

0057



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DETERMINACION DE TRAZAS DE BENCIDINAS EN AGUA POR EXTRACCION EN FASE SOLIDA EN LINEA POR HPLC.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE: MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS (QUIMICA ANALITICA) PRESENTA: I.Q. ARACELI GARCIA AC



MEXICO, D.F.

2000

282951



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:

PRESIDENTE: M. en C. SANTIAGO CAPELLA VIZCAINO.
VOCAL: Dr. RAFAEL NAVARRO GONZÁLEZ.
SECRETARIO: M. en C. JOSE LUIS GALLEGOS PEREZ.
PRIMER SUPLENTE: Dra. MARTHA PATRICIA GARCÍA CAMACHO.
SEGUNDO SUPLENTE: Dra. ARACELI PEÑA ALVAREZ.

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

DIRECTOR DE TESIS

Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

SUSTENTANTE

I. Q. ARACELI GARCÍA AC

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme
dado la oportunidad de ser una más de sus integrantes.

A la Facultad de Química

A la Dra. Luz Elena Vera por ser una excelente asesora, por la transmisión de
su experiencia y conocimientos, por su colaboración y apoyo.

Al H. Jurado por sus valiosas críticas y acertadas observaciones al trabajo de
investigación y por haber aceptado ser parte de éste.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo
brindado

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	5
Capítulo 1.	
GENERALIDADES Y ANTECEDENTES	9
1.1 ESTRUCTURA Y PROPIEDADES DE LAS BENCIDINAS	9
1.2 EXTRACCIÓN Y PRECONCENTRACIÓN DE COMPUESTOS ORGÁNICOS EN AGUA.	16
1.2.1 PREPARACION DE LA MUESTRA POR EXTRACCIÓN LÍQUIDO- LÍQUIDO.	17
1.2.2 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA.	18
1.3 LA DETECCIÓN ELECTROQUÍMICA EN CLAR.	25

	Página
Capítulo 2.	
PARTE EXPERIMENTAL.	35
2.1 EQUIPO Y ACCESORIOS	35
2.1.1 COLUMNA ANALÍTICA Y PRECOLUMNA DE CONCENTRACIÓN.	36
2.1.2 CALIBRACIÓN DEL RIZO DEL INYECTOR.	37
2.2 REACTIVOS.	37
2.2.1 DISOLUCIONES PATRON DE BENCIDINAS	38
2.2.2 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES Y FASES MOVILES	38
2.2.3 PREPARACION DE LAS MUESTRAS	38
2.3 DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN DE MUESTRA QUE SE PUEDE CARGAR EN LA PRECOLUMNA DE CONCENTRACIÓN.	40
2.4 PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS EN LÍNEA DE BENCIDINAS.	42
2.4.1 DESCRIPCIÓN DEL ACOPLAMIENTO DEL SISTEMA CROMATOGRÁFICO CON EL SISTEMA DE PRECONCENTRACION.	42

	Página
2.4.2 DESCRIPCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS.	43
2.4.3 DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS.	46
2.4.4 REGENERACIÓN Y LIMPIEZA DEL SISTEMA.	48
2.4.5 TIEMPO DE ANÁLISIS.	49
Capítulo 3.	
RESULTADOS EXPERIMENTALES	51
3.1 ESTABLECIMIENTO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN	51
3.1.1 ENSAYOS PRELIMINARES. DEFINICIÓN DEL SISTEMA DE EFS A UTILIZAR Y SELECCION DEL MATERIAL DE EMPAQUE DE PRECOLUMNAS.	51
3.1.2 OPTIMIZACION DE LA SEPARACIÓN CROMATÓGRÁFICA.	53
3.1.3 OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE DETECCIÓN.	57
3.1.4 OPTIMIZACIÓN DE LA PRECONCENTRACIÓN Y LA PREPARACIÓN PREVIA DE LA MUESTRA.	60

	Página
3.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO	62
3.2.1 ESTUDIO DE LA RECUPERACIÓN DE LA BENCIDINA Y DE LA 3,3'-DICLOROBENCIDINA.	63
3.2.2 LINEALIDAD.	65
3.2.3 LÍMITE DE DETECCIÓN.	70
3.3 APLICACIÓN DEL MÉTODO EN DIFERENTES MUESTRAS DE AGUA.	73
CONCLUSIONES.	79
REFERENCIAS.	81
APÉNDICE	85

RESUMEN

Se desarrolló una metodología alternativa para la determinación de bencidina y 3,3-diclorobencidina a niveles de trazas en muestras de agua. Estos compuestos presentan una alta toxicidad y una comprobada actividad carcinogénica por lo que en muchos países, incluyendo México, se han establecido normas muy estrictas para regular su uso y limitar su dispersión en el ambiente.

Las características hidrofóbicas y electroactivas de los compuestos considerados fueron aprovechadas para el diseño de un método analítico, sensible y selectivo, que permite su determinación en agua a muy bajos niveles de concentración. Este método está basado en el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida y la cromatografía de líquidos con detección electroquímica.

En la primera etapa del método los solutos de interés son extraídos de la fase acuosa y concentrados sobre el adsorbente polimérico PLRP-S, el cual se encuentra empacado en una precolumna de acero inoxidable de pequeñas dimensiones. Esta precolumna está montada en una válvula de conmutación, insertada entre el inyector y la columna de un sistema de cromatografía de líquidos.

En la siguiente etapa, la precolumna se acopla en línea con la columna analítica de fase reversa C-18 mediante el cambio de posición de la válvula. Los solutos son transferidos de la precolumna a la columna y separados en esta última empleando un gradiente binario de fase móvil. La detección de las bencidinas se realiza por coulombimetría fijando el potencial del electrodo de trabajo a 700 mV.

Debido a que el proceso de preconcentración y análisis de las bencidinas se efectúa en línea, la manipulación de las muestras por el analista se reduce drásticamente y esto se traduce en un incremento notable de la calidad de los resultados. Así, la recuperación en muestras de agua grado reactivo dopadas a 1.5 µg/L de cada analito fue superior al 90% con coeficientes de variación del 5%. Los límites de detección del método en muestras favorables son inferiores a un µg/L.

La aplicación del método desarrollado a muestras reales, se ilustra mediante el análisis de muestras de agua potable, de río y de pozo fortificadas con las bencidinas estudiadas.

SUMMARY

A liquid chromatographic method was established for determination of benzidine and 3,3'-dichlorobenzidine at trace concentration levels in water samples. These compounds have been found to be carcinogenic, therefore, their production and use are strictly regulated in several countries including Mexico, and a protective legislation has been established to limit their dispersal into environment.

Hydrofobic and electroactive characteristics of the compounds become useful for designing an analytical method, simple and selective, that permits their determination in water at very low concentration levels. This method is based on line Solid Phase Extraction (SPE) and High Performance Liquid Chromatography. (HPLC).

In the first step of the methodology, compounds are extracted from aqueous phase and are concentrated on the polymeric adsorbent PLRP-S, that is packed in a stainless steel precolumn with small dimentions. This precolumn is connected to a commutation valve, between injector and the chromatographic column.

In next step, the precolumn is coupled on line with the reverse phase analytical column C-18, with a change of position of the valve. Analytes are transferred from the precolumn to the analytical column, and separated using a binary gradient. Detection of benzidines is realized with a coulombimetric detector fixing an electrode potential, 700 mV.

Current methods for benzidine determination at trace concentration levels in environmental water samples are based on liquid-liquid extraction of the sample followed by HPLC preparation, however procedure for sample preparation is very long and laborious requiring extensive sample handling. In this work, a more simple and rapid alternative method, which can be automated, is proposed. Recoveries in spiked reactive degree water samples with 1.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ were superior to the 90%, RSD < 5%. Detection limits in favourable samples are inferior to a $\mu\text{g}/\text{L}$.

INTRODUCCIÓN

La bencidina, la 3,3'-diclorobencidina, las o-toluidinas y varios otros derivados de las bifenil-4,4'-diaminas son importantes intermediarios sintéticos en la manufactura de colorantes y pigmentos. Sin embargo, se ha encontrado que varios de estos compuestos presentan actividad carcinogénica en animales e incluso se ha comprobado la actividad carcinogénica de la bencidina en los humanos. En consecuencia, su producción y uso han sido regulados en varios países y se han establecido normas ecológicas muy estrictas para limitar su dispersión en el ambiente.

Las bencidinas y compuestos relacionados pueden entrar en el ambiente desde una amplia variedad de fuentes; directamente, en los efluentes de las industrias textiles, de pintura, del papel y del cuero, indirectamente, por la degradación de plaguicidas o por la conversión bacteriana de compuestos azo a aminas precursoras.

Por su toxicidad para los seres vivos, la bencidina y la 3,3'-diclorobencidina han sido incluidas en la lista de los 129 contaminantes prioritarios establecida por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Asimismo, en la Gaceta Ecológica Mexicana se ha clasificado a la bencidina en el grupo de sustancias de alto riesgo, para las cuales debe reducirse a un mínimo la exposición humana. De hecho, en los criterios ecológicos de calidad del agua establecidos por la EPA se considera que para máxima protección de la salud humana, respecto a los efectos carcinogénicos potenciales por exposición a las bencidinas a través de la ingestión de agua y organismos acuáticos contaminados, la concentración de estas sustancias en el agua ambiental debiera ser cero. Sin embargo, con el objeto de establecer normas reguladoras, los organismos ambientales en diferentes países han estimado valores de concentraciones máximas en agua ambiental tales que el riesgo de contraer cáncer durante la vida de un individuo debido a la contaminación de agua con bencidinas sea menor a un cierto valor. Las concentraciones así estimadas para las bencidinas son sumamente bajas, en general inferiores a la parte por billón.

La discusión anterior muestra la necesidad de contar con métodos analíticos muy sensibles y confiables que permitan determinar esas bajas concentraciones de bencidinas en agua. Adicionalmente se requiere que dichos métodos sean simples y rápidos de modo que se puedan establecer programas de monitoreo frecuente de los cuerpos acuáticos susceptibles a este tipo de contaminación.

En la literatura se han publicado diversos métodos para el análisis de bencidinas en agua, incluyendo métodos colorimétricos, espectrofluorimétricos en capa delgada y por cromatografía de gases con detector de ionización de flama, CG- FID (M.C. Bowman et al, 1976 y R. L. Jenkins, 1975). Este último ha dado los mejores resultados con límites de detección del orden de 2-3 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, las bajas presiones de vapor de las bencidinas y la naturaleza fuertemente polar de sus grupos amino dificultan el análisis de estos compuestos por cromatografía de gases. Los intentos que se han hecho para reducir los límites de detección utilizando detectores más selectivos y sensibles, como el de flama alcalina y el de captura de electrones, no han dado resultados satisfactorios (R.M Riggin, 1979).

Un método alternativo, que ha encontrado gran aceptación para el análisis de bencidinas en diversas matrices, es la cromatografía de líquidos en fase reversa (RP-HPLC) (HPLC por sus siglas del inglés High Performance Liquid Chromatography) con detección electroquímica. Esta técnica presenta la ventaja de ser simple y no requerir la formación previa de derivados de las aminas orgánicas, además se complementa con las características de alta sensibilidad y gran selectividad del modo de detección.

Los métodos hasta ahora publicados para la determinación de bencidinas a muy bajas concentraciones en agua, que utilizan la RP-HPLC con detección electroquímica, p. ej.(Lacorte S et al, 1999) no han obtenido resultados satisfactorios en recuperación y límite de detección (0.1 ppm), mientras que el método 605 de la EPA (USEPA, 1984), incluye una etapa larga, tediosa y relativamente complicada de preparación de la muestra, cuyo objetivo es extraer los solutos de la matriz, preconcentrarlos y purificar el extracto. Aunque los límites de detección alcanzados por este método son inferiores a una parte por billón, la confiabilidad de los resultados se encuentra limitada por los altos riesgos de pérdida o contaminación de las muestras durante la etapa de preparación.

El propósito de este trabajo fue el de desarrollar un método analítico para determinación de bencidinas en agua que, además de permitir la cuantificación de estos solutos a niveles cercanos o inferiores a la parte por billón, resultara más rápido, simple, confiable y robusto que los métodos hasta ahora publicados.

Las particularidades y ventajas del método propuesto se resumen en los siguientes puntos:

- 1) La preparación de muestra se simplifica utilizando la extracción en fase sólida en vez de la extracción líquido-líquido.
- 2) La manipulación de las muestras y los riesgos de pérdida o contaminación de éstas se minimizan acoplando en línea las etapas de preparación de muestra y análisis.
- 3) Para la etapa de análisis se aprovechan las características de sencillez, selectividad y sensibilidad proporcionadas por la cromatografía de líquidos en fase reversa con detección electroquímica.
- 4) El diseño del método hace posible la automatización de los análisis.

1.1 Estructura y propiedades de las bencidinas

La bencidina, las o-tolidinas, la o-dianisidina y la 3,3'-diclorobencidina son derivados de la bifenil-4,4'-diamina cuyo interés comercial se basa en que sirven como intermediarios en la manufactura de una amplia gama de colorantes y pigmentos azo.

La estructura general de estos compuestos es la siguiente:

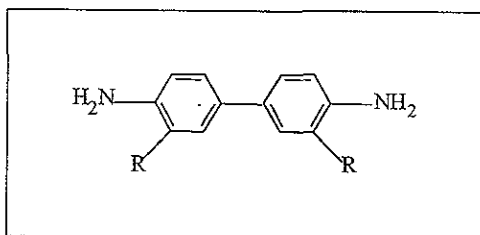


Fig1.1 Estructura general de las bencidinas

Tabla 1.1 Nomenclatura de las bencidinas

COMPUESTO	R	NOMENCLATURA
Bencidina	H	Bifenil-4,4'-diamina
o-Tolidina	CH ₃	3,3'-dimetilbifenil-4,4'-diamina
3,3'-Diclorobencidina	Cl	3,3'- Diclorobifenil-4,4'-diamina
o- Dianisidina	OCH ₃	3,3'- Dimetoxibifenil-4,4'-diamina

Las principales propiedades físicas de las bencidinas se muestran en la Tabla 1.2, incluyendo algunas propiedades fisico-químicas. Adicionalmente, en la Tabla 1.3 se reportan los coeficientes de distribución de las bencidinas entre el agua y algunos disolventes orgánicos.

TABLA 1.2. Principales propiedades físicas y químicas de las bencidinas

	Bencidina	O-Tolidina	3,3'-DCB	O-Dianisidina
No.de registro	92-87-5	119-93-7	91-94-1	119-90-4
Fórmula molecular	$C_{12}H_{12}N_2$	$C_{14}H_{16}N_2$	$C_{12}H_{10}Cl_2N_2$	$C_{14}H_{16}N_2O_2$
Color	Blanco	Blanco	Blanco	Blanco
Punto de ebullición:	400-401°C			
Punto de Fusión	128°C	130°C	132-133°C	133°C
pKa	pKa ₁ =4.96 pKa ₂ = 3.74	pKa ₁ = 4.79 pKa ₂ = 3.46		
Eo	+0.76 Volts			

TABLA 1.3. Coeficientes de distribución de las bencidinas entre el agua y algunos disolventes orgánicos. (Seong T. Hwang, 1980)

	Bencidina	3,3'-Diclorobencidina
Tricresyl fosfato	59	2600
Undecano	52	0.03
MTBK	77	1
Tridecano	44	0.02
Benceno	110	9
Isobutileno	140	0.04
Isobutano	90	0.02
n- Butilacetato	66	1.3
Isobutil acetato	70	0.8
Eter diisopropilico	80	0.05
Octanol	64	2290

A continuación se discuten algunas características importantes de algunos derivados de la bifenilamina.

Bencidina

Reactividad:

La bencidina lleva a cabo reacciones químicas características de las arilaminas primarias, así como aquellas relacionadas a su carácter difuncional tales como la oxidación a estructuras quinoides y copolimerizaciones. Puede tener reacciones de alquilación o de acilación secuencial en nitrógeno para formar los derivados mono, di, tri y tetramino sustituidos.

En la sulfonización de la bencidina se forman varios ácidos sulfónicos, la sulfonbencidina y los ácidos sulfonsulfónicos. La halogenación y nitración de los derivados N,N'-diacetil ocurren orto a los grupos amino, mientras que la nitración del sulfato de bencidina ocurre meta a los grupos amino. La bencidina también puede ser cuantitativamente cianoacilada con acrilonitrilo (cianoetilación) y reacciona con sales de diazonio para producir las correspondientes triazinas o compuestos diazoamino.

Una reacción comercialmente importante es la reacción de bencidina con ácido nitroso para formar la sal de bisdiazonio (o tetrazonio) que con naftol o derivados de naftilaminas y otros compuestos reactivos, produce una amplia y útil variedad de colorantes azo.

Las sales de tetrazonio pueden ser fácilmente convertidas a 4,4'-bifenildiól, por ebullición con agua o a bifenil por calentamiento con etanol. También puede participar en reacciones de Sandmeyer o Gatterman, pero los productos de sustitución generalmente son acompañados por mezclas complejas o por productos y polímeros.

Dependiendo de las condiciones la oxidación de la bencidina puede llevar a un número de productos coloreados, incluyendo la 4,4'-diaminoazobifenil, quinonedimina, perifenoquinona, y quinona. La bencidina también produce muchos compuestos de distintos colores cuando reacciona con metales cationicos y aniones oxidativos.

Síntesis:

La síntesis más simple y ampliamente usada es la reducción alcalina de nitrobenzeno a hidrazobenceno. Como reductores se usan amalgamas de zinc o sodio, electrólisis catódica o zinc metálico en polvo. El hidrazobenceno se separa de la mezcla de reacción produciendo con ácido clorhídrico, 26 la bencidina y otros productos.

Los azúcares, los glicoles y los formaldehídos también sirven como reductores pero no se usan comercialmente.

Toxicidad

La bencidina y sus sales son potentes carcinogénicos humanos, capaces de ser absorbidos a través de la piel por inhalación. Estudios epidemiológicos llevan a tales conclusiones. La exposición industrial está ampliamente asociada a esta potencialidad carcinogénica.

Se han reportado tumores en la vejiga entre trabajadores japoneses y pintores de seda que estuvieron en contacto con colorantes derivados de bencidina durante algún tiempo. Las investigaciones muestran que la orina de monos que estuvieron en contacto con este tipo de colorantes indica una reducción metabólica casi total de los colorantes a bencidina. Los colorantes derivados de bencidina también pueden ser reducidos por *E.coli* y bacterias del suelo.

Usos:

La bencidina ha sido utilizada en la manufactura de colorantes azo directos, para la industria textil, del papel y de las pieles. El *Índice de colores* enlista 250 colorantes derivados de la bencidina y muchos otros que son derivados de la bifenildiamina.

