

29
29-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DETERMINACION DE TRAZAS DE PLAGUICIDAS
ORGANOFOSFORADOS (METIDATION) EN
AGUA POTABLE"

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA DE ALIMENTOS
P R E S E N T A
MARIA ELENA HERNANDEZ ROJAS



MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

259768



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

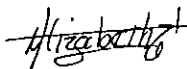
PRESIDENTE	Profra. Durán Domínguez Ma. del Carmen
VOCAL	Prof. Torres Barrera Rodolfo
SECRETARIO	Profra. García Camacho Martha Patricia
1er. SUPLENTE	Profra. Elizalde Torres Josefina
2do. SUPLENTE	Profra. Calderón Villagómez Hilda Elizabeth

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:
PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL, Y
EN LAB. DE TECNOLOGIAS LIMPIAS, FACULTAD DE QUÍMICA, UNIVERSIDAD
NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



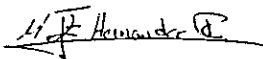
ASESOR

Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO



SUPERVISOR
TÉCNICO

M. en C. HILDA E. CALDERÓN VILLAGÓMEZ



SUSTENTANTE
MARÍA ELENA HERNÁNDEZ ROJAS

DEDICATORIAS

A mis padres con mucho carino y respeto porque no tengo como pagarles todo su apoyo incondicional que me han toda mi vida, y que gracias a ellos pude culminar con mis estudios profesionales, gracias.

Con mucho carino a mi sobrino Lalo que es una persona muy espeial y por ser un ejemplo de superación y constancia.

AGRADECIMIENTOS

Al Programa Universitario de Alimentos (PUAL) por el apoyo brindado para la realización de esta tesis cuyo tema fue ganador del “*Premio PUAL de estímulos a la investigación en alimentos 1996*” dentro del *Área de Ciencia y Tecnología de Alimentos (Toxicología de Alimentos)*

A la UNAM-GTZ dentro del proyecto residuos peligrosos por el apoyo otorgado.

Sinceramente a la Dra. Patricia García por su excelente asesoría y su invaluable apoyo, consejos y paciencia brindados en todo momento durante la realización de la tesis.

A mis amigas Lucero Rodríguez y Naheli Pacheco que me dieron lo más importante que poseen: su amistad, cariño y un apoyo incondicional.

Y a todos mis compañeros que en algún momento de mi estancia en la facultad convivimos y me brindaron su sincera amistad.

ÍNDICE

página

RESUMEN

1.	ANTECEDENTES	1
1.1	OBJETIVOS	2
2.	GENERALIDADES	3
2.1.	CARACTERÍSTICAS DEL METIDACIÓN	3
2.1.1.	Uso y toxicidad	3
2.1.2.	Propiedades fisicoquímicas	4
2.1.3.	Métodos de análisis en muestras acuosas	4
2.2.	ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS	7
2.2.1.	Parámetros que influyen en el control de la separación	8
2.2.1.1.	Factor de capacidad	8
2.2.1.2.	Selectividad	9
2.2.1.3.	Eficiencia	9
2.2.1.4.	Resolución	10
2.2.2.	Instrumentación	11
2.2.3.	Técnicas en cromatografía de líquidos	12
2.3.	PRECONCENTRACIÓN DE MUESTRAS ACUOSAS	13
2.3.1.	Extracción líquido-líquido (ELL)	13
2.3.2.	Extracción líquido-sólido (ELS)	14
2.3.2.1.	Metodología en tiempo diferido (off-line)	16
2.3.2.2.	Metodología en tiempo real o en línea (on-line)	16
2.3.2.3.	Parámetros fundamentales en la ELS	17
2.3.2.3.1	Volumen de fin de fijación	18
2.3.2.3.2.	Rendimiento de extracción	19

2.3.2.4.	<i>Agentes adsorbentes más comunes</i>	20
3.	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	REACTIVOS Y APARATOS	22
3.2.	METODOLOGÍA	24
3.2.1.	<i>Análisis cromatográfico</i>	25
3.2.1.1.	<i>Selección de la longitud de onda para la detección</i>	25
3.2.1.2.	<i>Selección de la composición de la fase móvil</i>	25
3.2.1.3.	<i>Respuesta del detector y límite de detección</i>	27
3.2.2.	<i>Preconcentración</i>	28
3.2.2.1.	<i>Preconcentración en tiempo diferido (off-line)</i>	28
3.2.2.1.1.	<i>Optimización de la elución</i>	28
3.2.2.1.2.	<i>Optimización del volumen de muestra a percolar</i>	29
3.2.2.1.2.1.	<i>Rendimiento de extracción en agua pura</i>	29
3.2.2.1.2.2.	<i>Rendimiento de extracción en agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria</i>	30
3.2.2.1.3.	<i>Aplicación del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable adicionada con el metidatién en concentraciones diluidas</i>	31
3.2.2.2.	<i>Preconcentración en tiempo real o en línea (on-line)</i>	31
3.2.2.2.1.	<i>Descripción del acoplamiento del sistema cromatográfico con el sistema de preconcentración</i>	31
3.2.2.2.2.	<i>Descripción del procedimiento de preconcentración y análisis</i>	33
3.2.2.2.3.	<i>Optimización de la fase móvil de elución</i>	33
3.2.2.2.4.	<i>Rendimiento de extracción en agua pura</i>	34
3.2.2.2.5.	<i>Rendimiento de extracción en agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria</i>	34
3.2.2.2.6.	<i>Aplicación del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable en concentraciones diluidas</i>	34

4.	<i>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</i>	35
4.1.	<i>ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISIS</i>	35
4.1.1.	<i>Detección</i>	35
4.1.2.	<i>Composición de la fase móvil</i>	36
4.1.3.	<i>Linearidad y límite de detección</i>	39
4.2.	<i>PRECONCENTRACIÓN</i>	40
4.2.1.	<i>Preconcentración en tiempo diferido (off-line)</i>	40
4.2.1.1.	<i>Elección de la mezcla de elución</i>	40
4.2.1.2.	<i>Protocolo completo para la metodología en tiempo diferido</i>	41
4.2.1.3.	<i>Rendimiento de extracción</i>	43
4.2.2.	<i>Preconcentración en tiempo real o en línea (on-line)</i>	47
4.2.2.1.	<i>Optimización de la fase móvil de elución</i>	47
4.2.2.2.	<i>Rendimiento de extracción</i>	47
4.2.2.3.	<i>Protocolo completo para la metodología en tiempo real o en línea</i>	50
4.2.2.4.	<i>Precisión del método</i>	50
4.2.2.5.	<i>Aplicación del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable en concentraciones diluidas</i>	51
5.	<i>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</i>	56
5.1.	<i>CONCLUSIONES</i>	56
5.2.	<i>RECOMENDACIONES</i>	57
	<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	58
	<i>Glosario de términos</i>	61
	<i>Lista de cuadros</i>	61
	<i>Lista de figuras</i>	61
	<i>Lista de tablas</i>	62

RESUMEN

El metidatión es un plaguicida organofosforado clasificado como "altamente peligroso" que es utilizado para controlar la presencia de una amplia variedad de insectos en diferentes cultivos. La solubilidad que este compuesto presenta en agua, superior a la solubilidad media de muchos otros compuestos organofosforados (240 mg/L) y su relativa estabilidad a la hidrólisis, en conjunto, hacen que tenga una gran posibilidad de contaminar el agua. La determinación analítica de este compuesto en muestras complejas como las aguas naturales y/o potables se encuentra reportado en muy pocas referencias bibliográficas. La principal dificultad de su análisis a nivel de vestigios o trazas se debe a que solo puede ser analizado cuando se efectúa una concentración previa de la muestra junto con una correcta eliminación de los agentes interferentes. En el presente trabajo se realizó la determinación del metidatión en diferentes tipos de aguas potables efectuando una preconcentración en una columna de sílice C-18 y un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución con detección en la región del ultravioleta del espectro electromagnético. La preconcentración se realizó en tiempo diferido (utilizando cartuchos) y en tiempo real o en línea (utilizando precolumnas). Con ambos métodos de preconcentración se puede llegar a determinar al metidatión en concentraciones del orden de las partes por billón o de partes por trillón cuando se aumenta la cantidad de agente adsorbente en los cartuchos. Además, el empleo de precolumnas permite realizar la determinación más rápida, sin riesgos de contaminación con un volumen de muestra más pequeño y un mejor coeficiente de variación (< 7.8%).

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas la necesidad de incrementar la producción agrícola ocasiona que los plaguicidas sintéticos tengan un uso intensivo. No obstante la importancia económica de estos productos, es esencial destacar que su aplicación indiscriminada y sin control daña al ambiente, contaminando suelos, agua y organismos. Estos compuestos generan también un impacto negativo en la calidad del agua potable, cuya fuente de abastecimiento proviene de las aguas superficiales y/o subterráneas.

Actualmente, los plaguicidas organofosforados se utilizan en gran escala a nivel mundial, sobre todo porque se han propuesto como sustitutos de los plaguicidas organoclorados que son altamente persistentes y bioacumulables. La mayoría de los plaguicidas organofosforados tienen baja volatilidad y su principal forma de degradación en el ambiente es la hidrólisis. Son compuestos menos persistentes; sin embargo, su toxicidad aguda es muy alta y los casos de intoxicaciones humanas son frecuentes, pudiendo ocasionar también efectos dañinos a largo plazo. De ahí la importancia de generar información rápida y continua sobre la calidad del agua, para minimizar los riesgos asociados al uso de estos contaminantes.

Los plaguicidas, al igual que muchos otros contaminantes, se encuentran en los medios acuosos a nivel vestigial o de trazas. Para llevar a cabo su control monitorio en el ambiente y en los alimentos, se deben desarrollar métodos de análisis muy selectivos y sensibles. Las técnicas analíticas más comúnmente usadas son la cromatografía de gases (CG) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Sin embargo, la gran dilución de las muestras y la complejidad de las matrices naturales exige una concentración de la muestra previa a su análisis, que comprenda una etapa de eliminación de los agentes interferentes a la detección.

La extracción líquida-sólida (ELS) cuyos principios se basan en la distribución de los solutos entre una fase sólida y la muestra acuosa, es una técnica que se adapta bien al enriquecimiento de trazas de muestras acuosas. La ELS puede efectuarse en tiempo diferido, es

decir, como una etapa independiente del análisis cromatográfico o en tiempo real o en línea, cuando es acoplada directamente al análisis cromatográfico. La eliminación de los compuestos interferentes a la detección pueden realizarse de una manera relativamente simple con la utilización de mezclas de elución que presenten diferentes fuerzas. Además los métodos en línea presentan varias ventajas con respecto a otros métodos de extracción, como la rapidez, la utilización de volúmenes pequeños de muestra, la fácil automatización y la eliminación de los riesgos de contaminación, ya que no existe manipulación de la muestra entre la etapa de preconcentración y la etapa de análisis.

El metidati6n es un plaguicida organofosforado, clasificado desde el punto de vista toxicol6gico como "altamente peligroso". El compuesto presenta tambi6n una solubilidad en agua de 240 mg/L. lo que le proporciona una alta posibilidad de contaminar el agua. Adem6s, es muy com6n que se aplique en formulaciones combinadas con el DDT, plaguicida organoclorado prohibido en muchos pa6ses, aunque en M6xico est6 catalogado como "restringido", ya que se sigue utilizando corrientemente (The Agrochemicals Handbook, 1983). Por lo tanto, en el presente trabajo se desarrollaron los siguientes objetivos:

1.1. OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un procedimiento analítico con el que se pueda determinar al metidati6n en el agua potable a concentraciones del orden de $\mu\text{g/L}$ o ng/L . Este procedimiento consistir6 en una preconcentraci6n por ELS (acoplada en l6nea o efectuada de manera independiente), y un an6lisis por CLAR.
- 2) Comparar la metodolog6a en tiempo real o en l6nea (on-line), con la metodolog6a en tiempo diferido (off-line) y seleccionar la mejor para efectuar la determinaci6n de las muestras.
- 3) Aplicar el procedimiento seleccionado para determinar el metidati6n en diferentes muestras de agua potable comerciales, incluyendo el agua del sistema de distribuci6n de la Ciudad de M6xico (Distrito Federal).

2. GENERALIDADES

2.1. CARACTERÍSTICAS DEL METIDATIÓN

2.1.1. *Uso y toxicidad*

El metidati3n es un plaguicida organofosforado, de uso agr3cola como insecticida-acaricida de contacto. En M3xico se usa para controlar las plagas en los cultivos de alfalfa, algod3n, c3rtamo, frijol, olivo y de frutos como el durazno, mandarino, mango, membrillo, naranjo, peral y otros. En las formulaciones viene mezclado con el DDT en emulsi3n o en polvo (The Agrochemicals Handbook, 1983; CICLOPLAFEST, 1994).

El compuesto es poco persistente en la naturaleza pero al ser clasificado toxicol3gicamente como altamente peligroso, ocasiona da3os al ambiente por causar la muerte a los peces, abejas y vida silvestre. Adem3s, desde el punto de vista de la salud es un irritante ocular, d3rmico y del tracto respiratorio. La ingesta diaria admisible (IDA) de este producto es de 0.001 mg/kg (CICLOPLAFEST, 1994).

Su mecanismo de acci3n es por inhibici3n de la actividad de la acetilcolinesterasa, al igual que muchos otros plaguicidas organofosforados. El fen3meno ocurre en el nivel de las sinapsis nerviosas, en donde el neurotransmisor acetilcolina act3a sobre la membrana postsináptica (la que recibe el impulso nervioso) a la que despolariza; de esta manera excita a las células efectoras: glándulas, fibras musculares lisas, fibras musculares estriadas y otras neuronas. Una vez conseguido su objetivo, la funci3n de este neurotransmisor debe terminar, lo que ocurre por acci3n de la acetilcolinesterasa, enzima que r3pidamente hidroliza a la acetilcolina, para que deje de actuar y las células efectoras entren en reposo, para volverse a reactivar cuando el organismo lo demande (CICLOPLAFEST, 1994; Haynes y Laws, 1991).

La inhibición de la actividad de la acetilcolinesterasa es en el sitio preciso en donde rompe la molécula de acetilcolina; por lo tanto, se generan gran cantidad de impulsos a las células eefectoras y esta estimulación continua causa la manifestación de esta intoxicación (Henaoy Corey, 1991).

2.1.2. Propiedades fisicoquímicas

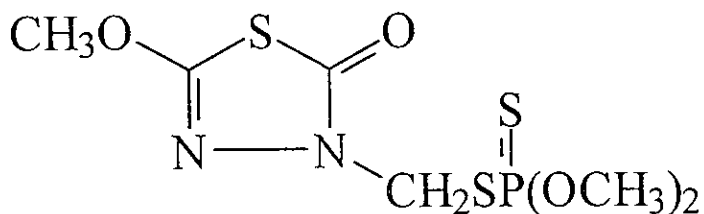
En el cuadro 1 se resumen las principales propiedades fisicoquímicas del metidatión; se pueden destacar su solubilidad en agua relativamente alta, su polaridad media ($\log P$ 1-3) según lo indica el valor del logaritmo del coeficiente de reparto agua/octanol ($\log P$) (Guenu y Hennion, 1994), y que su longitud máxima de absorción en el ultravioleta se encuentra en una región muy baja, lo que dificulta la detección con las muestras reales, si la eliminación de compuestos o elementos interferentes (o simplificación de la matriz) no se hacen correctamente (Haynes y Laws, 1991).

2.1.3. Métodos de análisis en muestras acuosas

La necesidad de contar con métodos analíticos eficaces para realizar un monitoreo de los residuos de plaguicidas organofosforados en agua es cada vez más creciente pues, con ayuda de estos, se puede obtener información rápida sobre la presencia de dichos compuestos en concentraciones de alerta o de peligro.

No existe un método único para la determinación de vestigios o trazas de plaguicidas, debido a la gran variedad de compuestos que se utilizan. Por esta razón, los métodos de análisis disponibles en agua son numerosos, usando la mayor parte de ellos cromatografía gases y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR). Para la preparación de la muestra comúnmente se requiere la extracción de los compuestos con diferentes disolventes, dependiendo de sus características físicas y químicas, seguido de la purificación del extracto orgánico y, finalmente, la determinación cromatográfica.

FÓRMULA ESTRUCTURAL



0,0'-dimetil S(2,3-dihidro-5-metoxi-2-oxo-1,3,4-tio Diazol-3-ilmetil)fosforoditiato.

