2927
0.7	1.7579	2.0394	2.3953	2.7955	4.1363
0.8	1.5994	1.8871	2.2487	2.6532	4.0005
0.9	1.4560	1.7502	2.1176	2.5266	3.8804
1	1.3244	1.6253	1.9988	2.4123	3.7728
1.2	1.0874	1.4028	1.7890	2.2119	3.5858
1.3	0.9789	1.3021	1.6949	2.1227	3.5035

Tabla 6.44.  $\ln k'$  para la serie de los parabens en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 40:60(v/v).

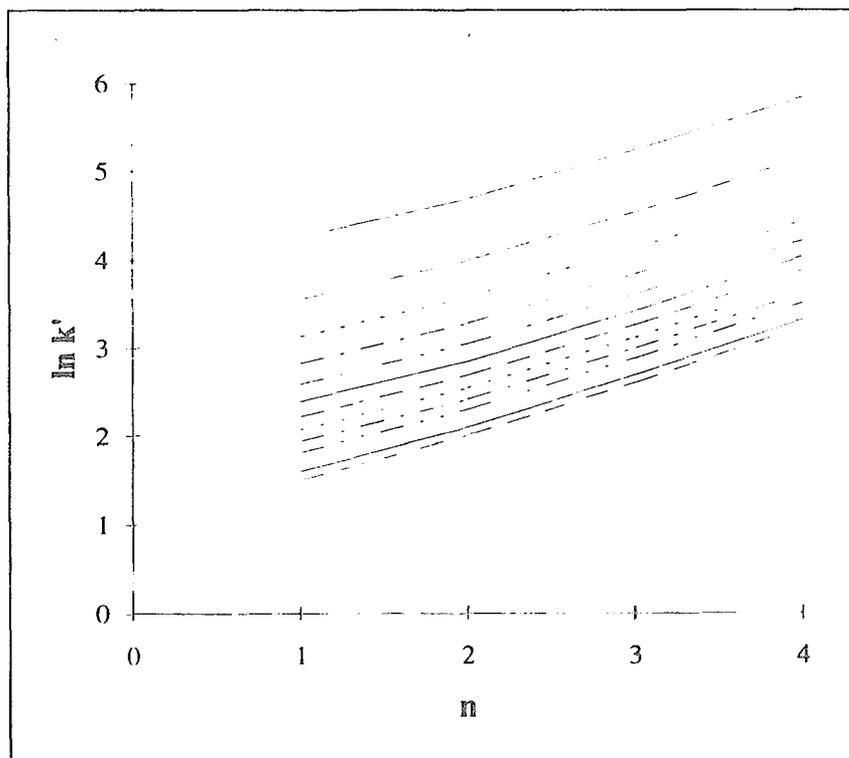


Figura 6.45.

Número de carbonos				
Vo	1	2	3	4
0.1	4.2570	4.6913	5.2375	5.8406
0.2	3.5496	3.9890	4.5390	5.1446
0.3	3.1297	3.5742	4.1282	4.7362
0.4	2.8273	3.2771	3.8351	4.4456
0.5	2.5893	3.0445	3.6066	4.2195
0.6	2.3918	2.8526	3.4188	4.0342
0.7	2.2223	2.6888	3.2592	3.8771
0.8	2.0732	2.5455	3.1202	3.7406
0.9	1.9395	2.4179	2.9968	3.6199
1	1.8181	2.3026	2.8859	3.5115
1.2	1.6027	2.1001	2.6924	3.3232
1.3	1.5058	2.0098	2.6067	3.2402

Tabla 6.45. Ln k' para la serie de los parabenos en la columna III. Fase móvil: acetonitrilo-agua 30:70(v/v).

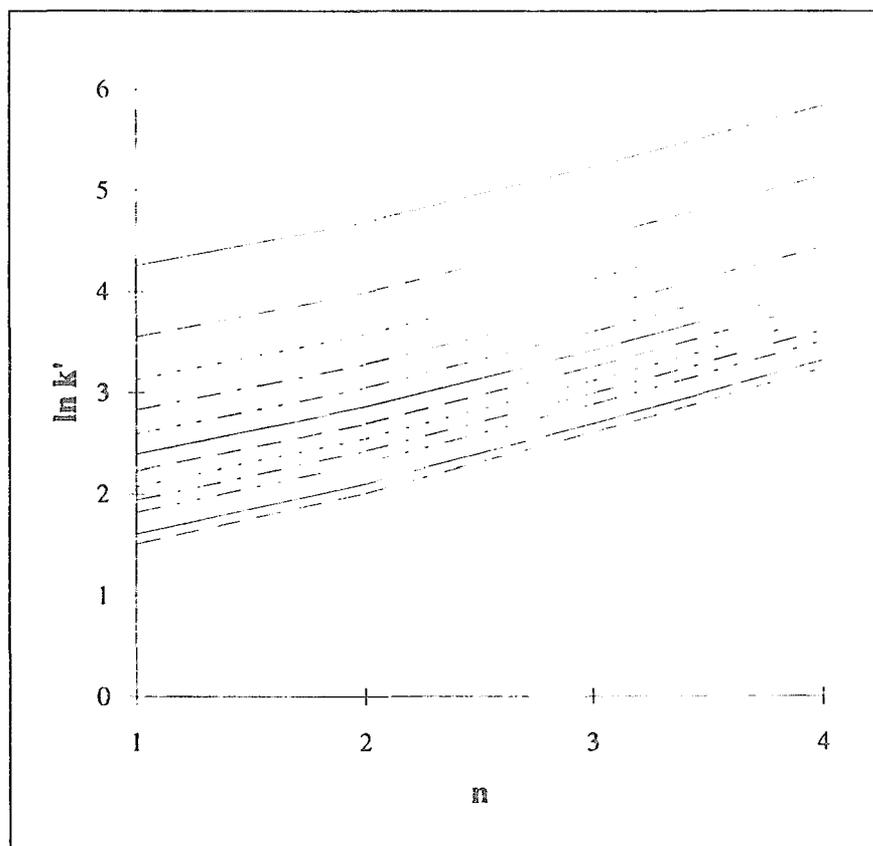
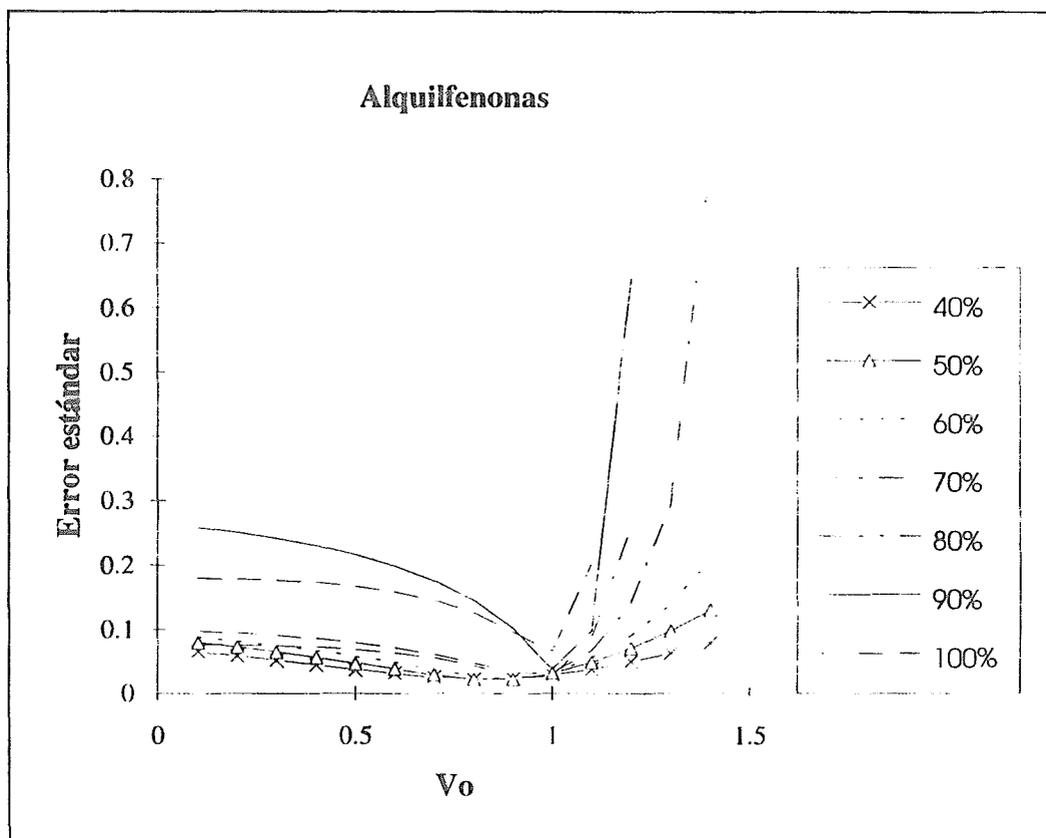