El negro directo 38 es uno de los principales colorantes consumidores de bencidina. Otros de los colorantes son el azul directo 2, café directo 95, verde directo 6, azul directo 6 y el rojo directo 28.

O-tolidina

Reactividad:

La o-tolidina presenta reacciones similares a aquellas de la bencidina. Forma mono y disulfatos así como varios mono y poliacil y alquil derivados.

Síntesis:

La o-tolidina se sintetiza a partir del o-nitrotolueno por procesos análogos a aquellos por los cuales la bencidina es preparada a partir del nitrobenzeno.

Toxicidad:

A pesar de que los colorantes de o-tolidina se han utilizado como sustituyentes de los colorantes de bencidina, se ha encontrado que son carcinogénicos en roedores, presentando un metabolismo similar al de la bencidina.

Usos:

La o-tolidina es ampliamente utilizada en la manufactura de colorantes azo directos, el *índice de colores* enlista 95 colorantes derivados a partir de ella, uno de los más importantes es el rojo directo 2 y el 39, también el azul directo 25.

Otro de sus usos es como indicador para la detección de cloro residual en aguas potables y recreativas

3,3'-Diclorobencidina

Reactividad:

Su reactividad es similar a la de los otros derivados de bencidina.

Síntesis:

La 3,3'-diclorobencidina se sintetiza por un proceso análogo al de la bencidina y otros derivados por una reducción alcalina del o-nitroclorobenceno y rearrreglos del compuesto hidrazo resultante.

Toxicidad:

Se ha encontrado que la 3,3'-diclorobencidina presenta propiedades carcinogénicas en roedores. Sin embargo, es excretada por perros sin cambios metabólicos apreciables y los estudios epidemiológicos no han dado evidencias de que exista un peligro carcinogénico debido a exposición industrial.

Usos:

Es usada exclusivamente en la manufactura de pigmentos amarillo, naranja y rojo. En menores cantidades para colorantes rojo directo enlistados en el *índice de colores*.

o-dianisidina

La o-dianisidina es el único derivado alcoxi de la bencidina, con importancia comercial. Está disponible comercialmente como dihidrocloruro de dianisidina que es muy soluble en agua.

Reactividad:

Su reactividad es típica de los derivados de la bencidina. Cuando es incorporada en colorantes, los grupos metoxil pueden ser dimetilados en un medio alcalino y el compuesto dihidroxi resultante puede formar quelatos con cobre. Estos quelatos son colorantes de excelente luminosidad.

Toxicidad:

Ha sido reportada como carcinogénica en roedores pero, como la 3,3'-diclorobencidina, no presenta cambios en las excreciones en perros. Su manejo industrial no se ha demostrado que sea una causa para tumores en el hombre.

Usos:

Se usa principalmente en la preparación de colorantes azo directos, 89 de los cuales pertenecen a la lista del *índice de colores*.

1.2 Extracción y preconcentración de compuestos orgánicos en agua

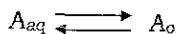
En el análisis de muestras complejas por cromatografía de líquidos, a menudo se requiere de un paso de pre-fraccionación, por medio de extracciones líquido-líquido, o precipitaciones; estas técnicas son poco automatizadas, laboriosas, consumen tiempo y conllevan a frecuentes errores.

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

La tecnología de las precolumnas conmutadas para la preconcentración y limpieza de aguas, conocida como Extracción Sólido - Líquido (ESL) o Extracción en Fase Sólida (EFS) en línea, presenta la ventaja de ser rápida y capaz de conseguir altos factores de concentración.

1.2.1 Preparación de la muestra por extracción líquido- líquido

La extracción líquido-líquido (ELL) se basa en la distribución (reparto) de un analito entre dos líquidos inmiscibles y está representada por el equilibrio:



Donde A_o es el analito extraído por la fase orgánica, y A_{aq} es el analito residual en la muestra acuosa. El coeficiente de distribución está dado por la relación de concentraciones de analito en las dos fases, es decir:

$$D = \frac{(A)_{aq}}{(A)_o}$$

Donde D es el coeficiente de reparto de A . Se asume que las variaciones de concentración de analito no modifican apreciablemente la miscibilidad mutua entre los dos solventes utilizados. D depende del solvente orgánico a utilizar, de la temperatura y, para los solutos ionizables, del valor del pH del medio acuoso

Como el valor de D es finito, en muchos casos el proceso de reparto debe favorecerse ya sea utilizando grandes volúmenes de extractante o realizando varias extracciones de una misma muestra.

Las sustancias neutras de características no polares pueden extraerse de sistemas acuosos a orgánicos directamente. Las especies con características ionizables requieren la supresión de su disociación modificando el valor del pH del medio. Es por ello que los analitos ácidos se extraen después de una acidificación de la muestra con ácido clorhídrico y los básicos de una alcalinización con hidróxido de sodio.

Por otra parte, es necesario considerar que en muchos casos (p. ej. análisis ambientales) se requiere preconcentrar el o los compuestos de interés durante la etapa de preparación de muestra. Esto implica que, en los métodos basados en la extracción líquido-líquido, será generalmente necesario evaporar grandes cantidades de disolvente orgánico hasta reducir el extracto a un pequeño volumen.

Para realizar la limpieza del extracto se deberá hacer alguna filtración, ya que tanto las muestras como los estándares a inyectar deben

estar totalmente libres de partículas en suspensión. Las partículas presentes en las muestras pueden rayar los sellos del inyector, o bloquear algún complemento del equipo cromatográfico especialmente tuberías o filtros de columnas. La filtración de las muestras se realiza en filtros desmontables o fijos que contienen membranas de 0.45 o 0.22 μm de diámetro de poro. Estos filtros se seleccionan de acuerdo a su resistencia frente al solvente de disolución de las muestras.

Se debe tener en cuenta la posible adsorción de analito a las membranas, para ello se suele filtrar una solución estándar de analito y se inyecta en el equipo de cromatografía de líquidos, tanto la muestra filtrada como la muestra sin filtrar y se compara la concentración hallada de analito en ambas. Se deberá evaluar si la membrana produce picos adicionales por el paso de sus componentes a la solución a inyectar, para ello se filtra un poco del solvente que se utiliza como medio de disolución para el analito y se inyecta. Si aparecen picos no adjudicables al solvente puro, es conveniente lavar la membrana con la misma disolución de la muestra a filtrar descartando los primeros mililitros. Cuando el analito se adsorbe en las membranas, o cuando la cantidad de muestra es muy pequeña como para intentar una filtración, la remoción de las partículas puede lograrse centrifugando la solución.

La extracción líquido-líquido es una operación lenta y tediosa, muy dependiente de la habilidad del operador y que está expuesta a numerosos problemas, como la formación de emulsiones, manipulación de grandes cantidades de solventes tóxicos e inflamables o riesgo de pérdidas en evaporaciones finales. Adicionalmente en el análisis de trazas debe considerarse que los solventes de extracción pueden agregar nuevos compuestos a la muestra a analizar (sus propias impurezas) y que estos compuestos pueden interferir en la determinación del analito.

1.2.2 Preparación de la muestra por extracción en fase sólida

Las técnicas de extracción en fase sólida han presentado un creciente interés como una alternativa a los laboriosos y lentos métodos de extracción líquido-líquido. En general la extracción en fase sólida puede ser descrita en una primera aproximación como un simple proceso cromatográfico y la retención de los compuestos orgánicos ocurre debido a que no son eluidos por el agua de la muestra acuosa misma.

La extracción en fase sólida se fundamenta en el fenómeno de la sorción, que a su vez involucra los siguientes mecanismos físico-químicos: adsorción, absorción, adsorción química y la condensación capilar, ya sea

de los componentes en estado gaseoso o de las sustancias disueltas sobre los adsorbentes sólidos. Las técnicas de extracción en fase sólida pueden efectuarse empleando operaciones experimentales en diferido o bien operaciones en línea.

La extracción o preconcentración en diferido (off-line) se lleva a cabo de manera independiente a la etapa de análisis. El proceso de preconcentración de los solutos comprende dos etapas operacionales: la extracción y la desorción.

En la primera parte, se efectúa la extracción de los solutos contenidos en la muestra por el adsorbente sólido. Los compuestos orgánicos son atrapados por un adsorbente empacado en columnas, cartuchos o en una matriz inerte de un disco de extracción basado en membranas. En la etapa de desorción, los solutos extraídos son eluidos mediante un volumen reducido de un disolvente orgánico apropiado. Después de la evaporación de este disolvente se obtiene un extracto concentrado de los solutos, el cual se puede analizar mediante procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de líquidos.

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

Comparada con los métodos de preparación de muestra por extracción líquido-líquido, la extracción en fase sólida fuera de línea ofrece tiempos de proceso reducidos y ahorro sustancial de solventes.

A pesar de lo anterior, estos procedimientos presentan aún varios inconvenientes, por ejemplo, pérdidas de analitos de interés por la continua manipulación de la muestra, contaminación adicional de la muestra por la manipulación y/o por los disolventes empleados en el proceso y menor sensibilidad del método debido a que generalmente sólo se analiza una alícuota del extracto obtenido.

En la figura 1.2 se presenta el principio del proceso de extracción en fase sólida en forma diferida (off-line).

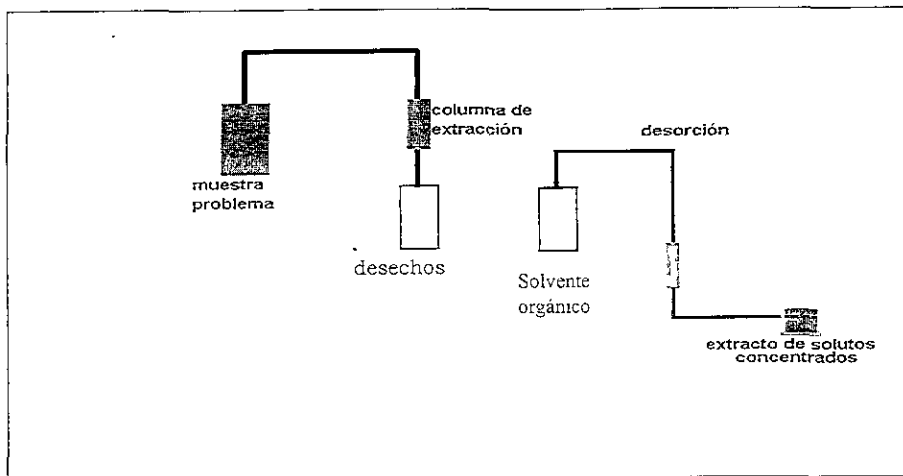


Figura 1.2 Principio del proceso de extracción en fase sólida en forma diferida (off-line)

Otra de las maneras disponibles para realizar la extracción en fase sólida, es la extracción en línea (on-line). En este caso, la extracción se lleva a cabo en precolumnas de acero inoxidable empacadas con el adsorbente y, posteriormente, los solutos extraídos y concentrados son desorbidos y transferidos directamente hacia una columna cromatográfica para su separación y cuantificación. Este proceso se realiza comúnmente colocando la precolumna entre dos puertos de una válvula de conmutación e insertando esta última entre el inyector y la columna analítica del cromatógrafo de líquidos. Si la adsorción y la desorción son eficientes se pueden esperar resultados cuantitativos más exactos y precisos.

Igual que las extracciones en diferido, en las extracciones en línea (on line) la etapa de preconcentración consiste en percolar un volumen dado de muestra a través del adsorbente sobre el cual se fijan los solutos de interés. La diferencia entre ambas técnicas está en la etapa de desorción ya que, en los sistemas en línea, el dispositivo usado para la extracción se acopla directamente con la columna analítica y las sustancias orgánicas preconcentradas se desorben y transfieren simultáneamente, mediante una fase móvil apropiada, hacia la columna cromatográfica para su análisis.

Con la finalidad de reducir el ensanchamiento de banda durante la transferencia de los analitos de la precolumna hacia la columna analítica, las dimensiones de la precolumna deben ser extremadamente pequeñas en comparación con las dimensiones de la columna analítica y los adsorbentes de empaque de la precolumna deben ser de granulometría pequeña.

Este método presenta la ventaja de que disminuye los riesgos de pérdida y contaminación de los solutos debido a que se minimiza la manipulación de la muestra. También se obtiene una mayor sensibilidad debido a que el extracto completo es transferido y analizado en el sistema cromatográfico.

En la figura 1.3 se presenta el principio operacional de este proceso de preconcentración y análisis.

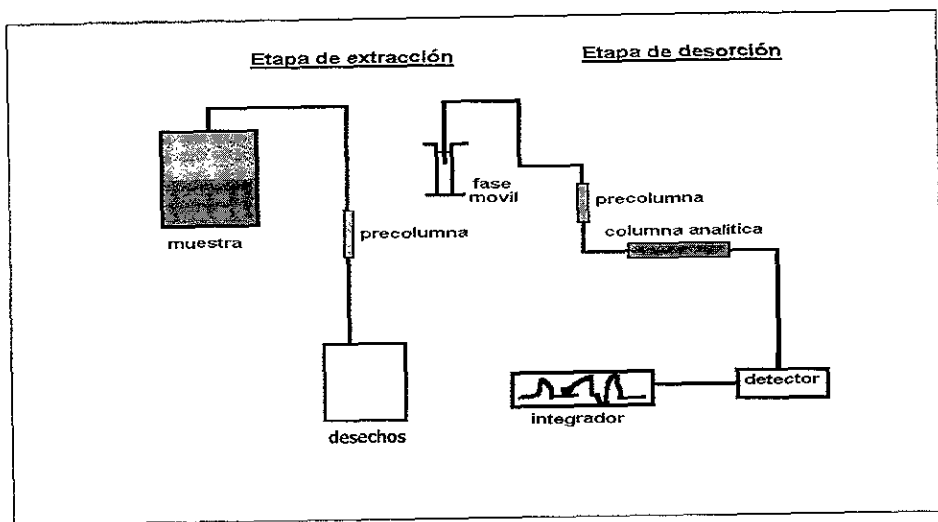


Figura 1.3 Extracción en fase sólida en línea

La selección del adsorbente a emplear para la preconcentración de compuestos a partir de muestras acuosas se fundamenta en la naturaleza química de estos mismos, de tal forma, que su coeficiente de distribución entre el adsorbente y el agua deberá ser lo más grande posible. Las fases sólidas que se pueden utilizar para realizar la extracción de compuestos orgánicos en muestras de agua son las fases químicamente enlazadas con cadenas hidrocarbonadas, los polímeros porosos, los intercambiadores de iones y los carbones.

A excepción de los intercambiadores iónicos, las fases mencionadas son utilizadas para la extracción de compuestos moleculares. La elección de una u otra depende en gran medida de la hidrofobicidad de los solutos de interés. Para los compuestos más hidrofílicos (compuestos con área hidrocarbonada pequeña y uno o varios grupos funcionales de gran polaridad) se recomiendan los adsorbentes en base carbón (p. ej. Hypercarb). Los compuestos de polaridad media, como las aminas y los clorofenoles, se extraen generalmente con adsorbentes poliméricos (p. ej. PRP, PLRP-S O CHP-3C). Finalmente, los compuestos fuertemente hidrofóbicos, como los hidrocarburos aromáticos polinucleares, se extraen con fases reversas químicamente unidas (C-8 y C-18).

De acuerdo con lo expresado anteriormente, los adsorbentes más adecuados para la EFS de bencidinas son los del tipo polimérico. Estas fases son generalmente copolímeros de estireno y divinilbenceno cuyo grado de entrecruzamiento es el adecuado para obtener partículas rígidas con alta resistencia a la presión. Por otra parte, la estructura macroporosa de las partículas permite disminuir la resistencia a la transferencia de masa en la fase estacionaria, lo que se traduce en una mayor eficiencia, comparada con la de las resinas microporosas clásicas. Adicionalmente, en la actualidad se producen fases poliméricas de granulometría muy fina (5 o 3 μm de diámetro de partícula) y regular, por lo que es posible obtener columnas o precolumnas de muy buena eficiencia.

Aunque la eficiencia y la resistencia a la presión de las fases poliméricas sigue siendo un poco menor que la de las fases químicamente unidas, presentan dos ventajas muy interesantes sobre éstas últimas. La primera es su excelente estabilidad en todo el intervalo de pH; las fases químicamente unidas están soportadas en sílice y por ello no son estables en medio alcalino. La segunda es su mayor poder de retención, lo que les permite retener compuestos orgánicos relativamente polares que no alcanzan a ser suficientemente retenidos por las fases químicamente unidas. Así el campo de aplicación de las fases poliméricas,

particularmente en EFS, es más amplio que el de las populares fases C-8 o C-18

Por otra parte, aunque persisten dudas respecto a algunos aspectos del mecanismo de retención en los adsorbentes poliméricos, se acepta que la retención es debida principalmente a interacciones hidrofóbicas similares a las generadas en las fases químicamente enlazadas C-8 o C-18. Además, debido a la presencia de anillos aromáticos en la red de la matriz polimérica, se pueden esperar también fuertes interacciones π - π con los anillos aromáticos de los solutos (Hennion y Coquart 1993).

Por lo anterior, las fases poliméricas han sido clasificadas dentro del grupo de "fases reversas" cuyo comportamiento es fundamentalmente explicado mediante la teoría solvofóbica de Hovarth. Dicha teoría señala que la interacción entre las moléculas del soluto y del disolvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas del disolvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar a la fase estacionaria la cual actúa como receptor pasivo.

Las fases reversas tienen la desventaja de ser muy poco selectivas, especialmente los polímeros cuyo poder de retención es muy fuerte. Por ello, en los métodos que utilizan estas fases para extracción en fase sólida de solutos orgánicos a partir de muestras acuosas, es necesario incluir un paso posterior de purificación o limpieza de las muestras concentradas. Cuando los solutos de interés son ionizables, es posible utilizar un método que da muy buenos resultados y está basado en el uso de una segunda precolumna empacada con un intercambiador iónico. Las muestras a un pH adecuado para tener los analitos en forma molecular, son extraídas y concentradas en la primera precolumna empacada con fase reversa. Posteriormente, los solutos son desorbidos de la primera precolumna, mediante una disolución a un pH tal que provoque la ionización de los compuestos de interés, y son transferidos en línea a la segunda precolumna empacada con el intercambiador iónico donde quedan retenidos. Así, la primera precolumna actúa como un filtro que atrapa a todos los compuestos no ionizables presentes en la muestra. La segunda precolumna contiene un extracto de la muestra muy limpio, ya que solo estarán en ella los solutos que hayan podido ionizarse y transferirse.

