

00577

4
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**DETERMINACION DE TRAZAS DE CLORO Y
NITROFENOLES EN AGUA POR EXTRACCION EN
FASE SOLIDA EN LINEA CON CROMATOGRAFIA
DE LIQUIDOS.**

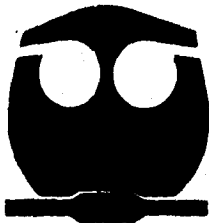
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS

(QUIMICA ANALITICA)

P R E S E N T A

I.Q. ANA MARIA NUÑEZ GAYTAN



CIUDAD UNIVERSITARIA,

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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

PRESIDENTE: M. en C. Santiago Capella Vizcaino
PRIMER VOCAL: Dra. Josefina de Gyves Marciniak
SECRETARIO: Dra. Araceli Peña Alvarez
PRIMER SUPLENTE: M. en C. Francisco Rojo Callejas
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. Ma. del Rosario Covarrubias Herrera

Sitio donde se desarrolló el tema:

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.

**Dra. Luz Elena Vera Avila
ASESOR**

**I. Q. Ana María Núñez Gaytán
SUSTENTANTE**

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco el apoyo brindado de las siguientes Instituciones:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Universidad Nacional Autónoma de México

Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo

A mis padres:

Dr. Héctor Núñez Vega

Quien a pesar de su prematura
partida dejó en mi un
ejemplo a seguir

y

Dra. Ana María Gaytán Elizarraras
Por hacer posible con su amor, paciencia y
esfuerzo todo lo que ahora soy y tengo

A ellos con mi respeto, cariño y admiración.

A mis hermanos:

Julio, Héctor, Eduardo, María Elena y Sergio

Por el afecto, los consejos y la confianza
que en todo momento me han
brindado para seguir adelante.
En especial doy las gracias a mi
hermana María Elena por ser una gran
compañía y apoyo constante en mi vida.

A mis Tías:

Pachita, Pepita y Angelita

Por su cariño y dedicación que
siempre me han demostrado.

A mi Asesor:

Dra. Luz Elena Vera Avila

Por su apoyo, colaboración y ayuda
para lograr este objetivo.

A la Maestra:

M. en C. Ma. del Rosario Covarrubias Herrera

Por su amistad, colaboración y entusiasmo
para la realización de este trabajo.

Al H. Jurado:

Por su orientación y valiosa aportación
para la realización de este trabajo.

A mis Maestros:

Por haber compartido sus conocimientos
conmigo y haber contribuido a mi
formación profesional.

A todos mis Amigos y Compañeros de la Maestría.

RESUMEN

En este trabajo se ha desarrollado un método analítico por cromatografía de líquidos para la determinación de cloro y nitrofenoles al nivel de trazas (ppb) en agua, empleando un gradiente de elución de fase reversa y un detector UV con arreglo de diodos. La metodología desarrollada para el análisis de estos solutos proporciona resultados confiables en un tiempo de análisis corto.

Los compuestos utilizados en el desarrollo de esta metodología son seis de los fenoles considerados contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA). Estos contaminantes son: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dimetilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol.

Los compuestos fenólicos son introducidos en el medio ambiente a través de diversos procesos químicos industriales. Pueden estar presentes en el agua y por ello se consideran como contaminantes cotidianos de este recurso natural, algunos de estos compuestos son altamente tóxicos y pueden afectar la salud tanto del hombre como la de los diversos organismos de la vida acuática incluso a niveles de concentración bajos ($\mu\text{g/l}$).

El análisis de estos contaminantes traza en agua, se realiza empleando un método en línea basado en la técnica de Extracción en Fase Sólida (EFS) con dos precolumnas en serie, una está empacada con un material polimérico PRP y la otra contiene un intercambiador de aniones, acopladas a una columna analítica C-18 de alta eficiencia. Este tratamiento preliminar de la muestra es necesario debido a su complejidad, es decir puede contener otras sustancias de naturaleza orgánica e inorgánica que interfieren en la determinación de los solutos de interés, así como a las bajas concentraciones de estos analitos.

Se diseñó un sistema bidimensional de precolumnas acoplado con la cromatografía de líquidos con el fin de efectuar la preconcentración, purificación y aislamiento de los solutos en matrices acuosas ambientales.

Se presentan los resultados de exactitud y precisión obtenidos al realizar la evaluación de este método empleando muestras de agua dopadas con los solutos. Se lograron recuperaciones mayores de 90% para los siguientes fenoles: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol; una recuperación de ~ 80% para el pentaclorofenol y una recuperación baja (~ 52%) para el 2,4-dimetilfenol. Además, se obtuvo una precisión ($\text{CV} < 5\%$) aceptable para todos los solutos a estos niveles de concentración y los límites de detección alcanzados oscilan en un intervalo de 0.6 a 1.1 $\mu\text{g/l}$.

El método desarrollado es simple, rápido, preciso y puede ser adoptado para el monitoreo de fenoles hidrofóbicos en agua al nivel de trazas. Además se minimiza el riesgo de pérdida y contaminación de la muestra.

SUMMARY

A liquid chromatographic method was established for the determination of chloro- and nitrophenols at ppb levels in water using reversed-phase gradient elution and UV detection with a diode array detector. The methodology developed for the analysis of these solutes provides reliable results in a short time.

The compounds used in this work are six of the phenols on the U. S. Environmental Priority Pollutant list: 2-methyl-4,6-dinitrophenol, 2,4-dimethylphenol, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol.

The phenolic compounds are mainly introduced in the environment as products of many industrial processes. These analytes are common water pollutants, and some of them have been found to be highly toxic to man, fish and other aquatic life even at low concentrations ($\mu\text{g/l}$).

Because of the interference from other organic and inorganic compounds and the low concentration levels of the phenols, their analysis in water utilizes on-line Solid Phase Extraction (SPE) with two precolumns in series, one packed with the polymer-based PRP and the other with an anion exchange support, coupled to a high efficiency C-18 analytical column.

A two-step solid phase extraction for sample preparation coupled to liquid chromatographic was developed to preconcentrate, clean-up and isolate the solutes from the aqueous environmental samples.

The recovery and repeatability of this methodology are presented. Recoveries > 90% for the following phenols: 2-methyl-4,6-dinitrophenol, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol; recovery ~ 80% for pentachlorophenol and about 52% for 2,4-dimethylphenol were obtained with spiked water samples. Besides, RSD < 5% and limits of detection ranging from 0.6 to 1.1 $\mu\text{g/l}$ were obtained.

The procedure is simple, rapid, accurate and may be adopted for the monitoring of hydrophobic phenols at low concentrations levels in water. The method established minimizes losses of the solutes during sample pretreatment and avoids cross contamination.

OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar una metodología alternativa a los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido que permita extraer, purificar y determinar cloro y nitrofenoles a niveles de concentración del orden de ppb en agua. El método propuesto está basado en un sistema bidimensional de precolumnas para extracción en fase sólida (EFS), acopladas en línea con la cromatografía de líquidos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

Establecer las condiciones experimentales óptimas para realizar el pretratamiento de la muestra con el propósito de obtener altos porcentajes de recobro para los solutos analizados en las diversas matrices acuosas y por consiguiente lograr una precisión y exactitud aceptables para estos niveles de concentración.

Seleccionar las condiciones experimentales más adecuadas que permitan realizar una buena separación y detección de los analitos para poder obtener una separación reproducible así como el mejoramiento de la sensibilidad del método propuesto.

ÍNDICE.

	Página
Resumen	1
Summary	2
Objetivos	3
Antecedentes	6
Capítulo 1.	
Parte Teórica.	
1.1. Aplicación de los compuestos fenólicos en la industria química.	8
1.2. Propiedades de los compuestos fenólicos.	9
1.3. Métodos de pretratamiento de la muestra.	11
1.4. Soportes sólidos empleados en extracción líquido-sólido.	13
1.5. Pretratamiento de la muestra en línea.	17
1.6. Métodos de determinación de compuestos fenólicos.	19
1.7. Certificación del método desarrollado.	25
Capítulo 2.	
Parte Experimental.	
2.1. Equipo, material y reactivos.	26
2.1.1. Empacado de precolumnas.	27
2.1.2. Calibración de la punta de la micropipeta.	28
2.1.3. Preparación de disoluciones.	28
2.2. Pretratamiento de la muestra.	29
2.2.1. Estudio de la capacidad de retención de la fase polimérica PRP. Volumen de fuga.	29
2.2.2. Estudio de la desorción de los fenoles de la fase polimérica.	31
2.3. Definición de las condiciones de separación cromatográfica.	31
2.4. Tratamiento de la muestra previo a su análisis cromatográfico.	31
2.5. Procedimiento para la preconcentración y análisis en línea de cloro y nitrofenoles.	33
2.6. Evaluación Estadística del método desarrollado.	36
2.7. Análisis de muestras acuosas: agua potable, agua de pozo y agua de manantial.	37
Capítulo 3.	
Resultados y discusión.	
3.1. Capacidad de retención de la precolumna polimérica de fase reversa.	38

3.2. Desorción de los fenoles de la fase polimérica (PRP).	38
3.3. Condiciones experimentales de la separación cromatográfica de la muestra de fenoles.	40
3.4. Evaluación Estadística del método desarrollado.	42
3.4.1. Selectividad del método.	42
3.4.2. Linealidad del método desarrollado.	42
3.4.3. Exactitud y precisión.	52
3.5. Caso del 2,4-dimetilfenol.	64
3.6. Límite de detección.	65
3.7. Análisis de muestras de agua potable, agua de pozo y de manantial.	69
3.7.1. Análisis de agua potable.	69
3.7.2. Análisis de agua de pozo.	70
3.7.3. Análisis de agua de manantial.	72
Capítulo 4.	
Conclusiones	75
Referencias.	77

ANTECEDENTES.

En la actualidad, tanto la tecnología como la explosión demográfica mundial son responsables del fenómeno de contaminación ya que han alterado el equilibrio entre las necesidades del hombre y la capacidad de la tierra para satisfacerlas. Este fenómeno ha originado el deterioro del medio ambiente debido a la presencia de una gran diversidad de materiales que por su naturaleza nociva causan un desequilibrio ecológico al contaminar tanto el aire, como el suelo y el agua. Estos materiales son principalmente residuos industriales, domésticos, agrícolas, de transportes y de centrales nucleares. Así, las fuentes de contaminación del agua provienen de residuos industriales y urbanos, vertidos a los ríos y océanos sin el debido tratamiento de depuración.

Este problema de contaminación que afecta a nuestro medio ambiente ha derivado en el interés que se tiene en diversos laboratorios de investigación por desarrollar técnicas analíticas sensibles y eficientes que permitan monitorear y determinar contaminantes traza en diversas matrices, los cuales generalmente están presentes a niveles de concentración que varían entre $\mu\text{g/l}$ (ppb) y ng/l (ppt). La labor básica en el monitoreo de microcontaminantes orgánicos en muestras acuosas consiste en detectar los contaminantes sospechosos en la matriz, elucidar su identidad y medir su concentración. Para ello, es necesario elaborar técnicas eficientes de preparación de la muestra aunadas a métodos cromatográficos precisos y sensibles.

La materia orgánica disuelta en el agua está constituida de numerosos compuestos, que varían en amplios intervalos de volatilidad, solubilidad y polaridad. Estos compuestos son de origen natural y sintético y generalmente su concentración en el agua varía desde niveles de $\mu\text{g/l}$ hasta mg/l . En nuestro país el análisis de la materia orgánica, y en general el control de la calidad del agua, se ha visto limitado en muchas ocasiones a la medida del contenido total de carbono orgánico (COT). Sin embargo, un análisis más fino requiere de métodos analíticos más poderosos y complejos como son las técnicas cromatográficas de alta resolución.

El análisis de compuestos traza, por su parte, comprende obligatoriamente una etapa de extracción y enriquecimiento, con el fin de aislar los compuestos de la matriz y concentrarlos para su determinación. En razón de la complejidad y de la diversidad de la materia orgánica presente en las aguas naturales, los procesos de extracción y de análisis son raramente simples.

En el presente trabajo, el proceso de extracción selectiva de los compuestos fenólicos de la matriz acuosa se efectúa en dos etapas mediante extracción en fase sólida (EFS). La separación de los analitos concentrados se realiza por cromatografía de líquidos en fase reversa. Los métodos en línea para preconcentración, limpieza y análisis de muestras de agua por cromatografía de líquidos son, actualmente, una de las herramientas más poderosas para determinar contaminantes traza en esta matriz. El pretratamiento de la muestra, basado generalmente en sistemas multidimensionales de EFS, presenta considerables ventajas respecto a los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido (ELL).

La originalidad del método denominado en línea, reside en el acoplamiento directo entre las etapas de preconcentración y de análisis lo cual disminuye en gran proporción los riesgos de pérdida y contaminación de la muestra ya que las operaciones de manipulación externa de la muestra son mínimas. En este método la totalidad de la materia orgánica preconcentrada es analizada.

CAPÍTULO I.

PARTE TEÓRICA.

1.1. APLICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA INDUSTRIA QUÍMICA.

Los compuestos fenólicos de origen sintético son generados como subproductos en diversos procesos químicos industriales que incluyen la industria del petróleo¹, la industria de la pulpa y el papel², la producción de coque en la industria del acero y en la licuefacción del gas de hulla³. También se emplean como materias primas o intermediarios para la manufactura de varios productos sintéticos^{4,5} tales como medicamentos, colorantes, antioxidantes, plásticos, resinas, fungicidas, pesticidas y ácido pícrico.

El miembro más sencillo, el fenol es una sustancia cristalizada incolora cuyo olor es característico, es tóxico. Sus aplicaciones, muy variadas, hacen del fenol una materia prima esencial de la industria química orgánica: en terapéutica sirve para preparar medicamentos, en particular derivados del ácido salicílico, de los cuales algunos se emplean en perfumería. La industria de los explosivos lo utiliza para fabricar ácido pícrico. Las industrias de materias plásticas (fenoplastos) y de textiles artificiales (nylon y perlón) lo emplean también como materia prima. Se utiliza igualmente para refinar petróleos, en la fabricación de materias colorantes, detergentes, taninos sintéticos, insecticidas, herbicidas y hormonas vegetales.

El fenol y los polimetilfenoles son productos de la pirólisis controlada de materiales como carbón (hulla) y madera; por lo tanto están comúnmente asociados con el proceso concerniente a la producción de gas y coque.

Los metilfenoles (cresoles): orto, meta y para-cresoles se extraen de los aceites medios de alquitrán de hulla (procesos de destilación de aceites a partir del carbón). El o-cresol es bastante fácil de separar de los otros dos, cuyos puntos de ebullición son muy próximos. El derivado nitrado del m-cresol se utiliza como explosivo con el nombre de cresilita. Estos metilfenoles se emplean en la fabricación de fenoplastos, sirven también como materias primas en la preparación de colorantes sintéticos y además son usados como antisépticos potentes.

Los derivados de los nitrofenoles como el 2-tert-butil-4,6-dinitrofenol se emplea como herbicida durante la cosecha y el 2-sec-butil-4,6-dinitrofenol preparado en su forma acetato se utiliza como un potente insecticida.

Los clorofenoles tienen una gran aplicación^{6,7}, así se emplean como insecticidas, fungicidas, inhibidores de moho, antisépticos, desinfectantes, conservadores de la madera y como materias primas en la manufactura de pesticidas. Los compuestos más importantes comercialmente son el 2,4-diclorofenol y el pentaclorofenol. Por ejemplo, el 2,4-diclorofenol se emplea en la manufactura del ácido 2,4-diclorofenoxiacético.

La presencia de estos compuestos en numerosos efluentes industriales ha dado origen a la contaminación de suelos y aguas superficiales. Por su alta toxicidad, algunos compuestos fenólicos son considerados contaminantes prioritarios ya que aún a bajas concentraciones alteran considerablemente la calidad del agua y por lo tanto dañan la

salud del hombre, plantas y animales. Los fenoles matan la vida acuática, absorbiendo el oxígeno disuelto en el agua, o esterilizando los propios organismos.

El fenol y sus derivados metil, cloro y nitrofenoles pueden ser detectados en aguas naturales y suelos a niveles de concentración de ppb debido a sus propiedades organolépticas. Es decir, estos contaminantes tienen un efecto adverso en el sabor y olor del agua potable incluso a niveles de concentración menores de 1 ppb. La legislación de la Comunidad Económica Europea (1980) estipula que la concentración máxima admisible de fenoles en agua para consumo humano es 0.5 µg/l.

Por lo anterior, es necesario realizar en forma continua un monitoreo de estos compuestos orgánicos en aguas naturales y residuales para poder detectarlos y cuantificarlos a nivel de trazas (ppb) en diversas matrices empleando métodos analíticos precisos, simples y eficientes para este propósito.

Los criterios ecológicos de calidad del agua de la legislación para el control de la contaminación del agua en México están dados por la Gaceta Ecológica del Diario Oficial de la Federación ⁸. La concentración máxima aceptable en ppb, para cada fenol en diversas fuentes de abastecimiento se muestra en la tabla 1.

TABLA 1. Criterios ecológicos de calidad del agua.

TABLA 1

Compuesto	Fuente de abastecimiento de agua potable	Protección de la vida acuática agua dulce	Protección de la vida acuática agua marina (áreas costeras)
4,6-dinitro-2-metilfenol	10*		10
2,4-dimetilfenol	400	20	
2,4-diclorofenol	30	20	
2,4,6-triclorofenol	10*	10	
pentaclorofenol	30	0.5	0.5

* Este nivel ha sido extrapolado mediante el empleo de un modelo matemático, por lo que en revisiones posteriores podrá ser modificado a valores menos estrictos.

1.2. PROPIEDADES DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS.

Los compuestos fenólicos contienen en su estructura un grupo hidroxilo (OH) unido a un átomo de carbono del anillo bencénico.

En su inmensa mayoría, los fenoles son sustancias incoloras, si bien la introducción de grupos nitro puede dar origen a un color amarillo (4,6-dinitro-2-metilfenol, o-nitrofenol); generalmente se trata de sólidos cristalinos, aunque algunos compuestos fenólicos son líquidos (*m*-cresol, 2,4-dimetilfenol) ⁹. Algunos fenoles son productos de

origen natural como el timol y el carvacrol; los cuales son isómeros y se encuentran en la esencia de tomillo.

En su estructura, el radical fenilo imparte propiedades ácidas al grupo hidroxilo de estos compuestos. La acidez del grupo hidroxilo del fenol se incrementa debido a la presencia de grupos electronegativos como el grupo nitró. Por lo tanto, los nitrofenoles se consideran ácidos más fuertes que el fenol y sus homólogos.

Algunas propiedades¹⁰⁻¹¹ de los seis compuestos fenólicos de interés considerados en este trabajo se presentan en la tabla 2.

TABLA 2. Propiedades de los fenoles.

TABLA 2.

Compuesto	Peso molecular	Gravedad específica	Punto de fusión °C	Punto de ebullición °C a presión atmosférica (760 mmHg)	pKa en agua	Solubilidad en agua
4,6-dinitro-2-metilfenol (O ₂ N) ₂ C ₆ H ₂ (OH)CH ₃	198.13		87.5		4.35	ligeramente soluble
2,4-dimetilfenol (CH ₃) ₂ C ₆ H ₃ OH	122.17	1.027 ₄ ¹⁴	27	210-212	10.58	ligeramente soluble
4-cloro-3-metilfenol CH ₃ (Cl)C ₆ H ₃ OH	142.59		68	235	9.55	insoluble
2,4-diclorofenol Cl ₂ C ₆ H ₃ OH	163		42-43	209-210	7.85	ligeramente soluble
2,4,6-triclorofenol Cl ₃ C ₆ H ₂ OH	197.45	1.4901 ₄ ¹⁵	69	246	6.42	insoluble
pentaclorofenol C ₆ Cl ₅ OH	266.34	1.978 ₄ ²¹	190-191	310	5.26	0.008 % peso

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha incluido 11 fenoles dentro de la lista de los contaminantes prioritarios: fenol, 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 2-clorofenol, 2-nitrofenol, 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dimetilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol.

