

00577



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

1

METODOLOGIA PARA LA DETERMINACION DE TRAZAS DE
HIDROCARBUROS AROMATICOS POLINUCLEARES EN
AGUA POR EXTRACCION EN FASE SOLIDA EN LINEA
CON CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS

287505

T E S I S

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

P R E S E N T A :

Q. EDGAR ARTURO CAZARES IBAÑEZ

ASESORA: DRA. LUZ ELENA VERA AVILA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Sin duda el soporte constante para el desarrollo de este trabajo es el aportado por la Dra Luz Elena, a quien agradezco infinitamente su ayuda y enseñanzas además de haberme impregnado de la tenacidad necesaria para lograr esto.

No podía faltar mencionar mi eterno agradecimiento al Angel de la Guarda para la consecución de los objetivos de este trabajo: La infatigable y siempre oportuna Maestra Rosario.

Un agradecimiento especial a mi jurado por sus sugerencias y aportaciones a la revisión de este trabajo y a todos mis maestros cuyas experiencias y enseñanzas aprecio infinitamente.

Gracias Facultad de Química

Gracias Instituto Mexicano del Petróleo

Agradezco al Ing. Ernesto Ibarra Nuñez, quién me ha apoyado en la obtención de tiempos y espacios para lograr mis objetivos además de sus valiosos consejos.

Agradezco de manera particular al M. en I. Cuauhtemoc Zapata González cuyo apoyo también ha sido muy valioso, así como a las autoridades correspondientes del Instituto Mexicano del Petróleo que han facilitado mi desarrollo personal.

Mi agradecimiento por sus aportaciones en los dibujos a mi compañero Jose Luis Flores Ocegueda

También dedico este trabajo y el esfuerzo que este encierra a mis hermanos: Paty, Sandra, Cesár y Alberto. A mis sobrinos: Maira, Melisa, Nayeli, Aurora, Eder y Cristian.

Una dedicatoria especial a mi tfo Angel que actualmente es como un padre para mi.

Nunca he olvidado el apoyo en los momentos difíciles por parte de mi tía Martha y su esposo Moises.

A mis amigos cuyo aprecio y confianza son ilimitadas: Saúl y Marcela, Pepe, Victor, Juan, Fernando, Enrique, Hugo y Marcela, Esteban, Guillermo, Alejandro, Oscar, Dorinda y Sergio, Nenidia, Nora y Polo. .

**EN LAS HORAS PROPICIAS, CUANDO FLUYEN SOLAS LAS PALABRAS,
DIFÍCILMENTE PODRÍA HALLARSE EN LA TIERRA UNA FORMA MAS
GRATA DE PASAR EL TIEMPO. LAS HORAS MALAS NO CUENTAN.
LA VIDA NO EXISTE SIN ELLAS**

**CUANTO MAYOR SENTIDO TIENE AHORA LA VIDA EN LUGAR DE
NUESTRO LENTO Y PESADO IR Y VENIR A LOS PESQUEROS
HAY UNA RAZÓN PARA VIVIR
PODREMOS ALCANZAR SOBRE NUESTRA IGNORANCIA, PODREMOS
DESCUBRIR COMO CRIATURAS DE PERFECCIÓN, INTELIGENCIA Y
HABILIDAD. PODREMOS SER LIBRES
PODREMOS APRENDER A VOLAR.**

JURADO

PRESIDENTE: DRA ARACELI PEÑA ÁLVAREZ
VOCAL: DRA EVANGELINA CAMACHO FRÍAS
SECRETARIO: M. en C. FRANCISCO ROJO CALLEJAS
PRIMER SUPLENTE: M. en C. MARÍA PATRICIA C. PADILLA CORTÉS
SEGUNDO SUPLENTE: M. en C. JOEL REZA GONZÁLEZ

Sitio donde se desarrolló el tema

**Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Departamento de Química Analítica
División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química de la Universidad Nacional
Autónoma de México.**