La magnitud de la interacción soluto-fase estacionaria será mayor cuanto mayor sea el área hidrocarbonada de ambos, debido a un incremento en la superficie de contacto. Mientras que las funciones polares del soluto favorecerán su interacción con los disolventes polares y reducirán su retención.

El proceso de extracción en fase sólida, en cualquiera de sus modalidades, corresponde a una cromatografía de análisis frontal. Al pasar el influente a través de la columna, el soluto se adsorbe en las primeras porciones de fase estacionaria y un efluente libre de soluto emerge de la columna. A medida que la fase estacionaria se satura localmente con el soluto, éste avanza progresivamente en la columna, en forma de un frente, ocupando las porciones subsecuentes, no saturadas, del adsorbente. Finalmente todo el lecho estacionario queda saturado con el soluto y el frente de éste emerge de la columna. En este momento, la composición del efluente es idéntica a la del influente. Los procesos bien conocidos de difusión del soluto en la fase móvil y en la fase estacionaria, responsables del ensanchamiento de banda en cromatografía de elución, también están presentes en la cromatografía de análisis frontal. Su efecto es la dispersión del frente de migración del soluto, el cual no avanza como un frente recto sino que ocupa una zona finita en la columna, denominada zona de transición. Esta zona separa la porción de fase estacionaria totalmente saturada con soluto de la porción de columna totalmente libre de soluto. Cuando el extremo más avanzado de la zona de transición llega al final de la columna, el soluto empieza a emerger en el efluente; sin embargo en este momento no toda la fase estacionaria en la columna se encuentra saturada con soluto. La saturación u ocupación total del adsorbente se produce hasta que toda la zona de transición ha emergido de la columna.

En el análisis frontal, el tiempo en el que emerge de la columna el centro de masa (o punto estequiométrico) del frente, está relacionado con el tiempo de retención del soluto en el sistema fase estacionaria-fase móvil considerado, por tanto depende del coeficiente de distribución del soluto (aspecto termodinámico). El ancho de la zona de transición está relacionado con los fenómenos de difusión y por tanto con la eficiencia del proceso (aspecto cinético). Debido a que en EFS el proceso se detiene antes de que inicie la fuga del soluto, es importante tener una zona de transición lo más estrecha posible para aprovechar al máximo la capacidad de adsorción de la fase estacionaria.

Es interesante mencionar que la capacidad de adsorción de los copolímeros estireno-divinil benceno disminuye hacia cierto tipo de compuestos, sobre todo de naturaleza aromática conforme el adsorbente se va usando. Lo anterior se atribuye a la compactación que experimentan las partículas del polímero. Afortunadamente la capacidad de este tipo de soportes se puede regenerar fácilmente con un tratamiento basado en disoluciones acuosas de alcoholes (Jahangir y Samuelson 1980).

Los antecesores directos de las modernas fases poliméricas son las resinas XAD; particularmente XAD-2 y XAD-4. Estas resinas fueron muy utilizadas en los años 70's y 80's (G. A. Junk et al 1976), para la EFS en diferido de un gran número y variedad de microcontaminantes orgánicos en agua. Sin embargo, su baja resistencia mecánica y su pobre eficiencia hacen inviable su acoplamiento a la cromatografía de líquidos para la EFS en línea. Además, aún para las extracciones en diferido, la lenta cinética del proceso adsorción-desorción en estos materiales, obliga a trabajar las columnas a muy bajas velocidades de flujo para evitar la fuga prematura de los solutos más polares (L. E. Vera-Avila et al, 1999). Estas desventajas fueron subsanadas en gran medida al desarrollarse los adsorbentes poliméricos modernos que han ido desplazando paulatinamente a las resinas XAD de la mayoría de sus aplicaciones analíticas. En la actualidad, las resinas XAD siguen siendo utilizadas en una gran variedad de aplicaciones, por su menor costo, pero a nivel industrial.

1.3 La Detección Electroquímica en HPLC.

El detector electroquímico utilizado en este trabajo, es un detector selectivo, empleado para la detección de analitos que pueden oxidarse o reducirse ante la aplicación de un potencial. Consta de 2 celdas, una celda de guardia y una celda analítica. La primera tiene por objeto "limpiar" la fase móvil de sustancias electroactivas para que, al llegar ésta a la celda analítica, la corriente residual sea mínima y la sensibilidad de detección para los analitos de interés sea máxima. Con este fin, la celda de guardia se coloca entre las bombas del cromatógrafo y el inyector, imponiendo a su electrodo de trabajo un potencial que deberá ser entre 50 y 100 mV superior (más oxidante o más reductor, según sea el caso) al potencial del electrodo de trabajo de la celda analítica. Por sus funciones, el electrodo de trabajo de la celda de guardia es de gran superficie (coulombimétrica) y está constituido en nuestro caso, por un cilindro de carbón poroso a través del cual pasa la fase móvil. La celda analítica utilizada, denominada celda de alta sensibilidad, consta de dos electrodos de trabajo, a cada uno de los cuales se le puede imponer independientemente un potencial; al interior de la celda, cada uno de esos electrodos tiene su correspondiente electrodo de referencia y contraelectrodo (patente de fabricante). Los dos electrodos de trabajo de la celda analítica son de carbón poroso, el primero (con respecto al paso de la fase móvil) es coulombimétrico de gran superficie y el segundo es amperométrico.

Un detector electroquímico en su forma más simple consta de una fuente de poder y una celda de flujo en la cual están colocados tres electrodos, de tal manera que su superficie se encuentra en todo momento

en contacto con el fluido que atraviesa la celda. A su vez, los tres electrodos están conectados a la fuente de poder, mediante la cual se imponen o se miden diferencias de potencial o intensidades de corriente. Aunque en la actualidad existen detectores electroquímicos muy sofisticados que permiten poner en juego una gran variedad de técnicas electroquímicas (amperometría, coulombimetría, voltamperometría cíclica, pulsos de tensión sobrepuesta, etc.), en este inciso nos referimos al uso más básico y común de este detector.

Para que un compuesto pueda ser detectado por un detector electroquímico se requiere que dicho compuesto sea electroactivo, es decir, que sea capaz de oxidarse o reducirse en el dominio de electroactividad definido por el sistema. La reacción de transformación parcial o total del soluto es promovida por el aporte de energía en forma de un potencial eléctrico. Esta energía es proporcionada por la fuente de poder mediante la cual se impone una diferencia de potencial entre dos electrodos de la celda de flujo; uno de ellos es un electrodo de potencial fijo o electrodo de referencia y el otro es el electrodo de trabajo, el cual adquiere un potencial positivo o negativo con respecto al potencial del electrodo de referencia. Si la diferencia de potencial aplicada es suficientemente grande, ocurrirá la oxidación o reducción del analito en la superficie del electrodo de trabajo, generándose una corriente eléctrica. Esta corriente fluye por el circuito externo de la celda hacia la fuente de poder, donde es medida, y regresa a la celda por el tercer electrodo, denominado electrodo auxiliar o contraelectrodo. En la superficie de este último se produce la reacción redox complementaria que involucra a especies presentes en la fase móvil o al disolvente mismo. Finalmente, el circuito se cierra en el interior de la celda por el movimiento de cargas, portadas por iones presentes en el fluido, entre el contraelectrodo y el electrodo de trabajo.

Los detectores electroquímicos comerciales se pueden clasificar en dos grandes grupos, los amperométricos y los coulombimétricos.

En los detectores amperométricos, la celda está generalmente constituida por dos bloques de un material adecuado (p. ej. Teflón) que se mantienen unidos mediante un juego de tornillos. En la cara interna de uno de los bloques y hacia su parte media se encuentra colocado el electrodo de trabajo, una pequeña pastilla (carbón vitrificado, oro, platino, etc.) que puede cambiarse fácilmente para adaptarse a diferentes aplicaciones; en este mismo bloque, hacia uno de sus extremos, está colocado el contraelectrodo constituido por un alambre o una pastilla de platino. En el bloque contrario hay dos perforaciones, para la entrada y salida del efluente de la columna, que están comunicadas mediante un pequeño canal impreso en la cara interna del bloque; por lo tanto el

volumen de celda en estos detectores es muy pequeño, de apenas 1 a 2 μL . Adicionalmente, en este bloque hay una perforación central donde se introduce el electrodo de referencia, generalmente un pequeño electrodo de $\text{Ag}^\circ | \text{AgCl}$. Entre los dos bloques se coloca una membrana de Teflon con una ranura central; su función es evitar el contacto directo entre el electrodo de referencia y el de trabajo (que se encuentran enfrente uno de otro) y coadyuvar al buen sellado de la celda.

Dadas las características de la celda anteriormente descrita, y en particular la pequeña superficie del electrodo de trabajo, sólo una mínima fracción del soluto alcanza a ser electrolizada durante su paso a través de la celda. Sin embargo el flujo continuo del efluente, que facilita el transporte de especies hacia la superficie electroactiva por fenómenos de convección, y la presencia de un electrolito indiferente en la fase móvil, que participa en el transporte de corriente por migración, permiten asegurar el establecimiento de un régimen de difusión pseudoestacionaria. En estas condiciones la corriente de electrólisis es proporcional a la concentración del soluto electroactivo. La constante de proporcionalidad depende del propio soluto (movilidad y número de electrones intercambiados en la reacción redox), del diseño y características de la celda y de algunos parámetros experimentales como la composición y velocidad de flujo de la fase móvil. Lo anterior implica que, para efectuar una determinación cuantitativa, siempre será necesaria una calibración con estándares del soluto a concentración conocida.

El dominio de electroactividad del sistema depende de la naturaleza y composición de la fase móvil y de la naturaleza del electrodo de trabajo. Considerando que las técnicas electroquímicas requieren de un medio conductor, este tipo de detección sólo puede usarse con fases móviles acuosas o mezclas agua-disolvente orgánico, a las que se adiciona un electrolito. Esto implica que el uso del detector electroquímico está limitado a la Cromatografía en Fase Reversa, la Cromatografía de Intercambio iónico y la Cromatografía de Pares de Iones. Los electrodos de trabajo más comunes en los detectores amperométricos son el de carbón vitrificado y el de platino. Ambos tienen el inconveniente de no poder operar hacia los medios muy reductores porque se presenta el muro de reducción del agua desde potenciales cercanos a los 0 V (vs ENH) en condiciones ácidas. Por el contrario, el muro de oxidación del agua se presenta a potenciales bastante oxidantes por lo que el campo de aplicación de los detectores electroquímicos en el modo anódico (oxidación de solutos) es muy amplio. Un inconveniente de las celdas amperométricas es el de requerir una limpieza (pulido) bastante frecuente de la superficie del electrodo de trabajo, ya que los productos formados durante la

electrólisis de los solutos quedan a menudo adheridos, disminuyendo la de por sí pequeña superficie electroactiva. Por otra parte, como las corrientes generadas son muy pequeñas, la caída óhmica (iR) en el interior de la celda amperométrica es despreciable y la diferencia de potencial aplicada determina realmente el potencial del electrodo de trabajo con respecto al de referencia.

El conocimiento de las curvas intensidad-potencial del compuesto considerado permite elegir el valor de potencial que deberá imponerse al electrodo de trabajo para provocar la reacción redox. En el caso de sistemas redox rápidos, la oxidación de un compuesto requerirá la imposición de un potencial (vs ENH) que podrá ser sólo ligeramente superior al potencial normal del par redox en juego. Por el contrario, cuando los sistemas son lentos se requerirá aplicar una sobretensión anódica importante para lograr la oxidación deseada. En ambos casos, a partir de un cierto voltaje, un aumento en el potencial aplicado provocará un aumento en la corriente generada hasta llegar a un punto a partir del cual la corriente permanecerá constante. Esta corriente es la corriente límite de difusión, característica del compuesto y proporcional a su concentración en la muestra analizada pero dependiente también de otras condiciones experimentales. Es importante subrayar que no es condición necesaria el que los sistemas redox sean rápidos para poder realizar la detección electroquímica. El factor crítico es que la corriente debe ser proporcional a la concentración, es decir, el proceso debe estar controlado por el transporte de masa: difusión del analito hacia el electrodo y difusión del producto formado desde el electrodo. Adicionalmente, la corriente residual (corriente en ausencia de analito), al potencial que se esté empleando para el análisis, debe ser pequeña y estable. Esto conduce a bajos niveles de ruido y en consecuencia una mayor sensibilidad.

A manera de ilustración, las ecuaciones (1a, b, c) y (2a, b, c) muestran la expresión matemática de la curva intensidad- potencial para un reductor solo (corriente anódica) de un sistema lento y uno rápido, respectivamente. En ambos casos se presupone un régimen de difusión estacionario y un sistema simple del tipo $\text{Red} - ne^- \rightleftharpoons \text{Ox}$.

Sistema lento

$$(1a) \quad E = E_o + \frac{RT}{\beta nF} * \ln \frac{k_{red}}{i_o} + \frac{RT}{\beta nF} * \ln \frac{i}{i_{red} - i}$$

$$(1 \text{ b}) \quad E = E_{1/2} + \frac{RT}{\beta nF} * \text{Ln} \frac{i}{i_{red} - i}$$

Donde

$$(1 \text{ c}) \quad E_{1/2} = E_o + \frac{RT}{\beta nF} * \text{Ln} \frac{k_{red}}{i_o}$$

Donde

E es el potencial del electrodo de trabajo (Volts)

i es la corriente de electrólisis a ese potencial (Amperios)

E_o es el potencial normal del par redox involucrado

i_{red} es la corriente límite de difusión del reductor

β es su coeficiente de transferencia

i_o es una constante de velocidad característica del sistema redox considerado

k_{red} es el coeficiente de difusión del reductor

n es el número de electrones intercambiados

R es la constante de los gases

T es la temperatura absoluta

F es el Faraday,

E_{1/2} es llamado potencial de media onda y corresponde al valor de potencial cuando i = i_{red/2}; este potencial es independiente de la concentración.

Sistema rápido

$$(2 \text{ a}) \quad E = E_o + \frac{RT}{nF} * \text{Ln} \frac{k_{red}}{k_{ox}} + \frac{RT}{nF} * \text{Ln} \frac{i}{i_{red} - i}$$

$$(2 \text{ b}) \quad E = E_{1/2} + \frac{RT}{nF} * \text{Ln} \frac{i}{i_{red} - i}$$

donde

$$(2 \text{ c}) \quad E_{1/2} = E_o + \frac{RT}{nF} * \text{Ln} \frac{k_{red}}{k_{ox}} \approx E_o$$

En este caso k_{ox} es el coeficiente de difusión del oxidante del par redox y como en general k_{red} y k_{ox} difieren poco, el potencial de media onda

es muy cercano al potencial normal. De estas relaciones se puede deducir que cuando el potencial impuesto al electrodo es aproximadamente $120/n$ mV superior a E_0 , la corriente de electrólisis es practicamente igual a la corriente límite de difusión del reductor ($i = 99\% i_{red}$). Esto confirma que para un sistema rápido basta imponer al electrodo de trabajo un potencial ligeramente superior al potencial normal del par redox para estar en condiciones adecuadas para que la corriente de electrólisis sea proporcional a la concentración del soluto en la muestra.

La coulombimetria consiste en la determinación de la cantidad de electricidad puesta en juego en el curso de una reacción electroquímica. Sea por ejemplo la reacción simple: $Red - ne^- \rightleftharpoons Ox$, conociendo la cantidad de electricidad y el número de electrones intercambiados por molécula, se puede deducir la cantidad de reductor que ha sido oxidado. Para la detección coulombimétrica en HPLC, la electrólisis se realiza a potencial constante.

Los detectores coulombimétricos se caracterizan por tener un electrodo de trabajo de gran superficie. En general se trata de un electrodo de grafito en forma de cilindro poroso a través del cual fluye el efluente de la columna; esto maximiza el contacto de los compuestos electroactivos en solución con la superficie del electrodo, en gran parte debido al aumento de la velocidad de migración de las especies hacia la superficie del electrodo por fenómenos de convección. Esencialmente, se producirá un 100% de conversión de las especies electroactivas.

El potencial impuesto al electrodo de trabajo se escoge en muchos casos de modo a colocarse sobre la meseta de difusión del analito de interés, con el fin de obtener la intensidad de corriente más alta posible y por tanto una mayor sensibilidad. Sin embargo, en el caso de muestras complejas donde hay posibilidad de coelución de especies electroactivas interferentes, el potencial del electrodo de trabajo se selecciona buscando mejorar la selectividad aunque se pierda en sensibilidad.

En todo caso, la corriente producida estará directamente relacionada con la cantidad de sustancia electrolizada según la Ley de Faraday. Esta última, mostrada en la ecuación (3), es la relación matemática fundamental de la coulombimetria.

$$Q = nFN \quad (3)$$

Donde, Q es la carga total transferida (coulombs), n es el número de equivalentes por mol (o número de electrones transferidos en la reacción

electroquímica), F es la constante de Faraday ($\approx 96,500$ coulombs/equivalente) y N es el número de moles de reactivo transformadas.

Si la corriente (i) es registrada como una función del tiempo (t), la ecuación anterior puede ser presentada como:

$$Q = \int_0^{\infty} i dt \quad (4)$$

Por otra parte, cuando el detector opera con eficiencia coulombimétrica, la corriente en un régimen de difusión estacionario o pseudoestacionario se define por:

$$i = n F C (F) \quad (5)$$

donde, C es la concentración de soluto (mol/ ml) en la fase móvil que atraviesa la celda del detector en un momento dado y F es el flujo volúmico (ml/seg).

De las relaciones anteriores se deduce:

$$Q = nF (F) \int_0^{\infty} C dt = K \times \text{área del pico} \quad (6)$$

Donde K es una constante de proporcionalidad y el área del pico depende únicamente de la concentración de la especie electroactiva y del número de electrones intercambiado en la reacción redox.

A diferencia de los detectores amperométricos, cuya celda es fácil de desmontar para limpiar el electrodo de trabajo, en los detectores coulombimétricos la celda está sellada y el electrodo no es accesible. Sin embargo, debido a la gran área superficial del cilindro poroso, la respuesta a un soluto dado se mantiene aun cuando una porción significativa de la superficie del electrodo esté inactiva por contaminación. Así, el tiempo de vida útil de la celda antes de requerir un tratamiento de limpieza es mucho mayor que el de las celdas amperométricas. Dicho tratamiento se realiza haciendo circular por la celda disoluciones acuosas de ácidos y/o bases relativamente concentradas. Por otra parte, la mayor desventaja del electrodo poroso es su sensibilidad a la presencia de partículas sólidas, aun muy finas, en el fluido que atraviesa la celda. Estas partículas quedan fácilmente atrapadas en los poros bloqueando el flujo y provocando un

aumento de presión que puede ocasionar la destrucción del electrodo de trabajo. Por ello es necesario extremar precauciones y colocar filtros en línea adicionales, con poro muy fino, entre la columna y el detector.