Figura 6.46

## Acetonitrilo

V <sub>0</sub>	40%	50%	60%	70%	80%	90%	100%
0.1	0.0655	0.0793	0.0876	0.0979	0.0766	0.2579	0.1796
0.2	0.0591	0.0726	0.0819	0.0950	0.0760	0.2504	0.1784
0.3	0.0524	0.0652	0.0754	0.0911	0.0748	0.2413	0.1762
0.4	0.0455	0.0572	0.0679	0.0862	0.0726	0.2301	0.1726
0.5	0.0386	0.0485	0.0593	0.0799	0.0692	0.2162	0.1670
0.6	0.0318	0.0393	0.0495	0.0718	0.0640	0.1986	0.1586
0.7	0.0260	0.0300	0.0385	0.0613	0.0560	0.1758	0.1458
0.8	0.0226	0.0226	0.0273	0.0480	0.0440	0.1452	0.1263
0.9	0.0236	0.0225	0.0216	0.0334	0.0272	0.1021	0.0963
1	0.0293	0.0325	0.0322	0.0322	0.0273	0.0385	0.0667
1.1	0.0385	0.0494	0.0564	0.0674	0.0890	0.0982	0.2012
1.2	0.0500	0.0712	0.0911	0.1411	0.2573	0.6490	
1.3	0.0633	0.0979	0.1389	0.2921			
1.4	0.0784	0.1304	0.2070	0.8387			

Tabla 6.46 Error estándar obtenido con las alquilfenonas en la columna I.



**Figura 6.47.** Dependencia de  $V_0$  del error estándar para la serie de los alquilfenonas en la columna I.

**Acetonitrilo**

<b>V<sub>o</sub></b>	<b>60%</b>	<b>70%</b>	<b>80%</b>	<b>90%</b>	<b>100%</b>
0.1	0.1691	0.1283	0.1325	0.1107	0.0684
0.2	0.1680	0.1220	0.1281	0.1096	0.0701
0.3	0.1670	0.1150	0.1228	0.1076	0.0717
0.4	0.1663	0.1071	0.1165	0.1047	0.0732
0.5	0.1659	0.0982	0.1090	0.1005	0.0743
0.6	0.1658	0.0881	0.0999	0.0943	0.0750
0.7	0.1664	0.0767	0.0889	0.0854	0.0750
0.8	0.1676	0.0636	0.0752	0.0724	0.0742
0.9	0.1698	0.0485	0.0583	0.0531	0.0738
1	0.1732	0.0315	0.0372	0.0251	0.0815
1.1	0.1781	0.0154	0.0163	0.0412	0.1348
1.2	0.1849	0.0243	0.0405	0.1560	0.5301
1.3	0.1940	0.0547	0.0997	0.7260	
1.4	0.2061	0.0963	0.2022		
1.5	0.2219	0.1533	0.4401		
1.6	0.2424	0.2371			
1.7	0.2688	0.3808			
1.8	0.3031	0.7744			
1.9	0.3482				
2	0.4093				
2.1	0.4964				
2.3	0.9176				

