

33
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA ANALITICA
PARA LA DETERMINACION DE LOS HERBICIDAS
2,4-D Y 2,4-DB POR EXTRACCION EN FASE SOLIDA
EN LINEA CON HPLC

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

J O S E L U I S M E R A Z L I R A



MEXICO D. F.

JUNIO DE 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO PARA EL TEMA:

PRESIDENTE: Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA.

VOCAL: M. en C. MARÍA DEL ROSARIO COVARRUBIAS HERRERA.

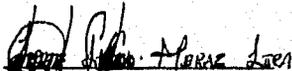
SECRETARIO: M. en C. VÍCTOR MANUEL UGALDE SALDIVAR.

PRIMER SUPLENTE: Q. GEORGINA ARTEMISA DUARTE LISCI.

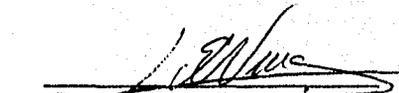
SEGUNDO SUPLENTE : Dra. ARACELI PATRICIA PEÑA ÁLVAREZ.

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.

SUSTENTANTE


JOSÉ LUIS MERAZ LIRA

DIRECTOR DE TESIS


Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

AGRADECIMIENTOS

El esfuerzo necesario para la realización de este trabajo fue arduo, sin embargo es solo una mínima parte si se compara con el apoyo recibido de parte de diversas personas e instituciones y sin el cual, la consecución de la meta hubiera sido particularmente difícil. Por esta razón deseo manifestar mi más profundo agradecimiento y hacerlos partícipes de este logro.

En primer lugar deseo agradecer a mis padres, de forma especial a mi Mamá, por el apoyo y confianza que siempre ha depositado en mí. El amor y la comprensión que me ha brindado es el factor principal que me motiva a una superación constante. No me queda más que decirte "Gracias Mamá por todo lo que has hecho por mí". A mi Papá no me queda más que agradecerle por su apoyo.

De forma muy especial también deseo agradecer a mis hermanos, sin los cuales nunca hubiera logrado concluir mis metas. Solo puedo decirles "gracias Rosa, María, Mago, Vero, Toño y Andrés por todo su apoyo, cariño y comprensión".

Agradezco igualmente a toda mi familia, a mis cuñados y a mis sobrinos, Mención a parte merece Toña(*) por que en el tiempo que estuviste con nosotros, me enseñaste a valorar las cosas que hay a mi alrededor.

AGRADECIMIENTOS

Igualmente deseo agradecer a cada uno de mis profesores que me transmitieron su conocimiento y experiencia a lo largo de mis estudios. Merecen mención especial la Maestra Pilar Rius a la cual le agradezco por sus consejos, la maestra María del Rayo y la maestra Isabel Gracia a las cuales les agradezco su amistad. De manera muy especial manifiesto mi admiración, respeto y cariño a la Facultad de Química de la UNAM, institución que me ha visto crecer y en la cual viví muchos de los momentos más gratos de mi vida.

Manifiesto también mi más sincero agradecimiento a todas las personas que laboran en el laboratorio 115 de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución por que hacen de este lugar de trabajo un sitio muy especial, gracias por su ayuda a Emma, José Luis, Edgar, Joel, Paty, Maestra Anita y Refugio.

También deseo agradecer a la Maestra Rosario por su ayuda y apoyo, así como también por sus valiosos comentarios a este trabajo. Igualmente agradezco a el Maestro Víctor Ugalde por las observaciones realizadas al texto de la tesis.

Asimismo manifiesto mi más sincero agradecimiento a mis compañeros de generación Químicos '92, de manera especial a Elizabeth, Vicky, Nora, Liliana, Maira, Mary, Alicia, a ustedes solo puedo decirles "gracias por su compañía, sigan adelante y cumplan sus metas".

Tal vez al último pero no por eso menos importante, quiero agradecer a la Dra. Luz Elena por que sin su confianza, amistad, apoyo y toda la ayuda que me ha brindado, no amaría a la Química Analítica y además no conocería al fascinante mundo de la Extracción en Fase Sólida.

DEDICATORIAS

A mi Mamá por que su ejemplo siempre me
guiará para una superación constante.

A mi familia por su apoyo y todos los
momentos que hemos vivido juntos.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance très
spécialement à la personne qui a eu le plus
d'influence dans ma vie. Merci beaucoup pour
ton amour, ton affection et ta compréhension.
Le temps que Dieu nous a permis de vivre
ensemble a été le temps le plus heureux de ma
vie. Merci Pili.

DEDICATORIAS

A Horacio(Φ) porque tu ejemplo me enseñó que todo en esta vida se puede lograr y solo es cuestión de poner empeño y dedicación para cumplir nuestros objetivos.

A Ramón, Asgard y César, por ser como hermanos mientras estuvimos en la prepa y posteriormente al egresar.

A Lisbet por su cariño, amistad y confianza, eres la mejor, gracias por todo.

A Elizabeth, por ser más que una excelente amiga, yo también te quiero como una hermana.

A Vicky, con el firme propósito de que nuestra amistad perdure por siempre.

A Maira, gracias por tu compañía y consejos, deseando que alguna vez logremos fortalecer nuestra amistad.

A Nora y Liliana por su amistad esperando que perdure a través del tiempo.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVO	5
<i>Capítulo 1.</i>	7
ENRIQUECIMIENTO Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN AGUA	7
1.1.- MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN Y LIMPIEZA	8
1.1.1 Extracción líquido-líquido.	8
1.1.2 Extracción en Fase Sólida.	9
1.1.2.1.-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA "OFF-LINE" O EN DIFERIDO.	10
1.1.2.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA.	11
1.2.- PROPIEDADES DE LOS HERBICIDAS ÁCIDO CLOROFENOXI.	13
1.3.- MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE HERBICIDAS ÁCIDO CLOROFENOXI.	15
1.4.- CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMISIBLES DE LOS HERBICIDAS.	18
<i>Capítulo 2.</i>	19
DESARROLLO EXPERIMENTAL.	19
2.1 EQUIPOS Y ACCESORIOS.	21
2.1.1 PRECOLUMNAS DE CONCENTRACIÓN.	23
2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.	27
2.2.1 DISOLUCIONES PATRÓN DE HERBICIDAS.	28
2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ÁCIDAS Y BÁSICAS.	29

2.3 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS VOLÚMENES DE CARGA Y DE DESORCIÓN DE LOS HERBICIDAS. _____	30
2.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA. _____	32
2.5. CONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS HERBICIDAS. _____	33
2.6 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS. _____	35
2.7 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y EL PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE LOS HERBICIDAS. _____	36
<i>Capítulo 3.</i> _____	<i>41</i>
RESULTADOS EXPERIMENTALES _____	41
3.1 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE OPERACIÓN. _____	42
3.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN. _____	45
3.3. RECUPERACIÓN DE LOS HERBICIDAS. _____	48
3.5 LÍMITE DE DETECCIÓN. _____	65
3.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DE POZO Y RÍO. _____	71
CONCLUSIONES _____	77
BIBLIOGRAFÍA _____	79

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1.1</i> Extractor continuo líquido-líquido. _____	8
<i>Figura 1.2</i> Principio de la preconcentración sobre un soporte sólido. Procedimiento en diferido. _____	10
<i>Figura 1.3</i> Principio del acoplamiento extracción en fase sólida-Análisis en línea. _____	12
<i>Figura 2.1</i> Diseño de las precolumnas empleadas. _____	23
<i>Figura 2.2</i> Dispositivo empleado para empacar las precolumnas de concentración. _____	25
<i>Figura 2.3</i> Determinación del volumen de fuga y del volumen de desorción por análisis frontal. _____	31
<i>Figura 2.4</i> Diagrama de tratamiento de la muestra. _____	32
<i>Figura 2.5</i> Diagrama de operaciones para concentración de los herbicidas. _____	33
<i>Figura 2.6</i> Diagrama esquemático del sistema de conmutación de válvulas. _____	37
<i>Figura 3.1</i> Separación de los dos herbicidas de interés. _____	47
<i>Figura 3.2</i> Determinación de los herbicidas en muestra de agua fortificada. 1 µg/L. _____	49
<i>Figura 3.3</i> Aplicación del método de análisis de herbicidas desarrollado en este trabajo a una muestra blanco. _____	50
<i>Figura 3.4</i> Definición del intervalo lineal. _____	54
<i>Figura 3.5</i> Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-D _____	55

<i>Figura 3.6 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-DB.</i>	56
<i>Figura 3.7 Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada.</i>	60
<i>Figura 3.8. Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.</i>	61
<i>Figura 3.9 Cromatograma obtenido con una muestra fortificada de 0.2 µg/L.</i>	69
<i>Figura 3.10 Cromatograma obtenido de una muestra fortificada con 0.5 µg/L.</i>	70
<i>Figura 3.11 Cromatograma obtenido del análisis de agua de río.</i>	73
<i>Figura 3.12 Cromatograma obtenido del análisis de agua de pozo.</i>	74

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1.1 Propiedades de 2,4-D y 2,4-DB.</i>	14
<i>Tabla 1.2 Principales características de los métodos desarrollados para la determinación de herbicidas ácido clorofenoxi.</i>	16
<i>Tabla 1.3 Criterios ecológicos de la calidad del agua.</i>	18
<i>Tabla 2.1 Dimensiones y empaques de la columna y precolumnas de concentración empleadas en el método de análisis de herbicidas.</i>	23
<i>Tabla 2.2 Condiciones para el empaqueo de la columna y precolumnas.</i>	24
<i>Tabla 2.3 Pureza de los herbicidas empleados en este trabajo.</i>	27
<i>Tabla 2.4 Pureza y procedencia de los reactivos utilizados.</i>	28
<i>Tabla 2.5 Resumen del método experimental para el análisis de los herbicidas en muestras acuosas.</i>	39
<i>Tabla 3.1 Recuperación obtenida de los herbicidas estudiados.</i>	51
<i>Tabla 3.2 Valores de t_{ca} y de $t_{a2}(n-1)$, para un nivel de significancia $\alpha=0.05$ para comprobar %R.</i>	52
<i>Tabla 3.3 Intervalo de confianza de %R para los datos de los herbicidas en estudio.</i>	53
<i>Tabla 3.4 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-D en la muestra de agua fortificada.</i>	55
<i>Tabla 3.5 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-DB en la muestra de agua fortificada.</i>	56
<i>Tabla 3.6 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 herbicidas pasan por el origen.</i>	59
<i>Tabla 3.7 Intervalo de confianza de las coeficientes a de las rectas de regresión.</i>	59
<i>Tabla 3.8 Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada.</i>	60
<i>Tabla 3.9 Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.</i>	61
<i>Tabla 3.10 Verificación de la hipótesis nula que establece $b=1$.</i>	63
<i>Tabla 3.11 Intervalo de confianza de los coeficientes b de las rectas de regresión.</i>	63
<i>Tabla 3.12 Verificación de la hipótesis nula que establece que las rectas de regresión que describen la variación de la cantidad de herbicida recuperado contra la cantidad de herbicida concentrado pasan por el origen del sistema de coordenadas.</i>	64

<i>Tabla 3.13 Límites de detección (LDM) y porcentajes de recobro (%R) reportados para el análisis en agua de dos herbicidas de la familia Clorofenoxi, aplicando el método 8150 (USEPA, 1984c) de la EPA.</i>	66
<i>Tabla 3.14 Desviación estándar obtenida en el análisis de muestras fortificadas con herbicidas.</i>	67
<i>Tabla 3.15 Límites de detección para los herbicidas estudiados. Utilizando rectas de regresión de los analitos</i>	67
<i>Tabla 3.16 Límites de detección para los dos herbicidas. Utilizando las consideraciones establecidas por la EPA.</i>	67
<i>Tabla 3.17 Porcentajes de recobro de los herbicidas en agua de río.</i>	72
<i>Tabla 3.18. Porcentajes de recobro de los herbicidas en una muestra de agua de pozo.</i>	72

ABREVIATURAS

HPLC = CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN.

PRP = PRECOLUMNA EMPACADA CON COPOLÍMERO ESTIRENO DIVINILBENCENO CHP-3C.

CAN = ACETONITRILO.

2,4-D = ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO.

2,4-DB = ÁCIDO 4-(2,4-DICLOROFENOXI)BUTANOICO.

EFS = EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.

CG = CROMATOGRAFÍA DE GASES.

EPA = AGENCIA DE PROTECCIÓN AMBIENTAL DE LOS ESTADOS UNIDOS.

SDB = RESINA ESTIRENO DIVINILBENCENO.

PLRP-S = RESINA ESTIRENO-DIVINILBENCENO.

PRP-1 = RESINA ESTIRENO-DIVINILBENCENO.

CG-MS = CROMATOGRAFÍA DE GASES CON DETECCIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.

V_f = VOLUMEN DE FUGA.

V_r = VOLUMEN DE RETENCIÓN.

V_m = VOLUMEN CORRESPONDIENTE A LA CANTIDAD MÁXIMA FIJADA.

V_d = VOLUMEN DE DESORCIÓN.

RP-HPLC = COLUMNA ANALÍTICA DE FASE REVERSA PARA HPLC.

UA = UNIDADES DE ABSORBANCIA.

mV = MILIVOLTS.

CV = COEFICIENTE DE VARIACIÓN.

LDM = LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.

ECD = DETECTOR DE CAPTURA DE ELECTRONES.

%R = PORCENTAJE DE RECOBRO.

RESUMEN

El presente trabajo muestra un método para el análisis de herbicidas ácido clorofenoxi en muestras de agua de río y pozo. Los dos herbicidas considerados están sujetos a regulación por organismos ecológicos para la prevención de la contaminación del agua.

El método desarrollado se basa en un sistema de precolumas para extracción en fase sólida que se acopla en línea a la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la detección y cuantificación de los herbicidas.

La extracción y preconcentración de las muestras se efectúa sobre una fase polimérica de estireno divinil-benceno (PRP) bajo condiciones ácidas ($\text{pH}=1$). En esta precolumna se extraen gran parte de las moléculas orgánicas neutras presentes en la muestra de agua. Los compuestos iónicos no retenidos por este adsorbente son eluidos de la precolumna o se eliminan durante el lavado de ésta con agua pura.

Una vez realizada la preconcentración se efectúa un proceso de limpieza de la muestra con ayuda de otra precolumna empacada con un intercambiador de aniones (precoluma aniónica), aprovechando las propiedades ácido-base de los herbicidas. Éstos son desorbidos de la PRP con ayuda de una disolución básica ($\text{pH}=10$), con 10% de ACN y se transfieren a la precoluma aniónica donde los herbicidas son nuevamente adsorbidos. De esta forma se eliminan la mayoría de los compuestos orgánicos interferentes, los cuales permanecen adsorbidos en la PRP.