**Dra Luz Elena Vera Ávila
ASESOR**

**Q. EDGAR ARTURO CÁZARES IBAÑEZ
SUSTENTANTE**

CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT..... | 2 |
| INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| Capítulo I. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES..... | 5 |
| I.1 Contaminación del Agua y Presencia de los HAP's..... | 5 |
| Efecto contaminante de los HAP's..... | 5 |
| Contaminación de mantos Acuíferos..... | 6 |
| Cuencas hidrológicas mas contaminadas..... | 9 |
| I.2 Propiedades físico-químicas de los HAP's..... | 11 |
| I.3 Métodos de Pretratamiento de Muestra | 14 |
| A. Criterios para la preparación de la muestra..... | 14 |
| B Metodología para la extracción en fase sólida..... | 15 |
| C Adsorbentes utilizados en columnas de EFS | 18 |
| D Extracción en fase sólida en línea | 23 |
| I.4 Métodos de Determinación de Compuestos Aromáticos Policíclicos en Agua | 25 |
| Capitulo II. DESARROLLO EXPERIMENTAL | 26 |
| II.1 Equipo y Accesorios | 26 |
| A. Equipo | 26 |
| B. Accesorios | 26 |
| C. Empacado de la precolumna | 27 |
| D. Calibración del rizo del inyector | 28 |
| II.2 Disolventes, Reactivos y Disoluciones | 28 |
| II.3 Condiciones Cromatográficas | 32 |
| II.4 Descripción del Procedimiento Para la Preconcentracion | 34 |
| y Análisis en Línea de HAP's | 34 |
| A. Montaje | 34 |
| B. Preparación previa de la muestra | 37 |
| C. Carga de la precolumna y análisis de los HAP's | 38 |

| | |
|---|----------------|
| Capítulo III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 41 |
| III.1 Separación y Detección de los HAP's | 41 |
| III.2 Linealidad y Exactitud Multinivel del Método | 46 |
| Pruebas y límites de confianza para la ordenada al origen | 64 |
| Y la pendiente de las rectas de regresión | 64 |
| III.3 Precisión y Exactitud a Concentraciones Cercanas a los Límites | 71 |
| de Cuantificación del Método | 71 |
| III.4 Límites de Detección y Cuantificación | 75 |
| III.5 Aplicación del Método al Análisis de Muestras | 79 |
| CONCLUSIONES | 103 |
| ANEXO 1 | 105 |
| A. Ecuaciones estadísticas | 105 |
| B. Cuantificación de HAP's en agua de río | 109 |
| REFERENCIAS | 111 |

Índice de Tablas

| | | |
|--------------|---|----|
| TABLA I.1.1 | Constituyentes del petróleo en el aceite crudo | 6 |
| TABLA I.2.1 | Algunas propiedades de los HAP's estudiados en este trabajo | 11 |
| TABLA I.3.1 | Adsorbentes de uso común para extracción en fase sólida | 20 |
| TABLA I.3.2 | Sistemas típicos para preparación de muestra | 21 |
| TABLA I.3.3 | Propiedades físicas de fases reversas químicamente unidas | 22 |
| TABLA I.3.4 | Selectividades de fases reversas ligadas para HAP's | 22 |
| TABLA I.4.1 | Métodos de determinación de HAP's en matrices acuosas con preparación de muestra por EFS | 25 |
| TABLA II.2.1 | Disoluciones stock de HAP's | 29 |
| TABLA II.2.2 | Concentración de HAP's en la mezcla stock | 31 |
| TABLA II.4.1 | Operación del sistema durante los diferentes pasos del método | 40 |

Tablas de recuperación de HAP's en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas a diferentes niveles de concentración:

| | | |
|----------------|---|----|
| TABLA III.2.1 | Naftaleno | 48 |
| TABLA III.2.2 | Acenafteno | 49 |
| TABLA III.2.3 | Acenaftileno | 50 |
| TABLA III.2.4 | Fluoreno | 51 |
| TABLA III.2.5 | Fenantreno | 52 |
| TABLA III.2.6 | Antraceno | 53 |
| TABLA III.2.7 | Fluoranteno | 54 |
| TABLA III.2.8 | Pireno | 55 |
| TABLA III.2.9 | Benzo(a)antraceno | 56 |
| TABLA III.2.10 | Criseno | 57 |
| TABLA III.2.11 | Benzo(a)pireno | 58 |
| TABLA III.2.12 | Benzo(b)fluoranteno | 59 |
| TABLA III.2.13 | Benzo(k)fluoranteno | 60 |
| TABLA III.2.14 | 1,2: 5,6-Dibenzoantraceno | 61 |
| TABLA III.2.15 | Benzo(ghi)perileno | 62 |
| TABLA III.2.16 | Indeno (1,2,3)-pireno | 63 |
| TABLA III.2.17 | Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión es igual a 1 | 65 |
| TABLA III.2.18 | Intervalos de confianza de la pendiente de las rectas de regresión | 65 |
| TABLA III.2.19 | Verificación de la hipótesis nula que establece que la la ordenada al origen de las rectas de regresión es igual a 0 | 66 |

| | |
|---|----|
| TABLA III.2.20 Intervalos de confianza de la ordenada al origen..... | 67 |
| de las rectas de regresión | 67 |
| TABLA III.3.1 Exactitud y precisión del método a muy bajos niveles de concentración ... | 72 |
| TABLA III.3.2 Intervalos de confianza para la recuperación de los HAP's | 73 |
| TABLA III.4.1 Desviación estándar de la concentración para HAP's ligeros | 76 |
| TABLA III.4.2 Desviación estándar de la concentración para HAP's pesados | 77 |
| TABLA III.4.3 Límites de detección | 77 |
| TABLA III.4.4 Límites de cuantificación | 78 |
| TABLA III.5.1 Estabilidad de HAP's en muestra de agua grado reactivo | 80 |
| TABLA III.5.2 Estabilidad de HAP's en muestra de agua potable | 82 |
| TABLA III.5.3 Análisis de HAP's en muestra de agua de río | 94 |