Algunos aspectos generales respecto a la toxicidad, persistencia y biodegradación de los compuestos fenólicos se mencionan a continuación:

1) Los alquilfenoles generalmente son menos tóxicos que los cloro y nitrofenoles. Por su alta toxicidad los cloro y nitrofenoles constituyen una causa seria de contaminación en el medio

ambiente. Por ejemplo, los compuestos 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol están clasificados como carcinógenos.

2) Los clorofenoles son los más persistentes en el medio ambiente. Estos compuestos se originan de la degradación o metabolismo de los pesticidas, de la cloración del agua y de su introducción directa de efluentes industriales. También pueden estar presentes en la orina de los humanos como resultado de su exposición directa a pesticidas ¹² u otros componentes que metabólicamente producen clorofenoles.

3) La toxicidad de los compuestos fenólicos se incrementa al aumentar su fuerza ácida. Por ello, los nitrofenoles son los compuestos más tóxicos dentro de la familia de los fenoles. Sin embargo, se pueden biodegradar por reducción a las aminas correspondientes.

4) Los alquilfenoles son compuestos relativamente biodegradables con excepción de aquellos fenoles que tienen grupos hidroxilo con impedimento estérico lo cual los hace más resistentes a la biodegradación.

5) Los cloro y nitrofenoles son los principales productos de la degradación de pesticidas tales como los compuestos de organofósforo y los clorofenoxiacidos.

1.3. MÉTODOS DE PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

Frecuentemente, las muestras de origen biológico o ambiental son demasiado complejas, diluidas o incompatibles con el sistema cromatográfico empleado para efectuar su análisis por inyección directa. Por esta razón, es necesario realizar ciertas operaciones previas al análisis cromatográfico tales como fraccionamientos preliminares, aislamiento y concentración de los solutos de interés de la muestra para asegurar su separación y detección efectivas. En la figura 1 se muestra el diagrama de flujo correspondiente a los procedimientos empleados para realizar la preparación de la muestra y su análisis cromatográfico.

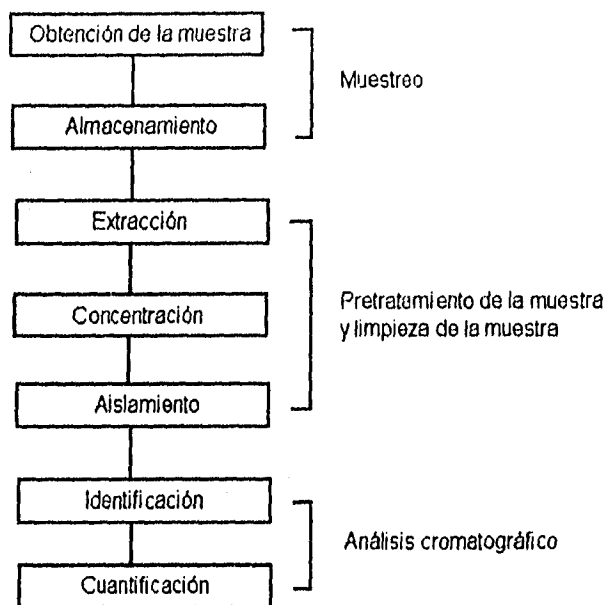


FIGURA 1. Diagrama de flujo correspondiente a un análisis orgánico característico.

Los métodos físicos más empleados para aislar y concentrar los solutos orgánicos de una muestra incluyen técnicas de destilación, extracción líquido-líquido y líquido-sólido.

La extracción en fase sólida es un procedimiento de preparación de la muestra basado en mecanismos de partición, adsorción, afinidad o intercambio iónico. Ha adquirido gran aceptación por ser más rápida que la mayoría de las técnicas clásicas. El principio de la retención en esta técnica es análogo al de la CLAE y es adecuado para el análisis de contaminantes de cualquier polaridad, dependiendo del soporte sólido utilizado. La extracción puede ser realizada en cartuchos, columnas o en discos de membranas. La reciente introducción de cartuchos de alta eficiencia ha contribuido a lograr un aislamiento más eficiente de un gran número de contaminantes. Además, este método de pretratamiento de la muestra es susceptible de automatizarse.

En la extracción líquido-sólido se pasa la muestra acuosa a través de una columna que contiene un adsorbente adecuado y los solutos orgánicos adsorbidos son posteriormente eluidos con un volumen pequeño de un disolvente orgánico. Los soportes sólidos empleados en esta separación incluyen carbón, resinas macrorreticulares, espumas o gomas de poliuretano, fases enlazadas e intercambiadores de iones.

1.4. SOPORTES SÓLIDOS EMPLEADOS EN EXTRACCIÓN LÍQUIDO-SÓLIDO.

Adsorbentes de carbón.

Las tres formas de carbón usadas en cromatografía son el carbón grafitizado, el carbón activado y los tamices de carbón molecular. Los tamices de carbón molecular tienen

poros pequeños y grandes áreas de superficie, siendo más adecuados para emplearse en la separación de gases por cromatografía de gases que como adsorbentes en el pretratamiento de una muestra de agua.

El carbón grafitizado es una forma de carbón relativamente pura preparada a temperaturas mayores de 1000 °C. Presenta una pequeña área de superficie (6-30 m²/g), se utiliza principalmente como adsorbente o soporte en cromatografía de gases. El carbón negro parcialmente grafitizado (por ejemplo, carbopack B) tiene un área de superficie de ~ 100 m²/g y un pH=10.25 en suspensiones acuosas. El carbón activado es preparado mediante la oxidación de carbones vegetales a baja temperatura, estos materiales tienen grandes áreas de superficie (300-1000 m²/g), una distribución de diámetro de poro ancho, y una superficie heterogénea que contiene grupos funcionales activos.

Se pueden presentar algunos problemas en cuanto a la adsorción de compuestos orgánicos en el soporte de carbón los cuales pueden afectar su identificación y cuantificación en una muestra acuosa. Algunos inconvenientes son que la desorción de los solutos no siempre es completa y los compuestos desorbidos no siempre son idénticos a aquellos originalmente extraídos.

Exceptuando posiblemente el caso de los compuestos orgánicos polares de bajo peso molecular, la mayoría de los estudios ha concluido que los adsorbentes de polímeros porosos macrorreticulares¹³⁻¹⁶ proporcionan una mayor recuperación de compuestos orgánicos (ésteres, alcoholes, ésteres ftalato, compuestos aromáticos, aldehidos, cetonas, pesticidas, compuestos aromáticos clorados y ácidos carboxílicos) en muestras de agua que los soportes sólidos de carbón.

Sin embargo, la capacidad de extracción del carbón es aceptable^{13,14,16} para la resolución de varios problemas analíticos. Así, por ejemplo se han empleado cartuchos de carbón negro grafitizado¹⁷ como soporte en el enriquecimiento de trazas de los 11 compuestos fenólicos prioritarios presentes en agua. En este trabajo la eficiencia del cartucho carbopack para retener fenoles se comparó con la obtenida empleando una fase enlazada C-18. El adsorbente de carbón resultó ser más adecuado para retener los fenoles muy polares que la sílica químicamente modificada C-18.

Adsorbentes de polímeros porosos macrorreticulares.

Las resinas macrorreticulares consisten de aglomerados de microesferas empacadas aleatoriamente y constituidos por una red de agujeros y canales. Esto trae como consecuencia una estabilidad mecánica y áreas de superficie mayores que las de los geles estireno-divinilbenceno.

Las propiedades características de la serie de resinas macroreticulares XAD Amberlite producidas por Rohm y Haas se dan en la tabla 3.

TABLA 3. Propiedades físicas de las resinas amberlite XAD.

TABLA 3

Tipo	Composición	Carácter	Diámetro promedio de poro, A°	Área específica de superficie m ² /g	Poros específico ml/g
XAD-1	copolímero estireno-divinilbenceno	hidrofóbico	200	100	0.69
XAD-2	copolímero estireno-divinilbenceno	hidrofóbico	85-90	290-300	0.69
XAD-4	copolímero estireno-divinilbenceno.	hidrofóbico	50	750	0.99
XAD-7	polímero de metacrilato	poco hidrofílico	80	450	1.08
XAD-8	polímero de metacrilato de metilo	poco hidrofílico	250	140	0.82

Las resinas de ésteres acrílicos son más hidrofílicas que los copolímeros estireno-divinilbenceno; por consiguiente, éstas se humectan más fácilmente y adsorben más agua.

Los polímeros porosos macroreticulares son ampliamente usados para la remoción de trazas de compuestos orgánicos en muestras de agua. La gran afinidad de estos polímeros por los compuestos neutros orgánicos, su baja retención de agua, su inercia química y la facilidad de recuperación de la muestra son características que han contribuido a su gran aceptación.

Generalmente, los porcentajes de recobro de compuestos orgánicos en muestras de agua obtenidos empleando resinas XAD son mayores con respecto a los obtenidos con soportes sólidos de carbón.

Los polímeros porosos macroreticulares requieren una purificación cuidadosa previa a su empleo en el análisis de trazas. Para remover las impurezas presentes se realiza un procedimiento de extracciones sucesivas ¹⁸ durante ocho horas con cada uno de los siguientes disolventes: metanol, acetonitrilo y éter.

Adsorbentes de poliuretano.

El poliuretano es un material espumoso de poro abierto que ha sido empleado como adsorbente^{19,23} para extraer y aislar sustancias orgánicas neutras en agua tales como: hidrocarburos aromáticos, pesticidas y fenoles. Los poliuretanos de poro abierto están constituidos de un aglomerado de partículas esféricas de diámetro 1-10 μ que forman una estructura rígida y altamente permeable. Su área de aplicación y modo de empleo es muy similar a la de los polímeros porosos macrorreticulares.

Adsorbentes de fases-enlazadas.

En este tipo de soportes sólidos, la partícula de fase ligada está compuesta por un material de base, sílica gel, alúmina, agarosa, copolímero de estireno y divinilbenceno, etc., al que se une químicamente un compuesto que contiene un grupo funcional específico. En la tabla 4 se muestran las características de algunos adsorbentes de sílica de fase enlazada que incluyen sílica gel (material base), fases enlazadas no polares y polares, y adsorbentes de intercambio iónico.

TABLA 4. Características de los adsorbentes de sílica de fases enlazadas.

TABLA 4

Tipo de adsorbente	Tipo de muestra	Aplicación
octadecilo	extracción en fase reversa de compuestos no polares	medicamentos, aceites esenciales, conservadores de alimentos, vitaminas, pesticidas, esteroides y hidrocarburos.
octilo	extracción en fase reversa de compuestos moderadamente polares	contaminantes prioritarios, pesticidas
fenilo	extracción en fase reversa de compuestos no polares. Proporciona menor retención de compuestos hidrofóbicos	poco utilizado
cianopropilo	extracción en fase normal de compuestos polares	aminas, alcoholes, colorantes, vitaminas, fenoles
silica gel	adsorción de compuestos polares	medicamentos, alcaloides, micotoxinas, aminoácidos, compuestos heterocíclicos, lípidos, esteroides, ácidos orgánicos, terpenos, vitaminas.
función diol	extracción en fase normal de compuestos polares. (similar a la silica gel).	proteínas, péptidos.
aminopropilo	extracción de intercambio aniónico débil	carbohidratos, péptidos, nucleótidos, esteroides, vitaminas
dimetilaminopropilo	extracción de intercambio aniónico débil	aminoácidos
función ácido sulfónico aromático	extracción de intercambio catiónico fuerte y extracción de fase reversa	aminoácidos, catecolaminas, ácidos nucleicos
aminas cuaternarias	extracción de intercambio aniónico fuerte	antibióticos, ácidos nucleicos

Resinas de intercambio iónico.

Estos materiales se usan ampliamente para la extracción y aislamiento de sustancias ácidas y básicas. Ejemplos típicos incluyen la recuperación selectiva de fenoles, ácidos orgánicos, esteroides y aminoácidos de fluidos biológicos. El intercambio iónico es una modalidad de la cromatografía, eficiente para las aplicaciones mencionadas ya que las moléculas neutras que interfieren en el análisis cromatográfico final son fácilmente eliminadas del intercambiador iónico, sin afectar la recuperación de los solutos ionizados.

1.5. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA EN LÍNEA.

La determinación cuantitativa²⁴ de compuestos orgánicos traza presentes en muestras de agua, requiere del desarrollo de técnicas analíticas sensibles a niveles de ppb y en ocasiones hasta niveles de sub-ppb. El análisis de trazas en matrices complejas exige una preparación específica de la muestra, siendo ésta una etapa importante dentro del análisis cuantitativo. A estos niveles²⁵ es necesario aislar y preconcentrar los analitos de interés de una muestra antes de su separación y detección mediante una técnica cromatográfica. Para este propósito, se pueden emplear técnicas analíticas de sorción líquido-sólido (extracción en fase sólida, EFS) las cuales representan una excelente alternativa con respecto a la extracción líquido-líquido (ELL), técnica que requiere de varias etapas de manipulación de la muestra, del empleo de grandes volúmenes de disolventes y de evaporaciones de los mismos.

La metodología por EFS²⁶ se aplica para la preconcentración y limpieza de muestras ambientales así como para la purificación de compuestos químicos. Emplea pequeñas columnas que contienen adsorbentes como: sílica, fases de silicagel ligadas a un hidrocarburo (C8, C18), alúmina, polímeros porosos con o sin grupos de intercambio iónico o materiales de carbón. Estas columnas pueden extraer compuestos traza de matrices líquidas e incluso gaseosas. Los primeros soportes sólidos empleados²⁷ en operaciones de extracción fueron los carbones activos. A pesar de su buena estabilidad y su capacidad de adsorción, estos soportes presentan el inconveniente de una desorción parcial y de una falta de reproducibilidad. Actualmente, se utilizan mucho los adsorbentes apolares de sílice de fases enlazadas n-alcilo y los copolímeros de estireno-divinilbenceno. Los copolímeros presentan la ventaja de poseer una estructura apolar muy homogénea y una gran estabilidad química en función del pH; por el contrario las sílices químicamente enlazadas son menos homogéneas debido a la presencia de los grupos de silanoles residuales y además solamente pueden emplearse para valores de pH comprendidos entre 2 y 8.

El inconveniente presentado por los copolímeros es una resistencia a la presión muy inferior a la de los soportes hechos a base de sílice. Los copolímeros son susceptibles a contaminarse por lo que es necesario realizar una purificación antes de emplearlos; este proceso de purificación consiste generalmente en una serie de lavados sucesivos en un equipo soxhlet empleando diversos disolventes orgánicos.

Las técnicas de preconcentración por EFS se efectúan de dos modos diferentes: fuera de línea y en línea; ambas se emplean en el monitoreo de sustancias contaminantes presentes en ríos y aguas residuales. En la técnica de preconcentración fuera

de línea ²⁸, los compuestos traza son retenidos en una columna de vidrio o de plástico empacada con un adsorbente apropiado o en una membrana porosa recubierta con una delgada capa del adsorbente y después son eluidos con un volumen pequeño de un disolvente orgánico adecuado, seguido por una operación de evaporación con el fin de obtener un extracto más concentrado o bien, un extracto seco. Posteriormente el extracto es analizado por alguna técnica cromatográfica, por lo que puede emplearse la cromatografía de gases o la cromatografía de líquidos de alta eficiencia. En esta técnica, las etapas de preconcentración y de análisis son totalmente independientes la una de la otra.

En el desarrollo de esta técnica, se realizan varias etapas de manipulación de la muestra como evaporación y transferencia; razón por la cual existen riesgos de contaminación y de pérdida de la muestra.

En general, se prefieren las técnicas de preconcentración en línea ²⁹ si se pretende automatizar la limpieza de la muestra y las operaciones de análisis. En esta metodología los analitos de interés se retienen en una precolumna de acero inoxidable empacada con un adsorbente apropiado de granulometría muy fina (aproximadamente 10 μ) que está acoplada a una columna analítica mediante válvulas de conmutación; posteriormente los solutos adsorbidos son eluidos directamente desde la precolumna a la columna analítica con una fase móvil adecuada. Como no hay manipulación externa de la muestra entre las etapas de preconcentración y análisis se obtienen resultados más exactos en el análisis de trazas. El término en línea significa que puede realizarse el acoplamiento directo de las diversas operaciones realizadas en un método analítico. Por ejemplo, en esta metodología desarrollada no hay etapas intermedias de evaporación y de redisolución de las sustancias entre su elución de la precolumna y su separación analítica.

Cuando se analizan muestras complejas y no se cuenta con un detector específico para los compuestos traza de interés, la selectividad puede mejorarse empleando varias precolumnas empacadas con diferentes soportes sólidos en serie durante la etapa de preconcentración y limpieza de la muestra (Cromatografía Multidimensional). La Cromatografía Multidimensional es un modo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, en el cual los analitos de una muestra se separan en forma secuencial en dos o más columnas empacadas con diferentes rellenos; es decir comprende el empleo de varios modos cromatográficos en una sola corrida y ha demostrado poseer una gran versatilidad para resolver numerosos problemas analíticos y adaptarse a la automatización de los equipos cromatográficos. Se aplica para el análisis de drogas en fluidos biológicos como suero y plasma, también en áreas clínicas, alimentos, problemas ambientales, petroquímica, etc., todas estas áreas de aplicación manejan matrices complejas.

Si se utilizan diferentes modos de la cromatografía de líquidos o diferentes columnas acopladas en serie es conveniente evaluar la compatibilidad de los disolventes a utilizar en cada modalidad. Es así que, si se utiliza una combinación entre fase reversa y normal, se debe poner un sistema intermediario que permita eliminar el agua proveniente del primero.

El sistema multidimensional de columnas opera empleando válvulas de conmutación colocadas entre las diferentes combinaciones de columnas. Se pueden usar válvulas de 3, 4, 6 y 10 puertos en las separaciones efectuadas por cromatografía multidimensional.

Un ejemplo de aplicación de estos sistemas es el presentado por R. W. Frei, G. J. Jong y U. A. Th. Brinkman, quienes analizaron trazas de 29 contaminantes prioritarios (fenoles, aminas y otros aromáticos) en una matriz de agua residual industrial. Emplearon un sistema de tres precolumnas empacadas con diferentes adsorbentes (C-18, fase polimérica de estireno-divinilbenceno y un intercambiador de cationes), acopladas en serie a una columna analítica de fase reversa C-18, empleando como sistema de detección un detector ultravioleta con arreglo de diodos. Los analitos de la muestra se separan en tres fracciones con este sistema de precolumnas y enseguida se efectúa la separación sucesiva de cada fracción en la columna analítica. En esta corrida los solutos apolares se retienen en la precolumna C-18, los moderadamente polares en la fase polimérica y los solutos polares en el intercambiador de cationes.

1.6. MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

En razón del impacto negativo causado por los compuestos fenólicos en el medio ambiente, se han desarrollado diversos métodos analíticos para detectarlos y cuantificarlos en matrices acuosas ambientales. Estos métodos incluyen diversas técnicas analíticas como: colorimetría³⁰⁻³⁷, cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)³⁸⁻⁴⁸ y cromatografía de gases (CG)⁴⁹⁻⁵².

El procedimiento estándar involucra la reacción de los compuestos fenólicos con la 4-aminoantipirina en presencia de ferricianuro de potasio para formar un derivado coloreado. Se emplea para la determinación de la concentración total de fenol. No es posible diferenciar entre varios fenoles y en general la mayoría de los compuestos fenólicos que presentan sustitución "para" no reaccionan. Sin embargo los sustituyentes "para" del fenol tales como carboxilo, halógeno, hidroxilo, metoxilo o grupo ácido sulfónico si reaccionan produciendo un derivado coloreado con la 4-aminoantipirina. El intervalo de trabajo es de 1 a 30 µg/l usando fenol como estándar. El límite de detección para este método es 1 µg/l de fenol.

En la actualidad, la determinación analítica de contaminantes orgánicos en matrices acuosas se basa en el empleo de técnicas de análisis por cromatografía, ya sea en fase líquida (CL) o en fase gaseosa (cromatografía de gases, CG). La elección del método cromatográfico más adecuado para el análisis de una muestra de agua depende principalmente de la volatilidad, la estabilidad térmica y la naturaleza química de los analitos de interés de la muestra.