Estado físico	Cristales incoloros
Peso molecular (g/mol)	301.96
Punto de fusión	39 a 40 °C
Presión de vapor (mm Hg)	3.37 x 10 ⁻⁶
Solubilidad	<u>agua : 240 ppm</u> acetona 690g/kg etanol 260 g/kg octanol 53 g/kg
λ _{max} Absorción UV	214 nm
log P _{oct}	2.42
Estabilidad a la hidrólisis	Estable a la hidrólisis en medio neutro o ligeramente ácido, menos estable a pH 1 o a pH 3 (50% de pérdida a pH 13 en 30 min a 25°C)

Cuadro 1. Propiedades fisicoquímicas del metidation (Haynes y Laws, 1991; CICOPLAFEST, 1994)

El procedimiento oficial empleado para la determinación del metidación en muestras de agua se basa en una extracción líquido-líquido con acetona seguida del análisis por CG y un detector de ionización a la flama, la realización de una extracción líquido-líquido para extraer el compuesto de la muestra presenta el inconveniente de ser muy laborioso y requerir una mayor manipulación lo cual podría ocasionar pérdidas en la extracción (Mueller y Smith, 1991).

Otro procedimiento reportado en la literatura en el que se determinaron simultáneamente varios plaguicidas organofosforados, entre ellos el metidación, en muestras de agua con alto contenido de materia orgánica, se llevó a cabo realizando una preconcentración en cartuchos de sílice C-18, seguida de un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). De esta manera se obtuvieron porcentajes de recuperación del 80% y límites de detección de 1 a 500 ppb (Johnson y col., 1991). Por otra parte, el método propuesto para el análisis de muestras acuosas subterráneas de la región agrícola de La Plana Castellón en España, en donde se usan insecticidas como el metidación y acaricidas para el control de plagas en los cultivos de cítricos, se basa en una ELS en tiempo diferido en cartuchos y discos de extracción C-18, con el subsecuente análisis por cromatografía de gases usando un detector de fósforo-nitrógeno, obteniendo porcentajes de recuperación para el metidación del 101-107% en un límite de detección de 0.1 ppb (Beltran y col., 1993). De los estudios realizados en alimentos, como el vino, se reporta un método de análisis de multiresiduos de plaguicidas organofosforados, entre ellos el metidación, basándose en la ELS usando cartuchos de C-8 para la purificación y concentración de la muestra, llevando a cabo el análisis por CLAR en una columna PR-18 y una fase móvil acetonitrilo/agua 50:50 y la determinación a una λ de 200 nm en un detector UV con arreglo de diodos. Con estas condiciones se lograron porcentajes de recuperación de 91% y llegando a un límite de detección de 0.02 ppm (Cabras y col., 1992).

En términos generales, se puede señalar que los procedimientos más recientes, propuestos para la determinación del metidación se basan en una extracción líquido-sólido

en tiempo diferido, seguida de un análisis por cromatografía de gases con detectores específicos. Aunque el análisis por CG es más sensible y rápido que por HPLC, presenta el inconveniente de que el acoplamiento en línea para la extracción de la muestra es más complicado de efectuarse en el laboratorio.

La CLAR también ha sido utilizada para el análisis, pero no se encontró información en donde se utilice una preconcentración en línea, con la cual la determinación se realice de manera más simple y directa, además de que es posible aumentar la sensibilidad de la detección UV.

Para comprender mejor cómo se desarrolló el método en el presente trabajo, a continuación se presentan algunos aspectos básicos sobre la cromatografía de líquidos y la preconcentración de muestras acuosas.

2.2. ASPECTOS FUNDAMENTALES DE LA CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La cromatografía es una técnica en la cual los componentes de una mezcla se transportan de manera diferencial a través de una fase estacionaria por medio de una fase móvil que fluye; las separaciones se basan así en las diferencias de velocidad de migración que existen entre los diferentes componentes de la muestra. El movimiento individual de los compuestos en cromatografía de líquidos resulta del equilibrio de distribución de los diferentes compuestos entre la fase estacionaria y la fase móvil (Snyder y Kirkland, 1979; Willard y Merritt, 1988).

En la figura 1 se presenta una separación hipotética de una mezcla de tres componentes por cromatografía de líquidos. En el paso (a) se aplica la muestra a la columna, en el paso (b) el disolvente o fase móvil comienza a fluir a través de la columna, provocando un movimiento de las moléculas de la muestra a lo largo de la columna y una separación parcial de sus componentes, en (c) sigue el flujo de la fase móvil y la migración

diferencial de los componentes y, finalmente, en (d) los tres componentes son separados cada uno del otro.

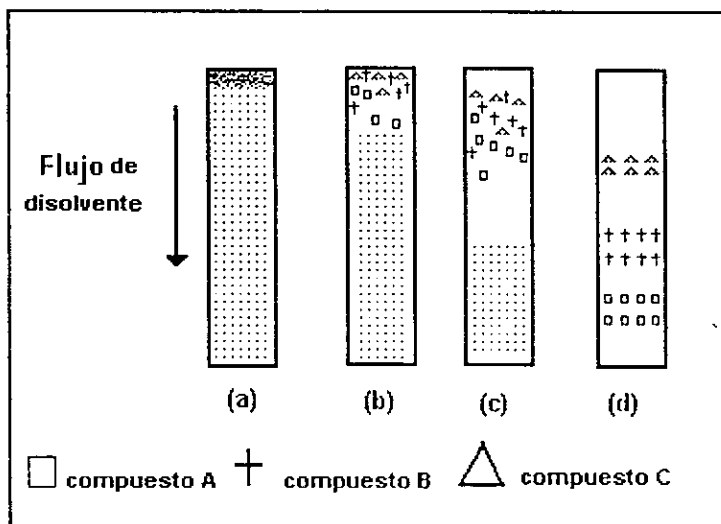


Figura 1. Separación de una mezcla de tres componentes en una columna

Como el movimiento del soluto puede ocurrir sólo gracias a la fase móvil, la velocidad promedio a la cual un soluto migra, depende de la fracción del tiempo que pasan en esta fase. Por lo tanto, las moléculas del compuesto C que pasan más tiempo en la fase estacionaria que en la fase móvil, se mueven a través de la columna más lentamente; las moléculas del compuesto A se encuentran en la fase móvil más tiempo, se mueven a través de la columna más rápidamente y se eluyen primero (Snyder y Kirkland, 1979).

2.2.1. *Parámetros que influyen en el control de la separación*

2.2.1.1. *Factor de capacidad*

La retención de un compuesto en una columna es referido por el factor de retención antes conocido como factor de capacidad (k'), el cual representa una medida de la afinidad del compuesto por la fase estacionaria (Lindsay, 1992).

El factor de capacidad es un parámetro experimental importante que se emplea ampliamente y se calcula experimentalmente con la siguiente relación:

$$k' = t_R - t_M / t_M$$

donde

t_R = Tiempo de retención. Es el tiempo entre la inyección de una muestra y la aparición de un pico de soluto en el detector de una columna cromatográfica.

t_M = Tiempo muerto. Es el tiempo que toma para que una especie no retenida pase a través de una columna.

Para incrementar la retención, la muestra debe estar en un ambiente donde prefiera la fase estacionaria. Esto es llevado a cabo por cambios en la polaridad de la fase móvil. Los valores óptimos de k' para las mejores separaciones se encuentran en un intervalo de 2 a 10 (Lindsay, 1992).

2.2.1.2. Selectividad

El factor de selectividad (α) para dos analitos en una columna proporciona una medida de que tan bien la columna los separa. Es definido para dos picos, como la relación de los factores de capacidad. Por convención esta ecuación es escrita de tal manera que $\alpha \geq 1$, es decir que el factor de capacidad con subíndice 2 corresponde al compuesto más retenido. La selectividad es expresada por la relación (Lindsay, 1992):

$$\alpha = k'_2/k'_1 = (t_{R2} - t_M)/(t_{R1} - t_M)$$

2.2.1.3. Eficiencia

La eficiencia de una columna cromatográfica se refiere a la magnitud del ensanchamiento de los picos que ocurre como consecuencia del desplazamiento de un compuesto a través de la columna. Para medir cuantitativamente la eficiencia de la

columna cromatográfica se usa el número de platos teóricos (N) o la altura de plato teórico (H), los cuales son definidos de la siguiente manera (Snyder y Kirkland, 1979):

$$N = 16 (t_R/w)^2$$

$$H = L/N$$

Donde

L = Longitud de la columna.

w= Es la anchura a la base del pico.

t_R = Tiempo de retención. Es el tiempo entre la inyección de una muestra y la aparición de un pico de soluto en el detector de una columna cromatográfica.

N = Números de platos teóricos.

Los valores pequeños de H y valores grandes de N proporcionan las columnas más eficientes. El número de platos puede ser incrementado, aumentando la longitud de la columna o disminuyendo el diámetro de partícula del empaque.

2.2.1.4. Resolución

El grado de separación de un componente de otro es descrito por la resolución (Rs), se calcula como la diferencia en el tiempo de retención de los dos solutos divididos por el promedio del ancho de los picos.

$$R_s = (t_{R2} - t_{R1})/0.5 (w_1 + w_2)$$

Cuando Rs = 1.5, la separación de dos picos es completa; una resolución de 0.75 no lo hace. Los tres parámetros descritos anteriormente (factor de capacidad, selectividad y número de platos teóricos) controlan la resolución. La interrelación de estos parámetros para definir la resolución es la siguiente (Skoog y col., 1992):

$$R_s = \left(\frac{1}{4}\right) \frac{(\alpha - 1)}{(\alpha)} \left(\frac{k'_2}{1 + k'_2} \right) (N_2)^{1/2}$$

donde el subíndice 2 se refiere al compuesto más retenido.

2.2.2. Instrumentación

La figura 2 es un diagrama que muestra los componentes importantes de un aparato común para cromatografía de líquidos de alta resolución o eficiencia, conocida por sus siglas en inglés como HPLC (High Performance Liquid Chromatography).

Un equipo de HPLC consta básicamente de una bomba de alta presión, un reservorio que suministre la fase móvil, una unidad de inyección para la introducción de la muestra, una columna de alta eficiencia, un detector conectado directamente o en línea y algún método para desplegar la señal del detector (Lindsay, 1992).

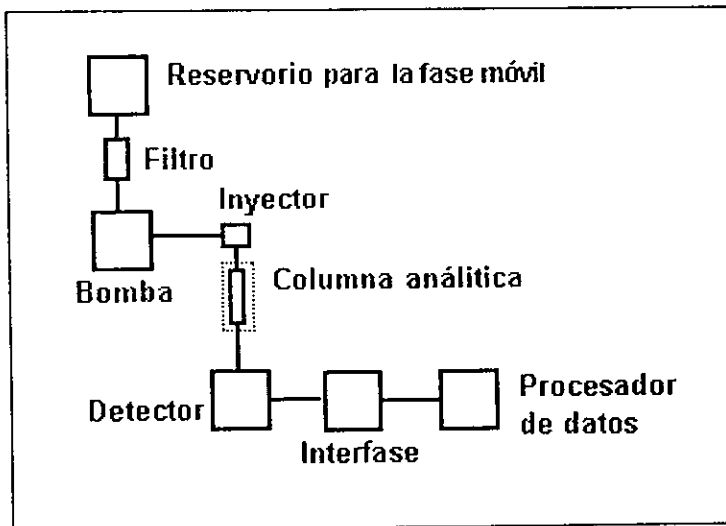


Figura 2. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución

2.2.3. Técnicas de cromatografía de líquidos

Dentro de la cromatografía de líquidos existen algunas subdivisiones dependiendo principalmente las características fisicoquímicas de los componentes de la muestra a separar. Los más importantes son:

1. Cromatografía de adsorción. Es un modo de retención en la cual la separación de los componentes de la muestra está basada en las diferencias en los intervalos de adsorción y desorción de los componentes de la muestra en las partículas de la superficie de la fase estacionaria.
2. Cromatografía de reparto. La separación es llevada a cabo debido a las diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra entre las fases estacionaria y móvil. Se puede llevar a cabo por medio de dos técnicas (1) Reparto líquido-líquido en donde una solución considerada la fase estacionaria es adicionada a un soporte sólido y el disolvente es drenado lentamente quedando distribuida de manera uniforme la fase estacionaria sobre el soporte y (2) Reparto en fases químicamente unidas, en donde la fase estacionaria está constituida por una matriz insoluble con grupos funcionales químicamente unidos como el octadecilsilano, el cual está unido a un soporte de sílice mediante ligaduras sililéter ($R_3\text{-Si-O-Si}(R_2)\text{-C}_{18}\text{H}_{37}$). Dependiendo de los grupos funcionales unidos a la sílice, la fase estacionaria puede tener carácter polar o apolar, llevándose a cabo la cromatografía en fase normal o en fase inversa, respectivamente.
3. Cromatografía de iones. Es un modo de retención en el cual los componentes de la muestra son separados en función de las diferencias en su carga y sus constantes de ionización.
4. Cromatografía de pares de iones. Es una alternativa a la de intercambio de iones usando una columna en fase inversa. El contraión orgánico (molécula formada por una cabeza polar cargada y una cola apolar hidrófoba) es incluido en la fase móvil y la separación de un compuesto iónico es llevada a cabo por fenómenos de reparto e interacciones electrostáticas.

5. Cromatografía de exclusión por tamaño. Las moléculas son separadas de acuerdo a su peso molecular (Braithwaites y Smith, 1985 ; Bidlingmeyer, 1992).

Cabe enfatizar que el análisis cromatográfico del metidati6n realizado en el presente trabajo, utiliza la cromatografía de reparto en fase inversa.

2.3. PRECONCENTRACI6N DE MUESTRAS ACUOSAS

Debido a que la mayoría de los contaminantes orgánicos estn presentes en aguas ambientales en cantidades vestigiales o de trazas (niveles de $\mu\text{g/L}$ o más bajos) se requiere de técnicas analíticas con límites de detecci6n muy bajos para poder “monitorear” directamente muestras de agua potable o estudiar el destino y transporte de los compuestos orgánicos directamente en el ambiente. Además, los compuestos orgánicos deben ser extraídos y concentrados realizando una correcta eliminaci6n de los compuestos co-extraídos que pudieran interferir en la detecci6n (Henion y Pichon, 1994).

Las técnicas de extracci6n más ampliamente utilizadas son la extracci6n líquido-líquido (ELL) y la extracci6n líquido-s6lido (ELS). A continuaci6n serán descritas, considerando más detalles de la última, ya que se trata de la técnica seleccionada en este trabajo.

2.3.1. Extracci6n líquido-líquido (ELL)

La preconcentraci6n de los compuestos orgánicos en muestras acuosas se efectúa comúnmente por extracci6n líquido-líquido(ELL), cuyos principios se basan en el reparto de un soluto entre el agua y un disolvente orgánico de extracci6n. La eficiencia del disolvente de extracci6n depende de la afinidad del compuesto por este disolvente y esto es medido por el coeficiente de distribuci6n, la relaci6n de volúmenes y el número de extracciones sucesivas. Esta técnica está limitada para el enriquecimiento de vestigios o trazas en muestras ambientales de analitos polares y es más accesible para analitos con coeficientes

de distribución grandes de naturaleza apolar (Hennion y Coquart, 1993). Otro inconveniente que presenta es que los disolventes de extracción comúnmente usados no son muy específicos, y los extractos orgánicos obtenidos son complejos para ser analizados. Aunque la ELL parezca simple y no requiere de equipo complejo, presenta problemas prácticos como son la emulsificación, el uso de volúmenes grandes de disolventes de alta pureza, en algunos casos tóxicos, el paso lento de su evaporación y el riesgo de contaminación y pérdida del analito (Smyth, 1992).

2.3.2. Extracción líquido-sólido (ELS)

Esta innovación en el procedimiento de extracción basado en el reparto, la adsorción, la afinidad o el intercambio iónico, comienza a tener una amplia aceptación debido a que es más rápida que muchas técnicas clásicas y, además, es adecuada para contaminantes de polaridad alta ($\log P < 1$), intermedia ($\log P 1-3$) y baja ($\log P > 3$), (Guenu y Hennion, 1994) dependiendo del adsorbente a usar. Sus principios se basan en la distribución de los solutos entre una fase sólida y la muestra acuosa (Smyth, 1992).

La ELS puede ser considerada como un proceso de cromatografía de líquidos simple, en donde el adsorbente es la fase estacionaria y la fase móvil es el agua en la muestra acuosa durante el paso de extracción o el disolvente orgánico durante el paso de elución. Los compuestos orgánicos que no son eluidos con el agua son atrapados en el adsorbente (Goewie y col., 1984).

Este método de preparación de muestra se adapta bien a la manipulación de muestras acuosas y se ha observado que se obtienen factores de enriquecimiento altos cuando los analitos son fuertemente retenidos por el adsorbente en la presencia de agua, y cuando hay una baja retención con el disolvente orgánico de elución (Padilla, 1997).