**Tabla 6.48.** Error estándar de la regresión obtenido con la serie de los alquilbencenos en la columna I.

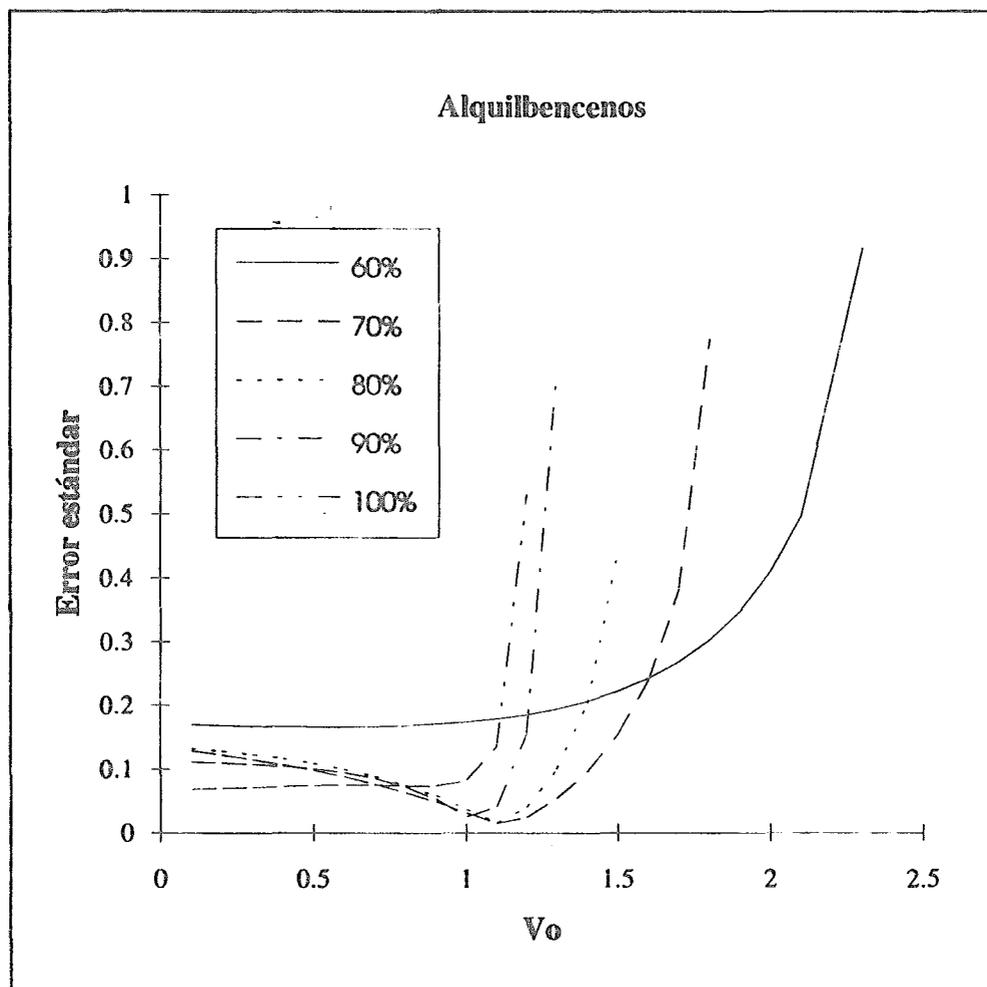


Figura 6.49. Dependencia de  $V_0$  del error estándar con la serie de los alquilbencenos. Columna I.

## Acetonitrilo

V <sub>0</sub>	40%	50%	60%	70%
0.1	0.1484	0.1515	0.1280	0.1064
0.2	0.1443	0.1465	0.1269	0.1092
0.3	0.1396	0.1402	0.1249	0.1118
0.4	0.1340	0.1325	0.1216	0.1140
0.5	0.1274	0.1228	0.1163	0.1154
0.6	0.1195	0.1106	0.1083	0.1154
0.7	0.1102	0.0951	0.0961	0.1128
0.8	0.0990	0.0751	0.0771	0.1052
0.9	0.0855	0.0485	0.0468	0.0877
1	0.0690	0.0128	0.0067	0.0519
1.1	0.0485	0.0414	0.1103	0.1370
1.2	0.0226	0.1233	0.4218	
1.3	0.0114	0.2730		
1.4	0.0564	0.7001		
1.5	0.1204			
1.6	0.2191			
1.7	0.3989			

Tabla 6.49. Error estándar obtenido con la serie de los parabenos en la columna I.

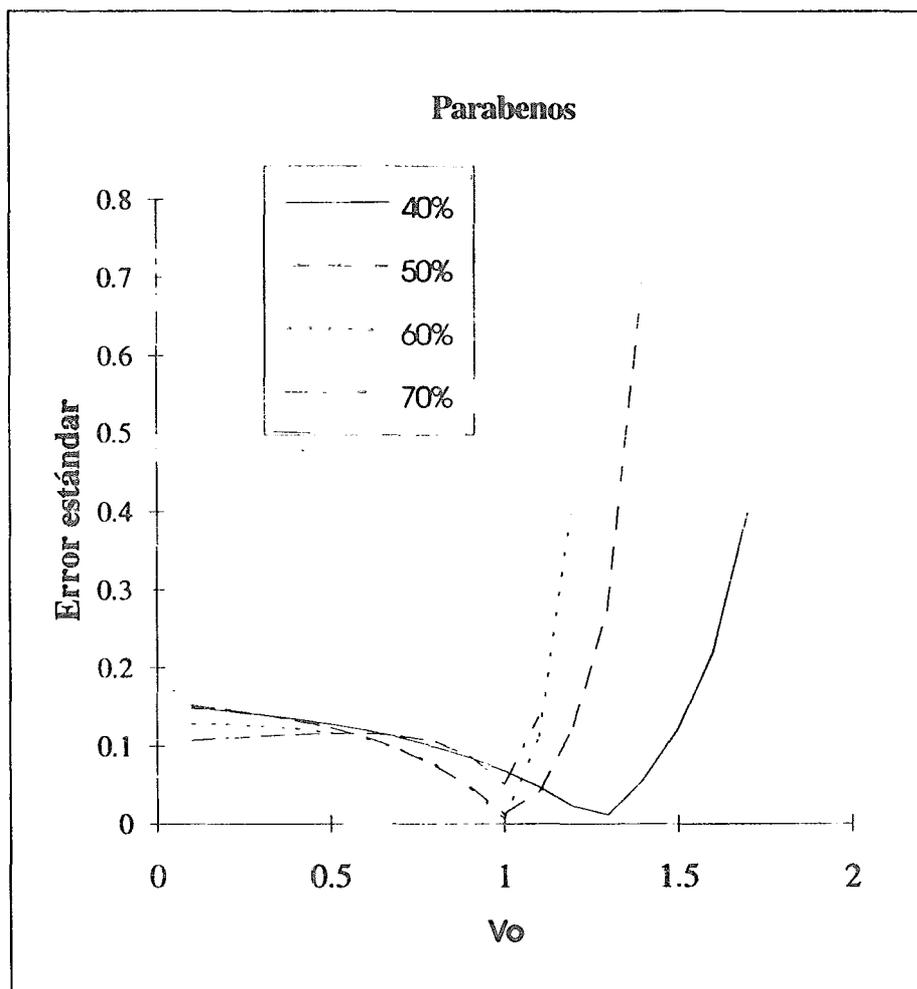


Figura 6.50. Dependencia de  $V_0$  del error estándar en la serie de los parabenos. Columna I.

## Acetonitrilo

Vo	100%	90%	80%	70%	60%	50%	40%	30%
0.2	0.0212	0.1150	0.0815	0.0797	0.0812	0.0590	0.0332	0.0124
0.4	0.0231	0.1212	0.0811	0.0774	0.0777	0.0561	0.0321	0.0116
0.6	0.0245	0.1280	0.0804	0.0748	0.0739	0.0531	0.0310	0.0107
0.8	0.0262	0.1357	0.0793	0.0718	0.0697	0.0498	0.0299	0.0098
1	0.0281	0.1444	0.0778	0.0682	0.0652	0.0464	0.0287	0.0089
1.2	0.0304	0.1543	0.0757	0.0641	0.0603	0.0428	0.0274	0.0080
1.4	0.0330	0.1658	0.0729	0.0593	0.0550	0.0389	0.0260	0.0070
1.6	0.0361	0.1792	0.0692	0.0537	0.0492	0.0349	0.0246	0.0060
1.8	0.0400	0.1952	0.0641	0.0471	0.0428	0.0306	0.0231	0.0049
2	0.0447	0.2146	0.0574	0.0392	0.0359	0.0261	0.0215	0.0039
2.2	0.0597	0.2700	0.0484	0.0299	0.0200	0.0167	0.0199	0.0028
2.4	0.0738	0.3129	0.0363	0.0188	0.0114	0.0123	0.0182	0.0016
2.6	0.1079	0.3779	0.0209	0.0069	0.0067	0.0096	0.0164	0.0004
2.8	0.3946	0.5038	0.0191	0.0149	0.0150	0.0110	0.0147	0.0008
3			0.0564	0.0364	0.0279	0.0160	0.0130	0.0020
3.2			0.1299	0.0655	0.0433	0.0229	0.0115	0.0033
3.4			0.3021				0.0104	0.0047
3.6							0.0104	
3.8							0.0099	

Tabla 6.50 . Error estándar obtenido con la serie de los alquilbencenos, en la columna III.