Para identificar y medir cuantitativamente compuestos fenólicos a niveles de µg/l en agua, se utilizan procedimientos que generalmente involucran una etapa preliminar de preparación de la muestra que consiste en una extracción líquido-líquido (ELL) o bien una extracción en fase sólida (EFS), seguida por un método cromatográfico. Los métodos cromatográficos (CG, CL) han reemplazado a la colorimetría dando lugar a un mejoramiento de la selectividad.

En los últimos años la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se ha transformado en una de las metodologías analíticas más ampliamente utilizadas en el análisis de sustancias orgánicas. Por la rapidez con la cual se obtienen resultados cuantitativos se le emplea tanto en los análisis de muestras de rutina como en el seguimiento

de procesos de líneas de producción. La CLAE es una técnica versátil, rápida y con una excelente capacidad para el análisis de trazas. La selectividad aportada por esta técnica es mayor que la de CG debido a que los dos parámetros que afectan la separación (fase estacionaria y fase móvil) comprenden diversos materiales que varían en un amplio rango de polaridades y funciones químicas.

La cromatografía de líquidos en fase reversa es la modalidad más versátil y de mayor empleo en CLAE, se estima que entre el 75 a 90% de todas las separaciones son realizadas en el modo de fase reversa, además, exceptuando la cromatografía de exclusión, es la más sencilla y predecible.

Los disolventes de cromatografía de líquidos de fase reversa son más económicos y menos riesgosos, los tiempos de equilibrio entre columna y fase móvil son menores, el gradiente de elución no presenta dificultades^{28,33}. Se puede citar algunas de las ventajas de la cromatografía de líquidos en fase reversa:

- 1) Se pueden separar compuestos no iónicos, iónicos e ionizables en la misma columna, con la misma fase móvil.
- 2) La fuerza de atracción superficie no polar-soluto es débil.
- 3) Se pueden separar selectivamente compuestos iónicos e ionizables mediante las diferentes formas de cromatografía en fase reversa: cromatografía de apareamiento iónico, supresión iónica e intercambio de ligando.
- 4) El sistema es relativamente simple de operar.
- 5) Como las fases estacionarias son químicamente enlazadas, las columnas son estables y las separaciones son reproducibles.
- 6) Debido a las energías débiles en la superficie de las fases enlazadas, los análisis son rápidos y los tiempos de re-equilibración son cortos.
- 7) La fase móvil predominante es agua, abundante y económica.
- 8) El modificador orgánico predominante, metanol, es asequible en calidad y precios adecuados.
- 9) La cromatografía en fase reversa puede utilizarse para determinar varias propiedades fisicoquímicas como: hidrofobicidad, constantes de disociación y constantes de complejación.
- 10) Empleando disolventes de inyección significativamente más débiles que la fase móvil, se puede realizar la preconcentración de solutos seleccionados en la cabeza de la columna.
- 11) La adsorción irreversible, que se presenta frecuentemente en la silicagel, raramente ocurre.

Algunos de los inconvenientes que se presentan en esta modalidad son:

- 1) El intervalo de pH es limitado de 2 a 8 con empaques para columna que contienen como material base la sílica.
 - 2) Si los grupos silanoles residuales están presentes en la superficie de la sílica, puede ocurrir una adsorción de los solutos a la superficie de la sílica, dando lugar a la obtención de picos no simétricos.
 - 3) El mecanismo de retención es más complejo que en otras formas de cromatografía por lo que se requiere conocerlo más para poder controlarlo.
- En cromatografía de líquidos en fase reversa, la fase estacionaria es no polar y la fase móvil es muy polar (en general mezcla de agua y un modificador orgánico como metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano).

La teoría solvofóbica de Horvath es la que mejor explica el mecanismo de retención en esta modalidad de la cromatografía. Esta teoría pone de manifiesto que la interacción entre moléculas de soluto y de disolvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de disolvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria, que actúa como receptor pasivo.

En la interacción de un compuesto orgánico con la fase enlazada, puede asumirse que el grupo polar se orienta hacia la fase móvil acuosa, mientras que su porción hidrofóbica lo hace hacia la superficie hidrocarbonada. La magnitud de la interacción soluto-fase enlazada (y la retención) será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar y consecuentemente, la superficie de contacto. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los disolventes polares y reducirán la retención.

La CLAE ofrece la posibilidad de separar fenoles muy polares y con un alto punto de ebullición. La mayoría de los fenoles son compuestos relativamente polares y su separación debe efectuarse idealmente mediante la cromatografía de líquidos. Las diferencias en su comportamiento cromatográfico requieren por lo general de técnicas de gradiente para lograr una buena resolución en tiempos de análisis cortos. La principal ventaja de la CLAE en el análisis de los compuestos fenólicos es que generalmente puede emplearse sin consumir tiempo necesario para realizar etapas de derivatización las cuales con frecuencia son necesarias cuando se utiliza la cromatografía de gases.

Los sistemas de detección más empleados en el análisis cromatográfico de compuestos fenólicos por CLAE son los detectores UV y el electroquímico.

El detector UV de arreglo de diodos ha tenido un considerable desarrollo en los análisis de compuestos fenólicos⁵⁴ mediante CLAE, en donde para propósitos de identificación de los fenoles se emplean además del tiempo de retención el espectro ultravioleta. Con el detector UV de arreglo de diodos, se monitorea y almacena (en un soporte magnético) la información relativa a todo el espectro de absorción, de modo que esa información puede ser posteriormente recuperada y manipulada. Los datos obtenidos del espectro UV son necesarios en la asignación de fórmulas estructurales. La cuantificación de los solutos es más exacta debido al registro de diferentes longitudes de onda y la posibilidad de chequear la pureza del pico. El espectro ultravioleta obtenido se usa para la identificación de picos cromatográficos desconocidos, mediante su comparación con espectros similares de estándares.

Los compuestos que son oxidados o reducidos en seguida como los fenoles, mercaptanos, aminas, compuestos halogenados y nitro aromáticos, aldehidos, cetonas y especialmente bencidinas pueden ser monitoreados por detección electroquímica. Mediante una cuidadosa selección del potencial aplicado a los electrodos, pueden mejorarse tanto la selectividad como la sensibilidad.

La mayoría de los métodos de determinación de fenoles por CL emplean columnas de fase reversa con un sistema de detección UV.

El grupo de fenoles considerados por la US EPA como contaminantes prioritarios ha sido analizado y cuantificado por numerosos métodos analíticos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Uno de estos métodos¹ considera el análisis de fenoles mediante CLAE y su detección por reacción post-columna. El sistema diseñado emplea la reacción de 10 de los fenoles de la lista de contaminantes de la US EPA con la 4-aminoantipirina en presencia de

ferriicianuro de potasio, es decir se combina el método cromatográfico con un procedimiento colorimétrico. La separación es por cromatografía de fase reversa y la detección con un espectrofotómetro de arreglo de diodos. El procedimiento de separación de la mezcla emplea un gradiente lineal con el fin de proporcionar una resolución óptima de los 10 solutos.

Realini ³² realizó la extracción de alquil, cloro y nitrofenoles de agua, empleando como disolvente de extracción cloruro de metileno (CH_2Cl_2) y como reactivo par-iónico el cloruro de tetrabutilamonio para concentrar los fenoles de la muestra acuosa. La separación se efectuó con una columna C18 de 5 μ y empleando un sistema de detección UV a 254 y 280 nm. Las recuperaciones de los fenoles variaron de 75 a 99 %.

C. E. Werkhoven-Goewie, W. M. Boon, A. J. J. Praat, R. W. Frei y U. A. Th. Brinkman ⁴⁷, encontraron que la separación y preconcentración en línea de los compuestos mono y diclorofenoles pueden realizarse en columnas empacadas con un copolímero divinilbenceno-estireno (PRP, polymeric reverse-phase). Debido a la presencia de anillos aromáticos en este tipo de material, se observó que la retención de los compuestos cloroaromáticos era mayor que en materiales C-18 de área superficial específica comparable. Esta característica, lo hace ser un material eficiente y adecuado para la preconcentración en general, de compuestos aromáticos de naturaleza medianamente polar y apolar.

O. Busto, J. C. Olucha y F. Borrull ⁵⁵⁻⁵⁶ desarrollaron dos métodos diferentes de HPLC, por cromatografía de fase reversa y detección ultravioleta con un detector UV de arreglo de diodos, para monitorear algunos cloro y metilfenoles considerados como contaminantes prioritarios por la EPA. La separación de los fenoles se realizó por las dos modalidades: corrida isocrática y gradiente de elución.

En ⁵⁵ ellos optimizaron la composición de la fase móvil para lograr la separación isocrática de los fenoles empleando el mapa de resolución superpuesto (ORM). Este mapa proporciona la optimización de mezclas de eluyentes de composición cuaternaria; se utilizaron los siguientes cuatro disolventes orgánicos: metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano e isopropanol y además agua. Sin embargo, por este método no se logra una adecuada separación del pentaclorofenol. Es decir, su pico no aparece o su tiempo de retención es muy grande. Por esta razón, emplearon el gradiente de disolventes para lograr una buena separación ⁵⁶ de la mezcla de fenoles incluyendo al pentaclorofenol; siendo posible realizar una identificación rápida de este soluto.

G. Marko-Varga y D. Barcelo ⁵⁷ desarrollaron un método de análisis para el monitoreo en agua de río de 29 compuestos contaminantes que incluyen fenoles y otros derivados aromáticos. Emplearon un sistema de EFS previo a la inyección de la muestra en el cromatógrafo. Investigaron la selectividad en diversas columnas de separación de sílica, de carbón y polimérica para la separación de los diferentes tipos de fenoles que poseen grupos funcionales diferentes y sustituyentes en diferentes posiciones del anillo aromático. La separación se efectuó en condiciones de elución isocrática y detección UV a 280 nm.

Ronald L. Smith y Donald J. Pietrzyk ⁵⁸, encontraron que el material PRP es adecuado para la preconcentración, separación y determinación cuantitativa de clorofenoles y ácidos fenoxiacéticos. Ellos demostraron que los copolímeros de poliestireno-divinilbenceno son estables en todo el rango de pH. Por ello, el pH es un parámetro que puede ser usado para realizar ambos procesos, el de enriquecimiento de trazas y el de elución de estos compuestos aromáticos. Es decir, controlando el pH de la disolución los

compuestos clorofenoles y ácidos fenoxiacéticos pueden ser convertidos de especies neutras a especies iónicas o viceversa, y desorberse o adsorberse en la fase sólida.

Se ha observado que para los adsorbentes del tipo fase reversa, la retención es alta cuando el analito está en forma neutra. Esto indica que las condiciones óptimas (K' grande) para la preconcentración de los compuestos cloroaromáticos y 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). Otros soportes sólidos del tipo poliestireno-divinilbenceno similares al material PRP ⁵⁹, que se han empleado para la preconcentración de los compuestos fenólicos son las resinas XAD-2. La adsorción de los fenoles en este tipo de material también depende del pH de la disolución.

La mayoría de los métodos por cromatografía de gases utilizados en el análisis de fenoles requieren una etapa de derivatización con el objeto de mejorar la volatilidad y detección de los analitos. Algunos de los reactivos empleados para realizar la etapa de derivatización son reactivos halogenados como anhídrido trifluoroacético o bromuro de pentafluorobencilo. Estos métodos requieren también un proceso apropiado de limpieza de la muestra y el monitoreo de los analitos de interés se efectúa empleando diversos sistemas de detección tales como: detector de ionización de llama, detector de captura de electrones y el espectrómetro de masas.

La derivatización constituye una limpieza adicional de la muestra ya que las interferencias pueden entorpecer el análisis de los compuestos de interés. En cromatografía de gases, si los solutos analizados son compuestos muy polares es necesario transformarlos en solutos volátiles apolares mediante una derivatización empleando ya sea metilación o fenoxiacidos. Los agentes de derivatización ideales presentan ciertas características tales como: ser selectivos, no tóxicos, su reacción debe ser de cinética rápida, no interferir en el análisis de los solutos y además el rendimiento de la reacción de derivatización debe ser alto.

En la actualidad uno de los propósitos es lograr la completa automatización de la etapa de derivatización con las técnicas cromatográficas de gases y de líquidos, con lo cual se mejoraría la reproducibilidad y repetibilidad de los análisis.

Generalmente, el producto derivatizado es térmicamente más estable, volátil y fácil de detectar. Por ejemplo, la derivatización de los clorofenoles para obtener sus derivados de pentafluorobencilo proporciona una mejor sensibilidad y selectividad para su análisis por CG capilar/DCE (cromatografía de gases y detección por captura de electrones).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (US EPA) ha propuesto métodos analíticos para el monitoreo de contaminantes prioritarios en aguas residuales industriales a muy bajos niveles de concentración. Los métodos estándar actuales para el análisis de trazas de fenoles en aguas residuales son el método 604 y la sección ácida extraíble del método EPA 625 de la US EPA. Estos métodos están basados en el pretratamiento de la muestra por extracción líquido-líquido; son laboriosos ya que requieren tiempo necesario para efectuar los procedimientos de preconcentración y limpieza de la muestra e incluyen varios pasos de manipulación de la muestra. Estas características se traducen en una serie de desventajas como las siguientes:

- Elevados riesgos de pérdida de muestra durante el procedimiento.
- Riesgo para el analista que manipula productos tóxicos concentrados.
- Costo elevado por el uso de grandes volúmenes de disolventes de alta pureza.

- Proceso contaminante, por la evaporación de dichos disolventes.

El método 604⁶⁰ se aplica en la determinación de los 11 compuestos fenólicos tóxicos incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la US EPA. Es aplicable para el análisis de estos contaminantes en descargas municipales e industriales. La sensibilidad de este método generalmente depende del nivel de interferencias más que de las limitaciones instrumentales. En este método el pretratamiento de la muestra se realiza por ELL, concentrando los analitos de la muestra con cloruro de metileno. Posteriormente los analitos concentrados son separados y analizados por cromatografía de gases empleando como sistemas de detección el detector de ionización de flama y el detector de captura de electrones.

Los límites de detección obtenidos en aguas residuales con un detector de ionización de flama en ausencia de interferencias se muestran en la tabla 5.

TABLA 5. Límites de detección en µg/l de compuestos fenólicos.

TABLA 5.

Compuesto	tiempo de retención (min)	límite de detección (µg/l)
2-clorofenol	1.70	2
2-nitrofenol	2.0	2.5
fenol	3.01	1.4
2,4-dimetilfenol	4.03	1.7
2,4-diclorofenol	4.30	2.1
2,4,6-triclorofenol	6.05	5.0
4-cloro-3-metilfenol	7.50	8.3
2,4-dinitrofenol	10.00	7.0
4,6-dinitro-2-metilfenol	10.24	10.0
pentaclorofenol	12.42	10.0
4-nitrofenol	24.25	10.0

Las condiciones del análisis cromatográfico son: Columna de vidrio supelcoport 80/100 empacada con 1% SP-1240 DA de 6 ft de longitud X 2 mm de D.I. Gas acarreador N₂ a una velocidad de flujo de 30 ml/min. Temperatura de la columna en el momento de la inyección 80 °C, programada inmediatamente a 8 °C /min a una temperatura final de 150 °C.

El límite de detección está calculado tomando en cuenta la respuesta mínima detectable y es igual a 5 veces el ruido de fondo.

El método también se emplea con una etapa de derivatización en la cual se realiza la preparación de derivados de pentafluorobenzilbromuros. Posteriormente estos se separan por CG detectando con un detector de captura de electrones. Además son necesarios procedimientos adicionales de limpieza para ayudar al analista en la eliminación de interferencias.

Si se requiere la limpieza, la sensibilidad del método es 10 ppb. Las condiciones empleadas para el análisis son: columna de vidrio empacada con 5% OV-17 ON CHROMOSORB W-AW. Gas acarreador 5% metano/95% argón a una velocidad de flujo de 30 ml/min. Temperatura de la columna 200 °C.

Todos los materiales empleados en la determinación de estos contaminantes: disolventes, reactivos, material de vidrio y otros deben estar libres de impurezas. Para demostrar que estos materiales están libres de impurezas se corren blancos con agua destilada.

1.7. CERTIFICACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO.

Es indispensable, que todo nuevo método analítico deba certificarse para demostrar su idoneidad, es decir se debe confirmar que los resultados por él producidos son confiables. De manera general la certificación de un método analítico, consiste en aplicar el método desarrollado a un conjunto de muestras ya estudiadas mediante otro procedimiento estándar o de prestigio ⁶¹. Al realizar la comparación entre ambos métodos es necesario realizar la identificación de errores sistemáticos, para poder determinar si el método desarrollado proporciona resultados significativamente más altos o más bajos que el procedimiento estándar.

En el caso de los métodos cromatográficos la verificación de resultados confiables se realiza mediante una prueba de certificación que consiste en la comparación de resultados de las pruebas de adecuación y de análisis en paralelo de, al menos, dos muestras homogéneas de concentraciones conocidas, dentro del intervalo de aceptación del producto o dentro del intervalo de aplicación de la metodología.

CAPÍTULO 2.

PARTE EXPERIMENTAL.

2.1. EQUIPO, MATERIAL Y REACTIVOS.

Equipo:

Sistema cromatográfico: Cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer.

Opera en dos modos: elución isocrática y gradiente de disolventes.

Inyector: Inyector de rizo Rheodyne 7125, con loop de 24 µl.

Bombas: Sistema constituido por dos bombas de pistón (bombas recíprocas). Cada bomba es capaz de bombear a una velocidad de flujo que va desde 0.1 a 30 ml/min.

Detector: Detector UV con arreglo de diodos, Spectromonitor modelo 5000 de Thermoline Separations que permite trabajar simultáneamente a diferentes condiciones de sensibilidad y longitud de onda. En este trabajo el detector se utilizó únicamente a una longitud de onda de 270 nm.

Integrador: Integrador Hewlett-Packard modelo 3396A

Otros equipos:

Sistema purificador y desionizador de agua nanopure, Barnstead modelo 04747.

Sistema para filtrar Millipore modelo OM037.

Sistema de ultrasonido para desgasificar las soluciones y fases móviles.

Marca Sonicor, modelo SC-100.

Potenciómetro Corning modelo 220, equipado con un electrodo combinado vidrio calomel marca Cole-parmer, modelo 60648.

Sistema para empacado de columnas a alta presión marca Haskel, modelo 29426-DSTV-122

Bomba isocrática Beckman, modelo 110B.

Balanza analítica Ohaus.

Materiales:

Columna analítica (150X4.6 mm D.I.) empacada con fase reversa (C-18), SPHERISORB ODS-2 de 5 µ.

Precolumna (30X4.6 mm D.I.) empacada con fase reversa MCI GEL, CHP-3C de 10 µ.

Precolumna (20 X 2 mm D.I.) empacada con una resina aniónica HAMILTON PRP-X100, de 10 µ.

Membranas de nylon para filtración (Phenomenex) de 47 mm con poro de 0.45 μ .
Dos válvulas de conmutación de seis puertos, Rheodyne 7000.
Micropipetas marca Socorex, de capacidades: 5-50, 50-200 y 200-1000 μ l.
Jeringa de vidrio marca Hamilton, modelo CH-7402 con capacidad de 0-100 μ l.

Reactivos:

Fenoles:

4,6-Dinitro-2-metilfenol de 99% de pureza, Chem. Service Co., USA.
2,4-Dimetilfenol de 96.5% de pureza, Chem. Service Co., USA.
4-Cloro-3-metilfenol de 99% de pureza, Chem. Service Co., USA.
2,4-Diclorofenol de 99% de pureza, Chem. Service Co., USA.
2,4,6-Triclorofenol de 98% de pureza, Chem. Service Co., USA.
Pentaclorofenol de 99% de pureza, Chem. Service Co., USA.

