



00577  
3  
2E1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE FENOLES EN  
AGUA POR CROMATOGRFIA DE LIQUIDOS CON  
EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA ANALÍTICA)  
P R E S E N T A :  
Q. JOEL REZA GONZALEZ



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.



*" ...pero Dios me atendió,  
me concedió lo que le suplicaba.  
¡ Bendito sea Dios,  
que no puso mis súplicas aparte  
ni me negó su amor ! "*

*Salmo 65, 19-20.*



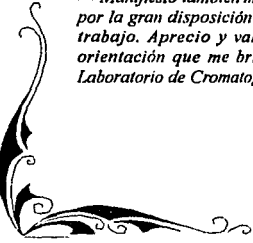


## AGRADECIMIENTOS

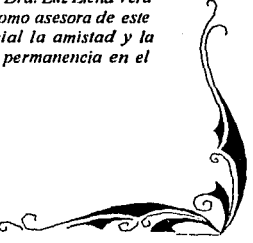


*El presente trabajo representa la consecución de una de las metas más importantes de mi vida. Para alcanzar esta meta ha sido necesario poner un pequeño esfuerzo adicional a mis actividades diarias. Sin embargo, dicho esfuerzo es mínimo comparado con el apoyo que he recibido por parte de diversas personas e instituciones y sin el cual, la consecución de la meta mencionada me habría sido particularmente difícil. Por esta razón deseo manifestarles mi sincero agradecimiento y hacerlos partícipes de este logro.*

*En primer lugar agradezco a toda mi familia, de manera especial a mi Mamá, por todo el apoyo y confianza que siempre han depositado en mí. El cariño y el amor que me han brindado ha sido el factor principal que me motiva a superarme día con día y que me permite valorar y amar la vida que Dios me ha dado.*



*Manifiesto también mi profunda gratitud a la Dra. Luz Elena Vera por la gran disposición e interés que mostró como asesora de este trabajo. Aprecio y valoro de manera especial la amistad y la orientación que me brindó a lo largo de mi permanencia en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos.*







## AGRADECIMIENTOS

*Asimismo deseo hacer un agradecimiento especial a cada uno de los profesores que me transmitieron parte de sus conocimientos y experiencia a lo largo de mis estudios. Manifiesto mi particular respeto y cariño a la Facultad de Química de la UNAM, institución a la que debo tanto y con la que siempre estaré profundamente agradecido.*

*Finalmente, pero de la manera más profunda, agradezco a Dios por todos los beneficios que me ha brindado, por permitirme disfrutar del cariño y la amistad de las personas que me rodean y por hacerme comprender el valor de la vida.*



---

---

**JURADO:**

**PRESIDENTE: Dr. ARMANDO MANJARREZ MORENO.**

**VOCAL: Dra. MARÍA AURORA ARMIENTA.**

**SECRETARIO: M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO.**

**PRIMER SUPLENTE: M. en C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS.**

**SEGUNDO SUPLENTE: Dra. ARACELI PEÑA ALVAREZ.**

**El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA**

**SUSTENTANTE**

**Q. JOEL REZA GONZÁLEZ**

---

---

---

---

# CONTENIDO

	<i>Página</i>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>Capítulo 1.</b>	
<b>EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN AGUA.</b>	<b>7</b>
<b>1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.</b>	<b>8</b>
1.1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA "OFF-LINE" O EN DIFERIDO.	9
1.1.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA.	10
1.1.3 SOPORTES EMPLEADOS EN LA PRECONCENTRACIÓN DE SOLUTOS ORGÁNICOS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	12
• FASES ESTACIONARIAS QUÍMICAMENTE ENLAZADAS.	12
• POLÍMEROS POROSOS.	14
• INTERCAMBIADORES DE IONES.	15
• CARBONES	16
<b>1.2 TEORÍA DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.</b>	<b>17</b>
1.2.1 CÁLCULOS DE RECUPERACIÓN A PARTIR DE VOLÚMENES DE FUGA.	25
1.2.2 CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN EXPERIMENTAL A PARTIR DE LAS ÁREAS DE LOS PICOS.	28

---

---

---

	<i>Página</i>
<b>1.3 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.</b>	<b>33</b>
<b>1.4 MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE FENOLES.</b>	<b>35</b>
<b>Capítulo 2.</b>	
<b>DESARROLLO EXPERIMENTAL.</b>	<b>41</b>
<b>2.1 EQUIPOS Y ACCESORIOS.</b>	<b>42</b>
2.1.1 PRECOLUMNAS DE CONCENTRACIÓN.	43
2.1.2 CALIBRACIÓN DEL RIZO DEL INYECTOR Y DE LAS PUNTAS DE LA MICROPIPETA.	47
<b>2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.</b>	<b>48</b>
2.2.1 DISOLUCIONES PATRÓN DE FENOLES.	49
2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ÁCIDAS Y BÁSICAS.	50
<b>2.3 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS VOLÚMENES DE FUGA Y LOS VOLÚMENES DE DESORCIÓN DE LOS FENOLES.</b>	<b>52</b>
2.3.1 VOLÚMENES DE FUGA.	52
2.3.2 VOLÚMENES DE DESORCIÓN.	52
<b>2.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE LOS FENOLES.</b>	<b>54</b>

---



---

---

	<i>Página</i>
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>RESULTADOS EXPERIMENTALES.</b>	<b>61</b>
<b>3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS.</b>	<b>61</b>
3.1.1 SELECCIÓN DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE Y LAS DIMENSIONES DE LAS PRECOLUMNAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.	<b>62</b>
3.1.2 EFICIENCIA DEL ACOPLAMIENTO PRECOLUMNA-COLUMNA ANALÍTICA	<b>72</b>
<b>3.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN.</b>	<b>75</b>
<b>3.3 RECUPERACIÓN DE LOS FENOLES.</b>	<b>81</b>
<b>3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.</b>	<b>87</b>
<b>3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.</b>	<b>104</b>
<b>3.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DE MANANTIAL Y DE RÍO.</b>	<b>110</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>119</b>
<b>REFERENCIAS.</b>	<b>121</b>

---

---

---

## RESUMEN

En este trabajo se presenta un método de análisis por cromatografía de líquidos para la determinación de cinco compuestos fenólicos en muestras de agua potable, de manantial o de río. Los cinco compuestos fenólicos considerados están sujetos a regulación por la legislación ecológica mexicana para la prevención de la contaminación del agua e incluyen al fenol, al 4-nitrofenol, al 2,4-dinitrofenol, al 2-clorofenol y al 2-nitrofenol.

El método presentado incorpora una etapa de extracción en fase sólida en línea, la cual permite efectuar a la vez un enriquecimiento de los fenoles y una purificación de la muestra. Esta etapa se realiza empleando dos precolumnas, una empacada con una fase estireno-divinilbenceno (EDVB) y otra empacada con una resina intercambiadora de aniones.

La extracción y preconcentración de las muestras se efectúa sobre la fase polimérica EDVB bajo condiciones ácidas ( $\text{pH} = 2$ ). En esta precolumna se extraen además de los fenoles de interés otras moléculas orgánicas neutras presentes en la muestra. Por el contrario, los compuestos iónicos, no retenidos por este adsorbente, son eluidos de la precolumna o se eliminan durante el lavado de ésta con agua pura.

Empleando una disolución acuosa básica ( $\text{pH} = 11.5$ ), los compuestos fenólicos extraídos se ionizan, se desorben de la fase polimérica EDVB y se transfieren en línea hacia la segunda precolumna empacada con el intercambiador de aniones. En esta precolumna los fenoles son de nuevo adsorbidos y se produce conjuntamente una compresión de banda. Durante esta operación se elimina a la gran mayoría de los compuestos orgánicos interferentes, los cuales permanecen adsorbidos como moléculas neutras en la fase polimérica EDVB.

Finalmente, la precolumna de intercambio aniónico se conecta en línea con una columna analítica empacada con una fase reversa C18, mediante válvulas de conmutación. Los fenoles son eluidos y separados bajo condiciones isocráticas empleando como fase móvil una mezcla acetonitrilo-agua a  $\text{pH}$  ácido. El análisis de los compuestos se realiza con un detector UV a longitud de onda de 270 nm.

---

---

Debido a que el proceso de preconcentración y análisis de los fenoles se efectúa en línea, no existe ninguna manipulación externa de la muestra durante su análisis, por lo que se disminuye la posibilidad de contaminación de ésta, así como la posible degradación o pérdida de los solutos de interés. Así mismo, se logra un ahorro sustancial en el uso de disolventes con respecto a los volúmenes empleados en los métodos de análisis basados en extracciones líquido-líquido.

La aplicación del método desarrollado a muestras reales se ilustra mediante el análisis de muestras de agua de manantial y de río fortificadas con los fenoles estudiados.

## INTRODUCCIÓN

Como consecuencia del desarrollo industrial y del crecimiento de la población en las últimas décadas, la contaminación ambiental se ha convertido en uno de los problemas más graves que enfrenta la humanidad. Día con día una gran cantidad de contaminantes industriales y domésticos se descargan hacia la atmósfera, el agua y el suelo del planeta. Invariablemente, todos estos contaminantes afectan de una manera negativa al hombre, a los animales y a las plantas.

La contaminación del agua es uno de los problemas más graves que enfrenta la sociedad.

Dependiendo de su procedencia, el agua en la naturaleza puede estar constituida por una cantidad variable de sustancias químicas de naturaleza orgánica e inorgánica.

La materia orgánica presente en el agua se puede clasificar en tres fracciones: la materia orgánica coloidal, la materia orgánica disuelta y la materia orgánica en forma de partículas. La distinción entre estas tres fracciones es arbitraria y generalmente se basa en el tamaño de los poros de los filtros empleados para su separación.

La cantidad de materia orgánica en una muestra de agua se estima generalmente a partir de su contenido de Carbono Orgánico Total (COT) o de Carbono Orgánico Disuelto (COD).

Se considera que la concentración de sustancias orgánicas de origen natural en el agua, equivale a un contenido de COD de aproximadamente 0,7 mg/L. Esta materia orgánica está constituida a la vez por moléculas simples tales como azúcares, glicoles y ácidos grasos, así como por compuestos húmicos, que son el resultado de la agregación de compuestos de peso molecular elevado en forma de micelas.

Independientemente de las sustancias de origen natural, el agua también puede estar constituida por una cantidad variable de compuestos orgánicos de origen sintético. Dependiendo del tipo de agua (potable, de río, municipal, etc.), la concentración y naturaleza química de los contaminantes orgánicos presentes puede variar significativamente.

De una manera general, los compuestos orgánicos sintéticos o de origen natural, presentes en el agua se pueden agrupar como se indica en el cuadro 1 (Subra, 1989).

Debido a los efectos negativos que algunas de estas sustancias ejercen sobre el medio ambiente, aun a niveles de concentración relativamente bajos, su presencia en aguas potables,

**INTRODUCCIÓN.**

de río o de mares constituye un riesgo potencial para el desarrollo equilibrado de la vida animal y vegetal del planeta.

**Cuadro 1. Clasificación de compuestos orgánicos en aguas (Subra, 1989).**

<b>VOLATILIDAD/ POLARIDAD</b>	<b>VOLÁTILES</b>	<b>MODERADAMENTE VOLÁTILES</b>	<b>NO VOLÁTILES</b>
<b>POLARES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ALCOHOLES</li> <li>• ALDEHIDOS</li> <li>• ÁCIDOS CARBOXÍLICOS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ALCOHOLES</li> <li>• CETONAS</li> <li>• ÁCIDOS CARBOXÍLICOS</li> <li>• FENOLES</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• POLIELECTRÓLITOS</li> <li>• CARBOHIDRATOS</li> </ul>
<b>MODERADAMENTE POLARES</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ÉTERES</li> <li>• ÉSTERES</li> <li>• CETONAS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ÉTERES</li> <li>• ÉSTERES</li> <li>• EPOXIDOS</li> <li>• HETEROCICLOS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• PROTEÍNAS</li> <li>• CARBOHIDRATOS</li> <li>• ÁCIDOS HÚMICOS</li> </ul>
<b>NO POLARES</b>	<b>HIDROCARBUROS:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ALIFÁTICOS</li> <li>• AROMÁTICOS</li> </ul>	<b>HIDROCARBUROS:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ALIFÁTICOS</li> <li>• AROMÁTICOS</li> <li>• ALICÍCLICOS</li> <li>• ÁRENOS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• POLÍMEROS NO IÓNICOS</li> <li>• LIGNINA</li> <li>• ÁCIDOS HÚMICOS</li> </ul>

**PESO MOLECULAR ➔**

Dentro de los contaminantes más comunes e importantes presentes en los diferentes tipos de aguas se encuentran los fenoles. Estos productos son compuestos orgánicos que contienen un grupo OH-, unido a un átomo de carbono de un anillo bencénico.

Los compuestos fenólicos ejercen un amplio espectro de efectos negativos sobre diversos organismos vivos del planeta. Se ha observado por ejemplo (Carron y Afghan, 1989), que la presencia de fenoles en aguas de riego puede afectar negativamente tanto el rendimiento como la calidad de diversos productos agrícolas. Por otra parte, la mayoría de los compuestos fenólicos exhiben un alto nivel de toxicidad tanto para el ser humano como para diversos organismos acuáticos. Actualmente se considera a un gran número de este tipo de compuestos como cancerígenos potenciales para el hombre. Adicionalmente, varios fenoles tienen la característica de impartir un olor y sabor desagradable al agua o a los organismos vivos en los cuales se concentran (por ejemplo en los peces de los ríos contaminados), aun a niveles de concentración del orden de µg/L.

En función de las razones anteriores, es necesario disponer de métodos analíticos apropiados que permitan monitorear y cuantificar la presencia de fenoles en distintos tipos de

aguas y que puedan servir finalmente como herramientas precisas y confiables para el control y prevención de la contaminación de este recurso natural.

La Norma Oficial Mexicana para la determinación de fenoles en aguas (Dirección General de Normas, 1981) se basa en el método colorimétrico de análisis de los productos de reacción entre los fenoles y la 4-aminoantipirina, en presencia de ferricianuro de potasio. Sin embargo, este método no puede diferenciar entre los distintos fenoles sustituidos y se usa principalmente para la determinación de la concentración total de fenoles en la muestra. Por otra parte, la mayoría de los fenoles *para* sustituidos no reaccionan apropiadamente con la antipirina, por lo que el método no se considera apropiado para la identificación ni para la determinación cuantitativa de fenoles a concentraciones del orden de  $\mu\text{g/L}$  (Armentrout et al., 1979; Realini, 1981; Galceran y Santos, 1989).

Otros métodos para el análisis de fenoles en aguas, tales como el método 604 de la Agencia de Protección Ambiental, de los Estados Unidos (EPA), específico para fenoles (Hall et al., 1984; USEPA, 1984a) o la sección relativa a compuestos extraíbles con ácido del método 625 de la misma Agencia (USEPA, 1984b), se basan en el uso de procesos de extracción líquido-líquido, complementados con separaciones por cromatografía de gases (CG) con detección por espectrometría de masas (EM), ionización de llama (FID) o captura de electrones (CE). Estos métodos permiten alcanzar límites de detección bajos, hasta del orden de  $0.6 \mu\text{g/L}$  para algunos compuestos tales como el 2-clorofenol, el 2,4,6-triclorofenol o el pentaclorofenol (método 604), así como una identificación sin ambigüedad de los solutos cuando se emplea la EM como método de detección (método 625).

Sin embargo, el procedimiento operacional de los dos métodos mencionados involucra procesos de extracción con disolventes, evaporación de éstos, y en algunas ocasiones formación de derivados (de los fenoles), apropiados para su análisis por CG. Los procedimientos operacionales mencionados pueden provocar que la muestra se contamine y los analitos se degraden, además requieren una gran cantidad de tiempo y trabajo experimental así como un uso apreciable de disolventes y reactivos tóxicos y costosos. Lo anterior constituye una desventaja evidente de los métodos indicados.

En el presente trabajo se ha desarrollado un método cromatográfico (HPLC) de análisis basado en el empleo de procesos de extracción en fase sólida en línea, el cual permite efectuar la determinación, a niveles de concentración del orden de  $\mu\text{g/L}$  en agua, de cinco compuestos fenólicos sujetos a regulación por la legislación ecológica de México (DOF, 1989) y considerados como contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos.

La originalidad del método propuesto en este trabajo radica en que el pretratamiento de la muestra se efectúa empleando un sistema de extracción en fase sólida, conectado en línea con el sistema cromatográfico (HPLC) de análisis, de manera tal que entre las etapas de preconcentración y análisis de los solutos no existe ninguna operación de manipulación externa de la muestra. Esto evita cualquier riesgo de contaminación de los solutos y permite disminuir

## **INTRODUCCIÓN.**

**significativamente el tiempo de análisis de los fenoles considerados, con respecto al tiempo de análisis de otros métodos como los ya mencionados.**

# Capítulo 1.

## EXTRACCIÓN Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN AGUA.

La mayoría de los métodos actuales para el análisis de contaminantes orgánicos en agua se basan en el empleo de técnicas de análisis por cromatografía, ya sea en fase líquida (HPLC) o en fase gaseosa (CG).

La elección del método cromatográfico más apropiado para el análisis de una muestra de agua depende principalmente de la volatilidad, la estabilidad térmica y la naturaleza química de los solutos que se pretende analizar.

Independientemente del método cromatográfico empleado, cuando la muestra es demasiado compleja o "sucia", o bien, cuando la concentración de los solutos de interés es tan baja que su detección se dificulta, se requiere de una etapa previa de limpieza o preconcentración antes del análisis propiamente dicho. Esta etapa puede efectuarse con la ayuda de un gas, una fase líquida o un soporte sólido. Los gases son apropiados para la extracción de solutos volátiles, en tanto que los líquidos y los sólidos son empleados en la extracción de solutos no volátiles y moderadamente volátiles (Subra, 1989).

El empleo de la extracción líquido-líquido (ELL) para la preconcentración de solutos orgánicos presentes en muestras de agua se basa en la distribución que presentan los solutos entre el líquido orgánico, empleado como agente de extracción, y el agua misma.



En función de la naturaleza química de los compuestos a extraer, algunos disolventes orgánicos exhibirán hacia éstos una mayor capacidad de extracción que otros. En los últimos años se han efectuado estudios detallados acerca de los coeficientes de distribución y velocidades de transferencia de masa para diversos solutos, en una gran variedad de sistemas disolvente-agua. Mediante estos estudios se han desarrollado modelos matemáticos a través de los cuales se busca predecir la capacidad de extracción de diversos disolventes hacia solutos específicos. Bizek et al., (1992), han presentado un estudio de este tipo relativo a la distribución de algunos fenoles en varias mezclas disolvente-agua. Sin embargo, un solo disolvente no puede extraer de manera selectiva a un compuesto específico a partir de una muestra.

La baja selectividad de la ELL se puede mejorar mediante la aplicación de varias operaciones sucesivas de extracción empleando disolventes de naturaleza distinta. Sin embargo, estas operaciones tienen el inconveniente de requerir de volúmenes relativamente grandes de disolventes costosos y peligrosos, de involucrar procedimientos experimentales largos, pero sobre todo, de introducir una alta probabilidad de pérdida, degradación y contaminación de los solutos de interés en cada operación experimental efectuada.

## **1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Las técnicas de extracción en fase sólida (EFS) representan una alternativa a los métodos de extracción líquido-líquido debido a que ofrecen una reducción en el trabajo experimental así como un ahorro sustancial de disolventes.

La preconcentración de compuestos orgánicos presentes en muestras de agua por medio de procesos de extracción en fase sólida se basa en la distribución de dichos compuestos entre un soporte sólido y el agua. Los solutos orgánicos son atrapados mediante un adsorbente — empacado en columnas o cartuchos o inmerso en la matriz de una membrana— mientras el agua pasa a través de éste. Posteriormente son recuperados por elución con un pequeño volumen de disolvente orgánico.

El adsorbente a emplear para la preconcentración de los solutos se selecciona en base a la naturaleza química de éstos, de manera tal que su coeficiente de distribución entre la fase estacionaria y el agua sea lo más grande posible. Sin embargo para que la desorción de los solutos concentrados sea eficiente, su coeficiente de distribución entre la fase estacionaria y el eluyente debe ser pequeño.

Al igual que en la ELL, en la EFS una sola fase estacionaria no puede extraer de manera selectiva a un solo compuesto, sin embargo, la selectividad en los procesos de EFS también

### 1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

puede mejorarse a través de la aplicación de varias operaciones sucesivas de extracción con fases estacionarias de naturaleza diferente.

Las técnicas de extracción en fase sólida pueden efectuarse empleando operaciones experimentales en diferido o bien operaciones en línea.

#### 1.1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA "OFF-LINE" O EN DIFERIDO.

En los métodos de análisis que involucran el empleo de procesos de extracción en fase sólida "off-line" o en diferido, la etapa de extracción o preconcentración se realiza de manera independiente a la etapa de análisis.

El proceso de preconcentración de los solutos comprende dos etapas operacionales: la extracción y la desorción. Estas etapas se presentan en forma esquemática en la figura 1.1.

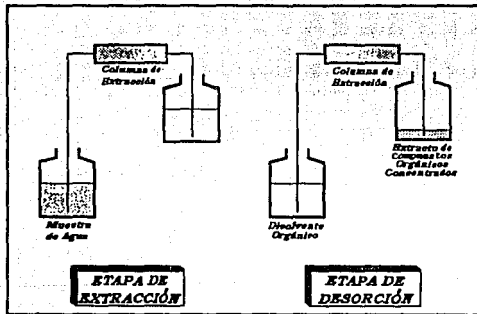


Figura 1.1. Principio de la preconcentración sobre un soporte sólido. Procedimiento en diferido

En la etapa de extracción se efectúa la fijación de los solutos, contenidos en la muestra, por el adsorbente sólido. En la etapa de desorción, los solutos extraídos son eluidos mediante un volumen reducido de un disolvente orgánico apropiado. Después de la eliminación de este disolvente se obtiene un extracto concentrado de los solutos, el cual se puede analizar mediante procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía en fase líquida a polaridad de fases invertida y la cromatografía en fase gaseosa (CG).

En las técnicas de preconcentración en diferido se pueden emplear columnas de dimensiones relativamente grandes (30 cm de longitud por 1 cm de diámetro interno), a través de las cuales es posible percolar grandes volúmenes de agua. Esta situación representa una ventaja, principalmente cuando la concentración de los solutos de interés en la muestra por analizar es baja, del orden de  $\mu\text{g/L}$  o inferior.

No obstante, los procedimientos de EFS en diferido aún presentan ciertos inconvenientes. Por ejemplo, debido a que dichos procedimientos involucran todavía etapas operacionales, tales como la desorción con disolventes de los solutos concentrados en la fase sólida, así como la evaporación de dichos disolventes para obtener un extracto concentrado de los compuestos de interés, aún existe el riesgo de pérdida o degradación de los solutos así como de contaminación de la muestra. Adicionalmente, se tiene una pérdida de sensibilidad del método debido a que sólo se analiza una alícuota del extracto concentrado.

Por otra parte, debido a que es imposible eliminar completamente toda contaminación de origen externo, es necesario efectuar periódicamente el análisis de una "muestra blanco" en el que se deben reproducir completamente las operaciones de manipulación a las que se somete la muestra estudiada. El análisis de la muestra blanco permite efectuar las consideraciones pertinentes, respecto de la contribución de las diversas operaciones experimentales, sobre el análisis cuantitativo final de los solutos de interés.

### ***1.1.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA.***

Muchos de los inconvenientes inherentes a las técnicas de EFS en diferido se pueden evitar usando métodos de EFS en línea.

Los métodos de EFS en línea constituyen una metodología en la cual una vez que los solutos han sido preconcentrados sobre un soporte sólido, éstos son desorbidos y transferidos directamente –mediante la ayuda de válvulas de conmutación (Ramsteiner, 1988)– hacia una columna cromatográfica, en la cual se efectúa su separación y análisis.

El principio operacional de los métodos de EFS acoplados en línea con análisis cromatográfico se presenta en la figura 1.2.

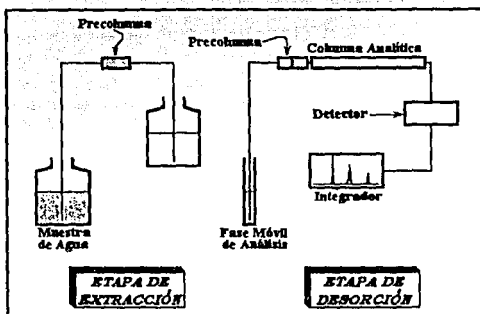


Figura 1.2. Principio del acoplamiento *extracción en fase sólida-Análisis en línea*.

Al igual que en los métodos en diferido, en los métodos en línea la etapa de preconcentración consiste en percolar un volumen dado de muestra a través del adsorbente sobre el cual se fijan los solutos de interés. Sin embargo, a diferencia de los métodos en diferido, en la etapa de desorción la precolumna de concentración se acopla directamente con la columna analítica y las sustancias orgánicas preconcentradas son desorbidas y transferidas simultáneamente, mediante una fase móvil apropiada, hacia la columna cromatográfica para su análisis.

A fin de reducir el fenómeno de ensanchamiento de banda durante la transferencia de los analitos, de la precolumna hacia la columna analítica, las dimensiones de la precolumna deben ser pequeñas en comparación con las dimensiones de la columna analítica. Además la precolumna debe empacarse con adsorbentes de granulometría pequeña.

Durante la etapa de preconcentración se puede efectuar una extracción selectiva de los solutos orgánicos presentes en la muestra analizada, a través del acoplamiento de dos o más precolumnas empacadas con fases estacionarias de naturaleza diferente. La selectividad hacia compuestos específicos también se puede incrementar empleando métodos de detección apropiados. De esta manera, tanto los solutos de baja polaridad, como los polares y los iónicos, pueden ser preconcentrados y analizados simultáneamente.

Debido a que no existe manipulación externa de la muestra (extracciones líquido-líquido, evaporaciones, etc.) entre la etapa de preconcentración y el análisis propiamente dicho, no

existe riesgo de contaminación o pérdida de ésta. Además, el total de los analitos extraídos son analizados en el sistema cromatográfico, lo cual incrementa la sensibilidad del método.

Un parámetro importante en la EFS es el volumen de muestra que se puede manejar en la etapa de preconcentración, antes de que exista fuga en la precolumna de los solutos que se concentran. En contraste con la EFS en diferido, en los procedimientos en línea dicho volumen no se puede incrementar mediante un aumento en la cantidad de adsorbente empleado, debido principalmente a las caídas de presión en el sistema analítico, por lo que es importante seleccionar las condiciones de operación de la etapa de preconcentración (volumen de muestra concentrado, velocidad de flujo, naturaleza química y granulometría del adsorbente, etc.) en función de los niveles de detección requeridos para los solutos analizados.

### **1.1.3 SOPORTES EMPLEADOS EN LA PRECONCENTRACIÓN DE SOLUTOS ORGÁNICOS POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.**

Los principales soportes sólidos empleados en la preconcentración de solutos orgánicos en aguas, por extracción en fase sólida en línea, incluyen a las fases químicamente enlazadas, los polímeros porosos, los intercambiadores de iones y los carbones.

#### **FASES ESTACIONARIAS QUÍMICAMENTE ENLAZADAS.**

Las fases estacionarias químicamente enlazadas están constituidas por un material base como silicagel, alúmina o agarosa sobre el que se une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional específico.

La mayor parte de las fases químicamente enlazadas disponibles comercialmente están formadas por una matriz base de silicagel. La unión del grupo funcional a la silicagel puede ser de cuatro tipos:

- Tipo Éster (Si-O-R)
- Tipo Amino (Si-NR<sub>2</sub>)
- Tipo Carbono (Si-CR<sub>3</sub>)
- Tipo Siloxano (Si-O-SiR<sub>3</sub>)

La disponibilidad de una amplia variedad de grupos funcionales para la preparación de empaques permite efectuar de una manera relativamente sencilla tanto procesos cromatográficos a polaridad de fases invertidas como en fase normal. Los procesos cromatográficos a polaridad de fases invertidas involucran el uso de fases estacionarias relativamente no polares en conjunción con fases móviles muy polares. Los procesos en fase normal requieren del empleo de empaques polares y fases móviles poco polares.

Las fases químicamente enlazadas del tipo siloxano se encuentran dentro de las más populares en HPLC. Estas fases se preparan a través de la reacción de los grupos silanol del soporte de sílice con reactivos del tipo organoclorosilano u organo alcoxisilano. Las fases químicamente enlazadas de este tipo son hidrolíticamente estables en un intervalo de pH de 2 a 8.5.

A pesar de haber sido ampliamente estudiado, aún no se comprende totalmente el mecanismo de retención en fase reversa. La teoría solvofóbica de Horvath para explicar dicho mecanismo es la de mayor aceptación hasta ahora. De acuerdo con dicha teoría, la interacción entre moléculas de soluto y de disolvente es mucho más débil que la interacción de la moléculas de disolvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, la cual actúa como receptor pasivo. La figura 1.3 muestra como ejemplo la interacción de fenol con la fase químicamente enlazada. En este caso puede asumirse que el grupo polar se orienta hacia la fase móvil acuosa, mientras que su porción hidrofóbica lo hace hacia la superficie hidrocarbonada. La magnitud de la interacción soluto-fase enlazada, y por consiguiente la retención, será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar debido a un incremento en la superficie de contacto. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los disolventes polares y reducirán su retención.



Figura 1.3. Mecanismo de retención en fase reversa. Interacción de fenol con la fase estacionaria y con la fase móvil.

### POLÍMEROS POROSOS.

Los polímeros porosos entrecruzados, formados por estireno y divinilbenceno (EDVB), han sido usados ampliamente para la preconcentración y separación de pequeñas cantidades de solutos orgánicos presentes en muestras de agua. Este tipo de polímeros se sintetizan mediante la reacción presentada en la figura 1.4.

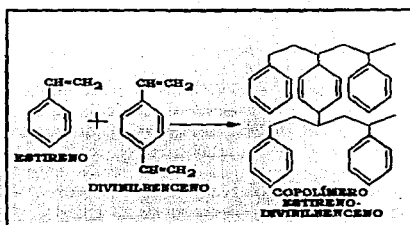


Figura 1.4. Polimerización entrecruzada de estireno y divinilbenceno.

El grado de entrecruzamiento del copolímero, del cual depende su rigidez, está determinado por la proporción del compuesto diolefinico. Otros factores como la porosidad, el tipo y el tamaño de partícula pueden ser controlados apropiadamente durante el proceso de polimerización.

Los copolímeros estireno-divinilbenceno del tipo XAD han sido usados ampliamente para la extracción en diferido de diversos analitos de naturaleza relativamente polar, a partir de muestras de agua de interés ambiental. Sin embargo, estos adsorbentes no se pueden usar en las metodologías en línea debido a que presentan una débil resistencia mecánica a presiones moderadamente grandes.