Por último la precoluma de intercambio iónico se conecta en línea con una columna analítica empacada con una fase reversa C18, mediante válvulas de conmutación. Los herbicidas son eluidos y separados empleando un gradiente binario de fase móvil. La porción acuosa de ambas fases está compuesta por HClO_4 y HCOOH a concentración 0.01 M, con el pH ajustado a 3.82 mediante una disolución de sosa. La fase A es una mezcla de acetonitrilo-disolución acuosa 20:80 (v/v) y la fase B de acetonitrilo-disolución acuosa 80:20 (v/v). El gradiente utilizado es: 0 min-0%B, 5 min-5%B, 20 min-35%B, 21 min-40%B y 40 min-45%B. El análisis de los herbicidas se realiza con un detector UV a una longitud de onda de 280 nm.

RESUMEN

El límite de detección para ambas herbicidas fue de 0.3 $\mu\text{g/L}$ en agua grado HPLC, de 1 $\mu\text{g/L}$ para los dos herbicidas en el agua de pozo analizada, y de 2 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-D y 1 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-DB en el agua de río.

La técnica establecida evita la contaminación y las pérdidas de la muestra por manipulación o por degradación debido a que el proceso de preconcentración y análisis de herbicidas se realiza en línea.

Los resultados obtenidos del análisis con las muestras de agua de río y pozo permiten afirmar que el método es adecuado para efectuar el análisis de los herbicidas en muestras de agua natural.

INTRODUCCIÓN

Los herbicidas son muy utilizados en el mundo para favorecer el desarrollo de cereales al destruir las hierbas malas o malezas de los sembradíos; en especial los herbicidas de la familia clorofenoxi son utilizados por ser herbicidas selectivos, es decir atacan únicamente a las hierbas que producen pérdidas en los cultivos.

En México se utilizan particularmente los herbicidas:

Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).

Ácido 4-(2,4-diclorofenoxi) butanoico (2,4-DB)

Actualmente el empleo de estos herbicidas no tiene un control muy estricto, por lo que en muchos casos son utilizados indiscriminadamente. Este uso indiscriminado provoca que el agua cercana a los campos de cultivo se contamine por la solubilidad de las sales de los ácidos clorofenoxiacéticos en ésta. Debido a la toxicidad de los herbicidas se hizo necesario el implementar técnicas de análisis para efectuar su identificación y cuantificación.

Sin embargo los métodos de análisis establecidos actualmente para los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB implican la utilización de sustancias tóxicas tales como el diazometano (cancerígeno, USEPA, 1984c). Además la preparación de la muestra es larga y minuciosa, presentándose el riesgo de contaminación de la muestra durante su manipulación. Por lo anterior se requiere desarrollar nuevos métodos de análisis que sean más simples, precisos y exactos para el análisis de herbicidas en agua a niveles de trazas y que además no contaminen al ambiente.

FALTA PAGINA

No. 4
6

OBJETIVO

Desarrollar una metodología alternativa a los métodos empleados actualmente para extraer, purificar, identificar y determinar herbicidas clorofenoxi a niveles de concentración del orden de trazas en agua; con base en un sistema de precolumnas para Extracción en Fase Sólida (EFS) acoplado en línea a la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC).

Capítulo 1.

ENRIQUECIMIENTO Y ANÁLISIS DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN AGUA

Actualmente el análisis de la gran variedad de contaminantes orgánicos presentes en muestras de agua se basa 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 la muestra de agua depende principalmente de la volatilidad, la estabilidad térmica y la naturaleza química de los solutos que se pretendan analizar.

Independientemente del método cromatográfico empleado, si 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 y/o preconcentración antes del análisis. 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 sólidos son empleados en la extracción de solutos no volátiles y moderadamente volátiles (Subra, 1989).

1.1.- MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN Y LIMPIEZA

Los métodos más utilizados para efectuar la preconcentración y limpieza de los compuestos orgánicos son:

1.1.1 Extracción líquido-líquido.

Es la preparación de muestra más comúnmente empleada para el análisis de compuestos orgánicos en agua. La extracción líquido-líquido se efectúa manualmente por agitación de la muestra en disolución acuosa con un disolvente orgánico dentro de un embudo de separación, o bien de forma automatizada empleando un extractor líquido-líquido continuo. El extractor líquido-líquido recomendado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) para el enriquecimiento de compuestos orgánicos semivolátiles (básicos, neutros y ácidos) es ilustrado en la figura 1.1. Dependiendo de las condiciones utilizadas, se pueden extraer compuestos de polaridad baja e intermedia, contaminantes débilmente volátiles (extracción universal para semivolátiles neutros) o compuestos ácidos y básicos (extracción selectiva ajustando el pH) .

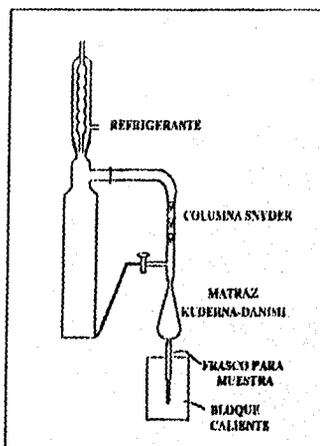


Figura 1.1 Extractor continuo líquido-líquido.

La extracción líquido-líquido, particularmente en su forma manual, puede consumir demasiado tiempo debido a que en muchas ocasiones se forman emulsiones que dificultan la separación de las fases. Además, el volumen del extracto orgánico obtenido es relativamente grande por lo que se requiere de un paso de evaporación para concentrar los solutos de interés, a un nivel tal que puedan ser adecuadamente detectados y cuantificados durante el análisis cromatográfico. Sin embargo no se aprovecha la totalidad del extracto concentrado ya que solo una pequeña alícuota (algunos microlitros) es inyectada en el cromatógrafo, lo que disminuye la sensibilidad del método.

Adicionalmente, el uso y posterior evaporación de grandes volúmenes de disolventes en la extracción líquido-líquido hacen de ésta un proceso caro e intrínsecamente contaminante.

Actualmente los métodos que utilizan la extracción líquido-líquido no son automatizables debido a la dificultad del acoplamiento en línea de este proceso con el sistema cromatográfico de análisis.

Sin embargo, el método estándar para la determinación de los herbicidas ácido clorofenoxi en matrices de agua (EPA) involucra la extracción líquido-líquido de la muestra, concentración y formación de derivados volátiles, con una limpieza adicional, para el posterior análisis por CG. (A.E. Greenberg, 1981)

1.1.2 Extracción en Fase Sólida.

El procedimiento de extracción está basado en los mismos fenómenos que son responsables de la retención en cromatografía de líquidos (adsorción, afinidad, hidrofobicidad, intercambio iónico, etc...). Este tipo de extracción, adecuada para contaminantes de polaridad baja, intermedia y alta, ha ganado una amplia aceptación por ser más rápida que las técnicas clásicas.

Volúmenes relativamente grandes de muestra pueden ser cargados en pequeñas cantidades de soporte. Esto permite que los solutos extraídos y preconcentrados puedan ser desorbidos con un pequeño volumen de disolvente orgánico lográndose factores de enriquecimiento elevados. La introducción de cartuchos de alta resolución (precolumnas) ha contribuido al gran desarrollo de estas técnicas.

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

1.1.2.1.-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: la extracción y la desorción. Estas etapas se presentan en la figura 1.2

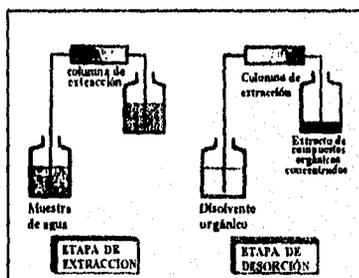


Figura 1.2 Principio de la preconcentración sobre un soporte sólido. Procedimiento en diferido.

Durante la etapa de extracción se fijan los solutos contenidos en la muestra en el soporte 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 éste se obtiene un extracto concentrado de los solutos, el cual se puede analizar mediante procedimientos cromatográficos.

Los procedimientos en diferido presentan inconvenientes debido a que involucran aún varias etapas de manipulación de la muestra, tales como la desorción con disolventes de los solutos concentrados en fase sólida, y la evaporación de dichos disolventes para obtener un extracto concentrado de los compuestos de interés. Por lo tanto aún existe el riesgo de pérdida por degradación de los solutos así como contaminación de la muestra. Adicionalmente, en este caso también se tiene una pérdida de sensibilidad del método debido a que solo se analiza una alícuota del extracto concentrado.

Este procedimiento de extracción para los herbicidas ácido clorofenoxi fue estudiado por A. Betti, 1990 y H. Ohno, 1992. En la mayoría de los casos sus estudios presentan bajos porcentajes de recuperación del analito (dependiendo del autor van de 90 a 40 %) y sus técnicas involucran un gran riesgo de contaminación por manipulación de la muestra. Los límites de detección alcanzados son del orden de $\mu\text{g/L}$ para los solutos estudiados.

1.1.2.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA.

Muchos de los inconvenientes que presenta la extracción en fase sólida en diferido se pueden evitar utilizando métodos de extracción en fase sólida (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, estos son desorbidos y transferidos directamente -mediante la ayuda de válvulas de conmutación (Ramsteiner, 1988)- hacia una columna cromatográfica para su separación y análisis.

La figura 1.3 presenta el principio operacional de la EFS acoplada en línea con el análisis cromatográfico .

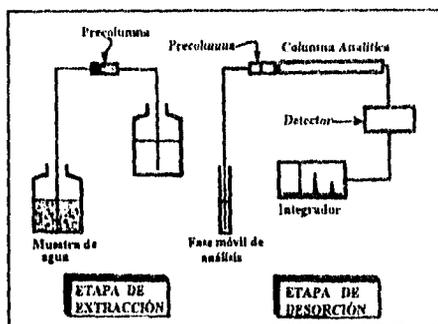


Figura.13 Principio del acoplamiento extracción en fase sólida-Análisis en línea.

Al igual que 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 deber ser pequeñas en comparación con las dimensiones de la columna analítica y ésta deberá empacarse con adsorbentes de granulometría pequeña (Reza, 1995).

Durante la etapa de pretratamiento de la muestra, se puede efectuar una extracción selectiva de los solutos orgánicos de interés a través del acoplamiento de dos o más precolumnas empacadas con fases estacionarias de naturaleza diferente. De esta manera,

1.2 PROPIEDADES DE LOS HERBICIDAS ...

tanto los solutos de baja polaridad como los polares y los iónicos, pueden ser preconcentrados y analizados simultáneamente. Por otra parte la selectividad hacia compuestos específicos también se puede incrementar empleando métodos de detección apropiados.

Debido a que no existe manipulación de la muestra (como en los métodos descritos con anterioridad) entre las etapas de preconcentración y análisis, se reducen considerablemente los riesgos de contaminación o pérdida de la muestra. Además, el total de los analitos extraídos son analizados en el sistema cromatográfico, lo cual incrementa la sensibilidad del método.

1.2 PROPIEDADES DE LOS HERBICIDAS ÁCIDO CLOROFENOXI.

Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)

Es muy utilizado para favorecer el desarrollo de cereales al destruir a la maleza y hierbas localizadas en campos de cultivo. Una vez aplicado persiste en el suelo por 30 días a partir de los cuales es descompuesto (por bacterias las cuales lo metabolizan por un mecanismo de β oxidación dejando como residuo de la reacción al 2,4-diclorofenol). Su persistencia en agua es de 5 meses aproximadamente debido a la baja actividad biológica en este medio. Es poco soluble en agua a altas concentraciones, es soluble en alcoholes y éteres; sus sales de sodio y amonio se disuelven muy bien en agua. En pequeñas cantidades no es tóxico para animales y plantas superiores, pero sí lo es para insectos y para hierbas (como herbicida es regulador del crecimiento). Es un ácido de fuerza media ($pK_a=2.64$) muy corrosivo, su presentación física es un polvo blanco con punto de fusión de 140.5°C .

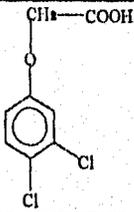
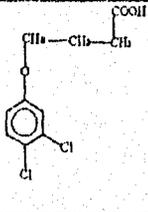
La exposición a concentraciones altas del compuesto ha demostrado que este herbicida es potencialmente cancerígeno.

Ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico (2,4-DB)

Al igual que el 2,4-D es utilizado en el cultivo de cereales para la prevención de malezas, es más selectivo que el 2,4-D y se puede utilizar en cultivos como alfalfa en donde el 2,4-D no es utilizable, este herbicida actúa sobre la β oxidación. Es poco soluble en agua, soluble en acetona, benceno, etanol y éter etílico, sus sales son solubles en agua pero precipitan en presencia de agua dura (debido a la formación de las sales con los iones de calcio y magnesio). Es un ácido débil ($pK_a=4.8$), tóxico e irritante y potencialmente cancerígeno a altas concentraciones. Se presenta en forma de cristales incoloros con punto de fusión de 119-119.5 °C. Al igual que el 2,4-D es degradado por bacterias dando como producto de degradación al 2,4-diclorofenol.

En la tabla 1.1 se presentan las principales propiedades de los herbicidas.

Tabla 1.1 Propiedades de 2,4-D y 2,4-DB.

PROPIEDAD	2,4-D	2,4-DB
ESTRUCTURA		
FORMULA MOLECULAR	$C_8H_6Cl_2O_3$	$C_{10}H_{10}Cl_2O_3$
PUNTO DE FUSIÓN °C	140.5	119-119.5
PESO MOLECULAR	220 g/mol	248 g/mol
CONSTANTE DE DISOCIACIÓN pK_a	2.64	4.8
SOLUBILIDAD EN AGUA A 25°C mg/L	620	46
DOSIS MORTAL mg/Kg	375	700

1.3. MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE HERBICIDAS ÁCIDO CLOROFENOXI

El uso creciente de los herbicidas en el medio agrícola ha promovido el desarrollo de numerosos métodos para su análisis y cuantificación. En términos de instrumentación los procedimientos son diversos, la Cromatografía de líquidos y la Cromatografía de gases son las más empleadas.

Los métodos basados en la cromatografía de gases involucran la utilización de detectores de ionización de flama, captura de electrones o espectrometría de masas. Estos métodos incluyen una etapa de derivatización mediante la cual los herbicidas son convertidos en especies más volátiles y menos polares a fin de facilitar su separación y cuantificación.

Los métodos de Cromatografía de líquidos involucran la utilización de detectores UV.

El método estándar para el análisis de diez herbicidas establecido por la EPA se describe a continuación.

Las muestras son extraídas, hidrolizadas con hidróxido de potasio y los interferentes orgánicos son removidos por medio de lavados con disolventes. Después las muestras son acidificadas y los ácidos clorofenoxi son extraídos, concentrados y derivados a los ésteres metílicos utilizando diazometano. Los ésteres son analizados por inyección directa en cromatografía de gases.

Los límites de detección del método para los dos herbicidas de interés son de 1.2 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-D y de 0.91 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-DB. Los límites de detección para ambos herbicidas en agua de pozo son de 12 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-D y de 9.1 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-DB. La desviación estándar del método para los herbicidas es de 3% para el 2,4-DB en una muestra de 10.3 $\mu\text{g/L}$ y de 4 % para el 2,4-D en una muestra de 10.9 $\mu\text{g/L}$, las recuperaciones obtenidas son de 93% y 75 % respectivamente

CAPÍTULO I ENRIQUECIMIENTO Y ANÁLISIS...

