



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**“CONCENTRACION, PURIFICACION Y
DETERMINACION EN LINEA DE HERBICIDAS DEL
TIPO ACIDO CLOROFENOXI EN AGUA”.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA ANALITICA)**

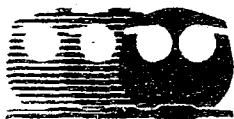
P R E S E N T A :

Q.F.B. MARIA PATRICIA C. PADILLA CORTES

MEXICO, D. F.

1997

M-247059





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: **Dr. ARMANDO MANJARREZ MORENO.**

PRIMER VOCAL: **M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAÍNO.**

SECRETARIO: **DRA. EVANGELINA CAMACHO FRÍAS**

PRIMER SUPLENTE: **DRA. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO**

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

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

DIRECTOR DE TESIS

Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

SUSTENTANTE

Q.F.B. MARIA PATRICIA C. PADILLA CORTÉS

SE AGRADECE, EL APOYO FINANCIERO QUE OTORGARON LAS SIGUIENTES INSTITUCIONES:

- CONACYT

- PADEP-UNAM

- DGAPA-UNAM

PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS

Con especial gratitud y admiración a la Dra. Luz Elena Vera, por la excelente dirección de esta Tesis, el gran apoyo y comprensión que me brindó en todo momento y sobre todo por la invaluable amistad que me otorgó a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos.

A los sinodales por sus valiosas aportaciones a este trabajo.

A la Maestra Rosario Covarrubias por su apoyo, ayuda y por la gran amiga que es.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Depto., de Química Analítica del DEPg., de la Facultad de Química UNAM.

A la Q. Oralia Ladrón de Guevara por el apoyo y las facilidades que me otorgó durante la realización de este trabajo.

Mi eterno agradecimiento a la Facultad de Química que me ha dado los momentos más gratos de mi vida.

DEDICATORIAS

A mi Mamá por ser mi mejor amiga, por la confianza y apoyo que que siempre me da, por que es el factor principal que me motiva a superarme día con día, por enseñarme a luchar en todo momento, a dar amor y a ser feliz, por acercarme a Dios y sobre todo por quererme tanto como yo a ella.

A mis hermanos, cuñadas, sobrinos (Ingrid, Ferny y Luicito) y a todos mis amigos les doy las gracias por su compañía y cariño. Y me agradaría compartir con ustedes la siguiente reflexión sobre no olvidar siempre mantener la constancia, dedicación y empeño para alcanzar las metas que tengamos en nuestra vida.

A alguien muy especial que siempre me ha dado todo su amor...

ABREVIATURAS

HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
RP	Precolumna empacada con copolímero de estireno-divinilbenceno CHP-3C.
2,4-D	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético
2,4-DB	Ácido 4-(2,4-Diclorofenoixibutírico)
2,4,5-T	Ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético
MCPA	Ácido 4-Cloro-2-metilfenoxipropiónico o Metaxon
MECOPROP	Ácido 2-(4-Cloro-2-metilfenoxipropiónico) o MCPP
SILVEX	Ácido 2-(2,4,5-Triclorofenoxiipropiónico) o 2,4,5-TP
ELL	Extracción líquido líquido.
EFS	Extracción en fase sólida.
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
CEM	Comite de Métodos Estándar para el Examen del Agua y de Aguas Residuales.
V_f	Volumen de fuga.
V_r	Volumen de retención.
V_m	Volumen correspondiente a la cantidad máxima fijada.
V_d	Volumen de desorción.
UA	Unidades de absorbancia

CONTENIDO

	<i>PÁGINA</i>
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
<i>CAPÍTULO 1.</i> ANTECEDENTES.	
1.1 CONTAMINACIÓN DEL AGUA POR HERBICIDAS	4
1.2 RECOPIACIÓN SOBRE LOS MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI- CARBOXÍLICOS	7
1.3 DESCRIPCIÓN DEL USO DE LA TECNOLOGÍA DE LAS PRECOLUMNAS CONMUTADAS PARA LA PRECON- CENTRACIÓN Y LIMPIEZA DE MUESTRAS DE AGUA.	10
1.3.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN DIFERIDO (OFF-LINE).	16
1.3.2 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA (ON- LINE).	18
1.4 PROPIEDADES DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI- CARBOXÍLICOS.	
1.4.1 ASPECTOS GENERALES	20
1.4.2 ESTRUCTURA QUÍMICA	20
1.4.3 NOMENCLATURA DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI	21
1.4.4 PROPIEDADES DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI	21
1.4.5 PROPIEDADES TOXICOLÓGICAS DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI	22

	<i>PÁGINA</i>
CAPÍTULO 2.	
DESARROLLO EXPERIMENTAL	
2.1 EQUIPOS Y ACCESORIOS	24
2.1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE EMPACADO DE LAS PRECOLUMNAS DE CONCENTRACION	26
2.1.2 CALIBRACION DEL RIZO (LOOP) DEL INYECTOR	27
2.2 REACTIVOS	27
2.2.1 DISOLUCION PATRON DE LOS ÁCIDOS CLORO-FENOXICARBOXÍLICOS.	28
2.2.2 PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES ACIDAS Y ALCALINAS.	28
2.2.3 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	29
2.3 DETERMINACION DE LOS VOLUMENES DE FUGA Y DESORCION DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI EN LA PRECOLUMNA DE CONCENTRACION.	31
2.3.1 VOLÚMENES DE FUGA	31
2.3.2 VOLÚMENES DE DESORCIÓN	33
2.4 PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXICARBOXÍLICOS	34
2.4.1 DESCRIPCIÓN DEL ACOPLAMIENTO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO EN EL SISTEMA DE PRECONCENTRACIÓN	34
2.4.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS	34

2.4.3 DESCRIPCIÓN DEL PROCESO DE REGENERACIÓN Y LIMPIEZA DE LOS SISTEMAS	39
2.4.3 DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	39
CAPÍTULO 3.	
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
3.1 DISCUSIÓN DE LA ESTRATEGIA EMPLEADA EN EL DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO.	41
3.2 DISEÑO DE LAS CONDICIONES DE PRECONCENTRACION Y LIMPIEZA.	42
3.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS VOLÚMENES DE FUGA Y DESORCIÓN DE LOS ÁCIDOS CLOROFENOXI EN DOS TIPOS DE ADSORBENTES.	43
3.3 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN	50
3.4 ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE LOS ACIDOS CLOROFENOXICARBOXILICOS	55
3.5 ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE ALGUNOS FACTORES EN LA PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS FORTIFICADAS	57
3.6 VALIDACIÓN	59
3.6.1 LINEALIDAD.	59
3.6.2 EXACTITUD DEL METODO.	75
3.6.3 PRECISIÓN DEL METODO.	86
3.6.4 LÍMITE DE DETECCIÓN DEL MÉTODO.	87

3.7 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN DIFERENTES MUESTRAS DE AGUA.	91
CONCLUSIONES	94
COMENTARIOS	96
REFERENCIAS	97
APÉNDICE "A"	100

RESUMEN

Se describe un método para el análisis de herbicidas del tipo clorofenoxi presentes en aguas, usando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. La concentración, limpieza, separación y cuantificación de estos compuestos se realiza por un proceso en línea, basándose en los métodos de extracción en fase sólida que presentan considerables ventajas en relación a los tradicionales métodos de extracción líquido-líquido (ELL).

Para lograr esto se diseñó un sistema de precolumnas interconectadas mediante válvulas de paso, con el fin de preconcentrar selectiva y cuantitativamente dichos compuestos que generalmente se encuentran en concentraciones del orden de partes por billón en agua.

Lo relevante de esta metodología es que puede ser una alternativa a los métodos convencionales ya establecidos, que en su mayoría se efectúan por ELL, y por lo tanto son potencialmente peligrosos y contaminantes.

La recuperación de los herbicidas probados con esta metodología es cercana al 100%, con un coeficiente de variación menor del 10%. El método resultó lineal en un intervalo de 1-80 $\mu\text{g/L}$ y se aplicó a muestras de agua potable y de río mostrando una buena eficiencia.

INTRODUCCION

Los herbicidas del tipo ácido clorofenoxi, formulados como sales o alquil ésteres, han sido extensivamente usados para el control de malezas en presas y campos de cultivo de cereales. Su persistencia en el suelo es de uno a cinco meses pero se sospecha de una alta persistencia en agua, debido a que ésta posee una baja actividad de biodegradación para este tipo de contaminantes.

Estos herbicidas se introducen en las aguas superficiales y subterráneas por el drenado natural de los suelos debido a las lluvias o por infiltración. Este hecho y la evidencia de su toxicidad han demandado el desarrollo de métodos selectivos y sensibles para su determinación a niveles de trazas en matrices como aguas naturales, superficiales o subterráneas, que son utilizadas como suministro de agua potable.

Los métodos establecidos para la determinación de estos contaminantes en agua requieren de extracciones líquido-líquido para aislar los analitos de interés, evaporación del disolvente para concentrarlos y finalmente una posterior derivación para proceder a su análisis por Cromatografía de Gases. Estos procedimientos son prolongados y laboriosos, la muestra es manipulada continuamente, lo que incrementa los riesgos de pérdida o contaminación durante el tratamiento, así como la peligrosa exposición del analista que manipula las disoluciones concentradas de estos productos tóxicos. Por otra parte, el consumo de grandes volúmenes de disolventes muy puros y su posterior evaporación hacen que estos métodos resulten excesivamente costosos y que ellos mismos sean contaminantes.

Estos inconvenientes, así como el gran tiempo empleado en todo el proceso, pueden ser reducidos exitosamente utilizando la extracción en fase sólida, ya sea en forma discontinua (off-line) o en línea (on-line), seguida por el análisis por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) con detección UV.

Debido a su alta capacidad de adsorción, los copolímeros de poliestireno-divinilbenceno han sido seleccionados para la extracción y enriquecimiento de los compuestos a niveles de trazas y que presentan una polaridad moderada. Estos adsorbentes son muy estables en un amplio intervalo de pH, lo cual es una ventaja para el análisis de solutos con propiedades ácido-base que requieren valores extremos de pH, como es el caso de los ácidos clorofenoxi, cuyos valores de pKa se encuentran alrededor de 2.5 a 4.8. En efecto, para lograr la extracción de estos analitos por el adsorbente son necesarias condiciones muy ácidas para mantenerlos en su forma molecular y, posteriormente, se requiere un cambio a condiciones básicas para desorberlos en su forma iónica.

Sin embargo, todos los adsorbentes del tipo fase reversa, entre los cuales se cuentan los copolímeros de poliestireno-divinilbenceno, presentan la desventaja de ser poco selectivos. Por ello es necesario considerar una etapa subsecuente de limpieza del material extraído y concentrado, con el fin de eliminar los compuestos interferentes que pudieran ser co-extraídos en las muestras de aguas naturales.

En la literatura se han propuesto básicamente dos métodos para la limpieza del extracto en sistemas en línea. El primero consiste en lavar la precolumna, que contiene el compuesto de interés adsorbido en el material polimérico, con un pequeño volumen de una mezcla acetonitrilo-agua de tal manera que este no se eluya; posteriormente la precolumna se acopla con la columna analítica, y se efectúa la elución, separación y análisis en línea de los solutos. En el segundo método, la precolumna es eluida con una disolución acuosa de pH muy elevado, pero solamente una fracción del eluato es enviada a la columna analítica para su posterior análisis (heartcutting). Estos dos procedimientos presentan todavía algunas limitaciones. En el primer caso la limpieza no es suficiente, por lo que al trabajar con matrices complejas como las aguas superficiales persisten algunos interferentes que dificultan la determinación de los ácidos clorofenoxi. En el segundo caso, el control de la instrumentación es muy delicado ya que sólo una pequeña fracción del eluato ($\approx 300\mu\text{L}$) debe ser transferida a la columna analítica; además ésta última debe estar empacada con una fase estacionaria que resista el elevado pH de la disolución que se utilizará para lograr la elución de los solutos de la precolumna.

En este trabajo se propone un método alternativo que consiste en utilizar dos precolumnas en serie, una empacada con un adsorbente de gran capacidad pero poco selectivo y la otra empacada con un adsorbente selectivo para compuestos ionizables. Los analitos de interés y algunos otros compuestos presentes en la muestra son extraídos y concentrados en la primera precolumna. Posteriormente, los ácidos clorofenoxi son transferidos a la segunda precolumna con una fase móvil que permite la ionización de los analitos de interés. Finalmente ésta última se acopla en línea con la columna analítica para eluir y separar los solutos en su forma molecular mediante un gradiente de elución.

CAPITULO 1.

ANTECEDENTES

1.1 Contaminación del agua por herbicidas.

En la actualidad, el agua es un recurso natural que se ve afectado por la contaminación ambiental. Un ejemplo de esto es el creciente uso de los herbicidas para el control de la maleza ó mala hierba, ya sea en los campos de cultivo de cereales, como en el control de la maleza acuática presente en presas, estanques o en canales destinados a la navegación (Bowner, 1987)⁽²⁾.

Muchos de los herbicidas empleados pueden ser rápidamente degradados en el suelo, mientras que otros pueden ser detectados aún en los depósitos de aguas subterráneas. En el caso de los empleados en la agricultura, éstos pueden llegar a extenderse a las aguas superficiales en donde pueden persistir por largos períodos a muy bajas concentraciones. Su incorporación se explica por la percolación y drenaje de las tierras de cultivo así como por las diseminaciones de aplicaciones aéreas y de la limpieza de los equipos empleados para las aplicaciones de los herbicidas.(Ver figura 1.1)

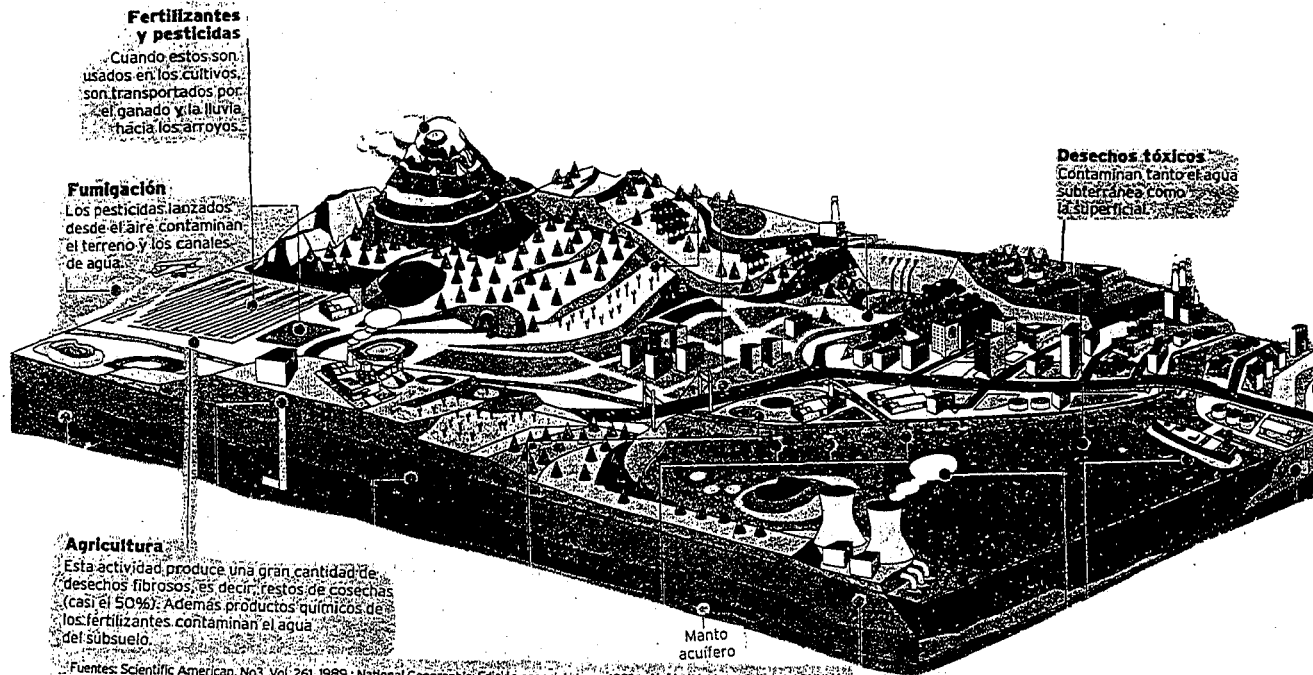
En el uso de cualquier herbicida, la principal preocupación consiste en que no tenga efectos perjudiciales fisiológicos en el hombre, así como tampoco en la flora y fauna que puedan tener contacto con ellos, ya que su uso principal es como agente preventivo y esterilizante.

La presencia de los herbicidas en el medio acuático dependerá de diversos factores físicos, químicos y biológicos, que determinarán su adsorción sobre superficies sólidas, su descomposición, su hidrólisis, su retención y eliminación en los sistemas biológicos y sus reacciones de precipitación. Subsecuentemente, estos factores determinan el tiempo de exposición del hombre a los herbicidas provenientes del medio acuático.

En el caso específico de los ácidos clorofenoxiacéticos, el más estudiado es el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), que se usa para el control de plantas acuáticas. El estudio de su ciclo en el agua indica que este herbicida puede persistir por tiempos prolongados, mientras que en el suelo se sabe que su persistencia es de 3 a 5 meses (1). Por ello es importante su monitoreo así como el de otros compuestos similares provenientes del grupo de los herbicidas clorofenoxi. Debido a que algunas aguas superficiales pueden estar contaminadas con dichos compuestos, y como ya se mencionó, éstas sirven como suministros de agua potable, por lo tanto es necesario eliminar este tipo de herbicidas en las plantas de tratamiento.

El 2,4-D en México es usado principalmene en la agricultura para el control de la maleza en sembradíos de arroz, avena, caña de azúcar, centeno, espárrago, maíz, sorgo y trigo. Además en áreas como potreros, pastizales y prados. Otro herbicida que es ampliamente usado en el país es el ácido 2,4-diclorofenoxibutírico (2,4-DB) que corresponde al grupo de los herbicidas hormonales selectivos post-emergentes y se usa en el control de la maleza de los cultivos de alfalfa, cacahuete y soya.

Figura 1.1. Fuentes de contaminación del agua.



1.2 Recopilación sobre los métodos para el análisis de los ácidos clorofenoxicarboxílicos.

La demanda de contar con métodos analíticos automatizados para monitorear los residuos de los herbicidas en aguas es cada vez más creciente. De esta forma se podría contar con una rápida información en cuanto a la presencia de dichos compuestos, así como conocer si la concentración detectada es de alerta o definitivamente de peligro.

Los métodos oficiales más comunmente empleados para la determinación de los herbicidas ácidos clorofenoxi en muestras de agua se basan en una doble extracción líquido-líquido (ELL) a diferentes valores de pH. Inicialmente la muestra se ajusta a pH básico y se extrae con el disolvente orgánico (éter dietílico o diclorometano) para eliminar compuestos orgánicos de baja polaridad y no ionizables; en estas condiciones los ácidos clorofenoxi se encuentran ionizados y permanecen en la fase acuosa. Posteriormente esta última se acidifica a un valor de pH cercano a uno y se efectúa una segunda extracción que permite recuperar los analitos de interés en la fase orgánica en su forma molecular. Después de la evaporación del disolvente orgánico se procede a la conversión de los ácidos clorofenoxi a sus respectivos metil ésteres derivados (los reactivos derivatizantes usados son diazometano o pentafluorbencilo). Finalmente se continúa con la separación y cuantificación por Cromatografía de Gases, usando un detector de captura de electrones (CG-DCE).

En términos generales podemos señalar que los compuestos polares que presentan bajas presiones de vapor pueden ser analizados de manera más simple por Cromatografía de Líquidos (CL), ya que se evita la etapa de derivación.

Dentro de los métodos oficiales que emplean CL se sugiere que las muestras de agua sean ajustadas a valores de pH ácidos ($\text{pH} < 2$) antes de realizar su ELL y que la detección de tales compuestos se realice con un detector de arreglo de diodos.

Una alternativa a la ELL, es el uso de las técnicas de extracción en fase sólida (EFS), ya sea en forma diferida (off-line) o en línea (on line). En la primera opción, se sugiere el uso de cartuchos empacados con adsorbentes del tipo Carboxypack, mientras que en los sistemas en línea se pueden usar precolumnas de acero inoxidable empacadas con adsorbentes de tipo polimérico (PLRP-S) o silicas modificadas (C_{18}). Recientemente se ha propuesto el uso de discos denominados Empore[®] como otra alternativa a la ELL. En este caso el pH de la muestra puede encontrarse entre valores de 1 a 7.

En la tabla 1.1 se da un resumen sobre algunos métodos propuestos para el análisis de los ácidos clorofenoxi presentes en muestras de agua.

TABLA 1.1 METODOS EMPLEADOS PARA EL ANALISIS DE LOS ACIDOS CLOROFENOXI.

COMPUESTOS ESTUDIADOS	TIPO DE AGUA	TIPO DE EXTRACCION, CROMATOGRAFIA Y DETECCION	%R ⁽¹⁾	LDM ⁽²⁾	REFERENCIA
2,4-D y 2,4,5-T	Río	ELL Cromatografía de Gases Detector de Captura de Electrones	> 97	8 - 16 µg/L	Renberg L. (1974) ⁽¹⁸⁾
2,4-D y MCPA	Análisis	ELL Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 220 nm	70	30 µg/L	Cabras P. (1982) ⁽³⁾
2,4-D y 2,4,5-T	Grado HPLC	EFS (on line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 254 nm	70-90	-	Smith R.L. (1983) ⁽²⁴⁾
2,4-D, 2,4,5-T y SILVEX	Grado HPLC	EFS (off-line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 280 nm	80-100	10 µg/L	Hoké S.H. (1986) ⁽¹¹⁾
2,4-D, 2,4,5-T y SILVEX	Grado HPLC	ELL + EFS (on line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 230 y 280 nm	88-100	0.020 µg/L	Hamann R. (1987) ⁽⁹⁾
MCPA, MCPP, 2,4-D, 2,4,5-T y 2,4-DB	Potable y Superficial	EFS (on line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 230 y 280 nm	70-114	0.1 - 0.5 µg/L	Geerdink R.B. (1989) ⁽³⁾
2,4-D, 2,4-DB, SILVEX, MCPA y MCPP	Grado Reactivo	EFS (off-line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 220 y 230 nm	96-101	10 - 50 µg/L	Betti A. (1990) ⁽¹¹⁾
2,4-D, 2,4-DB, MCPA y DICLORPROP	Río	ELL Cromatografía de Líquidos Detector de UV λ = 230 y 280 nm	67-87	0.080 µg/L	Schüssler W. (1990) ⁽²²⁾

⁽¹⁾ (%R) = Porcentaje de Recuperación; ⁽²⁾ LDM = Límite de detección; EFS = Extracción Fase Sólida
ELL = Extracción Líquido Líquido.

2,4-D = Ácido (2,4-Diclorofenoxi) acético; 2,4-DB = Ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi) butírico;
DICLORPROP = 2,4-DP = Ácido 2-(2,4-Diclorofenoxi) propiónico; MECOPROP = MCPP = Ácido
2-(4-Cloro-2-metilfenoxi) propiónico; MCPA = Ácido (4-Cloro-2-metilfenoxi) acético; SILVEX =
2,4,5-TP = Ácido 2-(2,4,5-Triclorofenoxi) propiónico.

TABLA 1.1 METODOS EMPLEADOS PARA EL ANALISIS DE LOS ACIDOS CLOROFENOXI (continuación).

COMPUESTO ESTUDIADO	TIPO DE MUESTRA DE AGUA	TIPO DE EXTRACCION, CROMATOGRAFIA Y DETECCION	%R ⁽¹⁾	LDM ⁽²⁾	REFERENCIA
2,4,5-T, 2,4-DB y SILVEX	HPLC Potable Superficial	EFS (on line) Cromatografía de Líquidos Detector de UV $\lambda = 230 \text{ nm}$	>85	0.05 - 0.1 $\mu\text{g/L}$	Geerdink R.B. (1991) ⁽⁶⁾
2,4-D, 2,4,5-T y SILVEX	Destilada	EFS (off-line) Cromatografía de Líquidos Detección por Espectrometría de Masas, con acoplamiento de partición del efluente.	89-109	1.1 $\mu\text{g/L}$	Incorvina Mattina M.J. (1991) ⁽¹²⁾
2,4-D, MCPA, 2,4-DB, DICLOROPROP, SILVEX, MECOPROP, MCPA y 2,4,5-T	Potable	EFS (off-line) Cromatografía de Líquidos Detector de Arreglo de Diodos $\lambda = 230 \text{ nm}$	92-107	0.020 $\mu\text{g/L}$	Schuster R. (1991) ⁽²³⁾
MCPA y MCPP	Estuario	EFS (on line) Cromatografía de Líquidos Detector de Arreglo de Diodos $\lambda = 200 \text{ nm}$	> 80	0.1 $\mu\text{g/L}$	Chiron S. (1994) ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ (%)R = Porcentaje de Recuperación; ⁽²⁾ LDM = Límite de detección; EFS = Extracción Fase Sólida
ELL = Extracción Líquido Líquido.

2,4-D = Ácido (2,4-Diclorofenoxi) acético; 2,4-DB = Ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi) butírico;
DICLOROPROP = 2,4-DP = Ácido 2-(2,4- Diclorofenoxi) propiónico; MECOPROP = MCPP = Ácido
2-(4-Cloro-2-metilfenoxi) propiónico; MCPA = Ácido (4-Cloro-2-metilfenoxi) acético; SILVEX =
2,4,5-TP = Ácido 2-(2,4,5-Triclorofenoxi) propiónico.

Los métodos oficiales empleados en la determinación de los herbicidas ácidos clorofenoxi son el método 8150 de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA)⁽¹⁴⁾ y el método 6640 del Comité de Métodos Estándar para el examen del agua y de aguas residuales⁽⁸⁾.