No obstante también existen en el mercado copolímeros estireno-divinilbenceno porosos, rígidos y resistentes a la presión. Estos soportes conocidos con los nombres comerciales de PRP (Hamilton) y PLRP-S (Polymer Labs) tienen la ventaja adicional de ser estables en el intervalo de pH de 1 a 14. Por lo general estos adsorbentes retienen a los analitos en su forma neutra pero no en su forma iónica. Sin embargo, en disoluciones acuosas los solutos de carácter

altamente hidrofóbico pueden ser retenidos muy fuertemente, aun cuando dichos solutos se encuentren ionizados.

A pesar de que el comportamiento de retención de los analitos sobre los copolímeros EDVB no ha sido estudiado a profundidad, se sabe que dicho comportamiento está gobernado en parte por interacciones hidrofóbicas, similares a las generadas con las fases químicamente enlazadas C18. Además, debido a la presencia de anillos aromáticos en la red de la matriz polimérica, se pueden esperar también fuertes interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los anillos aromáticos de los solutos (Hennion y Coquart, 1993).

Se ha observado (Jahangir y Samuelson, 1980) que la capacidad de adsorción de los copolímeros estireno-divinilbenceno hacia cierto tipo de compuestos, sobre todo de naturaleza aromática, disminuye en función de su uso. Lo anterior se atribuye a la contracción que experimentan las partículas del polímero. Afortunadamente, la capacidad de este tipo de soportes se puede regenerar de una manera fácil por tratamiento del adsorbente con disoluciones acuosas de alcoholes.

#### ***INTERCAMBIADORES DE IONES.***

Los soportes sólidos empleados para la preparación de intercambiadores iónicos en HPLC varían en su estructura, sin embargo los empaques poliméricos de naturaleza porosa son empleados con mayor frecuencia debido a la sencillez de su preparación y manejo. Estos materiales están formados por esferas microporosas, constituidas por una matriz macromolecular formada por cadenas de poliestireno unidas con puentes de divinilbenceno mediante un proceso de copolimerización. En función del tipo de intercambiador que se desee obtener, aniónico o catiónico, la matriz polimérica se somete a distintos tipos de tratamiento. La sulfonación de los grupos aromáticos en el polímero conducirá a la obtención de intercambiadores catiónicos. La clorometilación, seguida por reacción con una amina terciaria llevará a la formación de intercambiadores aniónicos fuertes; si el tratamiento se continua con amoniaco o con una amina primaria o secundaria se obtendrá un intercambiador aniónico débil. La estructura de un intercambiador aniónico fuerte se ilustra en la figura 1.5.

Los intercambiadores de iones permiten efectuar una extracción selectiva de especies ionizadas, o ionizables, que son poco retenidas sobre soportes apolares como los antes descritos.



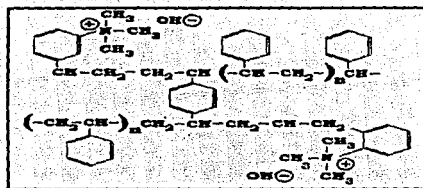


Figura 1.5. Estructura de un intercambiador de aniones

### CARBONES.

Los adsorbentes carbonáceos fueron los primeros materiales empleados para la extracción en diferido de compuestos orgánicos de diferente polaridad a partir de muestras de agua. El carbón negro grafitizado (CNG) es uno de los adsorbentes más comúnmente empleados. Este material se produce por calentamiento de carbones negros a temperaturas entre 2700 y 3000 °C en una atmósfera inerte. Los carbones negros grafitizados son adsorbentes no específicos, no porosos, con un área superficial comprendida entre 8 y 100 m<sup>2</sup>/g. Debido a su estructura cristalina, constituida por grandes hojas de naturaleza grafitica, las cuales se mantienen unidas por interacciones de Van der Waals, los CNG a menudo se consideran como adsorbentes de fase reversa con una mayor capacidad de retención que las sílices químicamente enlazadas C18 (Coquart y Hennion, 1992; Hennion y Coquart, 1993). Sin embargo, algunos estudios recientes (Di Corcia et al., 1993a, 1993b) han mostrado que debido a la forma de preparación de los CNG, la superficie de éstos presenta ciertas heterogeneidades químicas que dan origen a la formación de estructuras oxigenadas similares a los cromenos. En presencia de agua este tipo de estructuras se reorganiza para formar sales de bencilpirilid, de acuerdo a la reacción presentada en la figura 1.6.

La presencia de estas impurezas químicas, cargadas positivamente, sobre la superficie del CNG le permite fijar aniones a través de fuerzas electrostáticas por lo que, además de actuar como un adsorbente no específico, puede actuar de manera similar a un intercambiador de aniones.

El CNG también se ha empleado para efectuar concentraciones selectivas de algunos isómeros geométricos.

Sin embargo, es importante remarcar que los adsorbentes de naturaleza carbonacea presentan una cinética de desorción lenta.

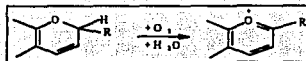


Figura 1.6. Generación de iones de bencilpirilolo en la superficie del carbón negro grafitizado por interacción con agua.

## 1.2 TEORÍA DE LA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

Cuando se hace circular una muestra de agua que contiene un analito a través de una precolumna empacada con un soporte sólido, ocurre un proceso cromatográfico que procede como una cromatografía frontal, siempre y cuando la velocidad de flujo de la muestra y la concentración del analito se mantengan constantes. En la figura 1.7 se muestran los cromatogramas derivados de un proceso de análisis frontal

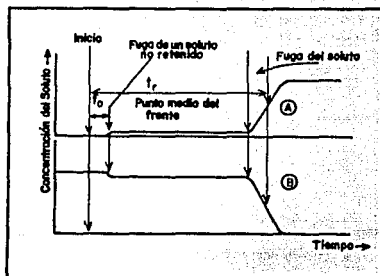


Figura 1.7. Cromatogramas obtenidos por análisis frontal. (A) Etapa de adsorción, (B) Etapa de desorción.

Al efectuarse el paso de la muestra a través de la precolumna, los analitos son extraídos por el adsorbente. De esta manera, al inicio del proceso la muestra que emerge de la precolumna se encontrará libre de analitos. Sin embargo, después de concentrado un cierto volumen de muestra, ocurrirá una fuga de los solutos de tal manera que la muestra que sale de la precolumna contendrá los analitos nuevamente.

En la figura 1.8 se presentan las *curvas frontales o curvas de fuga* para dos solutos (1 y 2) con diferentes afinidades hacia el adsorbente A (curva continua) y hacia el adsorbente B (curva punteada). Las curvas mencionadas se obtienen pasando disoluciones acuosas fortificadas con los solutos 1 y 2, por separado, a través de dos precolumnas independientes, empacadas con el adsorbente A o con el adsorbente B, y registrando de manera continua la señal (en un detector UV) generada por el efluente que emerge de cada precolumna.

Bajo condiciones ideales las curvas de fuga tienen una forma bilogarítmica en la que el punto de inflexión corresponde al volumen de retención,  $V_r$ , que el soluto tendría al ser eluido a través de la precolumna por agua pura. En el valor de 1 % de la absorbancia UV de la muestra se define el volumen de fuga,  $V_f$ . Este parámetro es de suma importancia en los procesos de extracción en fase sólida ya que indica el volumen máximo de muestra que puede pasarse a través de la precolumna sin que exista fuga del analito. A un valor de 99% de la absorbancia UV se define el valor del volumen máximo percolado,  $V_m$ , que corresponde al volumen a partir del cual la concentración, del soluto de interés en la muestra que emerge de la precolumna es igual a la de la muestra que entra en ésta.

El volumen de fuga y el volumen máximo percolado se puede expresar (Werkhoven-Goewie et al., 1981; Nondek y Chvalovsky, 1983) de acuerdo con las ecuaciones 1.1 y 1.2 respectivamente.

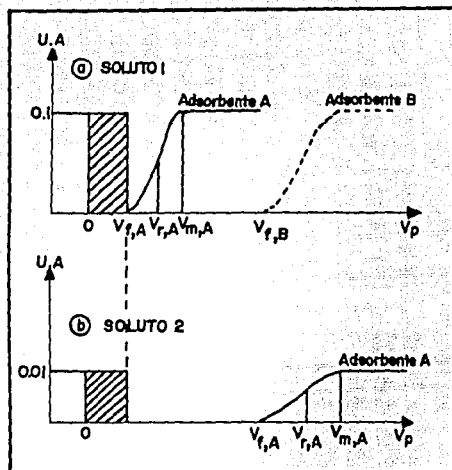
$$V_f = V_r - 2\sigma_v \quad (1.1)$$

y

$$V_m = V_r + 2\sigma_v \quad (1.2)$$

donde  $\sigma_v$  es la desviación estándar, la cual depende de la dispersión axial del analito a lo largo del lecho de partículas en la precolumna y puede ser expresada en términos de la longitud de la precolumna ( $L$ ), el diámetro de partícula del soporte ( $d_p$ ) y la altura reducida del plato teórico ( $h$ ) de acuerdo con la ecuación 1.3:

$$\sigma_v = V_r \sqrt{\frac{h d_p}{L}} \quad (1.3)$$



**Figura 1.8.** Determinación de los volúmenes de fuga a partir del registro de los cromatogramas frontales para dos muestras de agua fortificadas con (a) el soluto 1 y (b) el soluto 2. La respuesta UV de la muestra (absorbancia total) se mide registrando directamente la señal de la muestra de agua fortificada con el detector. A un volumen  $V_p = 0$ , la muestra se comienza a pasar a través de la precolumna;  $V_f$  se mide a 1%,  $V_r$  a 50% y  $V_m$  a 99% de la absorbancia total. La línea continua y la línea punteada representan los cromatogramas frontales registrados con la precolumna empacada con el adsorbente A y con el adsorbente B, respectivamente.

En base a la ecuación 1.3,  $V_f$  y  $V_m$  pueden expresarse de una manera más práctica a través de las ecuaciones 1.4 y 1.5 respectivamente.

$$V_f = V_r \left( 1 - 2\sqrt{\frac{h d_p}{L}} \right) \quad (1.4)$$

y

$$V_m = V_r \left( 1 + 2\sqrt{\frac{h d_p}{L}} \right) \quad (1.5)$$

De esta manera  $V_f$  y  $V_m$  dependen de  $h$ , la cual es una función de la velocidad reducida de flujo de la muestra a través de la precolumna, de la geometría del lecho adsorbente y de la velocidad de transferencia de masa, de acuerdo con la ecuación de Van Deemter. El valor exacto de  $h$  generalmente se desconoce para una precolumna particular, sin embargo puede esperarse (Nondek y Chvalovsky, 1983) un valor de 10 para precolumnas relativamente cortas empacadas a mano.

La recuperación,  $R$ , y el factor de enriquecimiento,  $f$ , son otros dos parámetros importantes en el análisis de trazas por extracción en fase sólida.

La recuperación se define como la relación entre la cantidad de analito extraído por el adsorbente y la cantidad total de analito pasado a través de la precolumna. La recuperación será del 100 % únicamente cuando el volumen total de muestra percolado a través de la precolumna,  $V_p$ , es menor al volumen de fuga del analito,  $V_f$ , sobre dicha precolumna ( $V_p < V_f$ ).

Desde un punto de vista práctico, el análisis cuantitativo es más fácil cuando la recuperación es del 100%. Sin embargo, además del caso en el que los solutos son sólo débilmente retenidos por el adsorbente, cuando se desea extraer y cuantificar varios solutos simultáneamente, será necesario efectuar dicha extracción y cuantificación con recuperaciones parciales (figura 1.8). Por ejemplo, si los solutos 1 y 2 se encuentran presentes en una misma muestra, una recuperación del 100 % para ambos solutos se alcanzará únicamente analizando un volumen máximo de muestra,  $V_p$ , igual a  $V_{fA}$ . En este caso, la cantidad de los solutos 1 y 2 extraída por el adsorbente (precolumna) A corresponde a la suma de las áreas sombreadas mostradas en la figura 1.8. Si el soluto 2 tiene una pobre absorbancia UV, la cantidad extraída de este soluto no será suficiente para ser detectada, de modo que el volumen percolado de muestra,  $V_p$ , tendrá que incrementarse, entonces la cantidad de soluto 1 adsorbida permanecerá constante pero su recuperación será menor del 100%. Cuando los solutos son más numerosos

es imposible ajustar el volumen de la muestra de tal manera que se alcance una recuperación del 100% para cada soluto.

Para el caso del soluto 1, la fuga ocurre a un volumen de muestra igual a  $V_{fA}$  para el caso de la precolumna A, y en volumen  $V_{fB}$  para el caso de la columna B. Considérese que la precolumna B se conecta a continuación de la precolumna A; cuando las dos precolumnas se acoplan la fuga ocurrirá, en una primera aproximación, en un volumen igual a  $V_{fA} + V_{fB}$ , ya que para la segunda precolumna las condiciones para el análisis frontal son distintas que para el caso de la primera debido a que la concentración de compuesto que entra en la segunda columna no es constante, sino que se incrementa dependiendo de la forma del frente de fuga producido por el paso del soluto a través de la primera precolumna. Cuando se pasa un volumen de muestra mayor que  $V_{fA}$ , el soluto 1 será extraído tanto por la precolumna A como por la precolumna B por lo que será necesario conocer los valores de  $V_{fA}$  y  $V_{fB}$  a fin de determinar las recuperaciones respectivas.

Los datos de retención son importantes ya que  $V_f$  puede estimarse en primera aproximación a partir de valores de  $V_r$  (ecuación 1.1). Estos valores de retención son demasiado grandes para medirse en agua pura. En cromatografía de fase reversa los datos de retención se pueden extrapolar a condiciones de agua pura a partir de datos conocidos a dos porcentajes de modificador orgánico, debido a la relación logarítmica entre el factor de capacidad y el contenido de metanol. Existe también una relación logarítmica muy útil entre los factores de capacidad en agua y los coeficientes de reparto octanol-agua de los solutos (Braumann, 1986).

La cantidad máxima de soluto extraída está dada por la relación  $V_r C_p$ , donde  $C_p$  representa la concentración del soluto en la muestra estudiada. La cantidad máxima extraída se alcanza para un volumen de muestra concentrado,  $V_p$ , igual o mayor que  $V_m$  y por tanto dicha cantidad no corresponde a una recuperación del 100%.

El factor de enriquecimiento,  $f$ , se define como la relación entre la cantidad de analito que entra en la columna analítica después de la etapa de preconcentración y la cantidad inyectada sin preconcentración.

El factor  $f$  para un analito A puede expresarse (Nondek y Chvalovsky; 1983, 1984) en función de la relación entre el volumen de muestra pasado a través de la precolumna,  $V_p$ , y el volumen muerto de ésta,  $V_0$ . Mientras  $V_p$  no sea superior al volumen de fuga se cumplirá la siguiente condición:

$$f = \frac{V_p}{V_0} \leq \frac{V_f}{V_0} = (1 + k') \left( 1 - 2\sqrt{\frac{h d_p}{L}} \right) \quad (1.6)$$

$k'_A$  es el factor de capacidad del analito A retenido por el adsorbente y el término,  $(1 - 2\sqrt{h} d_p/L)$  el cual toma en consideración la dispersión axial, expresa que tan grande debe ser el lecho adsorbente a fin de lograr preconcentraciones cuantitativas. De modo que una forma de alcanzar valores altos de  $f$  consiste en emplear adsorbentes que permitan obtener los más altos valores de  $k'_A$ .

Para el caso de analitos poco retenidos, con valores bajos de  $k'_A$ , y precolumnas cortas y pobremente empacadas el factor de enriquecimiento será bajo. Sin embargo, existen maneras de incrementar  $f$ . Una de éstas consiste en optimizar la geometría de la precolumna a fin de minimizar  $h$ . Werkhoven-Goewie et al., (1981) han recomendado el uso de precolumnas de diámetro pequeño, relativamente largas, cuyo término  $(1 - 2\sqrt{h} d_p/L)$  sea cercano a la unidad. Estas precolumnas pueden ser empacadas empleando la técnica de la suspensión, usando soportes con un  $d_p$  de entre 5 y 20  $\mu\text{m}$ .

Es importante remarcar sin embargo que las curvas de fuga obtenidas experimentalmente en la mayoría de los casos no exhiben una forma bilogarítmica ideal. La figura 1.9 muestra las curvas de fuga registradas (Subra et al., 1988) para diversos solutos como ftalatos, herbicidas y compuestos fenólicos, sobre (a) una precolumna empacada con una fase químicamente enlazada C18 y (b) una precolumna empacada con un copolímero estireno-divinilbenceno (PRP).

Como se observa en la figura 1.9, ninguno de los cromatogramas frontales exhibe la forma ideal de un frente bilogarítmico, el cual corresponde a un pico gaussiano en una cromatografía de elución; además, la forma de los frentes varía de un soluto a otro. Una razón del comportamiento anterior es que los volúmenes geométricos de las precolumnas empleadas en la determinación de los frentes mostrados son generalmente pequeños, además de que las precolumnas empleadas normalmente se empaquen de una manera que provoca que su número de platos teóricos no sea muy alto. Adicionalmente, es necesario considerar que los solutos tienen diferencias cinéticas de intercambio entre el adsorbente y la fase móvil.

Se puede observar a partir de la figura 1.9 que los compuestos apolares son extraídos por la precolumna C18, en tanto que los compuestos moderadamente polares son extraídos de una manera más apropiada por la precolumna PRP. Es importante remarcar adicionalmente que algunos compuestos presentan una diferencia importante entre sus valores de  $V_f$  y  $V_r$ . Por ejemplo, el 2,4,6-triclorofenol tiene un volumen de fuga, sobre la precolumna PRP, de 130 ml y un volumen de retención de 207 ml, esto provoca que los métodos de cálculo reportados en la bibliografía para la estimación de los valores de  $V_f$  y  $V_r$ , dentro de los procesos de extracción en fase sólida, sólo puedan considerarse como una primera aproximación a los valores reales en la mayoría de los casos.

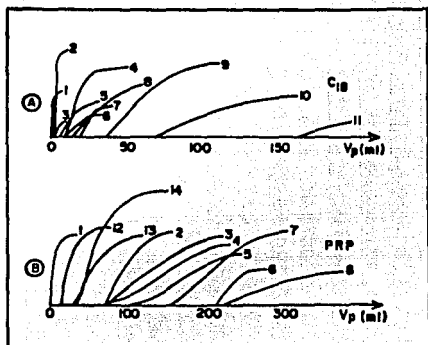


Figura 1.9. Curvas de fuga para solutos con (A) Una precolumna (10 x 2.1 mm d.i.) empacada con una fase reversa C18, y (B) Una precolumna (10 x 2.1 mm d.i.) empacada con un copolímero estireno-divinilbenceno (PRP). Muestras: disoluciones acuosas a pH = 3 (ácido perclórico 0.001M); velocidad de flujo 2.5 ml/min. Detección UV a longitud de onda variable. Solutos 1. 2,4,6-trinitrofenol, 2. 2-nitrofenol, 3. tolueno, 4. *m*-xileno, 5. 2,4,5-trimetilfenol, 6. *ftalato de dimetilo*, 7. 2,4,6-triclorofenol, 8. *simazina*, 9. *atrazina*, 10. *linuron*, 11. *ftalato de dietilo*, 12. 2-metilfenol, 13. 2,4-dinitrofenol, 14. 2,4-dimetilfenol.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que la fuga de los solutos de la precolumna ocurrirá cuando se exceda la capacidad del adsorbente. La capacidad del adsorbente depende entre otras cosas de su naturaleza química, de su estructura física y de las dimensiones de la precolumna.

Bajo condiciones de sobrecarga el volumen denotado por  $V_f$  no corresponde al volumen de retención del soluto. La figura 1.10 muestra las curvas de fuga en una precolumna empacada con un soporte C18, de diversas disoluciones acuosas fortificadas con concentraciones variables de *ftalato de dimetilo*.



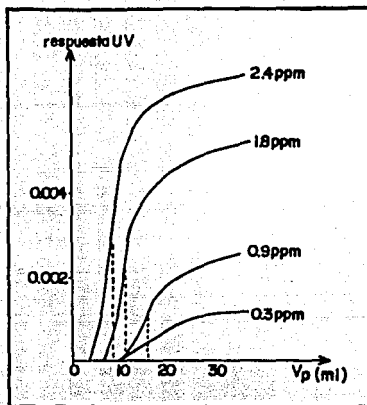


Figura 1.10. Registro de las curvas de fuga, en una precolumna empacada con una fase reversa C18, de disoluciones acuosas de concentración creciente de ftalato de dimetilo. Precolumna de 10 x 2.1 mm(d.i), velocidad de flujo: 2.5 ml/min, detección UV a 260 nm, sensibilidad 0.1 AUFS (Subra et al., 1988).

Se observa en la figura 1.10 que en los casos de la muestra fortificada con 0.3 y 0.9 ppm del soluto; la fuga ocurre a un mismo valor de volumen. Sin embargo, para concentraciones mayores el volumen de fuga disminuye. Por lo anterior es importante tener la certeza que durante las determinación experimental de los valores de  $V_f$ ,  $V_r$  y  $V_m$ , la fuga de los solutos no ocurra debido a una sobrecarga del adsorbente en la precolumna.

### 1.2.1 CÁLCULOS DE RECUPERACIÓN A PARTIR DE VOLÚMENES DE FUGA.

El análisis frontal permite obtener los volúmenes, a partir de los cuales se puede establecer la cantidad de soluto extraída por una precolumna en un proceso de extracción en fase sólida, así como el rendimiento de dicha extracción.

Las expresiones teóricas de la cantidad extraída y del rendimiento de extracción en función del volumen de muestra percolado para un sistema de dos precolumnas conectadas en serie, han sido presentadas por Subra et al., (1988). El caso de una sola precolumna es una simplificación del caso precedente.

Al analizar varias muestras de agua fortificadas con diversos solutos no ionizados acoplando dos precolumnas en serie durante la etapa de preconcentración, una empacada con una fase químicamente enlazada C18 y otra con un copolímero estireno-divinilbenceno (las cuales se denotarán C18 y PRP, respectivamente), es posible definir los volúmenes característicos presentados en la figura 1.8. Cuando la muestra de agua es pasada a través de las dos precolumnas los volúmenes  $V_{f,C18}$ ,  $V_{r,C18}$  y  $V_{m,C18}$  corresponden a los volúmenes obtenidos con la precolumna C18 sola, mientras que los volúmenes  $V_{f,PRP}$ ,  $V_{r,PRP}$  y  $V_{m,PRP}$  representan los volúmenes obtenidos con la precolumna PRP sola, más los valores obtenidos con la precolumna C18 sola. Para los solutos neutros estudiados (Subra et al., 1988) estos volúmenes se incrementan en el siguiente orden:

$$V_{f,C18} < V_{r,C18} < V_{m,C18} < V_{f,PRP} < V_{r,PRP} < V_{m,PRP} \quad (1.7)$$

Las curvas que representan los frentes se denotan por  $y(V_p)$  para C18 y  $z(V_p)$  para PRP. En el caso de cinéticas de intercambio rápido las expresiones son las integrales de la gaussiana característica de un pico cromatográfico. Las cantidades extraídas sobre las precolumnas C18, PRP., y sobre ambas son  $Q_{C18}$ ,  $Q_{PRP}$  y  $Q_T$ , respectivamente, y las recuperaciones correspondientes son  $R_{C18}$ ,  $R_{PRP}$  y  $R_T$ . La tabla 1.1 resume las diversas expresiones para los parámetros antes mencionados en función del volumen de muestra percolado.

En la figura 1.11 se muestra la variación de (A) las cantidades extraídas y (B) las recuperaciones, en función del volumen de muestra concentrada  $V_p$ .

Tabla 1.1. Ecuaciones para las cantidades extraídas, Q, y las recuperaciones, R, sobre precolumnas C18 y PRP, en función de los volúmenes de muestra cargados,  $V_p$ .

$p$	$Q_{C18}$	$Q_{PRP}$	$R_{C18}$	$R_{PRP}$
$\langle V_{f,C18} \rangle$	$C_p V_p$	0	1	0
$\langle V_{f,C18} \rangle$ $\langle V_{m,C18} \rangle$	$C_p V_p - \int_{f,C18}^p x(V_p) dV_p$	$\int_{f,C18}^p x(V_p) dV_p$	$1 - \frac{1}{C_p V_p} \int_{f,C18}^p x(V_p) dV_p$	$\frac{1}{C_p V_p} \int_{f,C18}^p x(V_p) dV_p$
$\langle V_{m,C18} \rangle$ $\langle V_{f,PRP} \rangle$	$C_p V_{r,C18}$	$C_p (V_p - V_{r,C18})$	$\frac{V_{r,C18}}{V_p}$	$1 - \frac{V_{r,C18}}{V_p}$
$\langle V_{f,PRP} \rangle$ $\langle V_{m,PRP} \rangle$	$C_p V_{r,C18}$	$C_p (V_p - V_{r,C18}) - \int_{f,PRP}^p x(V_p) dV_p$	$\frac{V_{r,C18}}{V_p}$	$1 - \frac{V_{r,C18}}{V_p} - \frac{1}{C_p V_p} \int_{f,PRP}^p x(V_p) dV_p$
$\langle V_{m,PRP} \rangle$	$C_p V_{r,C18}$	$C_p (V_{r,PRP} - V_{r,C18})$	$\frac{V_{r,C18}}{V_p}$	$\frac{V_{r,PRP} - V_{r,C18}}{V_p}$

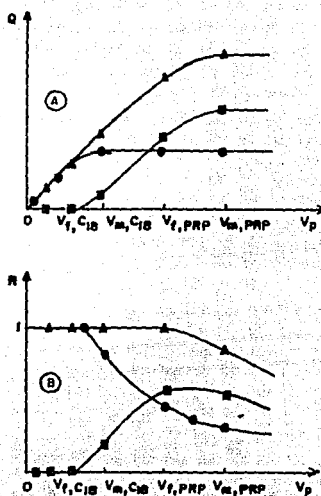


Figura 1.11. Variaciones de (A) las cantidades extraídas y (B) las recuperaciones, en función del volumen de muestra concentrada,  $V_p$ , para: ( $\bullet$ ) Una precolumna C18, ( $\blacksquare$ ) Una precolumna PRP, ( $\blacktriangle$ ) La precolumna C18 y la precolumna PRP acopladas en serie (Subra et al., 1988).

La variación de las cantidades extraídas es relativamente simple para un volumen de muestra menor que el volumen de fuga en la primera precolumna,  $V_{r,C18}$ , ya que las cantidades extraída y percolada son iguales y la recuperación es del 100%. Para un volumen de muestra mayor que  $V_{r,C18}$ , la cantidad extraída por la fase C18 aumenta hasta un valor máximo pero que es diferente de la cantidad de muestra pasada a través de la precolumna; la fracción de soluto

no retenido por la precolumna C18 es entonces extraída por la segunda precolumna (PRP) hasta que se alcanza el volumen  $V_{f,PRP}$ . La recuperación a partir de la precolumna C18 disminuye, mientras que en la precolumna PRP aumenta, sin embargo, la recuperación total es siempre de 100%. La cantidad máxima extraída se alcanza con un volumen de muestra  $V_{m,PRP}$ , que corresponde a una recuperación menor del 100%. Cuando el volumen de muestra concentrado,  $V_p$ , se encuentra entre  $V_f$  y  $V_m$ , las cantidades recuperada y extraída no se pueden calcular exactamente si no se conoce la ecuación del frente de la curva de fuga respectiva.

La variación de las cantidades extraídas y de las recuperaciones, en función de los volúmenes de muestra concentrados, son muy importantes. En el análisis de trazas, los límites de detección son el interés principal. A partir de las figuras 1.11A y 1.11B se puede observar que las mejores condiciones para la detección se obtendrán al trabajar con un volumen de muestra mayor que  $V_{f,PRP}$ , debido a que la cantidad extraída por la precolumna PRP es mayor que la extraída por la columna C18, a pesar de que las recuperaciones correspondientes sean únicamente del 50%. Este aspecto es particularmente importante para aquellos solutos que tiene características de detección pobres.

La determinación de la concentración de solutos en muestras de interés suele efectuarse a través de dos procedimientos. El primero consiste en determinar las concentraciones del soluto inyectando directamente una cantidad conocida de éste en la columna analítica mediante el uso de un rizo de inyección convencional; la cantidad de soluto en la muestra analizada se determina entonces a través de curvas de calibración y, por supuesto, teniendo en cuenta los datos de recuperación. Un segundo método, más ampliamente empleado, consiste en fortificar muestras de agua con cantidades conocidas de los solutos de interés y entonces determinar las cantidades extraídas correspondientes.

Por lo tanto es importante adaptar y optimizar el volumen de muestra a concentrar apropiado para cada problema analítico, teniendo en cuenta la concentración probable de los analitos en las muestras a estudiar así como el modo de detección que se empleará.

### **1.2.2 CÁLCULO DE LA RECUPERACIÓN EXPERIMENTAL A PARTIR DE LAS ÁREAS DE LOS PICOS.**

La determinación experimental tanto de los volúmenes de fuga como de las recuperaciones puede efectuarse empleando un dispositivo en línea. Mediante éste, un volumen pequeño,  $V_p$ , de muestra fortificada, con una concentración conocida  $C_p$  de cada analito de interés, es pasado a través de la precolumna. Se registra entonces el cromatograma correspondiente a la elución en línea de la precolumna, determinando las áreas de los picos obtenidos. Este primer volumen se elige de modo que no ocurra fuga de ninguno de los solutos presentes en la muestra (5 o 10

ml por ejemplo). Lo anterior se verifica comparando el cromatograma con uno obtenido por inyección directa, de la misma cantidad de soluto en la columna analítica. Entonces el volumen de muestra se incrementa y su concentración se disminuye, a fin de tener la misma cantidad  $C_p V_p$  de analitos en cada volumen de muestra preconcentrado. Mientras no ocurra fuga para ningún soluto, la cantidad concentrada permanece constante y las áreas de los picos obtenidos en el cromatograma "en línea" son constantes. Cuando la fuga ocurre, la cantidad extraída disminuye, lo cual se traduce en una disminución de las áreas de los picos. Los volúmenes de fuga pueden determinarse de esta manera a través de 3 o 4 experimentos de preconcentración de todos los solutos de interés de manera simultánea. Las recuperaciones correspondientes también se pueden calcular dividiendo las áreas de los picos entre las áreas obtenidas al preconcentrar un volumen pequeño de muestra en el que no hay fuga (los 5 o 10 ml antes mencionados).

Cuando el proceso de preconcentración se efectúa empleando dos precolumnas conectadas en serie, dependiendo de los volúmenes de fuga de los solutos analizados, éstos se extraerán sólo en la primera precolumna, o en ambas.