La tabla 1.2 muestra un resumen de los métodos desarrollados para la determinación de herbicidas, y las principales características de cada uno. En general los métodos presentados se basan en la determinación por cromatografía de líquidos, debido a que el análisis por cromatografía de gases en general es similar al método estándar utilizado por la EPA y que se describió con anterioridad.

Tabla 1.2 Principales características de los métodos desarrollados para la determinación de herbicidas ácido clorofenoxi.

Compuestos estudiados	Naturaleza del agua analizada	Método de concentración	características del método	Detección	LDM µg/L	Referencia
2,4-D	Agua de río, concentrar 100 mL, extracción en diferido	EFS con resina intercambiadora de aniones	Análisis por HPLC con % R=80	Detector UV a 280 nm	1	Ohno. H. Et al 1992
2,4-D	Agua de río, concentrar 200 mL extracción en diferido	EFS con dos columnas C18 en línea. dp=5 µm, cartucho comercial	Análisis por HPLC con %R=91.9 (5-250 µg/L)	Detector UV a 280 nm	---	Wells, M. et al 1987
2,4-D	Agua pura fortificada extracción en diferido	EFS, extraídos con columna C18	Análisis por HPLC con %R=80 (10-250 µg/L)	Detector UV a 280 nm	10	S. H. Hoké et al. 1986
2,4-D	Agua de río análisis en línea	Membrana líquida	Análisis por HPLC Con %R=56.4 (0.05-0.1 ppm)	Detector UV a 280 nm	100	Göran Nilve et al 1984.
2,4-D	Agua de río Análisis en diferido (5 L) y análisis en línea 150 mL	EFS precolumna con resina estireno-divinilbenceno y con columna C18	Análisis por HPLC % de R En diferido(1) C18=44% SDB=59% En línea(2) C18=74% SDB=82%	Detector UV a 200 nm	(1) 0.2 (2) 0.05	S. Chiron et al. 1994
2,4-D	Agua de pozo Agua de río análisis en línea	EFS precolumna PLRP-S y PRP-1	Análisis por HPLC % de R 87% y 101 %	Detector UV a 230 nm	---	R.B. Geerdink 1989

Tabla 1.2 Principales características de los métodos desarrollados para la determinación de herbicidas ácido clorofenoxi. (Continuación)

Compuestos estudiados	Naturaleza del agua analizada	Método de concentración	características del método	Detección	LDM µg/L	Referencia
2,4-D 2,4-D (éster metílico)	Inyección de la muestra en metanol	—	Análisis por HPLC	Detector UV a 280 nm	20 ng para el éster	C. Sanchez 1991
2,4-D (éster metílico)	Inyección de la muestra en metanol		Análisis por CG	CG-MS.	20 ng para el éster	C. Sánchez 1991
2,4-D 2,4-DB	Agua de río análisis en línea	EFS precolumna PLRP-S	Análisis por HPLC %R >85	Detector UV a 230 nm	0.05-0.1	R.B. Geerdink 1991
2,4-D 2,4-DB	Agua de río análisis en diferido	ELL Disolvente diclorometano	Análisis por HPLC 67 % de R 81 % de R	Detector UV a 230 nm	80 90	W. Schüssler 1990
2,4-D	Agua pura fortificada concentración en línea de 50 a 250 mL	EFS copolímero PRP dp. 10µm. 50 x 4.2 mm di.	Análisis por HPLC	UV a 254 nm	—	Smith et al., 1983
2,4-D 2,4-DB	Agua pura fortificada concentración en diferido	copolímero PRP	Análisis por HPLC 101% 99%	UV a 230 nm	10 50	A. Betti. 1990.
2,4-D 2,4-DB	Agua río análisis de ELL en diferido análisis de EFS en línea	ELL EFS	Análisis por HPLC Para ELL %R son 103 Para EFS %R para 2,4-D= 88.1	Para ELL UV a 280nm Para EFS UV a 230	—	R. Hamann 1987.

1.4. CONCENTRACIONES MÁXIMAS PERMISIBLES DE LOS HERBICIDAS.

Las concentraciones máximas permitidas que recomiendan los organismos ecológicos se presentan a continuación en la tabla 1.3,

Tabla 1.3 Criterios ecológicos de calidad del agua. Niveles máximos en µg/L.

SOLUTO	FUENTE DE ABASTECIMIENTO DE AGUA POTABLE	RECREATIVO CON CONTACTO PRIMARIO	AGUA EN ZONAS DE RIEGO DE MAÍZ	AGUA EN ZONAS DE RIEGO DE CAÑA DE AZÚCAR.	VIDA ACUÁTICA
2,4-D	100 ^{1,2,3}	1 ⁴ 10 ^{2,3}	100 ¹ 70 ²	200 ¹	-----
2,4-DB	200 ²	---	100 ¹	200 ¹	Afecta a los peces, pero no se tiene un valor específico.

1.- Norma ecológica Mexicana.

2.- Norma ecológica U.S.A

3.- Norma ecológica Canadiense.

4.- Norma ecológica establecida por la Organización Mundial de la Salud.

Capítulo 2.

DESARROLLO EXPERIMENTAL.

En los últimos años se han desarrollado un gran número de métodos cromatográficos que involucran diversas técnicas de concentración para los herbicidas, las cuales son: Extracción Líquido-Líquido(A.E Greenberg) y Extracción en Fase Sólida (EFS), con la posibilidad de utilizar ésta en diferido (A. Betti, 1990 y R Schuster, 1991) o en línea (R.B. Greerdink, 1991 y R.L. Smith, 1983). La Extracción Líquido-líquido(ELL) tiene el problema de requerir una continua manipulación de la muestra para la extracción, derivación y lavado de los analitos antes de su análisis, lo que lleva a posible contaminación de la muestra y, en general, bajos porcentajes de recobro. En la Extracción en Fase Sólida en línea el principal problema que se presenta es la interferencia de un gran pico de matriz con los analitos de interés. Este gran pico es debido a los diversos solutos provenientes de la muestra de agua que también se concentran. En el caso de la Extracción en Fase Sólida en diferido se presenta además el problema de un bajo porcentaje de recobro y posible contaminación de la muestra por manipulación.

El análisis de los diversos métodos y procedimientos publicados para la determinación de herbicidas en agua demuestra que aún se requiere de un método analítico

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

que, además de cumplir con las características de exactitud, precisión, selectividad y sensibilidad, sea sencillo, rápido, confiable y automatizable. Por ello, este trabajo está enfocado a la implementación de un método que reúna estas características.

El estudio aquí presentado tiene como antecedente varios trabajos desarrollados en el laboratorio de cromatografía de líquidos de la Facultad de Química, UNAM, para la determinación de diversos contaminantes en agua, utilizando la tecnología de los sistemas de precolumnas en línea. En particular, el método desarrollado por P. Padilla para el análisis de un grupo de seis ácidos clorofenoxi en agua ha servido como base del presente estudio.

A continuación se describe el procedimiento de extracción en fase sólida y análisis en línea implementado en este trabajo para el análisis de los herbicidas: ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico en muestras de agua.

A grandes rasgos el procedimiento consiste en efectuar la preconcentración de los herbicidas mencionados sobre una precolumna, empacada con una resina polimérica de estireno-divinilbenceno (precolumna PRP). Posteriormente se efectúa la remoción de los compuestos inorgánicos a través de un lavado de la precolumna con un pequeño volumen de agua; los herbicidas concentrados en ésta son transferidos en línea hacia una segunda precolumna empacada con un intercambiador de aniones base fuerte (precolumna Aniónica). Esta transferencia permite llevar a cabo un paso de purificación aprovechando las propiedades ácido-base de los herbicidas, debido a que otros solutos no ionizables concentrados en la columna PRP permanecen adsorbidos en ella. Finalmente, los herbicidas retenidos en el intercambiador de aniones en forma de iones acetato y butirato, son transformados en parte a su forma molecular y transferidos en línea a la columna analítica C18 en donde se efectúa su separación. La detección de los solutos 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 Gilson con dos bombas modelo 305 y 306 para gradiente, equipado con manómetro Gilson 805 y mezclador Gilson 811 B (a este sistema lo llamaremos "Bomba P1").
- ♣ Inyector Altex 210A con rizo de 22 μ L (válvula C).
- ♣ Columna de acero inoxidable de 150 x 4.6 mm (d.i.), empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μ de diámetro de partícula (Phase Separations).
- ♣ Detector UV con arreglo de diodos, Spectromonitor modelo 5000 de Thermoline Separations que permite trabajar a diferentes condiciones de sensibilidad y longitud de onda. En este trabajo el detector se utilizó únicamente a una longitud de onda de 280 nm.
- ♣ Integrador Hewlett Packard (HIP 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 210 A. Esta bomba será denominada en lo sucesivo "bomba P2"

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

- ♦ Dos válvulas (A y B) de conmutación de seis puertas (Rheodyne 7 000), las cuales junto con el inyector (válvula C), están montadas sobre un soporte metálico perforado *ad hoc*. La válvula A se encuentra conectada al inyector del sistema cromatográfico (puerta 2), a la válvula de conmutación B (puertas 3 y 5), a la bomba P2 (puerta 6) y a la precolumna PRP (puertas 1 y 4). Por otra parte, la válvula B está unida a la válvula A (puertas 2 y 6), a la precolumna aniónica (puertas 1 y 4), a una salida de desecho (puerta 5) y a la columna analítica (puerta 3).

Otros equipos y/o accesorios adicionales son los siguientes:

- ♣ Purificador y desionizador de agua NANOpure (Barnsted modelo 04747).
- ♣ Baño de ultrasonido para degasificar soluciones y fases móviles (sonicor, modelo SC-100)
- ♣ Micropipeta de volumen variable 50 a 200 μl (Scorex, modelo 811/821).
- ♣ Micropipeta de volumen variable 200 a 1000 μl (Scorex, modelo 811/821).
- ♣ Micropipeta de volumen variable 5 a 50 μl (Scorex, modelo 811/821).
- ♣ Sistema para empacado de columnas a alta presión (Haskel, modelo 29426).
- ♣ pH metro (Corning, modelo 220) equipado con un electrodo combinado de vidrio calomel (Cole-Palmer, modelo 60648).
- ♣ Sistema de filtración de vidrio (Millipore, modelo OM027).

2.1 EQUIPOS Y ACCESORIOS.

- ◆ Membranas de filtración de 47 mm de diámetro, con poro de 0.45 μm (Phenomenex AFO-0504))
- ◆ Balanza analítica Ohaus.

2.1.1 PRECOLUMNAS DE CONCENTRACIÓN:

Tanto las precolumnas como la columna analítica fueron empacadas en el laboratorio con ayuda del sistema de empaçado mencionado anteriormente.

En la figura 2.1 se presenta el diseño general de las precolumnas y la columna analítica. Todos los componentes de éstas son de acero inoxidable. En la tabla 2.1 se indican las dimensiones, así como los adsorbentes de empaque utilizados. En la tabla 2.2 se presentan las condiciones para efectuar el empaçado de las columnas

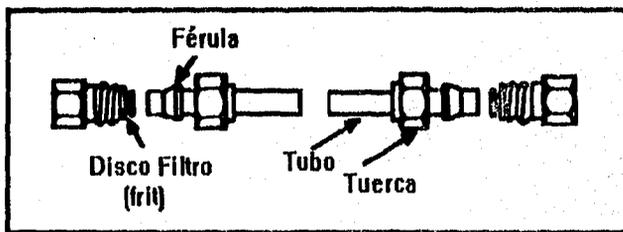


Figura 2.1 Diseño de las precolumnas empleadas en este trabajo para la preconcentración en fase sólida de los herbicidas.

Tabla 2.1 Dimensiones y empaques de la columna y precolumnas de concentración empleadas en el método de análisis de herbicidas

DIMENSIONES DE LA PRECOLUMNA	NATURALEZA DEL ADSORBENTE	DIÁMETRO DE PARTÍCULA	PROCEDENCIA COMERCIAL DEL ADSORBENTE
20 x 2 mm (precolumna)	Copolimero estireno-divinilbenceno CHP-3C	10 μ m	Mitsubishi Chemical Industries
20 x 2 mm (precolumna)	Polimero intercambiador de aniones PRP-X100	10 μ m	Hamilton Co
150 x 4.6 mm (columna)	Spherisorb-ODS-2	5 μ m	Phase Separations

Tabla 2.2 Condiciones para el empaqueo de la columna y precolumnas

COLUMNA	DISOLUCIÓN PARA LA SUSPENSIÓN DEL EMPAQUE	PRESIÓN (psi)	VOLUMEN DE DISOLVENTE PARA EMPACAR (mL)
Aniónica	NaOH (pH=13)- Metanol (40:60 v/v)	2100	60
PRP	Metanol (ligeramente ácido)	3000	60
RP-HPLC (Analítica)	Acetona-Etanol (50:50 v/v)	7500	140

La figura 2.2 muestra el dispositivo que permite empacar las precolumnas a presiones relativamente grandes lo cual genera un empaqueo homogéneo y compacto.

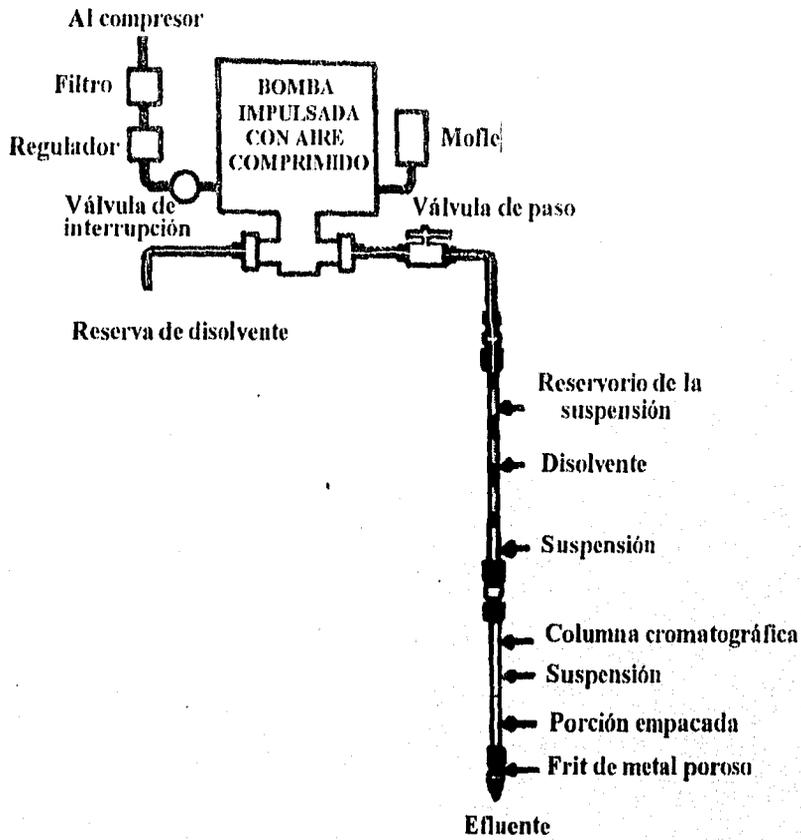


Figura 2.2 Dispositivo empleado para empacar las precolumnas de concentración.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

La metodología para el empaque es la siguiente: Inicialmente se prepara una suspensión de la fase estacionaria en un disolvente adecuado y se sumerge 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 dispersar los aglomerados de soporte formados. Simultáneamente se degasifican alrededor de 20 mL del disolvente empleado para efectuar la suspensión de la fase estacionaria. La precolumna a empacar se llena con este disolvente y se conecta al reservorio de suspensión. Entonces, la suspensión de la fase estacionaria se vierte rápidamente en el reservorio y éste se conecta al sistema de presión. Una vez efectuada la conexión, la presión se incrementa hasta alcanzar la establecida en la tabla 2.2 para cada precolumna y se abre la llave de paso. Esto permite que la fase estacionaria sea proyectada a gran velocidad hacia la precolumna, empacándose homogéneamente. Después de pasar un volumen adecuado (tabla 2.2) del disolvente de empuje, la bomba se para y cuando el sistema se despresuriza completamente la precolumna se desconecta. Finalmente el exceso de empaque depositado en la parte superior de la precolumna se retira cuidadosamente con 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.