Un proceso típico de ELS en un cartucho presenta la siguiente secuencia representada en la figura 3:

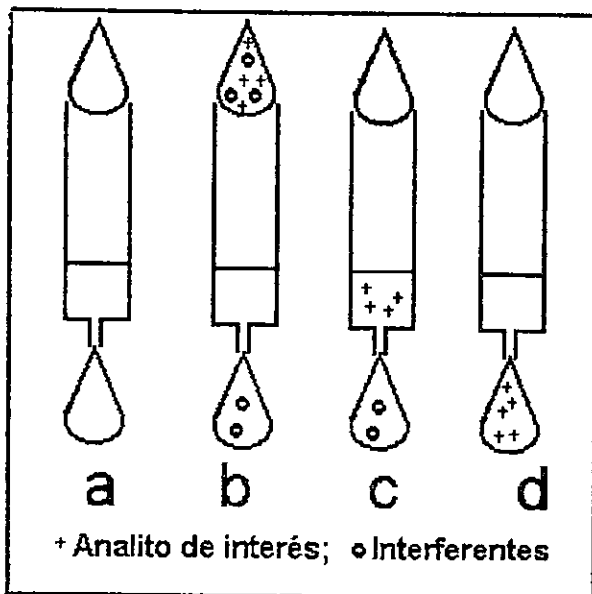


Figura 3. Protocolo típico de extracción sobre un cartucho empacado con una fase estacionaria C18

- (a) Acondicionamiento de adsorbente.
- (b) Aplicación de la muestra.
- (c) Una eventual limpieza.
- (d) La elución de los analitos concentrados.

En la etapa (a) el adsorbente es activado con 3-5 mL de metanol y acondicionado con el mismo volumen de agua desionizada. En la etapa (b) se aplica la muestra acuosa y las trazas de los compuestos orgánicos son retenidos por el adsorbente, mientras que el agua pasa a través de éste. La etapa (c) consiste en un paso de limpieza o “simplificación” de la matriz (en inglés “clean-up”) donde algunos de los compuestos interferentes pueden ser removidos aplicando 1-2 mL de mezcla de agua con un poco de disolvente orgánico. Finalmente, en la etapa (d) después de que el adsorbente es secado por medio de vacío, el analito concentrado es eluido con 1-5 mL de disolvente orgánico (Hennion y Pichon, 1994).

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

2.3.2.1. Metodología en tiempo diferido (off-line)

En este caso la extracción o preconcentración de la muestra se efectúa de manera independiente del subsecuente análisis cromatográfico. Las metodologías en tiempo diferido utilizan columnas o cartuchos empacados con el adsorbente apropiado. La figura 3 presentada anteriormente representa un buen ejemplo de este modo de extracción.

Este proceso presenta las siguientes ventajas con respecto a la extracción líquida-líquida:

- * Rapidez
- * Simplicidad
- * Posibilidad de muestrear en campo evitando el transporte de muestras voluminosas
- * Eficiencia al evitar la formación de emulsiones
- * Seguridad al reducir el uso de disolventes tóxicos
- * Menos cara
- * Menos laboriosa

2.3.2.2. Metodología en tiempo real o en línea (on-line)

El método de extracción en tiempo real o en línea se basa en que los solutos son retenidos sobre un soporte sólido empacado en una precolumna, los cuales son posteriormente desorbidos y transferidos directamente hacia una columna cromatográfica para su separación y cuantificación. El acoplamiento de la ELS a la CLAR se consigue mediante la ayuda de válvulas de cambio y tubería capilar, la cual es muy fácil de montar en el laboratorio. Un esquema simple se presenta en la figura 4, en donde la precolumna es colocada en la posición del inyector constituido por una válvula de 6 puertas. Con la válvula de inyección en la posición de "cargar" se lleva a cabo el acondicionamiento, aplicación de la muestra y eventual limpieza vía una bomba simple; mientras que la fase móvil, enviada por la bomba del cromatógrafo, va directamente a la columna analítica. La precolumna es acoplada a una columna analítica por colocación de la válvula en la posición

de inyección, los compuestos adsorbidos son eluidos directamente de la precolumna a la columna analítica por la misma fase móvil, la cual debe ser capaz de realizar la separación cromatográfica y la elución de los compuestos atrapados inicialmente en la precolumna (Hennion y Pichon, 1994).

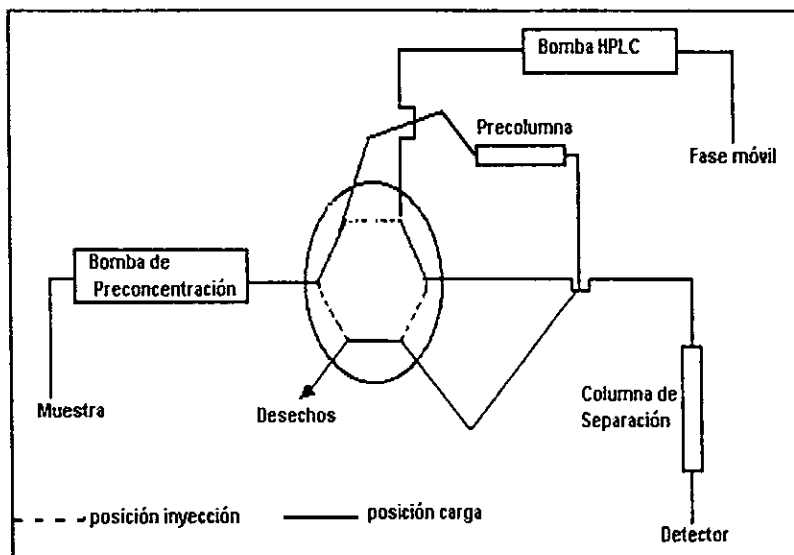


Figura 4. Acoplamiento de la extracción líquido-sólido en línea

Con esta metodología se esperan obtener resultados cuantitativos más exactos debido a que no hay manipulación entre la preconcentración y el análisis, el volumen de muestra es menor que en la ELS "off-line" porque la muestra entera es transferida y analizada. Además, se eliminan los riesgos de contaminación, es más rápida y de fácil automatización. También se tiene la gran ventaja de analizar la totalidad de los compuestos extraídos y no sólo una alícuota como ocurre con la metodología en tiempo diferido.

2.3.2.3. *Parámetros fundamentales en la ELS*

Los principios fisicoquímicos de la ELS pueden ser analogados a los de la cromatografía de líquidos: El adsorbente es equivalente a la fase estacionaria y el agua es

equivalente a la fase móvil para el manejo de muestras acuosas, los adsorbentes o fases estacionarias son, por lo general, los soportes apolares, por ser compatibles con la fase acuosa. Dentro de las más comunes se encuentran las sílices químicamente unidas C8 y C18, aunque también se utilizan los intercambiadores de iones para la extracción de los compuestos ionizables.

2.3.2.3.1. Volumen de fin de fijación

El parámetro más importante en ELS es el volumen de fin de fijación V_b , por su nombre en inglés (*breakthrough volumen*), que representa el volumen en el cual el soluto ya no es retenido por el adsorbente y comienza a ser eluido por el agua, bajo condiciones de no saturación. El V_b puede ser determinado directamente como se muestra en la figura 5, en donde la muestra acuosa que contiene el analito de interés en concentraciones trazas es percolada a través de una precolumna de extracción, la cual está conectada directamente al detector del cromatógrafo, en donde la absorbancia del eluyente es registrada. (Subra y col., 1988). La curva obtenida, que representa al frente de elución del compuesto estudiado, es idealmente bilogarítmica (ver figura 5). Inicialmente la absorbancia es nula ya que el compuesto está siendo retenido por el adsorbente y el efluente, que está siendo pasado por el detector, no lo contiene.

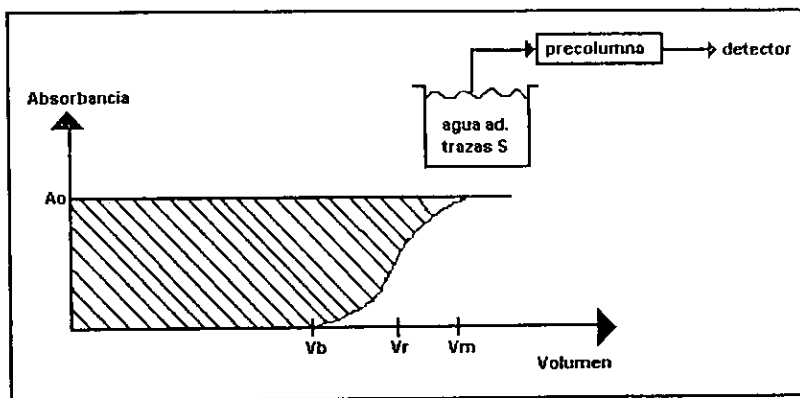


Figura 5. Frente de elución teórico obtenido por percolación de una muestra adicionada a través de una precolumna (A_0 = absorbancia inicial; V_b = volumen de fin de fijación, V_r = volumen de retención; S = soluto de interés; ad. = adicionada)

El volumen correspondiente al 1% de la absorbancia de la solución percolada (A_0), es considerado como V_b y el volumen correspondiente al punto de inflexión de la curva es considerado como el volumen de retención en agua pura V_r , es decir, el volumen de retención que se obtendría si se inyectara una solución concentrada del compuesto en la misma precolumna con una fase móvil constituida por agua pura. El volumen que corresponde al 99% de A_0 es considerado como el volumen máximo V_m .

La determinación directa de V_b es muy lenta de realizar, por lo que otro método aproximado para calcular V_b consiste en la preconcentración de volúmenes diferentes de muestras de agua, cada una adicionada con una cantidad constante del analito. Al variar el volumen de muestra aplicado, la concentración del analito en la solución cambia; sin embargo, la cantidad del compuesto permanece constante. El porcentaje de recuperación se obtiene comparando el área o la altura del compuesto eluido con el área obtenida por la inyección directa de la cantidad de compuesto adicionada a las muestras. El V_b ocurre cuando la relación de áreas de la cantidad inyectada y la preconcentrada es menor del 99%. En algunos casos, V_b puede disminuir cuando algo de metanol es adicionado a la muestra. Una ventaja de este método es que el V_b de diversos compuestos puede ser estimado simultáneamente y no se necesita una sensibilidad muy grande en el detector.

2.3.2.3.2. Rendimiento de extracción

Lo importante de conocer el V_b de un compuesto dado es que da una idea del rendimiento de extracción que se puede obtener en función del volumen de muestra aplicado, con una cantidad conocida de agente adsorbente. El rendimiento de extracción está definido como la relación existente entre la cantidad extraída y la cantidad percolada; esta última es igual a CV_p , donde C es la concentración del soluto en la muestra y V_p es el volumen percolado. Si V_p es inferior a V_b , la cantidad extraída por el cartucho o la precolumna es igual a la cantidad percolada. Bajo estas condiciones, el rendimiento de extracción es del 100%. Cuando V_p es superior a V_m , la cantidad del soluto retenida en la precolumna es constante y tiene su valor máximo que corresponde al área situada por

encima del frente de elución (zona rayada), es decir, CV_r . Así, el rendimiento es igual a V_r/V_p e inferior al 100%. Por lo tanto, la percolación de un volumen superior a V_m es inútil, puesto que ya no habrá más materia fijada. Finalmente, si V_p se encuentra entre V_b y V_m la cantidad extraída es inferior a la cantidad percolada, ya que desde que se alcanza V_b el soluto comienza a ser eluido por el agua. La relación que permite calcular el rendimiento de extracción no es simple, pero éste es inferior al 100%.

2.3.2.4. Adsorbentes más comunes

La selección del agente adsorbente a emplear para la preconcentración de los compuestos en estudio se fundamenta en la naturaleza química de estos mismos, de tal forma que el coeficiente de distribución entre el adsorbente y el agua deberá ser lo más grande posible. Los principales adsorbentes junto con el mecanismo de separación, el disolvente de elución y los analitos extraídos son reportados en la tabla 1.

Tabla 1. Los adsorbentes que pueden ser usados para la extracción de una fase sólida de compuestos presentes en nivel vestigial o de trazas en muestras acuosas

ADSORBENTE	MECANISMO DE SEPARACIÓN	DISOLVENTE DE ELUCIÓN	ANALITOS EXTRAÍBLES
Sílice unida a grupos alquilo (C8, C18)	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo)	Compuestos polares a neutros, polares moderadamente débiles
Copolímeros apolares estireno divinilbenceno	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo THF)	Compuestos neutros polares y moderadamente apolares
Carbono de grafito	Fase inversa	Disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo THF)	Compuestos neutros polares a apolares
Intercambiadores de iones	Intercambio de iones	Agua (ajuste de pH)	Compuestos orgánicos catiónicos y aniónicos (ajuste del pH de la muestra acuosa)

THF= Tetrahidrofurano

Los soportes apolares a base de sílice químicamente unida a grupos C18 son los más utilizados en ELS y también en el análisis cromatográfico. Su mecanismo de retención se basa en las interacciones hidrófobas, por lo que provocan una buena retención para los solutos apolares. Estos adsorbentes soportan muy bien la presión y se encuentran disponibles en granulometrías muy finas, desde 3 a 200 μm , por lo que se pueden utilizar en cartuchos o en precolumnas (Hennion y Pichon, 1994).

También existen los copolímeros apolares de estireno divinilbenceno, que son fases estacionarias que resisten condiciones de trabajo en un amplio intervalo de valores de pH, a diferencia de las sílices. La retención se lleva a cabo también por interacciones hidrófobas, aunque la presencia de anillos aromáticos en su estructura le permiten tener una retención más fuerte para los solutos aromáticos por medio de interacciones π - π (Hennion y Coquart, 1993).

En ELS se utilizan también otras fases como el carbono-grafito poroso, recientemente introducido, ya que se ha demostrado que presenta afinidad por ciertos compuestos polares, y por otra parte, están los intercambiadores de iones clásicos para extraer solutos iónicos o ionizables (Forgács y col., 1993).

De acuerdo con estos fundamentos, en este trabajo se usará la técnica de extracción líquido-sólido en tiempo diferido y en tiempo real o en línea para la preconcentración de la muestra y análisis por CLAR.

En los siguientes capítulos se muestra el desarrollo de la parte experimental, resultados y análisis de los mismos, y por último las conclusiones.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. REACTIVOS Y APARATOS

A continuación se listan el equipo, reactivos y materiales empleado en el desarrollo experimental.

Equipo cromatográfico

- ◆ Detector UV /Vis de absorbancia programable Perkin-Elmer, modelo 785A
- ◆ Bomba binaria e isocrática para cromatografía de líquidos, Perkin Elmer, modelo 250
- ◆ Programa: PE Nelson 900, serie 900, serie de la interface 950 A/970
- ◆ Columna analítica de acero inoxidable (15 cm x 4.6 mm de diámetro interno) empacada con fase "Nucleosil" C-18 de 5µm de diámetro de partícula
- ◆ Columna analítica de acero inoxidable (25 cm x 4.6 mm de diámetro interno) empacada con fase PRP-1 de 5 µm de diámetro de partícula

El sistema en línea fue montado mediante una serie de conexiones de tubería capilar de acero inoxidable y:

- Válvula Rheodyne Cotati, California, modelo 7000 de seis entradas y dos vías
- Bomba isocrática ELDEX, modelo CC-100-S
- Precolumna de acero inoxidable (1.3 cm X 4.5 mm d.i.) empacada con fase "Nucleosil" C-18 de 5 µm de diámetro de partícula
- Estuche para precolumna

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

- Jeringa Hamilton de 0-100 µL
- Extractor múltiple de 10 cartuchos
- Cartuchos de extracción "Spe-ed" C18/14 de 500 mg
- Bomba peristáltica de 4 vías Isco, modelo WIZ
- Baño de ultrasonido Branson modelo 1210
- Micropipeta de volumen variable de 100µL a 1000µL Eppendorf Serie 2000
- Potenciómetro Orion 720A

- Balanza analítica Mettler Toledo, modelo AG245
- Sistema de filtración por vacío de vidrio Sartorius
- Membranas filtrantes de 47 mm de diámetro, con un diámetro de poro de 0.45 μm , a base de "nylon" (nilón)
- Espectrofotómetro GBCO UV/Vis 911

Los disolventes orgánicos empleados fueron:

- ⇒ Acetonitrilo grado "HPLC" de EM SCIENCE
- ⇒ Metanol grado "HPLC" de EM SCIENCE
- ⇒ Agua grado "HPLC" de EM SCIENCE
- ⇒ Agua tridestilada

Los reactivos empleados en este trabajo fueron:

- ◊ Estándar de Metidación con un grado de pureza certificada del 99%, proporcionados por Chem Service
- ◊ Ácido perclórico tridestilado con una pureza de 99.9%, suministrado por Aldrich
- ◊ Hidróxido de sodio, grado reactivo, J.T. Baker
- ◊ Sulfato de amonio, grado reactivo, J.T. Baker
- ◊ Acetato de amonio, grado reactivo, Sigma Aldrich

Solución madre

Todas las disoluciones del metidación utilizadas fueron preparadas a partir de una disolución madre concentrada (100 ppm) que se preparó de la siguiente manera: Se pesó la cantidad de soluto necesaria (10 mg) y se disolvió en 10 mL de metanol grado "HPLC", el cual una vez disuelto se transfirió y aforo cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL, con metanol. La solución fue almacenada a una temperatura de -4°C y, periódicamente, era probada por cromatografía para verificar su estabilidad.