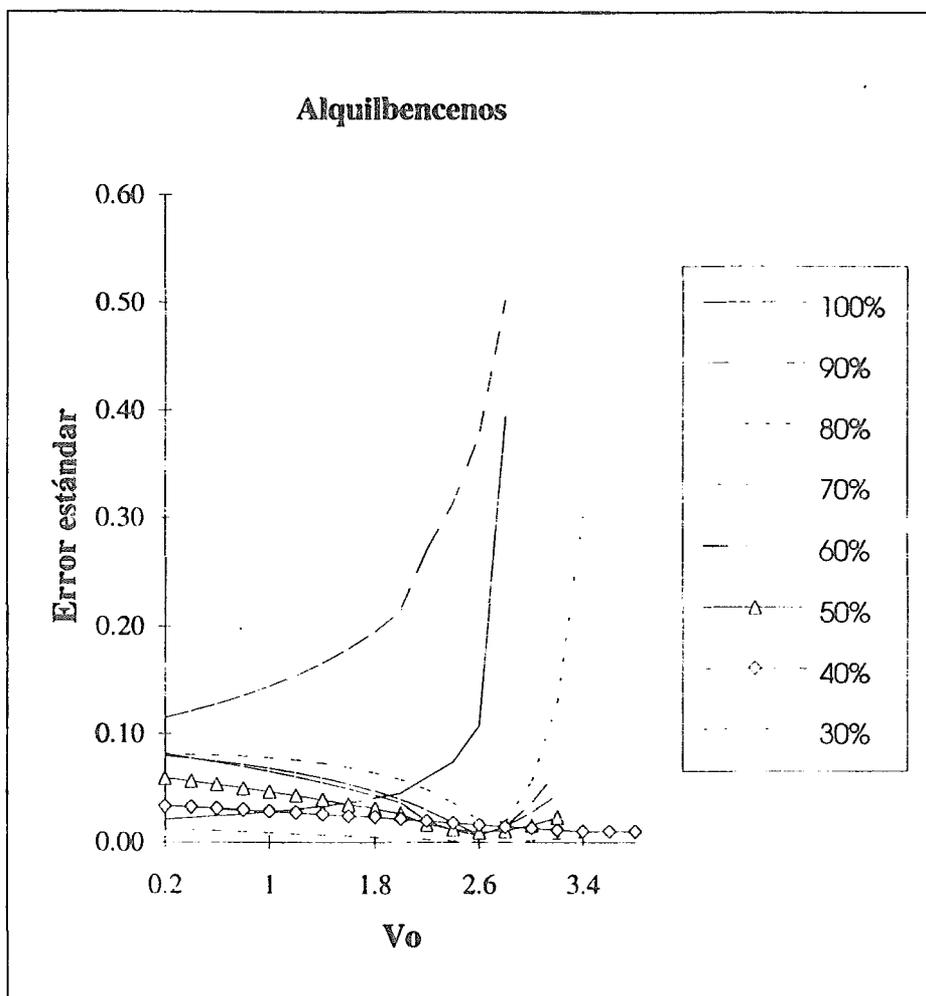


Figura 6.51. Dependencia de  $V_0$  del error estándar para la serie de los alquilbencenos en la columna III.

## Acetonitrilo

Vo	30%	40%	50%	60%	70%	80%	90%
0.1	0.0603	0.1022	0.0850	0.0654	0.0414	0.0266	0.0178
0.2	0.0594	0.1003	0.0839	0.0652	0.0417	0.0272	0.0184
0.3	0.0585	0.0983	0.0828	0.0649	0.0421	0.0277	0.0190
0.4	0.0575	0.0962	0.0816	0.0646	0.0424	0.0282	0.0196
0.5	0.0564	0.0940	0.0802	0.0641	0.0427	0.0288	0.0203
0.6	0.0554	0.0917	0.0787	0.0636	0.0429	0.0294	0.0211
0.7	0.0543	0.0893	0.0771	0.0629	0.0431	0.0300	0.0219
0.8	0.0531	0.0867	0.0753	0.0621	0.0433	0.0305	0.0227
0.9	0.0519	0.0840	0.0734	0.0612	0.0433	0.0311	0.0237
1.0	0.0507	0.0811	0.0713	0.0601	0.0433	0.0317	0.0247
1.1	0.0494	0.0781	0.0690	0.0588	0.0432	0.0323	0.0258
1.2	0.0481	0.0749	0.0665	0.0573	0.0429	0.0328	0.0271
1.3	0.0467	0.0715	0.0637	0.0556	0.0424	0.0333	0.0284
1.5	0.0437	0.0642	0.0573	0.0513	0.0409	0.0340	0.0317
1.7	0.0405	0.0559	0.0497	0.0454	0.0379	0.0342	0.0358
1.9	0.0370	0.0467	0.0403	0.0375	0.0328	0.0333	0.0415
2.1	0.0332	0.0362	0.0289	0.0267	0.0241	0.0299	0.0498
2.3	0.0291	0.0246	0.0148	0.0118	0.0092	0.0214	0.0643
2.5	0.0246	0.0126	0.0049	0.0121	0.0220	0.0161	0.1000
2.7	0.0198	0.0117	0.0269	0.0448	0.0846	0.1013	0.2966
2.9	0.0146	0.0280	0.0572	0.0986	0.2716		
3.1	0.0092	0.0499	0.0989	0.1977			
3.3	0.0051	0.0768	0.1593	0.4464			

Tabla 6.51. Error estándar obtenido con los parabenos en la columna III.