La precolumna PRP se sometió a los siguientes pasos para su limpieza y activación.

- 1.-Lavado con 20 mL de agua.
- 2.-Lavado con 30 mL de etanol.
- 3.-Lavado con 40 mL de agua.
- 4.-Lavado con 20 mL de NaOH pH=12.
- 5.-Lavado con 20 mL de agua.
- 6.-Lavado con 20 mL de HClO₄ pH=1
- 7.-Lavado con 40 mL de agua.

2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.

Para la precolumna Aniónica se siguió el siguiente procedimiento de limpieza y activación.

- 1.-Lavado con 20 mL de agua.
- 2.-Lavado con 40 mL etanol.
- 3.-Lavado con 20 mL de agua.
- 4.-Lavado con 40 mL de NaOH pH=12.
- 5.-Lavado con 40 mL de agua.

Una vez que se concluyen estas operaciones de lavado las precolumnas están listas para emplearse en los estudios de preconcentración y análisis en línea.

Con la columna analítica se siguió el siguiente procedimiento de limpieza.

- 1.-Lavado con 20 mL de agua.
- 2.-Lavado con 30 ml de Etanol.
- 3.-Lavado con 20 mL de agua.
- 4.-Lavado con 20 ml de una mezcla Acetonitrilo:Agua (80/20).

Los procesos de lavado y activación se efectuaron con ayuda de la bomba P2.

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 los herbicidas empleados fueron suministrados por Chem service Co. La pureza de cada uno de estos compuestos se indica en la tabla 2.3.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

Tabla 2.3 Pureza de los herbicidas empleados en este trabajo.

SOLUTO	PUREZA
Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)	99%
Ácido 4(2,4-Diclorofenoxi)butanoico (2,4-DB)	99%

La pureza así como la procedencia de otros reactivos empleados en este trabajo se presentan en la tabla 2.4.

Tabla 2.4 Pureza y procedencia de los reactivos utilizados.

REACTIVO	CARACTERÍSTICAS Y PROCEDENCIA
Ácido perclórico	Reactivo analítico 70-72% Aldrich Chemical Co.
Ácido fórmico	98% mínimo Merck, Co.
Hidróxido de sodio	98%, bajo en contenido de carbonatos (0.4 % como carbonato de sodio). Merck, Co.

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

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 5 minutos antes de utilizarse.

2.2.1 DISOLUCIONES PATRÓN DE HERBICIDAS.

Para los diversos estudios de preconcentración y análisis cromatográfico se preparó una disolución patrón de los herbicidas indicados en la tabla 2.3.

2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS.

La concentración de cada disolución patrón fue de 990 mg/L de los herbicidas correspondientes en metanol. Se utilizó este disolvente debido a la gran solubilidad de los herbicidas en él. Además, brinda la posibilidad de tener disoluciones concentradas de los analitos en metanol por periodos de tiempo relativamente largos (aproximadamente 4 meses) sin que se presenten indicios de degradación (Padilla, 1996).

La disolución patrón se empleó para preparar disoluciones estándar menos concentradas (disoluciones de trabajo). La toma de la alícuota de la disolución patrón se efectuó con ayuda de una micropipeta de volumen variable.

Tanto las disoluciones de trabajo como la disolución patrón se mantuvieron en refrigeración. Todas las disoluciones se hicieron con metanol únicamente.

2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ÁCIDAS Y BÁSICAS

Las disoluciones de ácido perclórico (HClO_4) y fórmico (HCOOH) 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 2.4.

Las disoluciones de hidróxido de sodio se prepararon a partir del reactivo de la tabla 2.4. Para preparar la disolución de hidróxido de sodio se utilizó un matraz Erlenmeyer de polietileno (nalgene).

El pH de todas las disoluciones (se midió el pH de la porción acuosa) 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 cada disolución.

2.3 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL DE LOS VOLÚMENES DE CARGA Y DE DESORCIÓN DE LOS HERBICIDAS

Este paso se efectuó con el montaje descrito en la figura 2.6, debido a que se recomienda utilizar todo el montaje para determinar el volumen de carga (M.C Hennion), Un estudio inicial con una disolución del herbicida menos hidrofóbico en agua acidulada a $\text{pH}=1$ demostró que se pueden cargar 200 mL de la muestra en la precolumna PRP sin pérdida del analito. Sin embargo el 2,4-DB al ser más hidrofóbico tiende a quedarse adsorbido en las paredes del recipiente que contiene la muestra acuosa. Por ello se optó por agregar a la muestra un disolvente orgánico que permitiera disminuir los efectos hidrofóbicos sobre el 2,4-DB, este disolvente fue metanol. Utilizando una concentración cercana al 5 % v/v se logró una buena recuperación del 2,4-DB, pero el 2,4-D comenzó a fugarse de la precolumna a un volumen menor al determinado con anterioridad. Después de varios ensayos se llegó a la conclusión de que las mejores condiciones para efectuar la concentración de los dos herbicidas son: carga de 75 mL de muestra de muestra acuosa a $\text{pH}\approx 1$ con 5 % de metanol.

Para la desorción de los herbicidas de la precolumna PRP se ensayaron disoluciones acuosas de pH 10-11, pero este disolvente no fue capaz de desorber completamente al 2,4-DB. La adición de un pequeño volumen de acetonitrilo a la disolución básica fue la solución del problema. Con únicamente 10% de acetonitrilo en la disolución de sosa se logró transferir el total de los herbicidas a la precolumna Aniónica. El volumen requerido para llevar a cabo la transferencia fue de 6 mL de la mezcla sosa ($\text{pH}=10$): acetonitrilo 90:10 v/v

La figura 2.3 Muestra los conceptos de volumen de fuga y volumen de desorción. Donde en una curva de fuga:

- ◆ Volumen de fuga (V_f) se define como el volumen en donde la absorbancia alcanza el 1% de su valor total.
- ◆ Volumen de retención (V_r) se define como el volumen en donde esta situado el punto de inflexión de la curva de fuga (al 50% de la absorbancia total de la muestra).

2.3 DETERMINACIÓN EXPERIMENTAL...

- ◆ Volumen correspondiente a la cantidad máxima fijada (V_m) corresponde al volumen en donde se tiene el 99% de la absorbancia total de la muestra.

En una curva de desorción:

- ◆ Volumen de desorción (V_d): Es definido como el volumen que corresponde al 1% del total de la absorbancia de la muestra.

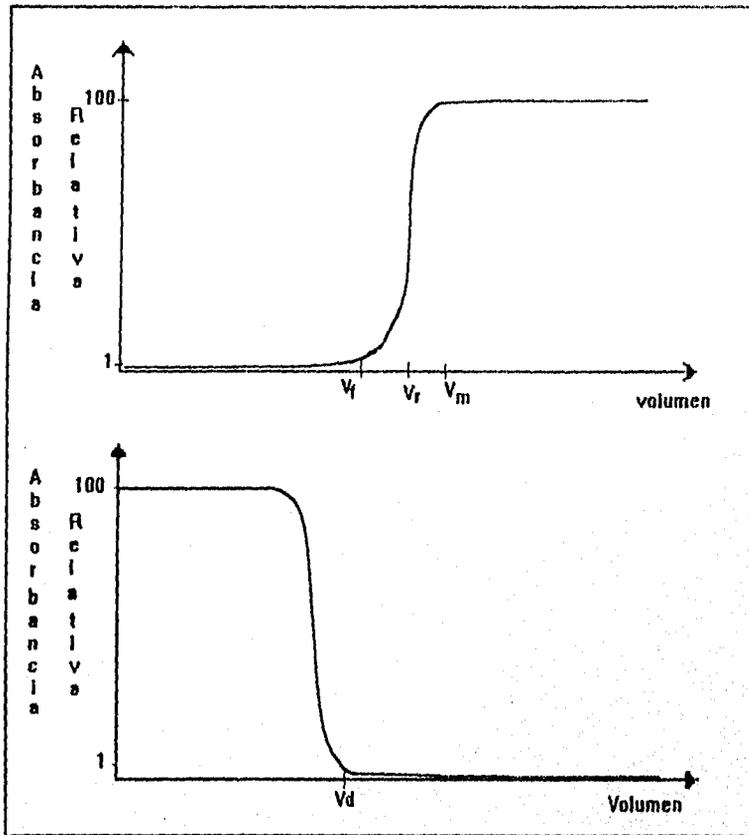


Figura 2.3 Determinación del volumen de fuga y del volumen de desorción por análisis frontal. V_f = Volumen de fuga, V_r = volumen de retención, V_m =volumen correspondiente a la cantidad máxima fijada, V_d =volumen de desorción. (Subra 1989)

2.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

El procedimiento experimental para el tratamiento de la muestra se presenta por medio del siguiente diagrama.

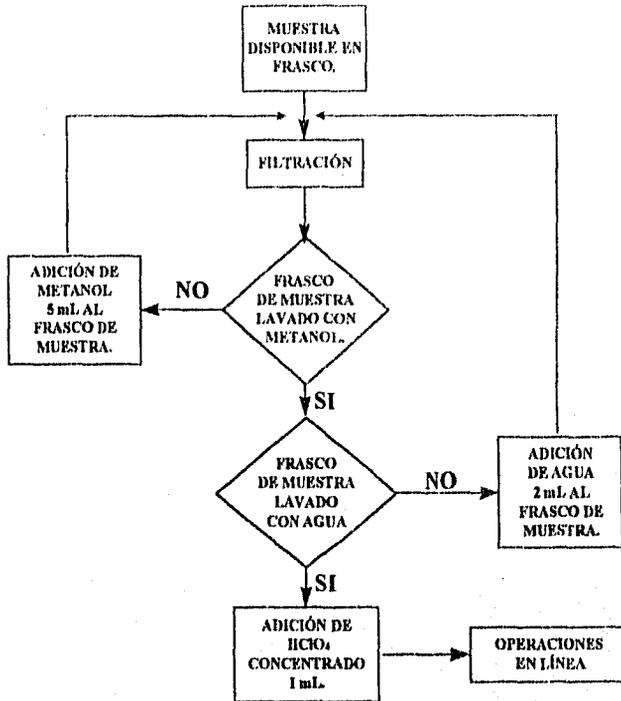


Figura 2.4 Diagrama de tratamiento de la muestra.

De esta forma tenemos preparada la muestra para comenzar el proceso de concentración, La filtración de la muestra tiene como objeto eliminar sales o sólidos en suspensión que se encuentran presentes en aguas naturales (los resultados de recuperación de los solutos indican que la membrana no retiene los herbicidas cuando se opera según el procedimiento esquematizado).

2.4 TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

El lavado con metanol evita que alguno de los analitos se quede adsorbido en las paredes del frasco que contiene la muestra.

El lavado con 2 mL de agua es para que todo el metanol remanente en el frasco pase a la disolución filtrada.

La adición de ácido perclórico tiene como fin el establecer un pH ácido para tener a los herbicidas en su forma molecular y lograr una mejor retención de éstos en la columna PRP.

2.5. CONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS HERBICIDAS.

A continuación el siguiente esquema nos muestra las operaciones efectuadas para la concentración de los herbicidas.

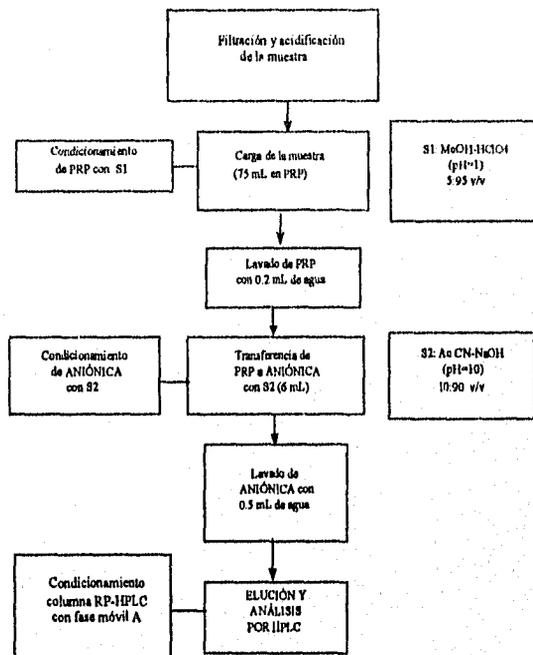


Figura 2.5 Diagrama de operaciones para concentración de los herbicidas.

CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

El condicionamiento de la PRP se lleva a cabo con 20 mL de S₁ a un flujo de 1 mL/min.

El lavado de la precolumna PRP con agua se efectúa a un flujo de 0.2 mL/min.

El condicionamiento de la precolumna aniónica se hace a 2 mL/min con un volumen de 20 mL de S₂.

El lavado de la precolumna aniónica con agua se efectúa a flujo de 0.2 mL/min.

El condicionamiento de la columna RP-HPLC (columna analítica) se realiza con 12 mL de la fase móvil A a flujo de 1 mL/min..

Simultáneamente al proceso de carga de la muestra mediante la bomba P₂ se efectúa la inyección y análisis cromatográfico de una disolución estándar de los herbicidas mediante la bomba P₁. Este último servirá posteriormente como referencia (estándar externo) para calcular la concentración de los herbicidas en la muestra analizada. En el caso de los estudios de recuperación es el estándar inyectado el mismo que se utiliza para fortificar la muestra acuosa. La concentración de los herbicidas en el estándar es 3600 veces mayor que en la muestra. Las inyecciones de estándar se hacen pasar por la precolumna aniónica y la columna analítica acopladas en línea, con el objeto de que el proceso cromatográfico para el estándar y la muestra sea similar.

Una vez terminado el proceso de carga y transferencia de la muestra, la columna PRP se lava con 20 mL de agua y 20 mL de metanol. Estos lavados se efectúan con la bomba P₂, mientras la muestra es eluida y analizada (bomba P₁)

Por otra parte, al terminar el análisis cromatográfico, las columnas aniónica y analítica que se encuentran acopladas en línea se lavan con 10 mL de fase móvil B, 20 mL de agua y 20 mL de una mezcla acetonitrilo:agua 80:20 v/v.