Filtración de disolventes

Los disolventes antes de ser usados fueron filtrados usando una membrana de "Nylon" (nilón) de 0.45 μm acoplada a la unidad de filtración por vacío. Antes de usar estas membranas fueron acondicionadas sumergiéndolas en metanol, y después con el disolvente a filtrar.

3.2. METODOLOGÍA

El estudio experimental realizado tuvo como objetivo el establecimiento de las condiciones de:

- a) El análisis cromatográfico
- b) La preconcentración en tiempo diferido
- c) La preconcentración en tiempo real o en línea

a) El análisis cromatográfico consistió en efectuar la separación adecuada del metidatión otros picos correspondientes a compuestos también presentes en el extracto. Para realizar esto, se analizó una solución estándar de metidatión, para lo cual se seleccionó la composición de la fase móvil óptima por medio de las curvas de retención del compuesto en función del porcentaje de disolvente orgánico y del pH de la fase móvil. También se eligió la longitud de onda adecuada para la detección por absorción en la región ultravioleta. Finalmente, con los parámetros anteriores establecidos, se procedió a conocer la respuesta del detector y el límite de detección del sistema seleccionado.

b) La preconcentración en tiempo diferido (llamada "off-line" en inglés) se efectuó en cartuchos "Spe-ed" empacados con una sílice C-18. Inicialmente se procedió a elegir el disolvente y el volumen de elución, así como el volumen de muestra óptimo para la preconcentración, mediante la obtención de la curva del rendimiento de extracción en función del volumen percolado con muestras de agua ultrapura y agua potable adicionadas con diferentes cantidades del estándar. Con las condiciones establecidas, el método se aplicó a diferentes muestras de agua potable que fueron adicionadas con metidatión a concentración de ppm y ppb.

c) La preconcentración en tiempo real o en línea (llamada "on-line", en inglés) se efectuó en precolumnas empacadas también con una sílice C-18. En este caso, la elección de la fase móvil de elución dependió de la compatibilidad de la fase móvil del análisis cromatográfico. También se optimizó el volumen de muestra a percolar mediante la curva del rendimiento de extracción en función del volumen percolado. La aplicación a diferentes muestras de agua potable se realizó, finalmente.

El esquema general de la metodología se presentan en la figura 6. A continuación se hace una descripción detallada de la misma.

3.2.1. Análisis cromatográfico

3.2.1.1. Selección de la longitud de onda para la detección

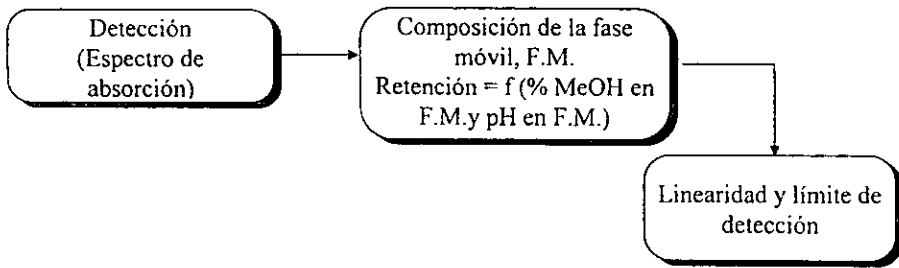
Para determinar la λ óptima para la detección del metidatión se obtuvo el espectro de absorción barriendo en un intervalo de 200 a 400 nm usando una disolución de 10 mg/L disuelta en metanol. Se eligió para el análisis la longitud a la cual el compuesto presenta la máxima absorción. La λ seleccionada como óptima fue confirmada por cromatografía por la obtención del tamaño del pico máximo.

3.2.1.2. Selección de la composición de la fase móvil

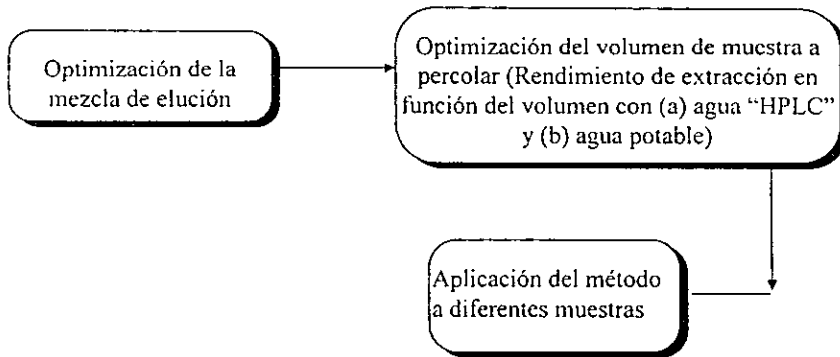
La selección de la composición de la fase móvil óptima para el análisis se basó en el estudio de la retención del metidatión en una columna empacada con una fase estacionaria Nucleosil C-18, con diferentes mezclas de agua/disolvente orgánico.

Esto se realizó probando dos disolventes orgánicos, para elegir el que mejor permitiera la separación del metidatión de compuestos interferentes que aparecen comúnmente en el volumen "muerto" cuando se trabaja con muestras reales. La obtención de picos de una mejor forma y simetría también fue un criterio de selección.

1.- ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO



2.- PRECONCENTRACIÓN EN TIEMPO DIFERIDO



3.- PRECONCENTRACIÓN EN TIEMPO REAL O EN LÍNEA

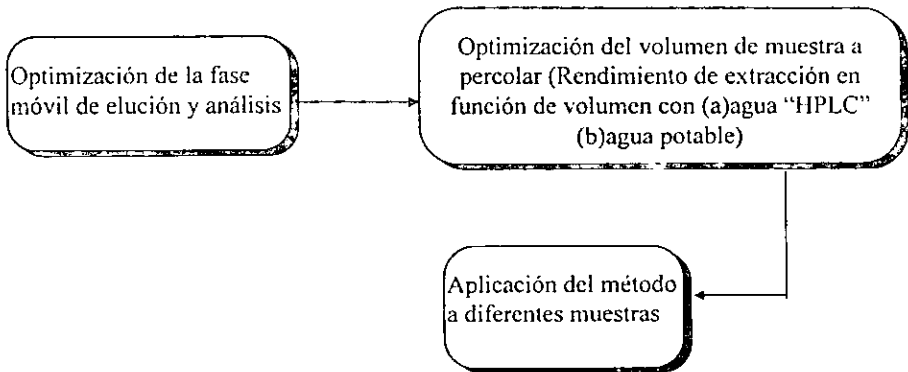


Figura 6. Diagrama general de la metodología experimental

Los disolventes orgánicos probados fueron el metanol y el acetonitrilo y con cada uno de ellos se fue variando el % en la fase móvil, en un intervalo de 85-55%, con intervalos de 5%, inyectando cada vez 20 μ L de una solución de 10 ppm de metidati3n. Despu3s de calcular k' , se traz3 la curva del logaritmo del factor de retenci3n (k') = f (% disolvente org3nico de la fase móvil).

Por otra parte, se estudio la influencia del pH en la retenci3n del metidati3n. Este estudio es importante porque los compuestos que presentan propiedades 3cido-base son mejor retenidos a un pH tal que predomina la forma molecular. De conocerse el pKa de los compuestos, la elecci3n del pH adecuado para lograr una mayor retenci3n es muy simple; por ejemplo, considerando el 3cido ac3tico cuyo pKa es de 4.6 y que presenta una forma molecular a un pH inferior a su pKa (-2 unidades) y una forma i3nica a un pH superior a su pKa (+2 unidades), puede evaluarse sin problemas. Por lo tanto, debido a que en la literatura no se encontr3 un pKa para el metidati3n, se procedi3 a realizar el estudio con una columna empacada con una fase estacionaria polim3rica PRP-1, cuyas caracteristicas permiten trabajar en un intervalo de pH muy amplio sin que sufra da3o la columna; adem3s, esta fase estacionaria permite de manera muy evidente demostrar la diferencia en la retenci3n de la forma molecular y forma i3nica de un mismo compuesto.

Asi, se realiz3 la gr3fica del t_R en funci3n del pH de la fase móvil inyectando una soluci3n de 10 ppm de metidati3n en la columna antes mencionada. La fase móvil estaba constituida por una mezcla de disoluci3n acuosa ajustada a diferentes valores de pH (de 2-8) y acetonitrilo.

Los valores de 2-5 se ajustaron con 3cido percl3rico diluido, el de 6 fue el del agua grado "HPLC", el de 7 con acetato de amonio 0.005 M y el de 8 con una soluci3n de NaOH diluida. El pH se midi3 en cada uno de los casos en el potenciómetro.

3.2.1.3. Respuesta del detector y límite de detecci3n

La linealidad es una medida del grado en que la curva de respuesta del detector en funci3n de la concentraci3n se aproxima a una lnea recta.

Para conocer la respuesta del detector a la λ seleccionada en función de la concentración analizada, se graficó el valor del área del pico cromatográfico correspondiente a diferentes soluciones estándar de metidatió en metanol. Se emplearon concentraciones de 50, 45, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1 mg/L. La composición de la fase móvil fue la misma con la que se efectuaron los análisis (ver resultados) y un flujo de 1 mL/min.

En este caso, la concentración de la solución estándar es la variable independiente y la variable dependiente es la señal o respuesta del detector expresada en unidades de área.

3.2.2. Preconcentración

Se efectuaron los ensayos de preconcentración de las muestra acuosas en cartuchos (metodología "off-line") y en precolumnas (metodología "on-line") y se compararon los resultados obtenidos con cada uno.

3.2.2.1. Preconcentración en tiempo diferido ("off-line")

El metidatió es un compuesto medianamente polar que desde el inicio se supuso sería retenido en un agente adsorbente como la sílice C-18, pero con un volumen de muestra limitado. Por lo tanto, primero se establecieron las condiciones para la elución completa del metidatió previa concentración en cartuchos de 500 mg de un volumen pequeño de la disolución del compuesto y después se determinó el volumen a percolar de las muestras sin que se presentara pérdida del compuesto.

3.2.2.1.1. Optimización de la elución

Las condiciones de elución se establecieron probando diferentes combinaciones de volumen y composición de una mezcla de metanol/agua. A fin de obtener el máximo factor de enriquecimiento, se debe utilizar el menor volumen posible de disolvente para eluir el

plaguicida adsorbido, así como emplear la mezcla adecuada para llevar a cabo una elución de los compuestos lo más selectiva posible, es decir, que es necesario hacer una limpieza o “clean-up”, que elimine la mayor parte de los compuestos interferentes a la detección.

Para seleccionar el volumen y composición de la mezcla de elución, se percolaron a través de un cartucho de extracción 250 mL de agua grado “HPLC” con una concentración de 3 mg/L de metidati6n. El protocolo de eluci6n y eliminaci6n de compuestos interferentes se llev6 a cabo con una primera fracci6n de 5 mL de una mezcla MeOH/Agua, (ver tabla 2) que se colect6 en un frasco de vidrio y con una segunda fracci6n de 5 mL de la misma mezcla MeOH/Agua la cual se colect6 en un segundo frasco; finalmente, se inyectaron en el cromat6grafo una alicuota de 20 μ L de cada uno los extractos para calcular el porcentaje de recuperaci6n del metidati6n de los cartuchos de extracci6n, por medio de la comparaci6n de 6reas con el pico obtenido de la inyecci6n de 20 μ L de una soluci6n de concentraci6n igual a la que se esperaba obtener si el 100% del compuesto extraído fuera eluido. Las mezclas de eluci6n probadas se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Composici6n a probar de las mezclas de eluci6n

Mezcla de Eluci6n
Metanol/Agua
100
85:15
80:20
70:30
60:40
50:50

3.2.2.1.2. Optimizaci6n del volumen de muestra a percolar

3.2.2.1.2.1. Rendimiento de extracci6n en agua pura

La determinaci6n del rendimiento de extracci6n se realiz6 aplicando en los cartuchos una cantidad constante de metidati6n en diferentes vol6menes de agua “HPLC”,

obteniéndose de esta manera diferentes concentraciones. Cada muestra de agua fue percolada en cartuchos de extracción empacados con sílice C-18 de 500 mg a un flujo constante de 3 mL/min por medio de una bomba peristáltica. Los cartuchos a su vez estaban conectados a un extractor múltiple con regulador de presión conectado a la fuente de vacío para que la muestra fuera aspirada.

Los volúmenes de agua utilizados fueron 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500 mL y la cantidad adicionada de 0.15 mg. Después de preconcentrar la muestra, la totalidad del metidatión adsorbido en el cartucho fue eluido con la mezcla de elución anteriormente determinada y una alícuota de 20 μ L fue inyectada por duplicado en el cromatógrafo.

El rendimiento de extracción obtenido para cada volumen de agua percolada se calculó comparando el área del pico obtenido de la inyección de 20 μ L de una disolución estándar de 30 mg/L de metidatión, la cual corresponde a la concentración de metidatión que se esperaría encontrar en 5 mL del material eluido de los cartuchos si se recuperara el 100%. El porcentaje de recuperación de las muestras se determinó calculando el cociente del área relacionando las unidades de área del pico de la solución estándar y el área del pico correspondiente a cada volumen de agua percolada por 100 (la mezcla de elución se escogió de tal manera que se asegurara la elución completa de la cantidad retenida) en el material adsorbente. Si la cantidad total retenida en el cartucho es igual a la cantidad eluida se obtendrán porcentajes de recuperación del 100%. Justo antes de que el metidatión empiece a fugarse en un 1% del cartucho y a eluirse junto con el agua, se considera como el volumen de muestra que podrá percolarse y en el cual se obtengan porcentajes de recuperación del 100%. A este volumen se le conoce como el volumen de fin de fijación (V_b). Los volúmenes de muestra a percolar deben ser inferiores a V_b para obtener rendimientos de extracción del 100%.

3.2.2.1.2.2. Rendimiento de extracción en agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria

El rendimiento de extracción también se determinó aplicando en cartuchos de 250, 500 y 1000 mL de una muestra de agua potable de la red de distribución de la Ciudad

Universitaria, adicionada con la misma cantidad anterior, con el propósito de tener una idea del efecto en la adsorción del metidatión y en el porcentaje de recuperación de una matriz real.

3.2.2.1.3. Aplicación del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable adicionada con el metidatión en concentraciones diluidas

Esta última etapa tiene por objeto evaluar la capacidad del método establecido para determinar al metidatión a bajas concentraciones en diferentes tipos de agua potable y con esto ver en qué medida la matriz de la muestra afecta el porcentaje de recuperación del metidatión. Cada muestra fue analizada de acuerdo al protocolo desarrollado, primero sin adicionar y después adicionada con el metidatión a una concentración de 10 µg/L, percolando un volumen de muestra de 1 L.

3.2.2.2. Preconcentración en tiempo real o en línea (on-line)

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

El acoplamiento de la preconcentración al análisis cromatográfico se efectuó por medio de dos válvulas de 6 entradas asociadas entre sí y tuberías capilares conectadas por medio de uniones y férulas especiales.

En la figura 7 y la tabla 3 se muestran el esquema de montaje y las posiciones simultáneas de las válvulas para poder efectuar cada una de las operaciones.

En el esquema, las válvulas son denominadas con la letra "A"(válvula de preconcentración) y "B"(válvula del cromatógrafo).

La válvula "B" se encuentra conectada a la bomba analítica a través de la entrada 2, el bucle de inyección está colocado en las entradas 6 y 3 y a la válvula "A" por la entrada 1. Las entradas 5 y 4 son para desechos.

La bomba de preconcentración está unida a la válvula "A" por la entrada 1 y la columna de extracción está montada entre las entradas 2 y 5 y la columna analítica por la entrada 3.