Indice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura I.2.1 Fórmulas de hidrocarburos aromáticos policíclicos | 13 |
| Figura I.4.1 Montaje Experimental, (A) Posición de carga y (B) Posición de elución | 35 |
| Figura III.1.1 Separación de una mezcla de poliaromáticos a alta concentración (UV) | 42 |
| Figura III.1.2 Separación de una mezcla de poliaromáticos a alta concentración (F) | 43 |
| Figura III.1.3 Cromatograma UV obtenido a niveles | 44 |
| muy cercanos al límite de detección | 44 |
| Figura III.1.4 Cromatograma de fluorescencia a niveles | 45 |
| muy cercanos al límite de detección | 45 |

Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de soluto recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

| | |
|---|----|
| Figura III.2.1 Naftaleno | 48 |
| Figura III.2.2 Acenafteno | 49 |
| Figura III.2.3 Acenaftileno | 50 |
| Figura III.2.4 Fluoreno | 51 |
| Figura III.2.5 Fenantreno | 52 |
| Figura III.2.6 Antraceno | 53 |
| Figura III.2.7 Fluoranteno | 54 |
| Figura III.2.8 Pireno | 55 |
| Figura III.2.9 Benzo(a)antraceno | 56 |
| Figura III.2.10 Criseno | 57 |
| Figura III.2.11 Benzo(a)pireno | 58 |
| Figura III.2.12 Benzo(b)fluoranteno | 59 |
| Figura III.2.13 Benzo(k)fluoranteno | 60 |
| Figura III.2.14 1, 2: 5,6 Dibenzoantraceno | 61 |
| Figura III.2.15 Benzo(ghi)perileno | 62 |
| Figura III.2.16 Indeno (1,2,3)pireno | 63 |
| Figura III.2.17 Blanco de muestra (UV) | 69 |
| Figura III.2.18 Blanco de muestra (fluorescencia) | 70 |

Cromatogramas UV del estudio de estabilidad de HAP's en agua potable:

| | |
|--|----|
| Figura III.5.1 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 85 |
| Figura III.5.1 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 86 |
| Figura III.5.1 c Estándar inyectado | 87 |

Cromatogramas de fluorescencia del estudio de estabilidad de HAP's en agua potable

| | |
|--|----|
| Figura III.5.2 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 88 |
| Figura III.5.2 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 89 |
| Figura III.5.2 c Estándar inyectado | 90 |

Cromatogramas UV del blanco de agua de río

| | |
|--|----|
| Figura III.5.3 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 95 |
| Figura III.5.3 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 96 |

Cromatogramas de fluorescencia del blanco de agua de río

| | |
|--|----|
| Figura III.5.4 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 97 |
| Figura III.5.4 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 98 |

Cromatogramas UV de muestra de agua de río dopada

| | |
|--|-----|
| Figura III.5.5 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 99 |
| Figura III.5.5 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 100 |

Cromatogramas de fluorescencia de muestra de agua de río dopada

| | |
|--|-----|
| Figura III.5.6 a Muestra tratada por el procedimiento para HAP's ligeros | 101 |
| Figura III.5.6 b Muestra tratada por el procedimiento para HAP's pesados | 102 |

RESUMEN

De acuerdo a los reportes de los últimos años los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's), son un grupo de compuestos altamente carcinogénicos y mutagénicos, debido a su gran facilidad de formación de aductos con las moléculas de ADN celular.

Es conocido que la solubilidad de estos compuestos en agua es sumamente baja, del orden de microgramos por litro. A pesar de ello su presencia en los medios acuosos debe ser monitoreada con regularidad debido a que aún a bajas concentraciones pueden dañar tanto la vida acuática como al hombre.

El problema de la determinación de estos microcontaminantes orgánicos no solo radica en la gran sensibilidad que se requiere del método analítico, sino también las precauciones minuciosas que deben tenerse durante el procedimiento de preparación de muestra (básicamente preconcentración). En efecto los hidrocarburos aromáticos polinucleares son fuertemente hidrofóbicos y tienden a adsorberse sobre las paredes de cualquier material que esté en contacto con sus disoluciones acuosas. Esta característica es responsable de que en la mayoría de los métodos tradicionales u oficiales utilizados para su análisis en muestras acuosas se presenten fuertes riesgos de obtener resultados poco exactos y/o precisos.