2.5 CONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS HERBICIDAS.

Una vez concluidos estos lavados, las respectivas columnas quedan limpias, regeneradas y están listas para el análisis de una nueva muestra.

El tiempo total requerido para efectuar el análisis de los herbicidas en muestras acuosas mediante el procedimiento experimental descrito con anterioridad es de aproximadamente 3 horas incluyendo lavados y regeneración de las columnas.

2.6 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA LA SEPARACIÓN Y DETECCIÓN DE LOS HERBICIDAS.

A continuación se presentan las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de los herbicidas.

FASE ESTACIONARIA

Columna Analítica (RP-HPLC): 150 X 4.6 mm. d.i., empacado con Spherisorb-ODS-2 de 5 μ m.

FASE MÓVIL:

Flujo 1 mL/min. Temperatura: Ambiente

Fase A: Acetonitrilo-Agua (pH=3.82) 20:80 v/v, con HClO₄ 0.01M y HCOOH 0.01M. El pH es ajustado con NaOH

Fase B: Acetonitrilo-Agua (pH=3.82) 80:20 v/v, con HClO₄ 0.01M y HCOOH 0.01M. El pH es ajustado con NaOH

GRADIENTE EMPLEADO:

TIEMPO (min)	0	5	20	21	40
% B	0	5	35	40	45

Condiciones del detector UV:

Longitud de onda	280 nm
Sensibilidad	0.05 UA/mV
Constante de Tiempo	0.5 seg

2.7 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO EXPERIMENTAL Y EL PROCEDIMIENTO PARA LA PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE LOS HERBICIDAS.

El dispositivo para la preconcentración de los herbicidas, así como su subsecuente desorción y análisis en línea se presenta en la figura 2.6.

En este dispositivo **A** y **B** son dos válvulas de conmutación; **C** es una válvula de inyección 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. Todos los conectores son de polímero Peek® de acero inoxidable.

En la figura 2.6 **A**, las válvulas de conmutación **A** y **B** se encuentran en la posición "CARGA", con respecto al flujo de la bomba **P1**. La válvula de inyección (**C**) también se encuentra en la posición de CARGA

En la figura 2.6 **B** las válvulas de conmutación **A** y **B** se encuentran en la posición "INYECCIÓN", con respecto al flujo de la bomba **P1**. La válvula de inyección (**C**) también se encuentra en la posición de INYECCIÓN.

Las combinaciones de posiciones de las válvulas mostradas en la figura 2.6 no se utilizan durante el proceso experimental y sólo sirven para ilustrar las posibles direcciones de los flujos provenientes de las bombas **P1** y **P2**.

La precolumna adaptada a la válvula de conmutación **B** es la precolumna Aniónica de 20 x 2 mm (di). La precolumna de concentración adaptada a la válvula de conmutación **A** es la precolumna PRP de 20 x 2 mm (di).

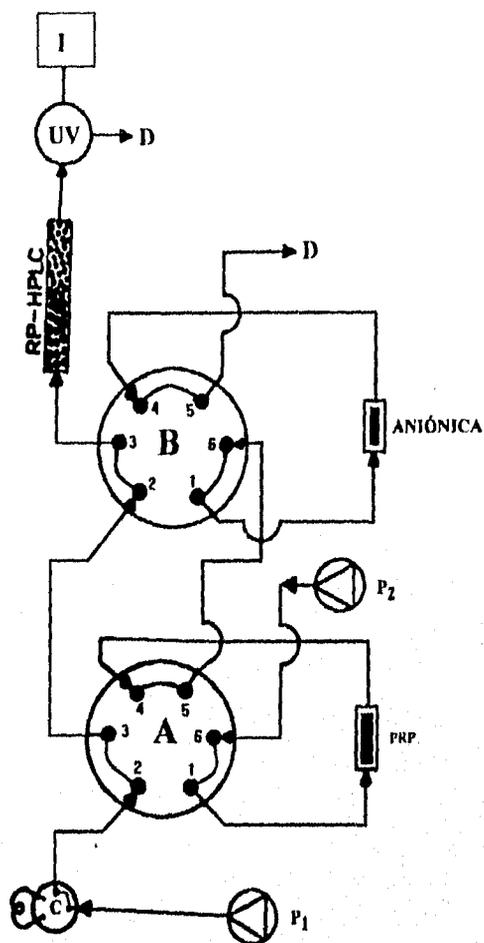


Figura 2.6 A Diagrama esquemático del sistema de conmutación de válvulas empleado en este trabajo para la preconcentración en fase sólida y análisis en línea de herbicidas presentes en muestras de agua. (Nomenclatura: P1, P2:Bombas; A, B:Válvulas de Conmutación; C:Inyector; UV:Detector; I: Integrador; D: Frasco de residuos.

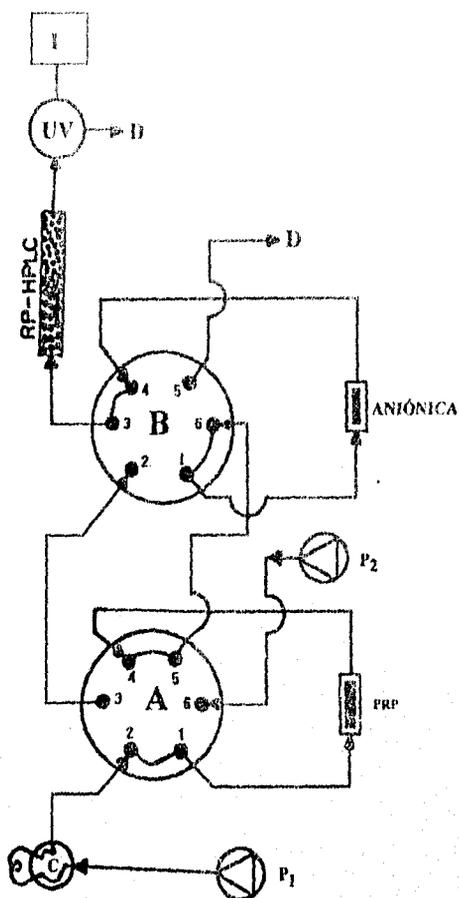


Figura 2.6 B Diagrama esquemático del sistema de conmutación de válvulas empleado en este trabajo para la preconcentración en fase sólida y análisis en línea de herbicidas presentes en muestras de agua. (Nomenclatura: P1,P2:Bombas; A, B:Válvulas de Conmutación; C:Inyector; UV:Detector; I: Integrador; D: Frasco de residuos.

2.7 DESCRIPCIÓN DEL EQUIPO Y EL PROCEDIMIENTO.

En la tabla 2.5 se presenta un resumen del método de análisis antes descrito, en esta tabla se indican además la posición que deben guardar las válvulas de conmutación e inyección del dispositivo presentado en la figura 2.6 durante las diversas etapas del método.

Tabla 2.5 Resumen del método experimental para el análisis de los herbicidas en muestras acuosas.

ETAPA	OPERACIÓN	FLUJO (ml/min) Y BOMBA EMPLEADA	POSICIÓN DE LA VÁLVULA B (PRECOLUMNA ANIÓNICA)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA A (PRECOLUMNA PRP)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA C
1	PRP equilibrada con 20 mL de HClO ₄ (pH=1) con 5% de metanol	(1) Bomba P ₂	Inyección	Carga	Inyección o Carga
2	Carga en PRP 75 mL de disolución acuosa de herbicidas (pH=1)	(1) Bomba P ₂	Inyección	Carga	Inyección o carga
3*	Columna analítica equilibrada con 12 mL de fase A	(1) Bomba P ₁	Inyección	Carga	Carga
4*	Inyección de alícuota de 22 µl de disolución patrón de herbicidas	(1) Bomba P ₁	Inyección	Carga	Inyección
5*	Lavado de Aniónica y analítica con 10 mL de fase B	(1) Bomba P ₁	Inyección	Carga	Inyección o Carga
6	Lavado de PRP con 0.2 mL de agua	(0.2) Bomba P ₂	Inyección	Carga	Inyección o Carga

Tabla 2.5 Resumen del método experimental para el análisis de los herbicidas en nuestras acuosas. (Continuación)

ETAPA	OPERACIÓN	FLUJO (mL/min) Y BOMBA EMPLEADA	POSICIÓN DE LA VÁLVULA B (PRECOLUMNA ANIÓNICA)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA A (PRECOLUMNA PRP)	POSICIÓN DE LA VÁLVULA C
7	Aniónica equilibrada con 20 mL de NaOH pH=10 con 10% de ACN	(2) Bomba P ₂	Carga	Inyección	Inyección o Carga
8	Transferencia de PRP a Aniónica con 6 mL de NaOH pH=10 con 10% de ACN	(0.5) Bomba P ₂	Carga	Carga	Inyección o Carga
9	Lavado de Aniónica con 0.5 mL de agua	(0.2) Bomba P ₂	Carga	Inyección	Inyección o Carga
10	Elución de Herbicidas de la columna Aniónica para su determinación	(1) Bomba P ₁	Inyección	Carga	Inyección o Carga
11	Lavado de PRP con 20 mL de agua y 20 de MEOH	(1) Bomba P ₂	Inyección	Carga	Inyección o Carga
12	Lavado de Aniónica y Analítica con 20 mL de agua y 20 mL de ACN al 80%.	(1) Bomba P ₁	Inyección	Carga	Inyección o Carga

*Las etapas 3, 4 y 5 se realizan simultáneamente a la etapa 2.

Capítulo 3.

RESULTADOS EXPERIMENTALES

El objetivo de este trabajo fue el de desarrollar un método rápido para el análisis de herbicidas en muestras de agua que comúnmente contienen estos compuestos, como son las aguas de ríos y pozos aledaños a zona agrícolas.

El método empleado por la EPA para la determinación de herbicidas, además de ser largo y tedioso presenta un bajo porcentaje de recuperación de éstos, lo cual puede deberse al exceso de manipulación de la muestra durante su preparación.

Debido a lo anterior se desarrolló un método analítico que permite efectuar la determinación selectiva de herbicidas a concentraciones del orden de $\mu\text{g/L}$ en muestras de agua reales, es decir, en presencia de muchos otros compuestos de naturaleza apolar, moderadamente polar o iónica. Los herbicidas considerados en el estudio fueron el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético y el ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico

3.1 ESTABLECIMIENTO DE CONDICIONES DE OPERACIÓN.

Para el pretratamiento de las muestras acuosas se emplean precolumnas de pequeñas dimensiones en comparación a la columna analítica, empacadas con soportes sólidos de granulometría pequeña. En condiciones ideales (Subra), estos adsorbentes deben poseer las siguientes características: una gran estabilidad mecánica (resistencia a la presión), una buena estabilidad química (resistencia a hidrolizarse), un alto grado de pureza, una gran superficie específica, estructura macroporosa, no deben degradar a los solutos ni presentar fenómenos de adsorción irreversible y además su regeneración al estado inicial debe ser rápida.

Se ha demostrado que los compuestos moderadamente polares se extraen mejor en el material del tipo PRP que en uno de tipo C18. (Trippel, 1985, C.E. Werkhoven-Goewie, 1982)

Ronald L. Smith y Donald J. Pietrzyk, encontraron que el material PRP es adecuado para la preconcentración, separación y determinación cuantitativa de ácidos fenoxiacéticos. Ellos demostraron que los copolímeros de estireno-divinilbenceno son estables en todo el rango de pH. Por ello, el pH es un parámetro que puede emplearse para realizar los procesos de enriquecimiento de trazas y elución de los compuestos. Es decir, controlando el pH de la disolución, los ácidos fenoxiacéticos pueden ser convertidos de especies neutras a especies iónicas y viceversa, y desorberse o adsorberse en la fase sólida.

Se ha observado que para los adsorbentes del tipo fase reversa, la retención es más alta cuando el analito está en forma neutra. Esto indica que las condiciones óptimas (k' grande) para la preconcentración de los ácidos fenoxiacéticos en materiales PRP y adsorbentes similares, son aquellas en que el pH de la muestra es ácido (el pH debe ser menor que el pKa más pequeño exhibido por los componentes de la muestra).

3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

Vera-Avila y Padilla encontraron que el pH óptimo para efectuar la preconcentración de los ácidos fenoxiacéticos en una precolumna empacada con un adsorbente PRP es cercano a 1.

De los experimentos realizados para conocer el volumen y las condiciones óptimas de carga de la muestra en la precolumna PRP se concluyó que era necesario adicionar un pequeño volumen de metanol al agua y limitar el volumen de carga a 75 mL.

Este fue un compromiso para lograr una buena recuperación tanto del 2,4-D como del 2,4-DB. En efecto, el 2,4-DB aún en su forma ionizada, que es como se encuentra en las aguas naturales (pH 5-8), es bastante hidrofóbico y tiende a adsorberse en las paredes de los recipientes que contienen la muestra acuosa. Esto es aún más notable cuando el soluto se encuentra en su forma molecular.

Por ello, después de filtrar la muestra (para eliminar sólidos en suspensión) es necesario lavar el frasco de muestreo con un poco de disolvente orgánico que permita recuperar residuos del soluto adsorbido en las paredes. El disolvente de lavado (metanol) se hace pasar por la membrana empleada para filtrar la muestra, ya que en ella también puede quedar adsorbido el 2,4-DB. Finalmente, el frasco se enjuaga con un poco de agua para arrastrar los residuos de disolvente y ésta se pasa también por la membrana de filtración. El ajuste de pH se hace directamente en el recipiente en donde se colectaron la muestra filtrada, el disolvente y el agua de lavado, mediante la adición de una alícuota de HClO_4 . De esta manera el 2,4-DB pasa a su forma molecular en una disolución que ya contiene un pequeño porcentaje de metanol, por lo que los efectos hidrofóbicos, se reducen notablemente. El recipiente que contiene la mezcla anterior acidificada se utiliza como reservorio de la bomba P_2 para efectuar la carga en la precolumna PRP.

Por otra parte, debido a la presencia del metanol en la muestra acuosa, los efectos hidrofóbicos sobre el 2,4-D también disminuyen notablemente. Esto significa que su retención en la fase reversa PRP es menor y por lo tanto el volumen de fuga de este soluto en la precolumna disminuye. Por esto fue necesario utilizar el mínimo volumen posible de disolvente orgánico para lavar el frasco y aún así se requirió limitar el volumen de muestra cargada en la precolumna a 75 mL. De hecho, el volumen de fuga del 2,4-D de la

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

precolumna PRP a partir de la disolución acuosa con 5 % de metanol es mayor. Sin embargo se consideró que en muestras reales, donde hay presencia de muchos otros compuestos orgánicos que también se adsorben en la fase reversa, el efecto de competencia disminuye el volumen de fuga de los solutos de interés. Por tanto, es necesario tener un margen de seguridad para lograr buenas recuperaciones en el análisis de los herbicidas en cualquier muestra.