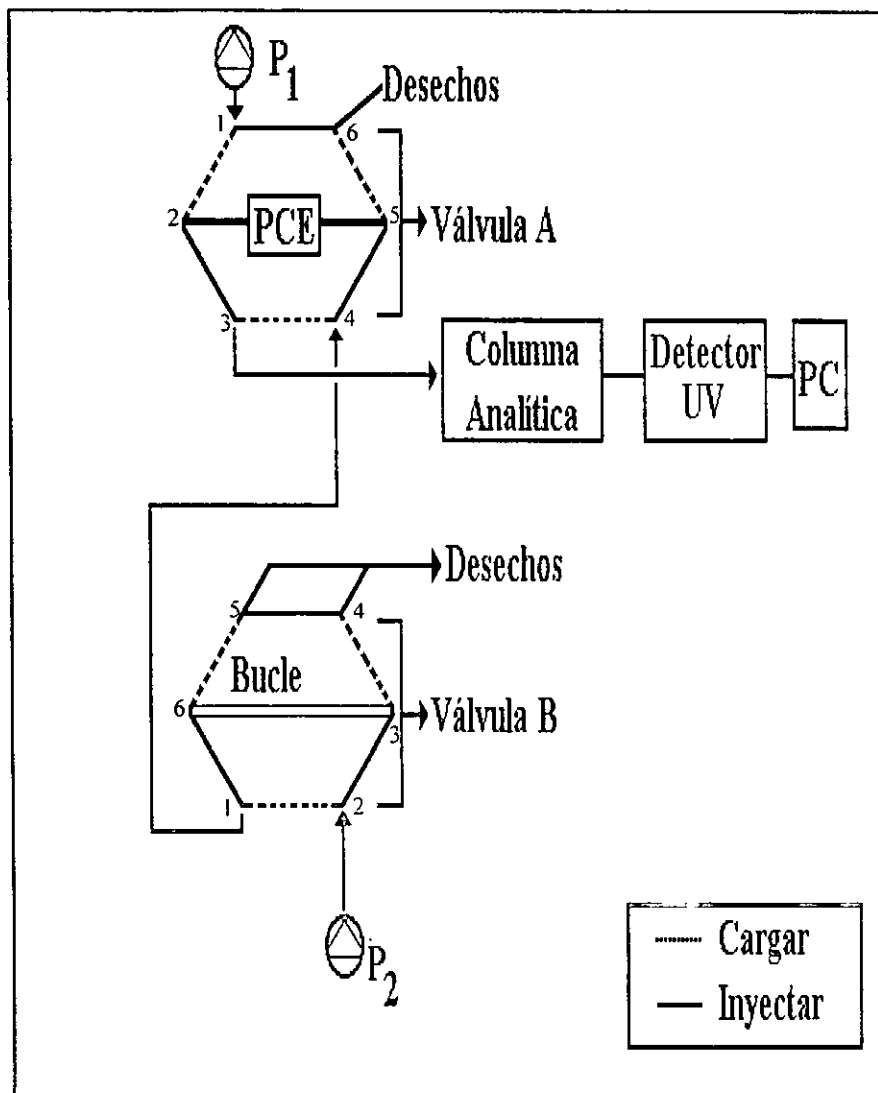


Figura 7. Montaje experimental para la preconcentración y análisis en línea (PCE= precolumna de extracción, UV= ultravioleta, PC= computadora personal)

La válvulas están unidas entre si por la entrada 4 de la válvula “A” y la entrada 1 de la válvula “B”. En la entrada 2 llega el flujo de la bomba del cromatógrafo.

Tabla 3. Posición de las válvulas y bombas empleadas para preconcentración y análisis en línea

OPERACIÓN	VÁLVULA A	VÁLVULA B	BOMBA
Acondicionamiento de PCE ⁽¹⁾ y limpieza de las conexiones ⁽³⁾	Cargar	Cargar	Preconcentración
Aplicación de la muestra	Cargar	Cargar	Preconcentración
Acondicionamiento de columna analítica ⁽²⁾	Cargar	Cargar	Analítica
Elución de PCE y análisis ⁽²⁾	Inyectar	Cargar	Analítica
Reacondicionamiento de PCE ⁽²⁾	Inyectar	Cargar	Analítica
Inyección directa	Cargar	Inyectar	Analítica

(1) Acondicionamiento, primero 5 mL de MeOH; segundo 10-15 mL agua grado “HPLC”; (2) Fase móvil: MeOH/Agua 65:35; (3) Con 2-3 mL agua grado “HPLC”, PCE=precolumna de extracción

3.2.2.2.2. Descripción del procedimiento de preconcentración y análisis

Las dos primeras etapas del proceso, que son el acondicionamiento de la precolumna de extracción (PCE) y aplicación de la muestra, se realizan con la bomba de preconcentración (P1). Las etapas restantes, como es el acondicionamiento de la columna analítica, elución, análisis, reacondicionamiento de PCE e inyección directa, son efectuadas con la bomba analítica (P2).

3.2.2.2.3. Optimización de la fase móvil de elución

Consistió en la elección de una fase móvil cuya composición permitiera eluir completamente los compuestos retenidos en la precolumna de extracción y, al mismo tiempo, sirviera para llevar a cabo la separación cromatográfica del pico de metidatió de otros compuestos interferentes preconcentrados y co-eluidos.

Se llevó a cabo la extracción y análisis en línea de 20 mL de agua grado “HPLC” adicionada con 0.8 µg de metidatión para establecer si el acoplamiento en línea era el correcto. Esto puede verificarse si no existe o se da un ensanchamiento del pico.

3.2.2.2.4. Rendimiento de extracción en agua pura

La determinación del rendimiento de extracción se realizó adicionando 0.8 µg de metidatión a cada uno de los siguientes volúmenes de agua grado “HPLC”: 10, 20, 30, 40, 50, 70, 90, 100, 120, 150, 200, 250 mL. Las soluciones fueron preconcentradas en una precolumna y analizadas en línea. El rendimiento de extracción se calculó comparando el área obtenida de la preconcentración de la solución de 10 mL con el área de las otras diferentes soluciones. Se consideró que un volumen de 10 mL es demasiado pequeño para provocar la fuga del compuesto de la precolumna, verificándose esto en los ensayos.

3.2.2.2.5. Rendimiento de extracción en agua potable tomada de la red distribución de la Ciudad Universitaria

Se aplicó el método anterior para el cálculo del rendimiento de extracción con 50, 100, 150 mL de agua potable tomada de la red de distribución de la Ciudad Universitaria, adicionada con 0.8 µg de metidatión, con el propósito de observar la retención del metidatión en muestras reales.

3.2.2.2.6. Aplicación del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable en concentraciones diluidas

El método establecido se aplicó al análisis de diferentes muestras de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria y comerciales de las marcas “Electropura y Proplus”. Los ensayos se efectuaron con muestras de 100 mL sin adicionar y adicionadas con el metidatión a una concentración de 1 µg/L .

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISIS

4.1.1. Detección

En la figura 8 se muestra el espectro de absorción del metidati6n. Se observa que la longitud de onda en la cual se tiene la máxima absorci6n es de 214 nm. Aunque la longitud de onda elegida para trabajar fue de 220 nm, debido a que en ésta es menor la absorci6n de otros compuestos que interfieren en el análisis del metidati6n y del propio metanol utilizado en la fase m6vil.

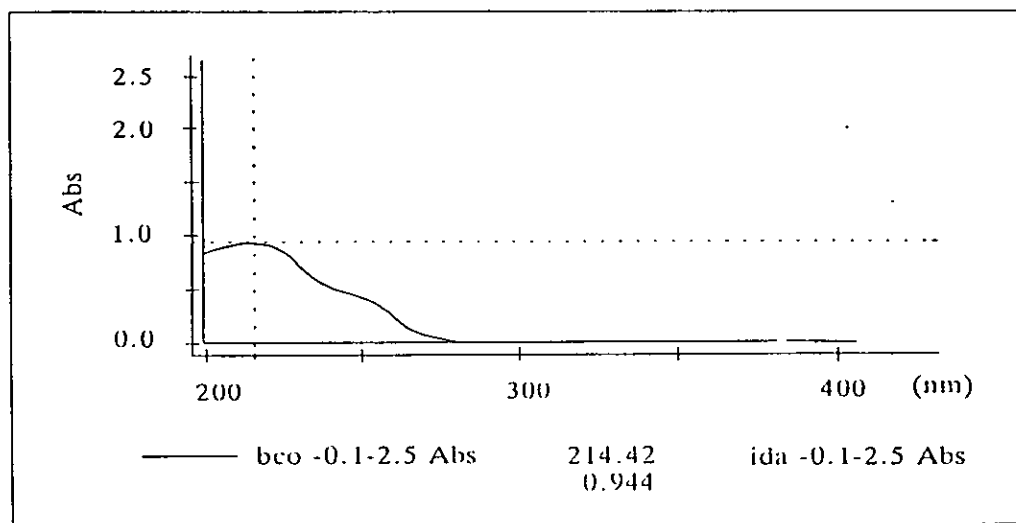


Figura 8. Espectro de absorci6n de una soluci6n 10 ppm de metidati6n

Se puede notar que esta λ no es muy selectiva, pero es la mejor para la detecci6n, además de que es importante considerar que el tratamiento de la muestra permitirá obtener una mejor sensibilidad y selectividad al eliminar gran parte de los compuestos interferentes a la detecci6n.

4.1.2. Composición de la fase móvil

Cuando se analizan muestras reales se observa generalmente la elución de un gran pico en el volumen muerto, al principio del cromatograma. Este pico al ser muy grande, interfiere en la detección e integración de los picos de los solutos que eluyen en tiempos de retención muy cortos. Por esta razón, la composición de la fase móvil para el análisis del metidación fue elegida de tal manera que permitiera separarlo de este gran pico de elución.

De los dos disolventes orgánicos (metanol y acetonitrilo) probados se eligió el metanol porque este disolvente es el más económico, no obstante que los 2 disolventes fueron apropiados para llevar a cabo una adecuada retención y separación del metidación de otros picos. En este caso se llegó a medir la retención solamente hasta la composición metanol/agua 55:45 debido a que el t_R del metidación aumentó hasta más de 20 min. Además, al permanecer mayor tiempo el compuesto en la columna ocasiona ensanchamiento del pico, de tal manera que el área del pico no se puede integrar adecuadamente y se pierde sensibilidad.

Los valores del tiempo de retención y del logaritmo del factor de capacidad ($\log k'$) en función del porcentaje del disolvente orgánico seleccionado para la fase móvil, se presentan en la tabla 4.

De estos valores se eligió para trabajar una composición de fase móvil de entre 50 y 60% MeOH, la cual presenta un tiempo de retención adecuado para llevar a cabo los análisis y una buena separación del metidación y los picos que podrían presentarse en el volumen muerto.

En la figura 9 se observa la dependencia lineal característica de la mayoría de los solutos, del logaritmo del factor de capacidad del metidación con el porcentaje del metanol en la fase móvil.

El grado de retención de un soluto en cromatografía en fase inversa depende de su grado de ionización. Por lo tanto, es importante conocer el pH óptimo que debe tener la fase móvil para obtener la retención máxima de un compuesto que posea propiedades ácido-base y también para obtener tiempos de retención reproducibles.

Tabla 4. Factor de capacidad k' en función del % de metanol en la fase móvil (mezclas metanol/agua)

%METANOL	t_R (min)	k'	$\log k'$
80	3	0.80	-0.090
75	3.70	1.24	0.093
70	5.10	2.10	0.32
65	7.25	3.40	0.53
60	11.42	5.90	0.77
55	18.33	10.12	1.00

donde $t_0 = 1.6$ min

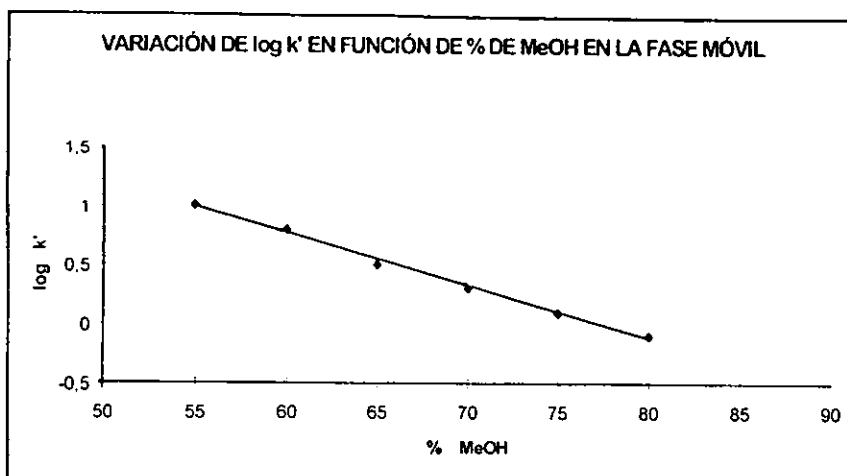


Figura 9. Variación de $\log k'$ en función del porcentaje de metanol en fase móvil (Columna: Nucleosil C-18 de 5 μm , 15 cm X 0.46 cm d.i.; fase móvil: Diferentes mezclas de MeOH/Agua; flujo: 1 mL/min; detección: UV a 220 nm; volumen de inyección: 20 μL)

El objetivo de estudiar la dependencia del pH en la retención del metidación es establecer si es necesario ajustar el pH en la fase móvil y de las muestras a percolar.

En la figura 10 y la tabla 5 se muestra el efecto del pH en la fase móvil en el tiempo de retención del metidación.

Se puede observar que en el intervalo de pH estudiado de 2-8, que es en el cual se puede trabajar con las sílices por razones de estabilidad, el tiempo de retención del metidación es constante y, por lo tanto, independiente del valor de pH.

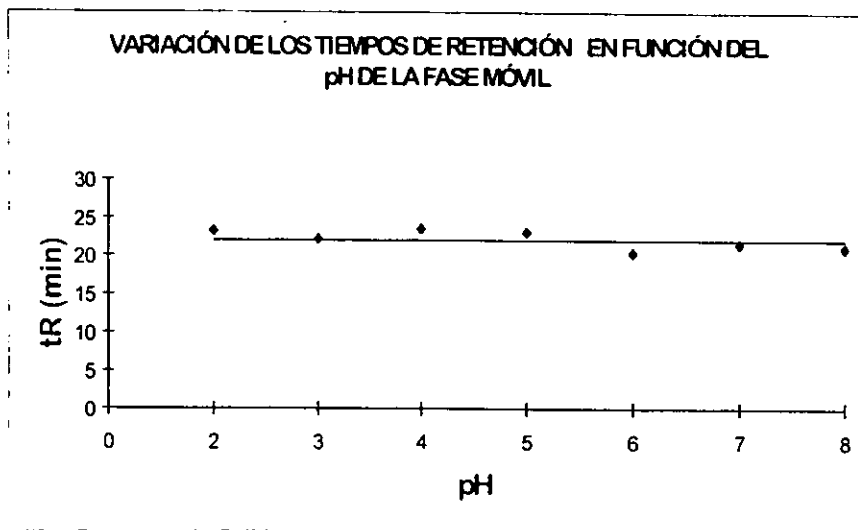


Figura 10. Variación de los t_R en función del pH en el agua de la fase móvil (Columna:PRP-1 de 5 μ m, 25 cm X 0.46 cm d.i.; fase móvil: Mezcla de ACN/Agua 50:50 ajustada a diferentes valores de pH con ácido perclórico, hidróxido de sodio y/o hidróxido de amonio; flujo: 1.5 mL/min; detección:UV a 220 nm; volumen inyectado: 20 μ L)

Tabla 5. Variación del tiempo de retención y de k' para el metidatión en diferentes valores de pH(s)

pH	t_R	k'
2	23.26	13.53
3	22.23	12.89
4	23.50	13.68
5	23.10	13.43
6	20.43	11.76
7	21.53	12.45
8	21.08	12.70

Esta fase estacionaria, como ya se mencionó en la metodología, presenta la particularidad de diferenciar muy bien entre la retención de un mismo compuesto que presenta forma molecular y forma iónica. Cuando se estudian compuestos con propiedades ácido-base, en valores de pH alrededor del pKa se da un salto brusco en los tiempos de retención, que conduce a una curva sigmoideal cuyo punto de inflexión representa el pKa (Coquart y col.; 1993).

4.1.3. Linearidad y límite de detección

En la figura 11 se ilustra el comportamiento de la respuesta del detector en función de la concentración de la solución inyectada de metidati6n.