En la tabla 1.2 se muestran los ácidos clorofenoxi analizados por cada método indicando su límite de detección y porcentaje de recuperación.

TABLA 1.2 METODOS OFICIALES EMPLEADOS PARA EL ANALISIS DE LOS ACIDOS CLOROFENOXI.

COMPUESTO ESTUDIADO	METODO 6640 ⁽¹⁾		METODO 8150 ⁽²⁾	
	LDM ⁽³⁾	%R ⁽⁴⁾	LDM ⁽³⁾	%R ⁽⁴⁾
2,4-D	0.010 - 0.050µg/L	93	0.91µg/L	93
2,4,5-T	0.020 - 0.100µg/L	100	0.20µg/L	83-85
SILVEX	0.020 - 0.100µg/L	94	0.17µg/L	88
MCPA	ND	ND	249µg/L	73-98
MECOPROP	ND	ND	192µg/L	94-97
DICLOROPROP	ND	ND	0.65µg/L	72-97
2,4-DB	ND	ND	1.20µg/L	75-77

⁽¹⁾CME método 6640⁽⁸⁾; ⁽²⁾USEPA método 8150⁽¹⁴⁾; ⁽³⁾LDM = Límite de detección;

⁽⁴⁾(%)R = Porcentaje de Recuperación; ND = no se determinó.

1.3 Descripción del uso de la Tecnología de las Precolumnas Conmutadas, para la preconcentración y limpieza de muestras de agua.

Una proposición para la preparación de muestras ambientales cuya matriz son las aguas subterráneas, superficiales o potables, es la de emplear adsorbentes sólidos, con el fin de enriquecer aquellos componentes que están presentes en niveles de trazas, antes de ser separados y detectados.

Esta técnica de preconcentración conocida como Extracción Sólido - Líquido (ESL) o Extracción en Fase Sólida (EFS) presenta la ventaja de ser rápida y capaz de conseguir altos factores de concentración.

Se fundamenta en el fenómeno de la sorción, que a su vez involucra los siguientes mecanismos fisico-químicos: adsorción, absorción, adsorción química y la condensación capilar, ya sea de los componentes en estado gaseoso o de las sustancias disueltas sobre los adsorbentes sólidos.

La selección del adsorbente a emplear para la preconcentración de los compuestos en estudio, se fundamenta en la naturaleza química de éstos mismos. de tal forma, que su coeficiente de distribución entre el adsorbente y el agua deberá ser lo más grande posible.

Al pasar una muestra de agua conteniendo los solutos de interés a través de la columna de concentración, se presentará un proceso cromatográfico conocido como "cromatografía frontal", en donde los compuestos serán adsorbidos de acuerdo al coeficiente de distribución del sistema particularmente propuesto (adsorbente / agua). La posterior desorción se puede realizar mediante un disolvente orgánico. El volumen empleado para este fin deberá ser pequeño y permitirá la desorción total de los solutos en estudio (Ver figura 1.2).

De ahí que los compuestos en estudio presentes en el agua serán retenidos por la columna y el agua que salga de ésta, estará libre de ellos. Sin embargo después de pasar un cierto volumen de agua, se ha encontrado que ésta nuevamente presenta los contaminantes, por lo que se dice que se tiene una saturación del adsorbente que a su vez estará relacionado con el factor de capacidad o de retención de cada soluto. La condición ideal para la extracción será cuando los contaminantes estén adsorbidos en un 100% al agente adsorbente. Esto dependerá del tipo de adsorbente seleccionado, de la estructura del compuesto, del pH de la disolución acuosa, de la concentración presente de los contaminantes en la muestra, del factor de retención en agua pura y del volumen de muestra usado para la concentración.

Los principales adsorbentes sólidos empleados en la preconcentración de los herbicidas ácidos clorofenoxi presentes en muestras de agua son los polímeros porosos, las fases apolares químicamente enlazadas y los intercambiadores de iones (Ver figura 1.3).

Los copolímeros de estireno-divinilbenceno porosos presentan una estructura rígida, que les permite tener una alta resistencia a la presión además de ser estables en el intervalo de pH de 1 a 14 y son conocidos comercialmente como PRP (Hamilton) y PLRP-S (Polymer Labs). Este tipo de adsorbente presenta la propiedad de retener a los analitos en su forma neutra, sin embargo en algunos casos los solutos de carácter altamente hidrofóbico pueden ser retenidos muy fuertemente, aún cuando se encuentran ionizados.

El mecanismo de retención para este tipo de adsorbente no ha sido estudiado con profundidad, pero se ha tratado de explicar su comportamiento en relación a las interacciones hidrofóbicas similares a las generadas en las fases químicamente enlazadas C_{18} . Además, debido a la presencia de anillos aromáticos en la red de la matriz polimérica, se pueden esperar también fuertes interacciones π - π con los anillos aromáticos de los solutos (Hennion y Coquart 1993) ⁽¹⁰⁾.

Es interesante mencionar que la capacidad de adsorción de los copolímeros estireno-divinil benceno disminuye hacia cierto tipo de compuestos, sobre todo de naturaleza aromática conforme el adsorbente se va usando. Lo anterior se atribuye a la compactación que experimentan las partículas del polímero. Afortunadamente la capacidad de este tipo

de soportes se puede regenerar fácilmente con un tratamiento a base de disoluciones acuosas de alcoholes (Jahangir y Samuelson 1980)⁽¹³⁾.

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

Los soportes sólidos empleados para la preparación de intercambiadores iónicos en HPLC varían en su estructura. Los más empleados son de naturaleza porosa, están formados por esferas macroporosas, constituidas por una matriz macromolecular formada por cadenas de poliestireno unidos con puentes de divinil benceno mediante un proceso de copolimerización. En función del intercambiador que se desee obtener aniónico o catiónico, la matriz polimérica se somete a distintos tipos de tratamiento. La sulfonación de los grupos aromáticos en el polímero condicionará a la obtención de intercambiadores catiónicos. La clorometilación, seguida por una reacción con una amina terciaria llevará a la formación de intercambiadores aniónicos o con una amina primaria o secundaria se obtendrá un intercambiador aniónico débil.

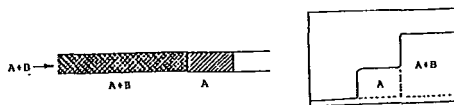
Las fases apolares químicamente enlazadas se preparan a través de la reacción de los grupos silanol del soporte de sílice con reactivos del tipo organo clorosilano u organo alcoxisilano. Estas fases son hidrolíticamente estables en un intervalo de pH de 2 a 8.5.

La teoría de mayor aceptación hasta ahora para explicar su mecanismo de retención es la teoría solvofóbica de Horvath. Dicha teoría señala que la interacción entre las moléculas del soluto y del disolvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas del disolvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar a la fase estacionaria la cual actúa como receptor pasivo. La magnitud de la interacción soluto-fase químicamente enlazada, será mayor cuanto mayor sea el tamaño del grupo apolar debido a un incremento en la superficie de contacto. Mientras que las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los disolventes polares y reducirán su retención⁽¹⁹⁾.

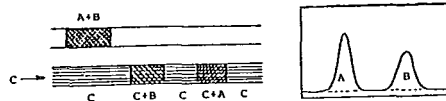
En la tabla 1.3 se presentan algunos adsorbentes empleados en la preconcentración de dichos compuestos.

A) PROCESO CROMATOGRAFICO

ETAPA DE CONCENTRACION → ANALISIS FRONTAL



ETAPA DE DESORCION → ANALISIS DE ELUCION



B) DESCRIPCION DE LA EXTRACCION EN FASE SOLIDA

¿Qué sucede sobre la superficie de la fase sólida?

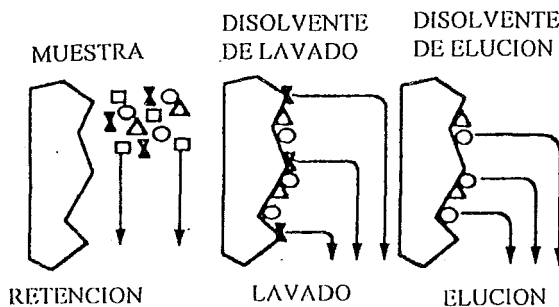
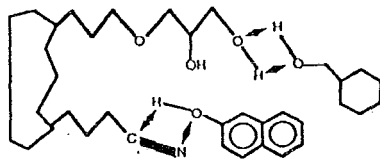


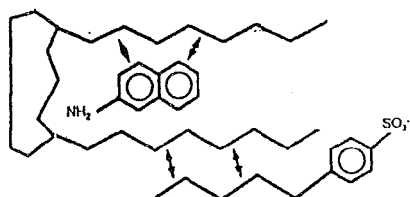
Figura 1.2 Extracción por Fase Sólida

INTERACCIONES SOBRE FASES POLARES

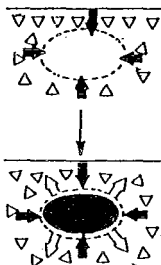


ATRACCION DIPOLAR

INTERACCIONES SOBRE FASES NO POLARES

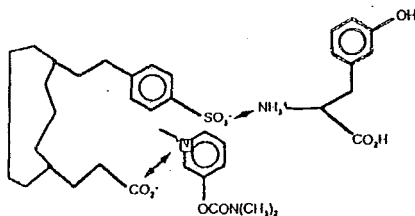


FUERZAS DE Van der Waals



INTERACCIONES HIDROFOBICAS

INTERACCIONES SOBRE ADSORBENTES INTERCAMBIADORES DE IONES



ATRACCION ELECTROSTATICA

Figura 1.3 Ejemplificación de las interacciones que actúan sobre diferentes tipos de fases químicamente enlazadas.

TABLA 1.3 ADSORBENTES USADOS EN LA PRECONCENTRACION DE LOS ACIDOS CLOROFENOXI EN MUESTRAS DE AGUA.

TIPO DE ADSORBENTE	DIMENSIONES DE LA COLUMNA	PROVEEDOR	REFERENCIA
PRP-1 Tamaño de partícula 10µm	50 x 4.2 mm d.i.	Hamilton	Smith R.L. (1983) ⁽²⁴⁾
Bakerbond C ₁₈ -HC Tamaño de partícula 40µm	Cartucho Volumen 6 mL	J.T. Baker	Hoké S.M. (1986) ⁽¹¹⁾
LiChrosorb NH ₂ Tamaño de partícula 7µm	12 x 4 mm d.i.	Merck	Hamann R. (1987) ⁽⁹⁾
PLRP-S Tamaño de partícula 15µm	10 x 2 mm d.i.	Polymer Laboratories Shropshire	Geerdick R.B. (1989) ⁽⁵⁾
PRP-1 Tamaño de partícula 25µm	Cartucho Volumen 5mL	Alltech	Betti A. (1990) ⁽¹¹⁾
PLRP-S Tamaño de partícula 15-25µm	10 x 2 mm d.i.	Polymer Laboratories Shropshire	Geerdick R.B. (1991) ⁽⁶⁾
Bakerbond C ₁₈ -HC Tamaño de partícula 40µm	Cartucho Volumen 6mL	J.T. Baker	Incorvina Mattina (1991) ⁽¹²⁾
Discos de Extracción SDB Empore®	-	J.T. Baker	Chiron S. (1994) ⁽⁴⁾

d.i. = diámetro interno

Estos adsorbentes pueden estar contenidos en cartuchos de plástico o en columnas pequeñas de acero inoxidable.

Esta técnica de extracción puede efectuarse ya sea en forma diferida (off-line) o en línea (on line).

1.3.1 Extracción en Fase Sólida en diferido (off-line).

En este proceso la extracción o preconcentración se efectúa de manera independiente a la etapa de análisis.

Su principio se describe en la figura 1.4.

Este proceso presenta los siguientes inconvenientes:

- * Pérdidas de los analitos de interés por la excesiva manipulación de la muestra
- * Contaminación adicional de la muestra por la manipulación y/o por los disolventes empleados en el proceso.
- * Menor sensibilidad del método debido a que generalmente sólo se analiza una alícuota del extracto obtenido.

Este proceso de extracción ha sido ampliamente empleado en el análisis de los ácidos clorofenoxi usando cartuchos de polipropileno empacados con diferentes tipos de fases estacionarias. Los resultados obtenidos en cuanto a recuperación mediante este procedimiento están entre un 80 a 110% y los límites de detección alcanzados son del orden de 0.1µg/L a 50µg/L para los solutos en estudio.

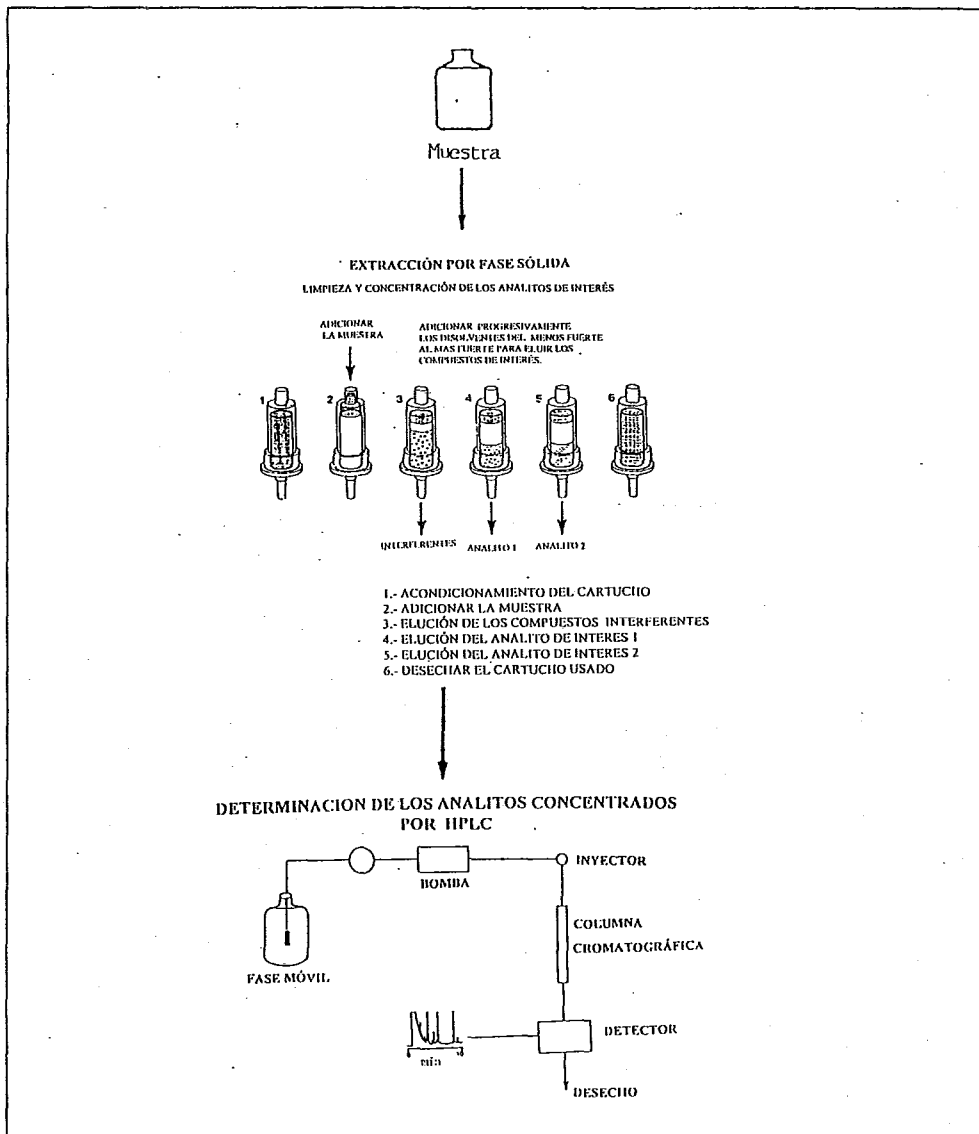


Figura 1.4 Descripción del proceso de extracción en fase sólida en forma diferida (off-line).

1.3.2 Extracción en Fase Sólida en línea (on-line).

Los métodos de EFS en línea se basan en que los solutos serán retenidos sobre un soporte sólido y posteriormente éstos serán desorbidos y transferidos directamente hacia una columna cromatográfica para hacer su separación y cuantificación. Todo este proceso se consigue mediante la ayuda de válvulas de conmutación. En la figura 1.5 se presenta el principio operacional de este proceso de preconcentración, limpieza y análisis.

La parte fundamental de este proceso radica en el diseño del acoplamiento de las válvulas que permiten la conmutación tanto a la columna cromatográfica como a la entrada de los disolventes que permitirán realizar en forma selectiva la desorción de los solutos de interés.

En cuanto a la aplicación de esta metodología en el análisis de los ácidos clorofenoxi, encontramos estudios de Smith et.al.(1983); Hamann et.al. (1987); Geerdink et.al.(1989 y 1991). Los porcentajes de recuperación alcanzados con este proceso son entre 80 y 114%. Los límites de detección están entre 0.02 y 0.5µg/L.

La ventaja de este método es que disminuye los riesgos en cuanto a la pérdida y contaminación de los solutos debido a que se minimiza la manipulación de la muestra.

Además se logra una mayor sensibilidad del método, ya que en este caso todos los analitos que han sido preconcentrados en forma selectiva serán analizados en el sistema cromatográfico.

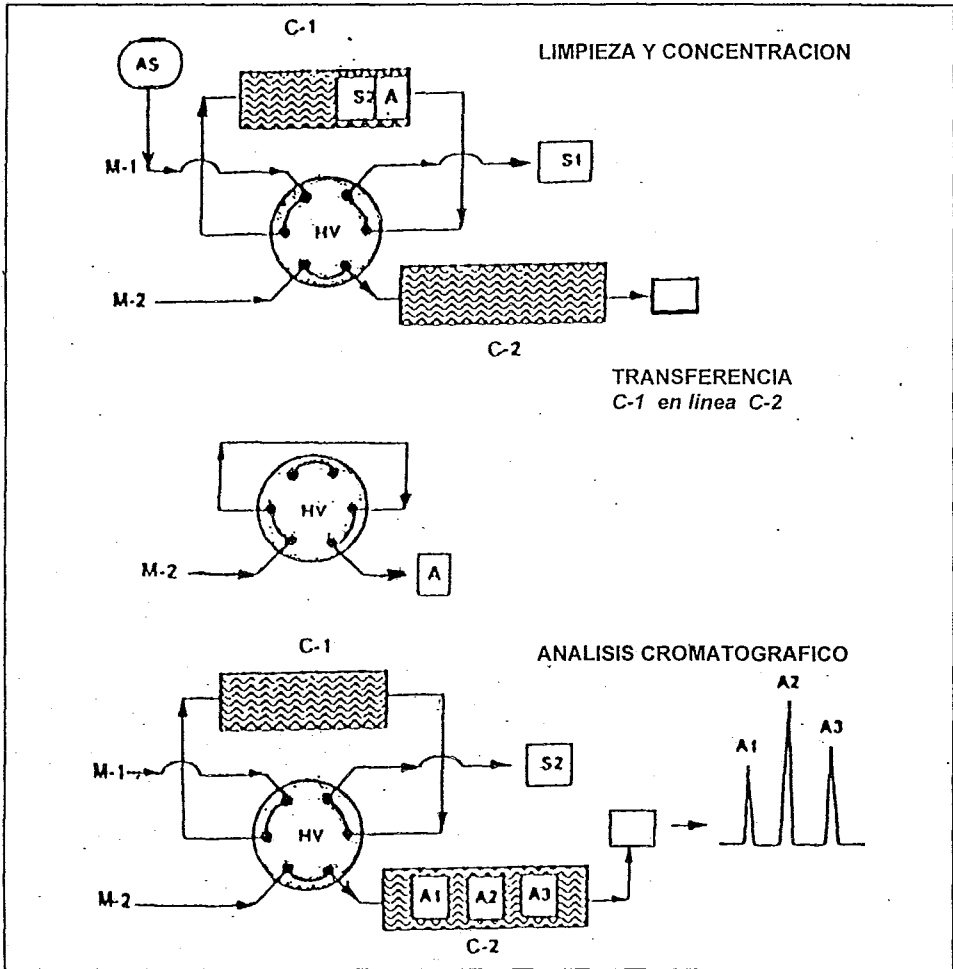


Figura 1.5 Descripción del principio de acoplamiento de la extracción en fase sólida en el proceso en línea (on-line).

AS= Muestra; C-1 = Precolumna de limpieza y concentración; C-2 = Columna analítica; M-1 y M-2 = Fase móvil; S1 y S2 = Solutos no deseados; A (1,2,3) = Analitos de interés; HV = Válvula de Alta Presión y D = Detector

1.4 Propiedades de los Ácidos Clorofenoxicarboxílicos.

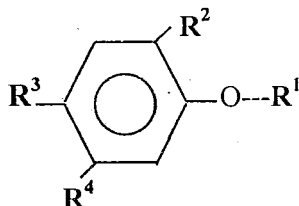
1.4.1 Aspectos Generales

Los herbicidas clorofenoxi funcionan imitando la acción de una hormona natural de las plantas conocida como el ácido indolacético, por lo que la absorción y translocación de estos compuestos es necesaria para la actividad herbicida y deberán ser aplicados en el follaje de las plantas en crecimiento.

Estos herbicidas son usados para el control selectivo de la hierbas latifoliadas de los campos de cultivo de cereales, pastos y césped.

Las preparaciones comerciales generalmente se componen de sales o ésteres del ácido. La cantidad de herbicida que debe aplicarse depende del campo a tratarse. En el caso de los campos de cultivo de granos se deberá aplicar una cantidad de 0.25 kg/ ha y en el caso del control de manchas en los árboles se utilizan 16 kg/ha.

1.4.2 Estructura Química.



COMPUESTO	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
2,4-D	-CH ₂ -COOH	-Cl	-Cl	-H
MCPA	-CH ₂ -COOH	-CH ₃	-Cl	-H
MECOPROP	(CH ₃)-CH-COOH	-CH ₃	-Cl	-H
2,4,5-T	-CH ₂ -COOH	-Cl	-Cl	-Cl
SILVEX	(CH ₃)-CH-COOH	-Cl	-Cl	-Cl
2,4-DB	-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -COOH	-Cl	-Cl	-H

Ref. ⁽²⁹⁾

1.4.3 Nomenclatura de los ácidos clorofenoxi.

NOMBRE COMUN	NOMBRE QUÍMICO	NOMBRE IUPAC	SINONIMOS
2,4-D	ácido (2,4-Diclorofenoxi) acético	ácido (2,4-Diclorofenoxi) acético	Acido 2,4-D
MCPA	ácido (4-Cloro-2-metil fenoxi) acético	ácido (4-Cloro-orto-toliloxi) acético	Agroxone Metaxon
MECOPROP	ácido 2-(4-Cloro-2-metil-fenoxi) propiónico	ácido 2-(4-Cloro-orto-toliloxi) propiónico	MCPP
2,4,5-T	ácido (2,4,5-Triclorofenoxi) acético	ácido (2,4,5-Triclorofenoxi) acético	Dacamine, T-Nox, U-46
SILVEX	ácido 2-(2,4,5-Triclorofenoxi) propiónico	ácido 2-(2,4,5-Triclorofenoxi) propiónico	2,4,5-TP Fenoprop
2,4-DB	ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi) butírico	ácido 4-(2,4-Diclorofenoxi) butírico	Acido 2,4-DB

1.4.4 Propiedades de los ácidos clorofenoxi.

PROPIEDAD	2,4-D	MCPA	MECOPROP	2,4,5-T	SILVEX	2,4-DB
Fórmula Química	$C_8H_6Cl_2O_3$	$C_9H_9ClO_3$	$C_{10}H_{11}ClO_3$	$C_8H_5Cl_3O_3$	$C_9H_7Cl_3O_3$	$C_{10}H_{10}Cl_2O_3$
Peso Molecular	221.04	200.63	214.60	255.49	269.53	249.09
Estado físico a (25°C)	cristales blancos	sólido ligeramente café	cristales	cristales	cristales	sólido cristalino blanco
Punto de fusión	140-141°C	118-119°C	93-94°C	153°C	181°C	120-121°C
Solubilidad en agua a (25°C) mg/l	900	825	---	150	140	46
Constante de Disociación (pKa)	2.64	---	---	---	---	4.8
Log del Coeficiente de Reparto Octano/Agua	2.22	2.30	2.99	2.83	3.52	---

Ref. ⁽²⁹⁾

1.4.5 Propiedades toxicológicas de los ácidos clorofenoxi.

La presencia de residuos de herbicidas del tipo clorofenoxi en agua han causado inquietud debido a dos razones. La primera fue el daño que sufrieron algunos cultivos de tomate, algodón y uva al ser regados con agua contaminada por alguna especie de ácido clorofenoxicarboxílico que fue descargado accidentalmente por una industria en Inglaterra. Y la segunda se debe a la gran controversia que se ha generado sobre la presencia de la impureza 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) que se produce durante la fabricación del 2,4,5-triclorofenol el cual a su vez se emplea para la preparación del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético. De ahí que todos los herbicidas clorofenoxi presentes en los suministros para agua potable sean considerados sospechosamente peligrosos para la salud. Sobretodo en el caso del 2,4-D que se usa sistemáticamente para el control de hierbas acuáticas en los suministros de agua potable. Por todo ésto, uno de los herbicidas más estudiado es el 2,4-D en donde se ha comprobado que, en general, hay ausencia de dioxinas. Sin embargo ésto no ocurre para el 2,4,5-T. por lo que se ha restringido su uso en los Estados Unidos desde 1985, en nuestro país se ha prohibido su importación y uso desde 1991.

En la tabla 1.4 se dan algunos datos sobre las concentraciones máximas permisibles o valores guía de los ácidos clorofenoxicarboxílicos de acuerdo a sus propiedades toxicológicas, carcinogénicas y a los criterios ecológicos.