En la figura 1.12 se muestran los cromatogramas obtenidos (Subra et al., 1988) al efectuar la preconcentración en línea, a través de dos precolumnas conectadas en serie una empacada con una fase reversa C18 y otra con un copolímero EDVB (PRP), de: (1) 10 ml de agua fortificada con tres herbicidas a una concentración de 120  $\mu\text{g/L}$  cada uno y (2) 150 ml de agua fortificada con los mismos compuestos pero a una concentración de 8  $\mu\text{g/L}$ . En ambos casos, la cantidad cargada de cada uno de los herbicidas es de 1.2  $\mu\text{g}$ . En el caso de la muestra de 10 mL, los tres herbicidas son extraídos sólo por la precolumna C18, en tanto que en el caso de la muestra de 150 ml los herbicidas son recuperados tanto en la precolumna C18 como en la precolumna PRP.

Considérese primero que sólo se usa una precolumna (por ejemplo la C18). Si  $V_p$  es menor que  $V_{f,C18}$ , la figura 1.11 muestra que las cantidades extraída y percolada serán iguales. Cuando la cantidad percolada es constante de una percolación a otra, el área del pico es constante y para un soluto dado se tendrá la condición:

$$V_p < V_{f,C18} \quad A(V_p) = kC_p V_p \quad (1.8)$$

Cuando  $V_p$  es mayor que  $V_{m,C18}$  la cantidad extraída será igual a  $C_p V_{r,C18}$ , de tal manera que:

$$A(V_p) = kC_p V_{r,C18} \quad (1.9)$$

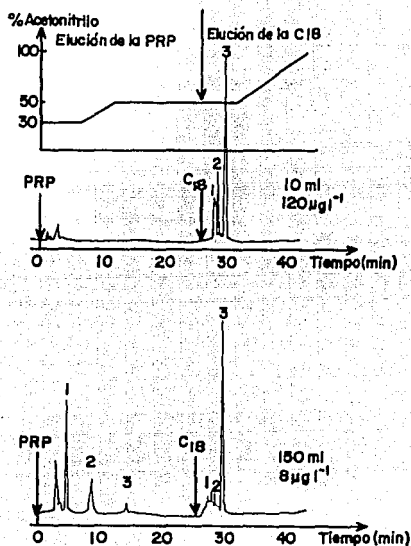


Figura 1.12. Análisis de dos muestras de agua fortificadas con las mismas cantidades de herbicidas: (A) preconcentración de 10 ml de agua fortificada con 120  $\mu\text{g/L}$  de cada soluto; (B) preconcentración de 150 ml de agua fortificada con 8  $\mu\text{g/L}$  de cada soluto. Solutos: 1. Simazina, 2. Atrazina, 3. Linuron. Preconcentración a través de dos precolumna (10 x 2.1 d.i. mm) conectadas en serie empacadas con una fase reversa C18 y con un copolímero PRP. Flujo: 3 ml/min (Subra et al., 1988).

Pero, debido a que las concentraciones de los solutos en la muestra se ajustan a fin de tener una cantidad preconcentrada constante,  $C_p$  puede expresarse en términos de  $C_{p1}$  y  $V_{p1}$ , para la primera concentración y el primer volumen de muestra respectivamente, de tal manera que ahora se tendrá:

$$C_p = \left( \frac{C_{p1} V_{p1}}{V_p} \right) \quad (1.10)$$

Denotando por  $A_1$  el área del pico obtenido en la primera percolación para la cual se verifica que  $V_{p1}$  es más pequeña que  $V_{f,C18}$  la ecuación 1.9 se puede expresar como:

$$A(V_p) = A_1 \left( \frac{V_{f,C18}}{V_p} \right) \quad (1.11)$$

si las áreas de los picos se normalizan por las áreas obtenidas para una primera percolación bajo condiciones  $A_1$ , se tendrán entonces las siguientes relaciones:

$$V_p < V_{f,C18}: \quad \frac{A(V_p)}{A_1} = 1 \quad (1.12)$$

y

$$V_p > V_{f,C18}: \quad \frac{A(V_p)}{A_1} = \frac{V_{f,C18}}{V_p} \quad (1.13)$$

La comparación de estas relaciones con las de la tabla 1.1 indica que éstas representan las recuperaciones obtenidas cuando la precolumna C18 se usa sola.

Cuando las dos precolumnas se conectan en serie, hay una disminución de las áreas de los picos obtenidos de la elución de la C18, en función de  $V_p$ , lo cual es acompañado por un



incremento en las áreas de los picos obtenidos a partir de la elución de la PRP. Empleando la misma notación para los volúmenes característicos antes definidos, los valores de las áreas normalizadas obtenidos de la elución de la C18 y la PRP y el análisis de los compuestos extraídos son como sigue:

$$V_p < V_{f,C18}: \quad \frac{A(V_{p,C18})}{A_1} = 1 \quad (1.14)$$

$$\frac{A(V_{p,PRP})}{A_1} = 0 \quad (1.15)$$

$$V_{m,C18} < V_p < V_{f,PRP}: \quad \frac{A(V_{p,C18})}{A_1} = \frac{V_{r,C18}}{V_p} \quad (1.16)$$

$$\frac{A(V_{p,PRP})}{A_1} = 1 - \frac{V_{r,C18}}{V_p} \quad (1.17)$$

$$V_p > V_{m,PRP}: \quad \frac{A(V_{p,C18})}{A_1} = \frac{V_{r,C18}}{V_p} \quad (1.18)$$

$$\frac{A(V_{p,PRP})}{A_1} = \frac{(V_{r,PRP} - V_{r,C18})}{V_p} \quad (1.19)$$

Comparando las ecuaciones 1.14 a 1.19 con las expresiones de la tabla 1.1 se puede observar que las áreas normalizadas de los picos representan recuperaciones exactas; la medición de las áreas de los picos cuando se preconcentran diversos volúmenes de muestra, fortificada con una cantidad constante de soluto, permite determinar las recuperaciones y las cantidades extraídas.

### **1.3 PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.**

Los fenoles son derivados hidroxilados del benceno y sus núcleos condensados. Estos compuestos contiene un grupo -OH unido a un átomo de carbono del anillo bencénico.

El radical fenilo imparte propiedades ácidas a los grupos hidroxilo de los fenoles, la acidez de dichos grupos se incrementa por la presencia de sustituyentes electronegativos en el anillo bencénico. Esto implica, por ejemplo, que los nitrofenoles son ácidos más fuertes que el fenol mismo.

En la tabla 1.2 se presentan algunas propiedades de los cinco compuestos fenólicos considerados en este estudio.

Algunos de los fenoles presentes en el medio ambiente son de origen natural, tales como el timol. No obstante, la mayoría de estos compuestos tienen su origen en diversos procesos industriales tales como la producción de fungicidas, herbicidas, preservativos de madera, tintes, pesticidas y productos farmacéuticos; en el uso masivo de diversos productos domésticos, agrícolas o industriales que los contienen; así como por la liberación accidental o intencional de dichos compuestos. A pesar de que la mayoría de los compuestos fenólicos presentes en muestras de agua se biodegradan en períodos de tiempo relativamente cortos (del orden de horas a días) o bien son susceptibles de experimentar reacciones fotoquímicas que los transforman en productos de menor toxicidad (Howard, 1990), la presencia de fenol y de sus principales cloro, nitró y alquilo derivados en agua representa un peligro potencial para la vida acuática y terrestre. Debido a su toxicidad es necesario disponer de métodos de análisis capaces de detectar y cuantificar estas especies a concentraciones del orden de  $\mu\text{g/L}$ , o inclusive menores, y a la vez monitorear efectivamente su posible cambio de concentración en función del tiempo (Carron y Afghan, 1989).






El fenol es un compuesto tóxico y corrosivo cuando se ingiere, se inhala o se absorbe a través de la piel. Los síntomas experimentados por exposición al fenol incluyen irritación del sistema respiratorio, alteraciones en el sistema digestivo, nefritis, gangrena y posiblemente la muerte. Existen datos que indican (USEPA, 1980a) que la variación de diversas propiedades del agua tales como el pH, la dureza y la temperatura, pueden alterar las características tóxicas del fenol. La concentración máxima de fenol en agua potable, en los Estados Unidos, está limitada a  $0.001 \text{ mg/L}$  (USEPA, 1980a).

Todos los clorofenoles son considerados como irritantes de las membranas mucosas. Estos compuestos provocan además daños al hígado y al riñón, y afectan al sistema nervioso central. Aparentemente su toxicidad aguda aumenta a medida que se incrementa la cloración de la molécula (USEPA, 1980b).

En el caso de los nitrofenoles, se conoce muy poco acerca de sus efectos tóxicos en el hombre, sin embargo, diversos estudios con animales indican que estos compuestos pueden

provocar depresión del sistema nervioso central, metahemoglobinemia y disnea (USEPA, 1980c).

Tabla 1.2. Propiedades de compuestos fenólicos.

PROPIEDAD	FENOL	4-NITRO FENOL	2,4-DINITRO FENOL	2-CLORO FENOL	2-NITRO FENOL
ESTRUCTURA					
FORMULA MOLECULAR	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ClO	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>
PUNTO DE EBULLICIÓN (760 mmHg), °C	181.75	279 (descompone)	—	174.9	216
PUNTO DE FUSIÓN, °C	43	113-124	112	9.3	44-45
PESO MOLECULAR	94.11	139.11	184.11	128.56	139.11
CONSTANTE DE DISOCIACIÓN pK <sub>a</sub>	9.994	7.156	3.94	8.52	7.230
Log DEL COEFICIENTE DE REPARTO OCTANOL/AGUA	1.46	1.91	1.54	2.15	1.79
SOLUBILIDAD EN AGUA A 25°C, mg/l	87,000	25,000	6,000	28,000	2,500
PRESIÓN DE VAPOR A 25°C, mmHg	0.524	0.001	2x10 <sup>-5</sup>	1.42	0.20

De manera general, se pueden establecer las siguientes aseveraciones respecto a la toxicidad y biodegradación de los compuestos fenólicos:

- Los alquil fenoles generalmente son menos tóxicos que los cloro o nitrofenoles.
- Los nitrofenoles son los más tóxicos de los derivados fenólicos, sin embargo, parecen biodegradarse fácilmente, a través de la reducción a la amina correspondiente
- Los fenoles clorados son los más persistentes en el medio ambiente
- La toxicidad de los compuestos fenólicos aumenta a medida que crece su acidez
- Los alquilfenoles son relativamente biodegradables, con excepción de aquellos fenoles que presentan grupos OH estéricamente impedidos, esto los hace más resistentes a la biodegradación.
- La tasa de biodegradación de los fenoles crece a medida que aumenta su lipofilicidad.
- Los fenoles altamente clorados se acumulan fácilmente en organismos acuáticos.

#### **1.4 MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE FENOLES.**

El creciente interés en la determinación de diversos fenoles en muestras ambientales ha promovido el desarrollo de numerosos métodos para su análisis y cuantificación. En términos de instrumentación los procedimientos son diversos. La colorimetría, la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos han sido las técnicas más empleadas.

El método colorimétrico para el análisis de fenoles se basa en la reacción de éstos con la 4-aminoantipirina para formar un derivado colorido. Sin embargo, mediante este método no es posible efectuar una diferenciación entre los diversos fenoles presentes en la muestra. Además, ciertos fenoles tales como aquellos con sustituyentes en la posición *para*, no reaccionan. Adicionalmente, la determinación no es muy satisfactoria para los fenoles que poseen sustituyentes como grupos alquilo, arilo, nitro, benzoilo, nitroso o aldehído (Buckman et al., 1984).

Debido a las desventajas antes mencionadas, los métodos cromatográficos han desplazado casi en su totalidad a los métodos colorimétricos. Los métodos por cromatografía de gases (Hall et al., 1984; Fingler et al., 1987; Masi y Gulick, 1987; Zhang, 1990) utilizan generalmente columnas capilares, con detección por ionización de llama, captura de electrones o

espectrometría de masas. La mayoría de estos métodos involucran una etapa de derivación mediante la cual los fenoles son convertidos en especies más volátiles y menos polares a fin de facilitar su separación y cuantificación.

La mayoría de los fenoles son compuestos relativamente polares y su análisis en muestras de agua se puede efectuar también empleando cromatografía de líquidos. Aunque tanto la cromatografía de líquidos a polaridad de fase invertida (Subra et al., 1989; Piangerelli, 1992; Marko-Varga y Barceló, 1992), como en fase normal (Calmer et al., 1977; Schabron et al., 1978) han sido investigadas, la primera ha tenido una aplicabilidad mucho más amplia para el trabajo con muestras reales. La cromatografía a polaridad de fases invertidas también es más apropiada para su acoplamiento con los procedimientos de limpieza o preconcentración en línea (Shoup y Mayer, 1982). Comúnmente se emplea la detección ultravioleta (UV) puesto que los fenoles tienen absorción fuerte en 2 bandas centradas alrededor de 230 y 289 nm. Sin embargo, puesto que la mayoría de los fenoles son electroquímicamente reactivos (Kissinger et al., 1980), la cromatografía de líquidos acoplada a un sistema de detección electroquímico ofrece otra excelente alternativa para el análisis de fenoles, debido a la alta sensibilidad y selectividad de este tipo de sistemas de detección.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia, a pesar de no ser tan popular como la cromatografía de gases, ofrece un gran potencial para el análisis de fenoles por varias razones. Por una parte, debido a que la fase móvil es un líquido, se pueden interconectar otras técnicas tanto antes como después de que la separación se ha realizado. Esto permite analizar una gran variedad de matrices o muestras además de que ayuda a disminuir los límites de detección de los solutos analizados. Por otra parte, el análisis de fenoles por HPLC tiene la ventaja adicional de poderse efectuar sin necesidad de etapas de derivación de los solutos.

Ogan y Katz (1981) han usado cromatografía de líquidos en fase reversa para analizar la separación de alquil fenoles empleando detección por fluorescencia y UV. Ellos encontraron que el orden de elución de 19 alquil fenoles crece a medida que aumenta el número de átomos de carbono del sustituyente alquilo. Adicionalmente establecieron que la intensidad de la fluorescencia no está influenciada de manera importante por la longitud de la cadena alquilada.

Empleando el método de los mapas de resolución, (Gijch et al., 1980), Ong et al., (1989) han optimizado la separación isocrática de los once fenoles considerados como contaminantes prioritarios por la EPA. La separación optimizada implica el uso de una columna analítica Partisil-5 ODS-3 ( $dp = 5 \mu\text{m}$ ) de 10 cm x 4.6 mm (di), detección UV a 280 nm, así como una fase móvil metanol-acetonitrilo-agua 32.2:25.2:42.6, (% volumen). Bajo estas condiciones el compuesto menos retenido, el 2,4-dinitrofenol, eluye en 0.9 minutos en tanto que la separación completa de los once solutos requiere de menos de 9 minutos.

En otro método de análisis, empleando una columna analítica Spherisorb ODS2 ( $dp = 5 \mu\text{m}$ ) de 25 cm x 4.6 mm (di), y detección UV a 280 nm. Busto et al., (1987) han predicho la mejor composición de la fase móvil para la separación isocrática de fenol junto con otros 10 alquil y clorofenoles. La fase móvil mencionada está constituida por: metanol-acetonitrilo-

tetrahidrofurano-agua 28.7:4.0:3.8:63.5 (% volumen). Bajo las condiciones de separación mencionadas la resolución entre todos los picos adyacentes es mayor de 2, el compuesto menos retenido, el fenol, eluye a los 4.7 minutos mientras que el compuesto más retenido, el 2,4,6-triclorofenol, eluye a los 49 minutos.

El análisis y separación de fenoles por cromatografía de líquidos a polaridad de fases invertidas se puede efectuar tanto en condiciones isocráticas como mediante un gradiente de elución, sin embargo también es posible efectuar dicha separación empleando una variación programada en la velocidad de flujo de la fase móvil. Esta técnica se ha utilizado (Hagen et al., 1991) para la determinación de fenoles, alquilfenoles, hidroxifenoles y clorofenoles en agua de río.

Algunos otros métodos propuestos para el análisis de compuestos fenólicos en diversos tipos de aguas, en los que además se incorpora una etapa de extracción en fase sólida para realizar la preconcentración de los fenoles presentes en la muestra o bien una limpieza preliminar de ésta, se resumen en la tabla 1.3

El creciente interés por el monitoreo de contaminantes fenólicos en agua ha conducido recientemente al desarrollo de nuevos métodos y materiales para la extracción y análisis de dichos contaminantes.

Zhang (1990) ha desarrollado un método de permeación para la determinación de contaminantes fenólicos en agua. Los fenoles presentes en la muestra se permean a través de una membrana de policarbonato de silicón, con un espesor de 0.025 mm, y son colectados sobre un adsorbente. La desorción de los fenoles puede efectuarse empleando disolventes o bien un procedimiento de desorción térmica. En el primer caso los compuestos fenólicos se concentran sobre un soporte de polimetacrilato (XAD7) y la desorción se efectúa empleando un aparato de extracción soxhlet y disolventes como metanol, acetonitrilo o acetona. Para la desorción térmica la concentración de los fenoles se efectúa sobre un polímero de óxido de 2,6-difenil-p-fenileno (TENAX-TA). La separación y cuantificación se efectúa empleando cromatografía de gases empleando una columna capilar (SPB-5) y un detector de ionización de llama. A través de la desorción térmica todos los solutos concentrados son transferidos directamente hacia el cromatógrafo para su análisis, sin un factor de dilución por efecto de disolventes. Sin embargo, existe la posibilidad de sobrecargar la columna analítica cuando se analizan muestras con altas concentraciones de fenoles. Por otra parte, cuando se permean muestras acuosas una cantidad importante de vapor de agua puede pasar a través de la membrana y afectar la eficiencia del adsorbente o extinguir la llama del detector. En términos generales la desorción térmica se aplica para la determinación de compuestos fenólicos a concentraciones del orden de  $\mu\text{g/L}$ , mientras que la desorción con disolventes se aplica para al análisis de concentraciones del orden de  $\text{mg/L}$ .

Recientemente ha sido introducida (Hagen et al., 1990) una nueva familia de materiales para la extracción en fase sólida de compuestos orgánicos. Estos materiales son membranas o discos fibrilares de politetrafluoroetileno (PTFE) impregnadas con pequeñas partículas (8  $\mu\text{m}$ )

de materiales adsorbentes. Schmidt et al.,(1993) han reportado el uso de dichas membranas impregnadas con partículas de poliestireno-divinilbenceno (PS-DVB) o acetil-PS-DVB para la extracción en fase sólida de fenoles a concentraciones del orden de ppm a partir de muestras de agua de río. Las membranas usadas tienen un diámetro de 47 mm y un espesor de 0.5 mm y se colocan en un aparato de extracción Millipore. Empleando seis membranas superpuestas, impregnadas con PS-DVB el fenol alcanza una recuperación del 36% y el 3-nitrofenol una recuperación del 57%. Empleando las membranas acetil-PS-DVB los rendimientos se incrementan a 96 y 73 % respectivamente. Desafortunadamente, los fenoles concentrados se deben desorber por elución con disolventes orgánicos (THF o metanol), lo cual da origen a inconvenientes como los indicados en la sección 1.1. El extracto final se analiza por HPLC a polaridad de fases invertidas.

El-Shahawi et al., (1994) han empleado espumas de poliuretano, tratadas con tributilfosfato para la preconcentración de algunos fenoles a partir de agua. Estos materiales se empaquetan en columnas de vidrio de 12 cm x 10 mm (di) a través de las cuales se hacen circular muestras de entre 100 y 3000 ml, a flujos de 5 a 10 ml/min. Las recuperaciones reportadas para los fenoles extraídos varían entre 93 y 102 %. Sin embargo, la desorción de los solutos debe efectuarse con 100 ml de acetona en un extractor soxhlet.

Buchholz y Pawliszyn (1994) han desarrollado el uso de fibras de sílice fundida, recubiertas con una película de 95 µm de espesor de un adsorbente de poliacrilato para extraer compuestos fenólicos presentes en muestras de agua. Después de la extracción, mediante la ayuda de una microjeringa, las fibras se transfieren directamente hacia el inyector de un cromatógrafo de gases en donde los fenoles se desorben térmicamente y subsecuentemente se separan y cuantifican. Este método elimina totalmente el uso de disolvente y es capaz de alcanzar límites de detección hasta de 0.1 µg/L. Sin embargo, las fibras de poliacrilato necesitan ser acondicionadas antes de su uso bajo una corriente de helio, a 350 °C, durante un tiempo de 4 a 5 horas. Por otra parte, los fenoles tienen la capacidad de formar enlaces por puentes de hidrógeno con la fase estacionaria de la columna (PTE-5, 0.25 mm d.i., 0.25 µm de espesor de película) lo cual resulta en un "coleo" de los picos, lo que dificulta su integración. Para resolver este problema es necesario formar derivados menos polares de los fenoles presentes en la muestra. Los derivados elegidos para optimizar la separación son los acetatos correspondientes, sin embargo algunos compuestos como el 2,4-dinitrofenol y el 2-metil-2,4-dinitrofenol no parecen experimentar la reacción de derivación. Para otros compuestos fenólicos el rendimiento de la reacción de derivación varía entre 85 y 100%.

Tabla 1.3. Aplicación de la extracción en fase sólida a la concentración y análisis, por cromatografía de líquidos, de compuestos fenólicos en agua.

COMPUESTOS ESTUDIADOS	NATURALEZA DEL AGUA ANALIZADA	NATURALEZA DEL ADSORBENTE Y DIMENSIONES DE LA FASE COLUMENA.	(%) R <sup>(1)</sup>	DETECCIÓN	LDM <sup>(2)</sup>	REFERENCIA
•Triclorofenoles (TF). •Tetraclorofenol (TCP). •Pentaclorofenol (PCF).	Agua de lago. Concentración EN LÍNEA de 50-250 ml de muestra	Fase reversa C18 (Lidrosorb RP18), dp = 5 µm. 2.2 x 4.6 mm di.	TP = 57 TCP = 103 PCF = 108 (20-50 µg/L)	UV a 220 nm.	2.5-750 ng	Werkhoven-Goevic, et al., 1981.
•Pentaclorofenol	Agua potable. Concentración EN LÍNEA de 20 ml de muestra	Fase Reversa C18, dp = 5 µm. Cartucho comercial 30 x 4.6 mm.	—	Electroquímica (0.9 V vs Ag/AgCl referencia).	2.4 ng	Shoup y Mayor, 1982
•Mono y Di-clorofenoles.	Agua de río. Concentración EN LÍNEA de 30 ml de muestra.	Copolímero PRP dp = 10 µm 2.2 x 4.6 mm di.	100 ± 4 (5-70 µg/L)	Reacción fotoquímica-Fluorescencia (271 nm excitación y 290 nm emisión)	1-50 ng.	Werkhoven-Goevic, et al., 1982.
•Fenol	Agua pura fortificada. Concentración EN DIFERIDO de menos de 200 µL.	Intercambiador aniónico AV-02, dp = 15-30 µm. 15 mm x 0.25 mm di	103 (100-300 µg/L)	UV 270 nm.	2 ng	Zhong Pei et al., 1982
•Cresoles (Cr). •Monocloro fenoles (CF). •Alquil Fenoles (AF)	Agua pura fortificada. Concentración EN DIFERIDO de menos de 200 µL.	Amberlita XAD2. dp = 10-13 µm. 15 mm x 0.25 mm di	Cr = 83 CF = 103 AF = 88 (100-300 µg/L)	UV 270 nm.	2 ng	Zhong Pei et al., 1982
•Clorofenoles	Agua pura fortificada. Concentración EN LÍNEA de 50-250 ml de muestra.	Copolímero PRP. dp = 10 µm 50 x 4.2 mm di.	70-90 (9 µg/L)	UV 254 nm.	—	Smith y Pietrzyk, 1983.
•Mono y Di-clorofenoles.	Agua potable y de río. Extracción Líq-Liq de 500 ml de muestra y Concentración en LÍNEA de alícuota de 50 ml o menos.	Copolímero PRP, dp = 10 µm. 11 x 5.5 mm di.	70-90 (2 µg/L)	Electroquímica (1V vs Ag/AgCl referencia).	50 ng	Trippel et al., 1985.



Tabla 1.3. (continuación). Aplicación de la extracción en fase sólida a la concentración y análisis, por cromatografía de líquidos, de compuestos fenólicos en agua.

COMPUESTOS ESTUDIADOS	NATURALEZA DEL AGUA ANALIZADA	NATURALEZA DEL ADSORBENTE Y DIMENSIONES DE LA PRECOLUMNA.	(%) R <sup>(1)</sup>	DETECCIÓN	LDM <sup>(2)</sup>	REFERENCIA
• Fenol (F) • Nitrofenoles (NFs) • Clorofenoles (CFs) • Alquilfenoles (AFs)	Agua de río. Concentración EN DIFERIDO de 150 ml de muestra	Carbón grafitizado, dp = 60-100 µm. 60 x 10 mm di (250 mg)	F: 82 NFs: 97 CFs: 98 AFs: 98 (5 µg/L)	UV a 280 nm.	Fl: 38 ng NFs = CFs = AFs =, 6 ng.	Borra et al., 1986.
• Alquilfenoles	Efluente de refinería. La muestra se destila y se concentran EN DIFERIDO 5 ml. de ésta	Fase reversa C18. Cartuchos Sep Pak C18. 9 x 9 mm.	>90% (25-250 µg/L)	Electroquímica (0.95 V vs Ag/AgCl referencia).	—	Cardwell et al., 1986
• Fenol	Agua de río, concentración EN LÍNEA de 5 ml de muestra	Copolímero PRP, dp = 10 µm, EN LÍNEA con Intercambiador aniónico Aminex A-28, dp = 11 µm PRP = 20 x 4.6 mm di Aminex = 10 x 3 mm di	89.5 (0.4 µg/L) 86.7 (4.0 µg/L)	Fluorescencia (271 nm excitación y 297 nm emisión).	0.05 ng	Nielen et al., 1986
• Fenol • Clorofenoles	Agua de río. Concentración EN DIFERIDO de 100 ml de muestra	Copolímero PRP, dp = 5 µm. 150 X 4.6 mm (di).	102.4 (0.5 µg/L)	Electroquímico (electrodo dual)	3.4 ng	Rennie y Mitchell, 1987.
• Mono y Di hidroxifenoles	Agua potable. Concentración EN LÍNEA de 50 ml de muestra	Carbón poroso grafitizado. dp = 7 µm. 27 x 4.6 mm di.	52.94 (10 µg/L)	Electroquímica (0.85 V vs Ag/AgCl referencia).	5 ng	Coquart y Hannon, 1992.
• Fenol	Agua de río. Concentración EN LÍNEA de 1 ml de muestra	Fase reversa Shepares C18. dp = 5 µm. 30 x 3.2 mm di	—	Electroquímica (1.1 V vs calomel referencia).	0.03 ng	Lebotay et al., 1993.
• Craoles (Cr) • Clorofenoles (CFs) • Nitrofenoles (NFs) • Alquilfenoles (AFs)	Agua potable, concentración EN DIFERIDO de 2L de muestra, sobre cartucho de carbón, conectado en serie con el intercambiador aniónico, seguido de evaporación del extracto obtenido	Cartucho de extracción empacado con 300 mg de Carbón negro grafitizado conectado en serie con intercambiador aniónico (SAX) dp = 40-120 µm. SAX = 60 x 5 mm di (50 mg).	Cr = 87 CFs = 95 NFs = 96 AFs = 97 (0.5 a 2 µg/L)	UV a 230 y 280 nm.	30 ng	Di Corcia et al., 1993.

<sup>(1)</sup> (%) R = porcentaje de recuperación. <sup>(2)</sup> LDM = Límite de detección.

# Capítulo 2.

## **DESARROLLO EXPERIMENTAL.**

En años recientes se han desarrollado un gran número de métodos cromatográficos que involucran técnicas de preconcentración en línea para la determinación de fenoles en aguas. Sin embargo, muchos de los métodos reportados hasta ahora no incluyen al fenol mismo o si lo incluyen, su recuperación es a menudo baja y/o su límite de detección es alto. Por lo que se requiere de métodos selectivos que permitan efectuar el análisis simultáneo del fenol y otros de sus derivados en presencia de contaminantes iónicos y no polares.

A continuación se describe el procedimiento de extracción en fase sólida y análisis en línea desarrollado en este trabajo, que permite efectuar el análisis simultáneo de fenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2-clorofenol y 2-nitrofenol en muestras de agua potable y de manantial o río, superficiales.

A grandes rasgos, el procedimiento consiste en efectuar la preconcentración de los fenoles mencionados sobre una precolumna, relativamente larga, empacada con una resina polimérica estireno-divinilbenceno (precolumna PRP). Después de la remoción de los compuestos inorgánicos, a través de una elución con un pequeño volumen de agua los fenoles concentrados en esta precolumna son transferidos en línea hacia una segunda precolumna de concentración, de dimensiones más pequeñas, empacada con un intercambiador de aniones base fuerte (precolumna aniónica). Esta segunda precolumna permite efectuar una compresión de la

muestra de fenoles desorbidos de la precolumna estireno-divinilbenceno y a la vez facilita la eliminación de los solutos no ionizables concentrados en dicha precolumna. Finalmente, los fenoles concentrados sobre el intercambiador de aniones, en forma de iones fenolato, son transformados a su forma molecular y transferidos en línea hacia una columna analítica C18 en donde se efectúa su separación. La detección de los poluto separados se realiza empleando un detector UV.

## 2.1 EQUIPOS Y ACCESORIOS.

El sistema cromatográfico empleado está constituido por el siguiente equipo y accesorios:

- Cromatógrafo de líquidos Varian 5000 con capacidad para gradiente de elución binario. Este equipo, utilizado en el modo isocrático en el presente trabajo será nombrado en lo sucesivo "bomba A".
- Inyector de rizo Rheodyne 7125 con rizo de 20  $\mu$ l (nominal)
- Columna de acero inoxidable de 150 x 4.6 mm (d.i.), empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5  $\mu$ m de diámetro de partícula (Phase Separations).
- Detector espectrofotométrico UV-Visible de longitud de onda variable (Varian UV-100).
- Integrador Hewlett Packard (HP 3396A)

El sistema de tratamiento de la muestra, acoplado en línea con el sistema cromatográfico fue intercalado entre el inyector y la columna analítica. Este sistema (figura 2.4, sección 2.4) consta de:

- ♦ Bomba isocrática (Beckman 210A). Esta bomba será denominada en lo sucesivo "bomba B".
- ♦ Dos válvulas (I y II) de conmutación de seis puertas (Rheodyne 7000) y una válvula (III) de inyección (Rheodyne 7125) montadas sobre un soporte metálico perforado *ad hoc*. La válvula II se encuentra conectada al inyector del sistema cromatográfico (puerta 2), a la válvula de conmutación I (puertas 3 y 5), a la bomba B (puerta 6) y a la precolumna PRP (puertas 1 y 4). Por otra parte, la válvula I está unida a la válvula II (puertas 2 y 6), a la columna analítica del sistema cromatográfico (puerta 3), a la precolumna aniónica (puertas 1 y 4) y a una salida de desecho (puerta 5)

Otros equipos y/o accesorios adicionales utilizados son los siguientes:

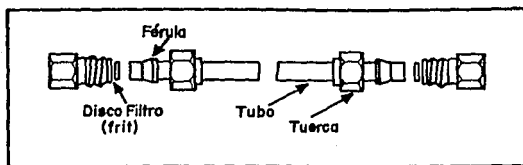
- Purificador y desionizador de agua NANO pure (Barnsted modelo 04747).
- Baño de Ultrasonido para desgasificar disoluciones y fases móviles (Sonicor, modelo SC-100).
- Micropipeta de volumen variable de 50 a 200 µl (Scorex, modelo 811/821).
- Sistema para empaçado de columnas a alta presión (Haskel, modelo DST-100C).
- pH Metro (Corning, modelo 220) equipado con un electrodo combinado vidrio calomel (Cole-Parmer, modelo 60648).
- Sistema de filtración de vidrio (Millipore, modelo OM027).