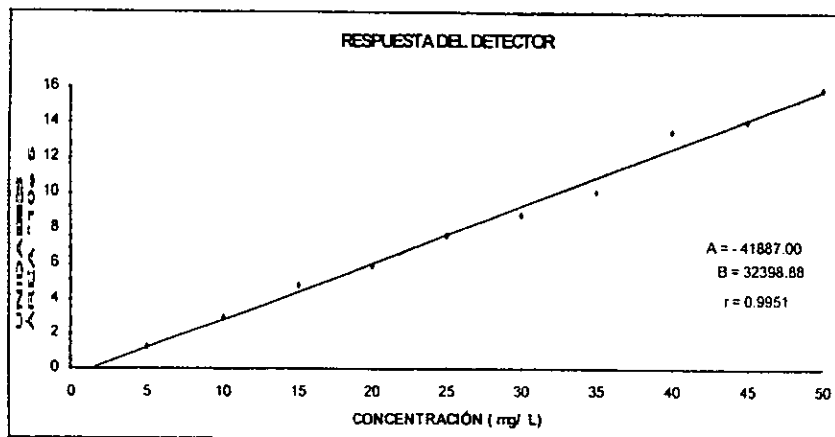


Figura 11. Variaci6n de la respuesta del detector UV en funci6n de la concentraci6n de soluci6n est6ndar de metidati6n

(Columna: Nucleosil C-18 de 5 μ m, 15 cm X 0.46 cm d.i.; fase m6vil: mezcla de MeOH/Agua 60:40; flujo: 1 mL/min; detecci6n: UV a 220 nm; volumen de inyecci6n: 20 μ L)

La representaci6n f6sica de las curvas de calibraci6n ayuda a evidenciar si, efectivamente, los valores tienden a alinearse a lo largo de una l6nea recta. La l6nea que mejor se ajusta a todos los puntos se determina a trav6s del coeficiente de correlaci6n (r).

El valor de r obtenido es 0.9951, el cual indica que se tiene una correlaci6n positiva muy cercana a 1. Puede decirse que los datos obtenidos tienden a comportarse como una funci6n de una l6nea recta.

El l6mite de detecci6n fue considerado como la concentraci6n que origina un pico con altura correspondiente a 3 veces el ruido de fondo y fue determinado inyectando soluciones cada vez m6s diluidas de metidati6n. La concentraci6n obtenida fue de 5 mg/L utilizando un bucle de 20 μ L, es decir un l6mite de detecci6n absoluto de 100 ng inyectados. Este valor permitir6 m6s adelante junto con el volumen de fuga establecer cu6l ser6 el l6mite de detecci6n del m6todo establecido de an6lisis.

4.2. PRECONCENTRACIÓN

4.2. 1. Preconcentración en tiempo diferido (off-line)

4.2.1.1. Elección de la mezcla de elución

La preconcentración de compuestos orgánicos presentes en muestras acuosas por medio de una extracción en fase sólida, se basa en la distribución de dichos compuestos entre un soporte sólido y el agua. Para el caso del metidatión, un compuesto medianamente polar, la sílice C-18, es un soporte adecuado para su extracción.

De acuerdo a los porcentajes de recuperación obtenidos con las diferentes mezclas y volúmenes de elución que se presentan en la tabla 6 se establecieron las condiciones para llevar a cabo la elución del metidatión de los cartuchos con una etapa previa de limpieza.

Tabla 6. Estudio de la recuperación del metidatión probando diferentes volúmenes y composiciones de la mezcla de elución

Mezcla de elución Metanol/Agua	Volumen de elución (mL)	
	1ª fracción 5mL	2ª fracción 5mL
	% RECUPERACIÓN	
100	100	0
85:15	100	0
80:20	100	0
70:30	80	0
60:40	28	35
50:50	0	27

Vol. percolado, 250 mL de agua grado "HPLC" adicionada con 0.15 mg de metidatión en 1.5 mL de metanol. La elución de cada mezcla se realizó en 2 fracciones de 5 mL

En la tabla se observa que con 5 mL de una mezcla MeOH/Agua 50:50, el metidatión no es eluido del cartucho, permitiendo elegir ésta como mezcla de limpieza. Con las combinaciones de 80 a 100% de metanol y un volumen de 5 mL, se obtiene una elución completa del metidatión de los cartuchos de extracción. Por lo tanto se eligió la mezcla 80:20 por considerarla más selectiva para eluir a los compuestos medianamente polares, entre ellos el metidatión y no eluir los compuestos apolares que quedan en el

cartucho, los cuales se convertirían en interferentes si fueran co-eluidos como sucedería en caso de usar 100 % de MeOH.

Considerando el estudio anterior, la secuencia de las etapas de elución se realizó de la siguiente manera:

- * Primero se aplicaron 5 mL de mezcla 50:50 para llevar a cabo una limpieza, eluyendo así a los compuestos polares y no el metidación.
- * Después 5 mL de mezcla 80:20 para eluir compuestos medianamente polares, con los cuales está incluido el metidación.
- * Finalmente, para verificar que todo el metidación había eluido en la mezcla anterior, se aplicaron 5 mL de MeOH.

El cromatograma correspondiente a cada una de estas fracciones de elución después de aplicar al cartucho 250 mL de agua potable adicionada se presentan en la figura 12.

4.2.1.2. Protocolo completo para la metodología en tiempo diferido

Considerando los estudios anteriormente descritos el protocolo completo para la preconcentración, limpieza y análisis por "HPLC" en tiempo diferido de muestras de agua adicionadas con metidación es el siguiente:

- Acondicionamiento del cartucho de extracción C-18 con 5 mL de MeOH grado "HPLC", seguido de 30 mL de agua grado "HPLC", teniendo cuidado de no dejar que la fase estacionaria del cartucho se seque.
- Percolación de la muestra de agua potable (flujo de 2.5 mL/min).
- Lavado de la fase estacionaria con 5-10 mL de agua grado HPLC.

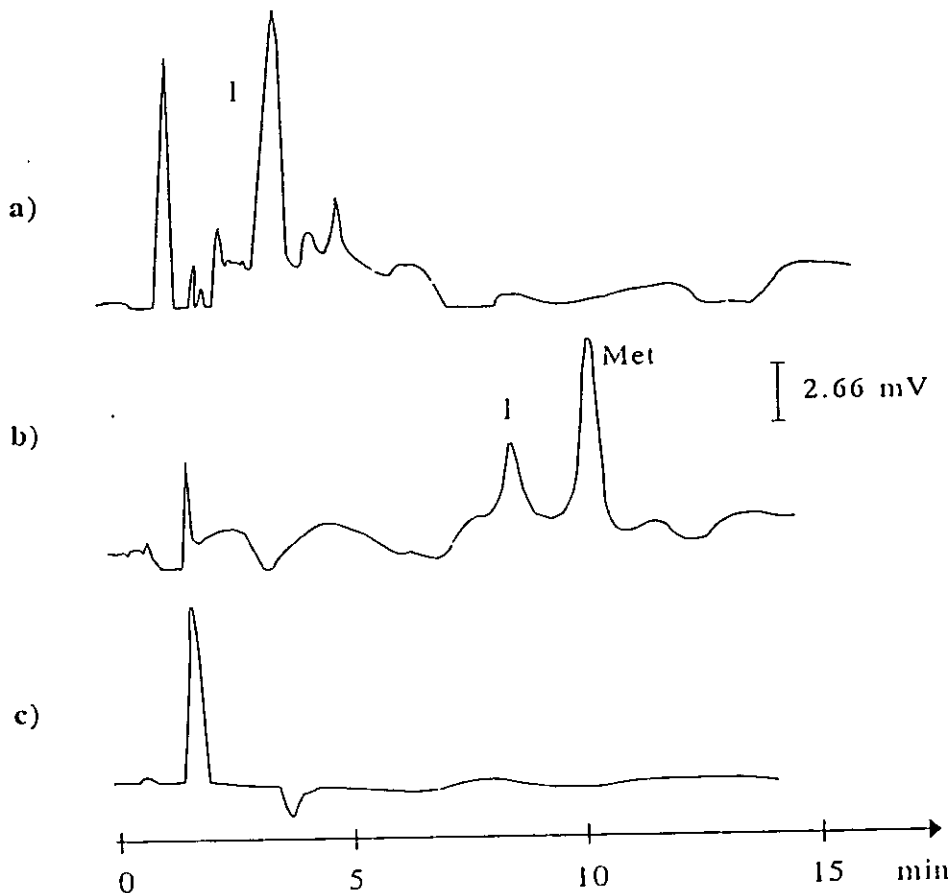


Figura 12. Optimización de la elución en cartuchos (Eliminación de interferentes)

(a) 1ª elución con una mezcla 1:1 MeOH/Agua (eliminación de compuestos interferentes polares), (b) 2ª elución con una mezcla 4:1 MeOH/agua (elución de compuestos medianamente polares como el metidatió), (c) 3ª elución con MeOH eliminación de compuestos interferentes apolares

(Preconcentración de 500 mL de agua de distribución adicionada con 3 mg/L de metidatió en cartuchos "Spe-ed" C-18 de 500 mg. Columna analítica: "Nucleosil" C-18 de 5 μ m, 15 cm X 0.46 cm d.i.; fase móvil: MeOH/Agua 60:40; Flujo: 1 mL/min; volumen inyectado: 20 μ L; detección: UV 220 nm; Met = Metidatió I = Compuestos interferentes)

- Secado de la fase estacionaria.
- Elución de los compuestos interferentes polares con 5 mL de una mezcla 50:50 MeOH/H₂O.
- Secado de la fase estacionaria.
- Elución de compuestos medianamente polares como el metidati3n con 5 mL de una mezcla 80:20 MeOH/H₂O.
- Secado de la fase estacionaria.
- Eluci3n de compuestos apolares, con 5 mL de MeOH, as3 como comprobar que todo el metidati3n fue eluido con la mezcla anterior.
- Evaporaci3n del producto eluido hasta sequedad.
- Reconstituci3n del residuo evaporado con 0.5 mL de MeOH.
- Inyecci3n al cromat3grafo de 50 μ L de la soluci3n reconstituida.

4.2.1.3. Rendimiento de extracci3n

La determinaci3n del volumen de muestra a percolar se bas3 en el c3lculo del % de recuperaci3n del metidati3n despu3s de la aplicaci3n de diferentes vol3menes de agua grado "HPLC" adicionado cada uno con una cantidad constante de 0.15 mg de metidati3n.

En la tabla 7 y figura 13 se observa que los porcentajes de recuperaci3n obtenidos con los diferentes vol3menes de muestra se encuentran alrededor del 100%, presentando

pequeñas variaciones alrededor de este valor a causa del error debido a la manipulación de la muestra que consiste en varios pasos.

Tabla 7. Rendimiento de extracción en cartuchos "Spe-ed" C-18 de 500 mg utilizando diferentes volúmenes de agua grado "HPLC" adicionada con 0.15 mg de metidati6n

VOLUMEN PERCOLADO (mL)	CONCENTRACI6N (mg/L)	% RECUPERACI6N
250	0.6	101
500	0.3	88
750	0.2	98
1000	0.15	92
1250	0.12	86
1500	0.1	106

De acuerdo a los resultados se decidi6 que es posible percolar hasta 1500 mL de agua conteniendo el plaguicida sobre los cartuchos de extracci6n con fase inversa C-18 y obtener rendimientos de extracci6n de alrededor del 100%. Esto verifica que el metidati6n tiene una capacidad de retenci6n apropiada para llevar a cabo la extracci6n de vestigios o trazas en este adsorbente, ya que su volumen de fin de fijaci6n es superior a 1.5 L.

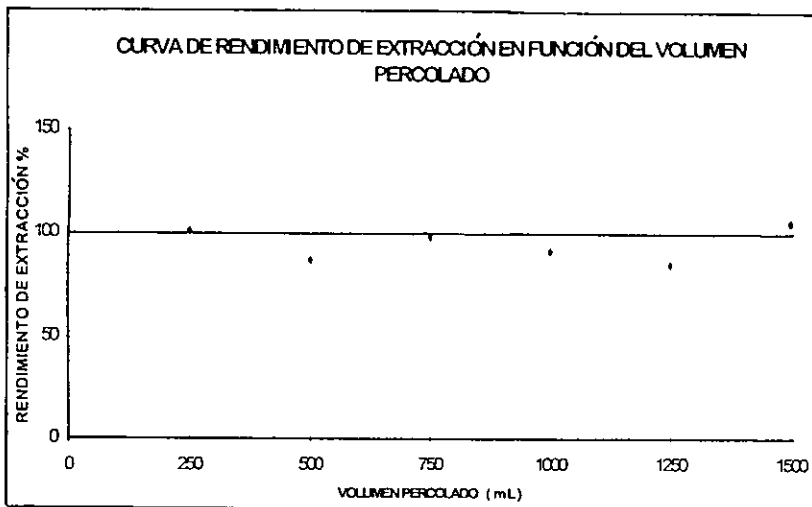


Figura 13. Curva de rendimiento de extracci6n en funci6n del volumen percolado (Preconcentraci6n en cartucho "Spe-ed" C-18 de 500 mg. Cantidad adicionada 0.15 mg de metidati6n en diferentes volúmenes de agua grado "HPLC")

El rendimiento de extracción en muestras de agua de distribución fue de alrededor del 50% sin importar el volumen aplicado, como se presenta en la tabla 8. La disminución tan grande de la recuperación de plaguicida puede deberse a que en esta matriz se encuentran compuestos orgánicos como los ácidos húmicos y fúlvicos que podrían interferir en la adsorción del metidatión en la fase estacionaria. También, parte de la pérdida puede ser a causa de que el metidatión es un poco hidrofóbico y podría quedar adsorbido a las paredes de los recipientes que tienen contacto con las disoluciones acuosas o podría haber pérdida del compuesto en el paso de evaporación y posterior redisolución. Esto es más notable en la muestra de agua a concentraciones diluidas (0.01 mg/L) donde se observan rendimientos de extracción muy bajos (12%).

Tabla 8. Rendimiento de extracción calculado en agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria usando cartuchos de extracción "Spe-ed" C-18 de 500mg

VOLUMEN DE MUESTRA (mL)	CONCENTRACIÓN (mg/L)	% RECUPERACIÓN
250	0.60	50.50
500	0.30	43.00
1000	0.15	50.00
1000	0.01	12.00

En la figura i4 se presentan los cromatogramas resultantes del análisis, tanto de las muestras de agua potable sin adicionar plaguicida como de las muestras adicionadas. Por comparación, se incluye en la figura, el cromatograma obtenido del análisis de una muestra de agua grado "HPLC" adicionada con metidatión a la misma concentración.

Se puede observar claramente que el porcentaje de recuperación en las muestras de agua potable es más bajo.

En los cromatogramas de agua potable puede apreciarse que no muestran picos interferentes cercanos al del metidatión. Con esto puede observarse que se efectuó una separación adecuada del metidatión de los posibles compuestos interferentes eluidos en el volumen muerto y de otros grandes picos cercanos, debido a que el agua potable contiene materia orgánica.