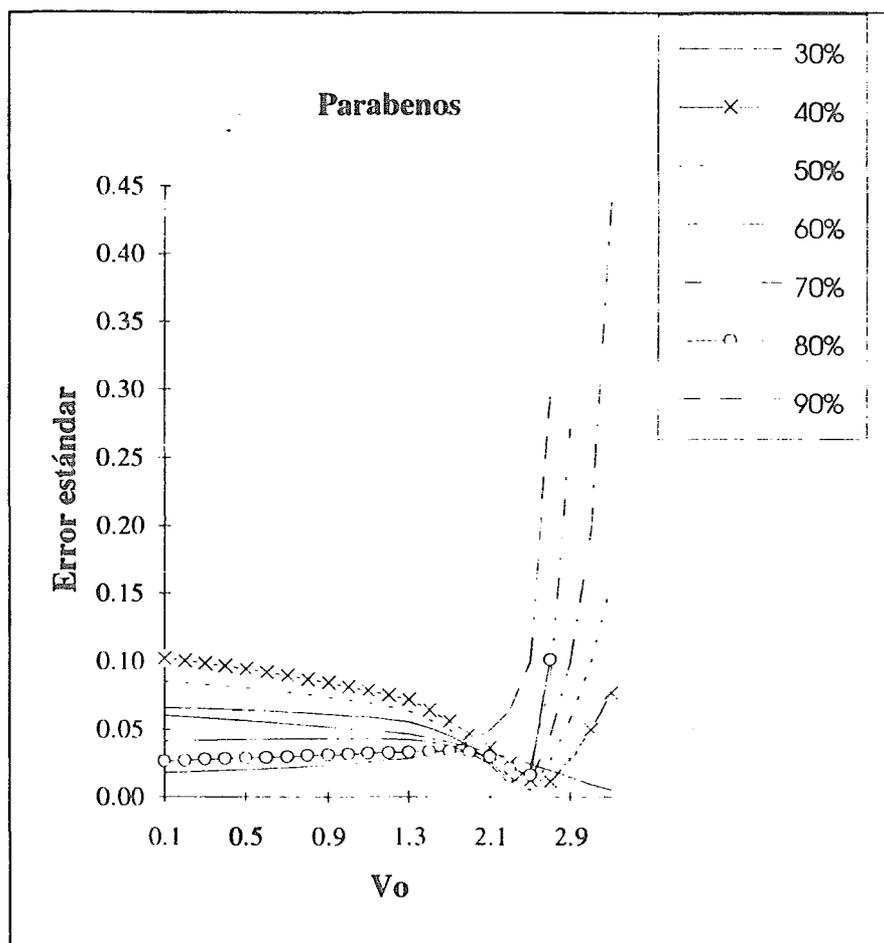


Figura 6.52. Dependencia de  $V_0$  del error estándar para la serie de los parabenos en la columna III.

%Acetonitrilo	100	90	80	70	60
$V_o$	0.8744	1.0254	1.0993	1.1264	0.5538
error est.	0.0736	0.0187	0.0163	0.0139	0.1657

Tabla 6.52. Error estándar mínimo en la determinación de  $V_o$  con los alquilbencenos en la columna I.

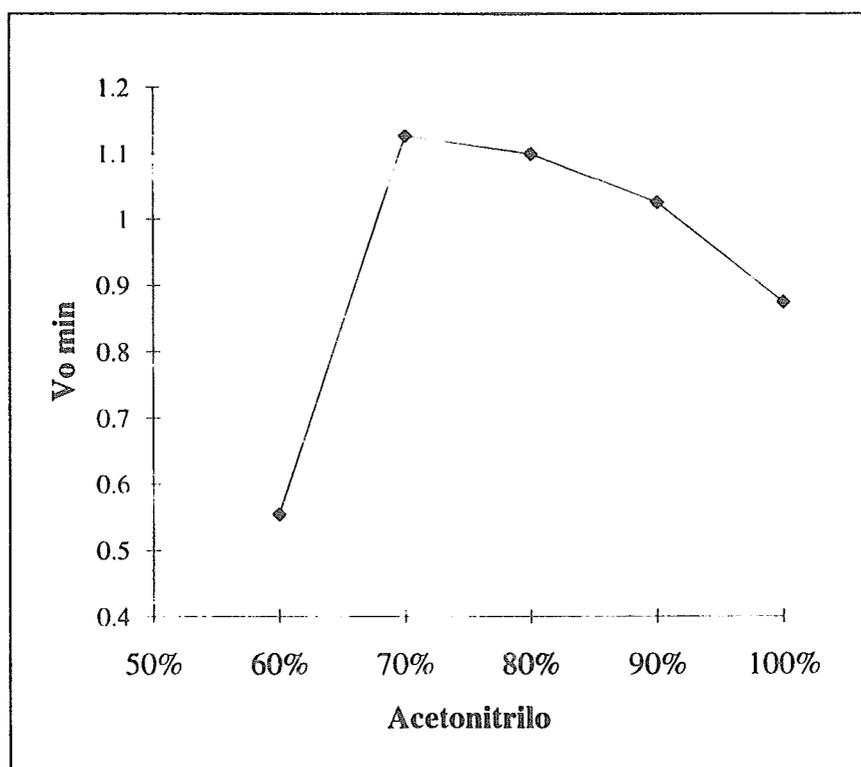


Figura 6.53. Error estándar mínimo en la determinación de  $V_o$  con la serie de los alquilbencenos en la columna I.

% Acetonitrilo	100	90	80	70	60	50	40
Vo	0.9980	1.0327	0.9569	0.9347	0.8928	0.8533	0.8315
std error	0.0667	0.0218	0.02045	0.0230	0.0215	0.0212	0.0224

Tabla 6.53. Error estándar mínimo en la determinación de Vo con las alquilfenonas en la columna I.

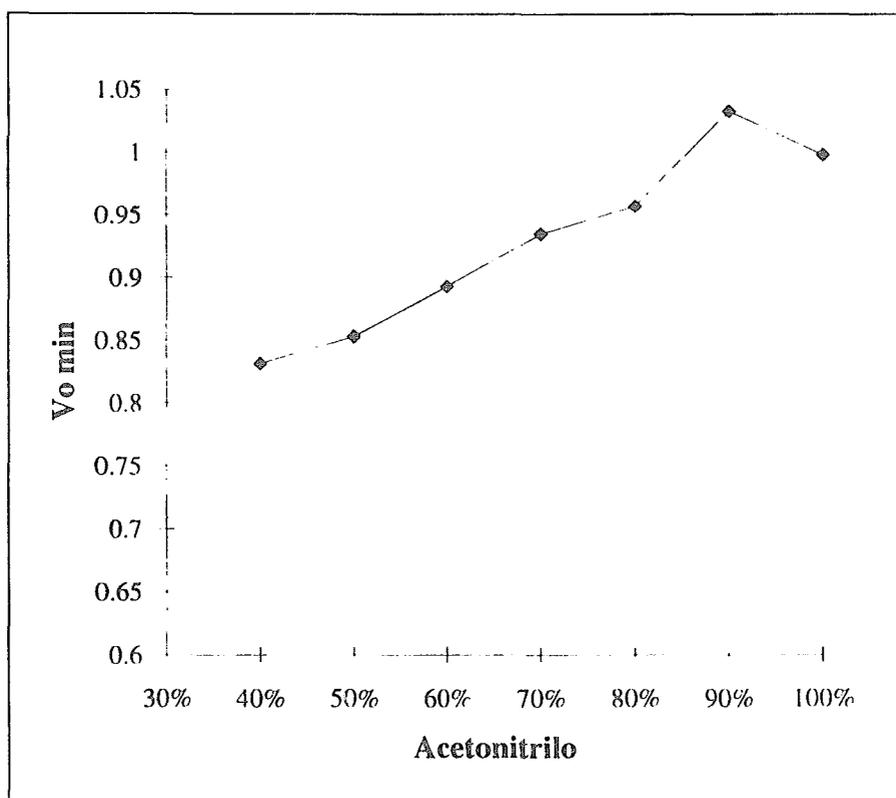


Figura 6.54. Error estándar mínimo en la determinación de Vo con las alquilfenonas en la columna I.