### 2.1.1 PRECOLUMNAS DE CONCENTRACIÓN.

Para la optimización del método de análisis se emplearon precolumnas de concentración de diversos tamaños, empaçadas con diversos soportes. Todas ellas estuvieron construidas de acero inoxidable. En la figura 2.1 se presenta el diseño de las precolumnas de concentración empleadas en este trabajo. En la tabla 2.1 se indican sus dimensiones, así como los adsorbentes de empaque utilizados.

La precolumna de 150 x 4,6 mm (d.i.) fue una columna empaçada comercialmente (Hamilton, PRP1). La precolumna de 30 x 4,6 mm (d.i.) fue construida en el laboratorio a partir de un tubo de acero inoxidable y conexiones terminales de volumen muerto pequeño, disponibles comercialmente. Finalmente, todas las precolumnas de 20 x 2 mm (d.i.) fueron obtenidas comercialmente (Upchurch Scientific, Modelo C-130B).

Con excepción de la precolumna de 150 x 4,6 mm, el resto de las precolumnas reportadas en la tabla 2.1 se empaçaron en el laboratorio mediante el dispositivo mostrado en la figura 2.2. Este dispositivo permite empaçar las precolumnas a presiones relativamente grandes lo cual genera un empaçado homogéneo y compacto.



**Figura 2.1.** Diseño de las precolumnas empleadas en este trabajo para la concentración en fase sólida de los fenoles.

**Tabla 2.1.** dimensiones y empaques de las precolumnas de concentración empleadas en la optimización del método de análisis de fenoles.

DIMENSIONES DE LA PRECOLUMNNA	NATURALEZA DEL ADSORBENTE	DIÁMETRO DE PARTÍCULA	PROCEDENCIA COMERCIAL DEL ADSORBENTE
20 x 2 mm	Fase reversa químicamente enlazada, C18	5 $\mu\text{m}$	Phase Sep Ltd.
20 x 2 mm	Copolímero estireno-divinilbenceno	10 $\mu\text{m}$	Mitsubishi Chemical Industries
30 x 4.6 mm	Copolímero estireno-divinilbenceno	10 $\mu\text{m}$	Mitsubishi Chemical Industries
150 x 4.6 mm	Copolímero estireno-divinilbenceno	10 $\mu\text{m}$	Hamilton Co.
20 x 2 mm	Resina intercambiadora de aniones base fuerte	10 $\mu\text{m}$	Hamilton Co.

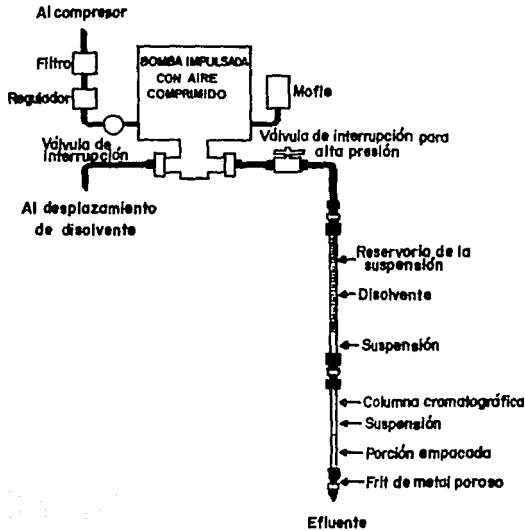


Figura 2.2. Dispositivo empleado para empacar las precolumnas de concentración.

La metodología para el empacado consiste en preparar inicialmente una suspensión estable de la fase estacionaria deseada. En el caso de la precolumna empacada con la fase reversa químicamente enlazada C18, la suspensión se preparó empleando como disolvente una mezcla

## Capítulo 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

tetracloruro de carbono-etanol 50:50 (v/v), para el caso del copolímero estireno-divinilbenceno el disolvente empleado fue metanol y en el caso de la resina intercambiadora de aniones se empleó una mezcla metanol-agua (hidróxido de sodio pH = 11.5), 80:20 (v/v). En todos los casos la concentración del soporte sólido en la suspensión fue de alrededor de 30 % en peso.

Una vez preparada la suspensión, ésta se colocó en un baño de ultrasonido por aproximadamente 2 minutos con el fin de remover los gases ocluidos dentro de la estructura del empaque, así como para dispersar los aglomerados de soporte formados. Simultáneamente se desgasificaron alrededor de 20 ml del disolvente empleado para efectuar la suspensión de la fase estacionaria. La precolumna a empacar se llenó con este disolvente y se conectó al reservorio de suspensión. Entonces, la suspensión de la fase estacionaria se vertió rápidamente en el reservorio y éste se conectó al sistema de presión. Una vez efectuada la conexión, la presión en el sistema se incrementó hasta alcanzar alrededor de 3000 lbs/pulg<sup>2</sup>; esto permite que la fase estacionaria se transfiera hacia la precolumna, empacándose homogéneamente. Después de transcurrido un tiempo de alrededor de cinco minutos la bomba se detuvo y cuando el sistema se despresurizó completamente la precolumna se desconectó. Finalmente el exceso de empaque depositado en la parte superior de la precolumna se retiró cuidadosamente con la ayuda de una navaja de afeitar. Una vez realizada esta operación, la precolumna se cierra y se somete a un proceso de lavado con el fin de eliminar las impurezas contenidas en el material de empaque.

Tanto la precolumna empacada con la fase reversa químicamente enlazada C18 (precolumna C18), como las precolumnas empacadas con el copolímero estireno-divinilbenceno (precolumnas PRP) se lavaron circulando a través de ellas alrededor de 40 ml de una fase móvil metanol-agua 80:20 (v/v). Después de terminado este proceso, cada precolumna se lavó con 50 ml de agua desionizada. Al concluir estas operaciones las precolumnas estuvieron listas para ser empleadas en los estudios de preconcentración de los fenoles contenidos en las muestras acuosas.

Se ha observado (Jahangir y Samuelson, 1980) que la capacidad de los polímeros porosos estireno-divinilbenceno para adsorber compuestos aromáticos a partir de disoluciones acuosas disminuye con el uso prolongado de dichos polímeros, debido a la contracción de éstos, sin embargo la capacidad del polímero se puede restaurar por tratamiento con disoluciones acuosas de alcoholes. Con el fin de prevenir este fenómeno de las precolumnas PRP empleadas en este trabajo se activaron regularmente (por lo general después de efectuar alrededor de 10 experimentos de preconcentración) empleando una fase móvil metanol-agua 80:20 (v/v).

En el caso de la precoluma aniónica el proceso de limpieza y activación de esta implicó las siguientes etapas:

1. Lavado con 20 ml de agua,
2. Lavado con 40 ml de una fase móvil metanol-agua 80:20 (v/v),
3. Lavado con 20 ml de agua,

4. Lavado con 50 ml de una disolución acuosa de NaOH ( $\text{pH} = 12.5$ ),
5. Lavado con 40 ml de agua.

Una vez concluidas estas operaciones de lavado la precolumna aniónica estuvo lista para emplearse en los estudios de preconcentración y análisis en línea.

Los procesos de lavado y activación de los soportes se efectuaron con las precolumnas colocadas en las válvulas de conmutación (según el montaje que se describirá en la sección 2.4) utilizando la bomba B.

### **2.1.2 CALIBRACIÓN DEL RIZO DEL INYECTOR Y DE LAS PUNTAS DE LA MICROPIPETA.**

Para efectuar un cálculo exacto de la recuperación de los diversos fenoles estudiados en el proceso de extracción en fase sólida-análisis en línea, fue necesario conocer el volumen real del rizo del inyector ya que a través de dicho rizo se efectuó la inyección de las disoluciones de fenoles que sirvieron como referencia para establecer la cantidad de soluto recuperado en cada experimento. Así mismo, fue necesario calibrar las puntas de la micropipeta empleadas en la preparación de las disoluciones de fenoles estudiadas (una disolución conteniendo fenol, 2-nitrofenol, 2-clorofenol y 4-nitrofenol y otra disolución conteniendo únicamente 2,4-dinitrofenol) a fin de establecer con exactitud la concentración de éstas.

Ambas calibraciones se efectuaron a través de un proceso de valoración ácido-base. En dicho proceso se empleó una disolución de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) 5.6 N, previamente valorada con una disolución estandarizada de NaOH.

En la valoración del rizo, la disolución de  $\text{HClO}_4$  se inyectó dentro de éste mediante la ayuda de una microjeringa de 100  $\mu\text{l}$  (Hamilton, 80665). El volumen nominal del rizo era de 20  $\mu\text{l}$ , sin embargo, para asegurar que durante los experimentos de calibración dicho rizo se llenara totalmente, el volumen inyectado de disolución de  $\text{HClO}_4$  fue de 50  $\mu\text{l}$ . Una vez llenado el rizo con la disolución ésta se desalojó mediante la ayuda de un flujo de agua (proporcionado por la bomba del cromatógrafo Varian 5000, bomba A). El efluente se recogió en un matraz Erlenmeyer y se valoró con la disolución de NaOH previamente estandarizada. A partir del volumen de disolución de NaOH consumido en esta valoración se determinó el volumen real del rizo de la válvula de inyección.

Para la calibración de las puntas de la micropipeta se tomaron alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  de la disolución de  $\text{HClO}_4$  5.6 N con dichas puntas. Cada alícuota se colocó en un matraz Erlenmeyer al cual se agregó un volumen adicional de 10 ml de agua desionizada. La disolución resultante se valoró con la disolución de NaOH estandarizada. En base al volumen de



disolución de NaOH consumido en la valoración se determinó el volumen real de las puntas de la micropipeta.

Tanto en el caso del rizo como en el de las puntas, las calibraciones se efectuaron realizando al menos seis valoraciones de las alícuotas de disolución de HClO<sub>4</sub> correspondientes.

## 2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.

El acetonitrilo y el metanol empleados en este trabajo fueron grado HPLC (pureza mínima de 99.8%) obtenidos de Prolabo.

Las muestras de todos los fenoles empleados fueron suministradas por Chem Service Co. La pureza de cada uno de estos compuestos se indica en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Pureza de los fenoles empleados en este trabajo.

SOLUTO	PUREZA
Fenol	99 %
4-Nitrofenol	99 %
2,4-Dinitrofenol	98 % + (10-15 % agua)
2-Clorofenol	99 %
2-Nitrofenol	99 %
4-Cloro-3-metilfenol	99 %
2,4-Dimetilfenol	96,5 %
2,4-Diclorofenol	99 %
2,4,6-Triclorofenol	98 %
4,6-Dinitro-2-metilfenol	99 %
Pentaclorofenol	99 %

La pureza, así como la procedencia de otros reactivos empleados en este trabajo se presenta en la tabla 2.3.

Tabla 2.3. Pureza y procedencia de los reactivos utilizados.

REACTIVO	CARACTERÍSTICAS Y PROCEDENCIA
Ácido perclórico	Reactivo analítico, 70-72 %. <i>Aldrich Chemical Co.</i>
Ácido fórmico	98 % mínimo. <i>Merck, Co.</i>
Ácido acético glacial	99.8 % mínimo <i>Merck, Co.</i>
Hidróxido de antonio	Disolución al 28-30 %. <i>J. T. Baker.</i>
Hidróxido de sodio	98 %, Bajo en contenido de carbonatos (0.4 % como carbonato de sodio). <i>Merck, Co.</i>

Tanto los fenoles como el resto de los reactivos empleados se usaron tal y como se recibieron del proveedor, sin someterlos a ninguna purificación adicional.

Todas las fases móviles y disoluciones acuosas empleadas en este trabajo se prepararon con agua desionizada obtenida de un sistema purificador NANOpure. Con el fin de eliminar el aire presente en el seno de las fases móviles, éstas se desgasificaron en un baño de ultrasonido durante 10 minutos antes de usarse.

### 2.2.1 DISOLUCIONES PATRÓN DE FENOLES.

Para los diversos estudios de preconcentración y análisis cromatográfico se prepararon disoluciones patrón, de cada uno de los fenoles indicados en la tabla 2.2.

La concentración de cada disolución patrón fue de 1 mg/ml del fenol correspondiente en metanol. Se utilizó este disolvente porque se ha reportado (Galceran y Santos, 1989) que las disoluciones concentradas de fenoles en metanol son estables por periodos de tiempo relativamente largos (entre cuatro y seis meses).

Las disoluciones patrón se emplearon para preparar las disoluciones acuosas menos concentradas (disoluciones de trabajo). La toma de alícuotas de las disoluciones patrón se efectuó con la ayuda de una micropipeta de volumen variable.

Tanto las disoluciones patrón como las disoluciones de trabajo de los fenoles estudiados se mantuvieron en refrigeración. Estas últimas contenían menos de 0.5 % de metanol.

### 2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ÁCIDAS Y BÁSICAS.

Las disoluciones de ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ), fórmico ( $\text{HCOOH}$ ) y acético ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) empleadas en este trabajo se prepararon a partir de disoluciones 1M de cada ácido, filtradas sobre filtros de membrana de Nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, AFO-0504). Las disoluciones 1 M de los ácidos mencionados se prepararon a partir de los reactivos indicados en la tabla 2.3.

Todas las disoluciones de hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) empleadas en este estudio se prepararon a partir de la disolución de  $\text{NH}_4\text{OH}$  indicada en la tabla 2.3

En el caso de la preparación de las disoluciones de hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) fue necesario efectuar algunas consideraciones especiales.

Las lentejas de hidróxido de sodio contienen generalmente entre 1 y 2% de carbonato de sodio. Por otra parte, las disoluciones acuosas de bases fuertes, tales como el  $\text{NaOH}$ , pueden absorber dióxido de carbono del aire. Cuando el tiempo de exposición de dichas disoluciones al aire atmosférico es corto, la formación de carbonatos en el seno de estas disoluciones es mínima. Sin embargo, bajo una exposición prolongada, la concentración de bicarbonato puede incrementarse apreciablemente

Para el caso de los estudios de preconcentración de solutos con intercambiadores aniónicos, que involucran el uso de disoluciones acuosas de hidróxido de sodio, la presencia de iones carbonato en dichas disoluciones puede llegar a provocar fenómenos indeseables. Por una parte, la mayoría de las resinas de intercambio aniónico tienen una afinidad más grande por los iones carbonato que por los iones  $\text{OH}^-$ , lo cual provoca que al usar disoluciones con una concentración alta de carbonatos, con el paso del tiempo, la precolumna de intercambio aniónico se convierta completamente a la forma carbonato dificultándose su regeneración. Por otra parte, los iones carbonato también pueden competir de una manera importante con los solutos aniónicos de interés por los sitios activos del intercambiador, este fenómeno es particularmente desventajoso en los procesos de preconcentración en fase sólida ya que los volúmenes de fuga de los solutos de interés pueden disminuir apreciablemente.

Lo anterior sugiere que para los estudios de preconcentración en línea que involucran el uso de resinas de intercambio aniónico es recomendable emplear disoluciones de  $\text{NaOH}$  con bajo contenido de carbonatos.

Por ello, todas las disoluciones acuosas de hidróxido de sodio empleadas en este trabajo se prepararon con  $\text{NaOH}$  de bajo contenido en carbonatos (0.4% como  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Las

disoluciones se prepararon justo antes de iniciar cada experimento usando una disolución saturada, también recién preparada, de hidróxido de sodio. Se empleó esta disolución saturada ya que el  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  es relativamente insoluble en disoluciones concentradas de NaOH en las cuales generalmente suele depositarse en forma de un precipitado blanco. Por esta razón, para la preparación de las disoluciones de trabajo de NaOH siempre se empleó la porción líquida superior de la disolución saturada. El tiempo transcurrido desde la preparación de la disolución saturada de hidróxido de sodio hasta el paso de la disolución de trabajo por la columna intercambiadora de aniones fue siempre menor a 1 hora.

En los casos en los que se requería preparar disoluciones de NaOH con concentraciones aun más bajas de carbonatos se utilizó el procedimiento alternativo siguiente:

1. Las lentejas de hidróxido de sodio empleadas para la preparación de la disolución saturada se lavaron rápidamente en agua desionizada, a fin de remover el carbonato formado en la superficie de éstas. El agua desionizada empleada fue hervida previamente a fin de eliminar el dióxido de carbono disuelto en ella.
2. Con el agua desionizada recién hervida y las lentejas de NaOH enjuagadas, se preparó, en un matraz Erlenmeyer de polietileno (Nalgene) la disolución saturada de NaOH. Una vez preparada esta disolución se introdujo en un desecador en donde se mantuvo en reposo por alrededor de 20 minutos. Esta operación se realizó con la finalidad de permitir la precipitación de los carbonatos insolubles.
3. Transcurrido el tiempo de reposo, la disolución saturada se sacó cuidadosamente del desecador. Entonces, empleando la porción líquida superior y agua desionizada recién hervida, se preparó rápidamente la disolución de trabajo de NaOH con el pH deseado. Esta disolución fue empleada inmediatamente para efectuar los experimentos de preconcentración o desorción de los fenoles en la columna aniónica.

El pH de todas las disoluciones empleadas en este trabajo se ajustó con el pHmetro indicado en la sección 2.1. El electrodo se calibró todos los días antes del ajuste del pH de cualquier disolución.

## **2.3 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS VOLÚMENES DE FUGA Y LOS VOLÚMENES DE DESORCIÓN DE LOS FENOLES.**

### **2.3.1 VOLÚMENES DE FUGA.**

La determinación experimental de los volúmenes de fuga de los fenoles sobre las diversas precolumnas se efectuó utilizando el montaje mostrado en la figura 2.3A.

De acuerdo con el diagrama de la figura 2.3, la precolumna a evaluar se conecta a una válvula de conmutación la cual a su vez se conecta con el detector UV.

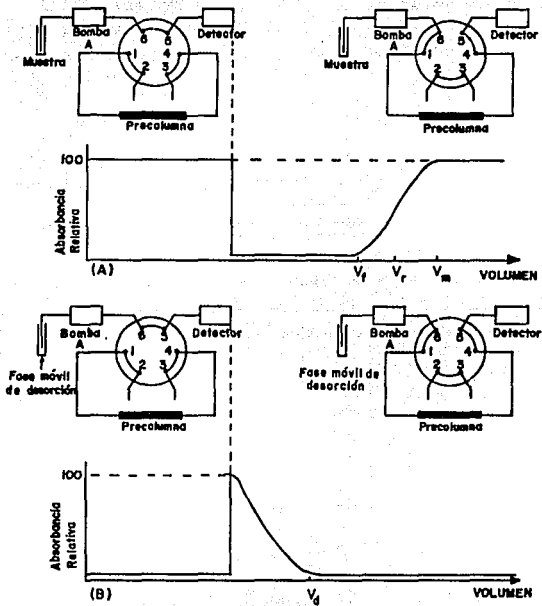
En la primera etapa del proceso (figura 2.3 A), una muestra de agua fortificada con el soluto se dirige hacia el detector en donde se registra su respuesta. Para cada soluto, esta respuesta representa un valor máximo, el cual depende de la longitud de onda del detector y es proporcional a la concentración del soluto en la muestra fortificada.

Cuando la muestra comienza a pasarse a través de la precolumna de concentración los solutos son extraídos por el adsorbente, por lo que al inicio de esta etapa su concentración en el efluente que emerge de la precolumna es nula. Sin embargo, a medida que se desarrolla el proceso de preconcentración, el soluto se distribuye a lo largo de la precolumna; cuando se alcanza un cierto volumen  $V_f$  de muestra percolada el soluto comienza a emerger de la precolumna y su concentración en el efluente se incrementa gradualmente hasta alcanzar una meseta que corresponde a la concentración del soluto en la muestra original.

El volumen de fuga,  $V_f$ , se define experimentalmente como el volumen percolado correspondiente a una absorbancia igual a un 1% de la absorbancia total de la muestra (Subra et al., 1988).

### **2.3.2 VOLÚMENES DE DESORCIÓN.**

Una vez determinados los volúmenes de fuga, los volúmenes de desorción de los solutos se determinaron como se indica en el diagrama de la figura 2.3B. Según el montaje presentado en esta figura, los solutos concentrados en la precolumna son desorbidos mediante una fase móvil apropiada. Esta desorción se traduce en un incremento brusco de la señal del detector seguida



**Figura 2.3.** Determinación del volumen de fuga y del volumen de desorción por análisis frontal.  $V_f$  = volumen de fuga,  $V_r$  = volumen de retención,  $V_m$  = volumen correspondiente a la cantidad máxima fijada,  $V_d$  = volumen de desorción.

seguida por una disminución paulatina de tipo exponencial. Para los fines de este trabajo se definió al volumen de desorción,  $V_d$ , como el volumen al cual prácticamente todo el soluto concentrado se ha desorbido de la precolumna. De la misma manera que el volumen de fuga  $V_f$ , el volumen de desorción,  $V_d$ , se determinó a un valor de 1% de la absorbancia total de la muestra.

## **2.4 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE LOS FENOLES.**

El dispositivo para la preconcentración de los fenoles, así como para su subsecuente desorción y análisis en línea se presenta en la figura 2.4.

En el dispositivo presentado en la figura 2.4, las válvulas **I** y **II** son dos válvulas de conmutación; la válvula **III** es una válvula de inyección adaptada con un rizo,  $R$ , de volumen constante. Las conexiones del dispositivo están realizadas con tubo capilar (0.01 pulgadas de diámetro interno) de acero inoxidable o de polímero Peek®. Todos los conectores son de polímero Peek®.

En la figura 2.4 A las válvulas de conmutación **I** y **II** se encuentran en la posición "CARGA", con respecto al flujo de la bomba A. La válvula de inyección (**III**) también se encuentra en la posición de CARGA.

En la figura 2.4 B las válvulas de conmutación **I** y **II** se encuentran en la posición "INYECCIÓN", con respecto al flujo de la bomba A. La válvula de inyección (**III**) también se encuentra en la posición de INYECCIÓN.

Las combinaciones de posiciones de las válvulas mostradas en la figura 2.4 no se utilizaron nunca durante el proceso experimental. Simplemente sirven para ilustrar claramente las posibles direcciones de los flujos provenientes de las bombas A y B.

La precolumna adaptada a la válvula de conmutación **I** es la precolumna aniónica de 20 x 2 mm (di). La precolumna de concentración adaptada a la válvula de conmutación **II** es la precolumna PRP de 30 x 4.6 mm (di).

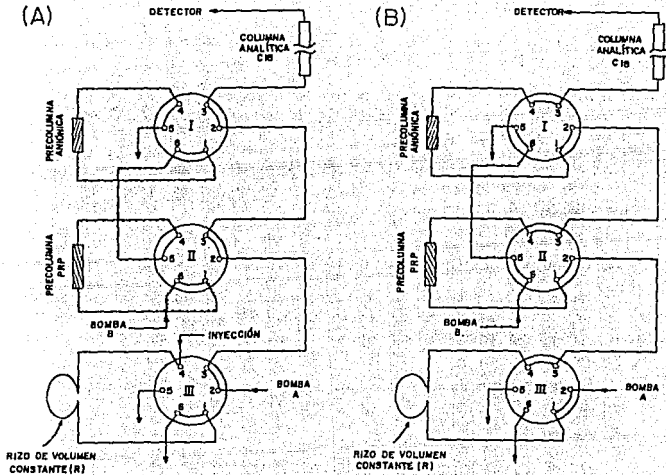


Figura 2.4. Diagrama esquemático del sistema de conmutación de válvulas empleado en este trabajo para la preconcentración en fase sólida y análisis en línea de fenoles presentes en muestras de agua.



*Capítulo 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL*

El procedimiento experimental del método de análisis desarrollado en este trabajo se describe a continuación:

1. Inicialmente la precolumna PRP se equilibra, mediante la bomba B, con 30 ml de ácido perclórico de pH = 2. Esta etapa se efectúa a un flujo de 3 ml/min.
2. Una vez equilibrada la precolumna PRP, se percolan a través de ésta 20 ml de la muestra acuosa de fenoles a estudiar (la cual se encuentra ajustada a un pH de 2). La preconcentración se efectúa a un flujo de 1 ml/min.
3. Después de que los solutos se han preconcentrado, la precolumna PRP se lava con 0.5 ml de agua, a un flujo de 0.1 ml/min.
4. La precolumna aniónica se equilibra con 30 ml de disolución de hidróxido de sodio ajustada a un pH de 11.5. Esta operación puede efectuarse a un flujo de 2.5 ml/min sin que se observe una caída de presión importante.
5. Una vez equilibrada la precolumna aniónica, parte de los fenoles preconcentrados en la precolumna PRP se desorben de ésta y se transfieren hacia la precolumna aniónica, empleando 3 ml de la disolución de hidróxido de sodio de pH = 11.5 y una velocidad de flujo de 1 ml/min.
6. La precolumna aniónica se lava con 0.5 ml de agua a una velocidad de flujo de 0.1 ml/min.
7. Una vez terminado el lavado, la precolumna aniónica se conecta en línea con la columna analítica C18 mediante la válvula de conmutación I. Los solutos concentrados se desorben de la precolumna aniónica para su separación y análisis mediante la fase móvil enviada por la bomba A.

Las condiciones para la desorción, separación y detección de los fenoles estudiados son las siguientes:

**Fase móvil:**

COMPONENTE	% VOLUMEN
Acetonitrilo	20
Fase A	80

FASE A: Disolución acuosa de ácido fórmico 0.05M + ácido perclórico 0.02M; ajustada a un pH = 3.5 con hidróxido de sodio.

**Condiciones del detector UV:**

Longitud de onda	270 nm
Sensibilidad	0.005 UA/mv
Constante de tiempo	0.5 seg.

**Flujo:** 1 ml/min.

- Una vez concluido el análisis de los fenoles desorbidos, se efectúa una inyección a través de la válvula III, manteniendo la precolumna aniónica en línea con la columna analítica. Se inyectan 20 µl de una disolución de fenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol y 2-nitrofenol con una concentración 100 veces mayor que la de la muestra fortificada empleada para efectuar la carga de 20 ml en la etapa 2. Esta inyección se realiza con el objeto de calcular los porcentajes de recuperación respectivos.
- Después la precolumna aniónica se lava con 10 ml de agua para eliminar el exceso de fase móvil y se equilibra con 30 ml de la disolución B, a una velocidad de flujo de 2.5 ml/min.

**Disolución B:**

COMPONENTE	% VOLUMEN
Acetonitrilo	10
Disolución de NaOH (pH = 11.5)	90

- La porción de los fenoles concentrados en la precolumna PR que no logró desorberse en la etapa 5 es desorbida ahora y enviada hacia la precolumna aniónica, empleando 10 ml de disolución B a una velocidad de flujo de 1 ml/min.
- La precolumna aniónica, con la segunda porción de fenoles, se lava con 0.5 ml de agua empleando un flujo de 0.1 ml/min.
- Al terminar el lavado de la precolumna aniónica, ésta se conecta nuevamente en línea con la columna analítica C18 y se efectúa la transferencia de los fenoles restantes empleando las mismas condiciones de desorción, separación y detección que en la etapa 7.

De manera simultánea a las operaciones de esta etapa la precolumna PRP se lava con 30 ml de agua.

## Capítulo 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

13. Después se efectúa una inyección de 20  $\mu$ l de una disolución de 2,4-dinitrofenol con una concentración 100 veces mayor que la de este soluto en la muestra fortificada empleada para la carga de 20 ml en la etapa 2. Esta inyección se realiza con el objeto de calcular el porcentaje de recuperación correspondiente.
14. La columna aniónica se lava con 30 ml de agua.
15. Finalmente las precolumnas PRP y aniónica se someten a un proceso de limpieza al final de cada análisis. Dicho proceso consistió en un lavado con 30 ml de una fase móvil que asegurara la eliminación de las posibles impurezas remanentes. La fase móvil empleada en el caso de la precolumna PRP fue una mezcla metanol-agua 50:50 (v/v). Para el caso de la precolumna aniónica la fase móvil fue una mezcla metanol agua (NaOH, pH = 11.5) 50:50 (v/v).

El tiempo requerido para efectuar el análisis de fenoles en muestras acuosas mediante el procedimiento experimental antes descrito es de aproximadamente 4 horas.

Al concluir la etapa 15 las dos precolumnas se encuentran regeneradas. Después de lavar ambas precolumnas con 20 ml de agua están listas para efectuar la preconcentración y análisis de una nueva muestra.

En la tabla 2.4 se presenta un resumen del método de análisis antes descrito. En esta tabla se indica además la posición que deben de guardar las válvulas de conmutación e inyección del dispositivo presentado en la figura 2.4 durante las diversas etapas del método.

Además del estudio de las muestras de agua pura fortificadas con fenoles, el método experimental antes descrito se aplicó también para al análisis de algunas muestras de agua potable, de río o de manantial.

Debido a la posible presencia en éstas de sales o sólidos en suspensión fue necesario efectuar un proceso de filtración antes de la preconcentración y análisis. Para esto se utilizó un filtro de membrana Nylon de 0.45  $\mu$ m (Phenomenex, AFO-0504) y un dispositivo de filtración Millipore.

Con la finalidad de establecer si el filtro de membrana empleado podía retener parte de los fenoles contenidos en las muestras analizadas, se realizaron algunos estudios con muestras de agua pura fortificadas con los fenoles de interés, las cuales fueron previamente filtradas empleando la membrana antes mencionada. Los resultados de recuperación de los solutos mostraron (sección 3.6) que las membranas no retienen a los fenoles.