La corriente residual en los detectores coulombimétricos alcanza a ser muy importante y limita la sensibilidad. Para disminuirla, estos detectores cuentan con una celda adicional de pre-electrólisis que permite eliminar impurezas electroactivas presentes en la fase móvil. Esta celda se coloca a la salida de la bomba del cromatógrafo. En condiciones óptimas y para solutos favorables es posible detectar cantidades de soluto del orden de los picogramos.

Existe una amplia variedad de compuestos que pueden analizarse utilizando los detectores electroquímicos (amperométricos o coulombimétricos). Para los compuestos orgánicos la posibilidad de detección está determinada por la presencia de grupos funcionales electroactivos en la molécula. Así, muchos compuestos que son fácilmente oxidables contienen grupos con pares de electrones libres en alguno de sus átomos, por ejemplo el grupo hidroxilo de un fenol o el grupo amino de una anilina. Los compuestos fácilmente reducibles contienen grupos como carbonilo o nitro.

Entre los tipos más comunes de compuestos que han sido detectados por métodos electroquímicos se cuentan: antioxidantes, carbohidratos, fenoles, catecolaminas, drogas, etc. Adicionalmente, el campo de aplicación de estos detectores puede ampliarse por la formación de derivados electroactivos de compuestos difícilmente oxidables o reducibles, un ejemplo típico es la formación de derivados precolumna de los aminoácidos primarios con o-ftaldehído.

En la figura 1.4 se muestran algunas estructuras de compuestos que son fácilmente oxidables o reducibles; como puede observarse, las aminas aromáticas (y por tanto las bencidinas) pertenecen al grupo de los compuestos oxidables.

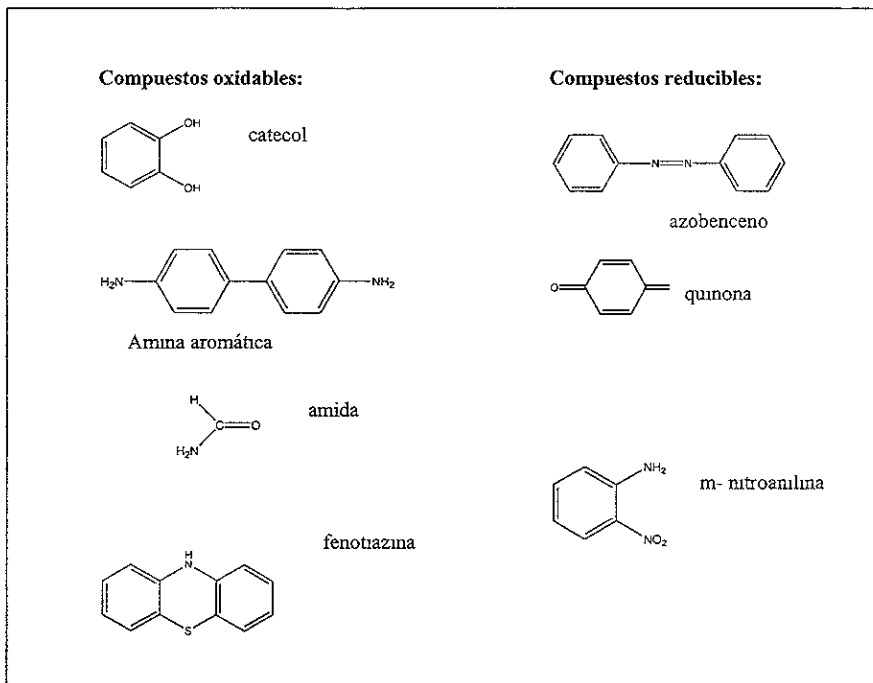


Figura 1.4 .Compuestos típicamente electroactivos.

2.1 Equipo y accesorios

- Cromatógrafo de líquidos marca Gilson equipado con 2 Bombas HPLC modelos 305 y 306 (modelo 305 programable y 306 no programable), con capacidad para elaborar gradientes de elución de tipo binario, (bomba de análisis).
- Mezclador modelo 811B y módulo manométrico modelo 805, ambos de la marca Gilson.
- Detector electroquímico, multielectrodo Coulochem II
- 2 integradores HP modelo 3396 serie II y HP 3396A
- Bomba isocrática Beckman 210B (bomba de muestra)
- Bomba isocrática Eldex modelos CC-30-5 y CC-100-S
- Inyector manual Rheodyne 7125 con loop de 24 μl (determinado por calibración)
- Válvula de conmutación Rheodyne 7000

Otros equipos y accesorios empleados:

- Micropipetas de volumen variable con intervalo de 50-200 μl y de 200-1000 μl , marca Scorex (Suiza), modelo DST-100C
- Baño de ultrasonido para degasificar soluciones y fases móviles, marca Sonicor (Copiague N. Y.) modelo SC-100
- pHmetro marca Corning (Corning N. Y), modelo 220, equipado con un electrodo combinado de vidrio calomel, Cole parmer, modelo 0M027
- Purificador y desionizador de agua NANOpure, marca Barnstead Thermolyne (Dubuquem IA, EUA) modelo D4741
- Microjeringa de 100 microlitros Hamilton 80665

- Columna analítica con longitud de 15 cm, diámetro interno de 4.6 mm, empaque fase reversa C-18 de 5 μm de diámetro de partícula (Hypersil ODS)
- Precolumna de 20 mm de longitud y 2 mm de diámetro interno, empacada con fase estacionaria PLRP-S con tamaño de partícula de 10 -15 μm . Esta precolumna se colocó entre las puertas 1 y 4 de la válvula de conmutación.

En la figura 2.1 se presenta el sistema diseñado para el tratamiento de las muestras que fue acoplado en línea entre el inyector del sistema cromatográfico Gilson y la columna analítica.

2.1.1 Columna analítica y precolumna de concentración

La columna y la precolumna utilizadas se empacaron en el laboratorio. El dispositivo utilizado, permite empacar este tipo de columnas a presiones altas, generando un empacado homogéneo y compacto.

Este proceso consiste en preparar una suspensión estable de la fase estacionaria que se necesita empacar, en este caso las fases estacionarias utilizadas fueron:

Para la columna analítica, una fase reversa C-18, Hypersil ODS de 5 μm de diámetro de partícula.

La precolumna fue empacada con una fase estacionaria a base del copolímero estireno divinilbenceno PLRP-S de 10 -15 μm de diámetro de partícula. En ambos casos la lechada se elaboró utilizando acetoneitrilo/agua 20:80 (v/v).

De acuerdo a Jahangir y Samuelson, 1980, la capacidad de los polímeros porosos estireno divinilbenceno para adsorber compuestos aromáticos a partir de disoluciones acuosas disminuye con el uso prolongado de dichos polímeros, debido a la contracción de éstos, sin embargo la capacidad del polímero se puede restaurar por tratamiento con disoluciones acuosas de alcoholes. Con el objetivo de prevenir estos fenómenos, la precolumna PLRP-S utilizada en este trabajo se activó regularmente empleando una fase móvil metanol /agua 80:20 (v/v)

2.1.2 Calibración del rizo del inyector.

Para calcular las recuperaciones de los solutos durante la etapa de extracción y concentración en fase sólida y su análisis en línea, es necesario calibrar el rizo del inyector. La calibración permite conocer el volumen exacto de cada disolución estándar de los analitos que es inyectada y con ello relacionar la cantidad inyectada con las unidades de área reportadas para cada analito probado. Estas relaciones son usadas como referencia para determinar la cantidad de soluto recuperado en cada experimento.

Esta calibración del rizo se lleva a cabo a través de un proceso de valoración ácido-base, (Padilla Cortes, 1997). Para tal fin se usó ácido perclórico (HClO_4) 5.9 N, el cual fue previamente valorado con una solución estandarizada de NaOH 0.1 N. El valor nominal del rizo era de 20 μl por lo que, con una jeringa de 100 μl (Hamilton, 80665) se introdujo dos veces más su volumen, de tal manera que efectivamente quedara totalmente lleno. Una vez llenado el rizo, el ácido fue desplazado a un matraz Erlenmeyer con la ayuda de un flujo de agua bombeado a través del inyector en posición de inyección. El líquido desplazado fue valorado con la disolución de NaOH 0.1N. Mediante esta valoración se calculó el volumen real del rizo de inyección. Este proceso se efectuó cinco veces.

2.2 Reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC, Prolabo (París, Francia)
- Metanol grado HPLC, E. Merck Science (Darmstadt, Alemania)
- Acido Cítrico, monohidratado granular (99.97% de pureza) de J. T. Baker (Phillipsburgh, NJ. EUA)
- Agua grado reactivo
- Hidróxido de sodio (lentejas, bajo en carbonatos) R A, Baker
- Acetato de Amonio RA, Productos Químicos Monterrey

Sustancias de referencia

- Bencidina Chem Service (West Chester, PA, EUA), pureza 99.0%
- 3,3'- diclorobencidina (DCB) Chem Service (West Chester, PA, EUA), pureza 99.0%

Las fases móviles empleadas se prepararon con agua purificada y desionizada obtenida de un sistema purificador Nanopure. Con el fin de eliminar el oxígeno presente en el seno de la fases móviles, éstas se degasificaron en un baño de ultrasonido durante 10 minutos antes de usarse.

2.2.1 Disoluciones patrón de Bencidinas

Para preparar la solución patrón de bencidina 1000 ppm, se pesaron 10 mg de sustancia de referencia, se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se disolvieron y llevaron a volumen con metanol grado HPLC. La solución patrón de diclorobencidina 1000 ppm se preparó de la misma manera.

Estas disoluciones patrón se emplearon para preparar las disoluciones estándar menos concentradas con las cuales se doparon las muestras de agua y se realizaron las inyecciones directas para calibración. Por ejemplo, para preparar una solución 5 mg/L de bencidina, se tomó una alícuota de 25 μ L de la solución patrón en un matraz volumétrico de 5 mL y se llevó a aforo con una mezcla agua-acetonitrilo 50:50 v/v.

Todas las disoluciones fueron guardadas en frascos ámbar y almacenadas a una temperatura de 4 °C.

2.2.2 Preparación de disoluciones y fases móviles.

El pH de todas las soluciones ácidas o básicas fue ajustado con el pHmetro, teniendo siempre la precaución de calibrar el equipo antes de su uso. Se preparó una solución amortiguadora de citratos 1M a pH = 6, a partir del ácido cítrico monohidratado granular, añadiendo el volumen necesario de una disolución saturada de NaOH para obtener el pH deseado.

La fase móvil A se preparó con un 10% de acetonitrilo y la fase móvil B con un 70% de acetonitrilo y a ambas se les añadió el amortiguador de citratos al 1% v/v. También fue necesaria una solución de acetato de amonio 1M para la preparación de muestra, esta solución fue preparada a partir de cristales del reactivo correspondiente.

2.2.3 Preparación de las muestras

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis, sobre todo en la determinación de trazas y cuando la matriz en que se encuentra el analito es muy compleja. La forma de la preparación de la muestra depende de muchos factores como pueden ser las propiedades físicas y químicas de los analitos, la concentración y forma en que se presenta el analito en la muestra, la naturaleza de la matriz de la muestra y los antecedentes de la forma en que la muestra llega al laboratorio.

En el caso de muestras ambientales existen normas que indican la forma en que las muestras deben ser recolectadas, cómo deberán ser empacados los frascos para su transporte, la temperatura para su envío al laboratorio, el tiempo máximo entre su recolección y análisis, y en general los métodos de preservación de la muestra.

En la recolección de estas muestras se utilizaron frascos de vidrio de color ámbar con tapones recubiertos de politetrafluoroetileno, los cuales fueron previamente lavados. Se recolectaron por lo menos 200 mL de muestra que se conservaron en refrigeración.

Las muestras que se obtuvieron presentaron sólidos en suspensión, algunas en mayor grado que otras dependiendo de la fuente de la que se tomaron, sobre todo las muestras de aguas superficiales. Por ello fue necesario hacer filtraciones previas a las operaciones de extracción en fase sólida. En algunos casos se intentó coagular a los sólidos suspendidos con sales coagulantes, pero se presentaron problemas de interferencia en las determinaciones debido a la presencia de residuos del coagulante. Por lo tanto se decidió filtrar directamente las muestras con membranas de "nylon" colocadas en la unidad de filtración por vacío.

El tipo de membrana utilizada fue diferente según la muestra a preparar. En las muestras más difíciles se filtró primero por una membrana con poro de 0.45 μm y finalmente con una membrana de 0.20 μm . Mientras que las muestras de agua subterránea y potable, solo se filtraron con una membrana de 0.20 μm .

Antes de usarlas, estas membranas se lavaron con acetonitrilo puro, dejándolas sumergidas durante una o dos horas en el disolvente, posteriormente se colocaron en el equipo de filtración, enjuagándolas con 5 mL de acetonitrilo fresco, finalmente se lavaron con 10 mL de agua grado reactivo.

Teniendo ya acondicionada la membrana, se procedió a la filtración de la muestra. La botella de muestreo se enjuagó con 10 mL de metanol, usando una primera porción de 2 mL, después de 4 mL y finalmente el resto. Las diferentes porciones del disolvente de enjuague se pasaron a través de la misma membrana utilizada para filtrar la muestra y se recolectaron en el mismo matraz. La mezcla se amortiguó adicionando 2 mL de acetato de amonio 1M.

El matraz conteniendo la muestra preparada fue utilizado como reservorio de la bomba isocrática Beckman (denominada como bomba "P2" en la figura 2.1). Este procedimiento se utilizó tanto para las muestras de agua pura fortificada, como para las muestras de agua potable, aguas superficiales y subterráneas.

2.3 Determinación del volumen de muestra que se puede cargar en la precolumna de concentración.

La determinación del volumen de muestra que puede cargarse en la precolumna sin que se fugen los analitos puede llevarse a cabo por dos vías; el análisis frontal y por aumento progresivo del volumen cargado analizando la recuperación de los analitos.

En el caso del análisis frontal, la muestra con el analito a examinar se hace pasar por la precolumna, cuya salida está conectada directamente al detector. Al inicio del proceso todo el soluto es adsorbido y no se registra ninguna señal en el detector. Sin embargo, a medida que el proceso transcurre, el adsorbente se satura con el soluto y un frente de soluto no adsorbido migra a lo largo de la columna hasta que finalmente eluye y es registrado por el detector. Se llama volumen de fuga al volumen en el cual el soluto empieza a aparecer en el efluente de la precolumna. Generalmente, este volumen se define como aquel que corresponde al 1% de la altura total de la señal producida por el frente.

El problema con el método del análisis frontal es que, para obtener una señal observable en el detector, es necesario que la concentración del soluto de interés en la muestra sea suficientemente grande para ser detectada. En efecto, cuando el frente eluye de la precolumna, la concentración de soluto en el efluente es igual a su concentración en el influente. Dada la sensibilidad de los detectores comúnmente utilizados en HPLC, lo anterior implica trabajar con concentraciones de analito en la muestra del orden de los mg/L (ppm).

Sin embargo, en este trabajo se pretende desarrollar un método que permita determinar bencidinas a concentraciones del orden de las partes por billón (ppb) en muestras acuosas. Se sabe, por trabajos anteriores realizados en el laboratorio de Cromatografía de Líquidos (J. L. Gallegos 1997, E. Ibarra 1998), que los volúmenes de fuga de los solutos disminuyen a medida que aumenta su concentración en el influente. Esto significa que el volumen de fuga obtenido mediante el análisis frontal subestima considerablemente el volumen de muestra que puede cargarse en la precolumna cuando la concentración de los solutos es del orden de los $\mu\text{g/L}$.

El segundo método para determinar el volumen de muestra a cargar en la precolumna es sin duda más adecuado pues se realiza bajo las mismas condiciones (orden de concentración, montaje experimental, etc.) en que se llevará a cabo posteriormente el análisis de las muestras. El método consta de los siguientes pasos:

1. Por inyección directa de un estándar en el sistema mostrado en la figura 2.1 (posición elución) se determina la respuesta (altura o área de pico) producida por una cierta cantidad del soluto en estudio. La fase móvil se deberá adecuar para que la retención del soluto no sea muy grande ni muy pequeña (por ej, $k' \approx 2$).
2. Una muestra acuosa con la composición que se desee ensayar (contenido de disolvente orgánico, buffer, pH etc.) se dopa con el soluto de modo que la cantidad de éste en un volumen definido de la muestra (p.ej. 5 mL) sea idéntica a la cantidad inyectada en el paso anterior.
3. La precolumna se carga (fig.2.1, posición de carga) con el volumen definido de muestra (por ej. 5 mL). Posteriormente se conmuta la válvula (posición elución) haciendo pasar la fase móvil a través de la precolumna lo que provoca la desorción del soluto y su elución del sistema "precolumna + columna". Con la señal obtenida se calcula el porcentaje de recobro del soluto, el cual deberá ser del 100% ya que, por el volumen pequeño de muestra cargado en la precolumna, no se espera fuga del soluto en este ensayo.
4. Se repiten varias veces los pasos 2 y 3 aumentando progresivamente el volumen de muestra que se carga en la precolumna pero cuidando que en cada caso dicho volumen contenga siempre la misma cantidad de soluto. En esta serie de ensayos se observará que, a partir de un cierto volumen de muestra cargado, la recuperación del soluto es significativamente menor del 100% lo que indica que se ha rebasado el volumen de fuga del soluto en la precolumna.
5. Se tomará como volumen de muestra a cargar el del ensayo inmediatamente anterior a aquél en que se observó pérdida del soluto.

En este trabajo se optó por utilizar este segundo procedimiento para la determinación del volumen de muestra a concentrar en la precolumna y con ello establecer las condiciones precisas para el método analítico finalmente propuesto. Sin embargo, en algunos ensayos preliminares se utilizó el procedimiento del análisis frontal por su mayor rapidez.

2.4 Preconcentración y Análisis en línea de Bencidinas

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

La figura 2.1 muestra el montaje utilizado para llevar a cabo la preconcentración, limpieza y análisis en línea de las muestras de agua.