La toxicidad relativa de una sustancia se mide a través del valor de la dosis letal 50 (DL₅₀). Esta es una estimación estadística de la cantidad de dicha sustancia que se requiere para matar al 50% de una población de animales de prueba bajo condiciones establecidas que no hayan estado en contacto con dicha sustancia anteriormente.

Por otra parte también en base a su toxicidad se pueden clasificar a los herbicidas por su peligrosidad en cuatro categorías: (I) extremadamente tóxico, (II) altamente tóxico, (III) moderadamente tóxico y (IV) ligeramente tóxico⁽²⁵⁾.

En cuanto a las propiedades carcinogénicas de estos compuestos no se han ofrecido resultados concluyentes, debido a una escasa información, o al pequeño número de animales utilizados⁽²⁶⁾.

En cuanto a efectos adversos al ambiente, ésto se deberá principalmente al uso irracional de cualquier tipo de plaguicida (herbicida) que propicie la contaminación del aire, suelo y agua, lo que a su vez afectará a todos los organismos, incluido el hombre. Por lo que se deberán tomar precauciones para proteger la vida silvestre así como a peces e insectos benéficos. Así como mantener medidas preventivas para evitar la contaminación del ambiente. En cuanto a los valores guía su propósito es proteger la salud del hombre y pueden ser no adecuados para proteger los organismos acuáticos. Estos valores se han obtenido a partir de las ingestas diarias admisibles (IDA) fijadas en las Reuniones Mixtas FAO/OMS de Expertos en Residuos de Plaguicidas y basadas en la hipótesis de que el agua potable no aportará más del 1% de las IDA. Como la IDA se basa en la exposición

durante toda la vida, las concentraciones superiores al valor guía durante un período breve, por ejemplo, como resultado de programas de control de hierbas acuáticas, pueden admitirse pero requieren una vigilancia cuidadosa ⁽²⁷⁾.

TABLA 1.4 Datos sobre los valores guía o concentraciones máximas permisibles de los ácidos clorofenoxicarboxílicos.

PARAMETROS	2,4-D	MCPA	MECOPRO P	2,4,5-T	SILVEX	2,4-DB
TOXICOLOGICOS Categoría del producto	III	ND	ND	Prohibido	Restringido a cultivos de arroz, caña de azúcar y sitios de no cultivo	IV
Efectos a la salud	Irritante para: ojos	ND	ND	Irritante para: ojos	Irritante para: ojos, piel y membranas mucosas	Irritante para: ojos y piel
LD ₅₀ (ORAL /RATAS) (mg/Kg)	375	700	1210	500	650	1960
Ingesta Diaria Admisible (IDA) (mg/Kg)	0.3	0.1	ND	0.03	ND	ND
CARCINOGENICOS Evidencia en animales	Inadecuada	ND	ND	Inadecuada	ND	ND
ECOLOGICOS Efectos adversos al ambiente	No tóxico en peces	ND	ND	ND	ND	tóxico en peces
Concentraciones Máximas Permisibles (µg/L) AGUA POTABLE	100	50	ND	10	ND	200

ND = no se disponen de datos

CAPITULO 2.

DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1 Equipos y Accesorios.

El sistema cromatográfico empleado se describe a continuación:

- ◆ Cromatógrafo de líquidos modular marca Gilson (Villiers-le-Bel, Francia) que consta de dos bombas (modelos 305 programable y 306 no programable) con capacidad para elaborar gradientes de elución de tipo binario. Módulo manométrico modelo 805, mezclador dinámico modelo 811-B. Todo este sistema será identificado por las iniciales "P1".
- ◆ Detector de UV de longitud de onda variable Gilson modelo 115.
- ◆ Inyector Rheodyne (Berkeley, CA, EUA) modelo 7125 con rizo de 20 μ L.
- ◆ Columna analítica de acero inoxidable (150 x 4.6 mm d.i.) empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μ m de diámetro de partícula (Phase Separations, Deeside, Reino Unido).
- ◆ Integrador marca Hewlett Packard (Avondale, PA, EUA) modelo 3396 Series II.

El sistema diseñado para el tratamiento de las muestras fue acoplado en línea entre el inyector del sistema cromatográfico Gilson y la columna analítica mediante una serie de conexiones de tubería capilar de acero inoxidable o de polímero Peek®. El sistema consta de (Ver Figura 2.1):

- ▲ Bomba isocrática marca Beckman (Berkeley, CA; EUA) modelo 110B, que será identificada por las iniciales "P2".
- ▲ Dos válvulas Rheodyne (Berkeley, CA, EUA) modelo 7000 de seis puertos, adaptadas sobre un soporte metálico perforado ad hoc.
- ▲ Dos precolumnas de acero inoxidable de 20 x 2 mm d.i. de Upchurch Scientific (Oak Harbor, WA, EUA) estas precolumnas fueron empacadas en el laboratorio usando un sistema para empaque de columnas marca Haskel (Burbank, CA, EUA) modelo 29426.

Otros equipos y/o accesorios empleados se enlistan a continuación:

- ⇒ Purificador y desionizador de agua marca Barnstead Thermolyne (Dubuquem IA, EUA).
- ⇒ Baño de ultrasonido Sonicor (Copiague N.Y.) modelo SC100.
- ⇒ Micropipeta de volumen variable de 5-50 μ l Socorex (Suiza) modelo 821-0050.

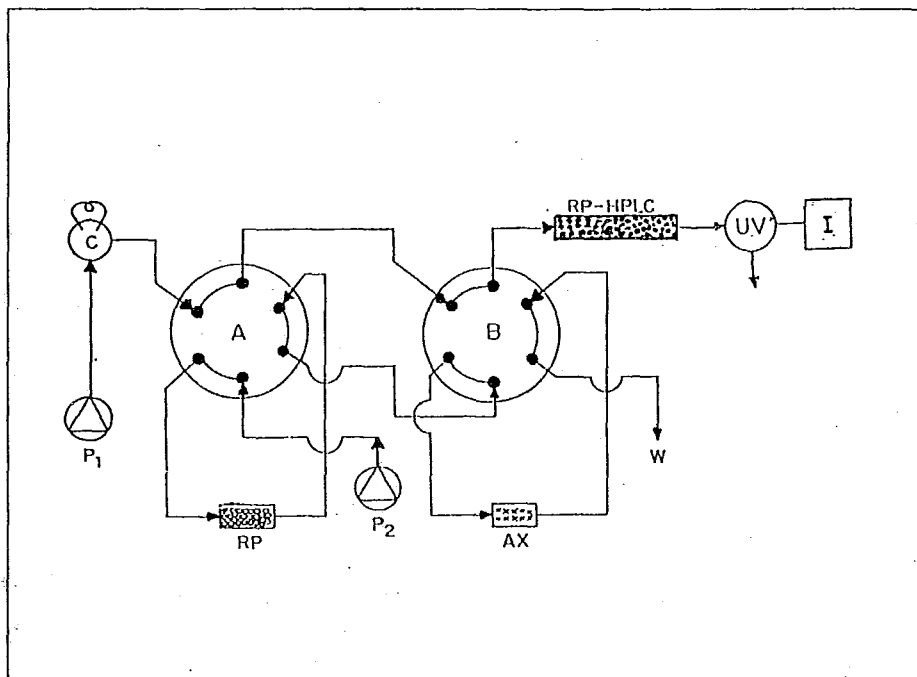


Figura 2.1. Diagrama del sistema experimental para la preconcentración en fase sólida, limpieza de la muestra y análisis en línea de los herbicidas ácido clorofenoxi presentes en agua.

Instrumentación : P1, sistema de bombas para efectuar gradiente; P2 bomba isocrática; A y B, válvulas de conmutación de alta presión; C, válvula de inyección; UV, detector; I, integrador; W, desecho.

Columnas:

RP precolumna de 20 X 2mm d.i., empacada con fase reversa polimérica CHP-3C de 10 μ m;

AX precolumna de 20 X 2mm d.i., empacada con intercambiador de aniones PRP-X100 de 10 μ m;

RP-HPLC columna analítica de 150 X 4.6 mm d.i., empacada con fase Spherisorb ODS-2 de 5 μ m.

- ⇒ pH metro Corning (Corning N.Y.) modelo 220 equipado con un electrodo combinado vidrio calomel (Cole Palmer modelo OM027).
- ⇒ Balanza Analítica Ohaus modelo Analytical Plus.
- ⇒ Sistema de filtración por vacío de vidrio Millipore (Bedford, MA, EUA).
- ⇒ Membranas filtrantes de 47-50 mm de diámetro, con un diámetro de poros de 0.45 μm , a base de nylon 66 de Phenomenex (CAL, EUA) número de parte AFO-0504.

2.1.1 Descripción del proceso de empacado de las precolumnas de concentración.

El dispositivo Haskel permite empacar las precolumnas a presiones superiores a la centena de atmósferas, lo cual genera un empacado homogéneo y compacto.

La metodología consiste en preparar una suspensión estable de la fase estacionaria que se desea empacar. En este trabajo las fases estacionarias que se utilizaron fueron:

Una fase reversa a base del copolímero estireno-divinilbenceno CHP-3C de Mitsubishi (Tokyo, Japón) de 10 μm de diámetro de partícula. En este caso la lechada se elaboró usando etanol; la concentración del soporte en la suspensión fue de alrededor de un 30% en peso y se empacó a una presión constante de 207 bar.

La segunda precolumna fue empacada con una resina intercambiadora de aniones PRP-X100 de Hamilton (Reno, NV, EUA) de 10 μm de diámetro de partícula. La disolución empleada para hacer la lechada fue una mezcla de metanol-agua alcalinizada (NaOH pH 13) en una relación 60:40 (v/v), la concentración del soporte fue de 30% en peso y la presión de empacado se mantuvo constante a 117 bar.

La precolumna empacada con el copolímero de estireno-divinilbenceno (precolumna que se denominará como RP) se lavó circulando a través de ella 40 ml de una fase móvil de metanol-agua 80:20 (v/v) a un flujo de 1 mL/min.

Fue necesario someter a la siguiente rutina a la precolumna con el intercambiador de aniones (denominada AX):

i) Lavado con 20 mL de agua grado HPLC, ii) lavado con 40 mL de fase móvil metanol:agua 80:20 (v/v), iii) lavado con 20 mL de agua, iv) lavado con 40 mL de una disolución acuosa de NaOH (pH 12.5) y finalmente v) lavado con 40 mL de agua. El flujo para todo el proceso fue de 1.0 mL/min.

Una vez realizadas estas operaciones las precolumnas estuvieron listas para ser empleadas en los estudios de preconcentración.

2.1.2 Calibración del rizo (loop) del inyector.

Este proceso es necesario para realizar un cálculo exacto de la recuperación de los solutos en estudio durante las etapas de extracción y concentración en fase sólida, así como su posterior análisis en línea. Para hacer dicha evaluación es necesario conocer la cantidad exacta que es inyectada de cada disolución estándar de los ácidos clorofenoxi, debido a que las unidades de área reportadas para cada analito probado, son usadas como referencia para determinar la cantidad de soluto recuperado en cada experimento.

La calibración del rizo se efectuó a través de un proceso de valoración ácido-base. Para tal fin se usó ácido perclórico (HClO_4) 5.9 N, el cual fue previamente valorado con una solución estandarizada de NaOH 0.1 N. El valor nominal del rizo era de 20 μL , por lo que se introdujo dos veces más su volumen, de tal manera que efectivamente quedara totalmente lleno. La disolución del ácido se introdujo con una jeringa de 100 μL (Hamilton, 80665). Una vez llenado el rizo, el ácido fue desplazado a un matraz Erlenmeyer, con la ayuda de un flujo de agua que se hizo bombear a través del inyector en posición de inyección. El líquido desplazado fue valorado con la disolución de NaOH 0.1 N. Mediante esta valoración se calculó el volumen real del rizo de inyección. El proceso se efectuó cinco veces.

2.2 REACTIVOS.

(A) Disolventes orgánicos:

Acetonitrilo grado HPLC de Prolabo (París, Francia)

Metanol grado HPLC de Prolabo (París, Francia)

(B) Ácidos:

Ácido perclórico grado reactivo (70-72% pureza) de Química Dinámica (Monterrey, México).

Ácido fórmico (98% mínimo de pureza) de Merck, Co. (Darmstadt, Alemania).

(C) Alcalis:

Hidróxido de sodio grado reactivo de Baker (Phillipsburgh, NJ, EUA).

(D) Sustancias patrón:

Todos los ácidos clorofenoxicarboxílicos fueron suministrados por Chem Service (West Chester, PA, EUA) con los siguientes grados de pureza certificados:

Soluto	Pureza
2, 4-D	99.9%
MCPA	97.9%
MECOPROP	98.0%
2,4,5-T	99.0%
SILVEX	97.0%
2,4-DB	99.0%

2.2.1 Disoluciones Patrón de los ácidos clorofenoxicarboxílicos.

Se prepararon disoluciones patrón de cada uno de los ácidos clorofenoxi indicados en la sección 2.2. Se pesó cada soluto por separado y se disolvió en 2 mL de metanol grado HPLC. Una vez disueltos, éstos fueron mezclados y transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 25 mL aforando con metanol. La concentración para cada soluto fue de 1 mg/mL. A partir de ésta disolución patrón concentrada, se prepararon las disoluciones estándar utilizadas para realizar los diferentes estudios de preconcentración y separación cromatográfica. Las disoluciones preparadas fueron almacenadas a una temperatura de -4 a 0°C.

2.2.2 Preparación de las disoluciones ácidas y alcalinas.

Se prepararon disoluciones 1N de cada uno de los ácidos mencionados en la parte de reactivos. Cada ácido fue filtrado sobre las membranas de filtración de Nylon de 0.45µm. A partir de estas disoluciones se prepararon disoluciones diluidas.

En el caso de las disoluciones de hidróxido de sodio fue necesario prepararlas con un bajo contenido de carbonatos. Para lograr esto se preparó una disolución saturada de NaOH, en donde el carbonato de sodio es relativamente insoluble. Por esta razón se utilizó el sobrenadante para preparar las disoluciones de NaOH al pH deseado. El pH de todas las disoluciones, ácidas o básicas, fue ajustado con el pHmetro, teniendo siempre la precaución de calibrar el equipo antes de su uso.

2.2.3 Preparación de las muestras.

Cuando se desarrolla un método analítico es necesario considerar los antecedentes y la forma en que la muestra real llega al laboratorio. En el caso de muestras ambientales existen normas (por ejemplo USEPA) que especifican la forma en que las muestras deberán ser recolectadas según su naturaleza física, cómo deberán ser empacados los frascos con las muestras para su transporte, la temperatura durante su envío al laboratorio, el tiempo máximo que podrá transcurrir entre su recolección y análisis, y en general los métodos de preservación de las muestras. En el caso de los ácidos clorofenoxicarboxílicos se sugiere el uso de botellas de vidrio previamente lavadas con disolventes orgánicos, con tapones recubiertos de politetrafluoroetileno (TFE), así como recolectar por lo menos 250 mL de muestra, que deberán ser preservados en refrigeración. En cuando al tiempo máximo de almacenamiento, se indica que es de siete días antes de hacer su extracción y de 20 días una vez hecha.

Para el método que se propone en este trabajo, las indicaciones anteriores siguen siendo válidas excepto, por el hecho de que las muestras son analizadas en cuanto se hace su extracción, ya que los dos procesos se efectúan en línea.

Por otra parte, debido a la presencia de sólidos en suspensión, sobre todo en el caso de muestras de aguas superficiales, es necesario hacer una filtración previa a las operaciones en línea. Para esto se utilizó una membrana de Nylon de 0.45 μm acoplada a la unidad de filtración por vacío (Figura 2.2).

Antes de usar estas membranas, fue necesario someterlas a un lavado con metanol. La operación consistió en dejarlas sumergidas en el disolvente orgánico durante una o dos horas. Posteriormente, la membrana fue colocada en el equipo de filtración y se procedió a enjuagarla con 10 mL de metanol fresco, finalmente se lavó con 20 mL de agua grado HPLC.

Una vez acondicionada la membrana, se filtró la muestra. La botella de muestreo fue lavada sucesivamente con 12.5 mL de metanol y con 5 mL de agua. Los disolventes de lavado fueron filtrados a través de la misma membrana y recolectados en el mismo matraz que la muestra. La mezcla se acidificó adicionando 4 mL de HClO_4 diluido 1:1 (v/v) en el matraz (pH 1.5).

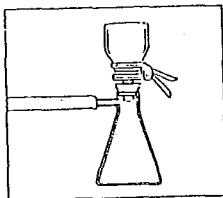
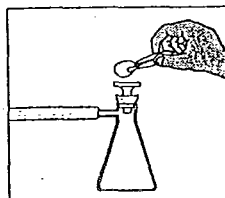
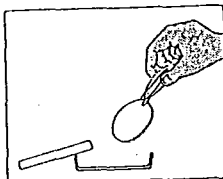
Este recipiente, conteniendo la muestra preparada, fue utilizado como el reservorio de la bomba isocrática Beckman (denominada como bomba "P2" en la figura 2.1).

Todo este procedimiento fue realizado tanto para las muestras fortificadas de agua pura como para las muestras de agua potable y de aguas superficiales.

A. Antes de usar la membrana

filtrante, ésta deberá ser acondicionada. Por lo que deberá ser sumergida en metanol (10ml) durante 1 a 2 hr. Se enjuagará otra vez con metanol (10ml) y finalmente con agua grado HPLC (20ml).

Se proseguirá con el ensamblado de la unidad de filtración, colocando un matraz limpio y seco para recibir la muestra de agua.



B. Vacíe en el recipiente superior el

volumen de muestra elegido como óptimo. Aplique el vacío, después que la muestra haya pasado, desconecte el vacío y enjuague el recipiente con 12.5ml de metanol. Enjuague otra vez con 5ml de agua, después de que todo el disolvente del primer enjuague haya pasado a través del filtro.

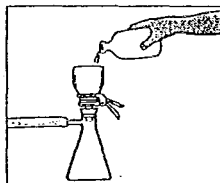
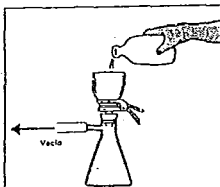


Figura 2.2. Preparación de la muestra.

2.3 Determinación de los volúmenes en fuga y desorción de los ácidos clorofenoxi en la precolumna de concentración.

2.3.1 Volúmenes de fuga.

La determinación de los volúmenes de fuga se realizó usando la bomba isocrática (P2) conectada a una válvula de conmutación en la que se montó la precolumna a evaluar. El efluente de la precolumna fue monitoreado por un detector UV.

Los volúmenes de fuga se midieron con agua grado HPLC fortificada con el soluto a evaluar. Cada soluto da una respuesta que depende de su coeficiente de extinción molar, de la longitud de onda empleada y de la concentración usada para fortificar la muestra.

En este proceso la muestra comienza a pasar a través de la precolumna en donde los solutos son extraídos por el adsorbente, por lo que al inicio de la etapa no se registra ninguna señal del efluente en el detector. Sin embargo, a medida que se desarrolla el proceso de preconcentración, el soluto avanza y se distribuye a lo largo del lecho de la precolumna. En el momento en que se alcanza un cierto volumen V_f de muestra percolada, el soluto comienza a emerger de la precolumna y su concentración en el efluente aumenta gradualmente hasta alcanzar una meseta que corresponde a la concentración del soluto en la muestra original. El volumen percolado que corresponde a una absorbancia igual a un 1% de la absorbancia total de la muestra es considerado como el volumen de fuga, V_f (Subra et al., 1988). Ver figura 2.3.

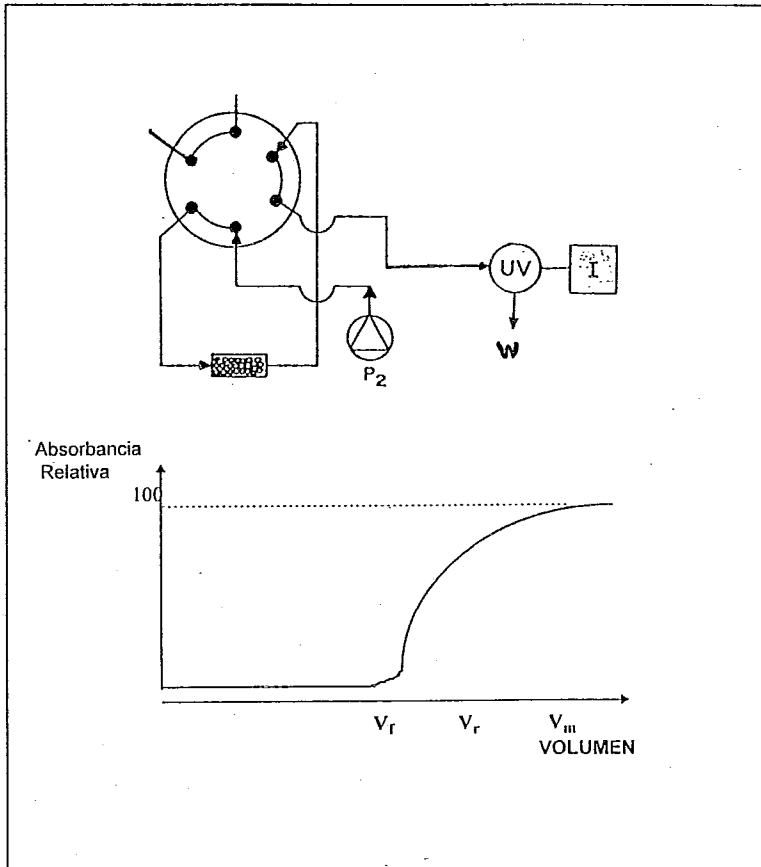


Figura 2.3. Determinación del volumen de fuga por análisis frontal.
 V_f, volumen de fuga; V_r, volumen de retención; V_m, volumen correspondiente a la cantidad máxima fijada; W, desecho; P₂, bomba 2; UV, detector de UV, I, integrador.

2.3.2 Volúmenes de Desorción.

Este proceso se realizó usando el mismo dispositivo señalado en la figura 2.1. La bomba P2 se limpia con agua y se purga con la fase móvil a probar. Los solutos concentrados en la precolumna son desorbidos mediante una fase móvil apropiada. La desorción se traduce en un incremento brusco de la señal del detector seguido por una disminución paulatina. El volumen de desorción (V_d), se define como el volumen al cual prácticamente todo el soluto concentrado se ha desorbido de la precolumna y se determina a un valor del 1% de la absorbancia total de la muestra. Ver figura 2.4.

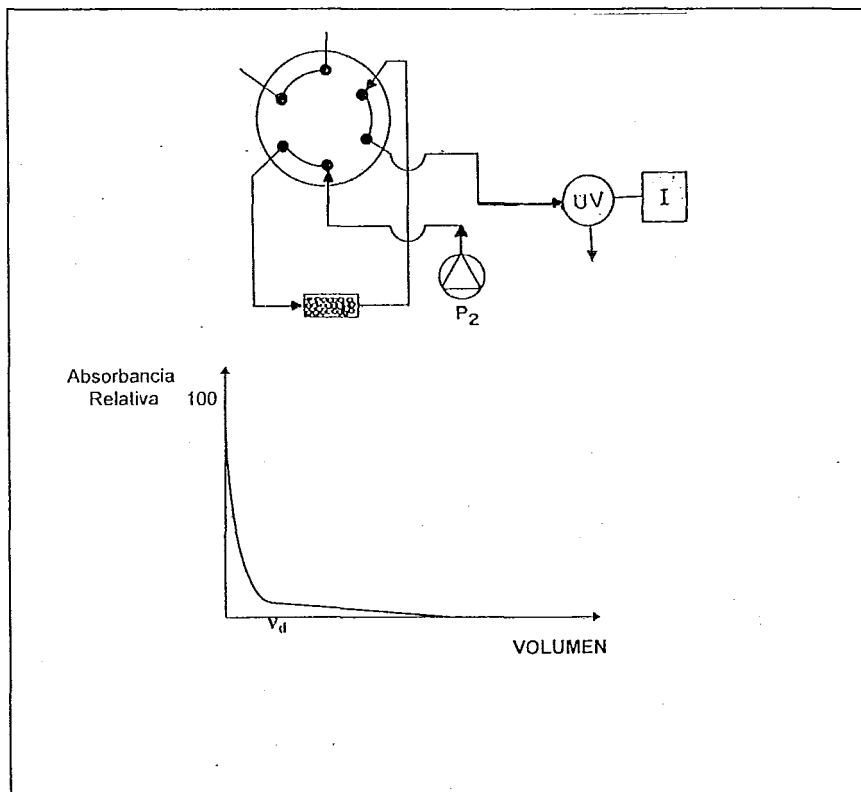


Figura 2.4. Determinación del volumen de desorción por desplazamiento ó análisis de elución. V_d , volumen de desorción; W, desecho; P₂, bomba 2 UV, detector de UV; I, integrador.

2.4 Preconcentración y Análisis en línea de los ácidos clorofenoxicarboxílicos.

2.4.1 Descripción del acoplamiento del sistema cromatográfico con el sistema de preconcentración.

En la figura 2.5 se muestra el montaje utilizado para llevar a cabo la preconcentración, limpieza y análisis en línea de las muestras de agua.

En el esquema las válvulas de conmutación son denominadas como "A" y "B".

La válvula "A" se encuentra conectada al inyector del sistema cromatográfico Gilson, (denotado como "C") a través de la puerta 2 y a la válvula "B" por las puertas 3 y 5. La bomba P2 esta unida a esta válvula por la puerta 6 y la precolumna de fase reversa polimérica (RP) está montada entre las puertas 1 y 4.