Tabla 2.4. Resumen del método experimental para el análisis de fenoles en muestras acuosas.gh

ETAPA	OPERACIÓN	FLUJO (ml/min) Y BOMBA EMPLEADA	POSICIÓN DE LA VÁLVULA I (PRECOLUMNA ANIÓNICA)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA II (PRECOLUMNA PRP)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA III
1	PRP equilibrada con 30 ml de $\text{HClO}_4$ (pH = 2)	(3.0) Bomba B	Inyección	Carga	Inyección o Carga
2	Carga en PRP de 20 ml de disolución acuosa (pH = 2) de fenoles	(1.0) Bomba B	Inyección	Carga	Inyección o Carga
3	Lavado de la PRP con 0.5 ml de agua	(0.1) Bomba B	Inyección	Carga	Inyección o Carga
4	Aniónica equilibrada con 30 ml de $\text{NaOH}$ (pH = 11.5)	(2.5) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o Carga
5	Desorción de los fenoles en PRP hacia aniónica con 3 ml de $\text{NaOH}$ (pH = 11.5)	(1.0) Bomba B	Carga	Carga	Inyección o Carga
6	Lavado de la aniónica con 0.5 ml de agua	(0.1) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o Carga
7 <sup>[a]</sup>	Transferencia de fenoles concentrados en aniónica hacia Col. analítica C18	(1.0) Bomba A	Inyección	Carga	Inyección o carga
8	Inyección de alícuota de 20 $\mu\text{l}$ de disoln. patrón de 4 fenoles (P,2,4,6-DNF y 4NF)	(1.0) Bomba A	Inyección	Carga	Inyección
9	Lavado de la aniónica con 10 ml de agua.	(1.0) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o carga
	Aniónica equilibrada con 30 ml de disolución II	(2.3) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o carga
10	Transferencia de fenoles remanentes en PRP hacia aniónica con 10 ml de disolución II.	(1.0) Bomba B	Carga	Carga	Inyección o Carga
11	Lavado de la aniónica con 0.5 ml de agua.	(0.1) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o Carga
12 <sup>[b]</sup>	Transferencia de fenoles concentrados en aniónica hacia Col. analítica C18	(1.0) Bomba A	Inyección	Carga	Inyección o Carga
	Lavado de la PRP con 30 ml de agua	(3.0) Bomba B	Inyección	Carga	Inyección o Carga
13	Inyección de alícuota de 20 $\mu\text{l}$ de disoln. patrón de 2,4-DNF.	(1.0) Bomba A	Inyección	Carga	Inyección
14	Lavado de la aniónica con 30 ml de agua	(3.0) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o Carga
15	Lavado de la PRP con $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ 50:50 (v/v)	(1.5) Bomba B	Inyección	Carga	Inyección o carga
	Lavado de la aniónica con $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (pH = 11.5) 50:50 (v/v)	(1.5) Bomba B	Carga	Inyección	Inyección o carga

<sup>[a]</sup> Primera etapa de transferencia

<sup>[b]</sup> Segunda etapa de transferencia

# Capítulo 3.

## **RESULTADOS EXPERIMENTALES.**

### **3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE ANÁLISIS.**

El objetivo del método descrito en este trabajo fue el de desarrollar un procedimiento analítico que permitiera efectuar el análisis, en muestras de agua potable, de manantial o de río, de diversos compuestos fenólicos sujetos a regulación por la legislación ecológica mexicana.

La mayoría de los métodos reportado hasta ahora para el análisis de fenoles en muestras de agua no incluyen al fenol mismo o a los compuestos fenólicos de naturaleza hidrófila, y si los incluyen las recuperaciones alcanzadas son a menudo bajas y/o sus límites de detección son altos.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se desarrolló un método analítico que permite efectuar la determinación selectiva de fenoles de naturaleza hidrófila a concentraciones del orden de  $\mu\text{g/L}$  en muestras de agua reales, es decir, en la presencia de otros contaminantes de naturaleza apolar, moderadamente polar o iónica. Los fenoles considerados en este estudio fueron el fenol, el 4-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol.

### 3.1.1 SELECCIÓN DE LOS MATERIALES DE EMPAQUE Y LAS DIMENSIONES DE LAS PRECOLUMNAS PARA LA EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

El primer punto que se consideró para el desarrollo del método analítico presentado en este trabajo fue el relativo a su selectividad. Como se ha mencionado en el capítulo 1, dependiendo del origen de la muestra de agua ésta puede estar constituida por una gran variedad, en tamaño y naturaleza química, de compuestos orgánicos e inorgánicos (cuadro 1).

En función de lo anterior, el primer paso para el establecimiento del procedimiento analítico consistió en plantear una estrategia que permitiera eliminar las sustancias presentes en las muestras de agua que podían provocar interferencias durante el análisis de los fenoles de interés. El planteamiento de la estrategia mencionada se basó en las siguientes consideraciones:

Para la eliminación de los compuestos interferentes de naturaleza apolar o hidrófoba se consideró en principio el empleo de una precolumna empacada con una fase reversa C18 debido a la afinidad de este tipo de fases hacia dichos compuestos. Sin embargo, teniendo en cuenta que dentro de los diez compuestos fenólicos considerados por la legislación ecológica mexicana también se encuentran presentes compuestos de naturaleza altamente hidrófoba, tales como el pentaclorofenol o el 2,4,6-triclorofenol, se consideró importante evaluar la capacidad de adsorción de la fase C18 hacia este tipo de fenoles. Para efectuar lo anterior se determinaron los volúmenes de fuga de tres fenoles representativos en una precolumna de 20 x 2 mm (di) empacada con una fase reversa C18. Los tres fenoles considerados incluyeron al fenol y al 2-clorofenol como ejemplos de fenoles de naturaleza hidrófila, y al 2,4,6-triclorofenol como ejemplo de un fenol de naturaleza hidrófoba. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Volúmenes de fuga,  $V_f$ , determinados sobre una precolumna de 20 x 2 mm (di), empacada con una fase reversa C18 ( $d_p = 5 \mu m$ ).

SOLUTO	Relación metanol:fracción acuosa en la fase móvil (v/v)			
	1:99	5:95	10:90	15:85
	$V_f$ (ml)			
Fenol	0.9	0.6	---	0.4
2-Clorofenol	3.6	---	---	---
2,4,6-Triclorofenol	36.7	30.5	27.4	21.8

La fracción acuosa de la fase móvil estuvo constituida por un buffer de ácido acético/acetato de sodio, a un pH = 7.0. La concentración de los fenoles en la disolución de carga fue de 0.5 mg/L.

La tabla 3.1 muestra que el fenol prácticamente no es retenido por la fase reversa C18, aun en ausencia de metanol en la fase móvil de carga. En el caso del 2-clorofenol, a pesar de que éste muestra una mayor afinidad que el fenol hacia la fase C18, su volumen de fuga es aún apreciablemente bajo, por lo que es evidente que el uso de la fase C18 para la preconcentración de los fenoles de naturaleza hidrófila no es recomendable.

En contraste con las observaciones anteriores el 2,4,6-triclorofenol muestra una alta afinidad hacia la fase C18, lo cual provoca una alta retención de dicho soluto aun en presencia de una concentración relativamente alta (15 % en volumen) de metanol en la fase móvil empleada para la determinación de los volúmenes de fuga.

Los resultados anteriores indican que la fase reversa C18 no puede emplearse para efectuar una limpieza preliminar de la muestra a estudiar, que permita eliminar los compuestos interferentes de naturaleza apolar o hidrófoba presentes en ésta, ya que en caso de efectuar dicha operación los fenoles tales como el 2,4,6-triclorofenol o el pentaclorofenol también son extraídos de manera apreciable.

Por las razones anteriores se concluyó que la fase C18 no podía tener ninguna aplicación de carácter práctico para el establecimiento del método analítico planteado en este trabajo.

Se ha reportado que las fases poliméricas estireno-divinilbenceno (PRP) presentan una mayor afinidad que las fases reversas C18 hacia compuestos moderadamente polares tales como los mono y diclorofenoles (Werkhoven-Goewie et al., 1981; Werkhoven-Goewie et al., 1982; Smith y Pietrzyk, 1983). Además, las fases PRP son mucho más apropiadas que las fases C18 para efectuar la preconcentración de analitos que contienen sustituyentes polarizables tales como grupos nitro, fenilo o halógeno (Coquart y Hemion, 1992).

En función de las consideraciones anteriores se decidió evaluar la capacidad de una fase PRP para realizar los procesos de preconcentración de los compuestos fenólicos de interés. Para efectuar dicha evaluación se determinaron los volúmenes de fuga de los tres fenoles representativos antes mencionados (fenol, 2-clorofenol y 2,4,6-triclorofenol) sobre una precolumna de 20 x 2 mm (di) empacada con una fase PRP de 10 µm de diámetro de partícula. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.2.

En la tabla 3.2 se observa que los fenoles de naturaleza hidrófoba, como el 2,4,6-triclorofenol, pueden preconcentrarse satisfactoriamente sobre la precolumna PRP. Sin embargo, para el caso de los solutos hidrófilos, tales como el fenol y el 2-clorofenol, la fuga aún ocurre a volúmenes relativamente pequeños de muestra preconcentrada. A pesar de lo anterior, y debido a la alta estabilidad mecánica y química de las fases PRP así como a sus excelentes propiedades para preconcentrar compuestos fenólicos de naturaleza moderadamente hidrófila, se decidió utilizar esta fase para efectuar el procedimiento primario de preconcentración de los fenoles polares, por lo que se procedió a optimizar el tamaño de la precolumna.

**Tabla 3.2.** Volúmenes de fuga,  $V_f$ , sobre una precolumna de 20 x 2 mm (di) empacada con una fase PRP ( $d_p = 10 \mu\text{m}$ ).

SOLUTO	Relación metanol : fracción acuosa en la fase móvil (v/v)		
	1:99	5:95	15:85
	$V_f$ (ml)		
Fenol	1.4	1.4	1.0
2-Clorofenol	7.3	—	—
2,4,6-Triclorofenol	45.1	—	—

La fracción acuosa de la fase móvil estuvo constituida por un buffer de ácido acético/acetato de sodio a un pH = 7.0. Concentración de los fenoles en la disolución de carga = 0.5 mg/L.

Para establecer el tamaño óptimo de esta precolumna se consideró como parámetro fundamental el límite de detección que se deseaba alcanzar para los diversos fenoles de interés. Se tuvo como meta primordial que el límite de detección alcanzado fuera al menos igual a la concentración máxima aceptable establecida en los criterios ecológicos de calidad del agua de la legislación para el control de la contaminación de agua en México (DOF, 1989). Estas concentraciones se muestran en la tabla 3.3.

En el sistema cromatográfico (HPLC) del método analítico desarrollado en este trabajo se empleó un detector UV de longitud de onda variable. La sensibilidad de este detector hacia los compuestos fenólicos depende de la longitud de onda a la cual se efectúa la detección. Con excepción del 2,4-dinitrofenol, el 4,6-dinitro-2-metilfenol y el pentaclorofenol, cuyos máximos de absorbancia se encuentran cercanos a 254 nm, la longitud de onda de los máximos de absorbancia del resto de los compuestos fenólicos presentados en la tabla 3.3 se encuentra cercana a los 270 nm (Realini, 1981; Buckman et al., 1984; Alarcon et al., 1991). En la tabla 3.4 se presenta una comparación de la respuesta de estos fenoles a las dos longitudes de onda mencionadas.



3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN...

Tabla 3.3. Criterios ecológicos de calidad del agua. Niveles máximos en µg/L. (DOF,1989).

SOLUTO	FUENTE DE ABASTECIMIENTO DE AGUA POTABLE	RECREATIVO CON CONTACTO PRIMARIO	PROTECCIÓN DE LA VIDA ACUÁTICA	
			AGUA DULCE	AGUA MARINA (ÁREAS COSTERAS)
<i>Fenol</i>	300	1.0	100	60
<i>4-Nitrofenol</i>	70	—	2.0	50
<i>2-Clorofenol</i>	30	—	40	100
<i>2,4-Dinitrofenol</i>	70	—	2.0	50
<i>2-Nitrofenol</i>	70	—	2.0	50
<i>2,4-Dimetilfenol</i>	400	—	20	—
<i>2,4-Diclorofenol</i>	30	—	20	—
<i>4-6-Dinitro-2-Metilfenol</i>	10(*)	—	—	50
<i>2,4,6-Triclorofenol</i>	10(*)	—	10	—
<i>Pentaclorofenol</i>	30	—	0.5	0.5

(\*) Este nivel de concentración ha sido extrapolado mediante el empleo de un modelo matemático, por lo que en revisiones posteriores podrá ser modificado a valores menos estrictos (DOF, 1989). Los fenoles considerados en este estudio se indican con letra cursiva.

Tabla 3.4 Relación de las respuestas de compuestos fenólicos al detector UV, a dos longitudes de onda (270 y 254 nm)

SOLUTO	RELACIÓN DE ÁREAS
	Área 270/Área 254
<i>Fenol</i>	1.63
<i>4-Nitrofenol</i>	3.35
<i>2-Clorofenol</i>	4.23
<i>2,4-Dinitrofenol</i>	0.40
<i>2-Nitrofenol</i>	2.09
<i>2,4-Dimetilfenol</i>	6.11
<i>4-Cloro-2-Metilfenol</i>	5.96
<i>2,4-Diclorofenol</i>	8.36
<i>4-6-Dinitro-2-Metilfenol</i>	0.74
<i>2,4,6-triclorofenol</i>	1.22
<i>Pentaclorofenol</i>	0.14

Como se observa en la tabla 3.4, con excepción del 2,4-dinitrofenol el resto de los cinco fenoles considerados en este estudio muestra una mejor respuesta a 270 nm. Por esta razón se eligió dicha longitud de onda para efectuar las determinaciones cuantitativas de estos solutos.

Las concentraciones mínimas de los cinco fenoles de interés que podían detectarse empleado nuestro detector UV se evaluaron inyectando alícuotas de 20  $\mu$ L de disoluciones de diferente concentración. Se encontró que la disolución con una concentración de 1 mg/L de cada uno de los fenoles producía las señales más bajas que era posible diferenciar de las señales de ruido (considerando una altura del pico igual a 3 veces el tamaño de la señal de ruido, a 0.005 AUFS). De esta manera, la inyección de una alícuota de 20  $\mu$ L con una concentración de 1 mg/L correspondió a una cantidad susceptible de ser detectada, equivalente a 20 ng de cada uno de los cinco fenoles estudiados.

Considerando lo anterior, se dedujo que si se deseaban detectar concentraciones de fenoles del orden de 0.001 mg/L; lo cual corresponde a la concentración más baja establecida para cualesquiera de los cinco compuestos fenólicos considerados (concentración de fenol en aguas recreativas con contacto primario, tabla 3.3) era necesario poder preconcentrar al menos 20 ml de una muestra con esa concentración.

Como se indica en la tabla 3.2, el volumen de fuga del fenol sobre la precolumna PRP de 20 x 2 mm (di) fue de 1.4 ml (empleando agua como fase móvil de carga), por lo que si se deseaba que dicho volumen fuera al menos de 20 ml, era necesario incrementar las dimensiones de la precolumna. Sin embargo, dicho incremento debería hacerse hasta un límite tal que no se provocaran fenómenos de ensanchamiento de banda y de caídas de presión importantes.

La primera prueba efectuada se realizó empleando como precolumna de concentración una columna analítica comercial de 15 cm x 4.4 mm (di). Se empleó esta columna de dimensiones tan grandes debido a la afinidad relativamente débil que parecía existir entre la fase PRP y el fenol (el soluto menos retenido).

El volumen de fuga del fenol determinado en esta precolumna, empleando como fase móvil de carga una disolución acuosa a pH = 7 (buffer  $\text{CH}_3\text{COOH}/\text{CH}_3\text{COONa}$ ) la cual contenía 1% de metanol, fue de 151 ml. Este valor indicó que era posible detectar concentraciones inclusive mucho más bajas que la planteada originalmente. Sin embargo fue evidente que el uso de esta columna como precolumna de concentración provocaría fenómenos de ensanchamiento de banda y de caídas de presión importantes. Por tanto, antes de poder emplear la columna de 15 cm de longitud para efectuar los procesos de preconcentración, fue necesario evaluar la facilidad con la que se desorbían los diversos compuestos fenólicos preconcentrados en ésta a fin de establecer si los fenómenos de ensanchamiento de banda, asociados con los procesos de desorción, no eran muy pronunciados.

Grieser y Prietzyk (1973) han mostrado que debido a su carácter ácido-base, la retención de los compuestos fenólicos sobre las fases PRP depende del pH así como del contenido de

### 3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN...

modificador orgánico en la fase móvil. Para la mayoría de los fenoles considerados en este estudio un cambio de pH de 3 a 7 no modifica sustancialmente la retención sobre la fase PRP, sin embargo un incremento mayor de pH, por ejemplo por arriba de 11, disminuye de manera importante su retención debido a que los iones fenolato generados bajo estas condiciones tienen poca afinidad hacia el adsorbente. Este fenómeno se manifiesta de manera preponderante en el caso de los fenoles más hidrófilos.

En función de lo anterior, y haciendo uso de la alta estabilidad química de las fases PRP en el intervalo de pH de 1 a 14, se buscó analizar la magnitud del fenómeno de ensanchamiento de banda inducido por las dimensiones grandes de la precolumna de concentración. Para esto, se analizó la desorción de los compuestos fenólicos empleando una fase móvil de pH alto. El hecho de emplear este modo de desorción tuvo la finalidad adicional de que los iones fenolato desorbidos de la precolumna PRP pudieran ser preconcentrados en una segunda precolumna de dimensiones más pequeñas, empacada con una resina de intercambio aniónico, en la cual se buscaba que ocurriera una compresión de banda.

Para efectuar la determinación de los volúmenes de desorción de los compuestos fenólicos concentrados en la precolumna PRP de 15 cm de longitud, ésta se cargó previamente con 150 ml de una disolución acuosa fortificada con una concentración de 0.1 mg/L de cada uno de los fenoles de interés. La disolución acuosa de carga se ajustó a un pH de 2 con ácido perclórico. Después de cargados los 150 ml de muestra, la columna se lavó con 5 ml de agua desionizada y posteriormente los solutos se desorbieron empleando como fase móvil una disolución acuosa de hidróxido de sodio a un pH de 11.5. Los volúmenes de inicio y término de desorción para cada uno de los fenoles considerados se muestran en la tabla 3.5.

Los datos de la tabla 3.5 muestran que, incluso en el caso de los fenoles hidrófilos, la desorción de la precolumna PRP de 15 cm de longitud es lenta, lo cual da una idea aproximada de la magnitud del fenómeno de ensanchamiento de banda inducido por las grandes dimensiones de esta columna.

La tabla 3.5 indica también que los once fenoles presentadas pueden agruparse, en base a su facilidad de desorción de la columna PRP, en dos grupos:

1. Aquellos solutos cuya desorción se inicia de manera prácticamente inmediata y concluye antes de pasar a través de la columna un volumen mayor de 25 ml de la fase móvil de desorción (disolución acuosa de pH=11.5). Este grupo incluye al fenol, al 4-nitrofenol, al 2-clorofenol y al 2-nitrofenol.
2. Aquellos solutos que debido a su naturaleza menos hidrófila exhiben una cinética de desorción lenta a partir del soporte polimérico estireno-divinilbenceno. En este grupo se incluyen a solutos tales como el 2,4-dinitrofenol, el 2,4-dimetilfenol, el 4-cloro-3-metilfenol, el 2,4-diclorofenol, el 4-6-dinitro-2-metilfenol, el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol.

**Tabla 3.5.** Volúmenes de inicio y término de desorción de fenoles preconcentrados sobre una columna de 150 x 4.6 mm (di) empacada con una fase PRP (dp = 10 µm).

SOLUTO	VOLUMEN DE INICIO DE LA DESORCIÓN (ml)	VOLUMEN DE TÉRMINO DE LA DESORCIÓN (ml)
Fenol	1.4	14.8
4-Nitrofenol	2.5	15.9
2-Clorofenol	4.4	18.3
2,4-Dinitrofenol	20.8	58.6
2-Nitrofenol	5.6	25.0
2,4-Dimetilfenol	> 70 <sup>(1)</sup>	—
4-Cloro-3-Metilfenol	25.4	106
2,4-Diclorofenol	32.7	104.0
4-6-Dinitro-3-Metilfenol	60.6	86.5
2,4,6-triclorofenol	> 70 <sup>(2)</sup>	—
Pentaclorofenol	> 70 <sup>(3)</sup>	—

Fase móvil de desorción: hidróxido de sodio de pH = 11.5.

Preconcentración de 150 ml de una disolución acuosa (0.1 mg/L), a pH = 2, de cada uno de los fenoles indicados, seguida por un lavado de la columna con 5 ml de agua desionizada.

<sup>(1)</sup> Después de pasar por la columna cargada con el 2,4-dimetilfenol 70 ml de disolución de hidróxido de sodio (pH=11.5) no se observó el inicio de la desorción del soluto, entonces, se circuló a través de la precolumna metanol al 100%, bajo estas condiciones el inicio de la desorción se dio a los 5.5 ml, sin embargo, el término de la desorción rebasó los 50 ml.

<sup>(2)</sup> Después de pasar por la columna cargada con el 2,4,6-triclorofenol 70 ml de disolución de hidróxido de sodio (pH=11.5) no se observó el inicio de la desorción del soluto, entonces, se hizo circular a través de la precolumna una fase móvil de Agua (NaOH, pH=11.5).Metanol, 80.20 (v/v), bajo estas condiciones el inicio de la desorción se dio a los 11.6 ml. El término de la desorción se alcanzó a los 58 ml.

<sup>(3)</sup> Después de pasar por la columna cargada con pentaclorofenol 70 ml de disolución de hidróxido de sodio (pH=11.5) no se observó el inicio de la desorción del soluto, entonces, se hizo circular a través de la precolumna una fase móvil de Agua (NaOH, pH=11.5).Metanol, 80.20 (v/v), bajo estas condiciones el inicio de la desorción se dio a los 20 ml, sin embargo, el término de la desorción rebasó los 230 ml.

En función de los resultados anteriores se decidió considerar el análisis de los cuatro compuestos fenólicos indicados en el grupo 1, en presencia de algún compuesto fenólico representativo del grupo 2. El compuesto elegido del grupo 2 fue el 2,4-dinitrofenol. Las consideraciones anteriores fueron las que sirvieron para definir el conjunto de los cinco fenoles estudiados en este trabajo.

### 3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN...

Una vez establecido, en base a los volúmenes de desorción de la tabla 3.5, que el fenómeno de ensanchamiento de banda provocado por la columna de 15 cm era grande se procedió a optimizar su tamaño considerando los límites de detección deseados.

Debido a que los fenoles concentrados en la precolumna PRP nunca serían desorbidos en línea hacia la columna analítica para su análisis, en principio las dimensiones de dicha precolumna podían ser relativamente grandes a fin de aumentar la retención de los fenoles polares, sin que esto se tradujera en un incremento importante del ensanchamiento de banda. Sin embargo, si estas dimensiones eran apreciablemente grandes, se requeriría también de volúmenes importantes de la fase móvil de desorción para lograr la desorción completa de los fenoles preconcentrados en esta precolumna y su transferencia simultánea, en línea, hacia la precolumna empacada con el intercambiador de aniones. El hecho de emplear un volumen grande de la fase móvil de desorción podía tener efectos negativos, ya que si los volúmenes de fuga de los fenoles en la columna empacada con el intercambiador de aniones eran pequeños, entonces la recuperación de estos solutos podía disminuir drásticamente.

Para tener una estimación del volumen aproximado de fase móvil que podía emplearse para la desorción de los fenoles concentrados en la columna PRP, sin que éstos se fugaran de la precolumna aniónica, se determinaron los volúmenes de fuga de algunos fenoles sobre ésta última empleando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio a diferentes valores de pH. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 3.6.

Tabla 3.6. Volúmenes de fuga de los fenoles,  $V_f$ , determinados sobre una precolumna (20 x 2 mm di) empacada con un intercambiador de aniones.

SOLUTO	pH de la fase móvil		
	10.5	11.0	11.5
	$V_f$ (ml)		
Fenol	21.4	16.4	14.3
4-Nitrofenol	—	22.7	21.6
2,4-Dinitrofenol	—	43.5	38.6
2-Clorofenol	—	—	> 25
2-Nitrofenol	—	—	> 25

Fase móvil: disolución acuosa de hidróxido de sodio, preparada justo antes de efectuar la determinación experimental. Antes de la determinación del volumen de fuga la precolumna se equilibró con 30 ml de disolución acuosa de NaOH a pH = 12.5 y posteriormente con 40 ml de la fase móvil.

La determinación del volumen de fuga se efectuó fortificando la fase móvil a una concentración de 0.1 mg/L de cada fenol. El flujo empleado fue de 1.0 ml/min.

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En la tabla anterior se observa que a medida que aumenta el pH de la disolución disminuye el volumen de fuga de los fenoles. Esto se debe principalmente a la fuerte competencia que existe entre los iones hidroxilo y los iones fenolato por los sitios activos de la resina. Dicha competencia favorece la fijación de los iones OH a medida que aumenta el pH. La tabla 3.6 indica además que empleando como fase móvil de desorción una disolución acuosa de hidróxido de sodio a un pH de 11.5, es posible utilizar hasta 14 ml de ésta para desorber a los solutos preconcentrados en la precolumna PRP, sin que exista fuga del fenol en la precolumna aniónica.

Nielen et al., (1986) han reportado que empleando una precolumna de concentración de 20 x 4.6 mm (di) (volumen = 332  $\mu$ l) empacada con una fase PRP, es posible alcanzar un volumen de fuga para el fenol de 20 ml (empleando como fase móvil de carga una disolución acuosa a pH = 7). Estos datos sugirieron que la precolumna PRP a emplearse en este trabajo debería tener unas dimensiones similares a las antes mencionadas. Sin embargo, debido a que en este trabajo además del fenol se deseaba analizar a otros cuatro compuestos fenólicos, se consideró conveniente emplear una precolumna PRP de dimensiones mayores que la usada por Nielen y colaboradores con el fin de eliminar la posible fuga de los solutos debido a fenómenos de desplazamiento entre ellos. De esta manera la precolumna usada en este trabajo se construyó con unas dimensiones de 30 x 4.6 mm (di) (volumen = 499  $\mu$ l), esto es 1 cm más larga que la empleada por Nielen y colaboradores.

Una vez establecidas las dimensiones de la precolumna, se evaluó su capacidad de retención hacia los fenoles de interés. Esta evaluación se efectuó determinando el volumen de fuga de los fenoles, lo cual permitió establecer el volumen máximo de muestra susceptible de ser preconcentrado.

Los volúmenes de fuga de los cinco fenoles estudiados, sobre la precolumna PRP de 30 x 4.6 mm (di) se presentan en la tabla 3.7.

**Tabla 3.7.** Volúmenes de fuga de fenoles,  $V_f$ , sobre precolumna PRP de 30 x 4.6 mm (di).

SOLUTO	$V_f$ (ml)
Fenol	20.5
4-Nitrofenol	> 50
2,4,-Dinitrofenol	> 50
2-Clorofenol	> 30
2-Nitrofenol	> 50

Las muestras para la determinación de los volúmenes de fuga de cada fenol fue una disolución ácida ( $\text{HClO}_4$ , pH = 2) con una concentración de 0.1 mg/L de cada soluto.

### 3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN...

En un experimento adicional, se determinó el volumen de fuga de una muestra de agua pura fortificada con los cinco fenoles juntos a una concentración de 0.05 mg/L cada uno, observándose el inicio del frente de fuga de la muestra a un volumen de 20.3 ml.

Como se observa en la tabla 3.7, el fenol es el soluto menos retenido, con un volumen de fuga de 20.5 ml. Sin embargo, la precolumna PRP de 30 x 4.6 mm (di) resulta aún apropiada para efectuar la preconcentración inicial de los cinco solutos de interés.

Para efectuar la transferencia de los fenoles concentrados en la precolumna PRP hacia la precolumna aniónica se consideró inicialmente el uso de una disolución acuosa de NaOH a un pH de 11.5. Como se observa en la tabla 3.6 es posible emplear hasta 14 ml de esta disolución para efectuar la transferencia en línea, sin que exista fuga de los solutos. Sin embargo, experimentos adicionales indicaron que para lograr la transferencia total de los fenoles se requería de 27 ml de la disolución de NaOH antes mencionada.

Por otra parte, se pensó también en la posibilidad de efectuar la transferencia de los fenoles de la precolumna PRP hacia la aniónica empleando una disolución de NaOH, a pH 11.5, mezclada con un modificador orgánico como el metanol. Sin embargo, cuando la desorción se intentó empleando una fase móvil Metanol-NaOH (pH=11.5) 10:90 (v/v), la fuga del fenol en la precolumna aniónica fue prácticamente inmediata.

En función de lo anterior, se concluyó que a fin de tener una recuperación alta de los fenoles estudiados, la transferencia en línea de los fenoles concentrados en la precolumna PRP hacia la precolumna aniónica debía efectuarse necesariamente mediante dos etapas de desorción.

Como se ha señalado anteriormente los cinco fenoles de interés en este estudio estuvieron constituidos por cuatro fenoles de naturaleza hidrófila (fenol, 4-nitrofenol, 2-clorofenol y 2-nitrofenol) y un fenol de naturaleza hidrófoba (2,4-dinitrofenol). Considerando estos dos grupos de solutos, se buscó que en la primera etapa de desorción se transfirieran hacia la precolumna aniónica fundamentalmente los fenoles hidrófilos, permaneciendo para la segunda etapa de transferencia el fenol hidrófobo. Lo anterior se hizo con la intención de que en futuros trabajos puedan incorporarse a los cinco fenoles estudiados en este trabajo, los otros cinco fenoles regulados por la legislación ecológica mexicana de aguas, los cuales se caracterizan por ser todos de naturaleza hidrófoba. De tal manera que los diez fenoles contaminantes regulados puedan ser analizados en base a su naturaleza hidrófila o hidrófoba.

De esta manera quedó establecido el procedimiento de preconcentración en línea de los cinco compuestos fenólicos de interés. Dicho procedimiento puede resumirse de la siguiente manera:

Los fenoles contenidos en la muestra de interés (acidificada a un pH = 2) son concentrados sobre una precolumna PRP de 3 cm de longitud en donde son retenidos junto con otros compuestos orgánicos. Los contaminantes de naturaleza inorgánica (principalmente sales), que pueden interferir en la etapa de enriquecimiento sobre el intercambiador aniónico, no se retienen sobre la precolumna PRP. Después de concentrada la muestra, la precolumna PRP es

lavada con un volumen de agua igual a su volumen geométrico, esto con el fin de asegurar que todos los compuestos interferentes de naturaleza inorgánica son eluidos. Entonces, los fenoles concentrados son desorbidos en línea hacia la precolumna aniónica empleando una disolución acuosa de NaOH a pH = 11.5. Se emplea este valor de pH, para asegurar que todos los fenoles, incluyendo al fenol mismo el cual posee el valor de pKa más alto de los cinco solutos estudiados ( pKa = 10), se transfieran hacia la precolumna aniónica en forma de iones fenolato. El uso de un pH mayor de la disolución de NaOH, o el empleo de algún modificador orgánico, provoca que el volumen de fuga de los solutos de interés sobre el intercambiador aniónico disminuya apreciablemente. Después de que los fenoles son eluidos de la precolumna PRP en su forma aniónica, son adsorbidos sobre una precolumna pequeña empacada con el intercambiador aniónico, en donde ocurre una compresión de banda de los solutos. Posteriormente esta precolumna es eluida, en línea, con una fase móvil apropiada hacia una columna analítica C18 en donde se efectúa la separación y análisis de los fenoles. Sin embargo, la disolución de NaOH de pH = 11.5 no es suficiente para desorber totalmente a los solutos preconcentrados en la precolumna PRP, por lo que se requiere de una segunda etapa de desorción, la cual se efectúa empleando como fase móvil una disolución de NaOH (pH 11.5) con un 10 % (v/v) de acetonitrilo. Mediante esta segunda etapa es posible desorber de la precolumna PRP, en su totalidad, a los fenoles remanentes de la primera desorción y transferirlos hacia la precolumna aniónica para una compresión de banda. Los fenoles concentrados sobre el intercambiador de aniones son desorbidos nuevamente en línea hacia la columna analítica en donde se efectúa su separación.