Disolventes:

Ácido perclórico, reactivo analítico 70-72%, Química Dinámica S. A. de C. V., México.
Ácido acético glacial 100%, Merck Co., México.
Hidróxido de sodio bajo en carbonatos, J. T. Baker, México.
Metanol grado HPLC, Prolabo, Francia.
Acetonitrilo grado HPLC, Prolabo, Francia.

2.1.1. EMPACADO DE PRECOLUMNAS.

El tratamiento previo de la muestra se realiza por extracción en fase sólida (EFS). Esta preparación de la muestra es una etapa esencial en la determinación de microcomponentes (trazas) y en los casos donde la matriz que rodea a los analitos de interés es muy compleja. La aplicación de la EFS en línea requiere del empleo de precolumnas de acero inoxidable que se utilizan para concentrar compuestos al nivel de trazas; se empacan con cantidades variables de distintos materiales que comprenden principalmente adsorbentes polares, poco polares y materiales de intercambio iónico.

En este trabajo se empleó un sistema constituido por dos precolumnas de concentración de tamaño diferente, las cuales se empacaron en el laboratorio: una precolumna (30 x 4.6 mm D.I.) empacada con un adsorbente apolar MCI GEL, CHP-3C de 10 μ y una precolumna (20 x 2 mm D.I.), que contiene un intercambiador de aniones HAMILTON PRP-100 de 10 μ .

El proceso de empacado de las precolumnas se efectúa con un sistema para empacado que opera a alta presión. Esta operación requiere de la preparación de una suspensión estable del adsorbente dado, ésta se colocó en un baño de ultrasonido con el fin de desgasificarla y dispersar los aglomerados de soporte formados.

Para el empaqueo de la precolumna polimérica de concentración, se preparó una suspensión con 300 mg de la fase estacionaria MCI GEL, CIIP-3C en 4.3 ml de etanol absoluto. La precolumna se llenó con dicloroetano y se conectó al reservorio de suspensión. Una vez que la suspensión se vierte sobre el reservorio, éste se conecta al sistema de presión y se impulsa la fase con etanol acidificado. La precolumna queda empacada con el adsorbente en forma compacta y homogénea manteniendo la presión del sistema en 3000 psi.

En el caso de la precolumna aniónica se preparó una suspensión estable con 60 mg del adsorbente Hamilton PRP-X100 en aproximadamente 1 ml de metanol alcalinizado. La precolumna queda rellena en forma compacta y homogénea con el intercambiador de aniones manteniendo la presión en el sistema a 1700 psi.

Finalmente las dos precolumnas se someten a un proceso de limpieza y activación para poder utilizarlas en los ensayos de preconcentración y análisis cromatográfico de los seis fenoles hidrofóbicos.

2.1.2. CALIBRACIÓN DE LA PUNTA DE LA MICROPIPETA.

La calibración de la punta de la micropipeta es necesaria para determinar el volumen real de la punta y así poder realizar cálculos confiables de las recuperaciones de los fenoles presentes en la muestra. Esta operación involucra la valoración de un ácido fuerte con una base fuerte. Se prepararon disoluciones de HClO_4 y NaOH de concentraciones aproximadas: HClO_4 6 M y NaOH 0.2 M. Enseguida se preparó una disolución diluida de HClO_4 de concentración 0.6 M.

El procedimiento de calibración de la punta consistió en efectuar dos valoraciones con 2 ml de la disolución de HClO_4 0.6 M y empleando como valorante la disolución de NaOH 0.2 M, con lo cual se determinó la concentración molar exacta del HClO_4 concentrado. Luego, se realizaron dos valoraciones, tomando con la punta de la micropipeta tres alícuotas de 54 μl del ácido 6 M y adicionando a éstas tres alícuotas idénticas de agua pura. La disolución resultante se valoró con la solución básica 0.2 M, de manera que el volumen de base consumido permite determinar el volumen exacto de la punta de la micropipeta.

2.1.3. PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES.

Disoluciones estándar de fenoles:

Se preparó un volumen de 50 ml de una disolución concentrada de 1000 ppm en metanol grado cromatográfico, con cada uno de los seis fenoles hidrofóbicos. De esta disolución concentrada, se obtuvieron disoluciones diluidas que se emplearon en los ensayos realizados para la obtención de las curvas de los seis fenoles; las cuales muestran la variación de la respuesta del detector en función de la concentración de cada fenol en la muestra dopada. Estas disoluciones diluidas se disolvieron en una mezcla de ácido perclórico-acetonitrilo (pH=2) 50:50 (v/v). Todas las disoluciones de fenoles se mantenían en refrigeración para conservarlas en buen estado.

Disoluciones ácidas y básicas:

Se prepararon las siguientes disoluciones, disolviendo el soluto dado y aforando hasta un volumen definido:

Disolución de ácido perclórico 1 M.
Disolución de ácido acético 1 M.
Disolución de ácido perclórico 0.01 M.
Disolución de hidróxido de sodio (pH=11).

Otras disoluciones:

Disolución de metanol-ácido perclórico (pH=2) 10:90 (v/v).
Disolución de metanol-hidróxido de sodio (pH=11) 40:60 (v/v).

Fase móvil:

Fase A: Acetonitrilo-fase acuosa, (pH=4.5), 15:85 v/v, conteniendo perclorato de sodio 0.01 M y un buffer de ácido acético-acetato de sodio 0.02 M.

Fase B: Acetonitrilo-fase acuosa, (pH=4.5), 70:30 v/v, conteniendo perclorato de sodio 0.01 M y un buffer de ácido acético-acetato de sodio 0.02 M.

2.2. PRETRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

La cuantificación de cloro y nitrofenoles en agua se realiza mediante un sistema bidimensional de extracción en fase sólida en línea con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia. Estos métodos en línea empleados en la preconcentración, purificación y determinación de contaminantes traza son más eficientes que los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido; los cuales son largos y laboriosos.

2.2.1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE LA FASE POLIMÉRICA PRP. VOLUMEN DE FUGA.

La determinación experimental del volumen de fuga de los fenoles se efectuó haciendo pasar una disolución acuosa con los analitos de interés a través de una precolumna empacada con un adsorbente apolar del tipo poliestireno-divinilbenceno de 10 μ de tamaño de partícula.

La precolumna, de acero inoxidable y de dimensiones 30 x 4.6 mm D.I., se colocó entre los puertos 1 y 4 de una válvula de conmutación Rheodyne 7000, la cual a su vez se conectó con una bomba isocrática para la alimentación de la muestra y el disolvente para equilibrar la precolumna (puerto 6) y con el sistema de detección UV (puerto 5), como se indica en la figura 2. Durante estos experimentos el sistema HPLC se mantuvo apagado.

Primero, la precolumna se equilibró con el disolvente de disolución de la muestra (ácido perclórico 0.01 M) colocando la válvula en la posición A.

Enseguida, pasando la válvula a la posición B, la disolución de la mezcla de fenoles a niveles de ppm en ácido perclórico 0.01 M se dirigió directamente hacia el detector para medir su respuesta, de manera que se obtuvo el valor máximo de absorbancia, el cual es proporcional a la concentración de fenoles en la muestra. Finalmente, regresando la válvula a la posición A, la mezcla de fenoles se hizo pasar a través de la precolumna de fase reversa polimérica mientras se registraba la absorbancia del efluente.

En un principio, mientras los solutos de la muestra quedan adsorbidos en el empaque de la precolumna, el efluente no registra ninguna absorbancia. Después de concentrar un cierto volumen de muestra, la fuga de los analitos de la precolumna se manifiesta por un aumento en la señal del detector. La absorbancia aumenta progresivamente hasta llegar al valor máximo, que se determinó al inicio del proceso, indicando que la concentración de fenoles en el efluente es idéntica a la del influente y que se ha rebasado la capacidad de adsorción de la precolumna.

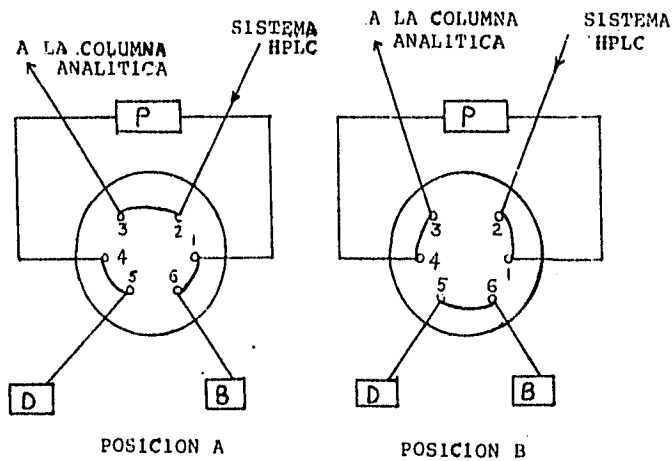


Figura 2. Diferentes posiciones de la válvula de conmutación.

P = precolumna polimérica (30 X 4.6 mm D.I.) de 10 μ de tamaño de partícula.

D = detector UV

B = bomba isocrática.

2.2.2. ESTUDIO DE LA DESORCIÓN DE LOS FENOLES DE LA FASE POLIMÉRICA.

El volumen de desorción se determina a un valor de 1% de la absorbancia total de la muestra y se define como el volumen al cual prácticamente todo el soluto concentrado se ha desorbido de la precolumna polimérica de extracción. Es decir, los analitos concentrados en la precolumna polimérica son eluidos con un disolvente apropiado, en este caso se utilizó una disolución alcalina que contiene metanol como modificador orgánico.

Esta elución de los analitos de la precolumna polimérica se manifiesta por un incremento brusco de la señal del detector seguido por una disminución paulatina de tipo exponencial. Se ensayaron condiciones para la desorción de los fenoles utilizando disoluciones de NaOH de pH diferentes, a las cuales se adicionaron volúmenes variados de metanol, con el fin de encontrar las condiciones óptimas para realizar la transferencia en línea de los analitos desde la precolumna polimérica de extracción y preconcentración hacia la precolumna de purificación del extracto (precolumna de intercambio de aniones).

2.3. DEFINICIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

En este trabajo experimental se ensayaron condiciones de elución isocrática así como gradiente de disolventes con el fin de lograr la mejor separación cromatográfica de los seis fenoles hidrofóbicos.

2.4. TRATAMIENTO DE LA MUESTRA PREVIO A SU ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.

Como las muestras de aguas naturales contienen sólidos en suspensión es necesario incluir una etapa previa de filtración. La filtración de la muestra mediante vacío se efectúa empleando una membrana de nylon de 0.45 μ de porosidad y un equipo de filtración adecuado.

La membrana se deja reposando el día anterior en metanol grado cromatográfico dentro de una caja petri. Al día siguiente se lava con dos porciones de 3 ml de metanol empleando el equipo de filtración y un vacío ligero; después se lava con 20 ml de agua desionizada para equilibrarla al medio acuoso. Este proceso de lavado de la membrana es con el objeto de eliminar las impurezas (residuos de plastificantes y antioxidantes) y así disminuir el riesgo de contaminación de la muestra.

Para la aplicación del método desarrollado en este trabajo al análisis de muestras de agua, se requiere que éstas sean colectadas en frascos de vidrio color ámbar con capacidad de 125 ml aproximadamente. El volumen de muestra puede variar entre 123 y 127 ml sin que se requiera efectuar ningún cambio en el método. Sin embargo, para calcular la concentración de los analitos de interés es necesario conocer con exactitud el volumen de la

muestra acuosa. Por eso, antes de comenzar el procedimiento de análisis, el menisco del líquido se marca en la botella para determinar posteriormente el volumen de muestra.

En el caso de las muestras dopadas, se adiciona una pequeña alícuota de la disolución estándar de fenoles (27 µl para dopar 125 ml de muestra con fenoles al nivel de 10 ppb) directamente en el frasco con la muestra y la mezcla se agita vigorosamente.

Posteriormente se procede a filtrar la muestra (dopada o sin dopar) con ayuda de un gendarme de vidrio para dirigir el líquido hacia el centro de la membrana, evitando en lo posible salpicar las paredes del recipiente de filtración. El frasco de muestreo se enjuaga con varias porciones de metanol puro, agitando vigorosamente el frasco tapado después de cada adición y pasando el líquido de enjuague a través de la misma membrana empleada para filtrar la muestra. En total se utilizan 10 ml de metanol para enjuagar el frasco de 125 ml. Todos los líquidos filtrados se colectan en un matraz kitazato de 250 ml y a esta mezcla se le añade directamente 1 ml de ácido perclórico 1.5 M para fijar el pH en un valor de 2, aproximadamente.

Finalmente, la muestra así preparada se desgasifica por ultrasonido y queda lista para el proceso de extracción en fase sólida, separación y análisis cromatográfico en línea.

El recipiente con la mezcla final obtenida se utiliza directamente para alimentar la bomba de carga de muestra; es decir, no se efectúa ningún trasvase de la muestra preparada.

El procedimiento anterior tiene por objeto minimizar los riesgos de pérdida de analitos y/o contaminación de la muestra durante su preparación. En efecto, algunos de los analitos estudiados, como el 2,4,6-triclorofenol y el pentaclorofenol, son muy hidrofóbicos y tienden a adsorberse en la superficie de los materiales que se ponen en contacto con la muestra acuosa (frascos, filtros, matraces, etc.). Por ello es necesario observar las siguientes precauciones:

- 1) Reducir al mínimo el número de recipientes empleados en la preparación de la muestra. No utilizar recipientes de gran volumen.
- 2) Enjuagar cuidadosamente los recipientes y materiales, que han estado en contacto con la muestra acuosa, con un pequeño volumen de un disolvente orgánico en el cual los analitos de interés sean muy solubles. Adicionar el disolvente de enjuague a la muestra preparada en el recipiente final que la contiene.
- 3) No utilizar recipientes de plástico porque en este material los solutos hidrofóbicos se adsorben más fuertemente.
- 4) Para evitar contaminación cruzada, limpiar cuidadosamente todo el material de vidrio después de cada experimento. Asimismo, lavar la tubería y la cabeza de la bomba empleada para la carga de muestra con metanol o acetonitrilo puros.

Es importante señalar que el tratamiento de muestra descrito aquí, previo a las operaciones de preconcentración y análisis en línea, es la única etapa del método en la que la muestra es manipulada por el analista. En todas las operaciones subsecuentes no hay manipulación externa de la misma.

2.5. PROCEDIMIENTO PARA LA PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE CLORO Y NITROFENOLES.

El sistema experimental en línea para efectuar la preconcentración, limpieza y análisis de los fenoles está constituido por dos precolumnas empacadas con adsorbentes de naturaleza diferente acopladas a una columna analítica de fase reversa tal y como se muestra en la figura 3.

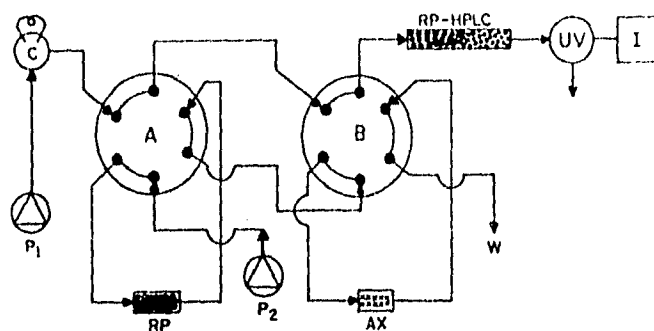


FIGURA 3. Diagrama del sistema experimental en línea para efectuar la preconcentración, limpieza y análisis de los fenoles.

P1, P2: bombas, siendo P1: sistema HPLC para gradiente binario

y P2: bomba isocrática.

A, B: válvulas de conmutación

C: inyector

W: deshechos

UV: detector ultravioleta de arreglo de diodos

RP: precolumna polimérica de extracción

AX: precolumna aniónica de purificación

RP-HPLC: columna analítica de fase reversa C-18

Al principio se trabajó con muestras sintéticas dopadas con concentraciones conocidas de los compuestos fenólicos y una vez que se encontraron las condiciones adecuadas para realizar la extracción en fase sólida y el análisis cromatográfico de los solutos; se aplicó dicho método a muestras de agua siendo necesario incluir un paso previo de filtración.

La extracción y concentración de los fenoles se efectúa en una precolumna (RP) de acero inoxidable (30 x 4.6 mm D.I.), empacada con un adsorbente polimérico poco selectivo del tipo estireno-divinilbenceno. La bomba isocrática P2 permite pasar la muestra de fenoles a través de la precolumna polimérica. Esta precolumna se encuentra montada en una válvula de conmutación (A). Los solutos se aíslan y concentran bajo condiciones ácidas (pH=2), quedando adsorbidos en su forma molecular. El volumen de muestra de fenoles que se percola en esta precolumna es de 75 ml; se consideró este volumen de carga debido a que los otros compuestos orgánicos presentes en la muestra de agua pueden disminuir el volumen de fuga de los solutos de interés. Además con este volumen de carga ninguno de los analitos se fuga de la precolumna polimérica.

La purificación del extracto se realiza en la precolumna AX (20 x 2 mm D.I.), empacada con un intercambiador de aniones el cual es un adsorbente más selectivo. Para ionizar a los solutos, se emplea una mezcla metanol-sosa (pH=11) 40:60 (v/v). La limpieza se realiza transfiriendo los solutos con dicha mezcla desde la precolumna polimérica hacia la precolumna aniónica; ésta se encuentra montada en la válvula de conmutación (B). Esta precolumna aniónica (AX) se conecta en línea con una columna analítica (150 x 4.6 mm D.I.) empacada con una fase reversa C18.

Este acoplamiento se realiza con la válvula de conmutación (B), por lo que al cambiar la posición de esta válvula se realiza la desorción de los fenoles de la precolumna aniónica y su correspondiente análisis cromatográfico en la columna analítica (RP-HPLC), empleando un gradiente de disolventes.

El análisis de los cloro y nitrofenoles se realiza con un detector ultravioleta con arreglo de diodos que permite trabajar a diferentes condiciones de sensibilidad y longitud de onda simultáneamente.

En la selección de las condiciones óptimas para la cuantificación en CLAE utilizando un detector ultravioleta deben considerarse la longitud de onda de trabajo, el ancho de banda instrumental y la constante de tiempo del detector. Para una mejor sensibilidad⁶² la longitud de onda de trabajo debe ubicarse en las proximidades del máximo de absorción de los picos de interés. Con excepción de los fenoles 4-6-dinitro-2-metilfenol y el pentaclorofenol³², cuyos máximos de absorbancia se encuentran cercanos a 254 nm, la longitud de onda de los máximos de absorbancia de los otros fenoles se encuentra cercana a los 270 nm.

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

1) La precolumna polimérica (RP) empacada con el adsorbente apolar, se equilibra con 20 ml de una mezcla metanol-ácido perclórico (pH=2) 10:90 (v/v). La bomba isocrática P2 permite pasar esta disolución por la precolumna, empleando un flujo de 2 ml/min. La precolumna se encuentra montada en la válvula de conmutación A.

2) Cargar en la precolumna RP 75 ml de muestra de fenoles previamente filtrada y acidificada a pH=2. Se emplea la bomba P2 para realizar esta extracción a un flujo de 2 ml/min.

3) Lavar la precolumna de extracción con 0.3 ml de agua pura, empleando un flujo de 0.1 ml/min. El disolvente de lavado tiene por objeto eliminar sales, ácidos, bases o algunos compuestos muy polares que pudieran haber quedado en el volumen intersticial de la precolumna durante la carga de la muestra.

4) Acondicionar la precolumna de purificación (AX) con 20 ml de la mezcla de metanol-sosa (pH=11) 40:60 (v/v) a un flujo de 1 ml/min. Esta precolumna se encuentra montada en la válvula de conmutación B; por lo que con la ayuda de la bomba isocrática P2 y el cambio de posición de dicha válvula se realiza el acondicionamiento.

5) Transferencia en línea de los solutos desde la precolumna RP hacia la precolumna AX con 20 ml de la mezcla metanol-sosa (pH=11) 40:60 (v/v) a un flujo de 1 ml/min.