La válvula "B" está unida a la válvula "A" por las puertas 2 y 6 y a la columna analítica (denominada como RP-HPLC) por la puerta 3. La precolumna de intercambio aniónico (AX) está montada entre las puertas 1 y 4. La puerta 5 queda como una salida de desecho.

2.4.2 Descripción del procedimiento de preconcentración y análisis.

Las cinco primeras etapas del proceso se realizan en el sistema de conmutación diseñado, por lo que se emplea la bomba isocrática (P2). Las etapas restantes son efectuadas con el sistema de gradiente binario Gilson (P1). Las combinaciones de las posiciones de las válvulas A y B, así como del inyector C, para cada etapa son dadas en la tabla 2.1. Las condiciones cromatográficas para la separación y análisis de los seis ácidos clorofenoxicarboxílicos son dadas en la sección 2.4.4.

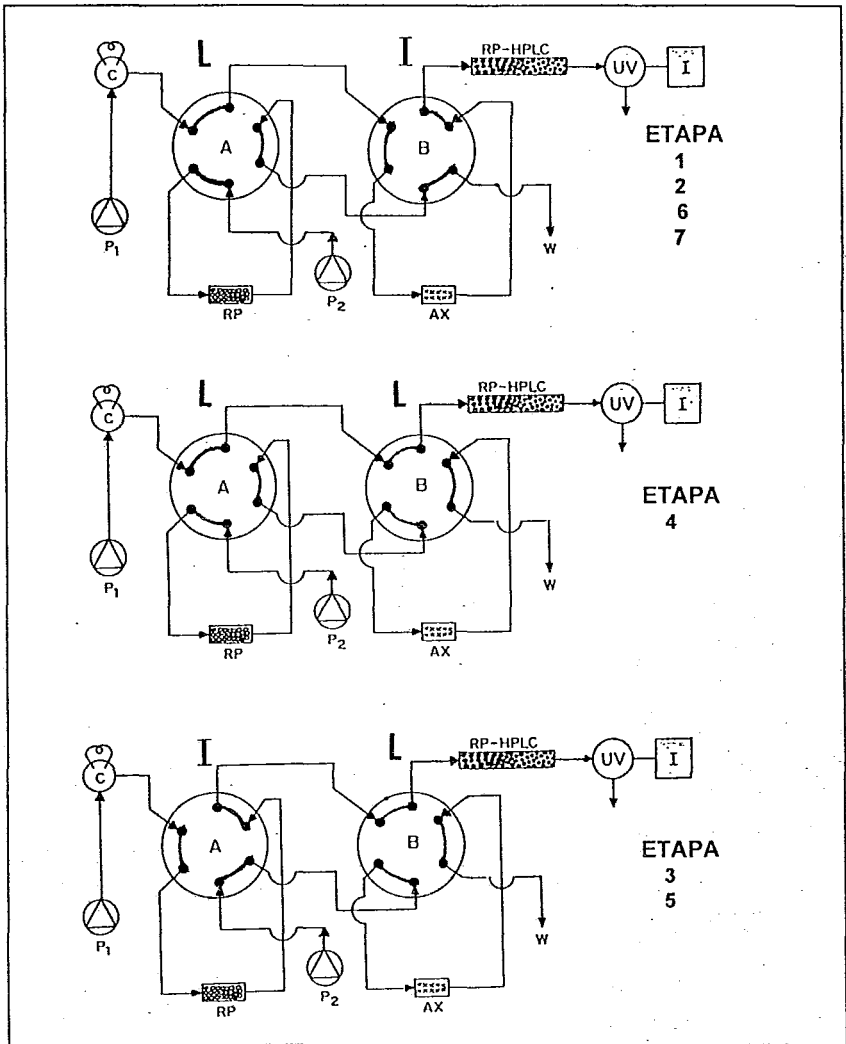


Figura 2.5. Representación esquemática de las posiciones de las válvulas conmutadas durante las diversas etapas del método. L, indica que la válvula está en posición de carga; I, indica que la válvula está en posición de inyección o elución.

TABLA 2.1. Posiciones de las válvulas conmutadas durante la preconcentración y análisis de los ácidos clorofenoxi.

ETAPA	OPERACION	VALVULA A	VALVULA B	INYECTOR C	BOMBA UTILIZADA
1	Acondicionamiento de RP	L	I	L/I	P2
2	Cargar RP y enjuagar	L	I	L/I	P2
3	Acondicionamiento de AX	I	L	L/I	P2
4	Transferencia de RP a AX	L	L	L/I	P2
5	Enjuagar AX	I	L	L/I	P2
6	Eluir AX y analizar la muestra	L	I	L/I	P1
7	inyectar estándar	L	I	I	P1

RP, precolumna de fase reversa polimérica; AX, precolumna de resina intercambiadora de aniones; L, posición de carga; I, posición de inyección; P2, bomba isocrática; P1, sistema de bombas para efectuar la elución por gradiente.

El procedimiento general desarrollado se describe a continuación:

1. Equilibrar la precolumna polimérica de fase reversa RP con 25 mL de una mezcla metanol:HClO₄ (pH=1) 5:95 (v/v) a un flujo de 2.0 mL/min.
2. Percolar sobre esta precolumna un volumen de 75 mL de la muestra preparada de acuerdo a la sección.2.2.3, a un flujo de 1.5 mL/min. Una vez cargados los solutos, lavar la precolumna con 0.2 mL de agua grado HPLC a un flujo de 0.1 mL/min.
3. Equilibrar la precolumna aniónica AX con 25 mL de una mezcla acetonitrilo:NaOH (pH=10) 10:90 (v/v), a un flujo de 2.0 mL/min.
4. Transferir la muestra preconcentrada en la precolumna RP a la precolumna AX con 5 mL de la mezcla anterior a un flujo de 1 mL/min.
5. Lavar la precolumna AX con 0.2 mL de agua grado HPLC, a un flujo de 0.1 mL/min.
6. Elución en línea de los solutos con la fase móvil constituida: fase "A" acetonitrilo : agua (pH 3.8) 20 : 80 (v/v) conteniendo HClO₄ 0.01M y HCOOH 0.01M; el pH se ajustó con NaOH concentrada. Fase "B" acetonitrilo : agua (pH 3.8) 80:20 (v/v) conteniendo HClO₄ 0.01M y HCOOH 0.01M; el pH también se ajustó con NaOH concentrada.
7. Inyectar la disolución estándar de los ácidos clorofenoxi para la cuantificación de estos analitos en la muestra.

En la figura 2.6 se resume toda la metodología antes descrita.

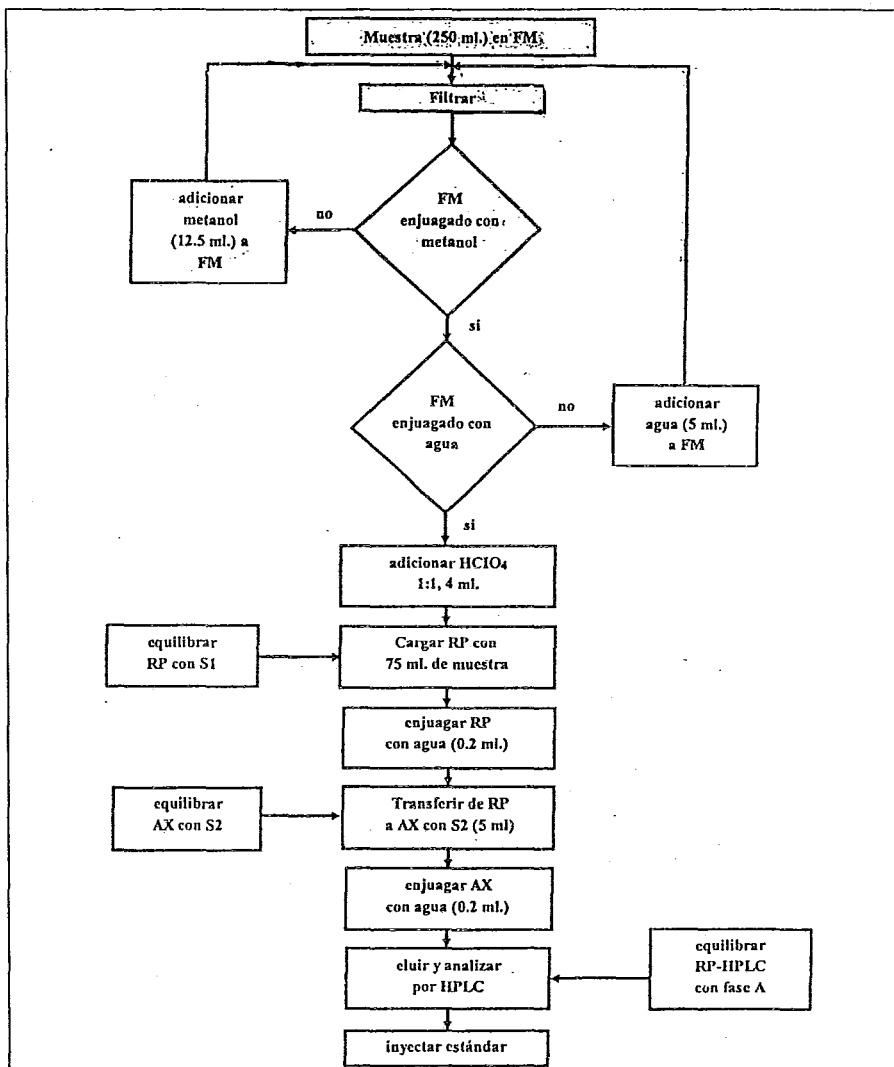


Figura 2.6. Diagrama de flujo de la metodología para la determinación de los herbicidas ácidos clorofenoxi en agua.

FM, frasco para muestreo de vidrio color ámbar con capacidad de 250 ml; S1, solución de Metanol : HClO₄ (pH 1.1) 5:95 (v/v); S2, solución de Acetonitrilo : NaOH (pH 10.0) 10:90 (v/v); RP, precolumna de fase reversa polimérica; AX, precolumna de resina intercambiadora de aniones; RP-HPLC, columna analítica de fase reversa C₁₈

2.4.3 Descripción del proceso de regeneración y limpieza de los sistemas.

La precolumna RP es regenerada haciendo pasar 10 ml de agua y 10 ml de metanol, a un flujo de 2.0 mL/min, con el fin de eliminar cualquier residuo de muestra o de impurezas, que haya quedado en las conexiones o en el empaque de la precolumna.

Este proceso se puede realizar mientras se efectúan los pasos 6 y 7 del procedimiento general, gracias a que se cuenta con el sistema de válvulas conmutadas.

En el caso de la precolumna AX, no es necesario realizar una regeneración extra ya que ésta es limpiada durante la elución por gradiente. Sin embargo, es conveniente activarla después de 10 ciclos de análisis, usando una disolución acuosa de NaOH pH 12.0 seguida por un abundante lavado con agua grado HPLC.

El tiempo requerido para efectuar todo este procedimiento es de aproximadamente 2.5 horas, incluyendo el análisis cromatográfico de la muestra y del estándar.

La columna RP-HPLC es regenerada con 20 mL de agua a un flujo de 1.0 mL/min. y finalmente con 40 mL de una mezcla de acetonitrilo:agua 80:20 (v/v).

2.4.4 Descripción de las condiciones cromatográficas.

1. Columna analítica.

Columna de acero inoxidable de 150 x 4.6 mm de diámetro interno, empacada con una fase reversa comercial denominada Spherisorb ODS-2 con un tamaño de partícula de 5µm.

Todas las separaciones, tanto de las muestras tratadas como de las mezclas estándar inyectadas, fueron realizadas con la precolumna de intercambio aniónico acoplada en línea a la columna analítica.

2. Fase móvil.

Fase "A" acetonitrilo : agua (pH 3.8) 20:80 (v/v) conteniendo HClO_4 0.01M y HCOOH 0.01M, el pH se ajustó con NaOH concentrada. Fase "B" acetonitrilo : agua (pH 3.8) 80:20 (v/v) conteniendo HClO_4 0.01M y HCOOH 0.01M, el pH también se ajustó con NaOH concentrada.

3. Temperatura.

La separación se realizó a temperatura ambiente.

4. Flujo del eluyente.

Se utilizó una relación de flujo de 1 mL/min.

5. Parámetros del gradiente (ver figura 2.7).

Tiempo (min)	Fase A %	Fase B %
0	100	0
15	93	7
30	80	20
50	40	60
55	30	70

6. Detección

UV a una longitud de onda de 230 nm.

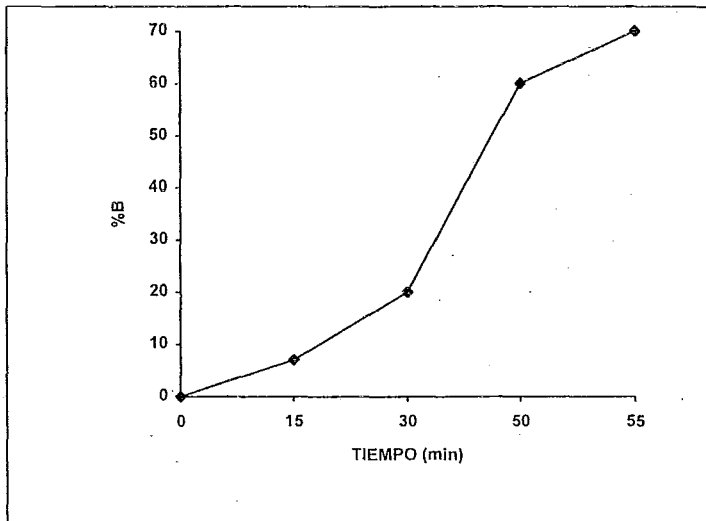


Figura 2.7. Gráfica del gradiente de elución empleado para la separación de los ácidos clorofenoxi.

CAPITULO 3.

Resultados y Discusión.

3.1 Discusión de la estrategia empleada en el desarrollo del método analítico.

Las etapas que se consideraron en la realización del presente trabajo fueron las siguientes:

- * Diseño
- * Desarrollo
- * Validación

Diseño.

Esta etapa comprendió una exhaustiva revisión bibliográfica, cuya finalidad fue conocer las propiedades físicas y químicas, así como la estabilidad e interacciones de los analitos de interés. Además se recopilaron referencias sobre metodologías y técnicas relacionadas con el análisis de trazas.

Con toda la información recabada se hizo un diseño preliminar de los pasos que deberían seguirse para la preconcentración y separación de los ácidos clorofenoxi, hasta establecer las condiciones generales del método.

Desarrollo.

Con base en las condiciones generales propuestas por la investigación bibliográfica los puntos que se consideraron para ser evaluados en forma experimental fueron:

- Condiciones de preconcentración y limpieza.
- Condiciones cromatográficas para el análisis
- Preparación y manipulación de las muestras fortificadas.

Validación.

Cualquier medición analítica no es válida hasta que los resultados característicos de la metodología han sido debidamente certificados, por lo que es esencial que los informes acerca de dichos valores sean correctos.

En esta etapa se evaluaron los siguientes parámetros estadísticos: linealidad, exactitud, precisión (repetibilidad) y límite de detección, con el fin de obtener información sobre la confiabilidad del método analítico desarrollado.

El último punto de nuestro estudio fue la aplicación del método desarrollado y probado en muestras reales fortificadas y sin fortificar.

3.2 Diseño de las condiciones de preconcentración y limpieza.

La preconcentración de compuestos orgánicos presentes en muestras de agua por medio de una extracción en fase sólida, se basa en la distribución de dichos compuestos entre un soporte sólido y el agua. En el caso de los ácidos clorofenoxi encontramos que los materiales más empleados para este fin son las fases químicamente enlazadas del tipo siloxano (Si-O-SiR₃) conocidas comercialmente como C₁₈ o como ODS, así como los polímeros porosos entrecruzados formados por estireno y divinilbenceno (EDVB) denominados comercialmente como PRP (Hamilton), PLRP-S (Polymer Labs.) y CHP (Mitsubishi).

Estas fases son conocidas generalmente como fases reversas y son usadas para eliminar interferentes de naturaleza apolar o hidrofóbica, por lo que actúan como filtros. Sin embargo presentan poca selectividad, lo que resulta una gran desventaja especialmente cuando se encuentran en combinación con un método de detección de baja selectividad como lo es la absorción en el UV a longitudes de onda menores de 254 nm.

De ahí la necesidad de plantear otra etapa que permita limpiar la muestra ya preconcentrada.

Nielen y Hennion han sugerido, para el caso de compuestos con propiedades ácido-base, hacer una transferencia de estos solutos en su forma ionizada a una segunda precolumna empacada con una resina intercambiadora de iones. Este paso será muy selectivo, ya que los compuestos neutros de polaridad media o baja quedarán retenidos en la primera precolumna empacada con el soporte de fase reversa.

Esta propuesta es la que se consideró en este trabajo, ya que los ácidos clorofenoxi son fácilmente ionizables, sus valores de pK_a están entre 2 y 4.

3.2.1 Determinación de los volúmenes de fuga y desorción de los ácidos clorofenoxi en dos tipos de adsorbentes.

La capacidad de adsorción de cada soporte se evaluó mediante la determinación de los volúmenes de fuga usando en este caso al soluto de menor hidrofobicidad (2,4-D), así como el de naturaleza mas hidrófoba (2,4-DB).

El primer soporte evaluado fue la fase reversa C₁₈ los resultados obtenidos se dan en la tabla 3.1.

TABLA 3.1 Volúmenes de fuga V_f, determinados en una precolumna empacada con C₁₈ (5µm d.p.).

SOLUTO	pH de la Fase Móvil								
	pH 1.5 ⁽¹⁾			pH 5.5 ⁽²⁾			pH 6.0 ⁽³⁾		
	Relación metanol : agua en la fase móvil (v/v)								
	1:99	15:85	30:70	1:99	15:85	30:70	1:99	15:85	30:70
V _f (mL)									
2,4-D	13	8	3	0.5	-	-	4.2	1.5	-
2,4-DB	98	54	20	5.0	1.5	-	58.7	7.7	-

(1) Agua acidificada con ácido perclórico (1:1)

(2) Agua grado HPLC

(3) Agua amortiguada con acetato de amonio 0.02M

- No se determinó el volumen de fuga

Nota: La concentración de los solutos en la disolución de carga fue de 1 mg/L

Las dimensiones de la precolumna son 20 x 2 mm (d.i.)

Se puede observar que el compuesto 2,4-D prácticamente no es retenido ya que sus volúmenes de fuga son apreciablemente bajos aún controlando las condiciones de acidez para mantenerlo en su forma molecular y sin la presencia de metanol. En cuanto al 2,4-DB podemos observar que muestra una mayor afinidad a este tipo de adsorbente ya que presenta una gran retención, aún en la presencia de un 30% de metanol se retiene en un 20%.

Se observó cómo se ve afectada la retención de ambos solutos bajo condiciones no controladas de acidez y basicidad como se muestra en el ensayo en que se utilizó únicamente agua.

De acuerdo con estos resultados la fase reversa C_{18} no puede ser usada como adsorbente para la preconcentración ya que, además de tener una capacidad de retención muy baja para el 2,4-D, se necesita mantener los solutos en su forma molecular a valores de pH muy ácidos. Sabemos que este tipo de soportes son estables en un intervalo de pH de 2 a 8, por lo que se concluye que la fase C_{18} no es adecuada para nuestro trabajo ya que no cubre nuestras necesidades.

El segundo adsorbente evaluado fue la fase polimérica RP, que actúa como una fase reversa. Este adsorbente presenta mejores propiedades en cuanto a su estabilidad mecánica y química, así como una mayor afinidad por los compuestos moderadamente polares. Coquart y Hennion han reportado que son muy apropiados para la preconcentración de analitos aromáticos que contienen sustituyentes polarizables tales como grupos nitro, fenilo o halógeno.

La evaluación de este soporte se realizó con el analito que presentaba poca retención sobre la fase C_{18} , manteniéndolo en su forma molecular y variando únicamente el contenido de metanol.

En la tabla 3.2 se muestran los resultados obtenidos con esta fase.

TABLA 3.2. Volúmenes de fuga, V_f , determinados en una precolumna empacada con RP ($10\mu\text{m}$ d.p.)

SOLUTO	Relación Metanol : Agua en la Fase Móvil (v/v)				
	1:99	5:95	10:90	15:85	30:70
	V_f (mL)				
2,4-D	250	210	160	100	10

La fracción acuosa consistió en agua acidificada con HClO_4 a un pH de 1.5.

La concentración del analito en la disolución de carga fue de 0.5 mg/L.

Las dimensiones de la precolumna son de 20 x 2 mm (d.i.).

Se puede observar que el ácido 2,4-D puede preconcentrarse satisfactoriamente sobre la columna RP, por lo que se decidió utilizar esta fase para la primera etapa de concentración de los ácidos clorofenoxi.

Una vez determinados los volúmenes de fuga del herbicida clorofenoxi menos hidrófobo sobre la fase reversa RP, se continuó con la evaluación de los volúmenes de desorción. Se realizaron varios ensayos usando disoluciones acuosas de hidróxido de sodio a diferentes valores de pH.

El procedimiento consistió en cargar previamente la fase RP con 150 mL de agua fortificada con una concentración de 0.5 mg/L del herbicida menos hidrófobo (2,4-D) y del mas hidrófobo (2,4-DB). Las disoluciones acuosas de carga fueron ajustadas a un pH de 1.5 con ácido perclórico. Una vez cargados los solutos en la precolumna, ésta fue lavada con 0.5 mL de agua desionizada y se prosiguió con la desorción haciendo pasar como fase móvil una disolución acuosa de NaOH a diferentes valores de pH. Los resultados se dan en la tabla 3.3.

TABLA 3.3. Volúmenes de desorción, V_d , de los herbicidas clorofenoxi concentrados sobre la fase RP.

SOLUTO	pH de la Fase Móvil		
	10.0	10.5	11.0
	V_d (mL)		
2,4-D	27	22	18
2,4-DB	47	39	32

Fase móvil: disolución acuosa de hidróxido de sodio

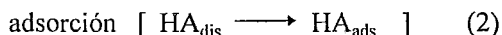
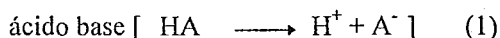
Preconcentración de 150 mL de la disolución acuosa a pH 1.5 fortificada con cada uno de los ácidos clorofenoxi indicados a una concentración de 0.5 mg/L. Se hizo pasar agua grado HPLC (0.5mL), antes de introducir la fase móvil de desorción.

El volumen correspondiente al 2,4-DB es muy grande, ésto se puede atribuir a su naturaleza muy hidrófoba, que da lugar a una fuerte retención sobre la fase polimérica, aún en condiciones en que el soluto debería estar ionizado.

Con respecto a esto último, un examen minucioso de la tabla 3.3 muestra que el volumen de desorción disminuye a medida que el pH de la disolución acuosa pasa de 10 a 11.

Estos resultados parecen sorprendentes si se considera que los pKa de estos solutos están muy alejados de los valores de pH ensayados, por lo que en las condiciones usadas este parámetro no debería tener ningún efecto.

La explicación que puede darse a este fenómeno se basa en la presencia de dos equilibrios simultáneos:



donde HA es el ácido clorofenoxi y los subíndices "dis" y "ads" se refieren a las especies en disolución y adsorbida respectivamente.

El paso de la especie molecular a la fase sólida provoca una disminución de la fuerza del ácido HA y con ello un aumento en el pKa condicional del par HA/A⁻. Este fenómeno es más importante cuanto mayor es la afinidad de la especie molecular por el adsorbente. Los resultados de la tabla 3.2 indican que aún para el soluto menos hidrofóbico (2,4-D), la afinidad por el adsorbente en disoluciones acuosas es muy elevada. Por lo tanto, se puede esperar que los ácidos HA se debiliten a tal grado que sus pKa condicionales pasen desde el valor inicial de 2 a 4 hasta valores del orden de 10 o más.

En estas condiciones resultará normal que un aumento del pH en el intervalo de 10 a 11 provoque una disminución importante en el volumen requerido para la desorción de los solutos, pues estaría aumentando el grado de ionización de éstos.

Lo anterior implica que para disminuir los volúmenes de desorción se requiere aumentar aún más el pH, para incrementar el grado de ionización de los solutos, o buscar otras condiciones que permitan disminuir la afinidad de éstos por el adsorbente. La primera opción no es adecuada desde el punto de vista práctico porque algunas partes del equipo (sellos de las bombas y las válvulas particularmente) son atacadas en medios muy alcalinos. La segunda opción, por el contrario, es fácil de llevar a cabo considerando que el adsorbente actúa como fase reversa y que los solutos se adsorben debido a fenómenos hidrofóbicos. Así, bastaría con añadir un pequeño volumen de un disolvente orgánico como metanol o acetonitrilo a la disolución acuosa para provocar una fuerte disminución de los efectos hidrofóbicos.

En la tabla 3.4 se muestra el efecto de la presencia de metanol o acetonitrilo en la disolución acuosa de pH 10 sobre los volúmenes de desorción del 2,4-D y el 2,4-DB.

Para estos experimentos se siguió el mismo procedimiento que se utilizó para el estudio del efecto del pH sobre la desorción.

TABLA 3.4. Efecto de la adición de un modificador orgánico sobre los volúmenes de desorción, V_d , de los ácidos clorofenoxi concentrados en el soporte RP.

SOLUTO	MODIFICADOR ORGANICO					
	METANOL			ACETONITRILO		
	Relación orgánico : NaOH (v/v)					
	5%	10%	15%	5%	10%	15%
	V_d (mL)					
2,4-D	12	8	4	9	4.5	3
2,4-DB	24	12	6	11	5.5	3.5

Fase móvil: disolución acuosa de NaOH pH 10.0.

Volumen preconcentrado 150 mL.

Volumen de lavado con agua desionizada 0.5 mL.