### **3.1.2 EFICIENCIA DEL ACOPLAMIENTO PRECOLUMNA-COLUMNA ANALÍTICA.**

Como se ha mencionado en la sección 2.1.1, la columna analítica empleada en este trabajo fue una columna comercial de 15 cm x 4.6 mm (di) empacada con una fase reversa C18 de 5 µm de diámetro de partícula.

Debido a la naturaleza hidrofóbica de esta fase estacionaria, para la determinación de la eficiencia de la columna analítica se eligió al naftaleno como soluto de prueba y una mezcla metanol-agua 80:20 (v/v) como fase móvil.

La eficiencia de la columna analítica se evaluó determinando su número de platos teóricos (N) así como la altura de un plato teórico (H). Los valores de estos parámetros se determinaron mediante las ecuaciones 3.1 y 3.2, respectivamente.



### 3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN...

$$N = 5.54 \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (3.1)$$

$$H = \frac{L_c}{N} \quad (3.2)$$

donde  $t_r$  es el tiempo de retención del soluto (naftaleno),  $W_{1/2}$  es el ancho de pico del soluto a la mitad de su altura y  $L_c$  es la longitud de la columna.

Los resultados obtenidos en la determinación de la eficiencia de la columna analítica C18 se presentan en la tabla 3.8.

**Tabla 3.8.** condiciones de prueba y eficiencia de la columna analítica empleada en este trabajo para la separación de los fenoles estudiados.

<b>CONDICIONES DE PRUEBA</b>	
Muestra	Disolución de naftaleno (10 mg/L)
Detector	UV a 270 nm
Volumen de la muestra	20 $\mu$ l
Fase móvil	metanol-agua, 80:20 (v/v)
<b>RETENCIÓN DE LA MUESTRA</b>	
Tiempo de retención (min.)	7.685
<b>EFICIENCIA DE LA COLUMNA</b>	
Factor de capacidad	6.83
Número de platos/columna	7862
Número de platos/metro	52414
H ( $\mu$ )	19.1

Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

A fin de minimizar el ensanchamiento de banda ocasionado por una precolumna, el volumen de ésta,  $V_P$ , debe mantenerse dentro de un intervalo que depende del volumen de la columna analítica,  $V_C$ , del número de platos de ésta,  $N$ , y del factor de capacidad,  $k'_A$ , del analito  $A$  que se preconcentra. Esta dependencia puede expresarse (Goewie et al., 1984; Nondek y Chvalovsky, 1983, 1984) mediante la ecuación 3.3

$$\frac{V_P}{V_C} \leq \frac{1+k'_A}{2\sqrt{N}} \quad (3.3)$$

Esta condición es válida sólo si el número de platos de la columna analítica es suficientemente alto ( $N > 1000$ ).

El volumen de la columna analítica empleada en este trabajo fue de 2,493  $\mu$ l, en tanto que el de la precolumna empacada con el intercambiador de aniones fue de 76  $\mu$ l. Lo anterior conduce a una relación  $V_P/V_C = 0.030$ . Por otra parte, el valor de los factores de capacidad, determinados empleando una fase móvil acetonitrilo-agua 20:80 (v/v), así como los valores correspondientes del término  $(1+k'_A)/2\sqrt{N}$ , para los cinco fenoles estudiados se dan en la tabla 3.9.

Tabla 3.9. Factor de capacidad y valor del término  $(1+k'_A)/2\sqrt{N}$ , para los cinco compuestos fenólicos estudiados.

COMPUESTO	$k'_A$	$(1+k'_A)/2\sqrt{N}$
Fenol	4.22	0.031
4-Nitrofenol	8.45	0.053
2,4-Dinitrofenol	9.78	0.061
2-Clorofenol	12.76	0.078
2-Nitrofenol	16.34	0.098

En función de los resultados anteriores y considerando la ecuación 3.3, se estableció que la concentración de los fenoles sobre la precolumna aniónica no debía provocar ningún

ensanchamiento de banda significativo, para ninguno de los cinco fenoles estudiados. Esta deducción se comprobó experimentalmente, encontrándose que en el método analítico desarrollado la preconcentración de los fenoles sobre la precolumna aniónica no produjo un ensanchamiento de banda apreciable para ninguno de los cinco solutos.

Es importante observar, sin embargo, que debido a las dimensiones relativamente grandes de la precolumna PRP de 3 cm de longitud, de haberse efectuado la desorción en línea hacia la columna analítica C18 de los fenoles preconcentrados en esta precolumna podían haberse provocado fenómenos importantes de ensanchamiento de banda. Esta afirmación se basa en el hecho de que la relación entre el volumen de la precolumna PRP y el volumen de la columna analítica C18 ( $V_P/V_C$ ) adquiere un valor de 0.2, el cual es superior al valor del factor  $(1 + k'_A) / 2\sqrt{N}$  de cualquiera de los fenoles mostrados en la tabla 3.9, por lo que no se cumplen las condiciones establecidas en la ecuación 3.3.

### **3.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN.**

La mayoría de los métodos descritos para el análisis de fenoles en aguas por cromatografía de líquidos emplean para la separación de los solutos columnas analíticas empacadas con fases reversas del tipo C18. Esta separación se complementa con detección UV o electroquímica. Las separaciones empleando fases normales también han sido reportadas, sin embargo, estas fases suelen tener una menor capacidad de resolución (Schabron et al., 1978).

En el presente trabajo, además de encontrar condiciones de elución para que los cinco fenoles se separaran con una resolución aceptable, se requería que la fase móvil tuviera la fuerza necesaria para desorberlos de la precolumna empacada con el intercambiador de aniones. Por otra parte, debido a que el método se desarrolló para aplicarlo en el análisis de muestras de agua potable y de río, se buscó que los tiempos de retención de los solutos fueran relativamente grandes con el fin de que todas las interferencias presentes en la muestra de agua, no eliminadas durante el proceso de preconcentración y que generalmente eluyen a tiempos de retención relativamente cortos, no interfirieran con el análisis de los cinco fenoles de interés.

Zhong-Pei et al., (1982), han publicado un método para la preconcentración en diferido y el análisis por HPLC de fenoles en muestras de agua. En dicho método, el fenol se preconcentra empleando una microcolumna de sílica fundida (15 x 0.25 mm di) empacada con un intercambiador de aniones. La desorción hacia la columna analítica del fenol preconcentrado se efectúa empleando una fase móvil acetonitrilo-agua 70:30 (v/v). Esta fase móvil tiene una fuerza de elución tal que provoca que el fenol se desorba fácilmente del intercambiador de aniones, sin embargo, su elución de la columna analítica es casi inmediata.

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Nielsen et al., (1986) han propuesto un método para la preconcentración en línea y análisis por HPLC de fenol en agua de río. En este método, el fenol se concentra sobre un intercambiador de aniones de donde es desorbido hacia una columna analítica C18 para su análisis. Para el proceso de desorción del fenol se empleó inicialmente una fase móvil acuosa de perclorato de sodio 0.1M y ácido perclórico 0.01M. Esta fase móvil no efectúa la desorción de una manera satisfactoria ya que, aunque el anión perclorato actúa como un desplazador de los iones fenolato, dicha fase móvil sólo convierte parcialmente al fenol a su forma neutra. Por otra parte, empleando como fase móvil una mezcla metanol-agua (buffer de acetato de sodio 1M, pH = 5), 1:1 (v/v), se observó una elución eficiente del fenol en su forma neutra. Sin embargo, debido a la alta concentración de sal se produjeron efectos secundarios que interfirieron la detección del fenol por fluorescencia. Finalmente los autores antes mencionados encontraron que el mejor compromiso entre el incremento de la señal y la eficiencia del procedimiento de elución se obtuvo empleando una fase móvil formada por un buffer de acetato de sodio 0.4M de pH = 5, mezclado con metanol en una relación 1:1 (v/v). Además, empleando esta fase móvil la regeneración de la precolumna aniónica es sencilla. Sin embargo, usando una columna analítica C18 de 10 cm x 3 mm (di) y un flujo de la fase móvil de 0.4 ml/min, el fenol eluye con un tiempo de retención de aproximadamente 3 minutos.

Tomando como base las consideraciones anteriores se procedió a establecer las condiciones más apropiadas para la desorción y separación de los cinco fenoles considerados en este trabajo.

Como se observa en la tabla 1.2 (sección 1.3), de los cinco fenoles considerados en este estudio el 2,4-dinitrofenol es el que posee el valor de pKa más bajo (pKa = 4), por lo que para asegurar su desorción de la precolumna aniónica en una forma neutra se consideró apropiado emplear una fase móvil con un pH inferior a 4. Por otra parte, como se mencionó anteriormente se buscó que la elución de los cinco fenoles de la columna analítica se diera a tiempos de retención tales que permitieran que otros compuestos presentes en muestras reales de aguas no interfirieran con la detección y cuantificación de los solutos de interés. Desde este punto de vista, la única alternativa posible pareció ser el empleo de un gradiente de elución. Después de evaluar diversas condiciones de separación se encontraron a las siguientes como unas de las más prometedoras:

**Columna analítica:** Spherisorb ODS (dp = 5 µm), 15 cm x 4.6 mm (di).

**Fase móvil:**

#### Gradiente de elución

TIEMPO (minutos)	FASE A %	FASE B %
0	100	0
8	100	0
15	75	25
30	30	70
40	30	70

### 3.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS...

Las fases A y B del gradiente de elución estuvieron constituidas de la siguiente manera:

COMPONENTE	FASE A	FASE B
	% V	
Acetonitrilo	5	40
Buffer formiato de sodio 0.05 M. pH = 3	95	60

**Detección:** UV a 270 nm.

La separación de los cinco fenoles de interés empleando las condiciones experimentales arriba indicadas se muestra en el cromatograma de la figura 3.1. La separación presentada se obtuvo al efectuar una inyección de 20  $\mu$ l de una disolución con una concentración de 10 mg/L de cada uno de los fenoles estudiados, manteniendo la precolumna aniónica (previamente equilibrada con 20 ml de la fase A) en línea con la columna analítica. La identificación de los picos se efectuó en base a los tiempos de retención obtenidos a partir de inyecciones por separado de cada uno de los fenoles. El pico con un tiempo de retención de 21.6 minutos es una impureza presente en la muestra patrón de 2,4-dinitrofenol.

Como se observa en el cromatograma presentado en la figura 3.1, el fenol, el soluto menos retenido, eluye con un tiempo de retención de 16.2 min. Este tiempo se consideró suficiente para permitir que las sustancias interferentes presentes en las muestras de agua eluyeran de la columna.

Una vez que se estableció que las condiciones experimentales antes presentadas eran apropiadas para lograr la separación de los fenoles, se procedió a correr una muestra blanco, siguiendo todas las etapas de concentración y desorción establecidas en el método analítico desarrollado, esto con el fin de establecer si podían existir interferencias que dificultarían la detección o cuantificación de los solutos de interés. El cromatograma obtenido de la primera etapa de desorción de la muestra blanco se presenta en la figura 3.2. Resultados similares se obtuvieron después de analizar por separado otras tres muestras blanco.

Como se observa en el cromatograma de la figura 3.2 existe una gran cantidad de señales que interfieren con la determinación de los picos presentes en el cromatograma de la figura 3.1. Inicialmente se pensó que las interferencias se debían a impurezas presentes en el hidróxido de sodio o bien a sustancias de naturaleza polimérica que eran extraídas de los recipientes de polietileno en los cuales se preparaban las disoluciones acuosas de dicha base. Sin embargo, aun cuando las disoluciones de NaOH se prepararon justo antes de ser usadas e inclusive empleando recipientes de vidrio pyrex, la presencia de interferencias no disminuyó. Como una alternativa, se efectuaron experimentos adicionales en los cuales se sustituyó el uso de las disoluciones de hidróxido de sodio por disoluciones concentradas de hidróxido de amonio. Sin embargo, aun bajo estas condiciones las interferencias permanecieron. Adicionalmente, las

disoluciones concentradas de hidróxido de amonio tienen la desventaja de que su composición varía en función del tiempo, lo que dificulta mantener constante el pH de las disoluciones de trabajo.

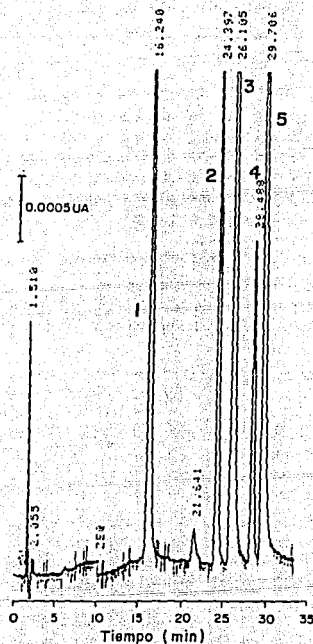


Figura 3.1. Separación de los cinco fenoles de interés, 1. Fenol, 2. 4-Nitrofenol, 3. 2,4-Dinitrofenol, 4. 2-Clorofenol, 5. 2-Nitrofenol. Gradiente de elución: 0-8 min. 0% B; 15 min. 25% B; 30 min. 70% B; 30-40 min. 70% B. Velocidad de flujo, 1 ml/min.

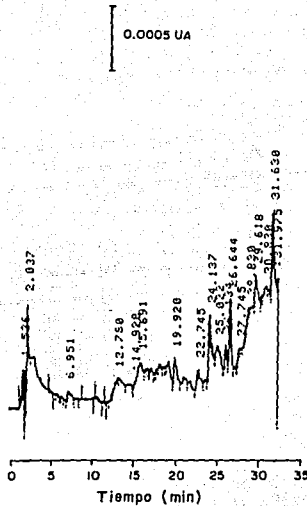


Figura 3.2. Cromatograma obtenido en la primera etapa de desorción (etapa 7 del procedimiento experimental descrito en la sección 2.4) correspondiente al análisis de una muestra blanco. La etapa de desorción se efectuó empleando el gradiente de elución usado para la separación presentada en la figura 3.1.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Es importante mencionar que se probaron otros gradientes de elución, además del antes indicado, en los cuales la fuerza de elución de la fase móvil se varió en un amplio intervalo. Sin embargo, en todas las pruebas efectuadas siempre se generaron interferencias similares a las presentadas en el cromatograma de la figura 3.2.

Cuando la desorción y separación de los fenoles se efectuó bajo condiciones isocráticas las interferencias desaparecieron.

Es importante mencionar que se probaron otros gradientes de elución, además del antes indicado, en los cuales la fuerza de elución de la fase móvil se varió en un amplio intervalo. Sin embargo, en todas las pruebas efectuadas siempre se generaron interferencias similares a las presentadas en el cromatograma de la figura 3.2.

Cuando la desorción y separación de los fenoles se efectuó bajo condiciones isocráticas las interferencias desaparecieron.

Por lo anterior fue necesario efectuar la desorción y separación de los solutos bajo condiciones isocráticas. Para esto se empleó como fase móvil una mezcla acetonitrilo-agua (pH=3.5) 20:80 (v/v). Con esta fase móvil el fenol, el soluto menos retenido, eluye con un tiempo de retención de 7 minutos. El emplear una fase con una concentración más alta de modificador orgánico provoca que el tiempo de retención del fenol disminuya, lo cual fue indeseable para los fines buscados en este trabajo. Por otra parte, al disminuir la fracción de acetonitrilo por debajo de 20 % se provoca que el último pico en eluir, el 2-nitrofenol, sufra un ensanchamiento importante.

Tomando en cuenta las recomendaciones de Nielsen et al., (1986) antes presentadas, relativas a las condiciones óptimas de desorción del fenol de la precolumna aniónica hacia la columna analítica, en este trabajo se analizó el efecto de la concentración de sales presentes en la porción acuosa de la fase móvil empleada sobre la forma de los picos cromatográficos. Las especies probadas, así como su efecto en la reducción de la amplitud de los picos, se presentan en la tabla 3.10.

**Tabla 3.10.** Efecto de diversas especies presentes en la porción acuosa de la fase móvil sobre el ensanchamiento de los picos cromatográficos.

	1	2	3	4	5
DISOLUCIÓN ACUOSA	Buffer formiato de sodio 0.02 M, pH = 3.5	Buffer formiato de sodio 0.04 M, pH = 3.5	Buffer formiato de sodio 0.1 M, pH = 3.5	Ácido perclórico 0.02M	HCOOH 0.05M + HClO <sub>4</sub> 0.02 M. Ajuste del pH a 3.5 con disoln. de NaOH.
% DE REDUCCIÓN EN LA AMPLITUD DEL PICO <sup>(1)</sup>	—	~5	~15	~4	~23

<sup>(1)</sup> % de reducción en la amplitud de los picos, con respecto a los obtenidos empleando la disolución acuosa 1.



### 3.3 RECUPERACIÓN DE LOS FENOLES.

Como se observa en la tabla anterior la disolución acuosa 5 fue la que presentó el mayor efecto de reducción de la anchura de los picos cromatográficos. Por esta razón dicha fase acuosa fue la que se empleó junto con el acetonitrilo para formar la fase móvil utilizada para la desorción y separación de los fenoles.

La fase móvil quedó constituida de la siguiente manera: acetonitrilo-fase acuosa 20:80 (v/v). La separación de los cinco fenoles considerados en este estudio, durante las dos etapas de desorción, empleando la fase móvil mencionada, una columna analítica C18, así como detección UV a una longitud de onda de 270 nm se presenta en la figura 3.3.

En la figura 3.4 se presentan los cromatogramas obtenidos en las dos etapas de desorción, después de aplicar el método de análisis a una muestra blanco. La señal con un tiempo de retención de 8.043 min en el cromatograma de la figura 3.4A corresponde a impurezas presentes posiblemente en las disoluciones de ácidos o base usadas durante el transcurso del análisis.

### 3.3 RECUPERACIÓN DE LOS FENOLES.

La determinación de la recuperación de cada soluto se efectuó comparando el área de la señal obtenida al aplicar el método a muestras de agua pura fortificadas con los fenoles, con el área obtenida por la inyección directa de una cantidad igual del fenol respectivo. Para la determinación de las recuperaciones se tomaron en cuenta los volúmenes corregidos obtenidos en la calibración del rizo del inyector del cromatógrafo y de las puntas de la micropipeta empleada en la preparación de las muestras de agua fortificadas. Esta calibración se efectuó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 2.1.2.

En la tabla 3.11 se presentan las recuperaciones obtenidas para los cinco fenoles estudiados así como la precisión obtenida en el análisis de varias muestras de agua grado HPLC, fortificadas con una concentración de aproximadamente 10 µg/L de cada fenol.

Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

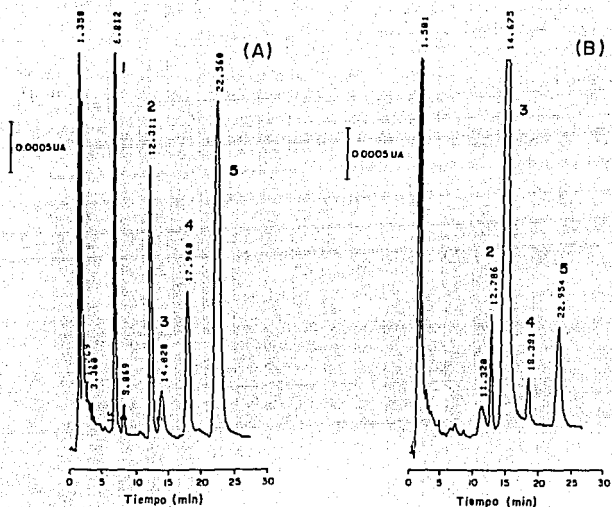


Figura 3.3. Determinación de fenoles en muestra de agua fortificada. A). Primera etapa de desorción, B) Segunda etapa de desorción. Preconcentración de 20 ml de agua pura fortificada con 10  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de los siguientes fenoles: 1. *Fenol*, 2. *4-nitrofenol*, 3. *2,4-dinitrofenol*, 4. *2-clorofenol* y 5. *2-nitrofenol*. Columna analítica Spherisorb ODS,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (15 cm x 4.6 mm di). Fase móvil: acetonitrilo-agua (HCOOH 0.05M + HClO<sub>4</sub> 0.02M, pH = 3.5) 20:80 (v/v). Velocidad de flujo: 1 ml/min. Detección UV a 270 nm.

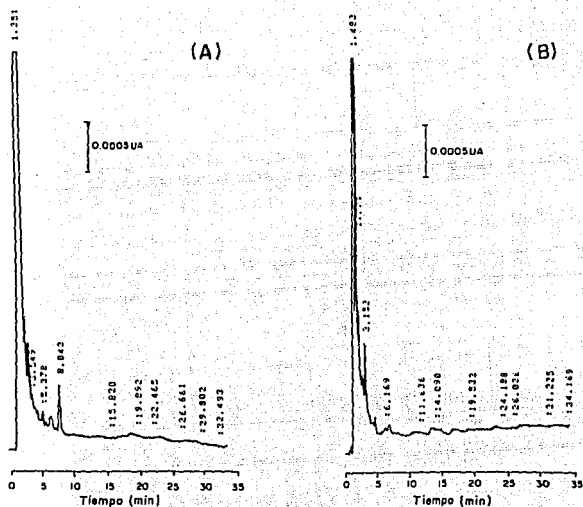


Figura 3.4. Aplicación del método de análisis de fenoles desarrollado en este trabajo a una muestra blanco. A). Primera etapa de desorción, B) Segunda etapa de desorción. Preconcentración de 20 ml de agua pura. Columna analítica Spherisorb ODS,  $d_p = 5 \mu\text{m}$  (15 cm x 4.6 mm di). Fase móvil: acetonitrilo-agua ( $\text{HCOOH}$  0.05M +  $\text{HClO}_4$  0.02M,  $\text{pH} = 3.5$ ) 20:80 (v/v). Velocidad de flujo: 1 ml/min. Detección UV a 270 nm.

**Tabla 3.11.** Recuperación obtenida para los cinco fenoles estudiados.

SOLUTO	n	1ª DESORCIÓN			2ª DESORCIÓN			DESORCIÓN TOTAL		
		R (%)	s	CV	R (%)	s	CV	R (%)	s	CV
Fenol	9	85.45	1.06	1.24	—	—	—	85.42	1.06	1.24
4-Nitrofenol	9	80.19	1.75	2.16	20.16	1.44	7.16	100.35	1.45	1.44
2,4-Dinitrofenol	8	8.08	0.83	10.74	89.88	1.81	2.02	97.96	2.11	2.17
2-Clorofenol	8	80.44	1.42	1.77	18.50	2.36	12.73	98.95	1.83	1.86
2-Nitrofenol	9	75.33	1.55	2.06	24.62	1.23	6.58	99.95	1.47	1.48

La precisión está expresada numéricamente como la desviación estándar,  $\sigma$ , estimada analíticamente por  $s$  y por la desviación estándar relativa o coeficiente de variación (CV).

El estimador  $s$  de la desviación estándar se calculó mediante la ecuación 3.4:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.4)$$

donde  $n$  es el número de medidas,  $x_i$  es el valor medido en el ensayo  $i$  y  $\bar{x}$  es el estimador de la media poblacional  $\mu$ , calculado de acuerdo con la ecuación 3.5.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (3.5)$$

La desviación estándar relativa o coeficiente de variación se calculó como:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (3.6)$$

Como se observa en la tabla 3.11, debido a su naturaleza hidrófila, el fenol concentrado en la precolumna PRP se transfiere en su totalidad hacia la precolumna aniónica durante la primera etapa de desorción. Sin embargo, dicha naturaleza también provoca que la recuperación del fenol no sea del 100%. Como se ha mencionado anteriormente, las dimensiones de la precolumna PRP empleada son apropiadas para preconcentrar 20 ml de muestra sin que exista fuga de ninguno de los cinco solutos analizados, incluido el fenol mismo. No obstante, es importante tener en cuenta que antes de la primera etapa de separación de los fenoles (etapa 7 del procedimiento experimental descrito en la sección 2.4) las precolumnas PRP y aniónica son lavadas con 0.5 ml de agua (etapas 3 y 6, respectivamente, del procedimiento experimental mostrado en la sección 2.4). Probablemente este hecho provoca que parte del fenol concentrado comience a ser parcialmente desorbido de las precolumnas alcanzándose sólo una recuperación del 85% para este soluto.

Exceptuando al fenol, el resto de los solutos analizados alcanzan una recuperación prácticamente del 100%.

Con el fin de establecer si estadísticamente el 4-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol alcanzaban una recuperación del 100%, se efectuó una prueba de hipótesis (Miller y Freund, 1965) relativa a la media de las recuperaciones obtenidas para cada soluto.

El estadístico de prueba empleado para la comprobación de la hipótesis fue el siguiente:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}} \quad (3.7)$$

el cual representa un valor de una variable aleatoria que tiene la distribución t con n-1 grados de libertad.

- Hipótesis nula,  $H_0: \mu = 100$
- Hipótesis alterna  $H_1: \mu \neq 100$

La hipótesis alterna  $H_1$  es bilateral debido a que se desea rechazar la hipótesis nula si la media de las determinaciones de recuperación es significativamente menor o mayor de 100.

- Criterio: se rechaza la hipótesis nula si  $t_{cal} < -t_{\alpha/2}(n-1)$  o  $t_{cal} > t_{\alpha/2}(n-1)$  donde  $t_{\alpha/2}(n-1)$  es el valor de la t de Student con n-1 grados de libertad.

Los valores de  $t_{cal}$  para los cinco fenoles estudiados, junto con los valores de  $t_{\alpha/2}(n-1)$  para los niveles de significancia  $\alpha = 0.02$  y  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la tabla 3.12.

Tabla 3.12. Valores de  $t_{ca}$  y de  $t_{ca/2}$  (n-1), para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  y  $\alpha = 0.02$ , para el caso de los cinco fenoles estudiados.

SOLUTO	n	$t_{ca}$	$t_{ca/2}(n-1)$	$t_{ca/2}(n-1)$
Fenol	9	-41.26	2.306	2.896
4-Nitrofenol	9	0.724	2.306	2.896
2,4-Dinitrofenol	8	-2.735	2.365	2.998
2-Clorofenol	8	-1.623	2.365	2.998
2-Nitrofenol	9	-0.102	2.306	2.896

Como se observa en la tabla 3.12, empleando tanto un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  como un nivel  $\alpha = 0.02$  se rechaza la hipótesis nula de que el fenol se recupera en un 100%. Con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$  se rechaza además la hipótesis nula de que el 2,4-dinitrofenol se recupera en un 100%. Sin embargo, empleando un nivel de significancia  $\alpha = 0.02$  se aceptan las hipótesis nulas que establecen que, exceptuando al fenol, el resto de los fenoles estudiados se recupera en un 100%. Como se indicará posteriormente, la recuperación del 4-clorofenol, el 2,4-dinitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol es del 100% en un intervalo de concentración comprendido entre 2 y 120  $\mu\text{g/L}$ .

El intervalo de confianza para la recuperación de los cinco fenoles se estimó mediante la relación:

$$\bar{x} - t_{\alpha/2} \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right) \leq R \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \left( \frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (3.8)$$

Considerando un nivel de significancia  $\alpha = 0.02$ , así como los datos presentados en las tablas 3.11 y 3.12, los intervalos de confianza estimados se presentan en la tabla 3.13.

### 3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

**Tabla 3.13.** Intervalo de confianza para los datos de recuperación de los cinco fenoles estudiados.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA RECUPERACIÓN (%)
Fenol	84.40 < R < 86.44
4-Nitrofenol	98.95 < R < 101.75
2,4-Dinitrofenol	95.72 < R < 100.20
2-Clorofenol	97.01 < R < 100.89
2-Nitrofenol	98.53 < R < 101.40

### 3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

La sensibilidad de un procedimiento diseñado para un análisis cuantitativo se puede definir como la pendiente de la función analítica de calibración  $y = f(x)$ . Esta función de calibración relaciona el resultado ( $y$ ) de un proceso de medición (una corriente eléctrica, un voltaje, un peso, etc.) con la concentración o cantidad ( $x$ ) del soluto que se determina.

El intervalo en el cual la sensibilidad se mantiene constante está definido por un límite inferior y un límite superior. Por definición el límite inferior será el límite de detección (como se define en la sección 3.5) y la concentración donde la sensibilidad comienza a cambiar (al ir de concentraciones bajas hacia concentraciones altas) se puede considerar como el límite superior. Debido a que este cambio es gradual, es necesario especificar claramente lo que se considera como una curva de calibración recta. una definición del límite superior puede ser la concentración en donde la respuesta difiere por un cierto porcentaje (por ejemplo 3%) de la respuesta que se debería esperar para una sensibilidad similar a la existente cerca del límite de detección. Considerando los dos límites antes mencionados es posible definir el intervalo lineal, o dinámico, para caracterizar a un procedimiento analítico.

El concepto del intervalo lineal (Massart et al., 1978) se ilustra en la figura 3.5. El intervalo lineal se expresa usualmente como el número de décadas entre los límites inferior y superior.

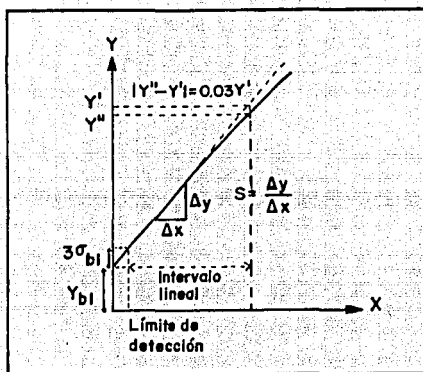


Figura 3.5. Definición del intervalo lineal.

Para establecer el intervalo lineal del método desarrollado en este trabajo, se analizaron muestras de agua grado HPLC, fortificadas con cada uno de los cinco fenoles, empleando concentraciones que variaron entre 2 y 120 µg/L.

Los resultados que describen la respuesta del detector en función de la concentración de cada fenol en la muestra de agua analizada se presentan en las tablas 3.14 a 3.28 y en las figuras 3.6 a 3.10.