6) Acondicionamiento de la columna analítica (RP-HPLC) con 8% de la fase B durante 15 min, empleando el sistema de bombas P1 para gradiente binario. Este acondicionamiento se realiza a un flujo de 1 ml/min.

7) El análisis de la muestra concentrada y purificada se realiza acoplado en línea la precolumna AX con la columna analítica (RP-HPLC). La desorción y análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos se realiza cambiando la posición de la válvula de conmutación B y con el sistema de bombas P1.

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

Fase móvil:

Fase A: acetonitrilo-agua (pH=4.5) 15:85 (v/v), conteniendo NaClO_4 0.01 M y $\text{CH}_3\text{COOH}\cdot\text{CH}_3\text{COONa}$ 0.02 M.

Fase B: acetonitrilo-agua (pH=4.5) 70:30 (v/v), conteniendo NaClO_4 0.01 M y $\text{CH}_3\text{COOH}\cdot\text{CH}_3\text{COONa}$ 0.02 M.

Gradiente empleado:

Tiempo (min)	0	35	50
% B	8	60	60

Condiciones del detector:

Sensibilidad: 0.05 AUFS.
Longitud de onda: 270 nm.
Constante de tiempo: 0.2

Flujo: 1 ml/min.
Temperatura: ambiente.

Simultáneamente, en esta etapa la precolumna (RP) se lava con 30 ml de agua pura.

8) Acondicionamiento del sistema acoplado en línea AX-RP-HPLC con 8 % de la fase A durante 15 min a un flujo de 1 ml/min.

9) Inyección de 24 µl del estándar de fenoles, manteniendo la precolumna AX en línea con la columna RP-HPLC. Durante esta etapa del método, se aprovecha para realizar simultáneamente el lavado de la precolumna RP con 20 ml de una disolución de metanol-agua 80:20 (v/v).

10) Finalmente las tres columnas cromatográficas: RP, AX y RP-HPLC se lavan cada una con 10 ml de agua pura.

2.6. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL METODO DESARROLLADO.

La evaluación estadística del método incluye los siguientes parámetros: linealidad, precisión, y exactitud.

Para estudiar la linealidad del método, se analizaron muestras de agua grado cromatográfico, dopadas con cada uno de los seis fenoles hidrofóbicos empleando concentraciones que variaron entre 1.33 y 100 ppb.

La precisión del método se evaluó mediante el análisis de siete muestras dopadas con cada uno de los fenoles a una concentración de aproximadamente 13.3 µg/l de cada soluto.

Para evaluar la exactitud del método se tomaron en cuenta las recuperaciones obtenidas de cada uno de los solutos en los análisis de siete muestras dopadas con cada uno de los fenoles a una concentración de aproximadamente 13.3 µg/l de cada soluto.

2.7. ANÁLISIS DE MUESTRAS ACUOSAS: AGUA POTABLE, AGUA DE POZO Y AGUA DE MANANTIAL.

Una vez realizada la certificación del método considerado, éste se aplicó a muestras de agua reales que incluyen agua potable, agua de pozo y agua de manantial. Cuando se trabaja con muestras de aguas naturales debe realizarse una filtración previa ya que estas muestras contienen sólidos en suspensión. El método desarrollado para la preconcentración y análisis cromatográfico de los cloro y nitrofenoles se aplicó a muestras acuosas sin dopar y dopadas con los seis fenoles hidrofóbicos.

CAPITULO 3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE LA PRECOLUMNA POLIMÉRICA DE FASE REVERSA.

La extracción y concentración de los fenoles poco polares se realiza en la precolumna de fase reversa empacada con una fase estacionaria de un copolímero del tipo poliestireno-divinilbenceno (PSDVB), dicho material también se conoce comúnmente como PRP (polymeric reverse-phase).

Durante el desarrollo de este trabajo experimental, se realizaron varios ensayos con el objeto de obtener el frente de elución de la mezcla de fenoles. Al percolar en la precolumna PRP 100 ml de la muestra ácida de los fenoles hidrofóbicos (pH=2) a niveles de ppm, no se observó ningún frente, por esta razón se considera que el volumen de fuga de los fenoles es mayor de 100 ml. Es decir, pueden cargarse en dicha precolumna 100 ml de la mezcla de los fenoles sin que exista fuga de los analitos.

Aunque es interesante cargar un volumen de muestra lo más grande posible para lograr límites de detección muy bajos, es necesario considerar que, debido a la pobre selectividad de los adsorbentes PSDVB, muchos otros compuestos orgánicos presentes en la matriz acuosa serán también adsorbidos. Esto tiene por consecuencia el disminuir la capacidad de retención del adsorbente hacia los compuestos de interés y por lo tanto su volumen de fuga. Por otra parte, la adsorción y preconcentración de una gran cantidad de materia orgánica puede dificultar el proceso ulterior de limpieza del extracto. Por estas razones se limitó el volumen de carga a 75 ml ya que con estas condiciones se logra obtener una buena sensibilidad para el análisis de los fenoles y no se observa fuga de los analitos aún con muestras acuosas fuertemente cargadas en materia orgánica.

3.2. DESORCIÓN DE LOS FENOLES DE LA FASE POLIMÉRICA PRP.

La segunda etapa de extracción de los compuestos fenólicos se basa en el hecho de que la retención de los compuestos orgánicos en los adsorbentes poliméricos disminuye notablemente cuando dichos compuestos son ionizados; así, la ionización de los fenoles para formar compuestos aniónicos permite efectuar la purificación o limpieza del extracto originalmente obtenido en la precolumna PRP. Este proceso se realiza transfiriendo los solutos con una mezcla metanol-sosa desde la precolumna de fase reversa hacia la precolumna aniónica.

Sin embargo, es necesario enfatizar que entre mayor sea la proporción de modificador orgánico en el disolvente empleado para la desorción, mayor es el riesgo de que otros compuestos interferentes, ionizables o no, inicialmente retenidos en la precolumna de fase reversa se desorban y transfieran a la segunda precolumna. Como, por otra parte, las resinas de intercambio de aniones presentan también propiedades de adsorción del tipo fase

reversa, los compuestos desorbidos de la primera precolumna pueden ser retenidos en la segunda por cualquiera de los dos mecanismos, intercambio iónico o fase reversa o una combinación de ambos.

Por las razones anteriores, y para no comprometer el proceso de limpieza del extracto, en este trabajo se buscó limitar al mínimo la proporción de modificador orgánico en el disolvente de desorción pero tratando de lograr al mismo tiempo una desorción cuantitativa de los fenoles de interés.

Después de realizar varios ensayos, se encontró que las condiciones óptimas para realizar la transferencia son empleando 20 ml de una mezcla metanol-sosa (pH=11) 40:60 (v/v).

La figura 4 muestra el frente de desorción de la mezcla de fenoles con la mezcla anterior, esto demuestra que los solutos se desorben bien de la precolumna polimérica con los 20 ml de la mezcla metanol-sosa seleccionada.

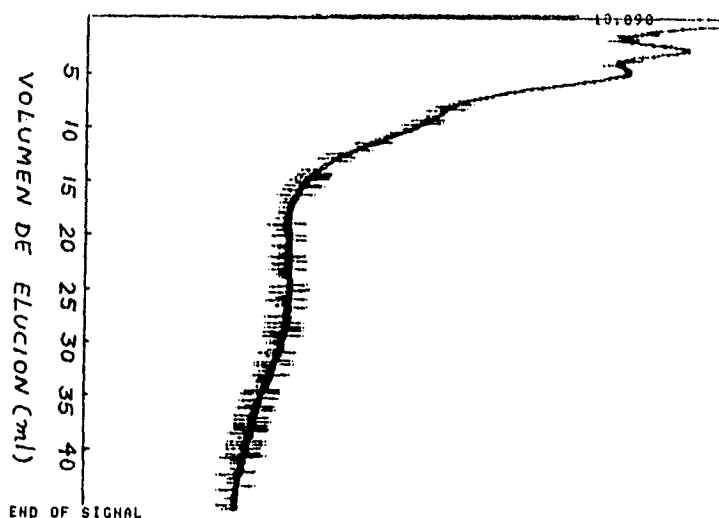


FIGURA 4. Frente de desorción de la mezcla de fenoles.
Condiciones: Disolvente de elución metanol-sosa (pH=11) 40:60 v/v.
Detección UV a 270 nm. Flujo 1 ml/min. Temperatura ambiente.

3.3. CONDICIONES EXPERIMENTALES DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LA MUESTRA DE FENOLES.

El análisis de la muestra concentrada y purificada se realiza acoplado en línea la precolumna aniónica con una columna analítica de alta eficiencia.

Para lograr una buena separación de la mezcla de fenoles era necesario determinar la composición adecuada de la fase móvil tal que permitiera efectuar la elución de los solutos, es decir la transferencia en línea de los solutos de la precolumna aniónica hacia la columna analítica y su correspondiente separación cromatográfica.

Al efectuar diversos ensayos se observó que con la corrida isocrática no se logra obtener una resolución aceptable de la mezcla de los seis fenoles hidrofóbicos. Los primeros solutos (nitrofenoles y monoclorofenoles) eluyen rápidamente mientras que los fenoles multiclorados tienen tiempos de retención muy largos y dan lugar a picos excesivamente anchos y difíciles de integrar.

Además, como este método se desarrolló para aplicarlo en muestras de agua residuales y superficiales, se pretendió que los tiempos de retención de los primeros solutos eluidos fueran relativamente grandes con el objeto de que todas las interferencias presentes en la matriz, no eliminadas durante los procesos de preconcentración y limpieza, y que generalmente eluyen a tiempos de retención muy cortos, pudieran interferir en el análisis y detección de los solutos de interés. En efecto, cuando se trabaja con muestras de aguas naturales, es común observar al principio del cromatograma la elución de un gran "pico de matriz" que desciende muy lentamente y dificulta o hace imposible la cuantificación precisa de los analitos poco retenidos. Por esta razón, se ensayó la elución en gradiente. La separación y análisis de la mezcla de fenoles se realizó en una columna C-18 de fase reversa de 5 μ de tamaño de partícula y empleando un detector ultravioleta de arreglo de diodos.

Las condiciones de la detección son: longitud de onda = 270 nm y sensibilidad = 0.05 AUFS. Después de evaluar diversos gradientes de elución, el que proporcionó la separación más adecuada de la mezcla de los fenoles hidrofóbicos fué el siguiente:

Tiempo (min.)	0	35	50
% Fase B	8	60	60

La figura 5 muestra un cromatograma de la mezcla de los seis fenoles considerados empleando el gradiente de disolventes anterior. La separación presentada en la figura se obtuvo al efectuar una inyección de 24 μ l de una disolución con una concentración de 25 ppm de cada uno de los fenoles estudiados. La identificación de los picos se efectuó en base a los tiempos de retención obtenidos a partir de inyecciones por separado de cada uno de los fenoles. El orden de elución fué el siguiente: 1) 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2) 2,4-dimetilfenol, 3) 4-cloro-3-metilfenol, 4) 2,4-diclorofenol, 5) 2,4,6-triclorofenol y 6) pentaclorofenol.

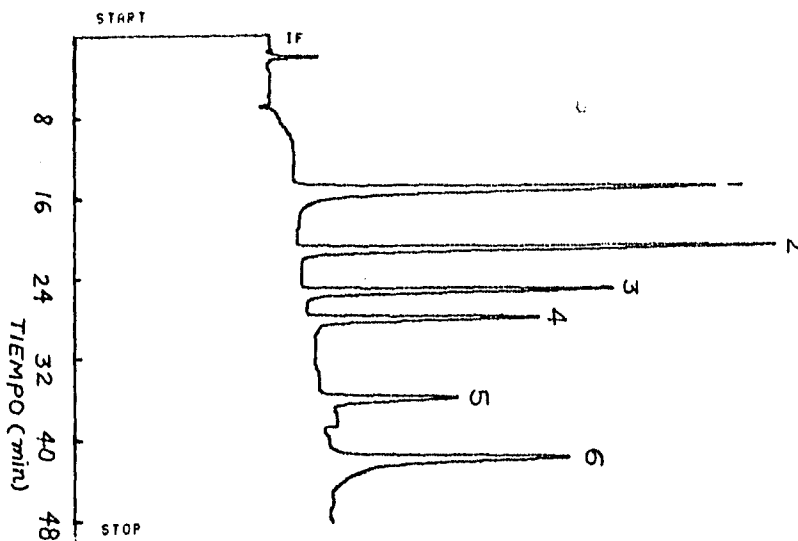


FIGURA 5. Cromatograma de la mezcla de fenoles.

Condiciones: Inyección de 24 μ l de una disolución estándar de fenoles a 25 ppm. Columna (150 X 4.6 mm D.I.) empacada con Spherisorb ODS-2 de 5 μ , elución en gradiente, Fase A: acetonitrilo-agua (pH=4.5) 15:85 v/v conteniendo NaClO₄ 0.01 M y CH₃COOH-CH₃COONa 0.02 M, Fase B: acetonitrilo-agua (pH=4.5) 70:30 v/v conteniendo NaClO₄ 0.01 M y CH₃COOH-CH₃COONa 0.02 M. Solutos: (1) 4,6-dinitro-2-metilfenol, (2) 2,4-dimetilfenol, (3) 4-cloro-3-metilfenol, (4) 2,4-diclorofenol, (5) 2,4,6-triclorofenol y (6) pentaclorofenol.

3.4. EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO DESARROLLADO.

3.4.1. SELECTIVIDAD DEL MÉTODO.

Se ha desarrollado un método simple y relativamente rápido para la determinación de cloro y nitrofenoles en agua mediante el empleo de un sistema bidimensional de precolumnas acopladas en línea con la cromatografía de líquidos. La selectividad del método para los solutos de interés está basada en los siguientes factores:

- Uso de tres fases estacionarias diferentes para extraer, aislar y separar los compuestos. En efecto, los solutos son primeramente extraídos en una fase reversa polimérica, posteriormente son transferidos a un intercambiador de aniones y finalmente son eluidos en línea y separados en una fase reversa C-18.

- Optimización de las condiciones de transferencia de los solutos de la primera a la segunda precolumna. La composición y pH del disolvente usado para la transferencia son tales que sólo los solutos débilmente retenidos en la fase polimérica o los solutos capaces de ionizarse a pH 11 serán transferidos al intercambiador de aniones. Entre estos solutos, sólo los aniones quedarán retenidos en la segunda precolumna.

- Selección de longitud de onda de detección. La longitud de onda de 270 nm es la más adecuada para la detección de fenoles. Aun cuando otros solutos aromáticos también absorben a esta longitud de onda, la sensibilidad para su detección es relativamente menor.

Evidentemente, en matrices muy complicadas, como podría ser el caso de algunas aguas residuales, hay una pequeña posibilidad de que algún compuesto con propiedades análogas a las de los fenoles atraviese las dos precolumnas y eluya en tiempos de retención similares a alguno de los compuestos de interés. Para evitar falsos análisis es conveniente programar al detector UV con arreglo de diodos para tomar espectros de absorción en tiempos que correspondan al inicio, el vértice y el final de los picos de los cloro y nitrofenoles. De esta manera se eliminarían prácticamente todos los riesgos de identificación falsa e incluso se detectaría la coelución de compuestos en un mismo pico.

3.4.2. LINEALIDAD DEL MÉTODO DESARROLLADO.

La linealidad del método es un parámetro que debe estudiarse adecuadamente, especialmente si se desean analizar trazas. Representa el intervalo lineal de concentraciones en el cual se cumple la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Dentro de este intervalo lineal se puede determinar el compuesto de interés por interpolación.

Para estudiar el intervalo lineal de concentraciones del método desarrollado en este trabajo, se analizaron muestras de agua grado cromatográfico dopadas con cada uno de los seis fenoles empleando un rango de concentraciones de 1.33 a 100 ppb.

A continuación se muestran las rectas de regresión de cada uno de los fenoles. Estos resultados se presentan en las tablas 6-11 y en las figuras 6-11.

TABLA 6. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del 4,6-dinitro-2-metilfenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 6

Concentración del soluto (ppb)	Area (cuentas)
1.18	80327
2.36	158435
5.90	524107
11.8	967799
17.7	1382712
35.4	2973424
53.1	4331414
70.8	5397850

La ecuación de regresión es: $Y = 39355.29 + 78146.93 X$

El factor de correlación (r) = 0.998

$r^2 = 0.997$

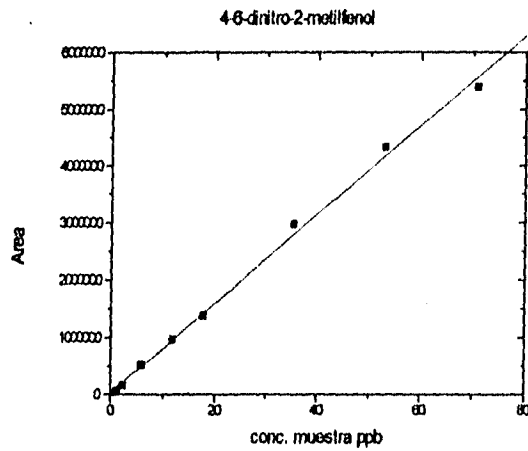


FIGURA 6. Relación área vs concentración para el 4,6-dinitro-2-metilfenol en el intervalo estudiado.

TABLA 7. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del 2,4-dimetilfenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 7

Concentración del soluto (ppb)	Area (cuentas)
2.36	79280
5.90	192290
11.8	477176
17.7	702804
35.4	1371784
53.1	1873288
70.8	2122910
88.5	2295546

La ecuación de regresión es: $Y = 172421.67 + 27073.16 X$

El factor de correlación (r) = 0.977

$r^2 = 0.954$

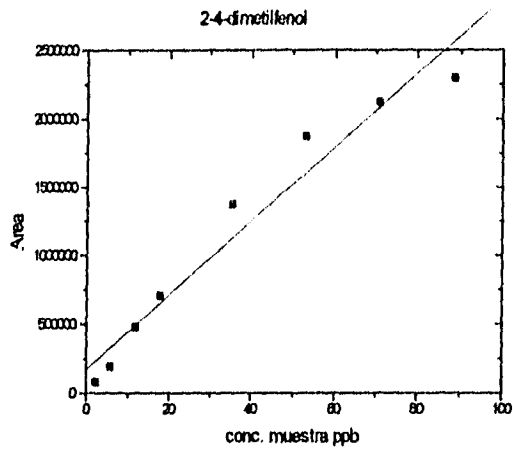


FIGURA 7. Relación área vs concentración para el 2,4-dimetilfenol en el intervalo estudiado.

TABLA 8. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del 4-cloro-3-metilfenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 8

Concentración del soluto (ppb)	Area (cuentas)
1.18	41424
2.36	111010
5.90	257932
11.8	531295
17.7	741994
35.4	1498880
53.1	2205398
70.8	2646453
88.5	3429877

La ecuación de regresión es: $Y = 53275.56 + 38285.98 X$

El factor de correlación (r) = 0.998

$$r^2 = 0.996$$

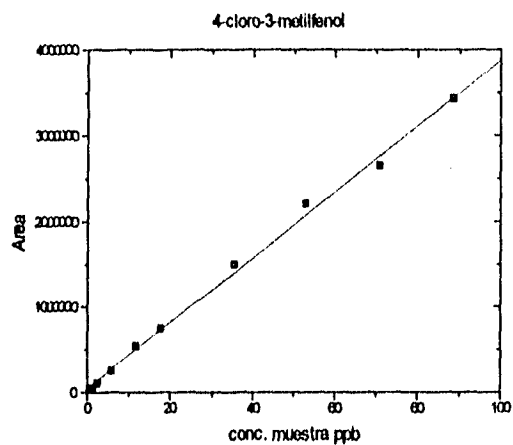


FIGURA 8. Relación área vs concentración para el 4-cloro-3-metilfenol en el intervalo estudiado.