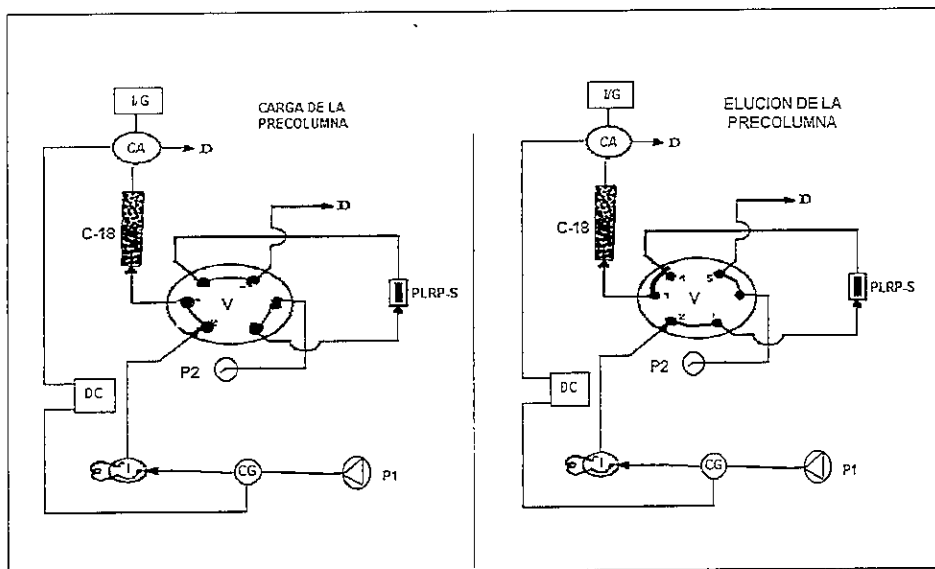


Figura 2.1. Montaje experimental. Representación esquemática de las posiciones de la válvula de conmutación durante las diversas etapas del método.

P1, bomba CLAR para gradiente binario (bomba de análisis), **P2** bomba isocrática (bomba de muestra); **V** válvula de conmutación. **I**: inyector, **DC**: detector coulumbimétrico, **CA** celda analítica, **CG** celda de guardia, **I/G** integrador, **D** desecho, **C-18**: columna analítica de fase reversa, **PLRP-S**: precolumna con adsorbente polimérico.

En el esquema la válvula de conmutación (V) se encuentra conectada al inyector del sistema cromatográfico Gilson, (I), a través del puerto 2. La bomba P2 está unida a esta válvula por la puerta 6 y la precolumna con adsorbente polimérico (PLRP-S) está montada entre las puertas 1 y 4. La columna analítica, denominada C-18, está conectada a la válvula por la puerta 3. La puerta 5 queda como una salida de desecho.

2.4.2 Descripción del procedimiento de preconcentración y análisis

Todas las etapas del proceso se realizaron en el sistema de conmutación diseñado, utilizando la bomba isocrática (P2) y la bomba del sistema de gradiente binario Gilson (P1). Las posiciones de la válvula y la operación de las bombas en cada paso del método están descritas en la tabla 2.1.

Tabla 2.1. Posición y manejo de la válvula de conmutación y bombas durante la preconcentración y análisis de bencidinas. **C**, posición de carga; **E**, posición de elución; **P1**, bomba de análisis, **P2**, bomba de muestra.

ETAPA	OPERACIÓN	VALVULA	BOMBA UTILIZADA
1	Acondicionar PRLP-S	C	P2
2	Cargar PRLP-S Equilibrar C-18	C	P2 Y P1
3	Enjuagar PRLP-S	C	P2
4	Eluir PRLP-S + C- 18	E	P1
5	Equilibrar PLRP-S + C-18	E	P1
6	Inyectar estándar	E	P1
	Siguiente muestra ir a 1		

El procedimiento de preconcentración y análisis incluyendo las disoluciones utilizadas y los flujos volúmenes proporcionados por la(s) bomba(s) activa(s) en cada paso del método, así como las etapas intermedias para la purga de las líneas durante el cambio de disoluciones, están especificados en la tabla de tiempo (tabla 2.2). En esta tabla se puede observar que durante la etapa 2 se realizan simultáneamente dos operaciones utilizando la bomba de análisis (P₁) y la bomba de muestra (P₂). En las demás etapas y en los pasos intermedios de purga de líneas sólo una de las bombas está activa.

Tabla 2.2. Tabla de tiempo para las operaciones en línea.

S₁: agua- metanol- acetato de amonio 1M, 89·10:1 (v/v), Fase inicial Fase móvil A 95% y Fase Móvil B 5% (v/v), Gradiente: Programa de composición de la fase móvil, C: Posición de carga, E: Posición de elución, P₁: Bomba de análisis, P₂: bomba de muestra.

Tiempo (min)	Etapas	Disolución	Flujo/bomba (mL/min)	Válvula
0-2	Intermedia	S ₁	3/P ₂	E
2-7	1	S ₁	2/ P ₂	C
7-9	intermedia	Muestra	3/ P ₂	E
9-34	2	Muestra	2/ P ₂	C
		Fase inicial	0.6/ P ₁	
34-36	intermedia	Agua	3/ P ₂	E
36-38	3	Agua	0.1/ P ₂	C
38-78	4	Gradiente	1/ P ₁	E
78-93	5	Fase inicial	1/ P ₁	E
93-133	6	Gradiente	1/ P ₁	E

La figura 2.2 esquematiza todo el proceso desarrollado, desde la preparación inicial de la muestra hasta el análisis cromatográfico de los solutos.

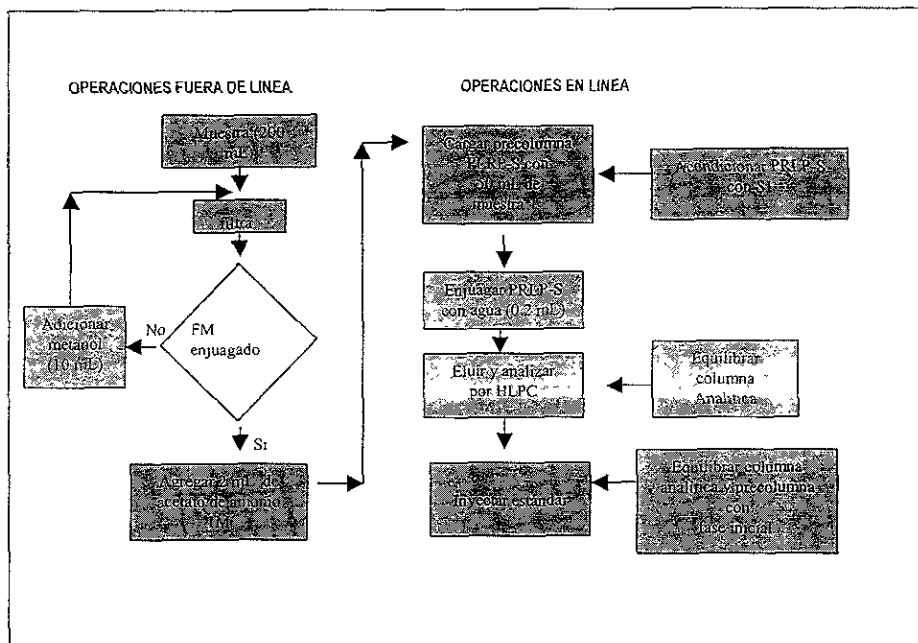


Figura 2.2 Diagrama de flujo de los diferentes pasos del método, para la determinación de bencidinas en agua, **S1:** agua- metanol - acetato de amonio 1M, 89/10/1 (v/v), **FM:** frasco de vidrio ámbar de 200 mL para muestrear, **PRLP-S:** precolumna con fase reversa polimérica, Fase inicial: Fase móvil A 95% - Fase móvil B 5%.

2.4.3 Descripción de las condiciones cromatográficas

1. Columna analítica

Columna de acero inoxidable (150 x 4.6 mm d. i.) empacada con una fase reversa comercial C-18 de 5 μm de diámetro de partícula Hypersil ODS.

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

2. Fase móvil

Fase A

Acetonitrilo- agua – buffer citratos 1M (pH= 6) 10:89:1 (v/v)

Fase B

Acetonitrilo – agua – buffer citratos 1M (pH= 6) 70:29:1 (v/v)

3. Temperatura

Todas las determinaciones se realizaron a temperatura ambiente

4. Flujo del eluyente

Se utilizó un flujo de 1 mL/min

5. Parámetros del gradiente

Tabla 2.3. Tabla de parámetros del gradiente

Tiempo (min)	Fase A %	Fase B %
0	95	5
12	95	5
13	70	30
25	10	90
30	0	100
40	0	100

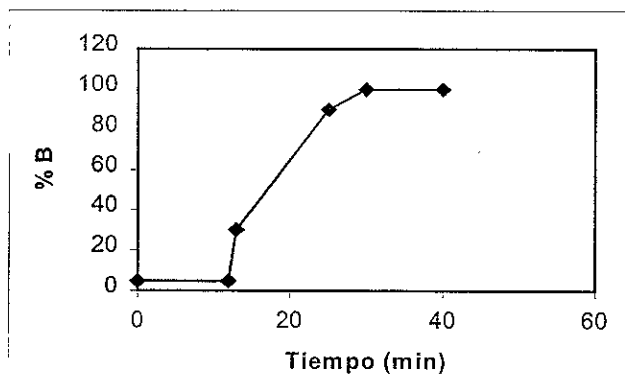


Figura 2.3 Gráfica del gradiente de elución empleado para la separación de las bencidinas.

6. Detección

Detección coulombimétrica

Celda de Guardia, potencial del electrodo de trabajo 900 mv

Celda Analítica, potencial de electrodo de trabajo 700 mv

Sensibilidad 50 μ A

El potencial impuesto al electrodo de trabajo es con respecto a la referencia interna de las mismas celdas. Según los datos especificados por el fabricante, esta referencia tiene un potencial de -300 mV con respecto al electrodo de Ag/AgCl, en una disolución a pH 3. Dicha referencia es sensible al pH y su potencial se incrementa en 60 mV por cada unidad de pH.

2.4.4 Regeneración y limpieza del sistema

El método propuesto lleva incluido un proceso de regeneración y limpieza de la columna analítica y la precolumna dentro del gradiente. En efecto, durante los últimos 10 minutos del programa de gradiente, se hace pasar la fase móvil fuerte (fase B) a través del sistema, lo que permite eluir compuestos presentes en la muestra que hayan quedado fuertemente retenidos en el empaque de la precolumna o en el de la columna analítica. Así cada vez que se analiza una muestra (o un estándar) se asegura que el adsorbente PLRP-S y la fase estacionaria C-18 queden libres de impurezas.

La eficacia de este procedimiento de limpieza queda demostrada por el hecho de que, durante todos los experimentos realizados en este trabajo, se utilizaron las mismas precolumas y columna analítica sin que se observara ninguna degradación de éstas.

Por otra parte, después de analizar varias muestras reales (agua de pozo y de río). se observó un aumento de presión en el sistema. El problema se solucionó completamente al cambiar los filtros de acero inoxidable de la precolumna. Aparentemente, algunas sustancias coloidales presentes en estas muestras logran atravesar las membranas de filtración y se acumulan en los filtros de la precolumna ocasionando un bloqueo parcial de los poros, y en consecuencia un aumento de presión. Por tanto, una recomendación adicional al método propuesto es la de

cambiar los filtros de la precolumna después de, aproximadamente, cada 10 análisis.

Los filtros de acero inoxidable de las precolumnas pueden limpiarse, fácilmente. El procedimiento para ello consiste en sumergirlas en una disolución de ácido nítrico al 20% (v/v) la cual se mete en un baño de ultrasonido durante 20 minutos; posteriormente se enjuagan varias veces con agua grado reactivo hasta eliminar totalmente el ácido.

2.4.5 Tiempo de análisis

El tiempo requerido para la determinación de trazas de bencidina y 3,3'-diclorobencidina en una muestra de agua, según el procedimiento desarrollado y esquematizado en la figura 2.2, es de aproximadamente 3 horas incluyendo el análisis cromatográfico de la muestra y del estándar. Cabe hacer notar que el tiempo mencionado presupone una muestra fácilmente filtrable y no incluye el tiempo necesario para la preparación de los estándares. En el caso de análisis repetitivos es posible hacer la preparación de la muestra (operaciones fuera de línea) mientras se realiza el análisis cromatográfico de la muestra y estándar anteriores, lo que permite reducir el tiempo de análisis a 2.22 horas que es el tiempo exactamente requerido para el programa de operaciones en línea tal como se muestra en la Tabla 2.2.

Es importante mencionar que las operaciones en línea pueden ser totalmente automatizadas para análisis de rutina. En este caso se requerirá utilizar inyectores y válvulas de conmutación automáticos y añadir una válvula selectora de baja presión con tres canales, también automática, a la entrada de la bomba P₂. La tabla 2.2 puede ser utilizada para la programación de las diferentes etapas.

3.1 Establecimiento de las condiciones de operación

En esta parte de nuestro trabajo se presentan los resultados de los diferentes ensayos realizados en la búsqueda de las condiciones óptimas de operación para realizar la determinación de las bencidinas a muy bajos niveles de concentración en el agua. El estudio incluye desde la selección de los empaques en las columnas, tanto precolumna como columna analítica, hasta la puesta a punto de cada una de las etapas en el método final.

3.1.1 Ensayos preliminares. Definición del sistema de EFS a utilizar y selección del material de empaque de la precolumna

En este trabajo, se pensó inicialmente en utilizar un sistema en donde se acoplara una precolumna con una fase inversa y otra precolumna con un intercambiador de iones, considerando la posibilidad de ionización de los grupos amino de las bencidinas. Sin embargo, dado que no se encontró reportado ningún pKa para la diclorobencidina era indispensable realizar primero algunos estudios de adsorción-desorción de estos solutos en fases reversas.

Los primeros ensayos fueron realizados con una precolumna (20 x 2 mm d.i.) empacada con fase C18, utilizando el método del análisis frontal y un detector UV a 254 nm para determinar la fuga de los solutos. Los resultados obtenidos mostraron que la bencidina no es suficientemente retenida en este material. Cabe mencionar que se tuvo la precaución de fijar el pH de la fase acuosa a 7 (con acetato de amonio) de modo que la bencidina se encontrara en su forma molecular, sin embargo el frente de bencidina fue detectado casi inmediatamente después de iniciar el ensayo.

En el siguiente paso se analizó el comportamiento de la bencidina en una precolumna de las mismas dimensiones empacada con fase polimérica CHP-3C. En este caso el frente de bencidina apareció en el efluente después del paso de, aproximadamente, 20 mL de muestra acuosa por la precolumna. La bencidina adsorbida se eluyó con una mezcla acetonitrilo-agua acidificada 10:90 v/v. La señal de desorción obtenida, en forma de un gran pico coleado corroboró que la bencidina se concentró en la precolumna y también permitió inferir que el eluyente utilizado es suficientemente fuerte para desplazar al soluto adsorbido.

Posteriormente se repitió el ensayo anterior, pero la fase acuosa se fortificó con 3,3'-diclorobencidina. Después del paso de aproximadamente 50 mL de muestra por la precolumna no se detectó ningún frente. Al intentar eluir el soluto adsorbido con la mezcla acetonitrilo- agua acidificada 10:90 v/v no se observó una señal definida de desorción. Por tanto se concluye que, en las condiciones utilizadas (agua a pH 7), el volumen de retención de la 3,3'-diclorobencidina en la precolumna empacada con el polímero CHP-3C es superior a los 50 mL. Por otra parte, es evidente que el eluyente utilizado es demasiado débil para desplazar al soluto adsorbido.

En trabajos anteriores realizados en el laboratorio se observó que las columnas empacadas con fase CHP-3C no pueden trabajarse con fases móviles que contengan más de 10% de acetonitrilo porque se generan muy altas presiones. Probablemente, este polímero de bajo grado de entrecruzamiento se hincha en presencia de acetonitrilo.

Considerando las restricciones impuestas por la fase CHP-3C, se intentó desorber la 3,3'-diclorobencidina con mezclas metanol- agua acidificada. Aunque se utilizaron concentraciones de ácido hasta del orden de 1 M; la única manera de desorber al soluto fue con altos contenidos de metanol en la mezcla. Estos resultados indican que la diclorobencidina es una base demasiado débil y no se protona, o bien que su hidrofobicidad es tan fuerte que aun estando ionizada no se desorbe fácilmente de la fase polimérica. Por lo tanto, se descartó la posibilidad de utilizar un sistema de dos precolumnas para la extracción, concentración y limpieza de la muestra.

Una vez definido que el sistema constaría sólo de una precolumna, se procedió a estudiar el comportamiento cromatográfico de los solutos en el conjunto constituido por la precolumna empacada con polímero CHP-3C y la columna analítica (150 x 4.5 mm d.i.) empacada con una fase químicamente unida C-18 de 5 μ m. Se inyectó en el sistema de columnas acopladas un estándar de 3,3'-diclorobencidina utilizando metanol- agua (pH 7 fijado con acetato de amonio) como fase móvil. Se ajustó la proporción de los disolventes en la fase móvil de modo que el volumen de retención del analito fuera de por lo menos 10 mL. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios porque el pico del soluto fue excesivamente ancho y deforme. Aparentemente, con la fase móvil ensayada, la cinética de adsorción-desorción de este soluto en la fase polimérica es muy lenta con respecto a la fase C-18 y la transferencia de analito entre estas dos fases provoca una gran deformación de la banda.

Por trabajos previos (J. Reza-González, 1995) se sabe que, en fases poliméricas, el acetonitrilo es un disolvente mucho más fuerte que el metanol. Además se han tenido evidencias de una mejora considerable en la forma de los picos cuando se utiliza el primer disolvente. Por ello, se consideró indispensable cambiar la fase polimérica CHP-3C por otra de mayor grado de entrecruzamiento que permitiera el uso de fases móviles con alto contenido de acetonitrilo sin hincharse. Se eligió la fase PLRP-S.

La inyección de la diclorobencidina en el sistema constituido por la precolumna empacada con fase polimérica PLRP-S y la columna analítica C-18 con fase móvil acetonitrilo- agua (pH = 7) dio resultados aceptables en cuanto a la anchura y simetría del pico.

3.1.2 Optimización de la separación cromatográfica

De acuerdo con el comportamiento de los solutos observado anteriormente, no fue posible incluir un paso de limpieza del extracto utilizando la tecnología de precolumnas acopladas, por lo que era necesario compensar la falta de selectividad en la preparación de la muestra con una mayor selectividad en el sistema de detección. Se eligió así sustituir el detector UV por un detector electroquímico lo que a su vez establece requerimientos especiales en las condiciones para la separación cromatográfica.

Es bien sabido que con un detector electroquímico es muy difícil de trabajar con gradientes de elución, pues la conductividad de la fase móvil débil rica en agua es muy superior a la de la fase móvil fuerte rica en disolvente orgánico. Esto quiere decir que, durante un gradiente de elución con este detector, se observan cambios importantes en la línea base que pueden dificultar o imposibilitar la detección de los solutos. Por ello se recomienda, de ser posible, trabajar en condiciones isocráticas.