La desorción de los herbicidas de la columna PRP y su transferencia a la columna aniónica se intentó primeramente por simple ionización de los solutos con la disolución acuosa de sosa a pH entre 10 y 11. Sin embargo, como ya se comentó anteriormente el 2,4-DB aún ionizado guarda una fuerte hidrofobicidad, razón por la cual no se desorbe completamente de la fase reversa. Por ello fue necesario actuar también sobre los efectos hidrofóbicos, disminuyéndolos mediante la adición de acetonitrilo a la disolución acuosa básica.

La composición de la disolución empleada para la desorción y transferencia de los herbicidas debe ser ajustada cuidadosamente. Por una parte se debe asegurar que el contenido de acetonitrilo y pH sean suficientemente elevados para lograr la completa desorción de los solutos de la precolumna PRP. Pero, por otra parte, estos parámetros no deben ser demasiado altos porque pueden provocar la fuga de los solutos de la precolumna aniónica durante la transferencia. Esto, debido a que el ión OH^- compite con los solutos por los sitios activos iónicos del intercambiador; a medida que el pH aumenta la concentración de OH^- también lo hace y la retención de los solutos en la precolumna aniónica disminuye. El acetonitrilo también provoca una disminución de la retención en la columna aniónica ya que, en esta retención, también juegan un papel importante los efectos hidrofóbicos.

Vera-Ávila y Padilla proponen un pH de 10 y un contenido de acetonitrilo del 10% para lograr la desorción y transferencia de varios ácidos clorofenoxiacéticos en un sistema en línea. Con base en estos valores y después de realizar varios ensayos se encontró que el volumen de disolución adecuado, para lograr la completa recuperación de los solutos en este paso, era de 6 mL de una mezcla acetonitrilo-agua (pH=10) 10:90 v/v.

3.2 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN

En el presente trabajo, además de encontrar las condiciones de elución para que los dos herbicidas 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 aguas naturales, se buscó que el tiempo de retención del primer soluto eluido (2,4-D) fuera relativamente grande, con el fin de que todas las interferencias presentes en la muestra de agua, no eliminadas durante el pretratamiento de ésta y que generalmente eluyen a tiempos de retención relativamente cortos, no interfirieran con el análisis de los herbicidas de interés .

Vera-Ávila y Padilla recomiendan utilizar un gradiente para la elución de los herbicidas de la precolumna aniónica y la columna analítica y plantean adicionalmente la utilización de percloratos dentro de la fase móvil para ayudar a desorber a los herbicidas de la precolumna aniónica.

Tomando en cuenta estas indicaciones, se establecieron las condiciones de elución de la muestra especificadas en el capítulo anterior. El gradiente de elución empleado y el cromatograma obtenido al inyectar 22 μ L de una disolución estándar de herbicidas se presentan en la figura 3.1.

Al principio del gradiente, la fase móvil es relativamente débil y su fuerza se incrementa muy levemente (1% / min de B) para retardar la elución del 2,4-D. A partir de los cinco minutos la pendiente del gradiente aumenta a 2% /min de B, lo que permite eluir al primer soluto después de los 10 minutos. Al llegar a 40% de B, lo que corresponde a 44% de acetonitrilo en la fase móvil, se disminuye radicalmente la pendiente del gradiente (0.26% /min de B), manteniendo esta condición hasta el final de la corrida cromatográfica. Este último paso fue necesario para evitar la aparición de picos, llamados "picos de

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

gradiente" o "picos fantasma", hacia el final de la corrida cromatográfica (John W. Dolan, 1995) La naturaleza de estos picos no ha sido totalmente elucidada; se supone que pueden ser debidos a impurezas presentes en la fase móvil o en la muestra que se acumulan a la entrada de la columna al inicio del gradiente. Posteriormente, al aumentar la fuerza de la fase móvil, las impurezas migran y eluyen provocando la aparición de picos al final del cromatograma. Se ha observado que el número y tamaño de los picos de gradiente aumenta al aumentar la sensibilidad del detector y al disminuir la longitud de onda de detección (detector UV).

Los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB presentan máximos de absorción cercanos a los 230 y 280 nm, con una relación 9:1 en el coeficiente de extinción molecular entre estas dos longitudes de onda (A. Betti, 1990). Sin embargo, en este trabajo se optó por seleccionar la longitud de onda de 280 nm por lo siguiente:

- 1.- A bajas longitudes de onda, la deriva de la línea base debida al gradiente de elución cuando se trabaja a alta sensibilidad es muy fuerte.
- 2.- Aún con el gradiente diseñado, no se pudieron evitar las interferencias en la determinación del 2,4-DB debidas a los picos de gradiente al trabajar a 230 nm.
- 3.- La detección a 280 nm es más selectiva, pues a esta longitud de onda el detector responde sólo a solutos que presentan dobles ligaduras resonantes. Este punto es importante a considerar cuando se desean hacer determinaciones de compuestos traza en matrices muy complicadas como son las muestras ambientales.

La figura 3.1 muestra que es posible detectar pequeñas cantidades de herbicidas a 280 nm, trabajando a alta sensibilidad del detector (0.05 AUFS) y operando por gradiente de elución. En estas condiciones la deriva de línea base es muy pequeña y no se presentan interferencias notables por picos de gradiente ni en la inyección, ni cuando se aplica el método completo para el análisis de la muestra (fig 3.3).

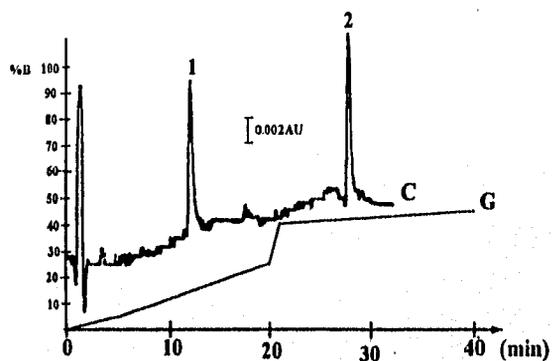


Figura 3.1 (G) Gradiente de elución empleado, (C) Separación de los dos herbicidas de interés, 1.- Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 2.- Ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico. Gradiente de elución: 0 min-0%B; 5 min-5%B; 20 min-35%B; 21 min-40%B; 40 min-45%B. Velocidad de flujo 1 mL/min. Detección a 280 nm. Cantidad inyectada 22 μ L de una disolución de 3.36 mg/L de cada herbicida.

3.3. RECUPERACIÓN DE LOS HERBICIDAS.

La determinación de la recuperación de cada soluto se realizó comparando el área de la señal obtenida por la inyección directa de una cantidad similar del herbicida respectivo. Para el cálculo de las recuperaciones se tomó en cuenta la dilución de la muestra debida a la adición de metanol y agua durante su preparación.

En la tabla 3.1. se presentan las recuperaciones de los herbicidas estudiados así como la precisión obtenida en el análisis de varias muestras de agua grado HPLC, fortificadas a una concentración de 4.67 $\mu\text{g/L}$ de cada herbicida.

Adicionalmente se presentan los cromatogramas obtenidos al efectuar el proceso para una muestra fortificada a una concentración de 1 $\mu\text{g/L}$ (figura 3.2) y para un blanco de agua grado HPLC preparado siguiendo todos los pasos del método. (figura 3.3).

3.3 RECUPERACIÓN DE LOS HERBICIDAS.

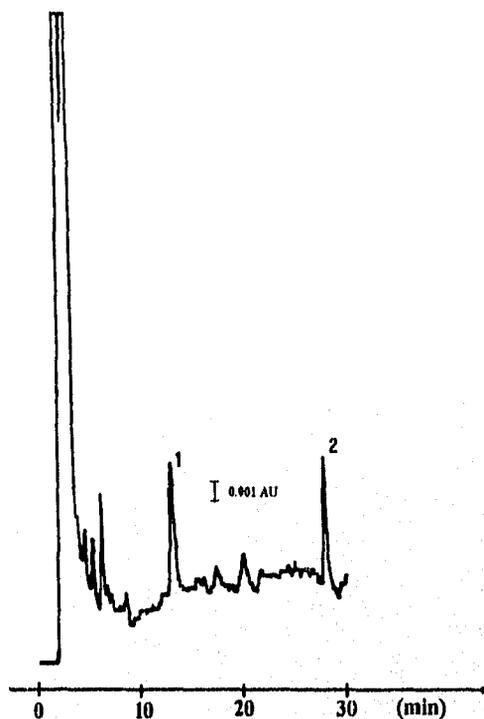


Figura 3.2 Determinación de los herbicidas en muestra de agua fortificada con $1\mu\text{g/L}$ de cada uno de los herbicidas: 1.- Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 2.- Ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico. Gradiente de elución: 0 min-0%B; 5 min-5%B; 20 min-35%B; 21 min-40%B; 40 min-45%B. Velocidad de flujo 1 mL/min. Detección a 280 nm.

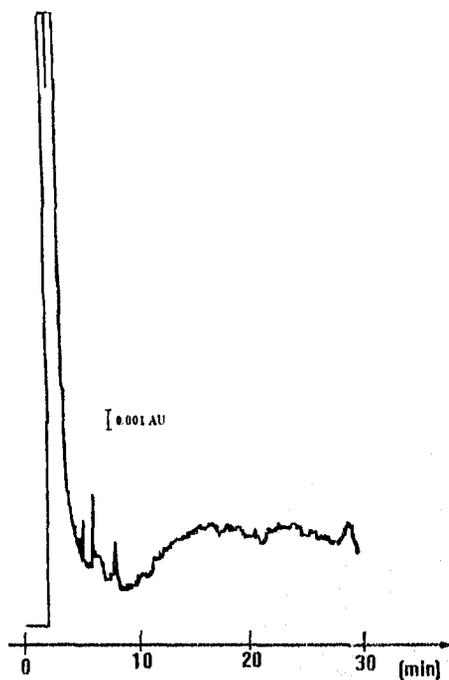


Figura 3.3 Aplicación del método de análisis de herbicidas desarrollado en este trabajo a una muestra blanco. Gradiente de elución: 0 min-0%B; 5 min-5%B; 20 min-35%B; 21 min-40%B; 40 min-45%B. Velocidad de flujo 1 mL/min. Detección a 280 nm.

Tabla 3.1 Recuperación obtenida de los herbicidas estudiados.

SOLUTO	n	R(%)	s	CV
2,4-D	7	100.5	2.248	2.215
2,4-DB	7	101.6	2.485	2.446

La precisión está expresada numéricamente como la desviación estándar, σ , 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.

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3.1)$$

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 μ , calculado de acuerdo a la ecuación.

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (3.2)$$

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

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}(100) \quad (3.3)$$

Como se observa el porcentaje de recuperación de los herbicidas es prácticamente 100%.

Con el fin de establecer si estadísticamente los herbicidas alcanzan una recuperación de 100% se efectuó una prueba de hipótesis (Miller y Freud, 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:

$$t_{cal} = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}} \quad (3.4)$$

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

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 a 100.

El criterio a tomar en cuenta para aceptar o rechazar la hipótesis nula es el siguiente:

La hipótesis nula se rechaza si $t_{ca1} < -t_{\alpha/2}(n-1)$ o $t_{ca1} > t_{\alpha/2}(n-1)$ donde $t_{\alpha/2}(n-1)$ es el valor de la t de Student con n-1 grados de libertad.

Los valores de t_{ca1} para los dos herbicidas en estudio, junto con los valores de $t_{\alpha/2}(n-1)$ para el valor de $\alpha=0.05$ se presentan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Valores de t_{ca1} y de $t_{\alpha/2}(n-1)$, para un nivel de significancia $\alpha=0.05$ para el caso de los herbicidas estudiados.

SOLUTO	n	t_{ca1}	$t_{0.025}(n-1)$
2,4-D	7	1.76	2.45
2,4-DB	7	1.70	2.45

Como se observa en la tabla 3.2 empleando un nivel de significancia de $\alpha=0.05$ se acepta la hipótesis de que los herbicidas se recuperan al 100%. Como se indicará posteriormente la recuperación del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y del ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butanoico es de 100 % en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5 y 100 $\mu\text{g/L}$.

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

$$\bar{x} - t_{\alpha/2} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \leq R \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (3.5)$$

Considerando un nivel de significancia $\alpha=0.05$ así como los datos presentados en las tablas 3.1 y 3.2, los intervalos de confianza estimados se presentan en la tabla 3.3.

Tabla 3.3 Intervalo de confianza para los datos de los herbicidas en estudio.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA RECUPERACIÓN (%)
2,4-D	99.41 < R < 103.58
2,4.DB	99.29 < R < 103.90

3.4 INTERVALO DE RESPUESTA LINEAL DEL MÉTODO.

La sensibilidad de un procedimiento diseñado para el 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 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 de límite superior puede ser la concentración en donde la respuesta difiere por

Tabla 3.4 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-D en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargada: 75 mL.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	ÁREA (CIENTAS)
0.495	18079
0.991	42041
1.98	83049
4.67	195148
9.94	520336
19.8	861141
50.0	2120236
79.7	3771742
99.5	4328699

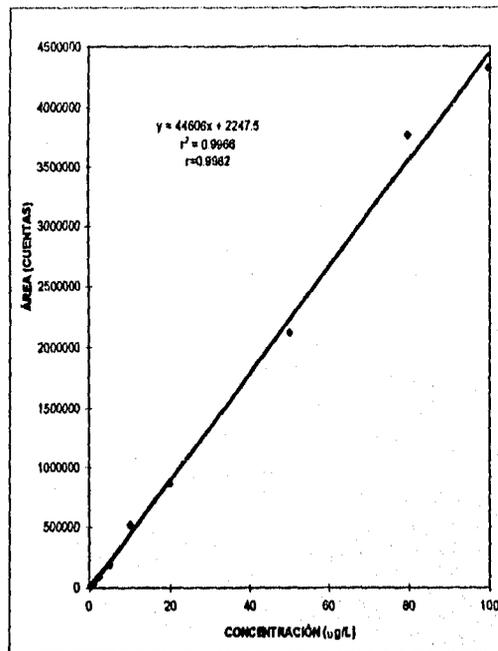


Figura 3.5 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-D en la muestra de agua fortificada. Volumen de carga: 75 mL.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.5 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de 2,4-DB en la muestra de agua fortificada. Volumen de muestra cargado: 75 mL.

CONCENTRACIÓN DE LA MUESTRA (µg/L)	ÁREA (CUENTAS)
0.495	16045
0.991	33786
1.98	77388
4.67	182744
9.94	431288
19.8	791395
50.0	1854951
79.7	3286069
99.5	3991442

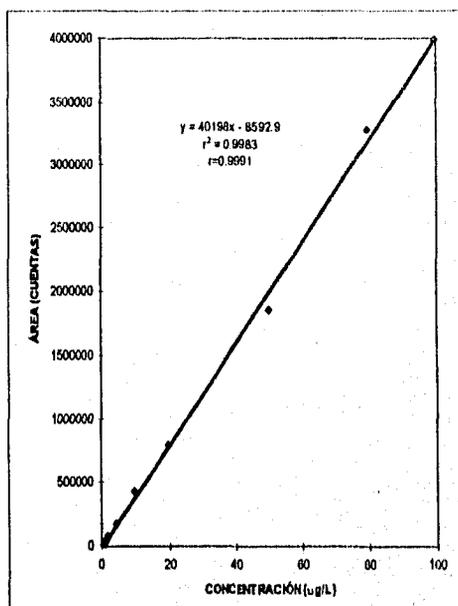


Figura 3.6 Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi)butanoico en la muestra de agua fortificada. Volumen de carga: 75 mL.