TABLA 9. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del 2,4-diclorofenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 9

Concentración del soluto (ppb)	Area (cuentas)
1.18	39564
2.36	79315
5.90	199882
11.8	393758
17.7	645784
35.4	1253912
53.1	1833997
70.8	2169126
88.5	2816069

La ecuación de regresión es: $Y = 41004.99 + 31585.64 X$

El factor de correlación (r) = 0.997

$r^2 = 0.995$

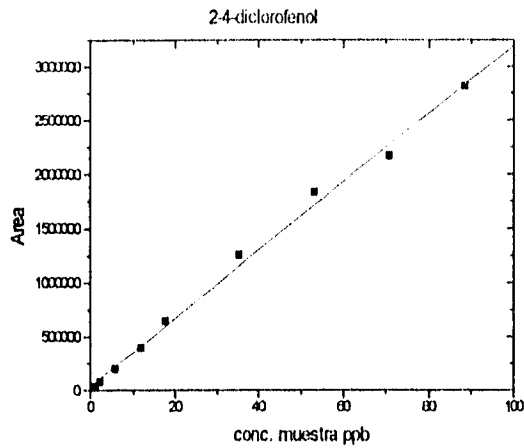


FIGURA 9. Relación área vs concentración para el 2,4-diclorofenol en el intervalo estudiado.

TABLA 10. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del 2,4,6-triclorofenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 10

Concentración del soluto (ppb)	Area (cuentas)
2.36	38044
5.90	129448
11.8	253130
17.7	384867
35.4	794431
53.1	1134843
70.8	1412634
88.5	1856698

La ecuación de regresión es: $Y = 13360.61 + 20638.86 X$

El factor de correlación $(r) = 0.998$

$r^2 = 0.997$

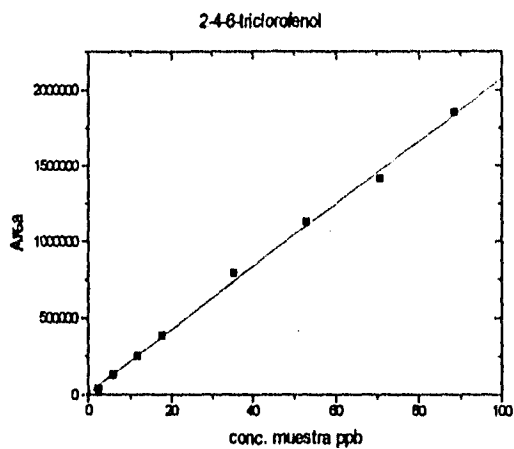


FIGURA 10. Relación área vs concentración para el 2,4,6-triclorofenol en el intervalo estudiado.

TABLA 11. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración del pentaclorofenol en la muestra de agua dopada.

TABLA 11

Concentración del soluto (ppb)	Área (cuentas)
2.36	94358
5.90	244255
11.8	482523
17.7	714087
35.4	1502839
53.1	2132438
70.8	2725758
88.5	3612336

La ecuación de regresión es: $Y = 12725.87 + 39921.1 X$

El factor de correlación (r) = 0.999

$$r^2 = 0.998$$

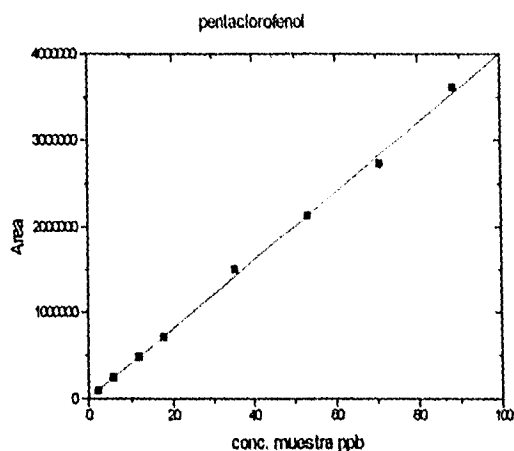


FIGURA 11. Relación área vs concentración para el pentaclorofenol en el intervalo estudiado.

Los coeficientes de correlación, r , de cada recta de regresión se determinaron por el método de los mínimos cuadrados, su valor es una medida de la calidad del ajuste de los puntos experimentales. Los coeficientes de correlación de cinco de las rectas de regresión son cercanos a la unidad, de manera que el ajuste de los puntos experimentales se considera razonablemente lineal.

De los resultados obtenidos se aprecia que las rectas de regresión obtenidas para los solutos: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol, se ajustan al modelo lineal. Para estos solutos el intervalo de concentraciones estudiado es lineal desde ~ 1 a ~ 90 ppb. Para el caso particular del 2,4-dimetilfenol se observa claramente que no hay relación lineal entre área y concentración en este intervalo; la curva se aplana hacia las concentraciones más elevadas formando una meseta. Se considera que este comportamiento se debe a que al aumentar la concentración de este soluto en la muestra, se incrementa su tendencia a fugarse de la precolumna aniónica durante el paso de transferencia, como se discutirá posteriormente.

En la aplicación del método de los mínimos cuadrados es necesario suponer que hay una relación lineal entre las áreas de los picos en cuentas (Y) y la concentración del analito (x), y está dada por la ecuación:

$$Y = a + bx \quad (1)$$

donde:

a= ordenada al origen.

b= pendiente de la recta.

Los valores de a y b obtenidos en las ecuaciones de ajuste son estimadores de los coeficientes de regresión α y β de la curva de regresión real: $Y = \alpha + \beta x$ (2)

Independientemente, de la apariencia de la recta, resulta conveniente evaluar los estimadores de regresión en un intervalo de confianza dado, por ejemplo $\alpha=0.05$.

Para evaluar la ordenada al origen de cada recta de regresión, es necesario realizar una prueba estadística para verificar que las rectas de cada soluto que describen la variación de la respuesta del detector en función de la concentración de cada fenol, pasan por el origen del sistema de coordenadas, es decir es necesario probar si estadísticamente el estimador $a = 0$ para un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

Sea la hipótesis nula $H_0 : \alpha = 0$

hipótesis alterna $H_1 : \alpha \neq 0$

nivel de significancia: 0.05

criterio: empleando un nivel de significancia dado, se rechaza la hipótesis nula si $t < -t_{\alpha/2}$ o $t > t_{\alpha/2}$, donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t de student, para un nivel de significancia $\alpha=0.05$ con $(n - 2)$ grados de libertad. Se emplea el estadístico de prueba ⁶³:

$$t = \left(\frac{a - \alpha}{S_e} \right) \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}} \quad (3)$$

Donde: n es el número de puntos sobre la recta de regresión, \bar{x} es el valor promedio de los valores x_i , y el valor de S_e está dado por:

$$S_e = \left(\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2)S_{xx}} \right)^{1/2} \quad (4)$$

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \quad (5)$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \quad (6)$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right) \left(\sum_{i=1}^n y_i \right) \quad (7)$$

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula para los seis fenoles considerados, empleando un nivel de significancia $\alpha=0.05$, se presentan en la tabla 12.

TABLA 12. Verificación de la hipótesis nula que establece que las rectas de regresión pasan por el origen del sistema de coordenadas. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

TABLA 12

Soluto	t	n	$t_{\alpha/2} (n-2, l)$	¿se rechaza la hipótesis nula?
4,6-dinitro-2-metilfenol	0.642	8	2.447	no se rechaza
2,4-dimetilfenol	1.538	8	2.447	no se rechaza
4-cloro-3-metilfenol	1.425	9	2.365	no se rechaza
2,4-diclorofenol	1.11	9	2.365	no se rechaza
2,4,6-triclorofenol	0.667	8	2.447	no se rechaza
pentaclorofenol	0.371	8	2.447	no se rechaza

Los intervalos de confianza del coeficiente "a" de las seis rectas de regresión se pueden estimar mediante la ecuación (15) y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13.

TABLA 13. Límites del intervalo de confianza para el coeficiente "a" de cada recta de regresión de los seis fenoles de la muestra, para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

TABLA 13

Soluto	Intervalo de confianza (área, cuentas)
4,6-dinitro-2-metilfenol	-11063 < a < 189345
2,4-dimetilfenol	-101899 < a < 446742
4-cloro-3-metilfenol	-35141 < a < 141693
2,4-diclorofenol	-46021 < a < 128031
2,4,6-triclorofenol	-35655 < a < 62377
pentaclorofenol	-71185 < a < 96637

3.4.3. EXACTITUD Y PRECISIÓN.

La exactitud de un método también conocida como error sistemático, corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud puede determinarse a partir de las recuperaciones obtenidas de cada soluto.

La recuperación del soluto debe acercarse al 100 %.

La recuperación de cada fenol se determinó mediante el análisis de 7 muestras de agua grado HPLC dopadas con una concentración de cada soluto de 13.3 ppb. Para el cálculo de la recuperación se relacionó el área del pico de cada soluto obtenido con la muestra dopada con la mezcla de fenoles con respecto al área obtenida por la inyección directa de una cantidad igual del soluto respectivo. Además para tener un valor real de la recuperación se tomaron en consideración los factores de corrección debidos a la calibración de la punta de la micropipeta, el volumen del loop y el efecto debido a la dilución de la muestra durante su preparación previa a las operaciones en línea.

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar, σ , estimada analíticamente por S o más comúnmente por el coeficiente de variación (CV). El estimador S de la desviación estándar se determina mediante la siguiente expresión:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (8)$$

Donde: n es el número de medidas, X_i es el valor medido en el ensayo i, y \bar{X} el estimador de la media poblacional μ , calculado como:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (9)$$

Además el coeficiente de variación puede calcularse mediante la expresión:

$$CV = \frac{S \cdot 100}{\bar{X}} \quad (10)$$

En la tabla 14 se presentan los resultados correspondientes a la recuperación y precisión para cada uno de los seis fenoles considerados.

TABLA 14

Soluto	n	Recuperación (promedio)	S (recuperación)	CV
4,6-dinitro-2-metilfenol	7	95.2	1.7	1.8
2,4-dimetilfenol	7	52.6	1.3	2.5
4-cloro-3-metilfenol	7	94.4	1.8	2
2,4-diclorofenol	7	94.6	1	1.1
2,4,6-triclorofenol	7	100.3	2.65	2.6
pentaclorofenol	7	82.2	2.32	2.8

De los resultados anteriores puede notarse que el % de recuperación promedio obtenido para estos fenoles es satisfactorio considerando que se trabaja a muy bajos niveles de concentración, cercanos a la decena de ppb, excepto en el caso del 2,4-dimetilfenol cuya recuperación es muy baja. Los pobres resultados obtenidos para este último fenol son debidos a su elevado pKa (10.58) como se discutirá posteriormente.

Para establecer si los solutos alcanzan una recuperación equivalente al 100 %, se realiza una prueba estadística. El estadístico que se emplea es el siguiente:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{s/\sqrt{n}} \quad (11)$$

Donde el estadístico t representa el valor de una variable aleatoria que tiene la distribución t con (n-1) grados de libertad.

hipótesis nula $H_0: \mu=100$

hipótesis alterna: $H_1: \mu \neq 100$

nivel de significancia $\alpha=0.05$

criterio: se rechaza la hipótesis nula si t calculada $< -t_{\alpha/2}$ (n-1 grados de libertad) o t calculada $> t_{\alpha/2}$ (n-1). Para un nivel de significancia $\alpha=0.05$

Los resultados obtenidos de esta prueba estadística se muestran en la tabla 15.

TABLA 15

Soluto	n	t calculada	t _{0.025} (6 grados de libertad)	¿se rechaza la hipótesis nula, para un nivel de significancia α=0.05?
4,6-dinitro-2-metilfenol	7	-7.47	2.447	si
2,4-dimetilfenol	7	-96.5	2.447	si
4-cloro-3-metilfenol	7	-8.23	2.447	si
2,4-diclorofenol	7	-14.2	2.447	si
2,4,6-triclorofenol	7	0.3	2.447	no
pentaclorofenol	7	-20.3	2.447	si

De los resultados anteriores, puede concluirse que solamente para el 2,4,6-triclorofenol se alcanza un % de recuperación del 100 %.

También el intervalo de confianza para la recuperación de los seis fenoles considerados puede estimarse mediante la expresión:

$$\bar{x} - t_{\alpha/2} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \leq R \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \quad (12)$$

La tabla 16 muestra los intervalos de confianza de cada fenol obtenidos mediante la expresión anterior para un nivel de significancia α=0.05.

TABLA 16

Soluto	Intervalo de confianza
4,6-dinitro-2-metilfenol	93.6 ≤ R ≤ 96.8
2,4-dimetilfenol	51.4 ≤ R ≤ 53.8
4-cloro-3-metilfenol	92.7 ≤ R ≤ 96.1
2,4-diclorofenol	93.7 ≤ R ≤ 95.5
2,4,6-triclorofenol	97.8 ≤ R ≤ 102.8
pentaclorofenol	80.1 ≤ R ≤ 84.3

Las pruebas anteriores permiten deducir las siguientes conclusiones con respecto al método desarrollado y su capacidad para determinar los fenoles de interés a niveles de concentración del orden de la decena de ppb en agua pura.

1) La recuperación del 4,6-dinitro-2-metilfenol, el 4-cloro-3-metilfenol, el 2,4-diclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol es muy buena para niveles de trazas, ya que rebasa el 90%.

2) La recuperación del pentaclorofenol, del orden del 80%, es aceptable a estos niveles de concentración, sobre todo si se considera que la alta hidrofobicidad de este soluto dificulta considerablemente su recuperación cuantitativa. En efecto, los solutos con un fuerte carácter hidrofóbico tienden a adsorberse en los materiales que entran en contacto con sus disoluciones acuosas (frascos, matraces, membranas de filtración, tubería, etc.) por lo que prácticamente nunca se logran obtener recuperaciones del 100% en las determinaciones de éstos en agua.

3) El método desarrollado no es adecuado para la determinación de fenoles de pKa muy elevado como el 2,4-dimetilfenol ya que se obtienen muy bajas recuperaciones. De los resultados de este trabajo y de uno anterior realizado en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos ⁶⁴ de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química, UNAM, estimamos que arriba de un pKa de 9, los métodos de preconcentración, limpieza y análisis en línea son poco adecuados para la determinación de solutos ionizables a aniones. La EFS fuera de línea sería probablemente una mejor opción.

4) Para todos los fenoles, la precisión de recuperación al nivel de concentración estudiado es muy buena (CV < 5%), incluso para el 2,4-dimetilfenol que no se recupera cuantitativamente.

Por otra parte, para estudiar la recuperación a diferentes niveles de concentración, es conveniente graficar la cantidad de soluto recuperada (ng) contra la cantidad de soluto cargada (ng), aplicando para la regresión el método de los cuadrados mínimos. La pendiente deberá acercarse a la unidad y la ordenada al origen deberá pasar por cero; estimando los parámetros de regresión en general con un $\alpha=0.05$.

Si estadísticamente el coeficiente "b" de las rectas de regresión de los solutos es igual a 1, esto significa que la cantidad de soluto cargada es igual su cantidad recuperada. Es decir, el % de recuperación del soluto es 100%.

Una ordenada al origen significativamente diferente de cero indica un error de tendencia constante (error sistemático) y se visualiza como una recta paralela a la teórica, en la cual el valor de la ordenada al origen corresponde a la magnitud del error.

Los resultados obtenidos de las gráficas de cantidad recuperada (ng) contra cantidad cargada o concentrada (ng), se muestran en las tablas 17-22 y en las figuras 12-17.

TABLA 17. Variación de la cantidad de 4,6-dinitro-2-metilfenol recuperada en función de su cantidad cargada.

TABLA 17

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
79.6	88.554
144.7	177.11
463.2	442.77
805.04	885.54
1219.6	1328.31
2537.6	2656.61
3798.5	3984.92
5167.2	5313.22

La ecuación de regresión: $Y = -24.8477 + 0.9689 X$

El factor de correlación (r) = 0.999

$r^2 = 0.999$

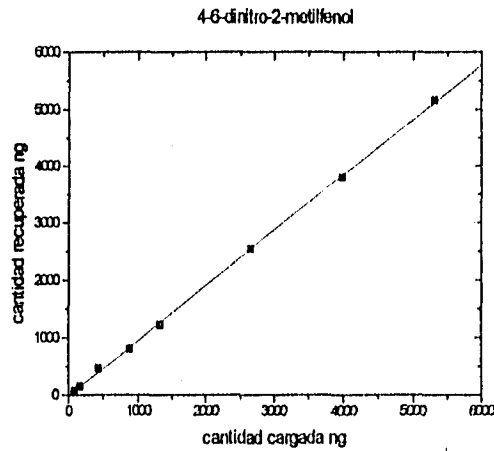


FIGURA 12. Variación de la cantidad de 4,6-dinitro-2-metilfenol recuperada en función de su cantidad cargada.

TABLA 18. Variación de la cantidad recuperada del 2,4-dimetilfenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 18

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
96.44	177.11
223.12	442.77
530.8	885.54
791.68	1328.31
1526.17	2656.61
2178.86	3984.92
2779.97	5313.22
3507.66	6641.54

La ecuación de regresión: $Y = 52.2886 + 0.5234 X$
 El factor de correlación $(r) = 0.999$
 $r^2 = 0.998$

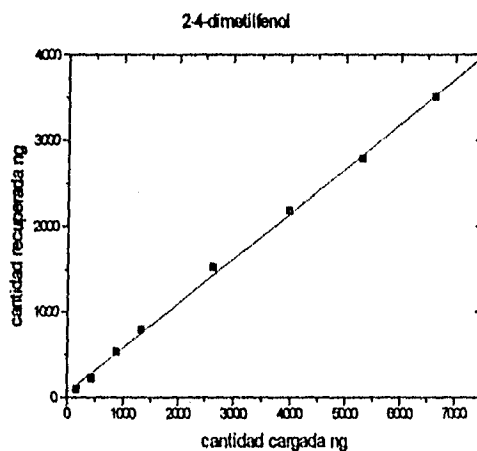


FIGURA 13. Variación de la cantidad recuperada del 2,4-dimetilfenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 19. Variación de la cantidad recuperada del 4-cloro-3-metilfenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 19

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
78.25	88.554
200.71	177.11
453.4	442.77
891.5	885.54
1256.05	1328.31
2594.33	2656.61
3920.5	3984.92
4699.94	5313.22
6427.14	6641.54

La ecuación de regresión: $Y = 33.0889 + 0.9398 X$
 El factor de correlación $(r) = 0.998$
 $r^2 = 0.996$

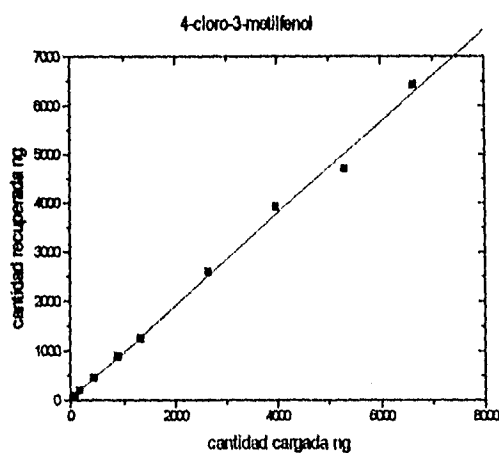


FIGURA 14. Variación de la cantidad recuperada del 4-cloro-3-metilfenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 20. Variación de la cantidad recuperada del 2,4-diclorofenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 20

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
91.55	88.554
180.5	177.11
437.43	442.77
829.79	885.54
1396.15	1328.31
2704.44	2656.61
4071.28	3984.92
4750.1	5313.22
6479.09	6641.54

La ecuación de regresión: $Y = 47.4666 + 0.9533 X$

El factor de correlación $(r) = 0.997$

$r^2 = 0.994$

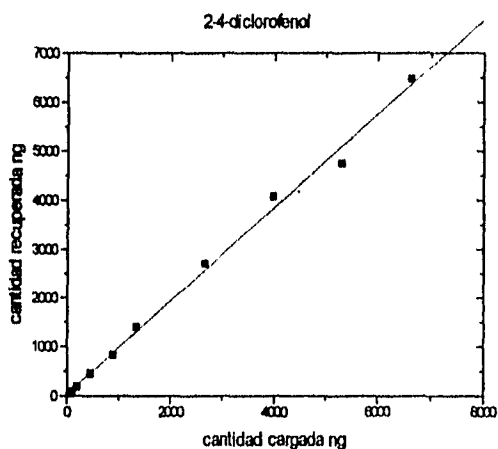


FIGURA 15. Variación de la cantidad recuperada del 2,4-diclorofenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 21. Variación de la cantidad recuperada del 2,4,6-triclorofenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 21

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
182.52	177.11
474.2	442.77
980.81	885.54
1341.88	1328.31
2788.23	2656.61
4075.06	3984.92
4799.33	5313.22
6627.23	6641.54

La ecuación de la recta de regresión: $Y = 83.2838 + 0.9614 X$
 El factor de correlación (r) = 0.996
 $r^2 = 0.993$

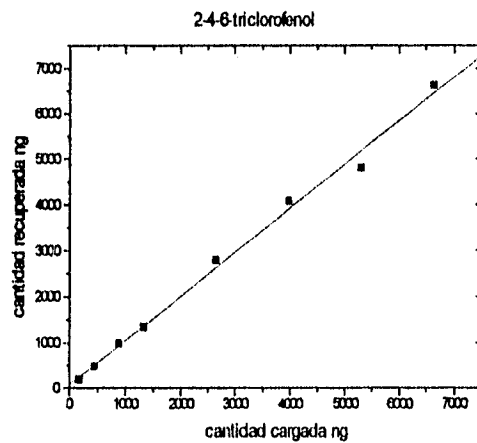


FIGURA 16. Variación de la cantidad recuperada del 2,4,6-triclorofenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 22. Variación de la cantidad recuperada del pentaclorofenol en función de su cantidad cargada.