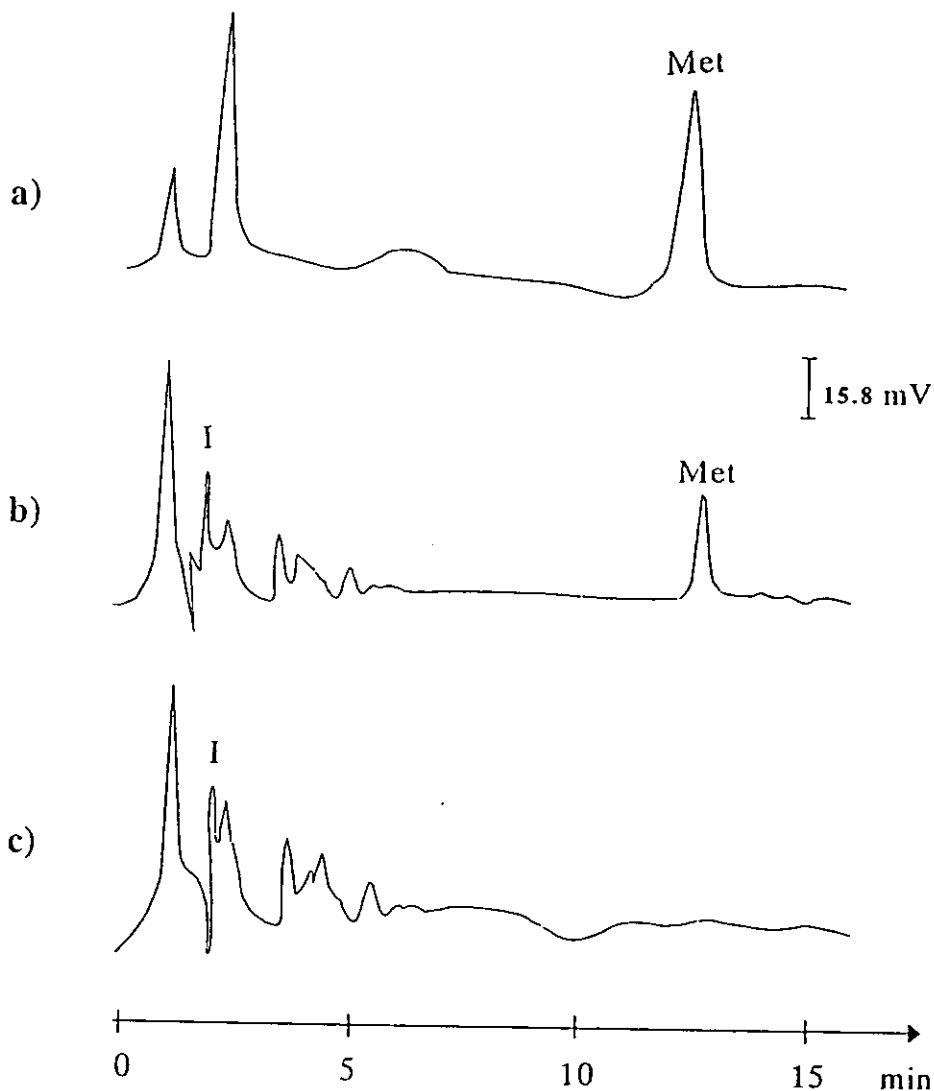


Figura 14. Comparación de la preconcentración en diferido de una muestra de agua pura y una muestra de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria

(a) 250 mL de agua grado "HPLC" adicionada con 0.15 mg metidación, (b) 250 mL de agua potable de la red de distribución adicionada con 0.15 mg de metidación, (c) 250 mL de agua potable de la red de distribución sin adicionar. Preconcentración en cartuchos "Spe-ed" C-18 de 500 mg (Columna analítica: "Nucleosil" C-18 de 5 μ m, 15 cm X 0.46 cm d.i.; fase móvil: MeOH/Agua 60:40; flujo: 1 mL/min; detección UV 220 nm, volumen inyectado: 20 μ L; Met = Metidación, I = Compuestos interferentes)

La pérdida en el porcentaje de recuperación del compuesto permite apreciar las limitaciones del método en tiempo diferido para llevar a cabo el análisis de vestigios o trazas de metidación en muestras acuosas, entre ellas destaca la mayor manipulación de las muestras al requerir una evaporación y redisolución del concentrado, provocando un posible riesgo de contaminación y pérdidas, así como menor sensibilidad al inyectar sólo una alícuota del extracto.

Por lo anterior, se procedió a aplicar el método en línea para el análisis del metidación en muestras acuosas, que resultó ser el más adecuado, como a continuación se presenta.

4.2.2. Preconcentración en tiempo real o en línea (on-line)

4.2.2.1. Optimización de la fase móvil de elución

Después de realizar varios ensayos, la composición de la fase móvil elegida fue MeOH/Agua 65:35, obteniéndose con esta composición una elución completa del metidación de la precolumna de preconcentración, y una separación adecuada del metidación de los picos de compuestos interferentes. Así también, se observa en la figura 15 cómo el acoplamiento en línea de la precolumna fue el adecuado al no causar ensanchamiento del pico.

4.2.2.2. Rendimiento de extracción

Los resultados del rendimiento de extracción en muestras de agua pura se presentan en la tabla 9 y en la figura 16. Como se observa, es posible percolar hasta 250 mL de muestra sin perder al metidación de la precolumna empacada con la fase inversa "Nucleosil" C-18, ya que se obtienen porcentajes de recuperación de alrededor del 100%.

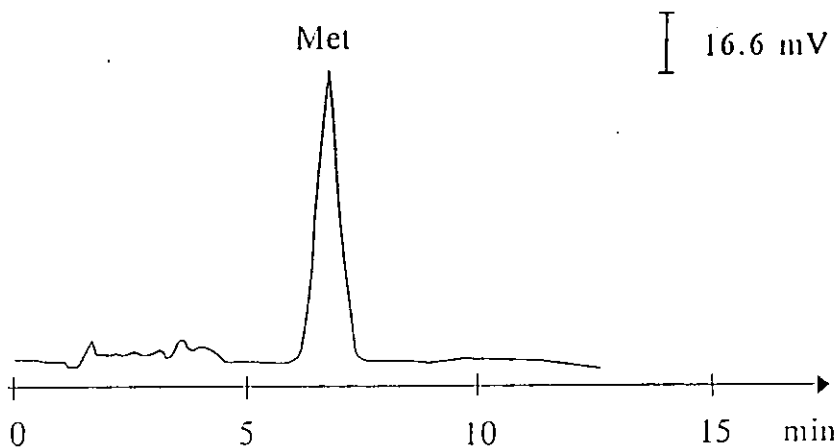


Figura 15. Análisis en línea de una muestra de agua grado "HPLC"
 (Preconcentración de 20 mL de agua grado "HPLC" adicionada con 40 µg/L de metidación en una precolumna "Nucleosil" C-18 de 5 µm; 1.3 cm X 0.46 cm d.i. Columna analítica: "Nucleosil" C-18 de 5 µm, 15 cm X 0.46 cm d.i.: fase móvil: MeOH/Agua 65:35; flujo: 1 mL/min; detección: UV 220 nm; Met = Metidación)

Tabla 9. Rendimiento de extracción calculado en agua grado "HPLC" adicionada con 0.8 µg de metidación usando precolumnas de extracción de "Nucleosil" C-18 de 5 µm de 1.3 cm x 4.6 mm d.i.

VOLUMEN PERCOLADO (mL)	CONCENTRACIÓN (µg/L)	% RECUPERACIÓN
10	80.00	100.00
20	40.00	91.00
30	26.60	91.00
40	20.00	107.00
50	16.00	100.00
70	11.42	101.00
90	8.88	90.00
130	6.16	99.00
150	5.30	110.00
170	4.70	101.00
250	3.20	100.00

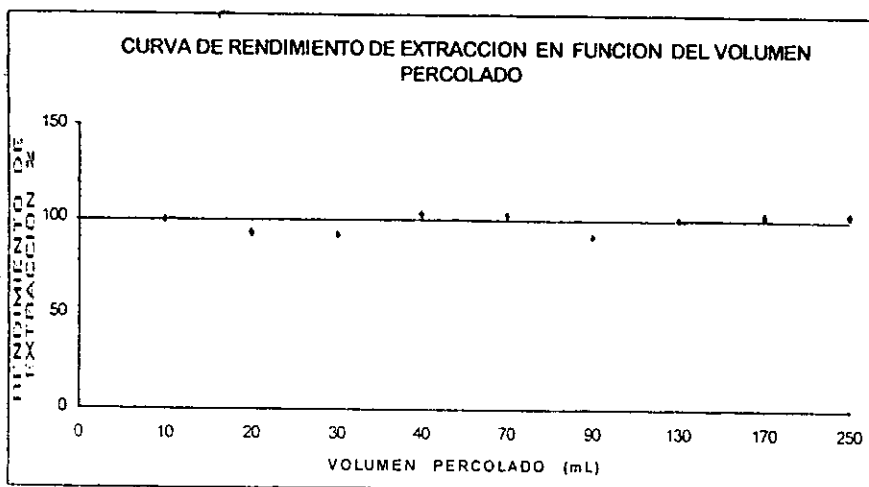


Figura 16. Curva de rendimiento de extracción en función del volumen percolado (Preconcentración en una precolumna "Nucleosil" C-18 de 5 μm de 1.3 cm X 0.46 mm d.i.; cantidad adicionada: 0.8 μg de metidatión en diferentes volúmenes de agua grado "HPLC")

En la tabla 10 se dan los porcentajes de recuperación de diferentes volúmenes de muestra de agua de distribución con metidatión adicionado y previamente filtradas. Se observa que también se tienen porcentajes de recuperación del 100%.

Tabla 10. Rendimiento de extracción calculado en agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria adicionada con 0.8 μg de metidatión usando precolumnas de extracción de "Nucleosil" C-18 de 5 μm de 1.3 cm x 4.6 mm d.i.

VOLUMEN DE MUESTRA (mL)	CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/L}$)	% RECUPERACIÓN
70	11.42	103.00
100	8.00	98.00
150	5.33	99.00

El rendimiento de extracción obtenido con muestras de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria presenta el mismo comportamiento que con agua grado "HPLC", con lo que se demuestran claramente las ventajas que tiene la metodología en tiempo real o en línea sobre la metodología en tiempo diferido, ya que se elimina cualquier riesgo de contaminación y pérdida.

4.2.2.3. Protocolo completo para la metodología en tiempo real o en línea

El procedimiento completo desarrollado se describe a continuación:

1. Equilibrar la precolumna de extracción con 25 mL de agua grado "HPLC" a un flujo de 1.5 mL/min. Al mismo tiempo, se puede acondicionar la columna analítica.
2. Percolar sobre esta precolumna un volumen x de la muestra con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min. Una vez cargados los solutos, lavar los intersticios de la precolumna y las conexiones con 3 mL de agua grado "HPLC".
3. Eluir en línea de los solutos con la misma fase móvil 65:35 del análisis cromatográfico.
4. Inyectar una solución estándar de metidación correspondiente a una concentración equivalente a la obtención del 100% de recuperación, para calcular el porcentaje de recuperación.

4.2.2.4. Precisión del método

La precisión del método se refiere al grado en que concuerdan las diferentes mediciones de una misma propiedad. Con el protocolo completo de preconcentración y análisis en línea se analizaron 4 muestras de 20 mL de agua grado "HPLC" adicionada con 40 $\mu\text{g/L}$ del plaguicida. Cada muestra se analizó en forma independiente por el mismo analista y equipo. Los datos obtenidos se dan en la tabla 11.

Tabla 11. Datos de la precisión del método con agua grado "HPLC"

PROMEDIO ÁREA(x)	1160200.75
DESVIACIÓN ESTÁNDAR(σ)	102077.30
COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (CV%)	8.79

Para la precisión del método en muestras reales se analizaron 100 mL de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria adicionada con 40 µg/L de metidati3n (tabla 12).

Tabla 12. Datos de la precisi3n del m3todo en muestras reales

PROMEDIO 3REA(x)	1148377
DESVIACI3N EST3NDAR(σ)	84717
COEFICIENTE DE VARIABILIDAD (CV%)	7.37

4.2.2.5. Aplicaci3n del protocolo completo a diferentes muestras de agua potable en concentraciones diluidas

Esta etapa tiene por objeto evaluar la capacidad del m3todo establecido para determinar el metidati3n a bajas concentraciones en diferentes tipos de agua potable.

En las figura 17,18 y 19 se presentan los cromatogramas resultantes del an3lisis de tres diferentes muestras, tanto de una muestra blanco como de una muestra de agua potable adicionada con metidati3n junto con el cromatograma obtenido del an3lisis de una muestra de agua grado "HPLC" adicionada con metidati3n a la misma concentraci3n. Los vol3menes preconcentrados en los 3 casos son los mismos.

Se puede observar que los cromatogramas correspondientes al agua potable tanto el blanco como las muestras adicionadas, presentan el mismo esquema de eluci3n: se observa un gran pico de la matriz al inicio del cromatograma, el cual es t3pico de las aguas que contienen materia org3nica (3cidos h3micos y f3lvicos) y que resulta pr3cticamente imposible de eliminar completamente.

En todos los casos se logr3 separar adecuadamente el pico del metidati3n de los compuestos interferentes, con la fase m3vil elegida.

Se observa que en las muestra analizadas sin adicionar no se encuentra el metidati3n y en las muestras adionadas se observa que el pico del compuesto es claramente visible pudi3ndose as3 suponer que se podr3an analizar muestras a3n m3s diluidas. Por ejemplo, si el volumen de muestra fuera de 250 mL se podr3a obtener un pico semejante con una concentraci3n de 0.4 µg/L.

Estos resultados obtenidos permiten apreciar las ventajas del método de análisis en tiempo real o en línea del metidación en comparación con el de tiempo diferido, como son un mayor porcentaje de recuperación, mayor sensibilidad, menor volumen de muestra, mayor rapidez y una manipulación de la muestra casi nula. Por lo anterior, se considera al método en tiempo real o en línea el adecuado para el análisis del metidación por "HPLC" a niveles vestigiales o de traza.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la parte experimental, se llegó a las conclusiones y recomendaciones expuestas en el siguiente capítulo.

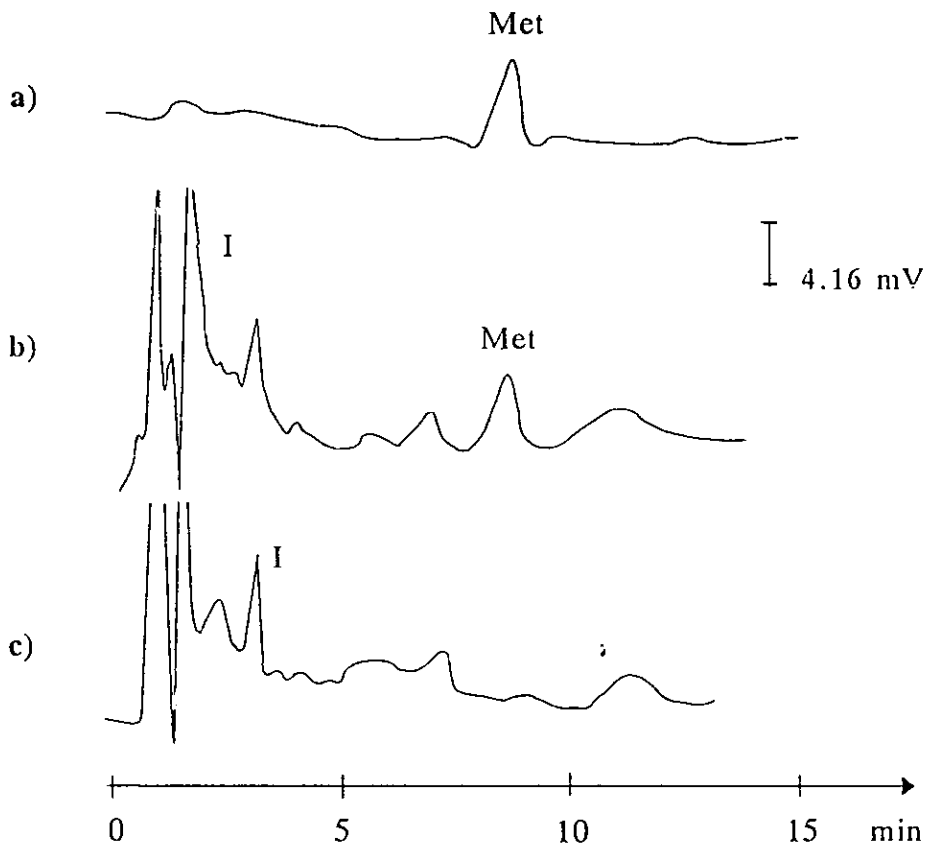


Figura 17. Comparación de la preconcentración en línea de 100 mL de una muestra de agua pura y una muestra de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria
 (a) Agua grado HPLC adicionada con 1 $\mu\text{g/L}$ de metidación, (b) Agua de la red de distribución de la Cd. Universitaria adicionada con 1 $\mu\text{g/L}$ de metidación, (c) Agua de la red de distribución de la Cd. Universitaria sin adicionar (Preconcentración en precolumna empacada con "Nucleosil" C-18 de 5 μm ; 1.3 cm X 0.46 cm d.i. Columna analítica: Nucleosil C-18 5 μm , 15 cm X 0.46 cm d.i. Fase móvil: MeOH/Agua 65:35; flujo: 1 ml/min; detección: UV 220 nm; Met= Metidación; I = Compuestos interferentes)