Por otra parte, cuando se desarrolla un método para análisis de trazas en matrices complejas, es necesario un paso previo de extracción y concentración de la muestra pues aun con los detectores más sensibles, como el electroquímico, no es generalmente posible la detección de los analitos, por inyección directa de la muestra. Sin embargo en este paso, también se concentran otros compuestos mayoritarios presentes en la matriz que pueden interferir posteriormente en la determinación de los solutos de interés. En el caso de muestras de aguas naturales (ríos, lagunas, pozos) una gran parte de esos compuestos interferentes está constituida por ácidos fúlvicos y húmicos. En las separaciones cromatográficas en fase reversa de extractos de estas muestras

ambientales, los interferentes mayoritarios generalmente aparecen al inicio del cromatograma en forma de un gran pico, denominado pico de matriz, que desciende muy lentamente a la línea base. Por ello es necesario ajustar las condiciones de la separación cromatográfica de modo que el primer soluto de interés eluya a un volumen de retención suficientemente separado del pico de matriz para que no sea opacado por éste.

El último punto a considerar para optimizar la separación cromatográfica son las propiedades ácido base de los analitos. La bencidina es una dibase que requiere para encontrarse en su forma molecular una fase móvil con pH superior a, aproximadamente, 6. Aunque es posible trabajar solutos en su forma parcial o totalmente ionizada, su retención en una fase reversa disminuye a medida que aumenta el grado de ionización. Adicionalmente, los solutos en forma ionizada dan lugar a picos más anchos y asimétricos. En todo caso, para los solutos con propiedades ácido-base es necesario la adición de un amortiguador a la fase móvil para evitar el desdoblamiento de los picos.

Con base en la discusión anterior se iniciaron las pruebas intentando trabajar en condiciones isocráticas. Primero se ensayó una fase móvil acetonitrilo-agua con el pH fijado a 7 con acetato de amonio, pero no se logró estabilizar el detector electroquímico con esta fase. Se optó por cambiar a un amortiguador de acetatos (pH = 4.7) y se ensayaron diversas proporciones de acetonitrilo. Sin embargo, dada la gran diferencia de hidrofobicidad entre la bencidina y la diclorobencidina no fue posible encontrar una fase móvil que permitiera retener suficientemente a la bencidina y eluir en las mismas condiciones a la diclorobencidina.

Para lograr poner a punto una separación con gradiente de elución utilizando el detector electroquímico se realizaron una gran cantidad de pruebas cambiando la composición de las fases móviles (particularmente la concentración y tipo de amortiguador) y la forma del gradiente. Se ensayaron amortiguadores como: acetatos (pH=4.7), hidroxilamina (pH=6) y citratos (pH=6). Sólo con el último de éstos, a concentración de 0.01M en las fases móviles débil y fuerte, se logró obtener una línea base aceptablemente controlada durante el gradiente. El contenido de acetonitrilo en las fases móviles débil (fase A) y fuerte (fase B) finalmente utilizadas fue de 10% y 70% (v/v) respectivamente.

Para establecer la forma del gradiente se fijaron los objetivos siguientes:

- 1) Eluir la bencidina a volúmenes superiores a los 10 mL
- 2) Eluir la diclorobencidina en volúmenes lo más cercano posible a la bencidina.
- 3) Evitar los cambios bruscos en la composición de la fase móvil en la cercanía de los tiempos de elución de los picos.
- 4) Obtener picos relativamente delgados y simétricos.

El último de estos objetivos depende no sólo de la forma del gradiente sino también de la calidad de la fase estacionaria químicamente unida, utilizada en la columna analítica. Esto es debido a que las aminas (bases) tienden a interaccionar con los silanoles residuales (ácidos) de las fases reversas C-8 o C-18. La combinación del mecanismo de fase reversa con el mecanismo de adsorción produce picos coleados y en el caso de las aminas este efecto es particularmente notable. Cuando las fases estacionarias han recibido durante su preparación un tratamiento terminal adecuado (p.ej. silanización con clorotrimetil silano), los silanoles residuales quedan poco accesibles a los solutos y los picos obtenidos son simétricos.

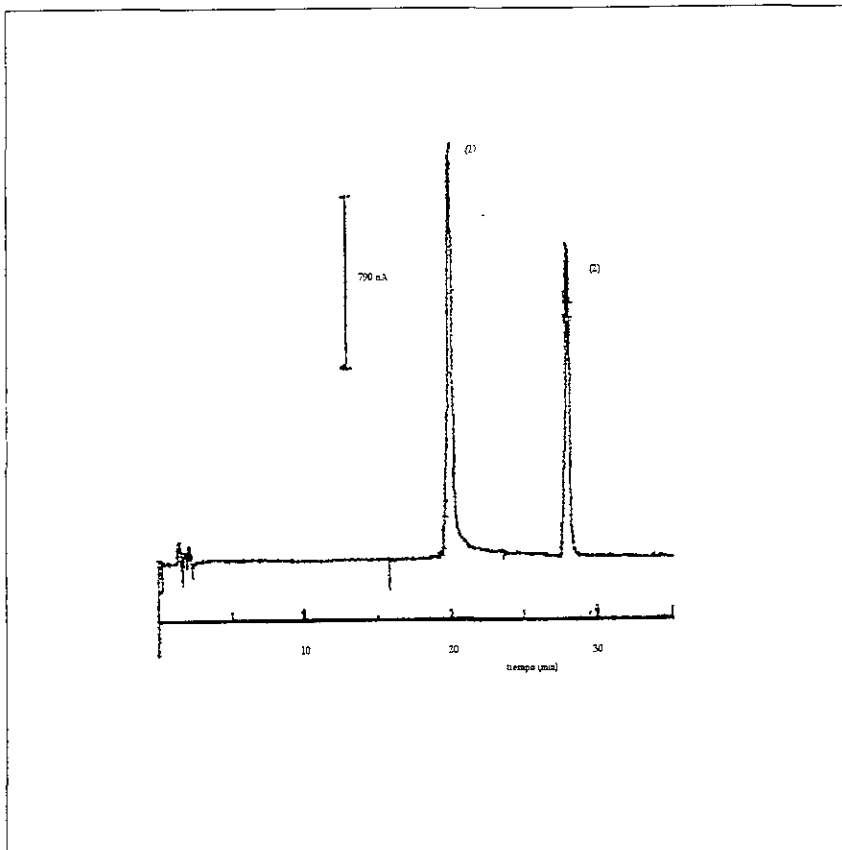


Figura 3.1 Separación de los solutos de interés, 1) Bencidina 2) 3,3'-diclorobencidina. Gradiente de elución: 0-12 min 5%B, 13 min 30%B, 30 min 100% B, 40 min 100%B. Velocidad de flujo: 1 ml/ min. Concentración de los solutos: 10 ppb. Columna (.150 X 4.6 mm D.I.) empacada con Hypersil ODS-2 de 5 μ m. Detector electroquímico, multielectrodo Coulochem II.

El gradiente finalmente establecido fue el siguiente:

TABLA 3.1 Gradiente de elución utilizado.

Tiempo (min)	0	12	13	25	30	40
% B	5	5	30	90	100	100

El cromatograma obtenido a un flujo de 1 mL/min, se muestra en la figura 3.1. Se inyectó una mezcla estándar de bencidinas en el sistema constituido por precolumna PLRP-S y columna C-18.

Al inicio del gradiente se mantuvo por 12 minutos una fase móvil muy débil para permitir la elución de posibles interferentes de las muestras antes de la elución de los analitos. El cambio brusco de composición de fase móvil al minuto 12, está diseñado para interferir lo menos posible con los picos de los analitos y lograr la elución de la diclorobencidina en tiempos razonables. En la figura 3.1, que fue obtenida en condiciones de baja sensibilidad (señal atenuada), no se aprecia la deriva de la línea base debida al gradiente. Sin embargo cuando se requiere trabajar a mayor sensibilidad (ver figura 3.7) el cambio brusco del minuto 12 aparece claramente en el cromatograma, recorrido un poco en la escala del tiempo debido a los volúmenes muertos del sistema. La bencidina eluye después del cambio brusco, por lo que la integración del pico no es demasiado afectada por éste.

Finalmente se puede apreciar que los picos de ambos solutos son relativamente simétricos y delgados lo que indica un buen diseño del gradiente y una buena calidad de la fase estacionaria (Hypersil ODS). Cabe mencionar que el montaje utilizado no es ideal con respecto a la eficiencia debido al acoplamiento de precolumna y columna (dos fases estacionarias diferentes) y a toda la tubería requerida para las conexiones, que incrementa los volúmenes muertos en el sistema.

3.1.3 Optimización de las Condiciones de Detección

Las bencidinas son compuestos fácilmente oxidables por lo que se impuso al electrodo de trabajo un potencial de oxidación. Además, dada la configuración de la celda analítica, se trató de aumentar la selectividad de detección si se imponía al primer electrodo un potencial en el cual los

solutos de interés no se oxidaran y al segundo electrodo un potencial mayor para que fuera el sensor de los analitos. Así, en el electrodo culombimétrico se podrían eliminar impurezas o solutos interferentes electroactivos presentes en la muestra a analizar. Se hicieron algunos ensayos en este sentido pero no se obtuvieron resultados satisfactorios porque las bencidinas empiezan a oxidarse desde potenciales relativamente bajos y, por otra parte, la menor área superficial del segundo electrodo lo hace menos sensible para la detección. Es decir, la pequeña ganancia en selectividad no compensaba la pérdida en sensibilidad.

Finalmente se decidió utilizar el electrodo culombimétrico como sensor de los analitos. Se hicieron inyecciones repetidas de cada uno de los solutos, por separado, imponiendo a los dos electrodos el mismo potencial y midiendo la altura de la señal obtenida. En estos ensayos se ajustó la composición de la fase móvil para cada soluto de modo que eluyera en un tiempo corto y en condiciones isocráticas. El objetivo de utilizar los dos electrodos fue el de observar en el primero de ellos el cambio de la señal en función del potencial impuesto y en el segundo evaluar la eficiencia de la electrólisis del analito al atravesar el primer electrodo. Las curvas de respuesta en función del potencial se presentan en las figuras 3.2 y 3.3.

En estas curvas se aprecia que, en el primer electrodo, se alcanza una respuesta constante para la bencidina a partir de los 600 mV de potencial impuesto y para la diclorobencidina a partir de aproximadamente 700 mV. Por otra parte las señales detectadas en el segundo electrodo son un poco mayores para la diclorobencidina, pero aun así, se pueden considerar despreciables frente a las del primer electrodo. Se concluye así que un potencial de 700 mV es adecuado para obtener máxima sensibilidad en la detección y que, a este potencial y al flujo de 1 mL/min con que se trabajó, una buena proporción del soluto alcanza a ser oxidada en el primer electrodo.

Cabe señalar que para estos analitos no es conveniente utilizar potenciales más elevados porque se pierde en selectividad (mayor probabilidad de oxidación de otros compuestos presentes en la muestra), aumenta el ruido en la línea base y también se incrementan las desviaciones de la línea base cuando se trabaja con un gradiente de elución.

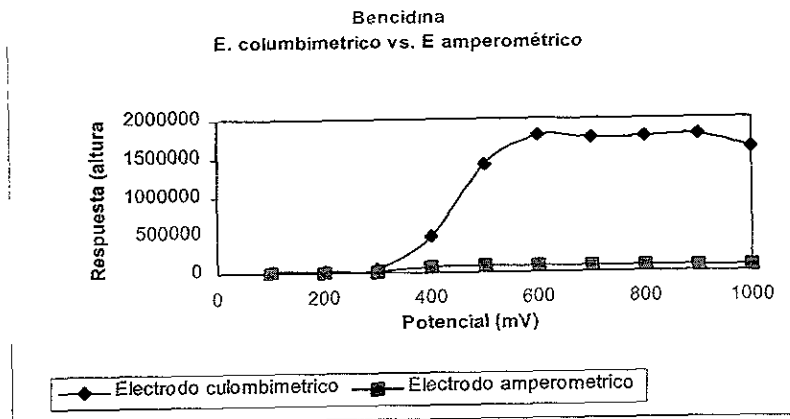


Figura 3.2 Estudio de la oxidación de la bencidina en función del potencial impuesto a los electrodos de trabajo. Cantidad inyectada: 216 ng, flujo: 1 mL/min, tiempo de retención: 7.2 min.

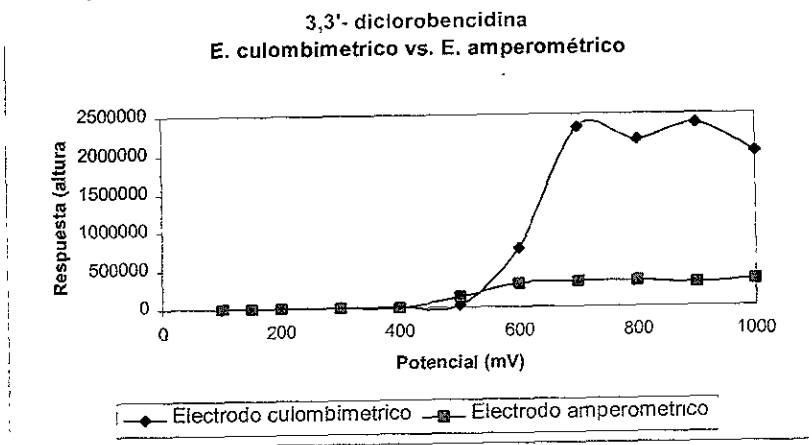


Figura 3.3 Estudio de la oxidación de la 3,3'-diclorobencidina en función del potencial impuesto a los electrodos de trabajo. Cantidad inyectada: 216 ng, flujo 1 mL/min, tiempo de retención: 6.7 min.

3.1.4 Optimización de la preconcentración y la preparación previa de la muestra

El volumen de muestra acuosa que puede cargarse en una precolumna de concentración está determinado por las dimensiones de la propia precolumna (cantidad de adsorbente) y por el volumen de retención del soluto de interés menos retenido en el adsorbente utilizado para la extracción en fase sólida.

En los sistemas en línea, donde la precolumna con los solutos extraídos y concentrados se acopla con la columna analítica durante la etapa de elución y análisis, es imprescindible que las dimensiones de la precolumna sean muy pequeñas para evitar un ensanchamiento excesivo de las bandas de los solutos. En este trabajo se utilizó una precolumna de 20 x 2 mm D.I. empacada con el adsorbente polimérico PLRP-S para la EFS y concentración de los solutos de interés.

De los dos solutos analizados en este trabajo, bencidina y 3,3'-diclorobencidina, el primero es el menos hidrofóbico y por ende el menos retenido en un sistema de fase reversa, como lo es el sistema constituido por el adsorbente PRLP-S y la muestra acuosa. Por tanto, es la bencidina quien limita el volumen de muestra que puede cargarse en la precolumna.

Sin embargo, la 3,3'-diclorobencidina, por su alta hidrofobicidad es un soluto que tiende a quedarse adsorbido en las paredes de los recipientes que contienen la muestra acuosa. Asimismo, puede quedar adsorbida en las membranas utilizadas para filtrar la muestra, en los sólidos suspendidos en ésta o incluso en los filtros de acero inoxidable de las bombas y en las tuberías de conexión de las diferentes partes del sistema de preconcentración. Para evitar la pérdida de los analitos hidrofóbicos por adsorción, es necesario enjuagar el frasco de muestreo y las membranas de filtración de la muestra con un disolvente orgánico en el que dichos analitos sean muy solubles. El disolvente de enjuague, que contiene al soluto hidrofóbico recuperado, debe añadirse a la muestra acuosa filtrada a analizar (sección 2.2.3: preparación de la muestra). Este procedimiento permite además minimizar los riesgos de adsorción de los solutos en los filtros y tuberías del sistema de preconcentración ya que los efectos hidrofóbicos, responsables de la adsorción, disminuyen notablemente cuando la muestra acuosa contiene una pequeña proporción de disolvente orgánico.

Desafortunadamente, el disolvente orgánico presente en la muestra también provoca una disminución de la retención de los solutos en los

adsorbentes de fase reversa. Por lo tanto, el volumen de muestra que puede cargarse en la precolumna disminuye a medida que la proporción de disolvente orgánico en dicha muestra aumenta.

Lo anterior significa que, cuando los solutos de interés en la muestra son de muy diferente hidrofobicidad (como en el caso presente), existe un compromiso entre la sensibilidad y la exactitud al utilizar la EFS para la concentración de los analitos. La primera depende en gran medida del volumen de muestra que se pueda cargar en el adsorbente, pero este volumen estará forzosamente limitado si se quiere tener una buena recuperación de todos los solutos, por la necesaria adición de disolvente orgánico a la muestra antes de la EFS.

En los ensayos realizados para optimizar la preparación y concentración de muestra se utilizó el procedimiento de incrementar progresivamente el volumen de carga en la precolumna para determinar la fuga de los solutos y su tasa de recobro. Inicialmente se prepararon las disoluciones acuosas dopadas con el analito, con 3% de metanol y 10^{-2} M de acetato de amonio, en el recipiente utilizado como reservorio de la bomba de muestra. Se observó que en estas condiciones se tenía una buena recuperación de los solutos al cargar 5, 10, 20, 50 y hasta 75 mL de muestra en la precolumna.

Posteriormente en el frasco de muestreo se colocaron 100 mL de agua grado reactivo, se añadió una cantidad conocida de una mezcla estándar de los analitos, se completó con 100 mL más de agua, se cerró el frasco y se agitó para homogeneizar la muestra. Esta se filtró a través de una membrana de nylon con poro de 0.2 μm recibiendo el filtrado en el recipiente utilizado como reservorio de la bomba. El frasco de muestreo se enjuagó primero con 4 mL de metanol y luego con 2 mL más, pasando el disolvente orgánico a través de la membrana utilizada para filtrar la muestra y colectándolo en el mismo recipiente que ésta. Finalmente se añadieron 2 mL de una disolución de acetato de amonio 1M al recipiente, se agitó suavemente para homogeneizar la mezcla y se cargaron 50 mL en la precolumna. Los resultados de recobro calculados para los analitos no fueron totalmente satisfactorios, por lo que se procedió a aumentar el volumen de disolvente orgánico utilizado para enjuagar el frasco y la membrana de filtración. Se ensayaron 10 mL y luego 16 mL de metanol. Los resultados de recobro obtenido se muestran en la tabla 3.2. Para todos los cálculos se hicieron las correcciones pertinentes por la dilución de la muestra.

TABLA 3.2 Efecto del porcentaje de disolvente orgánico utilizado en la preparación de muestra.