TABLA 22

Cantidad recuperada (ng)	Cantidad cargada (ng)
141.54	177.11
385.37	442.77
734.47	885.54
1073.05	1328.31
2173.02	2656.61
3265.66	3984.92
3956.82	5313.22
5581.34	6641.54

La ecuación de regresión: $Y = 3.8383 + 0.8064 X$
 El factor de correlación $(r) = 0.996$
 $r^2 = 0.993$

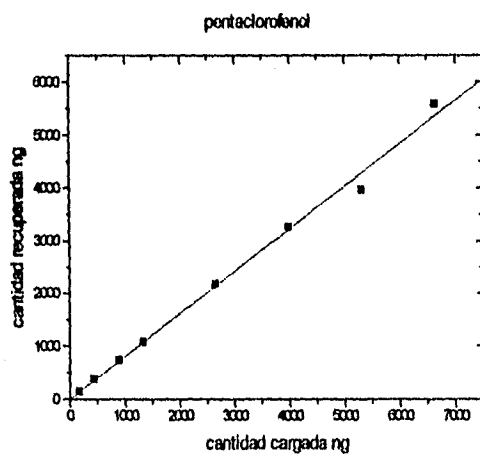


FIGURA 17. Variación de la cantidad recuperada de pentaclorofenol en función de su cantidad cargada.

Los coeficientes de correlación, r, para las rectas de regresión obtenidas son cercanos a la unidad; y por lo tanto los puntos experimentales se ajustan bien a una línea recta. También en estas rectas de regresión los estimadores (a) y (b) son muy importantes.

Como puede observarse el valor de los coeficientes "b" de las rectas de regresión de cuatro de los fenoles es cercano a la unidad. Si estadísticamente el coeficiente $b=1$, esto significa que la cantidad de soluto cargada es igual a la cantidad del mismo recuperada. Es decir, el % de recuperación del soluto es igual a 100.

Se efectúa una prueba estadística para demostrar que el coeficiente "b" de la recta de regresión es igual a 1.

hipótesis nula $H_0: \beta=1$

hipótesis alterna $H_1: \beta \neq 1$

Para efectuar la hipótesis se empleó el estadístico de prueba ⁶³ siguiente:

$$t = \frac{b - \beta}{S_b} \sqrt{\frac{S_{xx}}{n}} \quad (13)$$

En este caso el criterio es que 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 student para un nivel de significancia $\alpha=0.05$ con (n-2) grados de libertad.

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula se presentan en la tabla 23.

TABLA 23. Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión es igual a la unidad. Nivel de significancia=0.05.

TABLA 23

Soluto	t (calculada)	n	$t_{0.025}$ (n-2 grados de libertad)	¿Se rechaza la hipótesis nula?
4,6-dinitro-2-metilfenol	-3.92	8	2.447	si se rechaza
2,4-dimetilfenol	-52.4	8	2.447	si se rechaza
4-cloro-3-metilfenol	-2.74	9	2.365	si se rechaza
2,4-diclorofenol	-1.79	9	2.365	no se rechaza
2,4,6-triclorofenol	-1.24	8	2.447	no se rechaza
pentaclorofenol	-7.49	8	2.447	si se rechaza

El intervalo de confianza de los coeficientes "b" de las seis rectas de regresión puede calcularse mediante la expresión:

$$b \pm t_{\alpha/2} \cdot S_b \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}} \quad (14)$$

En la tabla 24 se muestran los intervalos de confianza de los coeficientes (b) de las rectas de regresión de cada fenol para un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

TABLA 24

Soluto	Intervalo de confianza
4,6-dinitro-2-metilfenol	$0.9495 < b < 0.9883$
2,4-dimetilfenol	$0.5012 < b < 0.5456$
4-cloro-3-metilfenol	$0.8879 < b < 0.9917$
2,4-diclorofenol	$0.8916 < b < 1.015$
2,4,6-triclorofenol	$0.8853 < b < 1.0375$
pentaclorofenol	$0.7432 < b < 0.8696$

Comparando estos resultados obtenidos con los presentados en la tabla (14), es posible decir que se confirma una recuperación $\geq 90\%$ para los siguientes solutos: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol. Una recuperación del orden de 80% para el pentaclorofenol y una baja recuperación, del orden de 50% para el 2,4-dimetilfenol y esto para todo el intervalo de concentraciones estudiado que comprende desde ~ 1 ppb hasta ~ 90 ppb. Por lo tanto el método es adecuado para determinar con exactitud y precisión aceptables cinco de los seis fenoles en este intervalo de concentraciones.

También debe verificarse que la intersección de cada una de las rectas con el eje de las ordenadas sea estadísticamente igual a cero. Es necesario realizar la prueba de hipótesis correspondiente, y hacer uso de las expresiones (3-7) tomando en cuenta un nivel de significancia de 0.05

TABLA 25. Verificación de la hipótesis nula que establece que el coeficiente (a) de las rectas de regresión de cada soluto es estadísticamente igual a cero. Nivel de significancia $\alpha=0.05$.

TABLA 25

Soluto	t (calculada)	n	$t_{0.025}$ (n-2 grados de libertad)	¿Se rechaza la hipótesis nula?
4,6-dinitro-2-metilfenol	-1.20	8	2.447	no se rechaza
2,4-dimetilfenol	1.64	8	2.447	no se rechaza
4-cloro-3-metilfenol	0.457	9	2.365	no se rechaza
2,4-diclorofenol	0.551	9	2.365	no se rechaza
2,4,6-triclorofenol	0.764	8	2.447	no se rechaza
pentaclorofenol	0.042	8	2.447	no se rechaza

El intervalo de confianza para el coeficiente (a) de cada una de las rectas de regresión puede determinarse mediante la expresión:

$$a \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{x})^2}{n \cdot S_{xx}}} \quad (15)$$

TABLA 26. Intervalos de confianza de los coeficientes (a) de las rectas de regresión de los seis solutos; considerando un nivel de confianza de 0.05.

TABLA 26

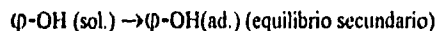
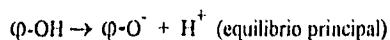
Soluto	Intervalo de confianza
4,6-dinitro-2-metilfenol	-75.2751 < a < 25.5797
2,4-dimetilfenol	-25.5653 < a < 130.1425
4-cloro-3-metilfenol	-138.1837 < a < 204.3615
2,4-diclorofenol	-156.2024 < a < 251.1358
2,4,6-triclorofenol	-183.3464 < a < 349.914
pentaclorofenol	-217.7108 < a < 225.3874

Los resultados presentados en la tabla (26) muestran que el coeficiente "a" de las rectas de regresión de los analitos es estadísticamente igual a cero, por lo que se puede decir que el método en línea desarrollado no muestra errores sistemáticos en la determinación de los fenoles en el intervalo de concentración estudiado.

3.5. CASO DEL 2,4-DIMETILFENOL.

Este soluto tiene, como se indicó anteriormente un pKa muy elevado (10.58) lo que significa que es un ácido muy débil y por lo tanto difícil de ionizar.

Esta característica hace que su tratamiento en un sistema como el aquí desarrollado no sea muy adecuado. Durante el primer paso del método (preconcentración en la precolumna PRP) el soluto se fija fácilmente sobre el adsorbente pues, aún sin necesidad de acidificar la muestra, se encuentra en su estado molecular. El problema se encuentra durante la etapa de desorción de la precolumna PRP y transferencia en línea a la precolumna aniónica. Para realizar este proceso es necesario alcalinizar fuertemente al disolvente de transferencia, llevándolo a un valor de pH considerablemente mayor al pKa del soluto, para lograr ionizarlo y provocar su desorción cuantitativa de la fase reversa. En efecto, se debe considerar que en presencia de un adsorbente que fija a la especie molecular del soluto, el equilibrio ácido-base de éste se desplaza disminuyendo, aún más, la fuerza del ácido:



donde, $\phi\text{-OH}$ representa al 2,4-dimetilfenol y los subíndices "sol" y "ad" indican la presencia de este soluto en disolución y adsorbido en la fase sólida, respectivamente.

Por lo anterior puede esperarse que una ionización efectiva del soluto en la precolumna de fase reversa podrá sólo lograrse con una disolución de pH cercano a 13. Esto no sería un gran problema desde el punto de vista de la estabilidad del adsorbente ya que las fases PRP son estables en todo el intervalo de pH.

Sin embargo, en estas condiciones la concentración del ión OH^- en el disolvente de transferencia es muy elevada, lo que significa que al llegar a la precolumna aniónica la fijación del fenolato en el intercambiador iónico se ve fuertemente debilitada por la competencia del anión OH^- . Esto se traduce en un volumen de fuga muy pequeño del soluto en esta precolumna. Además se debe considerar que este efecto de disminución del volumen de fuga por competencia del ión hidroxilo no sólo afecta al 2,4-dimetilfenol sino también a los otros fenoles de interés que se transfieren durante este paso.

Finalmente, llegamos a un problema insoluble para un sistema en línea, el 2,4-dimetilfenol no termina de ionizarse y desorberse de la fase PRP en la primera precolumna cuando ya ha empezado a fugarse de la segunda precolumna debido a su débil fijación provocada por la alta concentración de iones hidroxilo.

Así, todos los ensayos que se realizaron durante el desarrollo de este trabajo para tratar de optimizar el pH del disolvente de transferencia, desde pH ~ 10 hasta pH ~ 13, dieron resultados negativos. Nunca pudo lograrse recuperar más de ~ 52% del 2,4-dimetilfenol.

Por las razones anteriores en lo que sigue no se tomará en cuenta a este soluto.

3.6. LIMITE DE DETECCION.

En muchos trabajos relacionados con el análisis de contaminantes por cromatografía se define el límite de detección de un analito como la cantidad de compuesto que al pasar por el detector produce una señal significativamente diferente de la señal de una muestra en "blanco" o "señal de fondo". Para algunos autores esto significa un cociente señal/ruido entre 2 y 4.

En química analítica ⁶¹ se describe el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, y_B , más dos veces la desviación estándar del blanco, S_B . Recientes recomendaciones de organismos públicos americanos sugieren que el criterio debería de ser:

$$y - y_B = 3S_B \quad (16)$$

El límite de detección de los solutos considerados se estimará por dos procedimientos:

A. La determinación del límite de detección de los solutos analizados por este método se realiza mediante el empleo de las rectas de regresión de los solutos Área vs. Concentración obtenidas en el análisis de muestras de agua grado HPLC dopadas con los seis solutos en un intervalo de concentraciones de 1.33 a ~ 90 ppb. Además se emplea la desviación estándar en cuentas de área obtenida en el análisis de 7 muestras dopadas con los solutos a una concentración de 13.3 ppb. Los resultados de estas desviaciones estándar se muestran en la tabla 27.

TABLA 27

Soluto	n	S (área, cuentas)	CV
4,6-dinitro-2-metilfenol	7	27202	2.6
4-cloro-3-metilfenol	7	26332	4.6
2,4-diclorofenol	7	19486	4.5
2,4,6-triclorofenol	7	10641	3.9
pentaclorofenol	7	18494	3.6

En esta tabla el coeficiente de variación (CV) obtenido para cada soluto, se refiere a la variación en las cuentas de área de las determinaciones realizadas para los fenoles a concentración 13.3 ppb en 7 diferentes días mientras que en la tabla 14 el CV se refiere a la variación en las recuperaciones de los fenoles en estos mismos 7 experimentos pero que fueron determinadas con respecto al área de los picos de la inyección del estándar realizada el mismo día. Esto significa que la variabilidad de las áreas de los picos en diferentes días se corrige al inyectar el estándar de referencia cada día. Por lo tanto la variabilidad mayor es debida a cambios en la respuesta del detector de día a día y en mucho menor medida a la variabilidad de los resultados obtenidos por el método desarrollado.

Para la estimación del límite de detección se empleó la expresión (16), en donde el término y_B corresponde al coeficiente (a) de las rectas de regresión de los solutos considerados. Sin embargo, hay que recordar que en la sección 3.4.2. se demostró que este coeficiente era estadísticamente igual a cero.

Con esta consideración, los límites de detección de los seis fenoles, estimados a partir de las rectas de regresión, de la desviación estándar obtenida para un punto cercano al límite inferior del intervalo lineal (13.3 ppb) y de la ecuación (16) se muestran en la tabla 28.

TABLA 28

Soluto	Límite de detección (ppb)
4,6-dinitro-2-metilfenol	0.6
4-cloro-3-metilfenol	0.7
2,4-diclorofenol	0.6
2,4,6-triclorofenol	1.0
pentaclorofenol	1.1

Los resultados presentados en la tabla 28, muestran que los límites de detección de los analitos obtenidos mediante criterios estadísticos, oscilan entre 0.6 y 1.1 µg/l, lo que es perfectamente compatible con las normas de calidad del agua.

B. El límite de detección de los solutos considerados, se determinó a partir de las consideraciones de la USEPA. Se considera que para la estimación del límite de detección deben analizarse un mínimo de siete muestras⁵⁵ mediante el método desarrollado. El límite de detección se estima mediante la siguiente expresión:

$$MDL = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} \cdot S_c \quad (17)$$

Donde: $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$ es el valor de la t student apropiado para un nivel de confianza del 99 % con (n-1) grados de libertad, S_c es la desviación estándar en unidades de concentración.

La desviación estándar S_c , se determinó del análisis de las siete muestras de agua grado HPLC dopadas con los fenoles a una concentración de 13.3 ppb. Las desviaciones estándar de concentración de los solutos, se muestran en la tabla 29.

TABLA 29

Soluto	n	S (concentración)	CV
4,6-dinitro-2-metilfenol	7	0.21	1.9
4-cloro-3-metilfenol	7	0.21	1.9
2,4-diclorofenol	7	0.13	1.2
2,4,6-triclorofenol	7	0.31	2.6
pentaclorofenol	7	0.25	2.6

Por lo tanto, los límites de detección de los cinco fenoles, se estimaron empleando la ecuación (17), y se muestran en la tabla 30.

TABLA 30

Soluto	Límite de detección (ppb)
4,6-dinitro-2-metilfenol	0.7
4-cloro-3-metilfenol	0.7
2,4-diclorofenol	0.4
2,4,6-triclorofenol	1.0
pentaclorofenol	0.8

3.7. ANALISIS DE MUESTRAS DE AGUA POTABLE, AGUA DE POZO Y DE MANANTIAL.

3.7.1. ANALISIS DE AGUA POTABLE.

La muestra utilizada para realizar el análisis fue agua proveniente de la planta potabilizadora de Ciudad Universitaria, D. F. En el análisis de la muestra sin dopar según el método desarrollado, no se observaron los picos correspondientes a los solutos de interés. Por lo tanto, se concluyó que esta agua no contenía originalmente dichos contaminantes, o que éstos fueron destruidos en el proceso de potabilización.

El análisis de la muestra dopada con una concentración de 20 ppb de cada fenol mostró un cromatograma que tampoco contenía los picos de los analitos. Este resultado sólo puede explicarse considerando que los compuestos fenólicos fueron destruidos por el cloro empleado en el tratamiento de desinfección del agua potable. En efecto, los fenoles pueden ser completamente destruidos mediante un proceso de oxidación con cloro, dióxido de cloro (ClO_2) y ozono. Desde el punto de vista económico los procesos que emplean ClO_2 y ozono no son prácticos para la destrucción de los fenoles en aguas superficiales⁶⁶⁻⁶⁷.

El método químico preferido para realizar la destrucción de los fenoles es el proceso de cloración (clorooxidación) el cual se realiza en un intervalo de pH de 7 a 10. Es económicamente práctico si el contenido de fenoles presente en el efluente no excede 200 ppm. Para lograr la destrucción de los fenoles se requiere una relación de cloro a compuesto fenólico considerado entre 6:1 y 10:1. Un uso excesivo o inadecuado del cloro puede dar como resultado la formación de clorofenoles.

Con base en los resultados obtenidos en estos análisis puede decirse que la cantidad de cloro que permanece en el agua potable de la red es suficiente para destruir completamente los seis fenoles estudiados en este trabajo. Esta degradación es extraordinariamente rápida puesto que la muestra se analizó justo después de doparse. Lo anterior nos lleva a pensar que no tiene ningún interés el buscar trazas de cloro y nitrofenoles en agua potable ya que éstos estarán siempre totalmente degradados. En este caso sería más importante efectuar un estudio de los productos de degradación formados por la clorooxidación y determinar su toxicidad.

El cromatograma obtenido del análisis de la muestra dopada se presenta en la figura 18.

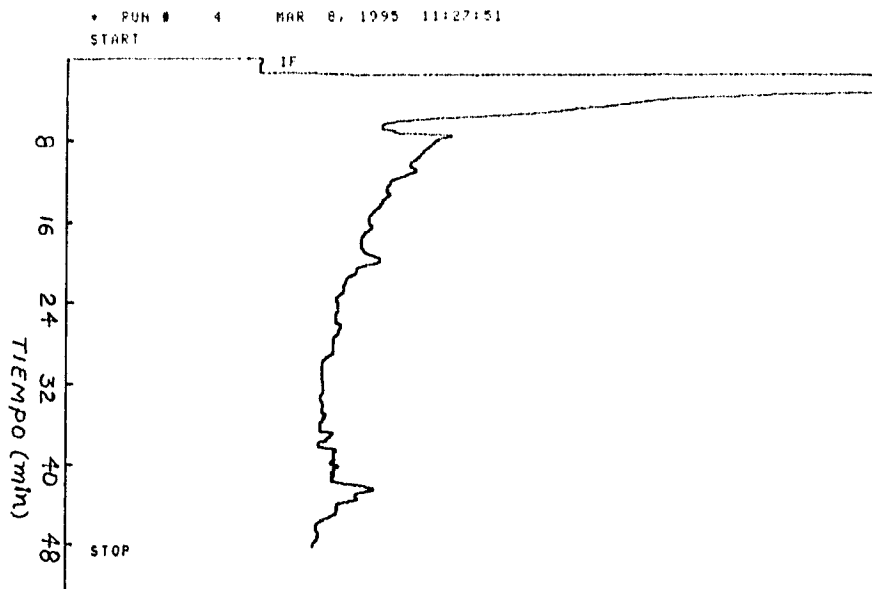


Figura 18. Cromatograma de la muestra de agua dopada a una concentración de 20 ppb de cada fenol.

Condiciones:

Muestra: 250 ml de agua potable, 10 ml de metanol y 1 ml de HClO₄ 1.5 M.