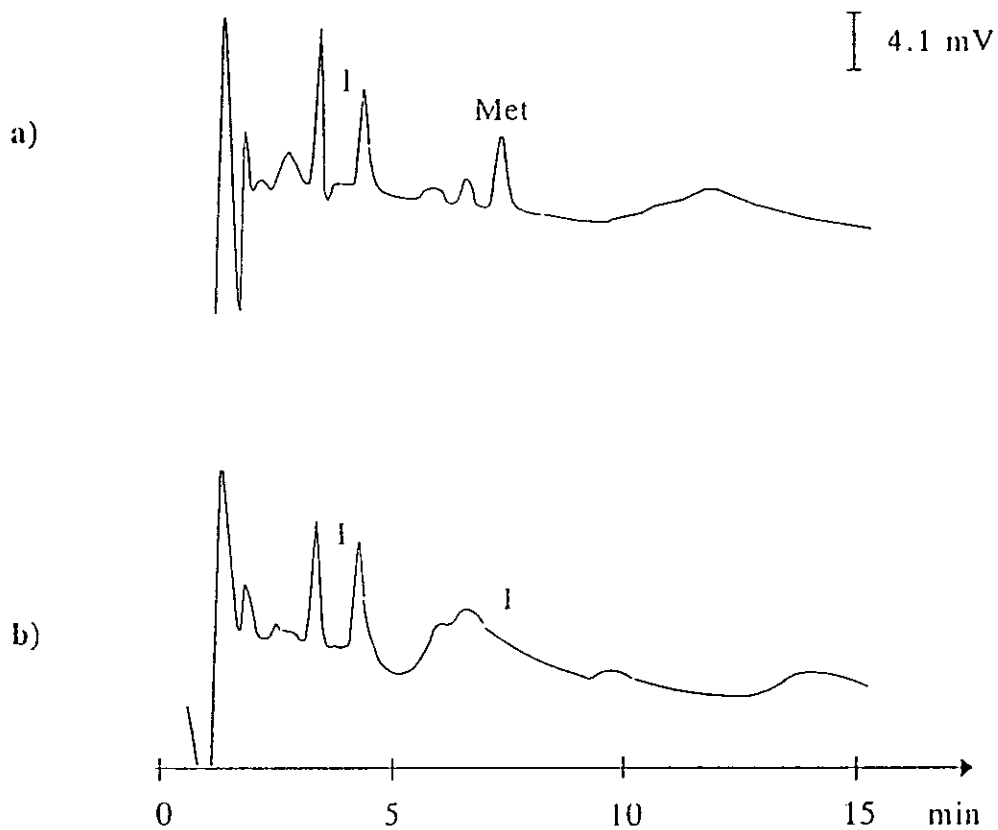


Figura 18. Análisis en línea de 100 mL de agua potable comercial "Proplus"

(b) Agua comercial "Proplus" sin adicionar (a) Agua comercial "Proplus" adicionada con 1 µg/L de metidación

(Preconcentración en precolumna empacada con "Nucleosil" C-18 de 5 µm; 1.3 cm X 0.46 cm d.i. Columna analítica: "Nucleosil" C-18 de 5 µm. 15 cm X 0.46 cm d.i.; flujo: 1 ml/min; detección: UV 220 nm; Met: Metidación; 1 = Compuestos interferentes)

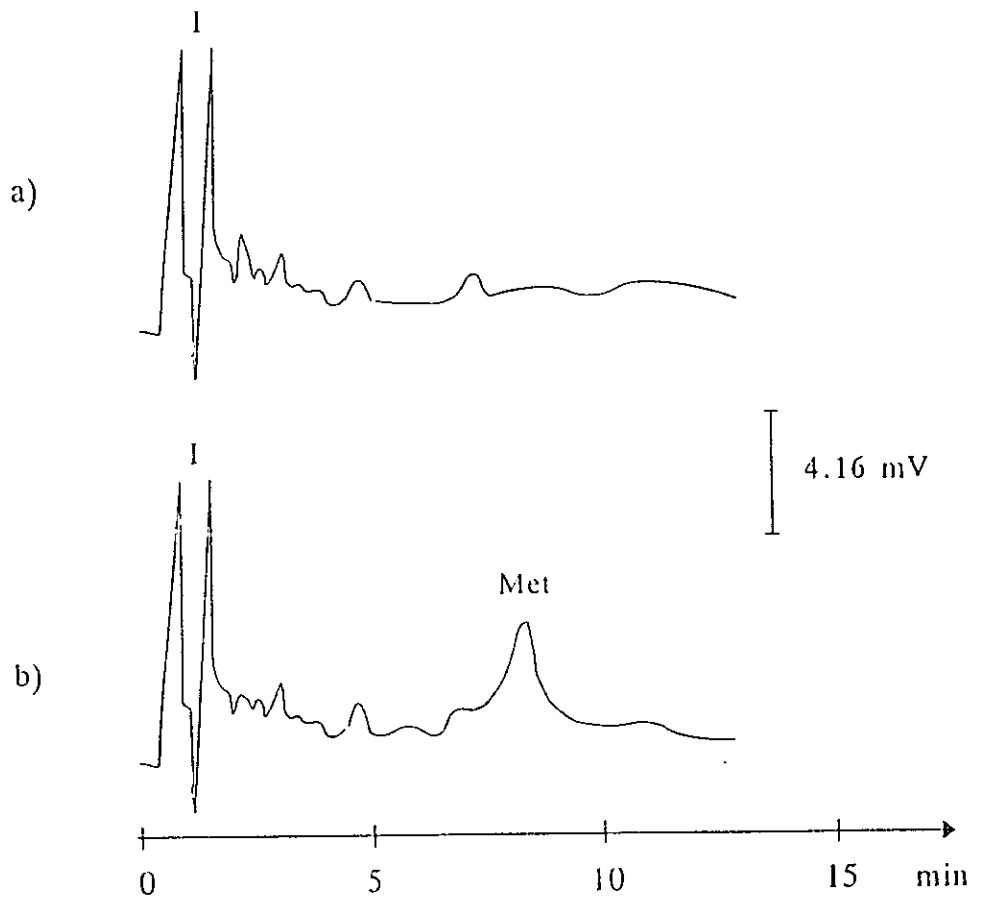


Figura 19. Análisis en línea de 100 mL de agua potable comercial “Electropura”
 (a) Agua comercial “Electropura” sin adicionar (b) Agua comercial “Electropura” adicionada con 1 $\mu\text{g/L}$ de metidación
 (Preconcentración en precolumna empacada con una sílice Nucleosil C-18 de 5 μm ; 1.3 cm X 0.46 cm d.i. Columna analítica: “Nucleosil” C-18 de 5 μm . 15 cm X 0.46 cm d.i.; flujo: 1 ml/min; detección: UV 220 nm; Met: Metidación; I = Compuestos interferentes)

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

De este trabajo experimental pueden derivarse las siguientes conclusiones:

- Es posible implementar el método de extracción en tiempo real o en línea y en tiempo diferido para preconcentrar y extraer el metidación de muestras acuosas. La gran adaptabilidad que presenta la ELS para el manejo de muestras acuosas se muestra claramente puesto que la manipulación es mínima y no se requiere el 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, la precolumna y los cartuchos de extracción son reutilizables varias veces.
- Los resultados ilustran muy claramente sobre las diferentes posibilidades de realizar una extracción cuantitativa y con una buena “limpieza” o simplificación de la matriz, operación importante para la obtención de límites de detección apropiados para la determinación de trazas. Así, con ambos métodos se logró determinar al metidación en concentraciones del orden de ppb, y es posible llegar a ppt, si se aumenta la cantidad de adsorbente, en el caso de la extracción en tiempo diferido.
- El método de extracción en tiempo real o en línea, además de que presenta las ventajas de evitar el riesgo de contaminación de las muestras, debido a que no hay contacto de la muestra entre la etapa de preconcentración y análisis, permitió obtener mejores rendimientos de extracción y precisión. La implementación de la metodología en línea, que permite la utilización de diversas estrategias para el manejo de muestras acuosas en función de los contaminantes orgánicos que se quieran determinar, representa un ejemplo típico de la simplicidad, rapidez y fácil automatización que se espera obtener con los métodos analíticos modernos y futuros.

5.2. RECOMENDACIONES

Para el seguimiento de esta línea de investigación, a continuación, se dan las siguientes recomendaciones:

- Se sugiere que para aumentar el rendimientos de extracción del metidati3n por el m3todo en tiempo diferido en muestras reales ser3a conveniente incrementar la cantidad de agente adsorbente en los cartuchos de extracci3n.
- Debido a que el metidati3n al aplicarse en los cultivos en combinaci3n con otros plaguicidas es muy probable que se encuentre presente en el agua a la vez con otros contaminantes.. por lo tanto para estudios posteriores se recomienda desarrollar un t3cnica de an3lisis por medio de la extracci3n l3quido-s3lido en tiempo real o en l3nea de multiresiduos de plaguicidas que junto con el metidati3n actualmente son utilizados en M3xico.

BIBLIOGRAFÍA

Beltrán, J.; López, F.J. y Hernández, F. N. 1993. Solid-phase extraction of pesticide residues from ground water: Comparison between extraction cartridges and extraction discs. *Anal. Chim. Acta*, 283: 297-303.

Bidlingmeyer, A. B. 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*. 1a. Ed. John Wiley & Sons. Inc. Pp. 19-23, 370-371. N.Y., EEUUA.

Braithwaite, A. y Smith, F.J. 1985. *Chromatographic Methods*. Chapman & Hall. 4a. Ed. Pp. 214-216. Boundary Row, London, Inglaterra.

Cabras, P.; Tuberoso, C.; Melis, M. y Martini, M.G. 1992. Multiresidue Method for Pesticide Determination in Wine by High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.*, 40:817-819.

CICOPLAFEST. 1994. Catálogo oficial de plaguicidas. SARH. Pp. 26-27, 130-131. México, D.F., México.

Coquart, V.; García-Camacho, P. y Hennion, M.C. 1993. Trace-level determination of hidroxyatrazine and dealkylated degradation products of atrazine in waters. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 52: 99-112.

Forgács, E.; Cserhádi, T. y Bordás B. 1993. Comparison of the retention behavior of phenol derivatives on porous graphitized and octadecylsilica columns. *Chromatographia*, 36: 19-26.

Goewie, C.E.; Kwakman, P.; Frei, R.W. y Brinkman, U.A. Th. 1984. Pre-column technology in high-performance liquid chromatography for the determination of phenylurea herbicides in water in the presence of their anilines. *J. Chromatography*, 284:73-86.

Guenu, M. y Hennion, M.C. 1994. On-line sample handling of water-soluble organic pollutants in aqueous samples using porous graphitic carbon. *J. Chromatography A*, 665: 243-251.

Haynes, W.J. y Laws, E.R. 1991. Handbook of pesticide toxicology. Academic Press Inc. Vol. 2. Pp. 924-925, 1024-1025. San Diego, California, EEUUA.

Henaó, S. H. y Corey, O. G. 1991. Plaguicidas inhibidores de las colinesterasas. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. Pp. 18-20. México, D.F., México.

Hennion, M.C. y Coquart, V. 1993. Comparison of reversed-phase extraction sorbents for the on-line trace enrichment of polar organic compounds in environmental aqueous samples. *J. Chromatography*, 642: 211-224.

Hennion, M.C. y Pichon, V. 1994. Solid-phase extraction of polar organic pollutants from water. *Environm. Sci.*, 28(13): 576-583.

Lindsay, S. 1992. High Performance Liquid Chromatography. 2a. Ed. John Barnes, John Wiley & Sons. Pp. 4-6, 85-87, 92-98. Londres, Inglaterra.

Johnson, W. E. ; Fendinger, N. J. y Plimmer, J.R. 1991. Solid-phase extraction of pesticides from water: Possible interferences from dissolved organic material. *Anal. Chem.* 63: 1510-1513.

Mueller, W. y Smith, D. 1991. Compilation of EPA's sampling and analysis methods. Lawrence H. Keith. Boca Raton, Florida, EEUUA.

Padilla, C. M. 1997. Concentración, purificación y determinación en línea de herbicidas del tipo ácido clorofenoxi en agua. Tesis de Maestría. UNAM, Facultad de Química. México, D.F., México.

Skoog, D.A.; West, D. M. y Holler, F. J. 1992. Fundamentos de química analítica. 6a. Ed. Saunders College Publishing. Pp. 490, 495-497. Orlando, Florida, EEUUA.

Smyth, M. R. 1992. Chemical analysis in complex matrices. Ellis Horwood and PTR Prentice Hall. Pp. 59-69. Londres, Inglaterra.

Snyder, L.R. y Kirkland, J.J. 1979. Introduction to modern liquid chromatography. 2a. Ed. John Wiley & Sons. Inc. Pp. 16-18, 27-28, 34. N.Y., EEUUA.

Subra, M.; Hennion, M.C. y Rosset, R. 1988. Recovery of organic compounds from large-volume aqueous samples using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. *J. Chromatography*, 456: 121-141.

The Agrochemicals Handbook. 1983. Royal Society of Chemistry. The University, Douglas Hartley. Nottingham, Inglaterra.

Willard, H. H. y Merritt, J.R. 1988. Métodos instrumentales de análisis. 6a. Ed. D. Van Nostrand Company. Pp. 697-701. Princeton, New Jersey, EEUUA.

Glosario de términos

CG. Cromatografía de gases.

Ancho del pico (w). Es la anchura a la base del pico.

CLAR. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

ELL. Extracción líquido-líquido.

ELS. Extracción líquido-sólido.

Factor de capacidad (k'). Representa una medida de la afinidad del compuesto por la fase estacionaria.

Factor de selectividad (α). Para dos analitos en una columna proporciona una medida de que tan bien la columna los separa.

Longitud de la columna (L).

Números de platos teóricos (N). Número de segmentos en los que esta dividida la columna.

Tiempo muerto (t_M). Es el tiempo que toma para que una especie no retenida pase a través de una columna.

Tiempo de retención (t_R). Es el tiempo entre la inyección de una muestra y la aparición de un pico de soluto en el detector de una columna cromatográfica.

Resolución (R_s). Es el grado de separación de un componente de otro es descrito por la resolución.

Volumen de fin de fijación (V_b). Representa el volumen en el cual el soluto ya no es retenido por el adsorbente y comienza a ser eluido por el agua, bajo condiciones de no saturación.

Volumen máximo (V_m). Es el valor máximo de muestra que puede percolarse y el cual corresponde al 99% de A_0

Volumen de retención (V_r). Es el volumen que se obtendría si se inyectara una solución concentrada del compuesto en la misma precolumna con una fase móvil constituida por agua pura.

Lista de cuadros

1. Propiedades fisicoquímicas del metidatió

Lista de figuras

1. Separación de una mezcla de tres componentes en una columna
2. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución
3. Protocolo típico de extracción sobre un cartucho empacado con una fase estacionaria C18
4. Acoplamiento de la extracción líquido-sólido en línea
5. Frente de elución teórico obtenido por percolación de una muestra adicionada a través de una precolumna
6. Diagrama general de la metodología experimental

7. Montaje experimental para la preconcentración y análisis en línea
8. Espectro de absorción de una solución 10 ppm de metidatió n
9. Variación de $\log k'$ en función del porcentaje de metanol en fase móvil
10. Variación de los t_R en función del pH en el agua de la fase móvil
11. Variación de la respuesta del detector UV en función de la concentración de solución estándar de metidatió n
12. Optimización de la elución en cartuchos (Eliminación de compuestos interferentes)
13. Curva de rendimiento de extracción en función del volumen percolado
14. Comparación de la preconcentración en diferido de una muestra de agua pura y una muestra de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria
15. Análisis en línea de una muestra de agua grado "HPLC"
16. Curva de rendimiento de extracción en función del volumen percolado
17. Comparación de la preconcentración en línea de 100 mL de una muestra de agua pura y una muestra de agua potable de la red de distribución de la Ciudad Universitaria
18. Análisis en línea de 100 mL de agua potable comercial "Proplus"
19. Análisis en línea de 100 mL de agua potable comercial "Electropura"

Lista de tablas

1. Los adsorbentes que pueden ser usados para la extracción de una fase sólida de compuestos presentes en nivel vestigial o de trazas en muestras acuosas
2. Composición a probar de las mezclas de elución
3. Posición de las válvulas y bombas empleadas para preconcentración y análisis en línea
4. Factor de capacidad k' en función del % de metanol en la fase móvil (mezclas metanol/agua)
5. Variación del tiempo de retención y de k' para el metidatió n en diferentes valores de pH(s)
6. Estudio de la recuperación del metidatió n probando diferentes volúmenes y composiciones de la mezcla de elución
7. Rendimiento de extracción en cartuchos "Spe-ed" C-18 de 500 mg utilizando diferentes volúmenes de agua grado "HPLC" adicionada con 0.15 mg de metidatió n
8. Rendimiento de extracción calculado en agua potable de distribución de la Ciudad Universitaria usando cartuchos de extracción "Spe-ed" C-18 de 500mg
9. Rendimiento de extracción calculado en agua grado "HPLC" adicionada con 0.8 μg de metidatió n usando precolumnas de extracción de "Nucleosil" C-18 de 5 μm de 1.3 cm x 4.6 mm d.i.
10. Rendimiento de extracción calculado en agua de distribución adicionada con 0.8 μg de metidatió n usando precolumnas de extracción de "Nucleosil" C-18 de 5 μm de 1.3 cm x 4.6 mm d.i.
11. Datos de la precisión del método con agua grado "HPLC"
12. Datos de la precisión del método en muestras reales