% Metanol	volumen de carga	% Recuperación Bencidina	% Recuperación Diclorobencd.
2.9%	50 mL	84.90	84.01
4.7%	50 mL	91.68	89.63
7.3%	50 mL	54.38	69.26

De acuerdo con los resultados de la tabla se puede inferir lo siguiente:

- Con 6 mL de metanol (2.9% en la muestra total) no se logran enjuagar suficientemente bien el frasco de muestreo (frasco de vidrio color ámbar con capacidad de 250 mL) y la membrana de filtración. Una pequeña parte de los solutos permanece probablemente adsorbida en estos materiales.
- Con 10 mL de metanol (4.7% en la muestra total) se obtiene un mayor porcentaje de recobro de los solutos, respecto al caso anterior. Esto indica por unâ parte un mejor enjuague de los materiales (frasco y membrana) y también permite deducir que los solutos no se fugan de la precolumna apreciablemente al cargar 50 mL de una muestra que contiene aproximadamente 5% de metanol.
- El ensayo con 16 mL de metanol (7.3% en la muestra total) mostró una disminución en la recuperación con respecto al caso precedente. La única explicación posible es que, con este contenido de metanol, el volumen de fuga de los dos analitos en la precolumna es inferior a 50 mL.

Finalmente se concluye que la mejor condición es la que corresponde al caso intermedio, o sea utilizar 10 mL de metanol para el enjuague de los materiales y cargar 50 mL de la muestra preparada en la precolumna.

3.2 Estudio Estadístico

Una vez desarrollado un método de análisis por cromatografía de líquidos , al igual que toda técnica analítica, deberá certificarse, es decir, se debe confirmar y documentar que los resultados obtenidos por el método son confiables.

En un ensayo de certificación deben considerarse los siguientes parámetros estadísticos: exactitud, precisión, linealidad y límite de detección .

3.2.1 Estudio de la Recuperación de la Bencidina y de la 3,3´diclorobencidina

En este caso, el estudio de recuperación se hizo comparando el área de la señal obtenida al aplicar el método desarrollado a muestras de agua pura fortificadas con los solutos, con el área obtenida por la inyección directa de una cantidad igual de los solutos respectivos.

Para hacer la determinación de estas recuperaciones se tomó en cuenta el volumen corregido obtenido en la calibración del rizo del inyector del cromatógrafo y el factor de dilución de la muestra durante su preparación.

A continuación se presentan las recuperaciones obtenidas para las bencidinas estudiadas, así como la precisión obtenida en el análisis de varias muestras de agua grado cromatografico, fortificadas a una concentración de 1.5 µg/L de cada soluto.

TABLA 3.3 Recuperación obtenida para las Bencidinas estudiadas.

SOLUTO	n	R (%)	s	C. V.
Bencidina	10	93.36	4.48	4.79
3,3'- Dicloro- bencidina	10	94.71	4.96	5.24

A partir de la tabla 3.3, podemos darnos cuenta que la recuperación promedio de las bencidinas es mayor del 90%. Se intentó establecer si estadísticamente esa recuperación es del 100%, efectuando una prueba de hipótesis (Miller y Freund, 1965) relativa a la media de las recuperaciones obtenidas para cada soluto.

En la siguiente tabla se presentan los valores de t calculada, para bencidina y 3,3'-diclorobencidina, también los valores de $t_{\alpha/2}(n-1)$, para niveles de significancia $\alpha = 0.02$ y $\alpha = 0.05$.

TABLA 3.4 Valores de t calculada y $t_{\alpha/2}(n-1)$, para niveles de significancia $\alpha = 0.02$ y $\alpha = 0.05$, para Bencidina y 3,3'-Diclorobencidina.

SOLUTO	n	t calculada	$t_{(0.025, 9)}$	$t_{(0.01, 9)}$
Bencidina	10	-4.7	2.262	2.821
3,3'- Diclorobencidina	10	-3.6	2.262	2.821

Como podemos ver a los niveles de significancia dados, no se aceptan las hipótesis nulas que establecen que las bencidinas estudiadas se recuperan al 100%. Estadísticamente se comprueba que para los niveles de concentración de 1.5 ppb de bencidinas que fueron probados, no existe una recuperación del 100%, debido a un error sistemático por defecto.

La ligera pérdida observada podría atribuirse a adsorción de solutos en alguna parte del sistema o al inicio de fuga de la precolumna durante la etapa de concentración.

Considerando un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$, así como los datos presentados en las tablas 3.3 y 3.4, los intervalos de confianza estimados se presentan en la tabla 3.5

TABLA 3.5 Intervalo de confianza para los datos de recuperación de Bencidina y 3,3'-diclorobencidina.

SOLUTO	Intervalo de confianza para la recuperación (%)
Bencidina	$90 \leq R \leq 97$
3,3'- Diclorobencidina	$91 \leq R \leq 98$

Cabe señalar que, a los niveles de concentración tan bajos que se utilizaron en estas pruebas, una recuperación del orden del 90% con una precisión de aproximadamente 5% son muy aceptables.

3.2.2 Linealidad

La linealidad de un método analítico se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. También se determina el rango lineal, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito para el cual el método ha sido probado y dentro del cual se pueden efectuar cálculos por interpolación en una curva estándar.

En este caso, se observó que la respuesta del detector electroquímico a una cantidad fija de los solutos inyectados en diferentes días varía considerablemente. Aunque en detectores más convencionales como el UV también se observan ligeras variaciones de la respuesta de día a día, en el detector electroquímico estos cambios son muy importantes. Por ello no es posible enfocar el estudio de linealidad como la proporcionalidad entre la respuesta (cuentas de área o altura) y la concentración de los analitos en las muestras que son analizadas en diferentes días. Se decidió entonces hacer la evaluación de la linealidad del método de acuerdo con la variación de la cantidad de soluto recuperado en función de la cantidad de soluto teóricamente analizado (es decir, suponiendo una recuperación total de los solutos).

Para ello se analizaron una serie de muestras de agua grado reactivo dopadas con cantidades conocidas de las bencidinas en el intervalo de concentraciones de 0.05 a 40 $\mu\text{g}/\text{l}$. Las muestras se analizaron en diferentes días y la respuesta obtenida para cada soluto en cada muestra se comparó contra la obtenida por inyección directa de un estándar adecuado de bencidinas. Se cuidó que, en cada caso, la cantidad de solutos inyectada fuera muy parecida a la cantidad teórica de solutos en la muestra analizada.

Se determinó la curva de regresión $Y = bX + a$ sobre los puntos individuales por el método de mínimos cuadrados.

En las siguientes tablas se presentan los resultados obtenidos y en las figuras se ilustra el comportamiento de la cantidad de analito recuperado en función de la cantidad de analito teóricamente concentrado. Las ecuaciones de las rectas de regresión y todos los datos estadísticos se calcularon sin considerar los 2 primeros datos de las tablas en donde evidentemente se está abajo del límite de cuantificación del método.

Tabla 3.6 Resultados de la recuperación de la bencidina en muestras dopadas a varios niveles de concentración. Volumen de muestra cargado: 50 ml.

Conc. en la muestra (µg/l)	Cantidad teórica cargada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.05	2.36	0
0.1	4.72	2.5
0.5	23.58	26
1.5	70.74	66
4.5	212.22	205
10	471.6	413
25	1179	1139
40	1886.4	1736

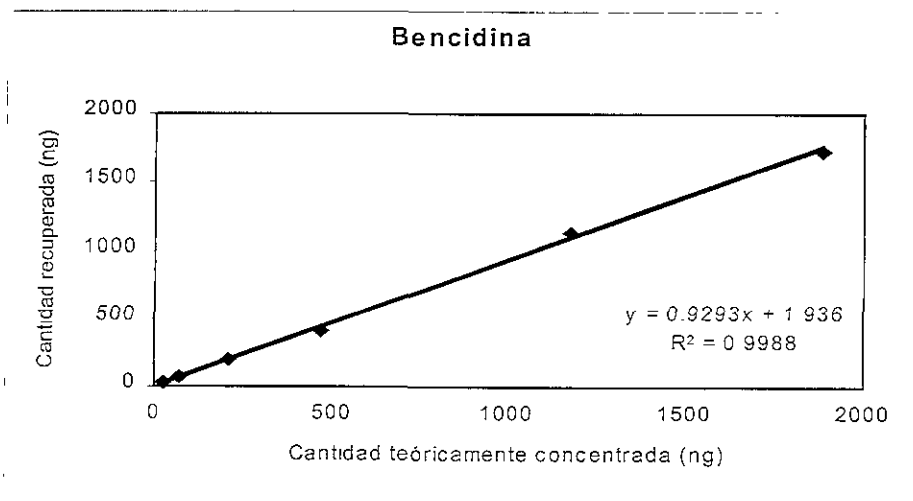


Figura 3.4 Variación de la cantidad de bencidina recuperada en función de la cantidad de bencidina teóricamente concentrada. Volumen de muestra cargado: 50 mL.

Tabla 3.7 Resultados de la recuperación de la 3,3'-diclorobencidina en muestras dopadas a varios niveles de concentración. Volumen de muestra cargado: 50 ml.

Conc. en la muestra (µg/l)	Cantidad teórica cargada (ng)	Cantidad recuperada (ng)
0.05	2.36	0.85
0.1	4.72	2.7
0.5	23.58	24
1.5	70.74	67.3
4.5	212.22	199
10	471.6	462
25	1179	1268
40	1886.4	1938

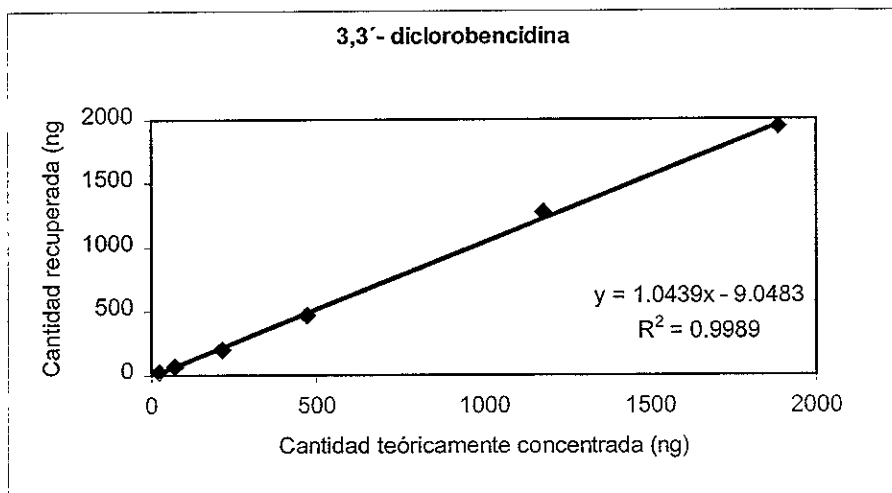


Figura 3.5 Variación de la cantidad de bencidina recuperada en función de la cantidad de 3,3'-diclorobencidina teóricamente concentrada. Volumen de muestra cargado: 50 mL.

Las rectas de regresión obtenidas se analizaron para establecer que estadísticamente cada una de ellas pasa por el origen del sistema de coordenadas, es decir que el coeficiente a debe ser igual a cero.

Para demostrar que efectivamente el coeficiente a tiende a cero se efectuó una prueba de hipótesis relativa a dicho coeficiente de regresión, empleando el estadístico de prueba (Miller y Freund, 1965), en el Apéndice "A" se da un resumen de las pruebas estadísticas utilizadas en el presente trabajo.

TABLA 3.8 Verificación de la hipótesis nula que establece que las rectas de regresión que describen la variación de la cantidad de soluto recuperado en función de la cantidad de soluto teóricamente concentrado pasan por el origen del sistema de coordenadas. Nivel de significancia $\alpha = 0.05$, para Bencidina y 3,3'-Diclorobencidina.

SOLUTO	$t_{calc} \ n=10$	$t(\alpha/2, \ gl=n-2)$	¿Acepta H_0 ?
Bencidina	0.12	2.776	si
Diclorobencd.	-0.57	2.776	si

A partir de los datos presentados en la tabla anterior se comprueba estadísticamente que las rectas de regresión pasan por el origen del sistema de coordenadas.

De las rectas de regresión obtenidas podemos ver que los coeficientes de correlación r , son altos, esto significa que los puntos experimentales se ajustan bien a una línea recta.

En este tipo de rectas los coeficientes b , tienen una gran importancia, porque si estadísticamente $b=1$, significa que la cantidad de soluto concentrado será igual a la cantidad de soluto recuperado al final del análisis, es decir que la recuperación de tal soluto es del 100% en el intervalo de concentración que se está estudiando.

De las gráficas anteriores se observa que el valor del coeficiente b de las rectas de regresión obtenidas para las bencidinas estudiadas es cercano a la unidad.

Para comprobar que el coeficiente $b=1$ se efectuó una prueba de hipótesis relativa a dicho coeficiente de la recta de regresión.

TABLA 3.9 Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión, obtenidas en las determinaciones de recuperación a través del intervalo de concentración estudiado, es igual a 1. Nivel de significancia $\alpha= 0.05$. para Bencidina y 3,3'-Diclorobencidina.

SOLUTO	n	t calculada	$t_{0.025} (gl=n-2)$	¿Acepta H_0 ?
Bencidina	6	-4.2	2.776	no
Diclorob.	6	2.6	2.776	si

También se calcularon los límites del intervalo de confianza para los coeficientes b de las rectas de regresión (Miller y Freund, 1965).

En la siguiente tabla se presenta el intervalo de confianza para los coeficientes b de las rectas de regresión de las bencidinas estudiadas, empleando un nivel de significancia $\alpha= 0.05$.

TABLA 3.10 Intervalo de confianza de los coeficientes b de las rectas de regresión.

SOLUTO	Intervalo de confianza
Bencidina	$0.88 < b < 0.98$
Dicloro-bencidina	$1.0 < b < 1.1$

En función de los resultados obtenidos se llega a la conclusión de que, en el intervalo de concentraciones de las bencidinas de 0.5 a 40 $\mu\text{g/L}$ en agua, el método analítico propuesto no presenta desviaciones dependientes de la concentración, es decir que existe una proporcionalidad entre la cantidad de soluto recuperado y la cantidad de soluto analizado.

En el caso de la bencidina se observa, al igual que en la sección anterior, que la recuperación se sitúa alrededor del 93% con una incertidumbre aproximada de $\pm 5\%$. Esto nos conduce a pensar que

durante la etapa de concentración del método una pequeña porción del soluto se fuga de la precolumna. Es decir que, al cargar en la precolumna 50 mL de la muestra preparada, se está rebasando mínimamente el volumen de fuga de la bencidina.

Para la diclorobencidina la recuperación promedio obtenida al analizar muestras dopadas a 1.5 ppb fue de aproximadamente 95%, mientras que en esta sección, las muestras dopadas a concentraciones entre 0.5 y 40 ppb dieron una recuperación promedio de 104%. Se considera que para este soluto el punto más crítico en cuanto a la exactitud y precisión del método se encuentran en la etapa de preparación de la muestra. La recuperación es muy sensible a la forma de operar durante la preparación de la muestra por la alta tendencia de la diclorobencidina a adsorberse, particularmente en la membrana de filtración. Por ello, el pequeño volumen de metanol utilizado para enjuagar el material y recuperar los solutos adsorbidos debe pasarse muy lentamente a través de la membrana procurando mojarla completamente. De hecho es recomendable disminuir la potencia del vacío durante esta operación. Por otra parte, se considera que para este soluto también hay algunas posibilidades de error (o falta de precisión) asociadas a la detección. En efecto, la figura 3.3 muestra que no toda la diclorobencidina se alcanza a oxidar en el electrodo coulombimétrico utilizado (primer electrodo de la celda analítica). Si las condiciones del detector cambian (periodo de calentamiento, estado de los electrodos, flujo de fase móvil, etc.) se pueden producir cambios en la proporción de la diclorobencidina no oxidada alterando los resultados. En este trabajo el estándar utilizado como referencia para la cuantificación de los solutos en la muestra siempre se inyectó inmediatamente antes o después del análisis de la muestra para disminuir las fuentes de error asociadas con la respuesta del detector.

3.2.3 Límite de detección

El límite de detección de un analito se puede definir como la cantidad de compuesto que al pasar por el detector produce una señal significativamente diferente de la señal de una muestra en "blanco" o "señal de fondo". Para algunos autores esto significa un cociente señal/ruido entre 2 y 4.

En química analítica (J.C. Miller. J.N. Miller) se describe el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, Y_B , más dos veces la desviación estándar del

blanco, S_B . Aunque existen recomendaciones de organismos públicos americanos que sugieren que el criterio debería ser:

$$Y - Y_B = 3S_B$$

El límite de detección de los solutos se puede calcular por dos procedimientos, uno de estos procedimientos es mediante el empleo de las rectas de regresión de los solutos Area vs. Concentración. En este caso, no es posible hacer el cálculo mediante este tipo de rectas, debido a que, como se ha mencionado anteriormente, no fue posible obtener una recta de regresión Area vs. Concentración, porque la señal del detector es muy variable de día a día y las muestras se analizaron en diferentes días.

Por lo tanto, el límite de detección se calculó de acuerdo con el procedimiento establecido por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 1984). Este procedimiento se establece con base en la desviación estándar de las mediciones, obtenida en la determinación de un analito, después de analizar al menos siete muestras bajo las condiciones del proceso analítico de interés.

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

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

donde:

$t_{(n-1, 1-\alpha = 0.99)}$ es el valor de la t de Student para un nivel de confianza del 99%.

s , es la desviación estándar en unidades de concentración, estimada con $n-1$ grados de libertad.

n , es el número de datos

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

En este caso, el límite de detección del método desarrollado se estableció empleando la desviación estándar obtenida en el análisis de 10 muestras fortificadas con cada uno de los solutos a una concentración de 1.5 $\mu\text{g/L}$ de cada soluto.

La desviación estándar obtenida en unidades de concentración de las muestras mencionadas se muestra en la siguiente tabla, esto de acuerdo a la tabla 3.2.

TABLA 3.11 Desviación estándar obtenida en el análisis de muestras fortificadas con bencidinas. Concentración de la muestra: 1.5 µg/L. Volumen de muestra concentrado: 50 mL.

SOLUTO	n	s (µg/L)	C. V.
Bencidina	10	0.067	4.79
3,3'- Dicloro- bencidina	10	0.074	5.24

Los límites de detección estimados con base en las consideraciones establecidas por la EPA, se presentan en la tabla 3.12.

TABLA 3.12 Límites de detección para las bencidinas estudiadas, estimados a partir de las consideraciones establecidas por la EPA.