Pretratamiento: carga de 75 ml de mezcla anterior en precolumna RP, transferencia selectiva de fenoles a precolumna AX con 20 ml de metanol-sosa (pH=11) 40:60 v/v.

Análisis: elución por gradiente acoplado en línea la precolumna AX y la columna analítica. Las condiciones cromatográficas están especificadas en la figura 5.

3.7.2. ANALISIS DE AGUA DE POZO.

Las figuras 19a y 19b muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras de agua de pozo sin dopar y dopada a una concentración de 20 ppb de cada fenol. La muestra analizada proviene de un pozo de la Ciudad de Morelia, Michoacán. Esta agua se utiliza solamente para servicios domésticos. Los resultados obtenidos muestran que la muestra sin dopar no contenía los solutos de interés. Para el caso de la muestra dopada con los compuestos fenólicos pueden calcularse las recuperaciones de los analitos, las cuales se dan en la tabla 31.

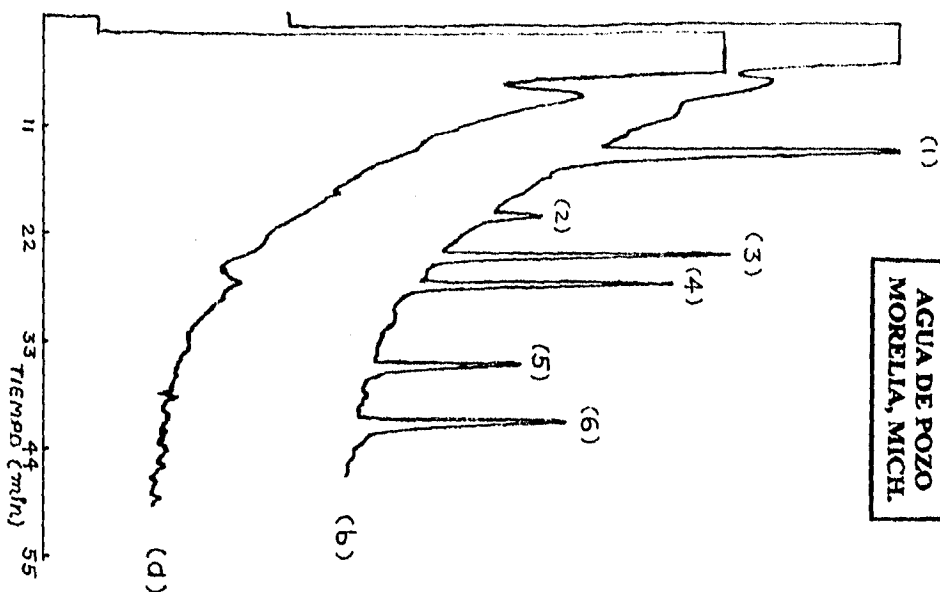


Figura 19. Cromatogramas de la muestra de agua de pozo sin dopar (a) y dopada (b) a una concentración de 20 ppb de cada fenol. Condiciones de preparación de muestra, pretratamiento y análisis cromatográfico especificadas en las figuras 18 y 5. Solutos: (1) 4,6-dinitro-2-metilfenol, (2) 2,4-dimetilfenol, (3) 4-cloro-3-metilfenol, (4) 2,4-diclorofenol, (5) 2,4,6-triclorofenol y (6) pentaclorofenol.

TABLA 31. Recuperaciones de los fenoles obtenidas en el análisis de la muestra de agua de pozo dopada a una concentración de 20 ppb de cada fenol.

TABLA 31

Soluto	Porcentaje de recuperación
4,6-dinitro-2-metilfenol	95.1
4-cloro-3-metilfenol	94
2,4-diclorofenol	93.4
2,4,6-triclorofenol	101.7
pentaclorofenol	81.2

Estos resultados muestran que los porcentajes de recuperación para los primeros cuatro solutos son mayores del 90%, por lo que su extracción de la muestra puede considerarse cuantitativa. Para el pentaclorofenol la recuperación obtenida es un poco mayor de 80%.

El pico del compuesto que eluye entre los 19 y los 20 minutos corresponde al 2,4-dimetilfenol que se encontraba presente en el estándar usado para dopar la muestra. Este compuesto no se cuantificó por las razones expuestas en una sección anterior.

3.7.3. ANALISIS DE AGUA DE MANANTIAL.

La muestra analizada proviene de un manantial de agua cercano a la Ciudad de Morelia en el estado de Michoacán y en cuyo lugar se encuentra un balneario.

Las figuras 20a y 20b muestran los cromatogramas obtenidos en el análisis de las muestras sin dopar y dopada a una concentración de 6.6 ppb de cada fenol. En el cromatograma de la muestra sin dopar se observa un pequeño pico a los 24 minutos que podría atribuirse a la presencia de 4-cloro-3-metilfenol o 2,4-diclorofenol, ya que tiene un tiempo de retención cercano al de estos solutos. Sin embargo, en el cromatograma de la muestra dopada se observa que este pico aparece bien diferenciado entre los picos de los solutos mencionados. Por lo tanto se descarta la presencia de cualquiera de los seis fenoles estudiados en el agua analizada. Las recuperaciones de los analitos obtenidas en el análisis de la muestra dopada se dan en la tabla 32.

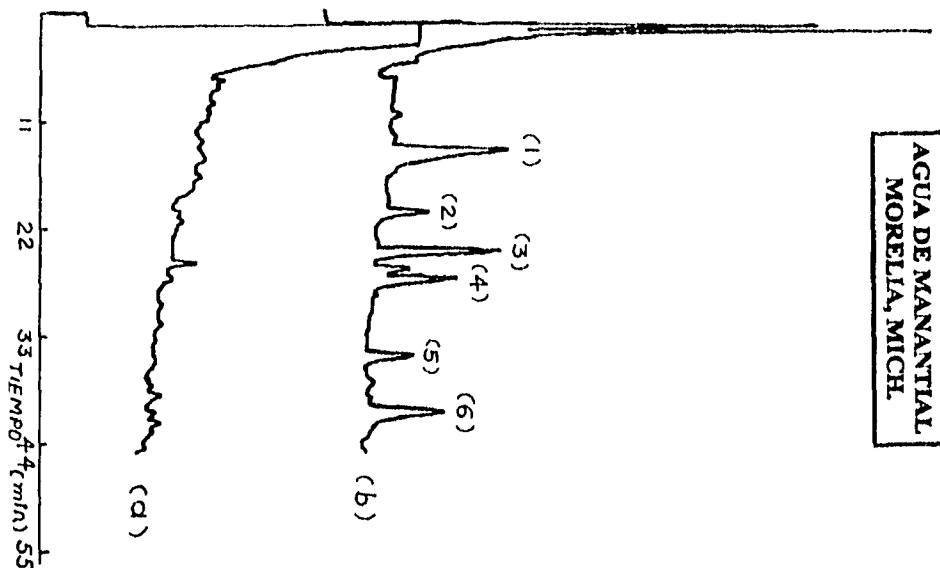


Figura 20. Cromatogramas de la muestra de agua de manantial sin dopar (a) y dopada (b) a una concentración de 6.6 ppb de cada fenol. Condiciones de preparación de muestra, pretratamiento y análisis cromatográfico especificadas en las figuras 18 y 5. Solutos: (1) 4,6-dinitro-2-metilfenol, (2) 2,4-dimetilfenol, (3) 4-cloro-3-metilfenol, (4) 2,4-diclorofenol (5) 2,4,6-triclorofenol y (6) pentaclorofenol.

TABLA 32. Recuperaciones de los fenoles obtenidas en el análisis de la muestra de agua de manantial dopada a una concentración de 6.6 ppb de cada fenol.

TABLA 32

Soluto	Porcentaje de recuperación
4,6-dinitro-2-metilfenol	94.1
4-cloro-3-metilfenol	93.9
2,4-diclorofenol	93.5
2,4,6-triclorofenol	99.3
pentaclorofenol	83.5

Estos resultados muestran que las recuperaciones obtenidas de los primeros cuatro solutos son cuantitativas y también es aceptable la recuperación obtenida para el pentaclorofenol.

CAPÍTULO 4.

CONCLUSIONES.

Se pueden enunciar las siguientes conclusiones respecto al método desarrollado:

1) La recuperación, concentración, purificación y determinación cuantitativa de trazas de cloro y nitrofenoles en muestras de agua a niveles de ppb se puede realizar de manera simple, rápida y eficiente empleando un método en línea de Extracción en Fase Sólida (EFS) acoplada a la Cromatografía de Líquidos. El pretratamiento de la muestra, basado generalmente en sistemas multidimensionales de EFS, presenta considerables ventajas respecto a los métodos tradicionales de extracción líquido-líquido.

2) Esta metodología, no contaminante, permite alcanzar sensibilidades del orden de partes por billón con manipulación mínima de la muestra y riesgos menores para el analista. Además, puede ser completamente automatizada mediante el empleo de válvulas de conmutación activadas mediante señales eléctricas, por lo cual el método es adecuado para emplearse en análisis de rutina de fenoles hidrofóbicos a estos niveles de concentración en muestras acuosas ambientales.

3) Este método debe su selectividad a la conferida por el sistema de extracción en fase sólida bidimensional acoplada a la cromatografía de líquidos.

4) El método desarrollado para la determinación de cinco contaminantes traza es lineal en el intervalo de concentraciones de ~ 1.3 a ~ 90 ppb. Su precisión es buena ($CV < 5\%$) y la exactitud (% de recobros $> 90\%$ para cuatro de los contaminantes: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol, y ~ 80% para el pentaclorofenol) es aceptable para estos niveles de concentración. La recuperación obtenida para el pentaclorofenol es adecuada sobre todo si se considera que la alta hidrofobicidad de este soluto dificulta considerablemente su recuperación cuantitativa.

5) Los límites de detección determinados a partir de criterios estadísticos varían de 0.6 a 1.1 ppb, siendo compatibles con las normas de calidad del agua. Son significativamente menores que las concentraciones máximas admisibles de la legislación para el control de la calidad del agua en México.

La eficiencia de esta metodología se demuestra por su aplicación a muestras de agua. Las conclusiones respecto a la aplicación del método para el análisis de aguas naturales son:

Los resultados obtenidos en el estudio de las muestras de agua subterránea (pozo) y agua de manantial se pueden considerar excelentes. En ambos casos, la recuperación de los analitos en la muestra dopada es prácticamente idéntica a la que se obtuvo en el estudio de la evaluación estadística del método con agua grado reactivo

dopada. Esto no sólo confirma la buena exactitud y precisión del método sino que demuestra su aplicabilidad al análisis de muestras de aguas naturales de origen diverso.

Es importante también hacer notar la gran especificidad del método, que queda bien establecida en el estudio de estas dos muestras reales. En ambos casos el cromatograma correspondiente al análisis de la muestra sin dopar es muy limpio. Aparte del gran pico de matriz que eluye al principio del cromatograma, son muy pocas y muy pequeñas las señales que se alcanzan a distinguir arriba del ruido de fondo. Es decir que, a pesar de utilizar un detector ultravioleta que es muy poco selectivo, el método resulta muy confiable debido a la selectividad que le confiere el Sistema de Extracción en Fase Sólida Bidimensional acoplada a la cromatografía de líquidos.

REFERENCIAS.

- 1) R. B. Baird, L. G. Caromone and R. L. Jenkins. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17 (1977) 764.
- 2) K. Tsuji. *Journal of Chromatography.*, 158 (1978) 337.
- 3) Carron J. M. and Afghan B. K. *Anal. Trace Org. Aquat. Environ. Chapter 4* (1989).
- 4) D. A. Baldwin/ J. K. Debowski. *Chromatographia.*, 26 (1988) 186.
- 5) Caroline Webster, Martin Smith, Peter Wilson and Michael Cooke. *Journal of High Resolution Chromatography.*, 16 (1993) 549.
- 6) Lars Renberg. *Analytical Chemistry.*, 46 (1974) 459.
- 7) F. P. Bigley and R. L. Grob. *Journal of Chromatography.*, 350 (1985) 407.
- 8) *Diario Oficial de la Federación. CE-CCA-001/89. México D. F.* (1989).
- 9) Louis F. Fieser and Mary Fieser. *Química Orgánica* (1965) 751.
- 10) Robert H. Perry, Cecil H. Chilton. *Chemical Engineers' Handbook.* (1973).
- 11) John A. Dean. *Lange's Handbook of Chemistry. Thirteenth edition* (1985).
- 12) E. M. Lores, T. R. Edgerton and R. F. Moseman. *Journal of Chromatographic Science.*, 19 (1981) 466.
- 13) M. Dressler. *Journal of Chromatography.*, 165 (1979) 167.
- 14) A. Bacaloni, G. Goretti, A. Lagana, B. M. Petronio and M. Rotatori. *Anal. Chem.*, 52 (1980) 2033.
- 15) P. Van. Rossum and R. G. Webb. *Journal of Chromatography.*, 150 (1978) 381.
- 16) A. Tateda and J. S. Fritz. *Journal of Chromatography.*, 152 (1978) 329.
- 17) Claudio Borra, Antonio Di Corcia, Marcello Marchetti and Roberto Samperi. *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2048-2052.
- 18) G. A. Junk, J. J. Richard, M. D. Grieser, D. Witiak, J. L. Witiak, M. D. Arguello, R. Vick, H. J. Suec, J. S. Fritz and G. V. Calder. *Journal of Chromatography.*, 99(1974) 745.

- 19) J. D. Nauratil, R. E. Sievers and H. F. Walton. *Anal. Chem.*, 49 (1977) 2260.
- 20) P. R. Musty and G. Nickless. *Journal of Chromatography* ., 100 (1974) 83.
- 21) D. K. Basu and J. Saxena. *Environ. Sci. Technol.*, 12 (1978) 791.
- 22) G. J. Moody and J. D. R. Thomas. *Analyst*., 104 (1979) 1.
- 23) M. S. El-Shahawi, A. B. Farag, M. R. Mostafa. *Separation Science and Technology*., 29 (2) (1994) 289.
- 24) P. Subra, M. C. Hennion, R. Rosset and R. W. Frei. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 37 (1989) 45-62.
- 25) R. W. Frei, G. J. de Jong and U. A. Th. Brinkman, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, (15) (1987) 59.
- 26) Jeffrey J. Sun and James S. Fritz. *Journal of Chromatography*. 590 (1992) 197-202.
- 27) Pascale Subra- Patemault. *These de Doctorat de L'Universite Paris VI* (1989).
- 28) Colin F. Poole and Sheila A. Sohuette. *Contemporary Practice of Chromatography*. Elsevier Science Publishers (1984).
- 29) R. E. Majors. *J. Chromatogr. Sci.*, 18 (1980) 571.
- 30) Colin D. Chriswell, Richard C. Chang and James S. Fritz. *Analytical Chemistry* (47) (1975) 1324-1329.
- 31) R. L. Whitlock, S. Siggia and J. E. Smola. *Anal. Chem.*, 44 (1972) 532.
- 32) P. A. Realini. *Journal of Chromatographic Science*., 19 (1981) 124-129.
- 33) American Public Health Association. *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, 14 th. Edition. American Public Health Association, Washington, D. C., 1976 (574-75).
- 34) M. T. Galceran and F. J. Santos. *Water Supply*., 7 (1989) 69-75.
- 35) N. G. Buckman, J. O. Hill, R. J. Magee and M. J. Mc. Cormick. *Journal of Chromatography*., 284(1984) 441-446.
- 36) Ronald E. Shoup and Ginny S. Mayer. *Anal. Chem.*, 54 (1982) 1164-1169.

- 37) Rand, M. C., Greenberg, A. E. Taras, M. J. De. "Standard Methods for the examination of waste and wastewater", 14 th. de. American Public Health Association; Washington, D. C. 1976.
- 38) J. Lehotay, M. Baloghová, S. Hatrik. *Journal of liquid Chromatography.*, 16(1993) 999-1006.
- 39) Karin Ugland, Elsa Lundanes, Tyge Greibrokk and Alf. Bjorseth. *Journal of Chromatography* 213 (1981) 83-90.
- 40) J. F. Schabron, R. J. Hurtubise and H. F. Silver. *Anal. Chem.*, 50 (1978) 1911-1917.
- 41) Grace Kung- Jou Chao and Joseph C. Suatoni. *Journal of chromatographic Science.*, 20 (1982) 436-440.
- 42) Anke Hagen, Jorgen Mattusch and Gerhard Werner Fresenius. *J. Anal. Chem.*, 339(1991) 26-29.
- 43) Sajid Husain, Peter Kunzelmann and Hermann Schildknecht. *Journal of Chromatography.*, 137 (1977) 53-60.
- 44) P. Chaminade, A. Baillet, D. Ferrier, B. Bourguignon and D. L. Massart. *Analytica Chimica Acta*, 280 (1993) 93-101.
- 45) V. Coquart and M. C. Hennion. *Journal of Chromatography.*, 600 (1992) 195-201.
- 46) P. Trippel, W. Maasfeld and A. Kettrup. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 23 (1985) 97-110.
- 47) C. E. Werkhoven- Goewie/W. M. Boon/A. J. J. Praat/R. W. Frei/U. A. Th. Brinkman. *Chromatographia.*, 16 (1982) 53-59.
- 48) David N. Armentrout, James D. Mc. Lean, and Merton W. Long. *Analytical Chemistry.*, 51 (1979) 1039-1045.
- 49) K. Abrahamsson and T. M. Xie. *Journal of Chromatography.*, 279 (1983) 199-208.
- 50) Lamparski, L. L. and Nestrick, T. J.. *Journal of Chromatography.*, 156 (1978) 143.
- 51) Corcia, A. D. Samperi, R., Sebastiani, E., and Severini, C., *Chromatographia.*, 14 (1981) 86.
- 52) O. H. Masi and W. M. Gulick, Jr. *Journal of High Resolution Chromatography & Chromatography Communications.*, 10 (1987) 647-649.

- 53) Snyder L. R., Kirkland J. J., "Introduction to Modern Liquid Chromatography".
2da. de., J. Wiley, N. Y., 1979.
- 54) B. Bartolome, M. L. Bengoechea, M. C. Galvez, F. J. Perez-Iizarbe, T. Hernandez,
I. Estrella and C. Gomez-Cordoves. *Journal of Chromatography*, 655 (1993) 119-125.
- 55) O. Busto/ J. C. Olucha/ F. Borrull., *Chromatographia*, 32 (1991) 566-572.
- 56) O. Busto/ J. C. Olucha/ F. Borrull., *Chromatographia*, 32 (1991) 423-427.
- 57) G. Marko- Varga/ D. Barceló., *Chromatographia*, 34 (1992) 146-154.
- 58) Ronald L. Smith and Donald J. Pietrzyk., *Journal of Chromatographic Science*
21 (1983) 282-287.
- 59) Merlin D. Grieser and Donald J. Pietrzyk., *Analytical Chemistry*, 45 (1973) 1348-1353.
- 60) US EPA. *Federal Register*, 44 (1979) 69484-69488.
- 61) J. C. Miller, J. N. Miller. *Estadística para Química Analítica. Segunda Edición.*
Editorial Addison-Wesley Iberoamericana (1993), USA.
- 62) Alarcon P. Bustos, A. Cañas B., Andres M. D. and Polo M. L., *Chromatographia*,
32 (1991) 566-572.
- 63) Miller I. and Freund J. E. *Probability and Statistics for Engineers.*
Editorial Reverte Mexicana (1967), México, D. F.
- 64) Reza Gonzalez Joel. Tesis de Maestría. "Determinación de trazas de fenoles en agua
por CL con EFS en línea. (1995).
- 65) John A. Glaser, Denis L. Foerst, Gerald D. McKee, Stephan A. Quave and William
L. Budde., *American Chemical Society*. 15 (1981) 1426-1435.
- 66) Geo. Clifford White. *Handbook of chlorination for potable water, wastewater,
cooling water, industrial processes and swimming pools.* Van Nostrand Reinhold
Company (1972).
- 67) Hans G. Seiler & Helmut Sigel and Astrid Sigel. *Handbook on Toxicity of
Inorganic Compounds.* Editorial Marcel Dekker, Inc. (1988) 228-229, USA.