La recta de regresión para los herbicidas en estudio 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:

$$y = a + bx$$

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

Las rectas de regresión obtenidas se emplearon para determinar el límite de detección del procedimiento analítico para los 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 α y β de la regresión real:

$$y = \alpha + \beta x \quad (3.6)$$

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):

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

$$t = \left(\frac{a - \alpha}{S_e} \right) \sqrt{\frac{n \cdot S_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}} \quad (3.7)$$

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

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2)S_{xx}}} \quad (3.8)$$

siendo

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (3.9)$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \quad (3.10)$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right) \quad (3.11)$$

Empleando un nivel de significancia α 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 α con n-2 grados de libertad. Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula para los dos herbicidas, empleando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se presentan en la tabla 3.6.

Los resultados de la tabla 3.6 permiten comprobar que, para los herbicidas estudiados, el valor de coeficiente α de la recta de regresión es, estadísticamente, igual a cero.

Tabla 3.6 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 herbicida, pasa por el origen del sistema de coordenadas. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

SOLUTO	t_{cal}	n	$t_{\alpha/2}(n-2 \text{ gl})$	¿Aceptar H_0 ?
2,4-D	0.049	9	2.365	Si
2,4-DB	-0.294	9	2.365	Si

Los límites del intervalo de confianza para los coeficientes a de las rectas de regresión se estimaron mediante la expresión:

$$a \pm t_{\alpha/2} * S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{x})^2}{n * S_{xx}}} \quad (3.12)$$

Los intervalos de confianza para los coeficientes a de las ecuaciones de regresión de los dos herbicidas estudiados, calculados empleando un nivel de significancia $\alpha=0.05$, se presentan en la tabla 3.7

Tabla 3.7 Intervalo de confianza de las coeficientes a de las rectas de regresión

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA (Aros, cuentas)
2,4-D	2036 < a < 2458
2,4-DB	-77649 < a < 60463

Posteriormente se analizó la recuperación de los herbicidas en el intervalo de concentración estudiado. La variación de la cantidad cargada en función de la cantidad recuperada al final del análisis, se presenta en las tablas 3.8 y 3.9, así como en las figuras 3.7 y 3.8.

Tabla 3.8 Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada

CANTIDAD CONCENTRADA (ug)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
37	39
74	76
148	155
350	353
745	890
1485	1542
3753	3870
5981	6267
7466	7437

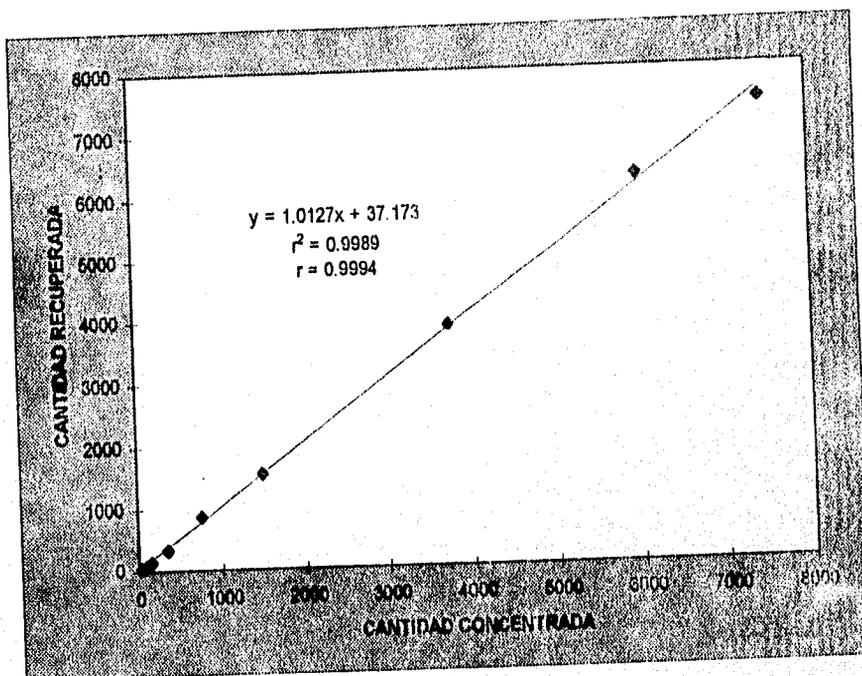


Figura 3.7 Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada.

Tabla 3.9 Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.

CANTIDAD CONCENTRADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
37	33
74	69
148	153
350	352
745	803
1485	1528
3753	3808
5981	5970
7466	7627

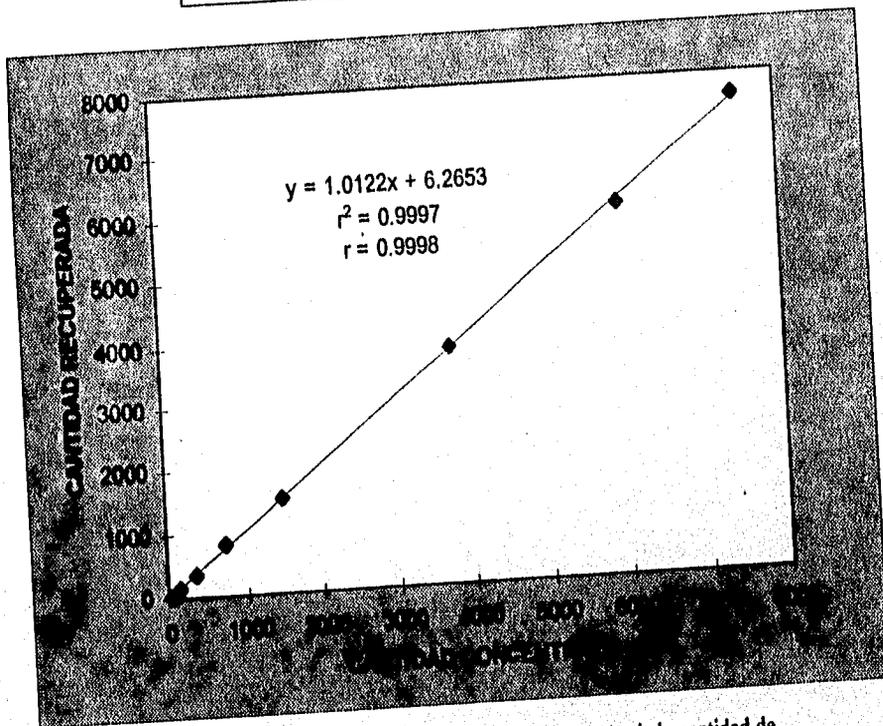


Figura 3.8. Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Los coeficientes de correlación, r , para las rectas de regresión obtenidas son altos y cercanos a la unidad, esto 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, indican el porcentaje de recobro en el intervalo estudiado.

Como se observa en las figuras 3.7 y 3.8, el valor del coeficiente b de las rectas de regresión obtenidas para los herbicidas 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 de 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 Freud, 1965) el estadístico de prueba que se presenta en la ecuación.

$$t = \frac{b - \beta}{S_e} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} \quad (3.13)$$

Debido a que se desea comprobar la hipótesis nula de que la recuperación es de 100%, en contra de la hipótesis alterna de que la recuperación es diferente de 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 con un nivel de significancia α con $n-2$ grados de libertad.

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula se presentan en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión, obtenidas en las determinaciones de recuperación a través del intervalo de concentración estudiado, es igual a 1. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

SOLUTO	t_{cal}	n	$t_{\alpha/2}(n-2 \text{ gl})$	¿Aceptar H_0 ?
2,4-D	1.007	9	2.365	Si
2,4-DB	2.11	9	2.365	Si

Los resultados de la tabla 3.10 muestran que estadísticamente, las rectas de regresión de los herbicidas estudiados tienen una pendiente igual a 1, lo cual puede relacionarse con una recuperación de 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 Freud, 1965) empleando la expresión.

$$b \pm t_{\alpha/2} * S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} \quad (3.14)$$

El intervalo de confianza para los coeficientes b de las rectas de regresión de los herbicidas estudiados, empleando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se dan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 Intervalo de confianza de los coeficientes b de las rectas de regresión.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA
2,4-D	$0.982 < b < 1.042$
2,4-DB	$0.9985 < b < 1.025$

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 con un nivel de significancia α con $n-2$ grados de libertad.

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula se presentan en la tabla 3.10.

Tabla 3.10 Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión, obtenidas en las determinaciones de recuperación a través del intervalo de concentración estudiado, es igual a 1. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

SOLUTO	t_{cal}	n	$t_{\alpha/2}(n-2 \text{ gl})$	¿Aceptar H_0 ?
2,4-D	1.007	9	2.365	Si
2,4-DB	2.11	9	2.365	Si

Los resultados de la tabla 3.10 muestran que estadísticamente, las rectas de regresión de los herbicidas estudiados tienen una pendiente igual a 1, lo cual puede relacionarse con una recuperación de 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 Freud, 1965) empleando la expresión.

$$b \pm t_{\alpha/2} * S_e \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} \quad (3.14)$$

El intervalo de confianza para los coeficientes b de las rectas de regresión de los herbicidas estudiados, empleando un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se dan en la tabla 3.11.

Tabla 3.11 Intervalo de confianza de los coeficientes b de las rectas de regresión.

SOLUTO	INTERVALO DE CONFIANZA
2,4-D	$0.982 < b < 1.042$
2,4-DB	$0.9985 < b < 1.025$

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 3.7.

Los resultados obtenidos con 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 presenta en la tabla 3.12.

Tabla 3.12 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_{cal}	n	$t_{0.02}(n-1 \text{ gl})$	¿Aceptar H_0 ?
2,4-D	0.846	9	2.365	Si
2,4-DB	0.342	9	2.365	Si

En función de los datos presentados en la tabla 3.12 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 que la respuesta del detector en función de la concentración de analito sigue una relación lineal para los dos herbicidas estudiados abarca de 0.5 a 100 $\mu\text{g/L}$. En este intervalo de concentración la recuperación de los dos herbicidas es estadísticamente igual al 100%. Cabe hacer mención que el estudio de intervalo lineal no se efectuó para concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/L}$, por lo que se deja abierta la posibilidad de que el método sea lineal aún a concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/L}$.

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 1993). 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 la desviación estándar del blanco, S_B .

La agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha establecido (USEPA, 1984c) un procedimiento para la determinación de 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 mismas condiciones del proceso analítico de interés.

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

$$\text{LDM} = t_{n-1, 1-\alpha=0.99} (S) \quad (3.15)$$

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 , en unidades de concentración 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 3.15, así como las recuperaciones alcanzadas cuando se aplica el método de análisis 8150 (USEPA, 1984c) de la Agencia de Protección Ambiental de los

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Estados Unidos, para la determinación en agua de los dos herbicidas considerados en este trabajo se presentan en la tabla 3.13.

Tabla 3.13 Límites de detección (LDM) y porcentajes de recobro (%R) reportados para el análisis en agua de dos herbicidas de la familia Clorofenoxi, aplicando el método 8150 (USEPA, 1984c) de la EPA.

SOLUTO	MÉTODO 8150	%R
	CG-ECD	
	LDM ($\mu\text{g/L}$)	
2,4-D	1.2	75
2,4-DB	0.91	93

En este trabajo, el límite de detección del método desarrollado se determinó de dos maneras:

- 1).- Considerando los criterios de la EPA y la ecuación 15, se calculó la desviación estándar en unidades de concentración a partir del análisis de 7 muestras fortificadas con cada herbicida a una concentración de $4.67 \mu\text{g/L}$ de cada soluto. Se empleó este nivel de concentración debido a que se esperaba alcanzar límites de detección del orden de 0.5 a $1 \mu\text{g/L}$.
- 2).- se utilizaron las rectas de regresión, obtenidas en el estudio del intervalo lineal del método. El límite de detección se definió según la ecuación 3.16.

$$LDM = y_b + 3 \frac{S_b}{m} \quad (3.16)$$

El valor de S_b para cada herbicida fue el valor de la desviación estándar en cuentas de área obtenida a partir del análisis de las siete muestras antes mencionadas, m es la pendiente de las rectas de regresión de las gráficas de la respuesta del detector en función de la concentración. (Sin embargo es importante tener en cuenta que, como se discutió en la sección anterior (tabla 3.6), el coeficiente a de las dos rectas de regresión es

3.5 LIMITE DE DETECCIÓN

estadísticamente igual a cero. Por esta razón, para las estimaciones de los límites de detección de los dos herbicidas estudiados mediante la ecuación 3.16 ($y_0=y_B$ se consideró a y_B igual a cero)

La desviación estándar obtenida, tanto en unidades de concentración como en cuentas de área, en el análisis de las siete muestras antes mencionadas se presenta en la tabla 3.14.

Tabla 3.14 Desviación estándar obtenida en el análisis de muestras fortificadas con herbicidas. Concentración de la muestra: 4.67 µg/L. Volumen de la muestra concentrado: 75 mL.

SOLUTO	n	(s) Área (cuentas)	(s) Concentración µg/L	CV de la Concentración	CV de la Área
2,4-D	7	4590	0.10	2.21	2.61
2,4-DB	7	4996	0.11	2.44	2.84

Los límites de detección para los herbicidas estudiados, estimados a partir de las rectas de regresión y de la ecuación 3.16 se presentan en la tabla 3.15.

Tabla 3.15 Límites de detección para los herbicidas estudiados, estimados a partir de la ecuación 3.16 y de las rectas de regresión obtenidas en el establecimiento del intervalo lineal del método.

SOLUTO	LDM (µg/L)
2,4-D	0.3
2,4-DB	0.3

Los límites de detección estimados en base a las consideraciones establecidas por la EPA (Ecuación 3.15) se presentan en la tabla 3.16.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Tabla 3.16 Límites de detección para los dos herbicidas estudiados, estimados a partir de las consideraciones establecidas por la EPA (ecuación 3.15).

SOLUTO	LDM ($\mu\text{g/L}$)
2,4-D	0.3
2,4-DB	0.4

De acuerdo a lo observado en las dos tablas anteriores se tiene un límite de detección de entre 0.3 y 0.4 $\mu\text{g/L}$ con el método desarrollado. Con el objeto de verificar el valor del límite de detección se analizó una muestra de agua HPLC fortificada a una concentración de 0.2 $\mu\text{g/L}$. El cromatograma obtenido (fig. 3.9) nos indica que a esta concentración estamos en el límite de decisión, debido a que el tamaño de los picos de los herbicidas es, aproximadamente 1.5 veces el valor del ruido de fondo. Por lo tanto, no es posible considerar a la concentración de 0.2 $\mu\text{g/L}$ como límite de detección porque no se tendría certeza de la presencia de los herbicidas.