Como puede observarse en la tabla 3.4 basta una pequeña proporción de disolvente orgánico en la disolución acuosa para que los volúmenes de desorción disminuyan considerablemente. Este efecto tan marcado es debido probablemente a dos factores simultáneos:

- 1ª Una disminución de los efectos hidrofóbicos provocando una menor afinidad de los solutos por el adsorbente.
- 2ª Al disminuir la afinidad de los solutos por el adsorbente también disminuye el pKa condicional del par HA/A^- .

Esto significa que para un valor dado de pH (en este caso pH 10) se logra una ionización más efectiva de los ácidos adsorbidos y esto contribuye a disminuir aún más su retención. Por otra parte, los resultados obtenidos muestran también que el efecto es más fuerte con acetonitrilo que con metanol, lo cual es un comportamiento típico en los sistemas de fase reversa. Entre menos polar es el modificador orgánico mayor es la disminución de los efectos hidrofóbicos y menor es la retención de los solutos.

Sin embargo, para determinar la composición y el volumen del disolvente que se empleará para transferir completamente los solutos de la precolumna RP a la precolumna empacada con el intercambiador de aniones (AX) no basta con estudiar las condiciones de desorción de la primera columna. Se requiere además cumplir con las siguientes condiciones:

- que los analitos no se escapen de la precolumna AX durante la transferencia.
- que otros compuestos interferentes, posiblemente retenidos en la precolumna RP durante la carga de la muestra, no sean transferidos a la precolumna AX. Es decir, que se cumpla el objetivo de la transferencia que es el de limpiar el extracto.

Obviamente no se puede pretender un cumplimiento cabal de la segunda condición puesto que dependerá en gran medida de la muestra de agua que se analice. No obstante, es posible minimizar el riesgo de transferir compuestos interferentes si se utiliza un volumen lo más pequeño posible de un disolvente lo más débil posible (bajo contenido de disolvente orgánico) para la transferencia. Esto a su vez servirá para cumplir con la primera condición.

Para poder establecer las condiciones más adecuadas para la transferencia, se realizaron pruebas con diversos volúmenes y composiciones del disolvente de transferencia, tratando de conservar las condiciones lo más cercano posible a las que se utilizarán posteriormente para el análisis de las muestras.

Es decir que se empleó el montaje mostrado en la figura 2.1 y se trabajó con la mezcla de los seis herbicidas seleccionados, siguiendo todos los pasos del procedimiento general de preconcentración y limpieza de las muestras, descrito en la sección experimental (Sección 2.4.2), con algunas modificaciones como se detalla a continuación.

Primero se procedió a optimizar la separación cromatográfica inyectando la mezcla estándar de los ácidos clorofenoxi sobre la precolumna AX acoplada en línea con la columna analítica. Los detalles y resultados de estos experimentos se describen en la sección 3.3. Una vez determinadas las condiciones de separación se realizaron los ensayos aplicando el procedimiento de la siguiente manera:

- * La precolumna RP se equilibró como se indica en el método y se cargó con 100 ml de una disolución de los analitos a una concentración de 0.5 mg/L.
Como se observa, el volumen cargado fue bastante menor que el volumen de fuga determinado para el 2,4-D (solutos menos retenidos) en estas condiciones (ver tabla 3.2) de tal manera que no hubiera ningún riesgo de pérdida de los analitos en este paso.

- * Después de lavar la precolumna RP, la precolumna AX se equilibró con 25 mL del disolvente de transferencia a probar.
- * Los solutos concentrados en la precolumna RP se transfirieron a la precolumna AX con diferentes volúmenes del disolvente de transferencia.
- * El resto del procedimiento se continuó como está marcado en la sección 2.4.2.

Al final se compararon las unidades de área de los picos del cromatograma de la muestra tratada, con las unidades de área del estándar inyectado para determinar el porcentaje de recuperación de cada soluto para cada disolvente y volumen de transferencia ensayado.

Los resultados de estos experimentos se muestran en la tabla 3.5

TABLA 3.5. Estudio de la recuperación de los ácidos clorofenoxi probando diferentes volúmenes y composiciones del disolvente de transferencia.

Volumen de transferencia (mL)	Modificador Orgánico											
	Metanol						Acetonitrilo					
	Relación Orgánico : NaOH (v/v)											
	5:95		10:90		15:85		5:95		10:90		15:85	
	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10	5	10
% DE RECUPERACION												
2,4-D	53	90	92	85	86	82	104	102	100	75	80	63
MCPA	50	66	85	79	90	94	96	100	101	82	81	63
MECOPROP	48	64	72	69	80	74	97	105	109	102	95	87
2,4,5-T	47	50	60	63	75	80	94	102	107	90	90	85
SILVEX	46	51	55	58	63	66	100	106	104	102	96	99
2,4-DB	40	50	54	55	59	61	103	108	105	106	103	109

Volumen preconcentrado 100 mL. Concentración de cada ácido clorofenoxi 5µg/L.

Volumen de lavado con agua grado HPLC 0.5mL.

De los resultados obtenidos se puede observar que efectivamente el uso de pequeños volúmenes de un modificador orgánico en combinación con la solución acuosa a pH básico ayuda a incrementar la recuperación de los herbicidas en estudio. Siendo las mejores alternativas las correspondientes al uso de un 5% y 10% de acetonitrilo, la diferencia de estos dos ensayos se encuentra en el volumen empleado para la transferencia. En el primer caso se utilizó un volumen de 10 mL y en el segundo se usó un volumen de 5 mL. En ambos ensayos se logró recuperar casi el 100% de los solutos.

Sin embargo, se decidió emplear el porcentaje del 10% de acetonitrilo más un 90% de la solución de NaOH pH 10, haciendo pasar únicamente 5 mL de esta mezcla a la precolumna RP para transferir los solutos a la precolumna de intercambio iónico AX.

3.3 Condiciones Cromatográficas de separación.

En este punto se buscó establecer las condiciones de separación de los seis ácidos clorofenoxi seleccionados. Se estudiaron los siguientes parámetros: fase móvil, tipo de elución y ensanchamiento de las bandas o picos debido al acoplamiento de la precolumna de intercambio aniónico con la columna analítica.

En cuanto a la fase móvil, ésta deberá tener las características adecuadas de fuerza iónica y pH para poder desorber los analitos retenidos en la precolumna de intercambio aniónico, así como lograr una resolución aceptable de los ácidos clorofenoxi.

Otros punto a cubrir es que la elución de los solutos de interés se efectuó en un tiempo tal, que permita la elución previa de los interferentes que no se han podido eliminar durante el proceso de limpieza.

En efecto, cuando se analizan aguas naturales, y en particular aguas de río o lagos, se observa generalmente la elución de un gran pico al principio del cromatograma, el cual desciende muy lentamente interfiriendo en la detección e integración de los picos de los solutos que eluyen en tiempos de retención cortos. Este pico, llamado "pico de matriz", es debido probablemente a la gran carga de materia orgánica, clasificada genéricamente como ácidos fúlvicos y húmicos, que contienen este tipo de aguas.

En relación al estudio bibliográfico realizado previamente podemos concluir, que aún utilizando métodos sofisticados de limpieza de muestras, es prácticamente imposible eliminar completamente el pico de matriz en las aguas superficiales.

Por todo lo anterior se decidió diseñar un gradiente de elución que permitiera que los solutos comenzaran a eluir a partir de los diez minutos de haber iniciado el análisis cromatográfico.

Con un gradiente cóncavo y las fases móviles descritas en la parte experimental se logró el objetivo deseado.

Durante los experimentos realizados para encontrar la forma óptima del gradiente y la composición adecuada de las fases móviles, se observó que el 2,4,5-T y el Mecoprop eran difíciles de separar. En medios muy ácidos, a pH 2, no se logró obtener una resolución idónea. Para mejorar la separación se hicieron varios ensayos variando el pH de las fases

móviles entre 2 y 4 ya que, por encontrarse los pKa de los ácidos clorofenoxi en esta región, este parámetro debería tener una gran influencia sobre la separación.

Finalmente, se consiguió una separación adecuada de todos los solutos a pH 3.8, que se fijó con una solución amortiguadora de ácido fórmico-formiato de sodio (pKa=3.77) a una concentración de 0.01M en ambas fases móviles Fase "A" o débil (con menor porcentaje de modificador orgánico) y Fase "B" o fuerte (mayor porcentaje de modificador orgánico).

En los primeros ensayos para establecer las condiciones de separación se observó una influencia desfavorable al acoplar en línea la precolumna de intercambio aniónico a la columna analítica de fase reversa C₁₈.

Al observar las figuras 3.1 y 3.2 podemos notar el efecto del acoplamiento en los valores del tiempo de retención de los solutos así como en la forma de los picos. Esto nos indica que la precolumna empacada con el intercambiador aniónico también participa en la retención de los solutos mediante un mecanismo diferente al que le corresponde a la columna analítica empacada con la fase C₁₈.

Esto nos conduce a la siguiente suposición: al pH de la fase móvil (3.8) se produce una mezcla de mecanismos de retención en el intercambiador de aniones debidos, por una parte, a las interacciones electrostáticas con los grupos activos de esta fase y por otra, a los efectos hidrofóbicos de la matriz de poliestireno-divinilbenceno del soporte.

Esto se comprobó al adicionar ácido perclórico (0.01M) a la fase móvil, pero manteniendo el valor de pH a 3.8, el resultado que se observó fue una notable mejoría en la forma de los picos así como una ligera disminución en los tiempos de retención de los ácidos clorofenoxi. Esto se explica por la gran afinidad de los iones perclorato por los sitios activos de las resinas intercambiadoras de aniones.

En la tabla 3.6 se dan los resultados de los parámetros cromatográficos evaluados para cada soluto, usando las condiciones de separación mencionadas anteriormente.

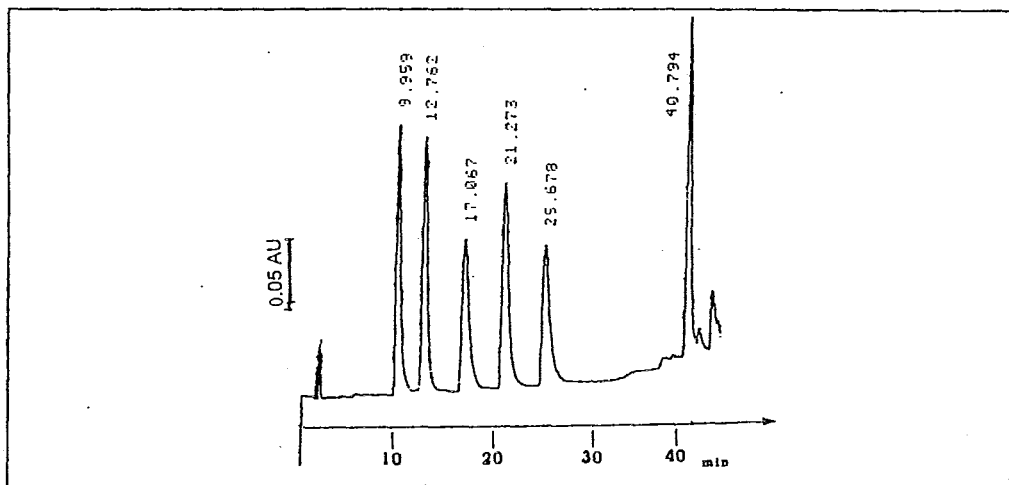


Figura 3.1 Cromatograma que muestra la elución de los seis ácidos clorofenoxi en ausencia de la precolumna de intercambio iónico. Identificación de los picos (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) MECOPROP; (4) 2,4,5-T; (5) SILVEX; (6) 2,4-DB.

Fase móvil (A) ACN : H₂O 20:80 (v/v); (B) ACN : H₂O 80:20 (v/v). La fase acuosa en este caso contiene solamente HCOOH 0.01M ajustando el pH con NaOH a un valor de 3.8. Relación de flujo 1.0mL/min. Elución por gradiente. Detección 230 nm. Temperatura ambiente.

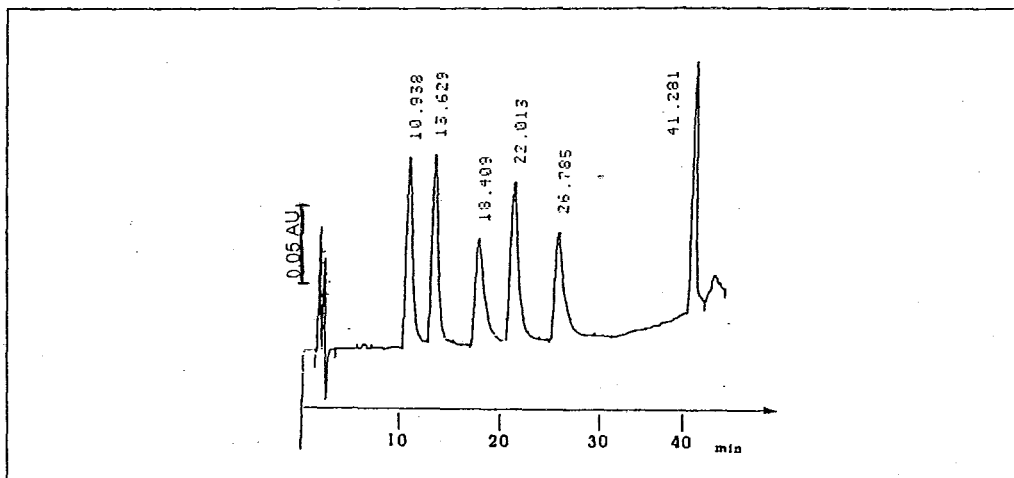


Figura 3.2 Cromatograma que muestra la elución de los seis ácidos clorofenoxi en presencia de la precolumna de intercambio iónico. Identificación de los picos (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) MECOPROP; (4) 2,4,5-T; (5) SILVEX; (6) 2,4-DB

Fase móvil (A) ACN : H₂O 20:80 (v/v); (B) ACN : H₂O 80:20 (v/v). La fase acuosa en este caso contiene solamente HCOOH 0.01M ajustando el pH con NaOH a un valor de 3.8. Relación de flujo 1.0mL/min. Elución por gradiente. Detección 230 nm. Temperatura ambiente.

TABLA 3.6. Resultados de los parámetros cromatográficos evaluados experimentalmente.

SOLUTO	PARAMETROS				
	t_r (min)	k'	$\alpha_{B/A}$	R_s	Factor de Asimetría
2,4-D	10.75	5.55	-	-	3.0
MCPA	13.38	7.14	1.29	2.12	4.3
MECOPROP	18.30	10.14	1.42	3.05	2.8
2,4,5-T	21.74	12.23	1.21	1.87	3.6
SILVEX	26.75	15.28	1.25	2.63	3.3
2,4-DB	40.51	23.66	1.55	8.71	1.0

Condiciones cromatográficas: Precolumna de 20 x 2 mm d.i., empacada con resina de intercambio aniónico PRP-X 100 (10 μ m d.p.) acoplada en línea a la columna analítica de 150 x 4.6 mm d.i., empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2 (5 μ m d.p.). Fase móvil (A) acetonitrilo : agua 20:80 (v/v) (B) acetonitrilo : agua 80:20 (v/v). La fase acuosa contiene HClO₄ 0.01M + HCOOH 0.01M ajustando el pH con NaOH a un valor de 3.8. Elución por gradiente. Relación de flujo 1.0mL/min. Detección a 230 nm. Temperatura ambiente. La concentración inyectada de cada soluto fue de 5 mg/L. t_r = tiempo de retención, k' = factor de capacidad, α = factor de selectividad y R_s = resolución. FA = 1 \rightarrow pico simétrico; FA > 1 pico coaleado; FA < 1 pico cabeceado.

Se puede observar que efectivamente se logra la completa separación de los solutos al emplear la elución por gradiente, así como que los solutos empiecen a eluir después de diez minutos de haber iniciado el análisis. El cromatograma de la separación de la mezcla de estos seis herbicidas se muestra en la Figura 3.2. La desviación estándar relativa en cuanto al tiempo de retención de los solutos fue entre 0.7% y 2.2%. La mayor variación se presentó con los solutos Mecoprop y 2,4,5-T.

Respecto al efecto que el volumen de la precolumna, V_p , puede ejercer sobre el ensanchamiento de la banda, sabemos que éste debe cumplir ciertas condiciones que dependen del volumen de la columna analítica V_c , del número de platos teóricos de ésta N , y del factor de capacidad del soluto A que se analiza k'_A . Esta dependencia se expresa por la siguiente relación matemática:

$$\frac{V_p}{V_c} \leq \frac{1+k'_A}{2\sqrt{N}}$$

Esta relación fue propuesta por Goewie et.al⁽⁷⁾, Nondek y Chvalovsky⁽¹⁷⁾. La única condición que ellos indican para que esta relación sea válida, es que el número de platos de la columna analítica deberá ser lo suficientemente alto ($N > 1000$).

Los resultados de la determinación de la eficiencia de la columna analítica se presentan en la tabla 3.7.

TABLA 3.7. Determinación experimental de la eficiencia de la columna analítica Spherisorb ODS-2 empleada en la separación de los ácidos clorofenoxi.

PARAMETROS	VALORES
Tiempo de retención (min)	9.96
Factor de capacidad (k')	4.33
Número de Platos Teóricos por columna	2217
Número de Platos Teóricos por metro	14777
Altura Equivalente a un Plato Teórico (H) (μ)	67.7

El soluto empleado en la determinación fue 2,4-D a una concentración de $10\mu\text{g/L}$. Condiciones cromatográficas: columna analítica de 150×4.6 mm d.i., empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2 ($5\mu\text{m}$ d.p.) Fase móvil (A) ACN : H_2O 20:80 (v/v); (B) ACN : H_2O 80:20 (v/v). La fase acuosa contiene HClO_4 0.01 M + HCOOH 0.01M ajustando el pH con NaOH a un valor de 3.8. Relación de flujo 1.0mL/min . Elución por gradiente. Detección 230 nm. Temperatura ambiente.

El volumen de la columna analítica fue de $2493 \mu\text{L}$, mientras que el volumen de la precolumna empacada con el intercambiador de aniones fue de $63 \mu\text{L}$. Esto nos da una relación de $V_p/V_c = 0.025$. Por otra parte, los valores correspondientes al término $(1+k'_A)/2 \sqrt{N}$, para los seis ácidos clorofenoxi estudiados se dan en la tabla 3.8.

TABLA 3.8 Valores del término $(1+k'_A)/2 \sqrt{N}$, para los seis ácidos clorofenoxi en estudio.

COMPUESTO	k'_A	$(1+k'_A)/2 \sqrt{N}$
2,4-D	4.37	0.057
MCPA	6.87	0.073
MECOPROP	8.13	0.097
2,4,5-T	10.39	0.121
SILVEX	12.75	0.146
2,4-DB	20.85	0.232

Las condiciones cromatográficas para calcular este término son las mismas que se indican en la tabla 3.7.

De acuerdo a los resultados anteriores se puede establecer que el acoplamiento en línea de una precolumna con las dimensiones de la que se utilizó no deberá provocar ningún efecto significativo en el ensanchamiento de banda, siempre y cuando se utilice la fase móvil propuesta y el programa de elución por gradiente diseñado en este trabajo.

Usando estas condiciones se determinó experimentalmente el límite de detección para muestras inyectadas de los herbicidas, siendo éste alrededor de 50 ng, con excepción del 2,4-DB. Debido a que este compuesto eluye al final del gradiente, en la región de mayor ruido en la línea base, se tienen dificultades para su detección a bajas concentraciones, por lo que su límite de detección es de 130 ng. El límite de detección se consideró a una altura del pico igual a 3 veces el tamaño de la señal de ruido, a una sensibilidad de 0.01 AUFS.

3.4 Estudio de la recuperación de los ácidos clorofenoxi.

La determinación de la recuperación de cada soluto se realizó comparando el área de la señal obtenida al aplicar el método diseñado a muestras de agua grado HPLC fortificadas con los ácidos clorofenoxi, con respecto al área obtenida por la inyección directa de una cantidad igual del ácido clorofenoxi correspondiente.

En este punto se afinaron algunos detalles con el fin de mejorar la recuperación de los herbicidas.

Como ya se indicó en la sección 3.2.1 es posible percolar más de 200 mL de muestra conteniendo el herbicida 2,4-D en presencia de un 5% de metanol sobre la precolumna empacada con la fase reversa RP. Sin embargo al aplicar este mismo procedimiento sobre una muestra de agua grado HPLC fortificada con la mezcla de los seis herbicidas, el porcentaje de recuperación no fue el esperado. Por lo que se decidió estudiar cómo afecta el percolar diferentes volúmenes de muestra sobre el porcentaje de recuperación, manteniendo la concentración de cada herbicida constante.

Los resultados se dan en la tabla 3.9.

TABLA 3.9. Efecto del volumen de muestra percolado sobre la recuperación de los seis ácidos clorofenoxi seleccionados.

COMPUESTO	Volumen de muestra percolado (mL)		
	75	100	150
% RECUPERACION			
2,4-D	100.4	90.7	82.5
MCPA	98.7	98.2	97.2
MECOPROP	104.4	103.4	100.1
2,4,5-T	96.8	96.5	95.1
SILVEX	99.8	99.3	98.4
2,4-DB	105.6	101.2	100.2

La concentración de los ácidos clorofenoxi fue de 10µg/L.

Las condiciones cromatográficas son la mismas que se señalan en la tabla 3.6.

De acuerdo a estos resultados se pudo observar que para el caso del compuesto 2,4-D es conveniente cargar 75 mL de muestra, sin que esto tenga algún efecto adverso sobre los demás herbicidas.

Otro aspecto que se optimizó fue el volumen de lavado de las precolumnas con agua grado HPLC, antes de introducir el siguiente disolvente de desorción.

En la primera etapa de preconcentración los herbicidas quedarán concentrados en la precolumna RP, en este caso se utilizó un volumen similar a su volumen muerto, con el fin de asegurar que todos los interferentes de naturaleza inorgánica fueran eluidos y evitar su posterior retención en el intercambiador aniónico. En el caso del intercambiador de aniones, el lavado fue para eliminar el exceso de NaOH y evitar un cambio brusco en cuanto a las condiciones de acidez y basicidad, por que los herbicidas en esta segunda etapa deberán ser desorbidos al introducir la fase móvil con un pH ácido. El volumen que se consideró como óptimo para ambos casos fue de 0.2 mL.

En base a todos los estudios antes realizados quedó establecida la metodología para la preconcentración, limpieza y análisis por HPLC en línea de muestras de agua fortificadas con los ácidos clorofenoxi. La metodología completa está en la sección 2.4.2.

3.5 Estudio de los efectos de algunos factores en la preparación de las muestras fortificadas.

Como ya se ha mencionado los ácidos clorofenoxi en su forma molecular son muy hidrofóbicos, por lo que pueden quedar fácilmente adsorbidos a las paredes de los recipientes donde las muestras son almacenadas o en la superficie de los filtros, así como en los recipientes que puedan tener contacto con las disoluciones acuosas de estos compuestos.

Por lo anterior se deben tomar precauciones durante la preparación de la muestra para evitar alguna pérdida de los analitos.

La primera propuesta es que la muestra debe ser filtrada antes de ajustar el pH, de esta forma los solutos se encontrarán en su forma ionizada y se adsorberán menos sobre la membrana de filtración. Una vez hecho ésto, la botella de muestreo, así como la membrana de filtración deben ser lavadas con un disolvente orgánico. En nuestro trabajo se utilizó metanol, todo ésto con la finalidad de recuperar los solutos que pudieron quedar adsorbidos.

Una vez filtrada la muestra, ésta fue acidificada en el mismo matraz donde se recibió el filtrado. El usar el mismo matraz con la muestra filtrada y preparada como reservorio de la bomba para el proceso de preconcentración ofrece la ventaja de disminuir las posibilidades de pérdida debido a que los solutos quedan adsorbidos en los recipientes.

La muestra al ser preparada en esta forma contiene un 4.6 % v/v de metanol; el volumen total de la muestra es de 271.5 mL y el pH de la solución es de 1.1, aproximadamente.

En la tabla 3.10 se muestra el efecto en la recuperación de los solutos cuando se acidifica la muestra antes de su filtración, en relación a cuando se filtra primero y después se ajusta el pH.

TABLA 3.10. Efecto del ajuste del pH antes y después del proceso de filtración .

COMPUESTO	% DE RECUPERACION	
	Ajuste del pH antes de filtrar	Ajuste del pH después de filtrar
2,4-D	68.4	91.8
MCPA	72.5	96.8
MECOPROP	78.9	100.2
2,4,5-T	75.6	98.9
SILVEX	75.9	99.2
2,4-DB	73.9	103.6

La concentración de los ácidos clorofenoxi es de 10µg/L.

Se percolaron 100 mL de muestra fortificada.

Las condiciones cromatográficas son las mismas que se señalaron en la tabla 3.6.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede apreciar el efecto favorable de filtrar los solutos en su forma ionizada, evitando así que éstos queden adsorbidos a los materiales de filtración y en la misma membrana, aunque por seguridad se enjuaga con un pequeño volumen de metanol.

3.6 Validación.

La validación es una evaluación sistemática de un método analítico para determinar su consistencia, fiabilidad y reproducibilidad. De ahí que cualquier método que sea nuevo, o bien, que se haya modificado deberá ser validado para comprobar su efectividad.

En este trabajo los parámetros estadísticos que se evalúan son: exactitud, precisión (repetibilidad), linealidad y límite de detección.

3.6.1 Linealidad .

La linealidad es una medida del grado en que la curva de respuesta en función de la concentración se aproxima a una línea recta.

Experimentalmente el ensayo consistió en analizar muestras de agua grado HPLC fortificadas con cada uno de los seis ácidos clorofenoxi seleccionados empleando un intervalo de concentraciones de 1 a 84 $\mu\text{g/L}$.

En este caso la variable dependiente es la señal o respuesta y la variable independiente es la concentración del analito analizado.