% Acetonitrilo	40	50	60	70
$V_0$	1.2700	1.0256	0.9915	1.0301
error est.	0.0021	0.0055	0.4017	0.0440

Tabla 6.54. Error estándar mínimo en la determinación de  $V_0$  con los parabenos en la columna I.

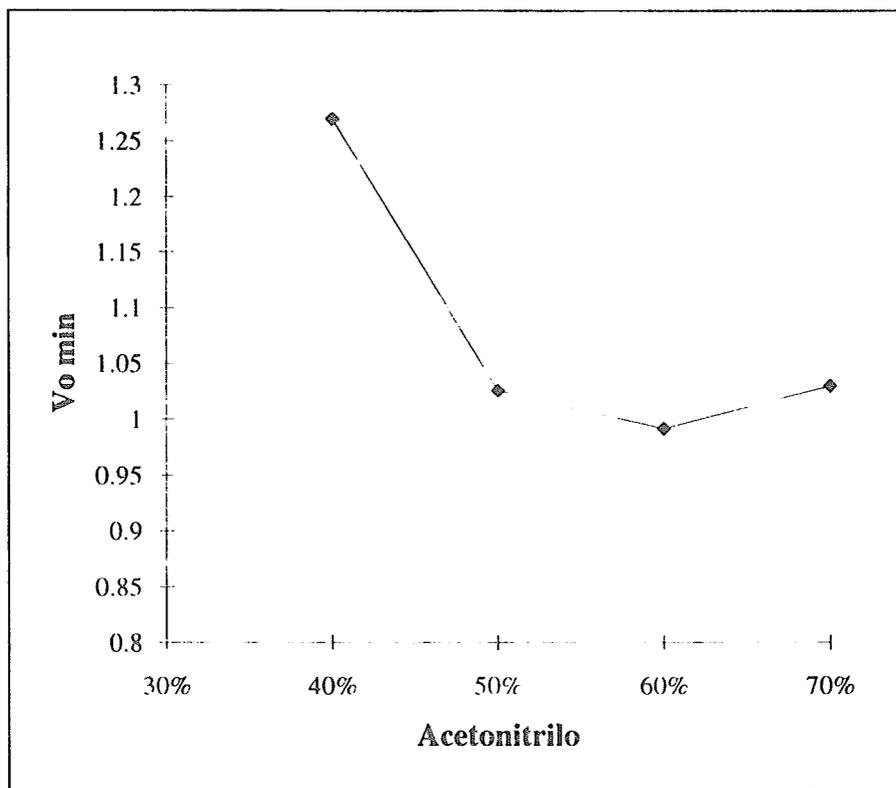


Figura 6.55. Error estándar mínimo en la determinación de  $V_0$  con los parabenos en la columna I.

% Acetonitrilo	80	70	60	50	40	30
Vo	2.4497	2.3684	2.4081	2.4641	2.6126	3.333
std error	0.0130	0.0047	0.0046	0.0034	0.0047	0.005

Tabla 6.55. Error estándar mínimo en la determinación de Vo con los parabenos en la columna III.

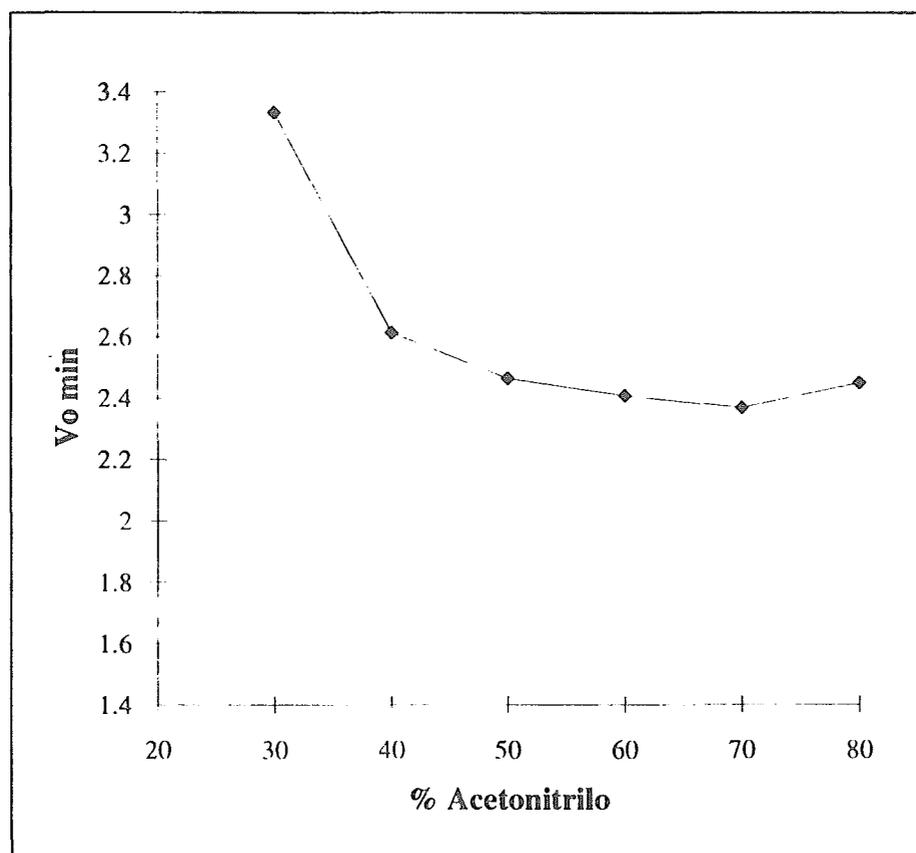


Figura 6.56. Error estándar mínimo en la determinación de Vo con la serie de los parabenos en la columna III,

% Acetonitrilo	100	90	80	70	60	50	40	30
Vo	0.0300	0.0300	2.7201	2.6476	2.7749	2.8433	3.6104	2.6731
std error	0.0208	0.0338	0.0148	0.0058	0.0066	0.0095	0.0099	4E-08

Tabla 6.56 Error estándar mínimo en la determinación de Vo con los alquilbencenos en la columna III.