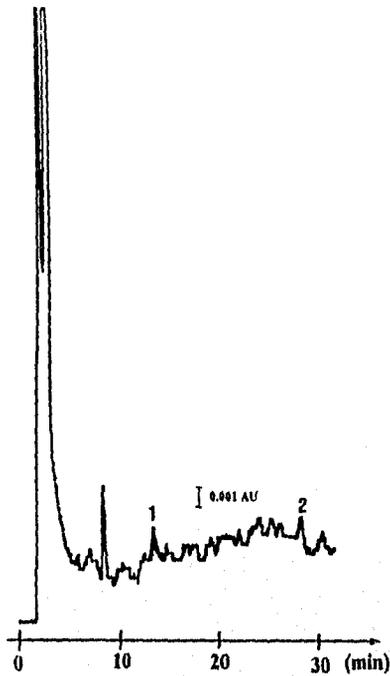


Figura 3.9 Cromatograma obtenido con una muestra fortificada a $0.2 \mu\text{g/L}$ de cada herbicida. 1.- 2,4-D; 2.- 2,4-DB. Gradiente de elución: 0 min-0%B; 5 min-5%B; 20 min-35%B; 21 min-40%B; 40 min-45%B. Velocidad de flujo 1 mL/min. Detección a 280 nm.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

Adicionalmente se presenta el cromatograma que se obtiene del análisis de una muestra de agua HPLC fortificada a 0.5 $\mu\text{g/L}$ de cada herbicida (fig. 3.10). Aquí se observa que se pueden cuantificar perfectamente a los herbicidas, por lo que los límites obtenidos son válidos.

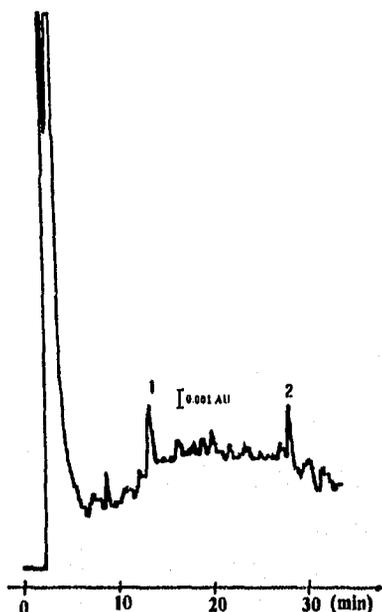


Figura 3.10 Cromatograma obtenido de una muestra fortificada a 0.5 $\mu\text{g/L}$ de cada herbicida. Gradiente de elución: 0 min-0%B; 5 min-5%B; 20 min-35%B; 21 min-40%B; 40 min-45%B. Velocidad de flujo 1 mL/min. Detección a 280 nm.

Como se observa en los datos presentados en las tablas 3.15 y 3.16 y las figuras de los cromatogramas anteriores, los límites del método son apropiados para detectar las concentraciones máximas permisibles establecidas en los criterios ecológicos de calidad del agua en México (tabla 1.3), lo que permite establecer que el método desarrollado en este trabajo es apropiado para el monitoreo y detección de los dos herbicidas considerados a niveles de concentración de trazas en agua.

Por otra parte, es importante mencionar que pesar de que en el método desarrollado en este trabajo únicamente se analizan los dos herbicidas clorofenoxi que se utilizan en México, los límites de detección alcanzados para éstos (tablas 3.15 y 3.16) son más bajos que los obtenidos al aplicar el método de análisis 8150 de la EPA (en éste se analizan 10 herbicidas). Además, las recuperaciones obtenidas para los herbicidas son mayores que las obtenidas por el método 8150 (especialmente para el 2,4-D).

Adicionalmente, el método evita en gran parte la contaminación de la muestra por manipulación debido a que una vez filtrada y acidificada, el operador no vuelve a tener contacto con ésta, en tanto que en el método 8150 el operador está en contacto con la muestra prácticamente durante todo el método.

3.6 ANÁLISIS DE MUESTRAS DE AGUA DE POZO Y RÍO.

Una vez evaluado el método analítico desarrollado, éste se aplicó al análisis de herbicidas en muestras de agua de río y pozo, por ser este tipo de agua la que mayor contacto tiene con campos de cultivo, que es el sitio en donde generalmente se esparcen los herbicidas estudiados.

Es importante remarcar que el análisis mencionado únicamente se efectuó con el fin de mostrar de manera preliminar la aplicación potencial del método.

Los resultados presentados en esta sección incluyen los datos obtenidos al analizar una muestra de agua de pozo recogida en una zona agrícola cercana a la localidad de Texcoco, Estado de México. Adicionalmente se presenta la aplicación del método al

CAPÍTULO 3. RESULTADOS EXPERIMENTALES.

análisis de una muestra de agua de río, recolectada aproximadamente a un kilómetro de su nacimiento. Ambas fuentes de agua son empleadas para el riego de la zona agrícola.

En la figura 3.11 se presenta el cromatograma obtenido en el análisis de agua de río. En dicho cromatograma se pueden observar un gran número de señales, pero los herbicidas no se encuentran presentes. Al fortificar la muestra se observa que el pico proveniente del 2,4-D se junta con uno de los picos de la muestra blanco de río, no obstante los picos se encuentran suficientemente separados para diferenciarlos y cuantificarlos.

En la tabla 3.17 se muestra el porcentaje de recobro obtenido de la muestra de agua de río fortificada a una concentración de 4 µg/L de cada herbicida.

Tabla 3.17 Porcentajes de recobro de los herbicidas en agua de río.

SOLUTO	% R
2,4-D	102.27
2,4-DB	99.52

En la figura 3.12 se presenta el cromatograma obtenido en el análisis de una muestra de agua de pozo. En éste no se observan los herbicidas pero, al fortificar la muestra, el pico del 2,4-D se une a uno de los picos del agua de pozo, igualmente el pico del 2,4-DB se une a uno de los picos proveniente de la muestra, no obstante los analitos se pueden diferenciar y cuantificar sin mayor problema.

En la tabla 3.18 se muestra el porcentaje de recobro de los herbicidas en una muestra de agua de pozo fortificada a una concentración de 2 µg/L de cada uno.

Tabla 3.18 Porcentajes de recobro de los herbicidas en una muestra de agua de pozo.

SOLUTO	% R
2,4-D	99.05
2,4-DB	99.83



Figura 3.11 Cromatograma obtenido del análisis de agua de río. 1.- 2,4-D y 2.- 2,4-DB, la figura A muestra un blanco con agua grado HPLC en tanto que la figura B muestra el cromatograma que se obtiene al efectuar el análisis en agua de río y la figura C muestra el análisis de agua de río fortificada a una concentración de 4 $\mu\text{g/L}$ de cada herbicida.

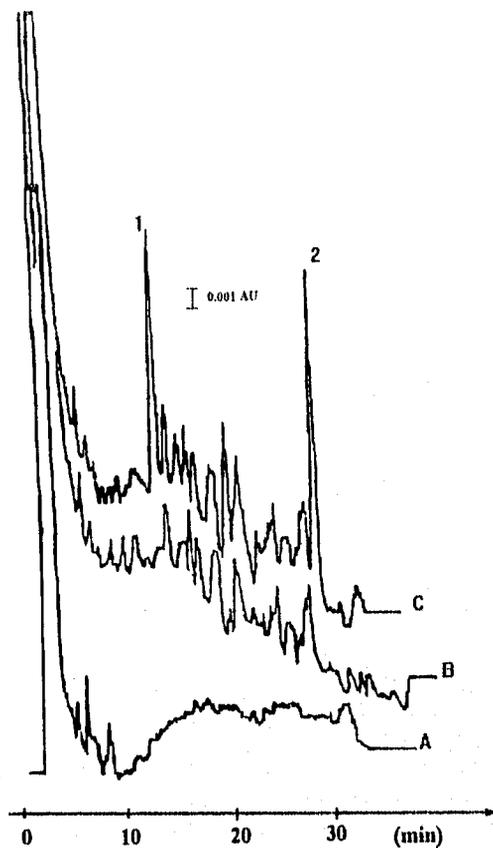


Figura 3.12 Análisis de una muestra de agua de pozo.1.-2,4-D y 2.-2,4-DB, la figura A muestra un blanco realizado con agua grado HPLC, la figura B muestra el análisis efectuado con agua de pozo y la figura C muestra el análisis de agua de pozo fortificada a una concentración de 2 $\mu\text{g/L}$ de cada herbicida.

Estos estudios permiten afirmar que el método es aplicable a las muestras de agua que mayor probabilidad tienen de contener los herbicidas por su contacto con los campos de cultivo.

Adicionalmente, los resultados obtenidos del análisis de la muestra de agua de pozo indican que en ésta se puede detectar muy bien los herbicidas a una concentración de 2 µg/L. Incluso, es posible afirmar que dichos herbicidas pueden ser detectados en este tipo de agua a una concentración ligeramente menor a 1 µg/L.

Por otra parte, en la muestra de agua de río se detectan muy bien los herbicidas a una concentración de 4 µg/L. Se puede considerar que el límite de detección para el 2,4-D en la muestra es del orden de 2 µg/L, mientras que el 2,4-DB, que eluye en una zona libre de interferencias, podría detectarse hasta a concentraciones inferiores a 1 µg/L.

CONCLUSIONES

Los herbicidas ácido clorofenoxi se pueden determinar selectivamente por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) en fase reversa, empleando detección UV y enriquecimiento de trazas en línea. La utilización de una precolumna empacada con un soporte PRP y una precolumna empacada con un material más selectivo, como un intercambiador de aniones, parece ser la estrategia apropiada para minimizar la presencia de compuestos interferentes de naturaleza orgánica e inorgánica

El sistema de preconcentración en fase sólida acoplada en línea con el sistema cromatográfico de análisis minimiza considerablemente el riesgo de contaminación de las muestras debido a que la manipulación externa de éstas es mínima. Los resultados obtenidos en lo que se refiere a exactitud (% de recobro), precisión (coeficiente de variación) y sensibilidad (límites de detección) se comparan favorablemente con los reportados en el método oficial para análisis de herbicidas en agua de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (8150, EPA). Además, el método desarrollado elimina el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos así como de reactivos tóxicos (como el diazometano que es cancerígeno) y costosos.

Por otra parte, el sistema de preconcentración y limpieza de la muestra utilizado proporciona una alternativa rápida y sencilla para el análisis de los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB en agua, teniendo las ventajas adicionales de ser sencillo de construir, compacto y de costo relativamente bajo, así como fácil de regenerar y mantener.

En el método desarrollado la respuesta obtenida varía linealmente con la concentración de los herbicidas en un intervalo comprendido entre 0.5 y 100 $\mu\text{g/L}$ y el porcentaje de recobro de los analitos es de 100% en este intervalo. Sin embargo se deja abierta la posibilidad de que el método sea lineal al concentraciones mayores a 100 $\mu\text{g/L}$.

CONCLUSIONES

No obstante que en el método desarrollado en este trabajo sólo se analizan dos herbicidas, los límites de detección alcanzados para éstos son tres veces más bajos que en el método de la EPA, con el cual se analizan diez compuestos. Además los porcentajes de recobro obtenidos en este trabajo son mayores que en el método de la EPA, especialmente para el Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

En tanto que el método de la EPA permite alcanzar límites de detección de 12 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-D y de 9.1 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-DB en agua de pozo, el método desarrollado presenta un límite de detección de 1 $\mu\text{g/L}$ para ambos herbicidas en la muestra de agua de pozo analizada. Por otra parte en la muestra de agua de río analizada los límites de detección son de 2 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-D y de 1 $\mu\text{g/L}$ para el 2,4-DB. Es decir los límites de detección en muestras de aguas reales alcanzados por el método desarrollado son más bajos que los alcanzados por el método de la EPA.

BIBLIOGRAFÍA

Adalberto Betti, Gaetano Lodi and S. Coppi. (1990), *J. Chromatogr.* 515, 219-225.

A.E. Greenberg, J.J. Connors and Jenkins (editors) Standar Methods for the Examination of Water and Waste. Washington, D.C. 15 th ed, 1981.

Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plagicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Catálogo Oficial de Plagicidas. Diario Oficial de la Federación. 1991.

C.Sanchez-Bruncte. Perez and J. L. Tadeo. (1991), *J. Chromatogr.* 552, 235-240.

Currie L. A. (1968) *Anal. Chem.*, 40, 586-593.

D. Barceló. (1988), *Chromatographia*, 25, 928-936.

Göran Nilve, Gudjon Audunsson and Jan Åke Jönsson. (1989) *J. Chromatogr.* 47, 151-160

J. C. Miller- J. N. Miller. Estadística para Química Analítica 2^{da} ed, Addison-Wesley Iberoamericana, 1993.

Laurence H. Keith (editor), E.P.A.'s Sampling and Analysis Methods. Lewis Publishers Inc. 1991

Massart D.L. Dystra A. and Kaufman I. Evaluation and Optimization of Laboratory Methods and Analytical Procedures, Elsevier, Amsterdam, 1987

M. C. Hennion., P. Subra, V. Coquart and R. Rosset. (1991), *J. Anal. Chem.*, 339, 448

Miller I and Freud J.E. Probability and Statistics for Engineers, Prentice Hall Englewood Clifts 1965.

Ohno, H and Aoyama T. (1992), *Jpn. J. Toxicol Environ Health*, 38, 202-208

BIBLIOGRAFÍA.

Ramsteiner K.A. (1988), J. Chromatogr. 456, 3-20

René B. Geerdink, Anita M. B. Groiumans and John Vivean (1991), J Chromatogr. 74, 478-483.

René B. Geerdink, Connie A. and Hendrik-Jan Brouwer. (1989), J. Chromatogr. 481, 275-285.

Reza González J. Tesis Maestría, Facultad de Química, UNAM 1995

R. Hamann, A. Kettrup (1987) Chemosphere, 16, 527-536.

Ronald L. Smith and Donald J. Pietrzyk (1983), J. Chromatogr. 21, 282-287.

S. Chiron, E. Martinez and D. Barceló (1994), J Chromatogr. 665, 283-293.

S. H. Hoké, E. E. Brueggemann, L. J. Baxter and T. Trybus (1986), J. Chromatogr. 357, 429-432.

Subra P. These de Doctorat, Universite Paris VI, 1989.

Trippel P. Maasfeld W. and Kettrup A.(1985), Intern. J. Environ Anal. Chem., 23, 97-110

Vera-Ávila L. E., Padilla P., Hernández G. and Meraz-Lira J. (1996), J. Chromatogr. 731, 115-122.

Wells, M. J.M. and Michael, J.L. (1987), Anal. Chem., 59, 1739-1742.

Werkhoven-Gowie C.E, Boon W., Praad A. J. J. and Frei R.W. (1982), Chromatographia, 16, 53-59.

W. Shüssler (1990), Chromatographia, 29, 24-30.

John W. Dolan, (1995), LC-GC, Vol 8 , N.7