En las tablas 3.11 a 3.16 se muestran los valores empleados para trazar las gráficas de calibración y en las figuras 3.3 a 3.8 se ilustra el comportamiento de la respuesta del detector en función de la concentración de cada ácido clorofenoxi en la muestra acuosa.

La representación física de las curvas de calibración ayuda a evidenciar si efectivamente los valores tienden a alinearse a lo largo de una línea recta mientras que el grado de asociación y la línea que mejor se ajusta a todos los puntos se determinan a través de los parámetros estadísticos.

En la tabla 3.17 se dan los datos calculados de las rectas de regresión de y sobre x para cada ácido clorofenoxi probado, así como el coeficiente de correlación momento producto r . Este coeficiente nos permite estimar el tipo de relación que existe de y sobre x . De ahí que si $r = +1$, se tendrá una correlación positiva perfecta, ya que todos los puntos estarán exactamente en una línea recta de pendiente positiva, en el caso que $r = -1$ indicará que su pendiente es negativa. En la práctica el valor de r es muy cercano a uno, por lo que es muy importante realizar el cálculo con un número adecuado de cifras significativas. En este trabajo se puede observar que los valores de los coeficientes de correlación obtenidos para cada ácido clorofenoxicarboxílico son bastante altos ($r = 0.9999$).

Tabla 3.11. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-D en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	AREA (UNIDADES)
2.0	54856
5.1	142753
10.1	285618
20.3	570954
40.5	1134081
50.6	1371545
77.4	2140629

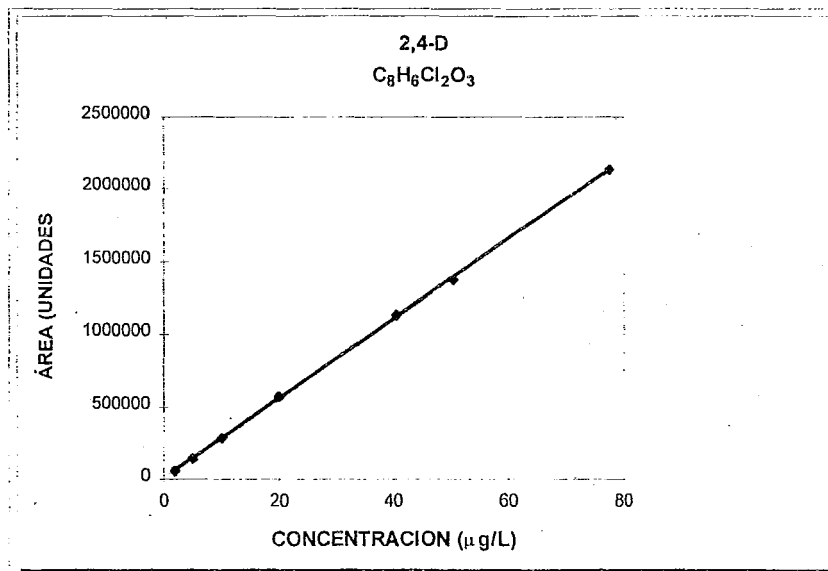


Figura 3.3. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-D en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.12. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MCPA en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	AREA (UNIDADES)
1.0	28606
1.5	42048
2.0	59517
5.1	148809
10.1	297734
20.2	593999
50.6	1429728
77.4	2186809

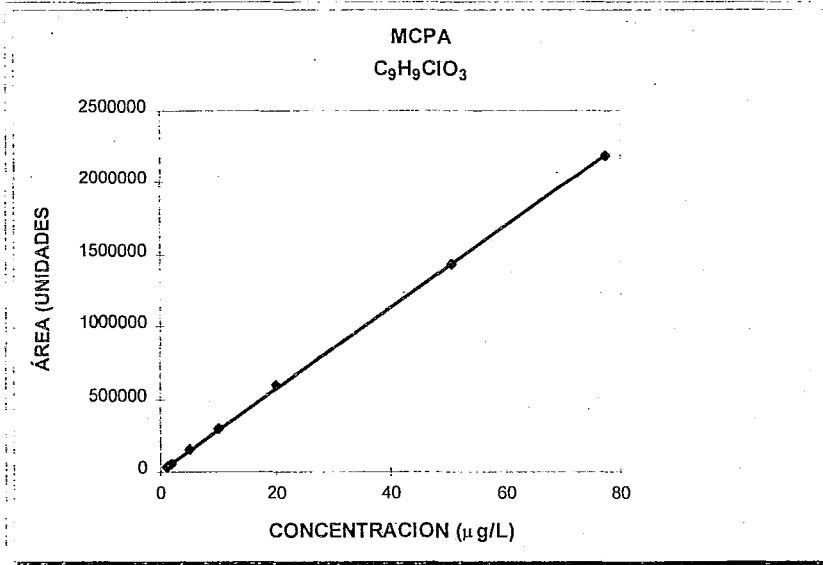


Figura 3.4. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MCPA en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.13. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MECOPROP en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	AREA (UNIDADES)
2.1	54458
5.3	136132
10.5	272163
21.1	544583
42.1	1026457
52.6	1307942
80.5	2000440
84.2	2092409

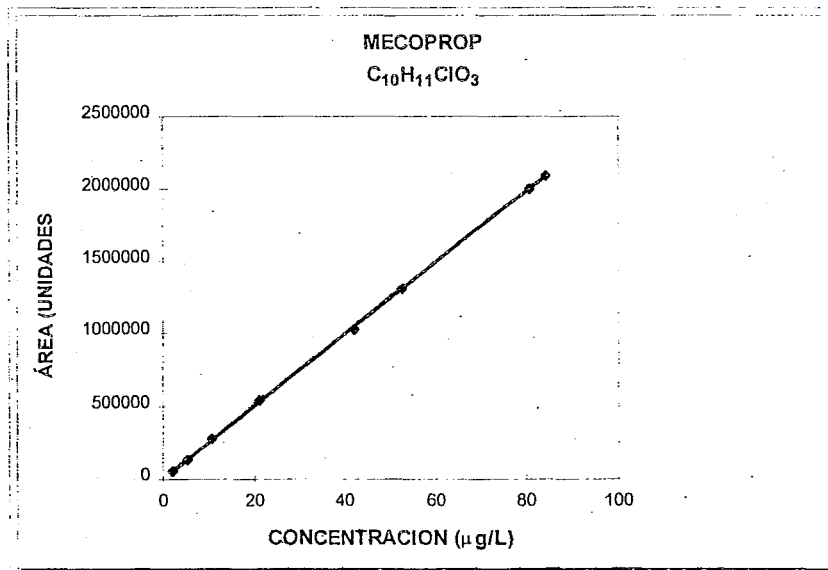


Figura 3.5. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MECOPROP en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.14. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4,5-T en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA (µg/L)	AREA (UNIDADES)
1.0	32070
2.1	66173
2.6	81711
5.3	165384
10.6	330705
21.3	661722
53.1	1588982
81.2	2430295

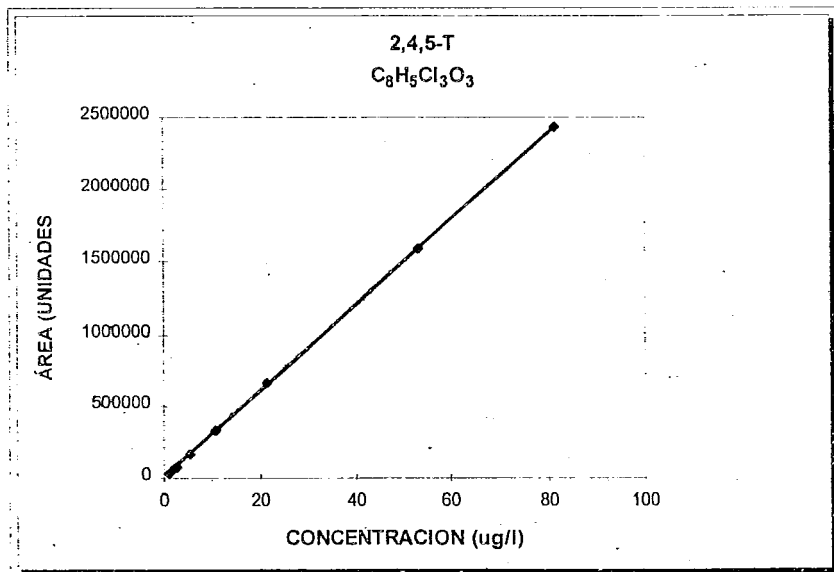


Figura 3.6. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4,5-T en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.15. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del SILVEX en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	AREA (UNIDADES)
2.0	56277
2.5	69534
5.1	140709
10.1	281528
20.3	562779
50.6	1351906
77.4	2067777
81.0	2162836

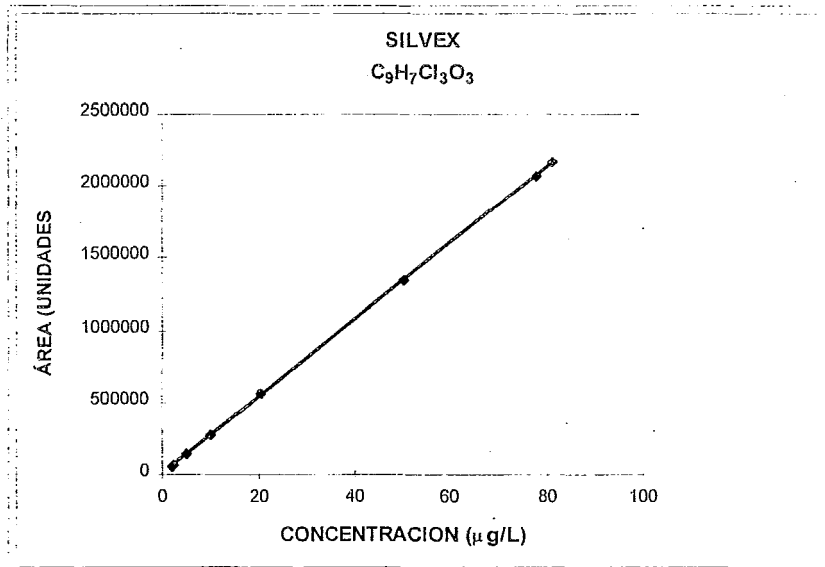


Figura 3.7. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del SILVEX en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.16. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-DB en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	AREA (UNIDADES)
2.0	51279
2.5	63338
5.0	128172
9.9	256396
19.9	512794
49.6	1231461
75.9	1883412
79.4	1970239

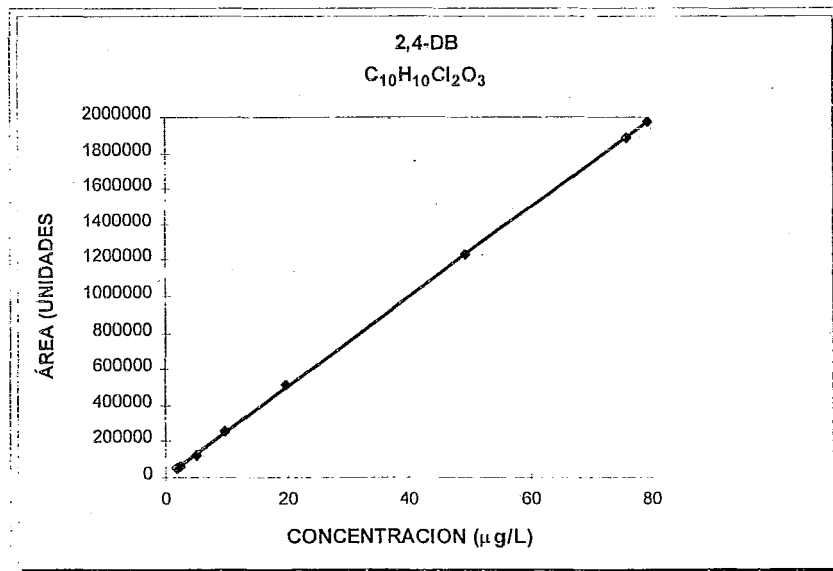


Figura 3.8. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-DB en la muestra de agua fortificada.

TABLA 3.17. Variación de la respuesta del detector en función de la concentración de cada ácido clorofenoxi estudiado.

COMPUESTO	INTERVALO DE CONCENTRACION	COEFICIENTE (a)	COEFICIENTE (b)	r ²	r
2,4-D	2.0 - 77.0	7159	27024	0.99989	0.99994
MCPA	1.0 - 77.0	6457	28188	0.99989	0.99995
MECOPROP	1.5 - 84.0	7452	24778	0.99993	0.99996
2,4,5-T	1.0 - 81.0	8108	29849	0.99990	0.99995
SILVEX	2.0 - 81.0	8426	26606	0.99994	0.99997
2,4-DB	2.0 - 79.0	7676	24719	0.99994	0.99997

Ecuación de regresión $y = bx + a$; a = ordenada al origen; b = pendiente; r = coeficiente de correlación (Ver apéndice "A" para las fórmulas empleadas en esta sección)

Una vez calculadas las rectas de regresión de y sobre x se procedió a graficar los residuos de y . Los valores residuales para cada herbicida se dan en las tablas 3.18 a 3.23 y su representación gráfica se muestra en las figuras 3.9 a 3.14.

En este caso se puede observar que el efecto aleatorio sobre los valores de y es de mayor importancia que la función que describe el comportamiento de una línea recta.

En base a todas estas evidencias podemos decir que los datos obtenidos en la calibración del método tienden a comportarse como una función de una línea recta.

Tabla 3.18. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-D en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	RESIDUOS
2.0	-4396.80
5.1	-105.67
10.1	-2284.68
20.3	10158.57
40.5	15994.87
50.6	-25319.08
77.4	5952.79

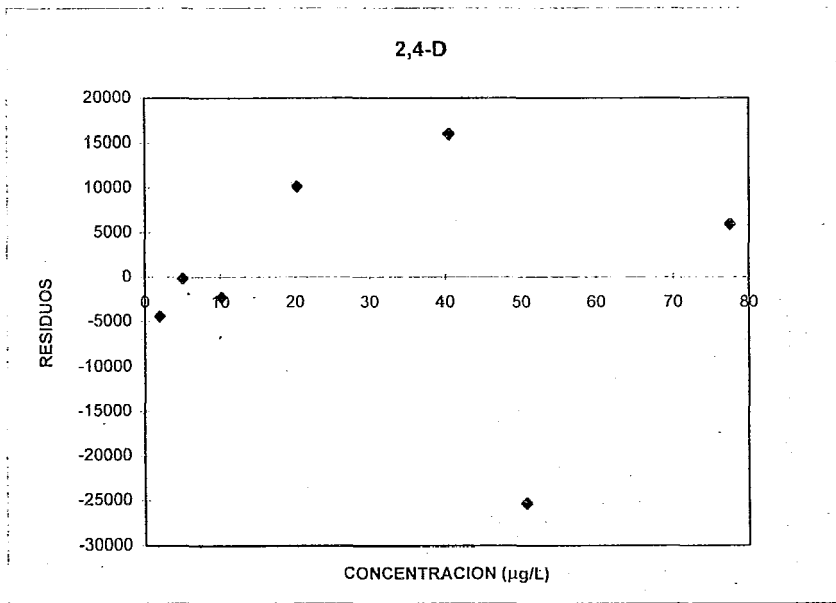


Figura 3.9. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-D en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.19. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MCPA en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	RESIDUOS
1.0	-6405.27
1.5	-6380.79
2.0	-4020.60
5.1	363.96
10.1	-5732.09
20.2	17861.33
50.6	-3890.81
77.4	-2531.99

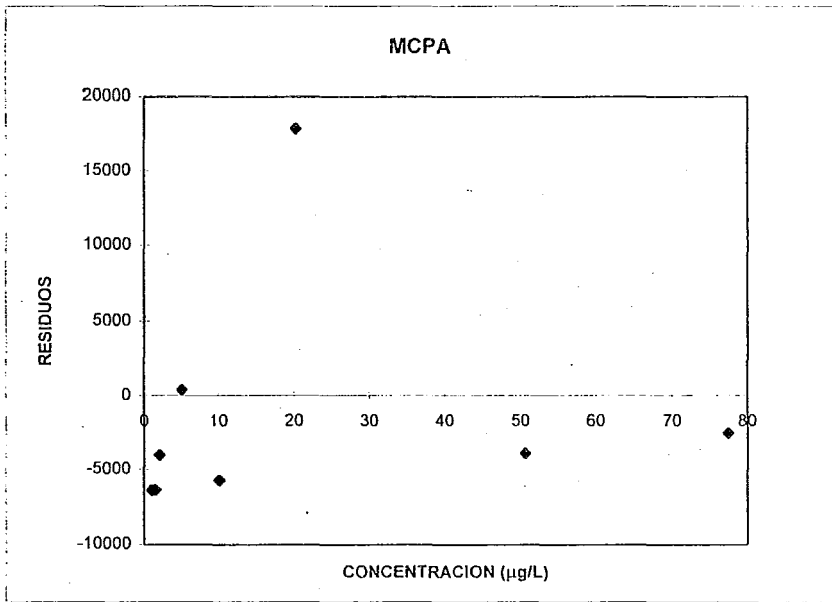


Figura 3.9. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MCPA en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.20. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MECOPROP en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA (µg/L)	RESIDUOS
2.1	-5236.22
5.3	1972.60
10.5	395.63
21.1	6099.23
42.1	-2482.59
52.6	-1633.32
80.5	312.86
84.2	571.82

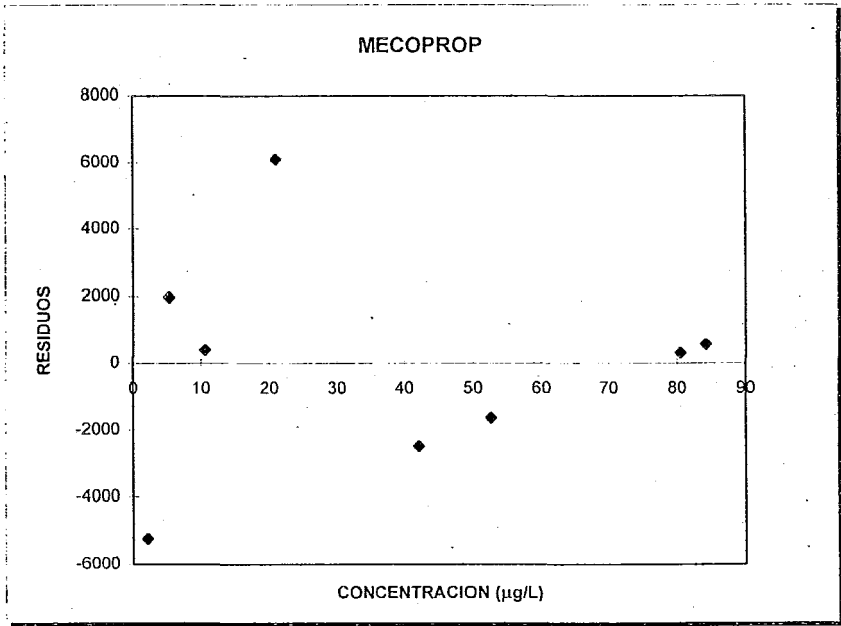


Figura 3.11. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del MECOPROP en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.21. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4,5-T en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA ($\mu\text{g/L}$)	RESIDUOS
1.0	-5889.74
2.1	-3540.02
2.6	-2907.83
5.3	500.77
10.6	-2765.38
21.3	20718.87
53.1	-3723.25
81.2	-2393.42

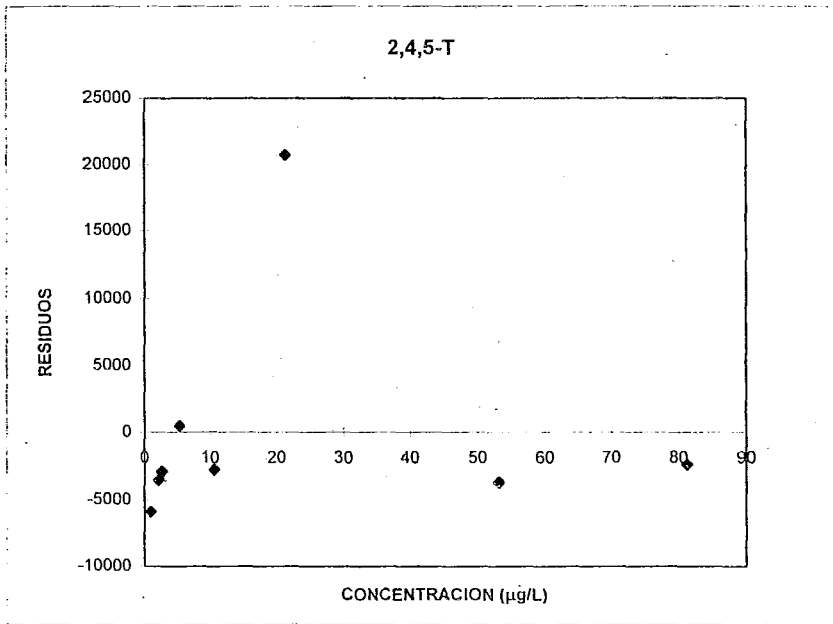


Figura 3.12. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4,5-T en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.22. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del SILVEX en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA (µg/L)	RESIDUOS
2.0	-6025.78
2.5	-5459.81
5.1	-2422.58
10.1	3584.19
20.3	15583.22
50.6	-3577.80
77.4	-1011.68
81.0	-669.77

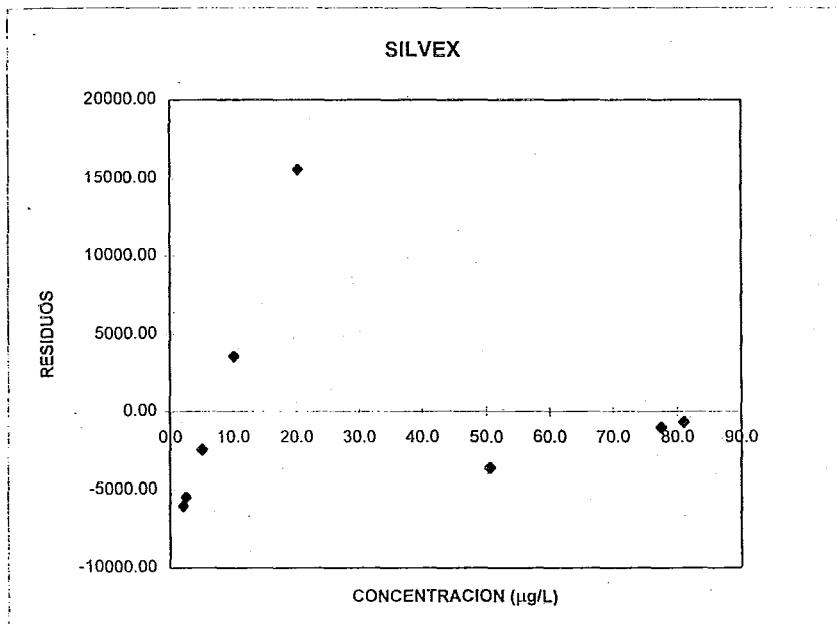


Figura 3.13. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del SILVEX en la muestra de agua fortificada.

Tabla 3.23. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-DB en la muestra de agua fortificada.

CONCENTRACION DE LA MUESTRA (µg/L)	RESIDUOS
2.0	-5488.350
2.5	-4973.070
5.1	-2208.207
10.1	3261.776
20.3	14201.180
50.6	-3260.419
77.4	-921.896
79.4	-611.017

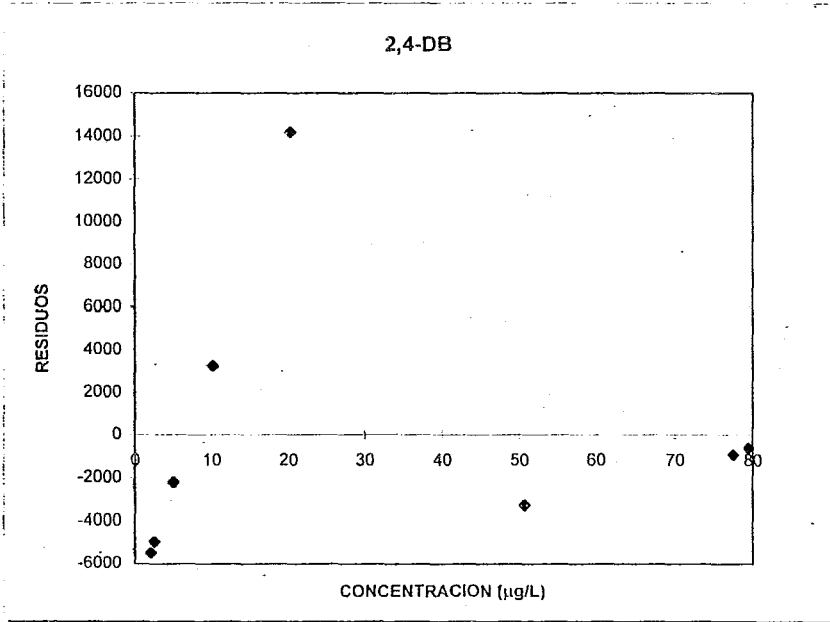


Figura 3.14. Determinación de los residuos de y de la respuesta del detector UV en función de la concentración del 2,4-DB en la muestra de agua fortificada.

En la tabla 3.24 se dan los valores calculados que permiten comprobar que el valor del coeficiente a de la recta de regresión es estadísticamente igual a cero. Es decir que las rectas pasan por el origen del sistema de coordenadas y se puede descartar la presencia de un error sistemático continuo en el método.

TABLA 3.24 Comprobación de la hipótesis nula sobre el coeficiente a . A un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, en el estudio de la linealidad del método.