3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

Tabla 3.14. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de fenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
2.5	22891
5.0	40691
12.4	100593
24.8	193696
49.5	375182
61.9	517901
84.3	592682
99.0	805739
111.0	908707
124.0	1006351

$y = -3793.1 + 8154.4 x$
$r = 0.9995$
$r^2 = 0.9990$

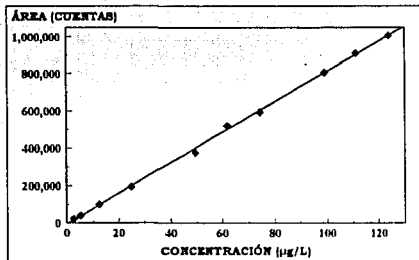


Figura 3.6. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de fenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

Tabla 3.15. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 4-nitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
2.3	63194
4.6	126986
21.6	307288
23.1	627603
46.2	1216442
69.5	1862096
92.6	2445510
104.0	2938159
116.0	3082828

$y = -6067.1 + 27079.6 x$
$r = 0.9990$
$r^2 = 0.9980$

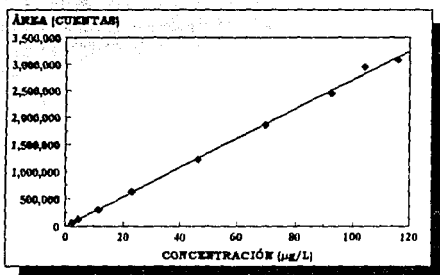


Figura 3.7. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 4-nitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

Tabla 3.16. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-dinitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
2.4	61912
4.7	121780
11.9	326490
23.7	645521
47.5	1273422
71.2	1945280
95.0	2628187
107.0	2934358
119.0	3137747

$y = -3671.0 + 27034.9 x$
$r = 0.9995$
$r^2 = 0.9990$

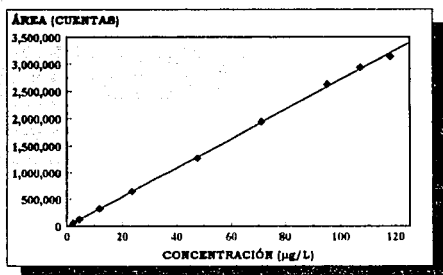


Figura 3.8. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-dinitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Tabla 3.17. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2-clorofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
2.4	21324
4.7	28946
11.8	92643
23.6	179384
47.1	357755
70.9	530647
94.5	755082
106.0	852319
118.0	905299

$y = -5054.0 + 7868.2 \cdot x$
$r = 0.9991$
$r^2 = 0.9982$

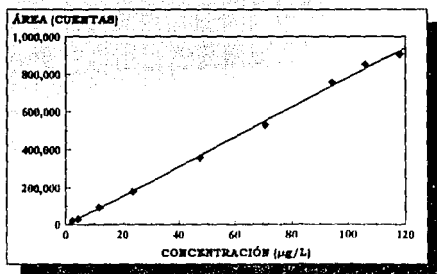


Figura 3.9. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2-clorofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml

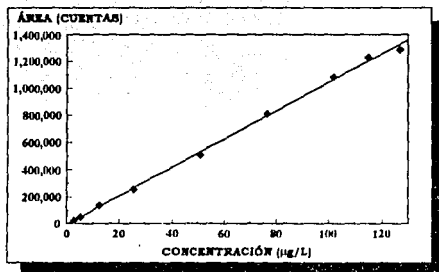
3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

**Tabla 3.18.** Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2-nitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
2.6	25002
5.1	49947
12.7	136266
25.5	252388
50.9	508071
76.4	808534
102.0	1083243
115.0	1226943
127.0	1285800

$y = -3836.2 + 10462.8x$
$r = 0.9992$
$r^2 = 0.9984$



**Figura 3.10.** Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2-nitrofenol en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 20 ml.

Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Para los cinco fenoles estudiados, la recta de regresión que describe la variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración de cada soluto en la muestra de agua analizada tiene la forma:

$$y = a + bx \quad (3.9)$$

donde  $a$  es la ordenada de la recta al origen y  $b$  es su pendiente.

Las rectas de regresión obtenidas para los cinco fenoles se emplearon para estimar el límite de detección del procedimiento analítico para dichos solutos. Primero fue necesario establecer si se podía considerar que, estadísticamente, cada una de las rectas pasaba por el origen del sistema de coordenadas, o bien que el coeficiente  $a$  obtenido en cada ecuación era, estadísticamente, igual a cero. Para esta verificación se efectuó una prueba de hipótesis relativa a dicho coeficiente de regresión.

Es importante remarcar que los valores de  $a$  y  $b$  obtenidos en las ecuaciones de ajuste son estimadores de los coeficientes de regresión  $\alpha$  y  $\beta$  de la recta de regresión real:

$$y = \alpha + \beta x \quad (3.10)$$

Para contrastar la hipótesis nula:

$$H_0: \alpha = 0$$

respecto a la hipótesis alterna

$$H_1: \alpha \neq 0$$

se empleó el estadístico de prueba (Miller y Freund, 1965):

$$t = \left( \frac{a - \alpha}{S_e} \right) \sqrt{\frac{n \cdot S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}} \quad (3.11)$$

donde  $n$  es el número de puntos sobre la recta de regresión,  $\bar{x}$  es el valor promedio de los valores  $x_i$ ,  $y$

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2)S_{xx}}} \quad (3.12)$$

siendo

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (3.13)$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \quad (3.14)$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right) \left( \sum_{i=1}^n y_i \right) \quad (3.15)$$

Empleando un nivel de significancia  $\alpha$  dado, se rechaza la hipótesis nula si  $t < -t_{\alpha/2}$  o  $t > t_{\alpha/2}$ , donde  $t_{\alpha/2}$  es el valor de la  $t$  de Student, para un nivel de significancia  $\alpha$  con  $n-2$  grados de libertad. Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula para los cinco fenoles estudiados, empleando un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la tabla 3.19.

Los resultados de la tabla 3.19 permiten comprobar que, para los cinco fenoles estudiados, el valor del coeficiente  $a$  de la recta de regresión es, estadísticamente, igual a cero.

**Tabla 3.19.** Verificación de la hipótesis nula que establece que las rectas de regresión que describen la variación de la respuesta del detector en función de la concentración de cada fenol, pasan por el origen del sistema de coordenadas. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

SOLUTO	t	n	$t_{\alpha/2}(n-1 \text{ gl})$	¿Aceptar $H_0$ ?
Fenol	-0.584	10	2.306	Si
4-Nitrofenol	-0.200	9	2.365	Si
2,4-Dinitrofenol	0.166	9	2.365	Si
2-Clorofenol	-0.588	9	2.365	Si
2-Nitrofenol	-0.325	9	2.365	Si

Los límites del intervalo de confianza para los coeficientes  $a$  y  $b$  de las rectas de regresión se estimaron mediante la expresión 3.16.

$$a \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{x})^2}{n \cdot S_{xx}}} \quad (3.16)$$

Los intervalos de confianza para los coeficientes  $a$  de las ecuaciones de regresión de los cinco fenoles estudiados, empleando un nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la tabla 3.20

**Tabla 3.20.** Intervalo de confianza de los coeficientes  $a$  de las rectas de regresión.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA (Área, cuentas)
Fenol	-18036 < $a$ < 10750
4-Nitrofenol	-79683 < $a$ < 66965
2,4-Dinitrofenol	-48554 < $a$ < 55896
2-Clorofenol	-25144 < $a$ < 15129
2-Nitrofenol	-31724 < $a$ < 24052

Posteriormente, se analizó la recuperación de los fenoles en el intervalo de concentración estudiado. La variación de la cantidad concentrada en función de la cantidad recuperada al final del análisis, se presenta en las tablas 3.21 a 3.25, así como en las figuras 3.11 a 3.15.



3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

Tabla 3.21. Variación de la cantidad de fenol recuperada en función de la cantidad de fenol concentrada.

CANTIDAD CARGADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
50	48
99	87
248	211
496	425
984	798
1240	1100
1490	1280
1980	1710
2230	1910
2480	2140

$y = -2.67 + 0.8618 x$
$r = 0.9997$
$r^2 = 0.9993$

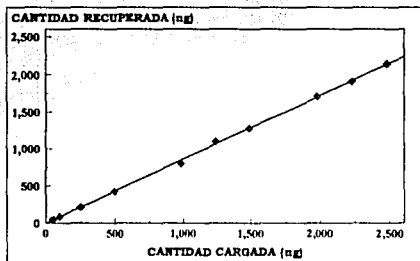


Figura 3.11. Variación de la cantidad de fenol recuperada en función de la cantidad de fenol concentrada.

Tabla 3.22. Variación de la cantidad de 4-nitrofenol recuperada en función de la cantidad de 4-nitrofenol concentrada.

CANTIDAD CARGADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
46	46
93	93
232	228
462	471
924	871
1390	1380
1850	1740
2080	2100
2320	2330

$y = -6.459 + 0.9915 x$
$r = 0.9990$
$r^2 = 0.9979$

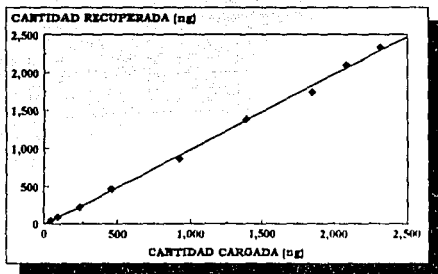


Figura 3.12. Variación de la cantidad de 4-nitrofenol recuperada en función de la cantidad de 4-nitrofenol concentrada.

3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

Tabla 3.23. Variación de la cantidad de 2,4-dinitrofenol recuperada en función de la cantidad de 2,4-dinitrofenol concentrada.

CANTIDAD CARGADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
47	43
95	86
238	241
474	473
950	946
1420	1440
1900	1990
2140	2150
2380	2350

$y = -1,923 + 1,0096 x$
$r = 0,9994$
$r^2 = 0,9988$

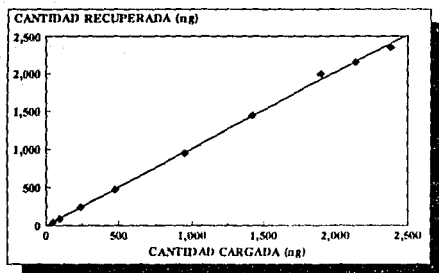


Figura 3.13. Variación de la cantidad de 2,4-dinitrofenol recuperada en función de la cantidad de 2,4-dinitrofenol concentrada.

Tabla 3.24. Variación de la cantidad de 2-clorofenol recuperada en función de la cantidad de 2-clorofenol concentrada.

CANTIDAD CARGADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
47	44
94	75
236	238
470	466
942	895
1420	1370
1890	1880
2120	2120
2360	2430

$y = -24.160 + 1.0195x$
$r = 0.9992$
$r^2 = 0.9984$

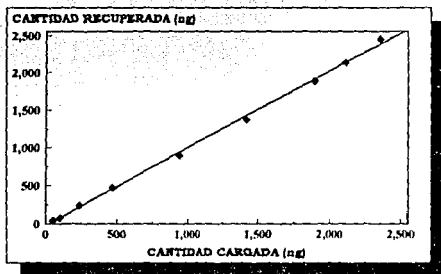


Figura 3.14. Variación de la cantidad de 2-clorofenol recuperada en función de la cantidad de 2-clorofenol concentrada

3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

Tabla 3.25. Variación de la cantidad de 2-nitrofenol recuperada en función de la cantidad de 2-nitrofenol concentrada.

CANTIDAD CARGADA (mg)	CANTIDAD RECUPERADA (mg)
51	48
102	104
254	257
510	501
1020	966
1530	1580
2040	2030
2300	2350
2540	2430

$y = 2.016 + 0.9904 x$
$r = 0.9988$
$r^2 = 0.9976$

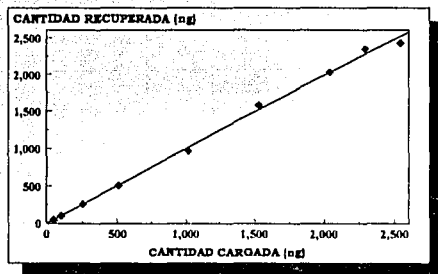


Figura 3.15. Variación de la cantidad de 2-nitrofenol recuperada en función de la cantidad de 2-nitrofenol concentrada.

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Los coeficientes de correlación,  $r$ , para las rectas de regresión obtenidas son altos, lo cual indica que los puntos experimentales se ajustan bien a una línea recta. Sin embargo, los coeficientes  $b$  de cada ecuación son los que tienen una importancia relevante.

Como se observa en las tablas 3.21 a 3.25, con excepción del caso del fenol, el valor del coeficiente  $b$  de las rectas de regresión obtenidas para los fenoles estudiados es cercano a la unidad. Se puede establecer que si estadísticamente  $b = 1$ , entonces la cantidad de soluto concentrado será igual a la cantidad de soluto recuperado al final del análisis, lo cual implicará que la recuperación de dicho soluto es del 100% en todo el intervalo de concentración estudiado.

Para comprobar lo anterior se efectuó una prueba de hipótesis relativa al coeficiente  $b$  de la recta de regresión.

La hipótesis nula a contrastar fue:

$$H_0: \beta = 1$$

contra la hipótesis alterna

$$H_1: \beta \neq 1$$

Para efectuar la prueba de hipótesis se empleó (Miller y Freund, 1965) el estadístico de prueba presentado en la ecuación 3.17.

$$t = \frac{b - \beta}{S_e} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} \quad (3.17)$$

Debido a que se desea comprobar la hipótesis nula de que la recuperación es del 100%, en contra de la hipótesis alterna de que la recuperación es diferente del 100%, la hipótesis nula se rechaza si  $t < -t_{\alpha/2}$  o  $t > t_{\alpha/2}$ , donde  $t_{\alpha/2}$  es el valor de la  $t$  de Student para un nivel de significancia  $\alpha$  con  $n-2$  grados de libertad.

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula se presentan en la tabla 3.26.

### 3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

**Tabla 3.26.** Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión, obtenidas en las determinaciones de recuperación  $\alpha$  a través del intervalo de concentración estudiado, es igual a 1. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

SOLUTO	t	n	$t_{\alpha/2}(n-1 \text{ gl})$	¿Aceptar $H_0$ ?
Fenol	-17.560	10	2.306	No
4-Nitrofenol	-0.498	9	2.365	Si
2,4-Dinitrofenol	0.720	9	2.365	Si
2-Clorofenol	1.257	9	2.365	Si
2-Nitrofenol	-0.515	9	2.365	Si

Los resultados de la tabla 3.26 muestran que estadísticamente, con excepción del fenol, las rectas de regresión de todos los fenoles estudiados tienen una pendiente igual a 1, lo cual puede relacionarse con una recuperación del 100 % a lo largo de todo el intervalo de concentración estudiado.

Los límites del intervalo de confianza para los coeficientes  $b$  de las rectas de regresión se estimaron (Miller y Freund, 1965) empleando la expresión 3.18.

$$b \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} \quad (3.18)$$

El intervalo de confianza para los coeficientes  $b$  de las rectas de regresión de los cinco fenoles estudiados, empleando un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , se dan en la tabla 3.27.

**Tabla 3.27.** Intervalo de confianza de los coeficientes  $b$  de las rectas de regresión.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA
Fenol	0.8440 < b < 0.8800
4-Nitrofenol	0.9494 < b < 1.0336
2,4-Dinitrofenol	0.9781 < b < 1.0411
2-Clorofenol	0.9828 < b < 1.0411
2-Nitrofenol	0.9463 < b < 1.0345

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Adicionalmente se verificó que la intersección de cada una de las rectas con el eje' de las ordenadas fuera estadísticamente igual a cero. Esta verificación se efectuó empleando nuevamente el estadístico de prueba presentado en la ecuación 3.11.

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula de que cada recta de regresión pasa por el origen, con un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la tabla 3.28.

**Tabla 3.28.** Verificación de la hipótesis nula que establece que las rectas de regresión pasan por el origen del sistema de coordenadas. Nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ .

SOLUTO	t	n	$t_{\alpha/2}(n-1 \text{ gl})$	¿Aceptar $H_0$ ?
Fenol	-0.151	10	2.306	Si
4-Nitrofenol	-0.008	9	2.447	Si
2,4-Dinitrofenol	0.106	9	2.365	Si
2-Clorofenol	-0.914	9	2.365	Si
2-Nitrofenol	0.046	9	2.365	Si

En función de los datos presentados en la tabla 3.28 es evidente que, estadísticamente, todas las rectas de regresión pasan por el origen del sistema de coordenadas.

De acuerdo con los resultados presentados en esta sección se puede establecer que el intervalo de concentración en el que la relación *respuesta del detector-concentración del analito* sigue una relación lineal para los cinco fenoles estudiados abarca de 2 a 120  $\mu\text{g/L}$ . En dicho intervalo de concentración la recuperación del 4-nitrofenol, el 2,4-dinitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol es estadísticamente igual al 100%. En el caso del fenol la recuperación varía entre un 84.4 y un 88.0 %.

### 3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.

En términos generales, se puede describir el límite de detección de un analito como aquella concentración que proporciona una señal, "y", *significativamente diferente* de la señal de una



muestra en "blanco" o "señal de fondo" (Miller y Miller, 1988). A pesar de que en la práctica existe muy poco acuerdo respecto a la interpretación de la frase "significativamente diferente" (Currie, 1968), en química analítica suele definirse al límite de detección como *la cantidad o concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco,  $y_B$ , más tres veces las desviación estándar del blanco,  $s_B$* .

La significación de esta definición se presenta en la figura 3.16

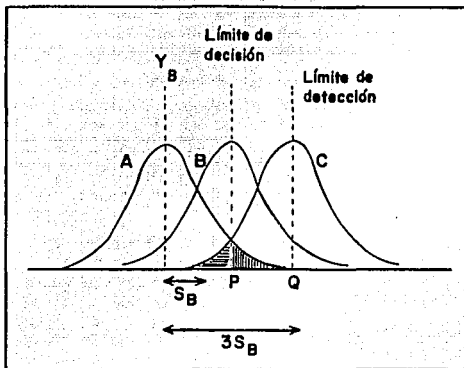


Figura 3.16. Definición del límite de decisión y el límite de detección.

Considerando el diagrama de la figura 3.16, supóngase que se estudian concentraciones a nivel de trazas de un analito en una muestra dada y se presentan dos problemas a considerar: por un lado, no se desea dar un informe de la presencia de analito cuando éste se encuentre ausente de la muestra, pero por otra parte, tampoco se pretende informar que el analito está ausente cuando de hecho está presente. La posibilidad de que ocurra cada uno de estos errores debe minimizarse bajo una definición lógica del límite de detección. En la figura 3.16, la curva

A representa la distribución de valores medidos para una muestra blanco, la cual se ha asumido como una distribución normal. Es posible establecer un punto  $y = P$ , hacia el borde superior de la distribución, y considerar como improbable que una señal mayor a este punto sea debida al blanco.

Sin embargo, si se analiza una muestra con una concentración de analito que proporciona una señal promedio  $y = P$ , la cual se asume sigue una distribución normal (curva B), entonces el 50% de las señales observadas será menor que P por lo que la probabilidad de concluir que la disolución con el analito no difiere de la disolución en blanco, cuando de hecho lo hace, es del 50%.

Lo anterior implica que el punto P, llamado el *límite de decisión*, es insatisfactorio como un límite de detección ya que aunque descarta la presencia del analito cuando éste se encuentra ausente, puede indicar, con un alto nivel de probabilidad, que el analito está ausente cuando de hecho está presente.

Por otra parte, si se considera una muestra con una concentración  $y = Q$ , de manera que el punto Q se sitúe al doble de la distancia que existe entre  $y_B$  y P, entonces la probabilidad de que cada uno de los dos errores antes mencionados ocurra, -indicada por las áreas sombreadas de la figura 3.16, es mínima. Si  $(y_B - Q)$  es igual a 3.28 veces la desviación estándar del blanco,  $s_B$ , entonces la probabilidad de que cada uno de los dos tipos de errores ocurra es sólo del 5%. Si la distancia  $(y_B - Q)$  es sólo  $3s_B$ , la probabilidad de ocurrencia de cada error es aproximadamente del 7%.

Para la estimación del límite de detección puede utilizarse la recta de regresión convencional para la calibración del método, no ponderada (Miller y Miller, 1988). Una suposición fundamental del método de mínimos cuadrados sin ponderar es que cada punto en la curva de calibración, incluido el que representa al blanco, tiene una variación que sigue una distribución normal (sólo en la dirección de las  $y$ 's), con una desviación estándar  $s_{y/x}$  estimada mediante la ecuación 3.19.

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (3.19)$$

La ecuación 3.19 utiliza los residuos de  $y$ ,  $y_i - \hat{y}_i$ , donde los valores  $y_i$  son los puntos sobre la recta de regresión calculada, correspondientes a los valores individuales de  $x$ , es decir, los valores de  $y$  "ajustados". El valor de  $\hat{y}_i$  para un valor dado de  $x$  se calcula a partir de la ecuación de regresión.

### 3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.

La desviación estándar  $s_{y/x}$  puede utilizarse en lugar de  $s_B$  para estimar el límite de detección. Por supuesto, se puede realizar el experimento con el blanco varias veces y obtener un valor independiente para  $s_B$ , sin embargo, éste es un procedimiento que implica tiempo, mientras que en la práctica el uso de  $s_{y/x}$  ha mostrado ser bastante adecuado (Miller y Miller, 1988). El valor calculado de  $\alpha$ , la ordenada al origen de la recta de regresión, puede utilizarse como una estimación de  $y_h$ .

Por otra parte, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha establecido (USEPA, 1984c) un procedimiento para la determinación del límite de detección de un método. Dicho procedimiento se establece en base a la desviación estándar de las mediciones, obtenida en la determinación de un analito, después de analizar al menos siete muestras bajo las condiciones del proceso analítico de interés.

El límite de detección del método (LDM) se estima a partir de la ecuación 3.20:

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} (s) \quad (3.20)$$

donde  $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$  es el valor de la  $t$  de Student apropiado para un nivel de confianza del 99% y una desviación estándar,  $s$ , estimada con  $n-1$  grados de libertad, siendo  $n$  el número de datos. La desviación estándar se estima a partir del análisis de muestras con el analito de interés, fortificadas a concentraciones que no excedan, preferentemente, 10 veces el LDM esperado para el analito.

Los límites de detección reportados, determinados en base a las consideraciones establecidas en la ecuación 3.20, así como las recuperaciones alcanzadas cuando se aplican los métodos de análisis 604 (Hall, 1984; USEPA, 1984a) y 625 (Glaser, 1981; USEPA, 1984b) de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, para la determinación en agua de los cinco fenoles considerados en este trabajo se presentan en la tabla 3.29.

En este trabajo, el límite de detección del método desarrollado se estableció empleando la desviación estándar obtenida en el análisis de entre 8 y 9 muestras fortificadas con cada uno de los cinco fenoles a una concentración de aproximadamente 10  $\mu\text{g/L}$  de cada soluto. Se empleó este nivel de concentración debido a que se esperaba alcanzar límites de detección del orden de 1  $\mu\text{g/L}$ . Así mismo, se tomaron en cuenta tanto las rectas de regresión obtenidas en la determinación del intervalo lineal del método como las consideraciones establecidas por la EPA (ecuación 3.20).

Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Tabla 3.29. Límites de detección (LDM) y porcentos de recuperación (% R) reportados para el análisis en agua de cinco compuestos fenólicos, aplicando los métodos 604 (Hall, 1984; USEPA, 1984a), y 625 (Glaser, 1981; USEPA, 1984b) de la EPA.

SOLUTO	MÉTODO 604 <sup>(1)</sup>				MÉTODO 625 <sup>(2)</sup>	
	CG-FID		CG-CE-BPFB		CG-EM	
	LDM µg/L	% R	LDM µg/L	% R	LDM µg/L	% R
Fenol	1.4	41	2.2	34	1.5	28
4-Nitrofenol	10.0	44	0.7	37	2.4	52
2,4-Dinitrofenol	7.0	87	— <sup>(3)</sup>	— <sup>(3)</sup>	42.0	94
2-Clorofenol	2.0	81	0.6	58	3.3	—
2-Nitrofenol	2.5	80	0.8	58	3.6	—

<sup>(1)</sup> El análisis de fenoles por el método 604 involucra la extracción líquido-líquido de éstos a partir de la muestra, la concentración del extracto obtenido y la determinación de los solutos por cromatografía de gases (CG) con detección por ionización de llama (FID). El extracto concentrado se puede analizar de una manera más específica efectuando la derivatización de los compuestos fenólicos con bromuro de pentafluorobenzilo (BPFB), seguida de una operación de limpieza sobre una columna de sílice gel activada y determinación final de los derivados fenólicos por CG con detector de captura de electrones (CE).

<sup>(2)</sup> El método de análisis 625 (sección relativa a los compuestos extraíbles con ácido) de la EPA, involucra la extracción líquido-líquido de los fenoles presentes en la muestra. El extracto concentrado se analiza por CG con detección por espectrometría de masas (EM).

<sup>(3)</sup> El 2,4-Dinitrofenol no se determina por CG-CE-BPFB.

La desviación estándar obtenida, tanto en unidades de concentración como en cuentas de área, en el análisis de las muestras antes mencionadas se presenta en la tabla 3.30.

Tabla 3.30. Desviación estándar obtenida en el análisis de muestras fortificadas con fenoles. Concentración de la muestra: 10 µg/L. Volumen de muestra concentrado: 20 ml.

SOLUTO	n	s		CV
		Área (cuentas)	Concentración (µg/L)	
Fenol	9	1191	0.15	1.09
4-Nitrofenol	9	12064	0.68	3.24
2,4-Dinitrofenol	8	14653	0.54	3.83
2-Clorofenol	8	16014	0.37	3.82
2-Nitrofenol	9	6160	0.58	3.96

### 3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN.

En el caso en que se emplearon los datos de las rectas de regresión, obtenidas en el estudio del intervalo lineal del método, para establecer el límite de detección, éste se definió mediante la ecuación 3.21.

$$LDM = y_B + 3S_B \quad (3.21)$$

El valor de  $s_B$  para cada fenol fue el valor de  $s$  presentado en la tabla 3.30, en tanto que  $y_B$  se consideró igual al valor de la ordenada al origen (coeficiente  $a$ ) obtenida de las rectas de regresión antes mencionadas. Sin embargo, es importante tener en cuenta que, como se discutió en la sección 3.4 (tabla 3.19), el coeficiente  $a$  de las cinco rectas de regresión es estadísticamente igual a cero. Por esta razón, para las estimaciones de los límites de detección de los cinco fenoles estudiados mediante la ecuación 3.21 se consideró a  $y_B$  igual a cero.

Los límites de detección para los cinco fenoles estudiados, estimados a partir de las rectas de regresión y de la ecuación 3.21 se presentan en la tabla 3.31.

**Tabla 3.31.** Límites de detección para los cinco fenoles estudiados, estimados a partir de la ecuación 3.21 y de las rectas de regresión obtenidas en el establecimiento del intervalo lineal del método.

SOLUTO	LDM ( $\mu\text{g/L}$ )
Fenol	1.0
4-Nitrofenol	1.6
2,4-Dinitrofenol	1.5
2-Clorofenol	2.1
2-Nitrofenol	2.0

Los límites de detección estimados en base a las consideraciones establecidas por la EPA (ecuación 3.20) se presentan en la tabla 3.32.

**Tabla 3.32.** Límites de detección para los cinco fenoles estudiados, estimados a partir de las consideraciones establecidas por la EPA (ecuación 3.20).

SOLUTO	LDM ( $\mu\text{g/L}$ )
Fenol	0.4
4-Nitrofenol	0.9
2,4-Dinitrofenol	1.5
2-Clorofenol	1.1
2-Nitrofenol	1.7

Como se observa en los datos presentados en las tablas 3.31 y 3.32, los límites de detección del método para los cinco fenoles estudiados son apropiados para detectar las concentraciones máximas permisibles establecidas en los criterios ecológicos de calidad del agua en México (tabla 3.3), lo que permite establecer que el método desarrollado en este trabajo es apropiado para el monitoreo y detección de los cinco fenoles considerados a los niveles de concentración mencionados.

Por otra parte, es importante mencionar que a pesar de que en el método desarrollado en este trabajo únicamente se analizan cinco fenoles, los límites de detección alcanzados para éstos (tablas 3.31 y 3.32) son más bajos que los obtenidos al aplicar el método de análisis 625 de la EPA, o el análisis por CG-FID del método 604 de la misma agencia (tabla 3.29). Con respecto al análisis por CG-CE-BPFB, del método 604, se observa (tabla 3.29) que éste alcanza límites de detección más bajos para el 4-nitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol, sin embargo, tiene la desventaja de que no permite efectuar el análisis del 2,4-dinitrofenol.

Adicionalmente, las recuperaciones obtenidas por el método desarrollado en este trabajo para los cinco fenoles estudiados (tablas 3.13, 3.26 y 3.27), son evidentemente mayores que las obtenidas por los métodos 604 o 625 de la EPA (tabla 3.29).

### **3.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DE MANANTIAL Y DE RÍO.**

Una vez evaluado el método analítico desarrollado, éste se aplicó al análisis de fenoles en muestras de agua de manantial y de río. Es importante remarcar que el análisis mencionado únicamente se efectuó con el fin de mostrar, de manera preliminar, la posible aplicación

potencial del método. Por esta razón no se efectuó un estudio más detallado de la aplicación de dicho método para el análisis de diversos tipos de aguas, por ejemplo, de manantial o de río, subterráneas, superficiales, de pozos, etc.

Así, los resultados presentados en esta sección incluyen únicamente los datos obtenidos al analizar una muestra de agua de manantial (superficial), recolectada en las montañas que rodean a la población de la Marquesa, Estado de México, y que se emplea como fuente de abastecimiento de agua potable. Adicionalmente se presenta la aplicación del método al análisis de una muestra de agua de río (superficial) generada a partir del manantial antes mencionado, y recolectada aproximadamente cinco kilómetros río abajo a partir del nacimiento de éste. A pesar de que tanto el manantial como el sitio en el cual se recolectó la muestra de agua de río se encuentran en una zona montañosa, alejada de centros industriales, no es posible descartar de manera absoluta la contaminación de estas aguas, debido a la gran afluencia de personas en dicha zona.

Para el caso de las muestras de agua de manantial o de río, debido a la posible presencia en éstas de sales o sólidos en suspensión, fue necesario efectuar un proceso de filtración antes de su preconcentración y análisis.

Con la finalidad de establecer si el filtro de membrana de nylon empleado en la etapa de filtración era capaz de retener parte de los fenoles, se realizaron algunos estudios con muestras de agua pura fortificadas con concentraciones conocidas de los solutos de interés. Después de filtrar estas muestras y someterlas al procedimiento de concentración y separación en línea, de acuerdo con el método desarrollado (sección 2.4), se evaluó la recuperación alcanzada para los cinco fenoles estudiados.