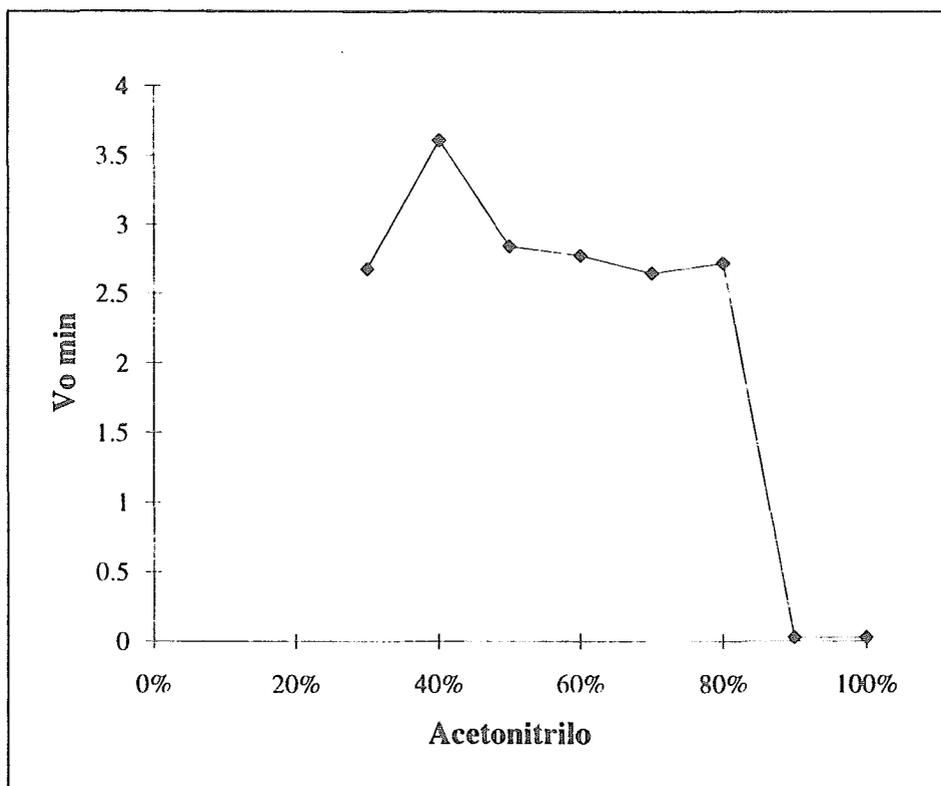


Figura 6.57. Error estándar mínimo en la determinación de Vo con la serie de los alquilbencenos en la columna III.

## 7. CONCLUSIONES.

### 7.1. Fuentes de error en el inyector y en la detección.

De las fuentes de error en el inyector estudiadas, la más importante es el residuo que queda en el inyector después de cada inyección.

De la comparación de las varianzas de las áreas obtenidas con el inyector automático y con la válvula, se concluye que el inyector automático es más preciso. Esto se debe probablemente a que el residuo de muestra en el inyector automático es menor que el de la válvula.

Le sigue en importancia la masa inyectada, si ésta es menor a  $0.2 \mu\text{g}$  la reproducibilidad disminuye considerablemente. Este valor límite corresponde a la mezcla fenol, benzaldehído, acetofenona y benzoato de metilo que presentan un valor de  $k'$  y de resolución mayores a uno en las condiciones cromatográficas empleadas en este estudio, para otros sistemas con diferente selectividad, y por lo tanto resolución de las bandas, el límite es diferente.

En cuanto al volumen de inyección se comprobó que no afecta significativamente a la precisión, si se introducen más de  $0.2 \mu\text{g}$ .

Se demostró que la composición del disolvente en que se diluye la muestra tampoco tiene efecto en la precisión en las condiciones en las que se trabajó.

De los dos métodos que se emplean para calcular la linealidad del detector, el que usa las "curvas de linealidad" (sensibilidad vs concentración) permite detectar la no linealidad de la respuesta del detector de UV-visible, y con ello incrementa la exactitud de la cuantificación. El intervalo lineal es significativamente distinto para los tres compuestos probados, lo que indica que depende de los grupos cromóforos

Las variaciones del flujo de la fase móvil no afectan la precisión, pero sí la exactitud. Variaciones del 1% producen cambios importantes en las áreas y también, pero en menor medida, en las alturas de los picos.

Las diferencias en el contenido del modificador orgánico de la fase móvil no influyen significativamente en la precisión.

Las condiciones óptimas con las que se obtiene una precisión mayor al 0.5% de DER son: 1) evitar el residuo de muestra entre inyecciones sucesivas; 2) introducir una masa de muestra mayor a 0.2  $\mu\text{g}$  (para las sustancias empleadas en este trabajo), en el caso de la válvula inyectar cinco veces el volumen total del rizo de inyección, en el caso del inyector automático es preferible inyectar más de 1  $\mu\text{l}$ ; 3) fijar la longitud de onda en el máximo de la banda de absorción del grupo cromóforo, calcular el intervalo lineal con las curvas de linealidad método de la AST; 4) elegir la composición de la fase móvil con la cual los picos correspondientes a las sustancias analizadas tengan un valor de  $k'$  mayor a 2; 5) desgasificar los disolventes de la fase móvil para evitar burbujas y comprobar que el flujo y la composición de la fase móvil son constantes a lo largo del análisis.

## **7.2. Fuentes de error en la determinación de los volúmenes de retención.**

El error en la medición de los volúmenes de retención fue 0.1% DER en el caso de las sustancias no retenidas uracilo y floroglucinol y de 0.3% para los miembros de las series homólogas de mayor tiempo de retención.

**7.2.1. Método de la sustancia no retenida.** El volumen muerto determinado con las sustancias no retenidas empleadas varía con la composición de la fase móvil y es menor que el volumen del líquido en la columna. El error en su determinación no se debe a la falta de repetibilidad de los tiempos de retención pues la diferencia entre el valor de  $V_0$  obtenido por este método y el de referencia es mayor que el 0.1% DER obtenido, se debe a que dichas sustancias son excluidas por la fase móvil debido a su gran polaridad.

**7.2.2. Método de linealización de las series homólogas.** Después de estudiar el comportamiento de las curvas del  $\ln k'$  vs número de átomos de carbono asignando diferentes valores de  $V_0$  se concluye que dichas curvas no son lineales para los primeros homólogos de la serie debido a la falta de aditividad de las interacciones entre los grupos metilenos de la cadena lateral de los miembros de las series homólogas y la fase

estacionaria. Este comportamiento da como resultado que con el método de linealización de las series homólogas se obtengan valores de  $V_0$  distintos para cada composición de la fase móvil y para cada serie. La diferencia entre los valores de  $V_0$  obtenidos con diferentes fases móviles no puede ser explicado por errores en el sistema cromatográfico ya que la diferencia entre ellos es mayor al 0.3% DER de los volúmenes de retención.