Compuesto	n	t_{cal}	$t_{\alpha/2}$ (n-2 g.l.)	¿Rechazar H_0 ?
2,4-D	7	1.559	2.571	No
MCPA	8	1.612	2.447	No
MECOPROP	8	1.958	2.447	No
2,4,5-T	8	1.906	2.447	No
SILVEX	8	2.244	2.447	No
2,4-DB	8	2.243	2.447	No

n = Número de determinaciones.

t_{cal} = valor calculado de la "t de Student"

$t_{\alpha/2}(n-2 \text{ g.l.})$ = valor teórico del "t de Student" para una región bilateral ó en dos sentidos, con n-2 grados de libertad

La hipótesis nula (H_0) se rechaza si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$

También se calculó el intervalo de confianza para la ordenada al origen (a), al mismo nivel de significancia del 95%. En la tabla 3.25 se presentan los intervalos de confianza para dicho coeficiente a correspondiente a cada una de las rectas de regresión de los ácidos clorofenoxi estudiados.

TABLA 3.25. Intervalo de confianza de los coeficientes a , de las rectas de regresión para los seis ácidos clorofenoxi probados a un nivel de confianza del 95%.

COMPUESTO	INTERVALO DE CONFIANZA (UNIDADES DE AREA)
2,4.D	-4644 < a < 18963
MCPA	-3342 < a < 16256
MECOPROP	-1859 < a < 16764
2,4,5-T	-2303 < a < 18519
SILVEX	-762 < a < 17614
2,4.DB	-696 < a < 16048

La determinación de la pendiente y ordenada a el origen de la rectas de regresión para cada herbicida nos permitirá calcular las concentraciones de las muestras problema por interpolación y estimar el límite de detección del procedimiento analítico.

3.6.2 Exactitud del método.

Con los resultados de los experimentos anteriores se evaluó la exactitud del método. En este caso lo que se trata de probar el grado de concordancia entre un valor experimental y un valor de referencia que se considera como real. Siendo la variable dependiente la cantidad recuperada del analito en estudio y la variable independiente la cantidad adicionada.

Los resultados obtenidos se dan en las tablas 3.26 a 3.31, así como en las figuras 3.15 a 3.20.

La comprobación de que el método es exacto en el intervalo de concentraciones estudiado, se realizó a través de las pruebas de hipótesis nula para la ordenada al origen y para la pendiente.

Al observar las tablas antes mencionadas, se puede confirmar que los correspondientes valores de las pendientes o coeficientes b de las respectivas rectas de regresión obtenidas para cada uno de los ácidos clorofenoxi están muy próximos a la unidad. Por lo que estadísticamente b deberá ser igual a uno, y entonces podremos decir que la cantidad de soluto concentrado es igual a la cantidad de soluto recuperado al final del análisis. Esto implicará que la recuperación de dichos solutos es del 100% en todo el intervalo de concentración probado.

Tabla 3.26. Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada.

CANTIDAD CARGADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng
0.140	0.136
0.350	0.343
0.699	0.660
1.399	1.314
3.497	3.174
5.348	5.265

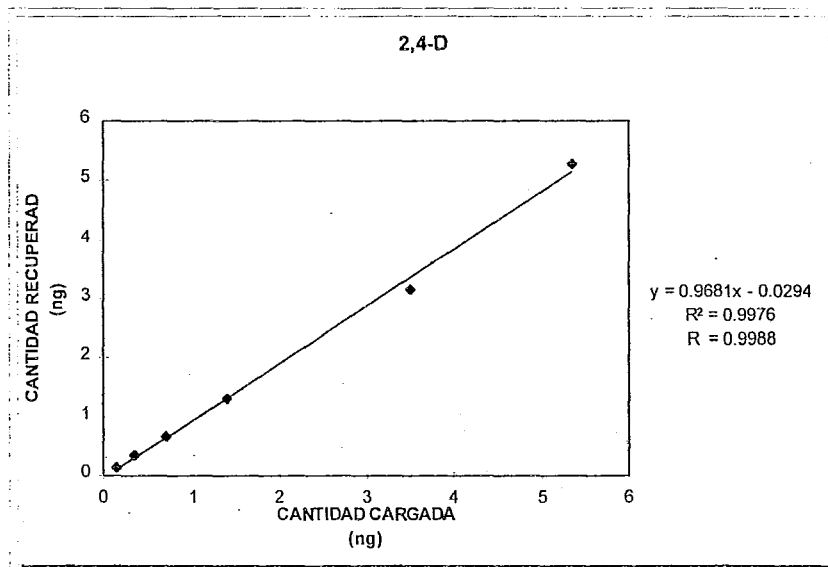


Figura 3.15. Variación de la cantidad de 2,4-D recuperada en función de la cantidad de 2,4-D concentrada.

Tabla 3.27. Variación de la cantidad de MCPA recuperada en función de la cantidad de MCPA concentrada.

CANTIDAD CARGADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng
0.070	0.057
0.103	0.100
0.140	0.147
0.350	0.300
0.699	0.608
1.399	1.307
3.497	3.092
5.348	5.231

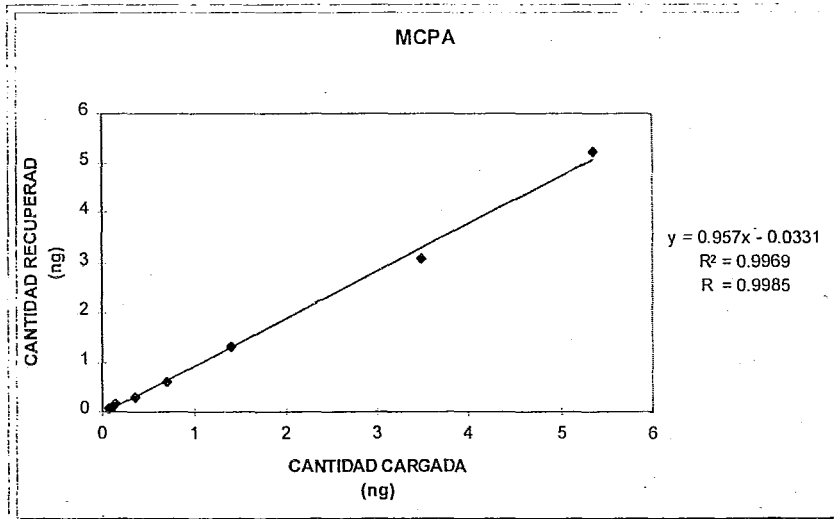


Figura 3.16. Variación de la cantidad de MCPA recuperada en función de la cantidad de MCPA concentrada.

Tabla 3.28. Variación de la cantidad de MECOPROP recuperada en función de la cantidad de MECOPROP concentrada.

CANTIDAD CARGADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng
0.107	0.085
0.145	0.155
0.363	0.343
0.727	0.601
1.454	1.395
3.634	3.345
5.558	5.441
5.814	5.794

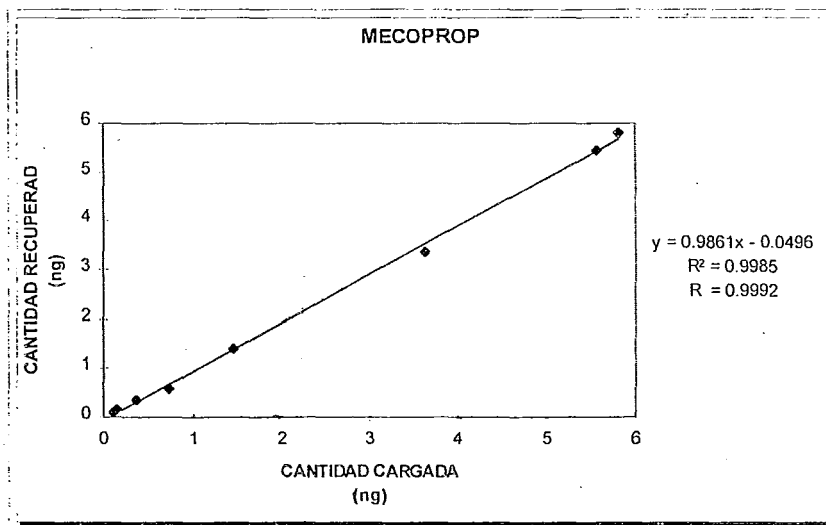


Figura 3.17. Variación de la cantidad de MECOPROP recuperada en función de la cantidad de MECOPROP concentrada.

Tabla 3.29. Variación de la cantidad de 2,4,5-T recuperada en función de la cantidad de 2,4,5-T concentrada.

CANTIDAD CARGADA (ng)	CANTIDAD RECUPERADA (ng)
0.073	0.170
0.147	0.258
0.181	0.179
0.367	0.358
0.734	0.647
1.467	1.331
3.668	3.392
5.610	5.573

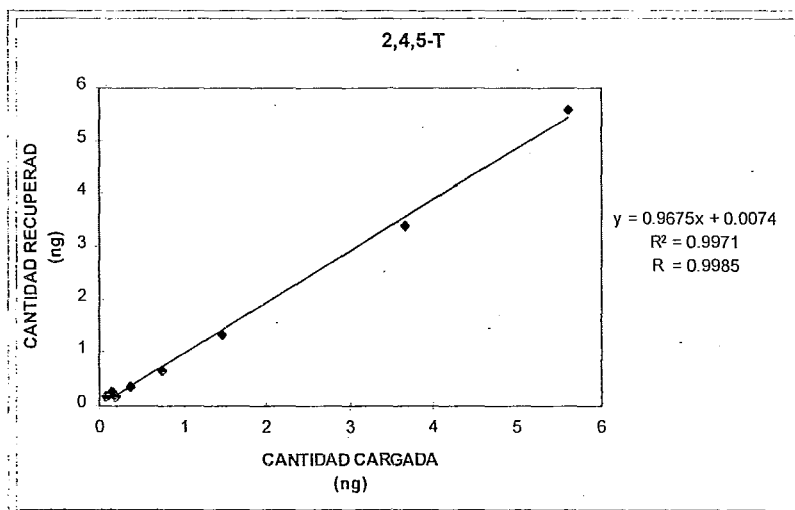


Figura 3.18. Variación de la cantidad de 2,4,5-T recuperada en función de la cantidad de 2,4,5-T concentrada.



QUIMICA
D.E.PG.

Tabla 3.30. Variación de la cantidad de SILVEX recuperada en función de la cantidad de SILVEX concentrada.

CANTIDAD CARGADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng
0.140	0.081
0.173	0.165
0.350	0.368
0.699	0.656
1.399	1.375
3.497	3.199
5.594	5.589

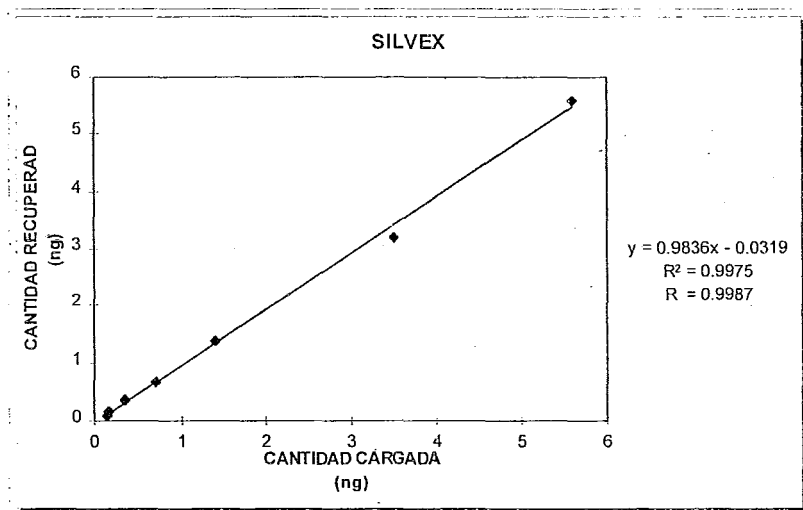


Figura 3.19. Variación de la cantidad de SILVEX recuperada en función de la cantidad de SILVEX concentrada.

Tabla 3.31. Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.

CANTIDAD CARGADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng
0.137	0.146
0.169	0.220
0.343	0.328
0.686	0.603
1.371	1.362
3.428	2.914
5.243	5.075
5.485	5.155

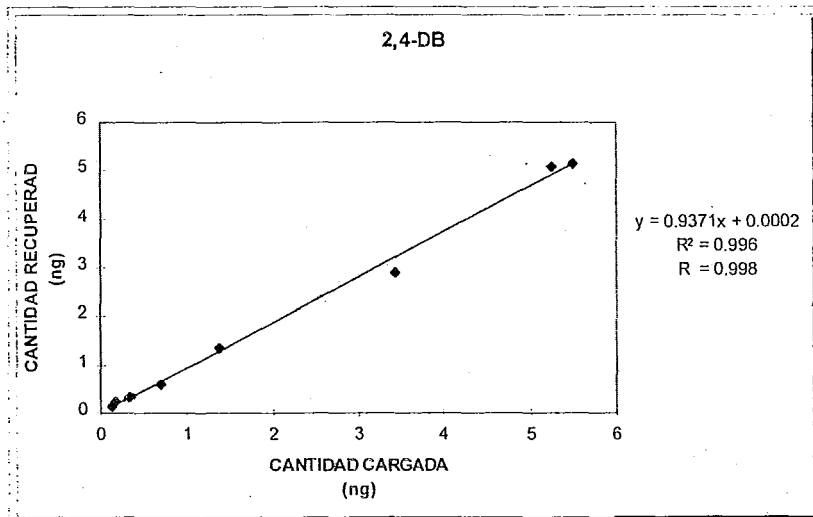


Figura 3.20. Variación de la cantidad de 2,4-DB recuperada en función de la cantidad de 2,4-DB concentrada.

La hipótesis nula a confirmar es que la recuperación obtenida corresponda al 100%, mientras que la hipótesis alterna consiste en que la recuperación es diferente del 100%.

La hipótesis nula ($H_0; b = 1$) se rechazará si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$. En 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.

En el Apéndice "A" se da un resumen de las pruebas estadísticas utilizadas en el presente trabajo.

La tabla 3.32 muestra los resultados de la verificación estadística de la hipótesis nula.

Tabla 3.32 Comprobación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión, es igual a uno. A un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, en el estudio de la exactitud del método a multiniveles.

COMPUESTO	PENDIENTE <i>b</i>	$t_{cal.}$	n	$t_{\alpha/2}(n-2)$ g.l.	¿Rechazar H_0 ?
2,4,-D	0.968	-1.341	6	2.776	No
MCPA	0.957	-1.983	8	2.447	No
MECOPROP	0.986	-0.903	8	2.447	No
2,4,5-T	0.968	-1.515	8	2.447	No
SILVEX	0.983	-0.748	7	2.571	No
2,4-DB	0.937	-2.606	8	2.447	Sí

n = Número de determinaciones

$t_{cal.}$ = valor calculado de la "t de Student"

$t_{\alpha/2}(n-2)$ g.l.) = valor teórico del "t de Student" para una región bilateral ó en dos sentidos, con n-2 grados de libertad

La hipótesis nula ($H_0; b=1$) se rechaza si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$

De acuerdo con ellos solo se rechaza el 2,4-DB, los demás casos se aceptan, indicándonos que el valor de las pendientes de las rectas de regresión de los ácidos clorofenoxi estudiados es de uno, por lo que estadísticamente se puede considerar una recuperación del 100%.

El intervalo de confianza para las pendientes de las rectas de regresión lineal, a un nivel de significancia del 95% se dan en la tabla 3.33.

TABLA 3.33. Intervalo de confianza de los coeficientes b de las rectas de regresión lineal en el estudio de exactitud del método a multiniveles.

COMPUESTO	INTERVALO DE CONFIANZA
2,4-D	$0.9020 < b < 1.0341$
MCPA	$0.9040 < b < 1.0100$
MECOPROP	$0.9485 < b < 1.0240$
2,4,5-T	$0.9150 < b < 1.0200$
SILVEX	$0.9225 < b < 1.0450$
2,4-DB	$0.8780 < b < 0.9962$

Además, se corroboró que la intersección de cada una de las rectas con el eje de las ordenadas fuera estadísticamente igual a cero. Los resultados se dan en la tabla 3.34 así como el intervalo de confianza para la ordenada al origen.

TABLA 3.34. Comprobación de la hipótesis nula sobre el coeficiente a de las rectas de regresión lineal y su intervalo de confianza a un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

COMPUESTO	n	Ordenada a	t_{cal}	$t_{\alpha/2}$ (n-2 g.l.)	¿Rechazar H_0 ?	Intervalo de Confianza
2,4-D	6	-0.0294	-0.459	2.776	No	$-0.207 < a < 0.148$
MCPA	8	-0.0331	-0.655	2.447	No	$-0.157 < a < 0.091$
MECOPROP	8	-0.0496	-1.016	2.447	No	$-0.169 < a < 0.069$
2,4,5-T	8	+0.0074	0.141	2.447	No	$-0.121 < a < 0.136$
SILVEX	7	-0.0319	-0.565	2.447	No	$-0.177 < a < 0.113$
2,4-DB	8	0.0002	0.003	2.447	No	$-0.177 < a < 0.177$

n = Número de determinaciones

t_{cal} = valor calculado de la "t de Student"

$t_{\alpha/2}(n-2 \text{ g.l.})$ = valor teórico del "t de Student" para una región bilateral ó en dos sentios con n-2 grados de libertad

La hipótesis nula (H_0) se rechaza si $t < -t_{\alpha/2}$ ó $t > t_{\alpha/2}$

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta comprobación estadística es evidente que todas las rectas de regresión sí pasan por el origen del sistema de coordenadas.

En base a todo lo anterior se demostró estadísticamente que la recuperación de cada soluto analizado es del 100%, con excepción del 2,4-DB cuya recuperación fue del 94%.

Otra forma de evaluar la exactitud es hacer por lo menos nueve réplicas del análisis a un nivel de concentración establecido. Cada muestra se analizará en forma independiente por el mismo analista y en el mismo equipo.

Los resultados generados de esta forma también serán usados para evaluar la precisión del método. Es importante mencionar que las palabras precisión y exactitud tienen significados diferentes en la teoría de los errores. Los errores aleatorios sólo tendrán influencia sobre la precisión. La exactitud sólo se ve afectada por los errores sistemáticos.

Los datos de recuperación obtenidos en este ensayo se dan en la tabla 3.35 indicando el porcentaje del coeficiente de variación.

TABLA 3.35. Recuperación obtenida para los seis ácidos clorofenoxi analizados.

COMPUESTO	R(%)	S	CV(%)
2,4-D	100.15	4.28	4.27
MCPA	101.40	5.11	5.04
MECOPROP	108.07	9.53	8.07
2,4,5-T	102.29	5.43	5.31
SILVEX	101.77	2.57	2.52
2,4-DB	101.28	5.92	5.84

R(%) = Recuperación expresada como porcentaje

S = Desviación estándar

CV(%) = Coeficiente de variación (porcentaje)

Las muestras fueron fortificadas con 5µg/l de cada herbicida.

El volumen concentrado fue de 75 ml.

El número de muestras analizadas fue nueve.

En la tabla 3.36 se muestran los resultados de la prueba aplicada para determinar la exactitud del método. El estadístico empleado es la "t" de Student para n-1 grados de libertad.

TABLA 3.36. Comprobación de la exactitud del método mediante el criterio de aceptación de la hipótesis nula (H_0) = 100% sobre la media poblacional. Determinación de los límites del intervalo de confianza para la media experimental a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$.

COMPUESTO	n	t_{cal}	$t_{w/2}$ (n-1 g.l.)	¿Rechazar H_0 ?	Intervalo de Confianza
2,4-D	9	0.11	2.31	No	97 < R < 103
MCPA	9	0.82	2.31	No	97 < R < 105
MECOPROP	9	5.69	2.31	Sí	111 < R < 125
2,4,5-T	9	1.27	2.31	No	98 < R < 106
SILVEX	9	0.57	2.31	No	100 < R < 104
2,4-DB	9	0.65	2.31	No	97 < R < 106

n = Número de determinaciones

t_{cal} = valor calculado de la "t de Student"

$t_{w/2}(n-1 \text{ g.l.})$ = valor teórico del "t de Student" para una región bilateral ó en dos sentidos con n-1 grados de libertad

La hipótesis nula (H_0) se rechaza si $t < -t_{w/2}$ ó $t > t_{w/2}$

Los resultados de estos experimentos confirman que para cinco de los compuestos analizados el método es exacto, con una recuperación del 100%. En el caso del MECOPROP, cuya recuperación es superior al 100%, indica un error sistemático por exceso en esta serie de pruebas.

Se puede suponer que este error es debido a la presencia de una impureza, proveniente ya sea de los reactivos empleados en la preparación de la muestra o de la misma agua grado HPLC, que coeluye con el pico del MECOPROP.

Es importante hacer notar que debido al proceso de preconcentración de las muestras y a la baja concentración de los analitos utilizada (5ppb), la presencia de pequeñísimas cantidades de impurezas en los reactivos pueden tener un efecto significativo sobre el análisis. Sin embargo sólo los compuestos interferentes con propiedades similares a las de los analitos, es decir con cierto grado de hidrofobicidad y con capacidad de ionizarse a valores de pH elevados, podrán atravesar el sistema de preconcentración y purificación de la muestra y eventualmente coeluir con alguno de los herbicidas. Evidentemente la probabilidad de que todo lo anterior suceda es baja pero existe.

Por esta razón es recomendable, al trabajar con muestras naturales, utilizar un detector de UV con arreglo de diodos que permita (mediante el trazo de espectros de absorción o por la medición de la absorbancia a dos o más longitudes de onda diferentes) confirmar la identidad de un compuesto y/o comprobar la pureza del pico cromatográfico.

Cabe aclarar que en los ensayos realizados a diferentes concentraciones de MECOPROP en la muestra (sección 3.4.1) este error no alcanza a detectarse porque probablemente, la cantidad de impureza pre-concentrada es tan pequeña que sólo tiene efecto a concentraciones muy bajas del analito.

3.6.3 Precisión del método.

Al mencionar el parámetro precisión debemos recordar que se refiere al grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad.

La precisión del método puede expresarse como la repetibilidad y reproducibilidad.

La repetibilidad se define como la concordancia dentro de las determinaciones independientes de las muestras fortificadas a una concentración predeterminada. En este estudio se utilizó 5µg/l para cada herbicida, que corresponde entre 29 veces más y 50 veces menos a la concentración reportada como el límite de detección del método oficial 8150 de la EPA para SILVEX (0.17µg/L) y MCPA (249µg/L) respectivamente. Los ensayos son realizados por un mismo analista y en las mismas condiciones de operación.

La diferencia con la reproducibilidad es que los análisis se realizan entre diferentes analistas y/o en diferentes laboratorios.

Con los datos obtenidos de la sección 3.4.2 se realizó la comprobación de si efectivamente el método es preciso.

En la tabla 3.37 se da la comprobación de la repetibilidad del método. Por tratarse de muestras aleatorias que provienen de una población normal de varianza σ^2 se utiliza la prueba Chi cuadrada (χ^2) con n-1 grados de libertad. La hipótesis nula a contrastar es:

$H_0: s^2 = \sigma^2$ contra la hipótesis alterna de que $s^2 > \sigma^2$.

Dado que en este trabajo se determinan analitos a niveles de concentración del orden de trazas, se ha establecido que la recuperación no deberá variar en más de un 10%, con respecto al valor promedio de %R para cada analito (reportado en la tabla 3.35), para considerar el método preciso. Por lo tanto, σ^2 tendrá un valor de 100.

TABLA 3.37. Comprobación de la precisión del método para el análisis de los ácidos clorofenoxi en muestras de agua fortificadas.

COMPUESTO	n	S	S ²	χ^2_{cal}	χ^2_{tab} (n-1 g.l)	¿Rechazar Ho?
2,4-D	9	4.27	18.32	1.5	15.51	No
MCPA	9	5.11	26.11	2.1	15.51	No
MECOPROP	9	9.53	90.73	7.3	15.51	No
2,4,5-T	9	5.43	29.48	2.4	15.51	No
SILVEX	9	2.57	6.60	0.5	15.51	No
2,4-DB	9	5.92	35.05	2.8	15.51	No

S = desviación estándar S² = varianza χ^2_{cal} = valor calculado por el estadístico Ji cuadrada
 χ^2_{tab} (n-1 g.l) = valor teórico del estadístico Chi cuadrada a un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

De acuerdo a los resultados obtenidos el método resulta preciso para los solutos estudiados. La precisión como ya se indicó, está especificada por la desviación estándar de los resultados obtenidos. En este valor están considerados los errores aleatorios debidos a la preparación y análisis de la muestra. La dispersión de resultados fijada como valor máximo fue de un 10% de acuerdo al Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater.

3.6.4 Límite de detección del método.

La finalidad de estimar el límite de detección se debe a la necesidad de poder responder. ¿Cuál es la menor concentración de analito que se puede detectar con un nivel de confianza determinado?

Este concepto sin embargo resulta muy controversial debido a una inadecuada definición y confusión de términos, ya que frecuentemente el limite de detección instrumental es usado como el límite de detección del método y viceversa.

De ahí que la definición más empleada sea: *aquella cantidad que pueda ser detectada por arriba del ruido o señal de fondo dentro de un procedimiento dado a un límite de confianza establecido. Los límites de confianza son establecidos de tal manera que la probabilidad de que ocurran errores de Tipo I y Tipo II sea lo más pequeña posible.*

Un error de tipo I, es denominado como error alfa (α) y corresponde a la probabilidad de decidir que un constituyente está presente cuando en realidad está ausente. El error tipo II, también llamado beta (β) corresponde a la probabilidad de no detectar un compuesto cuando en realidad está presente.

Una definición que se utiliza comúnmente en química analítica es que el límite de detección es *la cantidad o 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* ⁽¹⁶⁾.