Los resultados obtenidos en el análisis de dos muestras de agua grado HPLC, fortificadas con cada fenol, a una concentración de 10 µg/L, se presentan en la tabla 3.33.

**Tabla 3.33.** Recuperación obtenida para los cinco fenoles estudiados después de filtrar la muestra, empleando una membrana de nylon, y someterla al procedimiento de concentración y análisis en línea según el procedimiento analítico desarrollado en este trabajo.

SOLUTO	RECUPERACIÓN (%)	CV
Fenol	88.72	2.84
4-Nitrofenol	98.88	2.52
2,4-Dinitrofenol	96.99	3.24
2-Clorofenol	99.41	1.36
2-Nitrofenol	100.20	2.11

Los resultados de la tabla 3.33 indican que las membranas de nylon no retienen a los fenoles. A pesar de que el análisis de sólo dos muestras puede no ser suficiente, desde el punto de vista estadístico, para aseverar que los fenoles no son retenidos por las membranas de nylon, se decidió aceptar dicha aseveración en virtud de que otros autores (Galceran y Santos, 1989) también la han corroborado.

En función de lo anterior se estableció que las membranas de Nylon de 0.45  $\mu\text{m}$  eran apropiadas para efectuar un proceso previo de filtración, el cual permite eliminar las partículas sólidas en las muestras de agua potable, de manantial o de río que se desea analizar.

En la figura 3.17 se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar, de acuerdo con el procedimiento analítico desarrollado en este trabajo, una muestra de 20 ml de agua de manantial. Como se observa en el cromatograma obtenido en la primera etapa de desorción (figura 3.17A) únicamente aparecen señales a tiempos de retención por debajo de los 9 minutos, lo cual sugirió que el único soluto con posibilidad de encontrarse presente en la muestra era el fenol.

En la figura 3.17B se presenta el cromatograma obtenido en la segunda etapa de desorción. En éste se observa la presencia de dos señales anchas a tiempos de retención de 7.2 y 12.9 minutos, sin embargo éstas no corresponden a ninguno de los cinco solutos analizados.

En la figura 3.18 se presentan los cromatogramas obtenidos después de las dos etapas de desorción, al analizar una muestra de agua de manantial fortificada con una concentración de 10  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de los cinco fenoles estudiados. En la figura 3.18A se observa que además de las señales correspondientes a los cinco fenoles aparecen dos señales adicionales en un intervalo de tiempos de retención comprendido entre 7.5 y 8.5 minutos.

En la figura 3.19A y 3.19B se muestran los cromatogramas ampliados obtenidos después de la primera etapa de desorción para la muestra de manantial y la muestra de manantial fortificada con los cinco fenoles, respectivamente.

Es importante remarcar que el solo valor del tiempo de retención no es un criterio suficiente para identificar con una certeza absoluta al compuesto químico que genera una señal cromatográfica. Sin embargo, teniendo en cuenta la selectividad alcanzada durante las etapas de preconcentración del método analítico desarrollado, y por comparación de los cromatogramas de las figuras 3.19A y 3.19B, se consideró que la señal con un tiempo de retención de 6.489 minutos en el cromatograma de la figura 3.19A (muestra de manantial no fortificada) correspondía al fenol. Teniendo en cuenta esta consideración se procedió a calcular la concentración de este soluto en la muestra de agua de manantial.

En función del área obtenida para el pico cromatográfico con un  $t_r$  de 6.486 minutos, tomando en consideración el volumen original de la muestra analizada, y haciendo uso de la ecuación obtenida en la determinación del intervalo lineal para el fenol (tabla 3.14) se determinó que la concentración de este soluto en la muestra estudiada fue de 6,3  $\mu\text{g/L}$ .

Para determinar el error de la concentración calculada se hizo uso de la ecuación 3.22.



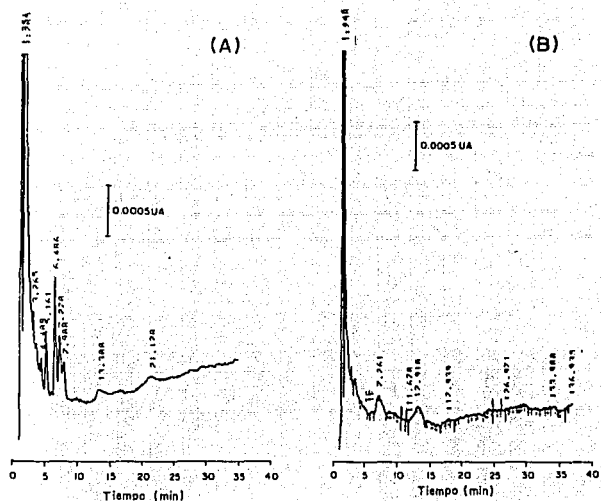


Figura 3.17. Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de 20 ml de agua de manantial, empleada para consumo humano, aplicando el método desarrollado en este trabajo. A). Primera etapa de desorción. B). Segunda etapa de desorción. Para condiciones experimentales ver sección 2.4.

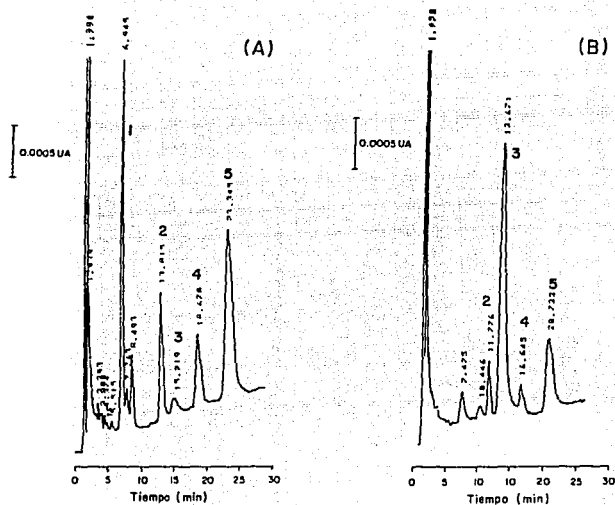


Figura 3.18. Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de 20 ml de agua de manantial, fortificada con una concentración de 10  $\mu\text{g/L}$  de cada uno de los siguientes fenoles: 1. Fenol, 2. 4-Nitrofenol, 3. 2,4-Dinitrofenol, 4. 2-Clorofenol y 5. 2-Nitrofenol. El análisis se efectuó de acuerdo con el método desarrollado en este trabajo. A). Primera etapa de desorción. B). Segunda etapa de desorción. Para condiciones experimentales ver sección 2.4.

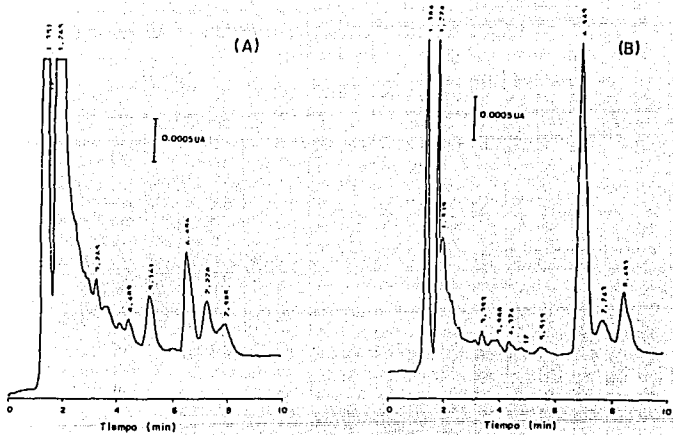


Figura 3.19. Ampliación de cromatogramas obtenidos en el análisis de 20 ml de una muestra de agua A) de manantial B) de manantial, fortificada con una concentración de 10 µg/L de cada uno de los siguientes fenoles: 1. Fenol, 2. 4-Nitrofenol, 3. 2,4-Dinitrofenol, 4. 2-Clorofenol y 5. 2-Nitrofenol. Únicamente se presenta la primera parte de los cromatogramas obtenidos en la primera etapa de desorción.

$$s_{x_0} = \left( \frac{S_{y/x}}{b} \right) \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (3.22)$$

donde  $y_0$  es el valor del área obtenida para el pico cromatográfico,  $x_0$  es el valor de la concentración y  $s_{x_0}$  es la desviación estándar de  $x_0$ . En función del valor obtenido de  $s_{x_0}$  para la concentración determinada, los límites del intervalo de confianza a un nivel de significancia de 95% son  $6.3 \pm 3.5 \mu\text{g/L}$ . Sin embargo, es importante tener en cuenta que el fenol sólo se recupera en un 85.4 % (tabla 3.11), de donde se establece que los  $6.3 \mu\text{g/L}$  detectados representan en realidad una concentración de  $7.4 \mu\text{g/L}$ .

El manantial de donde se tomó la muestra de agua analizada se emplea como fuente de abastecimiento para consumo humano. De acuerdo con los criterios de calidad del agua, establecidos en la tabla 3.3, el agua de la fuente antes mencionada es "apropiada" para consumo humano así como para la protección de la vida acuática tanto en agua dulce como en agua marina, sin embargo sobrepasa los niveles de concentración establecidos para fuentes de agua recreativas con contacto primario.

En la figura 3.20 se presentan los cromatogramas obtenidos, después de cada una de las dos etapas de desorción, al analizar una muestra de agua de río fortificada con una concentración de  $10 \mu\text{g/L}$  de cada uno de los cinco fenoles estudiados. Como se observa, debido al gran pico interferente de la muestra de agua de río, la sensibilidad del método disminuye, dificultando al mismo tiempo la cuantificación de los solutos analizados. Desafortunadamente, como ya se ha mencionado, no es posible efectuar la desorción de los fenoles de la precolumna aniónica empleando un gradiente de elución que permita aumentar su tiempo de retención de tal manera que eluyan mucho después del pico interferente.

Sin embargo, este problema podría ser resuelto, en parte, empleando un sistema de detección más selectivo, como un detector electroquímico. Golkiewicz et al., (1983) han reportado que el uso de un detector electroquímico en el análisis por HPLC de compuestos aromáticos apolares, en agua de río, permite disminuir de manera apreciable el gran pico interferente (similar al mostrado en el cromatograma de la figura 3.20) registrado cuando se emplea detección UV. Los detectores electroquímicos tienen la ventaja adicional de ser más sensibles hacia los fenoles que los detectores UV. En sus estudios con aguas de río, Baldwin y Debowski (1988) han reportado que empleando un detector amperométrico de pulsos, con un electrodo de carbón vítreo y un potencial de trabajo de 1.20 volts, es posible alcanzar límites de detección, para los cinco compuestos fenólicos estudiados en este trabajo, 40 (2-nitrofenol), 100 (4-nitrofenol), 120 (fenol), 160 (2-clorofenol) y 200 (2,4-dinitrofenol) veces más bajos que los límites de detección que son posibles de alcanzar empleando un detector UV, a una longitud de onda de 254 nm.

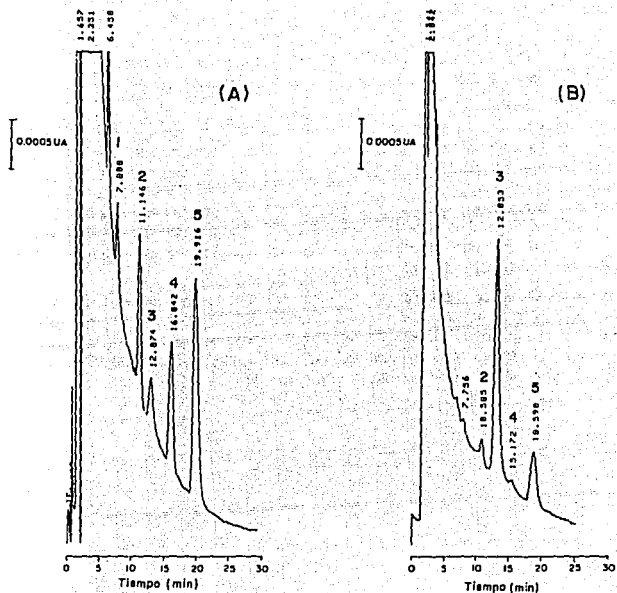


Figura 3.20. Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de 20 ml de agua de río, fortificada con una concentración de  $10 \mu\text{g/L}$  de cada uno de los siguientes fenoles: 1. Fenol, 2. 4-Nitrofenol, 3. 2,4-Dinitrofenol, 4. 2-Dlorofenol y 5. 2-Nitrofenol. El análisis se efectuó de acuerdo con el método desarrollado en este trabajo. A). Primera etapa de desorción. B). Segunda etapa de desorción. Para condiciones experimentales ver sección 2.4.

### Capítulo 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

En las etapas finales del presente trabajo se efectuaron algunos experimentos adicionales empleando un sistema de detección electroquímico, observándose que tanto la selectividad como la sensibilidad del método se incrementaron. Adicionalmente, con dicho sistema de detección es posible efectuar la desorción de los fenoles concentrados en la precolumna aniónica empleando un gradiente de elución, sin que aparentemente existan interferencias importantes tales como las observadas cuando se usa el detector UV.

A pesar de que no se efectuó un estudio más extenso con el detector electroquímico, lo antes mencionado parece indicar que el empleo de dicho sistema de detección puede mejorar la sensibilidad y selectividad del método desarrollado en este trabajo para el análisis de fenoles en muestras de agua de río.

Es importante mencionar por otra parte que los detectores con arreglo de diodos han propiciado avances considerables en el análisis por HPLC de compuestos fenólicos (Busto et al., 1991; Bartolomé et al., 1993), ya que mediante este tipo de detectores es posible registrar el espectro UV de cada compuesto detectado y emplearlo con fines de identificación. La sensibilidad en la detección de los solutos también se incrementa debido a que cada pico puede ser detectado a la longitud de onda de su máximo de absorbancia, pudiéndose registrar por otra parte la relación entre las absorbancias de un soluto a diferentes longitudes de onda. Adicionalmente existe la posibilidad de verificar la pureza de pico.

Los comentarios anteriores ponen de manifiesto que el acoplamiento del sistema de preconcentración en línea y análisis por HPLC con un sistema dual de detección, constituido por un detector con arreglo de diodos conectado en serie con un detector electroquímico puede incrementar de manera importante la sensibilidad, selectividad y capacidad de identificación de solutos, del método de análisis desarrollado en este trabajo.

## CONCLUSIONES.

- El método analítico descrito en este trabajo se propone como una técnica alternativa para el monitoreo y análisis de cinco compuestos fenólicos en muestras de agua potable, de manantial o de río. Los cinco compuestos fenólicos están sujetos a regulación por la legislación ecológica mexicana para la prevención de la contaminación del agua, e incluyen al fenol, al 4-nitrofenol, al 2,4-dinitrofenol, al 2-clorofenol y al 2-nitrofenol.
- Los compuestos mencionados se pueden determinar selectivamente por cromatografía de líquidos (HPLC) en fase reversa, empleando detección UV y enriquecimiento de trazas en línea. La combinación de una precolumna relativamente larga, empacada con un copolímero estireno-divinilbenceno de baja selectividad y una precolumna pequeña empacada con un material selectivo, tal como un intercambiador de aniones, parece ser una estrategia apropiada para minimizar la presencia de diversos compuestos interferentes de naturaleza orgánica e inorgánica.
- El sistema de preconcentración en fase sólida, conectado en línea con el sistema cromatográfico de análisis (HPLC) reduce considerablemente el riesgo de contaminación de las muestras estudiadas debido a que la manipulación externa de éstas es mínima. Así mismo, en comparación con métodos oficiales para el análisis de fenoles en agua, como los métodos 604 y 625 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), el sistema antes mencionado ayuda a disminuir significativamente el tiempo de análisis de las muestras, además de que no requiere del uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos, así como de otros reactivos tóxicos y costosos.
- De esta manera, el método de preconcentración y limpieza de la muestra desarrollado proporciona una alternativa para la extracción de contaminantes fenólicos en agua. El dispositivo de preconcentración tiene las ventajas

## CONCLUSIONES:

adicionales de ser simple de construir, compacto, de costo relativamente bajo, así como fácil de regenerar y mantener.

- Para los cinco fenoles estudiados la respuesta obtenida varía linealmente con la concentración en el intervalo comprendido entre 2 y 120 µg/L. Además, la recuperación de todos los analitos, exceptuando al fenol, es del 100 % en el intervalo de concentración mencionado. Para el caso del fenol la recuperación es del 85 %.
- A pesar de que en el método desarrollado en este trabajo únicamente se analizan cinco fenoles, los límites de detección alcanzados para éstos son más bajos que los obtenidos al aplicar el método de análisis 625 de la EPA o el análisis por cromatografía de gases con detección por ionización de llama (CG-FID) del método 604 de la misma Agencia. El análisis por cromatografía de gases, con detección por captura de electrones de los derivados pentafluorobenzoílicos de los fenoles (CG-CE-BPFB), del método 604 de la EPA, permite alcanzar límites de detección más bajos para el 4-nitrofenol, el 2-clorofenol y el 2-nitrofenol. Sin embargo, mediante la técnica CG-CE-BPFB el límite de detección para el fenol es más alto que el obtenido por el método desarrollado en este trabajo, además de que el 2,4-dinitrofenol no puede ser determinado por dicha técnica. Por otra parte, las recuperaciones obtenidas en este trabajo para los cinco fenoles estudiados son mayores que las obtenidas por los métodos 604 o 625 de la EPA.
- El límite de detección que el método analítico desarrollado permite alcanzar para cada uno de los fenoles estudiados hace factible que dicho método sea apropiado para la determinación de estos solutos, a los niveles de concentración establecidos en la legislación ecológica mexicana relativa a la prevención de la contaminación del agua.
- En función de los resultados obtenidos es evidente que si no se dispone de un detector más selectivo y sensible, el detector UV puede ser empleado para el análisis de fenoles en muestras de agua relativamente poco contaminadas, por el método desarrollado en este trabajo. Sin embargo, el acoplamiento del sistema de preconcentración en línea y análisis por HPLC con un sistema dual de detección, constituido por un detector con arreglo de diodos conectado en serie con un detector electroquímico, puede incrementar de manera importante la sensibilidad, selectividad y capacidad de identificación de solutos del método de análisis desarrollado en este trabajo.



## REFERENCIAS

*Alarcon P., Bustos A., Cañas B., Andrés M. D. and Polo M. L.* Determination of priority pollutant phenols by isocratic HPLC. *Chromatographia*, 32, 566-572 (1991).

*Armentrout D. N., McLean J. D. and Long M. W.* Trace determination of phenolic compounds in water by reversed phase liquid chromatography with electrochemical detection using a carbon-polyethylene tubular anode. *Anal. Chem.*, 51, 1039-1045 (1979).

*Baldwin D. A. and Debowski J. K.* Determination of phenols by HPLC down to PPT levels. *Chromatographia*, 26, 186-190 (1988).

*Bartolomé B., Bengoechea M. L., Gálvez M. C., Pérez-Itzarbe F. J., Hernández T., Estrella I. and Gómez-Cordovés C.* Photodiode array detection for elucidation of the structure of phenolic compounds. *J. Chromatogr.*, 655, 119-125 (1993).

*Bízek V., Horáček J. and Procházka J.* Extraction of phenols: I. Distribution of individual phenols between organic solvents and water or aqueous solvents. *Can. J. Chem. Eng.* 70, 341-349 (1992).

*Borra C., Di Corcia A., Marchetti M. and Samperi R.* Evaluation of graphitized carbon black cartridges for rapid organic trace enrichment from water: application to priority pollutant phenols. *Anal. Chem.*, 58, 2048-2052 (1986).

*Braumann T.* Determination of hydrophobic parameters by reversed-phase liquid chromatography: Theory, experimental techniques, and application in studies on quantitative structure-activity relationships. *J. Chromatogr.*, 373, 191-225 (1986).

*Buchholz K. D. and Pawliszyn J.* Optimization of solid phase microextraction conditions for determination of phenols. *Anal. Chem.*, 66, 160-167 (1994).

REFERENCIAS.

*Buckman N. G., Hill J. O., Magee R. J. and McCormick M. J.* Separation of substituted phenols, including eleven priority pollutants using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 284, 441-446 (1984).

*Busto O., Olucha J. C. and Borrull F.* Optimization of isocratic mobile phase composition for HPLC analysis of eleven Substituted Phenols. *Chromatographia* 24, 613-616 (1987).

*Carron J. M. and Afghan B. K.* Environmental aspects and analysis of phenols in the aquatic environment. In *Anal. Trace Org. Aquat. Environ. Afghan B. K. and Chau A. Eds. Chapter 4. CRC. Fla. USA. 1989.*

*Callmer K., Edholm L. E. and Smith B. E.* Study of retention behaviour of alkylphenols in straight- and reversed-phase liquid chromatography and application to the analysis of complex phenolic mixtures in conjunction with gas chromatography. *J. Chromatogr.* 136, 45-62 (1977).

*Carwell T. J., Hamilton Y. C., Mc Cormick M. J. and Symons R. K.* Determination of alkylphenols in refinery effluents by liquid chromatography using electrochemical detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 24, 23-35 (1986).

*Chriswell C. D., Chang R. C. and Fritz J. S.* Chromatographic determination of phenols in water. *Anal. Chem.*, 47, 1325-1329 (1975).

*Coquart V. and Hennion M. C.* Trace-level determination of polar phenolic compounds in aqueous samples by high-performance liquid chromatography and on-line preconcentration on porous graphitic carbon. *J. Chromatogr.*, 600, 195-201 (1992).

*Currie L. A.* Limits for quantitative detection and quantitative determination. Application to radiochemistry. *Anal. Chem.*, 40, 586-593 (1968).

*Di Corcia A., Marchese S. and Samperi R.* Evaluation of graphitized carbon black as a selective adsorbent for extracting acidic organic compounds from water. *J. Chromatogr.*, 642, 163-174 (1993a).

*Di Corcia A., Marchese S. and Samperi R.* Selective determination of phenols in water by a two-trap tandem extraction system followed by liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, 642, 175-184 (1993b).

*Dirección General de Normas. Análisis de agua. Determinación de fenoles. Norma Oficial Mexicana. NOM-AA-50-1981. Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial. 1981.*

*DOF. Diario Oficial de la Federación. Acuerdo por el que se establecen los criterios ecológicos de calidad del agua CE-CCA-001/89. México D. F. 2 de diciembre de 1989.*

*El-Shahawi M. S., Farag A. B. and Mostafa M. R. Preconcentration and separation of phenols from water by polyurethane foams. Sep. Sci. Technol., 29, 289-299 (1994).*

*Fingler S., Drevenkar V. and Vasilic Z. A Comparative study of trace enrichment of chlorophenols in water by extraction with C<sub>6</sub> and C<sub>8</sub> alkanes and by C18 reversed-phase adsorption. Mikrochim Acta, 11, 163-175 (1987).*

*Galceran M. T. and Santos F. J. Determination of phenols in water by HPLC and electrochemical detection. Water Supply, 7, 69-75 (1989).*

*Glaser J. A., Foerst D. L., McKee G. D., Quave S. A. and Budde W. L. Trace analysis for wastewaters. Environ. Sci. Technol., 15, 1426-1435 (1981).*

*Głajch J. L., Kirkland J. J., Squire K. M. and Minor J. M. Optimization of solvent strength and selectivity for reversed-phase liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. J Chromatogr., 199, 57-79 (1980).*

*Grieser M. D. and Pietrzyk D. J. Liquid Chromatography on a porous polystyrene-divinylbenzene support. Separation of nitro and chlorophenols. Anal. Chem., 45, 1448-1353 (1973).*

*Goewie C. E., Nielen M. W. F., Frei R. W. and Brinkman U. A. Th. Optimization of precolumn design in liquid chromatography. J. Chromatogr., 301, 325-334 (1984).*

*Golkiewicz W., Werkhoven-Goewie C. E., Brinkman U. A. Th., Frei R. Colin H. and Guiochon G. Use of pyrocarbon sorbents for trace enrichment of polar compounds from aqueous samples with on line HPLC analysis. J. Chromatogr. Sci., 21, 27-33 (1983).*

*Hagen A., Mattusch J. and Werner G. Flow/rate varied HPLC/EC-determination of phenols. Fresenius J. Anal. chem., 339, 26-29 (1991).*

REFERENCIAS.

Hagen D., Markell C. G., Schmitt G. A. and Blevins D. D. Membrane approach to solid-phase extractions. *Anal. Chim. Acta*, 236, 157-164 (1990).

Hall J. R., Florance J. R., Strother D. L. and Wass M. N. EPA method study 14: Method 604-Phenols; Contract No. 68-03-2625, USEPA, 1984.

Hennion M. C. and Coquart V. Comparison of reversed-phase extraction sorbents for the on-line trace enrichment of polar organic compounds in environmental aqueous samples. *J Chromatogr.*, 642, 211-234 (1993).

Howard P. H. Ed., Handbook of Environmental fate and exposure data for organic chemicals. Vol. 1. 3rd printing. Lewis Pub. Michigan. USA. 1990.

Jahangir L. M. and Samuelson O. Chromatography in aqueous solution on styrene-divinylbenzene resins. *J. Chromatogr.*, 193, 197-206 (1980).

Kissinger P. T., Bratin K., King W. P. and Rice J. R. Electrochemical detection of picomole amounts of oxidizable and reducible residues separated by liquid chromatography. In *Pesticide Analytical Methodology. Symposium Series. Harvey J. and Zhoerg A. Eds. Chapter 5. American Chemical Society. 1980.*

Lehotay J., Baloghova M. and Hatik S. HPLC method for determination of phenol in river and waste water. *J. Liq. Chromatogr.*, 16, 999-1006 (1993).

Marko-Varga G. and Barceló D. Liquid chromatographic retention and separation of phenols and related aromatic compounds on reversed phase columns. *Chromatographia*, 34, 146-154 (1992).

Masi O. H. and Gulick W. M. An optimized gas chromatographic determination of priority pollutant phenols. *J. High Res. Chromat. and Cromat. Comm.*, 10, 647-649 (1987).

Massart D. L., Dijkstra A. and Kaufman L. Evaluation and optimization of laboratory methods and analytical procedures. Chapter 6. Elsevier. Amsterdam, 1978.

Miller I and Freund J. E. Probability and Statistics for Engineers. Prentice Hall. Englewood Cliffs. 1965.

Miller J. C. and Miller J. N. Statistics for analytical chemistry. 2nd Ed. Ellis Horwood, London, 1988.

Nielen M. W. F. De Jong J., Frei R. W. and Brinkman U. A. Th. Trace-level determination of phenol by liquid chromatography with On-line precolumn technology and fluorescence detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **25**, 37-48 (1986).

Nondek L. and Chvalovsky V. On-line preconcentration and high performance liquid chromatographic determination of o-toluenesulphonamide in saccharin. *J. Chromatogr.*, **268**, 395-402 (1983).

Nondek L. and Chvalovsky V. On-line preconcentration and liquid chromatography of azaarenes using nitroaromatic sorbents. *J. Chromatogr.*, **312**, 303-312 (1984).

Ong C. P., Lee H. K. and Li S. F. Y. Optimization of mobile phase composition for high-performance liquid chromatographic analysis of eleven priority substituted phenols. *J. Chromatogr.*, **464**, 405-410 (1989).

Piangerelli V. Sostanze fenoliche in acque destinate al consumo umano. *Acqua Aria*, **6**, 541-548 (1992).

Ramsteiner K. A. Systematic approach to column switching. *J. Chromatogr.*, **456**, 3-20 (1988).

Realini P. A. Determination of priority pollutant phenols in water by HPLC. *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 124-129 (1981).

Rennie P. J. and Mitchell S. F. Determination of phenol in raw and potable waters by HPLC multielectrode electrochemical detection. *Chromatographia*, **24**, 319-323 (1987).

Schabron J. F., Hurtubise R. J. and Silver H. F. Separation of alkylphenols by normal-phase and reversed-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, **50**, 1911-1917 (1978).

Schmidh L., Sun J. J. and Fritz J. S. Solid phase extraction of phenols using membranes loaded with modified polymeric resins. *J. Chromatogr.*, **641**, 57-61 (1993).

REFERENCIAS.

Smith R. L. and Pietrzyk J. LC enrichment, separation, and determination of chlorophenols and phenoxyacetic acids on PRP-1. *J. Chromatogr. Sci.*, 21, 282-287 (1983).

Subra P. Analyse en differe et en ligne de la matiere organique contenue dans les eaux potables par les chromatographies. *These de Doctorat de L'Universite Paris VI*. 1989.

Subra P, Hennion M-C, Rosset R and Frei R. W. Recovery of organic compounds from large-volume aqueous samples using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. *J. Chromatogr.* 456, 121-141 (1988).

Subra P, Hennion M-C, Rosset R and Frei R. W. Applications of On-Line precolumn technology to water quality control. *Intern. J. Anal. Chem.* 37, 45-62 (1989).

Shoup R. E. and Mayer G. N. Determination of environmental phenols by liquid chromatography/electrochemistry. *Anal. Chem.*, 54, 1164-1169 (1982).

Trippel P., Maasfeld W. and Kettrup A. Trace enrichment and HPLC analysis of chlorophenols in environmental samples, using precolumn sample preconcentration and electrochemical detection. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 23, 97-110 (1985).

USEPA. Ambient water quality criteria for phenol. United States Environmental Protection Agency. Contract No. EPA-440/5-80-066. *Washington D.C.* 1980a.

USEPA. Ambient water quality criteria for chlorinated phenols. United States Environmental Protection Agency. Contract No. EPA-440/5-80-032. *Washington D.C.* 1980b.

USEPA. Ambient water quality criteria for nitrophenols. United States Environmental Protection Agency. Contract No. EPA-440/5-80-063. *Washington D.C.* 1980c.

USEPA. Method 604-Phenols. *Fed. Regist.* 49, 153 (1984a).

USEPA. Method 625-Base/neutral and acids. *Fed. Regist.* 49, 43290 (1984b).

USEPA. Appendix B to part 136-Definition and procedure for the determination of the Method Detection Limit-Revision 1.11. *Fed. Regist.* 49, 43430 (1984c).

REFERENCIAS.

*Werkhoven-Goewie C. E., Brinkman U. A. Th. and Frei R. W.* Trace Enrichment of Polar compounds of chemically bonded and carbonaceous sorbents and application to chlorophenols. *Anal Chem.*, 53, 2072-2080 (1981).

*Werkhoven-Goewie C. E., Boon W. M., Praat A. J. J., Frei R. W., Brinkman U. A. Th. and Little C. J.* Preconcentration and LC analysis of chlorophenols, using a styrene-divinyl-benzene copolymeric sorbent and photochemical reaction detection. *Chromatographia* 16, 53-59 (1982).

*Zhang G.* Determination of phenolic priority pollutants utilizing permeation sampling method. *Ph. D. Thesis. The University of Akron. USA. 1990.*

*Zhong-Pei H., Takeuchi T. and Ishii D.* Determination of some pollutant phenols in water by MHPLC. *J. High Res. Chromat. and Chromat. Comm.*, 5, 434-436 (1982).