SOLUTO	LDM (µg/L)
Bencidina	0.19
3,3'- Dicloro- bencidina	0.21

A partir de los resultados presentados en la tabla 3.12 se determina que los límites (estadísticos) de detección del método desarrollado son del orden de las 200 partes por trillón (ppt; ng/L) para la bencidina y la 3,3'-diclorobencidina. Sin embargo, utilizando criterios más prácticos (o experimentales) como el de una señal claramente detectable respecto al ruido de fondo se puede establecer que este método permite detectar concentraciones de 100 ppt para la bencidina y 50 ppt para la 3,3'-diclorobencidina, como lo muestran las tablas 3.5 y 3.6.

Se debe enfatizar que estos resultados se obtuvieron con muestras de agua grado reactivo dopadas con los analitos. Evidentemente, en muestras más “sucias” los límites de detección del método podrían ser más altos. De hecho, en este aspecto no es posible generalizar y más bien se considera que los límites de detección deben establecerse para cada tipo de muestra.

3.3 Aplicación del método en diferentes muestras de agua

Una vez que quedó establecido y certificado el método para el análisis de trazas de bencidinas en agua, utilizando muestras de agua pura dopadas, se procedió a estudiar su aplicabilidad en diferentes tipos de muestras acuosas reales. Se hicieron ensayos en agua potable, agua de río, agua de pozo y aguas de desecho.

Las muestras de desecho correspondían a aguas realmente muy sucias, tomadas directamente del canal de desechos de una tintorería y de una pequeña industria de tinción de fibras. Estas aguas eran muy opacas, con una gran cantidad de coloides y sólidos suspendidos, para clarificarlos se hicieron pruebas con sulfato de aluminio y acetato de plomo como coagulantes, luego se filtraron, se doparon con bencidinas a 5 ppb y se analizaron según el método desarrollado. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que las recuperaciones de los analitos fueron muy bajas y en análisis repetidos no se tuvo reproducibilidad de los resultados. Se realizó una prueba testigo con agua grado reactivo a la que se adicionó acetato de plomo para ver sus efectos. La muestra se dopó también a 5 ppb con las bencidinas y se analizó, obteniendo una recuperación entre 20 y 25% de las bencidinas. Por lo tanto se concluye que este tipo de sales no pueden ser utilizadas en las muestras cuando se analizan bencidinas ya que o las degradan o, lo que es más probable, forman complejos neutros insolubles que quedan atrapados en los filtros.

Los ensayos anteriores muestran que el método desarrollado no es aplicable, tal cual, para el análisis de bencidinas en aguas muy sucias. Es posible que pudieran obtenerse mejores resultados realizando modificaciones sustanciales al método, pero esto equivale en realidad a desarrollar un nuevo método ad hoc para este tipo de muestras.

Se procedió entonces a aplicar el método a muestras de agua más limpias como el agua potable de Ciudad Universitaria, aguas superficiales y aguas subterráneas. Las muestras (200 mL) se colocaron en frascos de vidrio ámbar con capacidad de 250 mL y se aplicaron todos los pasos del procedimiento establecido para su análisis, tanto en las muestras blanco

como en las mismas muestras dopadas a 5 ppb con las bencidinas. En la tabla 3.13 se reportan las recuperaciones obtenidas en los 3 tipos de agua para las muestras fortificadas. Cabe mencionar que en las muestras blanco no se detectó en ningún caso la presencia de bencidina o 3,3'-diclorobencidina.

TABLA 3.13 Recuperación de bencidinas en el análisis de tres diferentes tipos de muestras de agua dopadas a 5 µg/L con ambos solutos.

Soluto	Agua Potable	Agua de Río	Agua de Pozo
Bencidina	13.6	95.6	91.2
3,3'-diclorobenc.	83.0	93.5	96.8

La tabla 3.13 muestra que en el agua de río y el agua de pozo los resultados son comparables a los obtenidos con el agua grado reactivo dopada. Por lo tanto se puede concluir que el método es aplicable a este tipo de muestras de agua sin ninguna modificación. En las figuras 3.6 y 3.7 se muestran los cromatogramas obtenidos tanto para las muestras blanco como para las muestras dopadas.

Como puede observarse, en los cromatogramas no hay picos de otros compuestos que pudieran interferir con el análisis de las bencidinas, confirmando la selectividad del método para bencidinas en este tipo de muestras.

Por otra parte, la recuperación de los analitos en el agua potable es muy baja, especialmente para la bencidina. Es obvio que el cloro presente en estas aguas produce una rápida degradación de los solutos, ya que las muestras fueron analizadas inmediatamente después de doparse. Este fenómeno de degradación en el agua potable ya ha sido observado en trabajos anteriores con otros solutos como los fenoles (L.E Vera- Avila et al., 1998). Por lo anterior se concluye que no tiene ningún caso analizar bencidinas en agua potable ya que no es factible su persistencia en este medio.

Los criterios ecológicos de calidad del agua en México establecen como concentraciones máximas permisibles para la bencidina en agua dulce un nivel de 20 ppb y en agua potable una concentración de 1 ppt.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que el método desarrollado es totalmente apropiado para el monitoreo ecológico de la bencidina en aguas naturales. Este método no permitiría la determinación de bencidina a las concentraciones máximas permisibles en agua potable; sin embargo, por lo mencionado anteriormente, no es de esperarse la presencia de bencidinas en aguas cloradas.

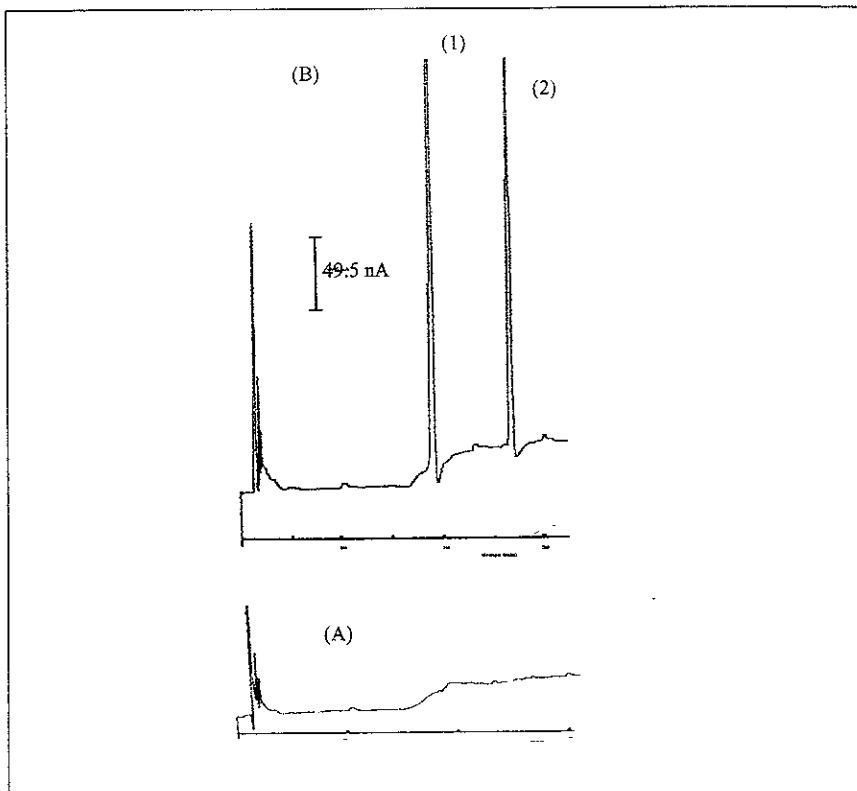


Figura 3.6 Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de 50 ml de agua de pozo, empleada para el riego de cultivos, aplicando el método desarrollado en este trabajo. A) Blanco de la muestra, B) Muestra con una concentración de $5\mu\text{g/L}$ de (1) bencidina y (2) 3,3'-diclorobencidina.

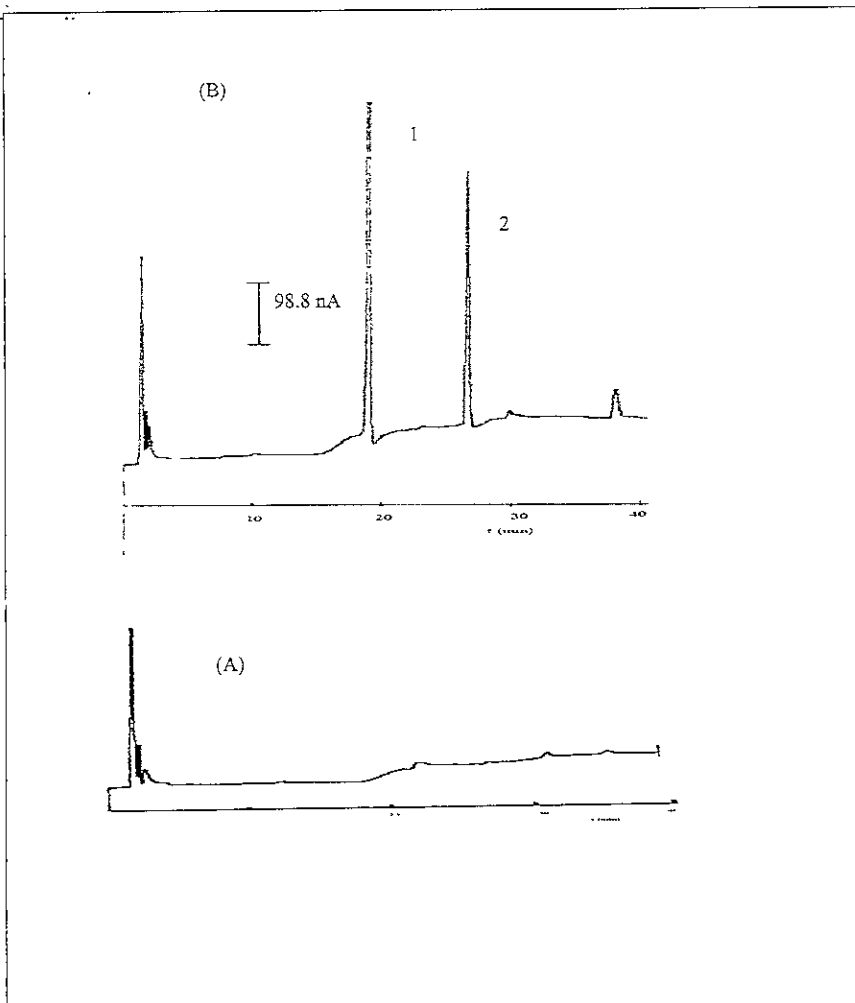


Figura 3.7 Cromatogramas obtenidos en el análisis de una muestra de 50 ml de agua de río. A) Blanco de la muestra B) Muestra fortificada con una concentración de 5 μ g/L de (1) bencina y (2) 3,3 - diclorobencina

CONCLUSIONES

- El método analítico descrito en este trabajo se propone como una alternativa para el monitoreo y análisis de bencidina y 3,3'-diclorobencidina en muestras de agua de río o de pozo. Estos compuestos están sujetos a regulación por la legislación ecológica mexicana para la prevención de la contaminación del agua.
- Los compuestos mencionados se pueden determinar selectivamente, por Cromatografía de Líquidos de alta resolución en fase reversa, utilizando detección electroquímica y enriquecimiento de trazas en línea, mediante una precolumna pequeña empacada con un copolímero macroporoso rígido de estireno/divinil benzeno.
- El sistema de preconcentración en fase sólida, conectado en línea con el sistema cromatográfico de análisis reduce considerablemente el riesgo de contaminación o pérdida de las muestras estudiadas debido a que la manipulación externa de éstas es mínima. También presenta la ventaja de disminuir considerablemente el tiempo de análisis y de ser más económico y menos contaminante que los sistemas tradicionales de preparación de muestra basados en la extracción líquido-líquido. En efecto, por una parte no se requiere del uso y posterior evaporación de grandes volúmenes de disolventes orgánicos generalmente tóxicos y costosos. Por otra parte, la precolumna de EFS puede ser reutilizada un gran número de veces sin necesidad de cambiar el empaque.
- El método propuesto permite la automatización casi total de los análisis. La etapa de EFS, la transferencia del extracto hacia la columna analítica la separación cromatográfica y la detección pueden ser programadas y controladas por un sistema electrónico.
- Los estudios realizados demuestran que el método es apropiado para la determinación de bencidinas en muestras acuosas a muy bajo nivel de concentración. Así, a niveles del orden de la parte por billón, la recuperación de los analitos fue superior al 90% con una precisión de, aproximadamente, 5%. Los límites de detección del método, determinadas estadísticamente, son del orden de las 200 partes por trillón; sin embargo, experimentalmente se demostró que es posible detectar hasta 50 ppt de 3,3'-diclorobencidina y hasta 100 ppt de bencidina.

- Finalmente es importante hacer notar que, aunque el adsorbente utilizado para la EFS es muy poco selectivo y el método propuesto no incluye ningún paso de purificación del extracto, los resultados obtenidos con muestras de agua de río y de pozo fortificadas son excelentes y no muestran ningún interferente. Esto es debido a la gran selectividad de la detección electroquímica.

REFERENCIAS

- Armentrout, N. D and Cutie, S. S. Journal of Chromatographic Science., 18 (1980) 370
- Banerjee, S et al. Environmental Science Technology., 12 (1978) 1425.
- Benzidine and β naphtilamines det. Lím.0.1 $\mu\text{g/l}$. Water Analysis 91 (Anal. Chem)
- Brumley, C. W and Cynthia M. Brownrigg. Journal of Chromatographic Science., 32 (1994) 69.
- DOF. Diario Oficial de la Federación. CE- CCA- 001/89. México D.F. (1989).
- Fleet B and Little C. J. Journal of Chromatographic Science., 12 (1974) 747.
- Gallegos Pérez J. L, Tesis de Maestría. "Estudio sistemático de factores que influyen en la adsorción de compuestos orgánicos en resinas XAD-4". (1997).
- G. A. Junk, J. J. Richard, M. D. Grieser, et al., J. Chromatogr., 99 (1974) 745.
- G. A Junk, C. D. Chriswell, R. C. Chang, L. D. Kissinger, J. J. Richard, J. S. Fritz and H. J. Svec, Fresenius Z. Anal. Chem., 282 (1976) 331.
- Gratzfeld Huesggen A., Shuster R. Schweiz, Lab. - Z. 1990, 47 (9) 327-331.
- Haas R., Schrelber I. Losekam M, Koss G. Fresenius Z Anal. Chem , 335- 8 (1989) 980-981.
- Hennion M.C. and Coquart V. J. Chromatogr., 624 (1993) 211- 234.
- Hinks D, Freeman S. H et al . Dyes and Pigments., 44 (2000) 199-207.

HPLC electrochemical detector benzidine in waste waters at low ng/ ml ($\mu\text{g/L}$) level Water Analysis 91 (Anal. Chem).

HPLC + electrochemical. Water Analysis 93 (Anal. Chem)

Ibarra Montaña E. L, Tesis de Maestría. "Estudio de la adsorción de fenol en columnas empacadas con resina XAD-2" (1998).

Jahangir L. M. and Samuelson O. J. Chromatogr., 193 (1980) 197-206.

Jenkins, L. R and Baird, B. R. Bulletin of Environmental Contamination Toxicology., 13-4 (1975) 436.

Johnson, J. H. et al. Journal of Analytical Toxicology., 5 (1981) 157.

Kawahara, F. K et al. Analytica Chimica Acta., 138 (1982) 207.

Keller, W. R and Adams, N. R. Analytical Chemistry 34- 10 (1962) 1302.

Keller, W. R and Adams, N. R. Analytical Chemistry., 49- 4 (1997) 663.

Lacorte S. Perrot M. C et al. J. Chromatogr A., 833 (1999) 181-194.

Levine, A. R et al. Journal of Analytical Toxicology., 6 (1982) 157.

M. Bouzige, P. Legeay et al. J. Chromatogr A., 846 (1999) 317-329.

M. C. Bowman, J. R. King and C.L. Holder, Int. J. Environ. Anal. Chem., 4 (1976) 205.

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

Miller J. C. and Miller J. N. Statistics for analytical chemistry. 2nd Ed. Ellis Horwood, London, 1998.

Oglesby, M. D et al. Analytical Chemistry., 38- 3 (1966) 385.

Padilla Cortés M. P, Tesis de Maestría. "Concentración, purificación y determinación en línea de herbicidas del tipo ácido clorofenoxi en agua", (1997).

Pindar G. A and Tinsley, M. H. Analyst.. 109 (1984) 1101.

Reza González Joel, Tesis de Maestría. “Determinación de trazas de fenoles en agua por CL con EFS en línea”, (1995).

R. L. Jenkins and R. B. Baird, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 13 (1975) 436.

Rice, R. J and Kissinger, T. P. Journal of Analytical Toxicology., 3 (1979) 64.

Riggin R. M and C. C. Howard, Anal. Chem., 51- 2 (1979) 210- 214.

Riggin, R. M. et al, Journal of Chromatographic Science., 21 (1983) 321.

Seong T. Hwang, AIChE Symposium Series 1980, 77(209) 304- 315.

US EPA, Federal Register., 44 (1979) 43667- 68

US EPA. Method 605 – Benzidines, Fed. Regist. V49, N 209 (1984)

Vera- Avila L.E, J. L. Gallegos Pérez and E. Camacho- Frias, Talanta., 50 (1999) 509.

Whang, C, Yang L. J. Chin. Chem. Soc. (Taipei) 1988, 35 (2) 109- 118.

APENDICE "A"

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

1. LINEALIDAD

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

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

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

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

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

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

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

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

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

$$j) \quad t = \left(\frac{b - \beta}{S_c} \right) \sqrt{\frac{S_{yy}}{n}}$$

$$k) \quad \text{I. C: } b \pm t_{\alpha/2} \cdot S_c \sqrt{\frac{n}{S_{xx}}}$$

$$l) \quad t_{calculada} = \frac{\bar{X} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

$$m) \quad \text{I. C: } \bar{x} - t_{\alpha/2} \cdot \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right) \leq R \leq \bar{x} + t_{\alpha/2} \cdot \left(\frac{s}{\sqrt{n}} \right)$$

2.- NOMENCLATURA

y, x Variables
 x variable independiente
 y variable dependiente

y/x y dado x

b, β Pendiente de la recta de regresión de y/x

a, α Ordenada al origen de regresión de y/x

\bar{x} Media de los valores observados de x

r Coeficiente de correlación momento producto

n Tamaño de la muestra (número de determinaciones)

(n-1) o (n-2) Término que se conoce como número de grados de libertad

μ Media poblacional

σ Desviación estándar poblacional

s Desviación estándar

s^2 Varianza

t	Distribución de Student
t_{cal}	Distribución de Student calculada
I. C	Interválo de confianza