Recientes recomendaciones de organismos públicos (Center for Drug Evaluation and Research)⁽²⁸⁾ sugieren que el criterio debería de ser:

$$y - y_B = 3s_B$$

De acuerdo con la explicación dada por Miller y Miller (1993)⁽¹⁶⁾ el emplear esta expresión nos conduce a la probabilidad de que cada error sea aproximadamente de un 7%.

En ambas definiciones el objetivo es minimizar los errores antes mencionados.

En este trabajo el límite de detección del método desarrollado se determinó por dos procedimientos:

A) De acuerdo a los criterios de la Agencia Ambiental de los Estados Unidos (USEPA 1984c)⁽¹⁹⁾. Según éstos, el límite de detección puede calcularse a partir de la desviación estándar de las mediciones obtenidas en la determinación de un analito, después de analizar por lo menos siete muestras bajo las mismas condiciones del proceso analítico de interés, utilizando la siguiente ecuación.

$$\text{LDM} = t_{n-1, 1-\alpha=0.99} (S) \quad (3.1)$$

donde $t_{n-1, 1-\alpha=0.99}$ es el valor de la t de Student apropiado para un nivel de confianza del 99% y S es la desviación estándar de las determinaciones, en unidades de concentración estimada con $n-1$ grados de libertad, siendo n el número de datos.

La desviación estándar se estima a partir del análisis de muestras con el analito de interés, fortificadas a concentraciones que no excedan, preferentemente, 10 veces el LDM esperado para el analito.

En nuestro estudio se calculó la desviación estándar (S) en unidades de concentración a partir de 9 muestras fortificadas con cada herbicida a una concentración de $5\mu\text{g/l}$ para cada analito. Se empleó este nivel de concentración debido a que se esperaba alcanzar límites de detección del orden de $1\mu\text{g/l}$.

B) El segundo procedimiento consistió en utilizar las rectas de regresión obtenidas en el estudio de calibración del método.

En este procedimiento el límite de detección (LD) de un analito se define como aquella concentración que proporciona una señal "y", significativamente diferente de la señal de una muestra "blanco" o "señal de fondo". Esto significa en términos estadísticos la cantidad o concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco y_B , mas tres veces la desviación estándar del blanco S_B . De ahí que el LDM pueda ser calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$LDM = 3 S_B / m \quad (3.2)$$

En donde el S_B para cada herbicida fue el valor de la desviación estándar en unidades de área obtenida a partir del análisis de las nueve muestras mencionadas en la sección 3.4.2. y m corresponde a la pendiente de las rectas de regresión, respuesta vs concentración..

La tabla 3.38 muestra los datos promedio de las unidades de área obtenidas y las concentraciones calculadas (por comparación con el estándar inyectado) para los seis ácidos clorofenoxi en cada análisis de las nueve muestras fortificadas a $5 \mu\text{g/l}$ de cada analito. Ahí mismo se reportan las desviaciones estándar en unidades de concentración y en unidades de área para cada uno.

TABLA 3.38. Valores promedio en unidades de área y concentración de los seis ácidos clorofenoxi analizados en nueve muestras fortificadas a $5 \mu\text{g/l}$ de cada soluto, indicando su desviación estándar en unidades de área y concentración.

COMPUESTO	ÁREA PROMEDIO (UNIDADES)	CONCENTRACION CALCULADA ($\mu\text{g/l}$)	DESVIACION ESTANDAR (s)	
			ÁREA (UNIDADES)	CONCENTRACION ($\mu\text{g/l}$)
2,4-D	255744	5.01	12380	0.24
MCPA	272076	5.07	13702	0.25
MECOPROP	252454	5.90	20357	0.47
2,4,5-T	292442	5.11	14373	0.25
SILVEX	216795	5.09	11353	0.13
2,4-DB	287389	5.06	13608	0.24

En la tabla 3.39 se reportan los límites de detección obtenidos por los dos procedimientos mencionados.

TABLA 3.39. Comparación de los Límites de Detección obtenidos mediante las rectas de regresión y de acuerdo a las consideraciones de la EPA.

COMPUESTO	METODO A LDM ($\mu\text{g/l}$)	METODO B LDM ($\mu\text{g/l}$)
2,4-D	0.70	1.3
MCPA	0.72	1.4
MECOPROP	1.36	2.4
2,4,5-T	0.72	1.4
SILVEX	0.38	1.2
2,4-DB	0.70	1.6

Método A ; LDM = $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} (S)$ ⁽¹⁹⁾

Método B ; LDM = $3S_B / m$ ⁽¹⁶⁾

Podemos observar que los límites de detección calculados a partir de ambos métodos presentan una diferencia de casi el doble al comparar A contra B. Esto es debido a que el parámetro de desviación estándar empleado en el cálculo tiene un significado diferente en cada caso. En el método A, la concentración de cada analito se calculó mediante el factor de respuesta determinado a partir de un estándar que se inyecta inmediatamente después de realizado el análisis de la muestra. Esto permite eliminar el factor de variabilidad debido a cambios en la respuesta del detector de día a día, ya que los análisis se efectuaron en diferentes días. Así la desviación estándar expresada en unidades de concentración para cada herbicida refleja únicamente la dispersión de resultados debido al método analítico. En el caso del método B, aunque se utilizan los resultados del mismo grupo de experimentos para el cálculo de la desviación estándar, ésta corresponde a la dispersión de los valores de área de pico para cada analito, obtenidos en varios análisis de la muestra realizados en diferentes días. Esto significa que contrariamente al caso anterior, la desviación estándar utilizada para el cálculo del límite de detección incluye la variabilidad propia del método analítico y la variabilidad de respuesta del detector día a día.

Considerando que en cualquier análisis por HPLC, el detector se calibra cada día, y en ocasiones varias veces al día, se concluye de la discusión anterior que el método A es el más adecuado para la determinación del límite de detección, ya que refleja la verdadera sensibilidad del método analítico desarrollado.

En cuanto a la comparación de los límites de detección obtenidos y los reportados para el método oficial 8150 de la USEPA las diferencias son apreciables, es importante recordar que la detección de estos compuestos se hace usando un detector de captura de electrones. No obstante se encuentran buenos resultados para los herbicidas MCPA y MECOPROP,

logrando una reducción de 178 y 80 veces para cada uno de ellos. En cuanto a los compuestos 2,4-D y 2,4-DB los diferencias no son tan significativas (0.2 y 0.5 µg/L respectivamente). Para los herbicidas 2,4,5-T y Silvex los límites determinados son siete veces más altos en ambos casos.

En el caso del método 6640 de la CME sus límites de detección dependerán del volumen al que se concentre un litro de muestra, en este método la detección también se realiza con un detector de captura de electrones. Sólo determina tres herbicidas que son 2,4-D, 2,4,5-T y SILVEX. Los límites reportados para cada uno son 26, 14 y 13 veces más bajos respectivamente a los obtenidos en el presente estudio. Sin embargo con nuestro método se consigue analizar tres herbicidas más que son el MCPA, MECOPROP Y 2,4-DB.

3.7 Aplicación del método en diferentes muestras de agua.

Esta última etapa tiene por objeto evaluar la capacidad del método desarrollado para determinar los ácidos clorofenoxi a bajas concentraciones en diferentes tipos de agua. Es decir, se pretende ver en que medida la matriz de la muestra afecta el porcentaje de recobro de los solutos y con ello tener una idea de la aplicabilidad del método en muestras naturales y sus limitaciones.

Las muestras probadas fueron: agua potable de Ciudad Universitaria y agua de río de la zona de Tequesquinahua, municipio de Texcoco en el Estado de México. Se debe aclarar que en ninguna de las dos muestras se detectó la presencia de los ácidos clorofenoxi.

Cada muestra fue analizada según el método desarrollado, primero sin fortificar y después fortificada con los ácidos clorofenoxi a 10 µg/l. En la figura 3.15 (b) y (c) se presentan los cromatogramas resultantes del análisis, tanto de las muestras "blanco" como de las muestras fortificadas. Por comparación se incluye en la misma figura, 3.9 (a), el cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado HPLC fortificada con los analitos a la misma concentración.

Se puede observar que los cromatogramas de las muestras "blanco" son muy limpios, prácticamente no muestran ningún pico interferente, sólo se aprecia la elevación de la línea base y los "picos de gradiente" hacia el final de la corrida. En el caso del agua de río también se observa el gran pico de matriz al inicio del cromatograma, el cual como ya se ha mencionado es típico de las aguas cargadas con grandes cantidades de materia orgánica (ácidos húmicos y fúlvicos) y que resulta prácticamente imposible de eliminar. Estos resultados permiten apreciar la eficacia del procedimiento de limpieza incluido en el método desarrollado.

La recuperación de los solutos en la muestra de agua potable fortificada es similar a la que se obtiene con la muestra de agua grado HPLC fortificada a la misma concentración. Es decir que el porcentaje de recobro de todos los analitos es superior del 90%.

En el caso de la muestra de agua de río, el pico de matriz logra ocultar parcialmente a los analitos que eluyen al inicio del cromatograma, el 2,4-D y el MCPA. La recuperación de éstos alcanza sólo el 78% y 70% respectivamente. Por el contrario, los cuatro últimos solutos son bien recuperados. Aunque sería posible mejorar los resultados de recobro de los primeros analitos empleando un gradiente más cóncavo para retardar su elución, esto provocaría un mayor ensachamiento de los picos y por tanto una disminución notable en la sensibilidad del método.

En conclusión, se puede considerar que el método es excelente para la determinación de los ácidos clororfenoxi a niveles de concentración del orden de partes por billón en aguas poco cargadas en materia orgánica (agua potable, agua de pozo y agua de manantial) ⁽¹⁵⁾. En aguas superficiales, los resultados obtenidos son aún bastante aceptables para estos niveles de concentración. Sin embargo, deberá tomarse en cuenta que la exactitud, precisión y sensibilidad del método, particularmente para los primeros solutos eluidos, dependerá en gran medida de la propia muestra.

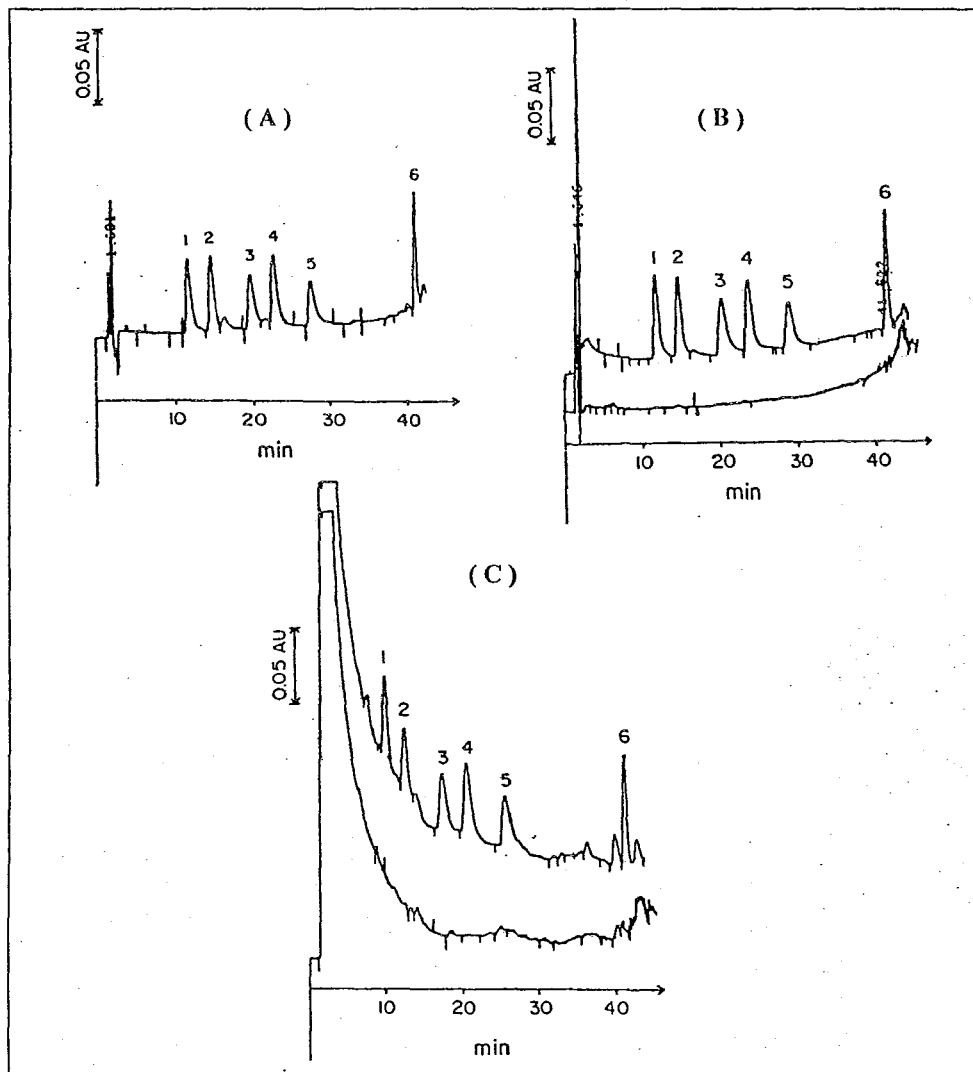


Figura 3.20 Cromatogramas correspondientes al análisis de diferentes muestras de agua. (a) agua grado reactivo fortificada (b) agua potable de CU fortificada y sin fortificar (c) agua de río fortificada y sin fortificar. Concentración adicionada de la mezcla de estándares $10\mu\text{g/L}$. Identificación de los picos: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) MECOPROP; (4) 2,4,5-t; (5) SILVEX; (6) 2,4-DB. Se concentraron 75 mL de cada una de las muestras en la precolumna RP. La transferencia a la precolumna de intercambio iónico se efectuó con 5 mL de Acetonitrilo : NaOH (pH 10) en una proporción de 10:90 (v/v). Las condiciones cromatográficas se dan en la parte experimental.

4. CONCLUSIONES

*El método analítico desarrollado representa una alternativa muy interesante con respecto a los "métodos oficiales", método 8150 de la USEPA y método 6640 del Comité de Métodos Estándar para el examen del agua y de aguas residuales.

*La selectividad que ofrece el método se logra por la combinación de 3 adsorbentes diferentes: una fase polimérica RP, un intercambiador de aniones y una fase reversa C₁₈. Así como por el empleo de disoluciones o fases móviles diseñadas específicamente para cada etapa de elución. De ahí que durante el paso de extracción y preconcentración en el primer adsorbente se eliminen las sales inorgánicas y los compuestos orgánicos de alta polaridad y baja hidrofobicidad. Durante el paso de la transferencia al segundo adsorbente se eliminan los compuestos apolares y medianamente polares no ionizables a pH 10. Y finalmente, los compuestos que han logrado pasar estos dos filtros son separados entre sí por el gradiente de elución en la fase C₁₈, para que los compuestos que sean capaces de dar una señal a 230nm, sean detectados por el detector UV.

*Límite de detección.- Los límites de detección alcanzados por este método están entre 1 y 2 partes por billón para los seis ácidos clorofenoxi estudiados. Sus valores son más altos que los reportados en los métodos oficiales 8150 y 6640 para el caso de los herbicidas 2,4-D, 2,4,5-T y Silvex. Sin embargo, éste método tiene la ventaja con respecto al 6640 de que cubre el análisis de otros tres herbicidas más de esta familia. Con respecto al método 8150 se tiene una sensibilidad similar para el 2,4-DB y muy superior para MECOPROP y MCPA.

*Exactitud y Precisión.- Se lograron excelentes porcentajes de recuperación para cada herbicida entre 100% y 110% con un C.V. <10%, a concentraciones de 5µg/l. Estos valores resultan muy superiores a los reportados por los métodos oficiales.

Esto se logró gracias a dos factores: (1) la cuidadosa optimización de las condiciones de limpieza y transferencia en cada paso del método y (2) al acoplamiento en línea de las etapas de preparación y análisis de la muestra. En efecto, con excepción del paso de filtración de la muestra, ésta, no es manipulada directamente a lo largo de todo el proceso por el analista. Todo esto contribuye a que disminuyan significativamente los riesgos por pérdidas o contaminación.

*El método muestra la factibilidad de diseñar y adaptar un dispositivo que en forma sencilla y eficiente logra la concentración y limpieza de muestras cuyas matrices son complejas y en las cuales los compuestos de interés se encuentran en concentraciones en el orden de trazas.

*El equipo requerido para el montaje del dispositivo de preconcentración y limpieza fue: (a) cromatógrafo de líquidos con detector programable UV; (b) una bomba isocrática precisa (flujo de 0.1 a 5 ml/min); (c) dos válvulas de conmutación; (d) dos precolumnas de acero inoxidable y alrededor de 50 mg de adsorbente polimérico y de resina intercambiadora de aniones; (e) columna analítica de fase reversa C_{18} .

*El procedimiento experimental para la preparación de la muestra resultó muy simple (conmutaciones de las válvulas y cambios de los disolventes de alimentación de la bomba isocrática) por lo que presenta la ventaja de ser casi completamente automatizable, resultando muy atractivo para los análisis de rutina.

*No requiere del uso, y posterior evaporación, de grandes volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos y relativamente costosos como es el caso de los métodos basados en la extracción líquido-líquido. Además las precolumnas son reutilizables y muy durables (alrededor de seis meses de uso diario) y logran proteger muy bien a la columna analítica, cuya duración se ha extendido hasta un año aproximadamente. Todo lo anterior permite preveer que el costo por análisis será mucho menor que al emplear otras metodologías.

COMENTARIOS

Como corolario de este trabajo es interesante subrayar el gran potencial de los sistemas de precolumnas en línea con la Cromatografía de Líquidos para el análisis de muestras acuosas ambientales. Esto ha quedado evidenciado por los trabajos desarrollados en el laboratorio de Cromatografía de Líquidos de la DEPg, Facultad de Química, UNAM. Ahí, se han propuesto metodologías similares a la aquí presentada para el análisis de fenoles polares, cloro y nitrofenoles y, ahora, los ácidos clorofenoxicarboxílicos.

El presente trabajo ha sido divulgado internacionalmente en el artículo intitulado "On-Line preconcentration cleanup and high performance liquid chromatographic determination of chlorophenoxy acid herbicides in water" en la revista Journal of Chromatography "A" volumen 731 páginas 115-122 (1996).

BIBLIOGRAFIA

1. Betti A. Lodi G. and Coppi S. Separation and determination of acidic herbicides on a PRP-1 polymeric column. *J. Chromatogr.* 513, 219-225 (1990).
2. Bowner H.K., Hutson D.H., Roberts T.R., Herbicides, 2° Ed John Wiley & Sons. Ltd. New York 9 : 271-325 (1987).
3. Cabras P., Diana P., Meloni M. and Pirisi F.M. Reversed-phase high-performance liquid chromatography of pesticides. *J. Chromatogr.* 234, 249-254 (1992).
4. Chiron S., Martinez E. and Barceló D. On-Line and off-line sample preparation of acidic herbicides acid bentazone transformation products in estuarine waters. *J. Chromatogr.* 665, 283-293 (1994).
5. Geerdink R.B., Van Balkom C.A.A. and Berrouwer H.J. Determinations of Phenoxy acid herbicides in water polymeric pre-column precentration acid tetrabutyl-ammonium ion-pair separation on a PRP-1 column. *J. Chromatogr.* 481, 275-285 (1989).
6. Geerdink R.B., Graumans M.B.C.A. and Viveen J. Determinations of Phenoxy acid herbicides in water. *J. Chromatogr.* 547, 478-443 (1991).
7. Goewie C.E., Nielen M.W.F., Frei R.W. and Brinkman U.A. Optimization of precolumn design in liquid chromatography using an interactive mixture-design statistical technique. *J. Chromatogr.*, 301, 325-334 (1984).
8. Greenberg A.E., Connors J.J., Jenkins D. Standar Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, Whashington D.C. 15th, ed, Método 6640-A-B (1981).
9. Hamann R. and Kettrip A. Determination of phenoxy acid herbicides in water samples. *Chemosphere* 16, 527-536 (1987).
10. Hennion M.C. and Coquart V. Comparison of reversed-phase extraction sorbents for the on-line trace enrichment of polar organic compounds in environmental aqueous samples. *J. Chromatogr.*, 642, 211,234 (1993).
11. Hoké S.H., Breggemann E.E., and Trybus T. Determination of phenoxy acid herbicides using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 357, 429-432 (1986).

12. Incorvina Mattina M.J. Determination of chlorophenoxy acid using high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 542, 385-395 (1991).
13. Jahangir L.M. and Samuelson O, Chromatography in aqueous solution on styrene-divinylbenzene resins. *J. Chromatogr.*, 193, 197-206 (1980).
14. Laurence H. K. (editor), E.P.A.'s Sampling and Analysis Methods, Lewis Publishers, Inc. (1991).
15. Meraz Lira J.L. Tesis de Licenciatura , Facultad de Química, U.N.A.M. (1996).
16. Miller J.C. and Miller J.N. Estadística para Química Analítica 2ª ed., en español Addison Wesley Iberoamericana México (1993).
17. Nondek L. and Chvalosusky V. On-line preconcentration and liquid chromatography of azaarenes using nitroaromatic sorbents. *J. Chromatogr.*, 313, 303-312 (1984).
18. Renberg Lass. Ion Exchange technique for the determination of Chloronated phenols and phenoy acids in organic tissue, soil and water. *Analytical Chemistry* 46, 459-461 (1974).
19. Reza Gónzales J. Tesis Maestría, Facultad de Química , U.N.A.M (1995).
20. Subra P., Hennion M.C., Rosset R. and Frei R.W. Recovery of organic compounds from large-volume aqueous samples using on-line chromatographic preconcentration techniques. *J.Chromatogr.* 456, 121-141 (1988).
21. Subra P., Hennion M.C., Rosset R. and Frei R.W. Applications of On-Line precolumn technology to water quality control. *Intern. J. Anal. Chem.* 37, 45-62 (1989).
22. Schiessler W. Automatic measurement of bentazome and phenoxy acid herbicides by HPLC with three. Different Detections. *Chromatographia* 29, 24-30 (1990).
23. Schuster R. and Gratzfeld-Husgen A. Analyse (PLHP des herbicides phenoxy-acideset due bentozone avec detections per benette de diodes. *Analisis* 145-148 (1991).
24. Smith R.L. and Pietrzyk D. LC Enrichment, Sepenetum acid determination of chlorophenols and phenoxyacetic acids on PRP-1 *J. Chromatogr. Science* 21, 282-287 (1983).
25. DOF. Diario Oficial de la Federación. Comisión Intersecretarialpara el control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. *Catálogo Oficial de Plaguicidas* (1991).

26. Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer. Some Halogenated hydrocarbons and Pesticide Exposures. Lyon, International Agency for Research on Cancer. *IARC Monographs on the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, 41 357-381 (1986).
27. Organización Panamericana de la Salud. Guías para la calidad del agua potable (Recomendaciones) Publicación científica No. 481. (1985)
28. CDER-Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods. Original document in WordPerfect was downloaded from ~~gopher://~~[gopher://gopher.cder.fda.gov/](http://gopher.cder.fda.gov/) and HTML transformed for a browser view. (October 1995).
29. The Merck Index (Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals) Editor: Budavari Susan; Merck& Co., Inc., 11th Edition (1989).

APENDICE "A" FORMULARIO

Se presenta una guía de las fórmulas estadísticas empleadas en el presente trabajo.

1. LINEALIDAD

a) Ecuación de una línea recta: $y = \beta x + \alpha$ ó $y = bx + a$

$$b) b = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$c) a = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$d) r = \frac{\sum_i \{ (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \}}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}}$$

$$e) \bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_i y_i}{n}$$

$$f) y' = bx + a$$

$$g) S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y'_i)^2}{n-2}}$$

$$h) S_b = S_{y/x} / \sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$i) S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n} - \bar{x}^2}$$

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

$$k) S_{xx} = n \sum_i x_i^2 - (\sum_i x_i)^2$$

$$l) S_{yy} = n \sum_i y_i^2 - (\sum_i y_i)^2$$

$$m) S_{xy} = n \sum_i x_i y_i - (\sum_i x_i)(\sum_i y_i)$$

$$n) I.C. = a \pm t_{\alpha/2} S_e \sqrt{S_{XX} + (n \bar{x})^2 / n S_{XX}}$$

$$o) t = (b - \beta) / S_e \sqrt{S_{XX} / n}$$

$$p) I.C. = b \pm t_{\alpha/2} S_e \sqrt{n} / S_{XX}$$

2. EXACTITUD

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

$$b) I.C. = \bar{x} \pm t_{\alpha/2} s / \sqrt{n}$$

3. PRECISION

$$a) \chi^2 = (n-1) s^2 / \sigma^2$$

$$b) I.C. = \sqrt{(n-1) s^2 / \chi^2_2} < \sigma < \sqrt{(n-1) s^2 / \chi^2_1}$$

NOMENCLATURA

y, x	Variables y variable dependiente
y/x	y dado x x variable independiente
b, β	Pendiente de la recta de regresión recta de y/x
a, α	Ordenada al origen de regresión de y/x
y	Media de valores observados de y
x	Media de valores observados de x

y'	Valor estimado de y con la recta de regresión de y/x
r	coeficiente de correlación momento producto
n	Tamaño de la muestra (número de determinaciones)
$(n-1)$ ó $(n-2)$	Término que se conoce como número de grados de libertad
μ	Media poblacional
σ	Desviación estándar poblacional
S_a	Desviación estándar de la ordenada al origen
S_b	Desviación estándar de pendiente
$S_{y/x}$	Error de estimación
s	Desviación estándar
s^2	Varianza
t	Distribución de Student
t_{cal}	Distribución de Student calculada
χ^2	Chi cuadrada
I.C.	Intervalo de confianza