## 8. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Snyder, L. R., Glajch, J. L. and Kirkland, J. J. *Practical HPLC Method Development*. John Wiley & Sons. New York. 1988. pp 1-14.
- 2.- Miller J. C. and Miller, J. N. *Statistics for Analytical Chemistry*. 2nd ed. Ellis Horwood. New York. 1988. pp 33-35 y 46-50.
- 3.- Massart, D. L., Dijkstra, A. and Kaufman, L. *Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures*. Elsevier Sci. Pub. Co. The Netherlands 1978. pp 105-107.
- 4.- Snyder, L. R., Kirkand, J. J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. John Wiley & Sons. New York. 1979. pp 87, 299.
- 5.- Poole, C. F., Shuette, S. A. *Contemporary Practice of Chromatography*. Elsevier, Amsterdam. 1984. pp 368-370.
- 6.- Rheman, M. J. *Chromatographia* (1987), 24, 495.
- 7.- Done, J. N. *J. Chromatogr.* (1976), 125, 43.
- 8.-Hoffman, N. E. et al. *J. Chromatogr.* 465 (1989), 189.
- 9.- Hoffman, N. E. et al. *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 651.
- 10.- *Annual Book of ASTM Standards; American Society for Testing and Materials*; Philadelphia, 1988, vol 14.01 pp 149-58; 178-83; 235-45; 289-99; 344-48.
- 11.-Wolf, T., et al., *J. Chromatogr. Sci.*, 19 (1981) 387.
- 12.-Pfeiffer C. D., et al., *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1622.
- 13.- Dorschel, C. A., et al., *Anal. Chem.*, 61 (1989) 951 A.
- 14.- Fowlis, I. A. and Scott R. P. W., *J. Chromatogr.*, 11 (1963) 1.
- 15.- Bakalyar, S. R., and Henry, R. A. *J. Chromatogr.*, 126 (1976) 327.
- 16.- Dryer, U., Melzer, H. and Mökel H. J. *J. Chromatogr.* 592 (1992) 13.
- 17.- Horvath, C., Melande, W. R., *Book of Abstracts*, 183rd. National Meeting of the ACS, Las Vegas NV. 1982.
- 18.- Smith, R. J., et al., *J. Liq. Chromatogr.* 9 (1986) 1387.

- 19.- Riedo, F. M. and Kovats E., *J. Chromatogr.* 239 (1982) 1.
- 20.- Mökel, H. J. and Freyholdt, T., *Chromatographia*, 17 (1983) 215.
- 21.- Larman, J. P. et al., *J. Chromatogr.* 255 (1983) 163.
- 22.- Scott, R. P. W. and Kucera, P., *J. Chromatogr.* 125 (1976) 251.
- 23.- Knox, J. H., et al. Faraday Symposium of the Chemical Society, New York, 15 (1980) 540.
- 24.- Laub, R. J. and Madden, S. J., *J. Liq. Chromatogr.* 8 (1985) 173.
- 25.- Kazakevich, Y. and McNair, H. M. *J. Chromatogr. Sci.*, 31 (1993) 317.
- 26.-Krstulovic, A. M., *Anal. Chem.*, 54 (1982) 2438.
- 27.- Slaats, E. H., et al., *J. of Chromatogr.*, 207 (1981) 299.
- 28.- Mc Cormick, R. M. et al., *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2249.
- 29.- Berendson, G. E., Schoenmakers, P. J. et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 3 (1980) 1669.
- 30.- Tchaplá, A., et al., *Anal Chem.*, 56 (1984) 621.
- 31.- Fini, O., et al., *J. Chromatogr.* 210 (1981) 326.
- 32.- Billiet, H. A. H. et al., *Anal. Chem.*, 55 (1983) 847.
- 33.- Thus, J. L. and Kraak, J. C., *J. Chromatogr.* 320 (1985) 27.
- 34.- Karger, B. L., et al., *J. Chromatogr.*, 128 (1976) 65.
- 35.- Wainwright, M. S., et al., *J. Chromatogr.*, 321 (1985) 287.
- 36.- Bakalyar, S. R., et al., *J. Chromatogr.*, 142 (1977) 353.
- 37.- Engelhardt, H., et al., *Chromatographia*, 14 (1981) 227.
- 38.- Paanakker, et al., *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 111.
- 39.- Horvath, C., et al., *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 43.
- 40.- Popl, I. V. M., et al., *J. Chromatogr.*, 281 (1983) 293.
- 41.- Flanagan, R. J. and Jane, I., *J. Chromatogr.*, 323 (1985) 173.
- 42.- Johnson, H. J., et al., *J. Chromatogr.*, 177 (1979) 297.
- 43.- Ageev, A. N., et al., *Chromatographia*, 14 (1981) 638.
- 44.- Biji, K. E., et al., *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 65.

- 45.- Nahum, A., et al., *J. Chromatogr.*, 203 (1981) 295.
- 46.- Van der Wal, S., et al., *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 431.
- 47.- Unger, S. H. and Feuerman, T. F., *J. Chromatogr.*, 176 (1979) 426.
- 48.- Hsu, A. J., et al., *J. Liq. Chromatogr.*, 7 (1984) 599.
- 49.- Wells, M. J. M. and Clark, C. R., *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1341.
- 50.- Martin, A. J. P., Synge, R. L. M., *J. Biochem.*, 35 (1941) 1358.
- 51.- Colin, H., et al., *J. Chromatogr.*, 149 (1978) 169.
- 52.- Martin, M., Thevenon, G., Tchaplá, A., *J. Chromatogr.*, 452 (1988) 157.
- 53.- Al-Thamir, W. K., Purnell, J. H., Wellington, C. A., Laub, R. J., *J. Chromatogr.*, 173 (1979) 388.
- 54.- Yonker, C. R., *J. Chromatogr.*, 241 (1982) 257.
- 55.- Östman, C. E. and Cölmsjo, L. *Chromatographia*, 25 (1988) 25.
- 56.- Smith R. M. and Burr, C. M., *J. Chromatogr.*, 475 (1989) 57.
- 57.- Bogusz, M. and Aderjan, R., *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 43.
- 58.- Yamaouchi, S., *J. Chromatogr.*, 635 (1993) 61.
- 59.- Smith R. J. et al., *J. Chromatogr.*, 236 (1982) 313.
- 60.- Shoenmakers P. J., Billiet, H. A. H. and de Galan, L., *J. Chromatogr.*, 185 (1979)
- 61.- Subcommittee E. 19.08 Task Group on Liquid Chromatography of the American Society for Testing and Materials. *J. Chromatogr. Sci.* 19 (1981) 338.