Actualmente los esfuerzos de los investigadores en química analítica van encaminados al desarrollo de métodos mas simples, rápidos y de preferencia, automatizables. En este sentido, el reemplazo de la extracción líquido-líquido por la extracción en fase sólida como método de preparación de muestra para la determinación de compuestos orgánicos en agua ha alcanzado muy buenos resultados.

En este trabajo se propone un método en línea en el cual el proceso de preparación de muestra, basado en la extracción en fase sólida, está acoplado en línea con el proceso de análisis por cromatografía de líquidos con detección dual, absorción de la luz UV y fluorescencia.

Esta nueva metodología permite determinar los hidrocarburos aromáticos polinucleares al nivel de trazas (ppb y ppt) en muestras de agua.

ABSTRACT

It is now generally agreed that the polynuclear aromatic hydrocarbons constitute a group of highly carcinogenic and mutagenic compounds due to their great facility to form adducts with the cellular DNA molecules.

Although the solubility of these compounds in water is extremely small, of the order of micrograms per liter or less, their presence in the aquatic media must be regularly monitored because even at these low concentrations they can be harmful for the aquatic life and men.

The problem for the determination of these organic micropollutants in water is not only due to the necessity of a high sensibility analytical method but to the scrupulously and minutely cautions that must be taken during the sample preparation procedure (basically preconcentration). Indeed, polynuclear aromatic hydrocarbons are highly hydrophobic and, thus, are easily adsorbed on any material that comes in contact with their aqueous solutions. It is because of this characteristic that the traditional or official methods used for their analysis in aqueous samples are prone to high risks of inaccurate or low precision results.

Actually, the analytical chemists efforts are directed toward the development of more simple, rapid and if possible automatizable methods. In this sense, the replacement of liquid-liquid extraction for solid-phase extraction as the sample preparation method for the determination of organic compounds in water has reached a strong success.

In this work, an on-line method is proposed. The sample preparation process, based on solid-phase extraction, is on-line coupled to the analytical process, carried out by liquid chromatography with dual detection, UV and fluorescence.

This new methodology allows the trace level (ppb or ppt) determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in water samples.

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP's) son compuestos pirogénicos que se originan en muchos procesos de combustión incompletos, particularmente en aquellos donde las temperaturas sobrepasan los 700 °C. Las fuentes de contaminación típicas son las centrales térmicas, las estufas, los humos de combustión de los automóviles, las factorías de preservativos de madera y la producción de alquitránes.

Debido a los reconocidos efectos carcinogénicos y/o mutagénicos de estos compuestos, su monitoreo en los diferentes compartimentos ambientales (agua, aire y suelo) es una prioridad para los organismos responsables de la salud humana y del cuidado del medio ambiente en la mayoría de los países. Aunque la solubilidad de los HAP's en agua es sumamente baja, del orden de las partes por billón ($\mu\text{g/l}$), se ha encontrado que algunos de ellos son tóxicos a estos niveles de concentración. Por ello, se han establecido límites muy estrictos respecto a su concentración total en las aguas naturales (superficiales y subterráneas) y tratadas.

Los 16 HAP's que se estudian en este trabajo forman parte de la lista de contaminantes prioritarios establecida por la agencia de protección ambiental de los E.U. (EPA). Los métodos tradicionales para su aislamiento y preconcentración a partir de matrices acuosas, previo a su análisis por cromatografía de líquidos o cromatografía de gases, están basados en el procedimiento de extracción líquido-líquido para contaminantes orgánicos ácidos/básicos/neutros implementado por la propia EPA. Cabe notar que este tipo de métodos son sumamente largos, tediosos y eminentemente manuales por lo que han sido poco a poco desplazados por métodos mas modernos basados principalmente en la extracción en fase sólida (EFS).

Probablemente el problema mas difícil a resolver o controlar cuando se determinan compuestos altamente hidrofóbicos como los HAP's en matrices acuosas, es la pérdida de analitos debido a procesos de adsorción durante la preparación de la muestra. En efecto, la extracción y preconcentración de compuestos hidrofóbicos en los adsorbentes apolares comúnmente utilizados para la EFS, como los copolímeros de estireno-divinilbenceno y las fases químicamente unidas octilo u octadecilo, es un proceso altamente favorable cuando dichos compuestos se encuentran en un medio acuoso. Sin embargo, por su propia hidrofobicidad estos compuestos presentan una fuerte tendencia a adsorberse sobre las paredes de los recipientes o cualquier material que se encuentre en contacto con sus disoluciones acuosas. Por tanto, es muy factible que la muestra percolada a través del cartucho, disco o precolumna de EFS, contenga una cantidad menor de analitos que la muestra original ya que una parte importante de éstos ha quedado previamente adsorbida en diferentes materiales (frascos de muestreo, vasos de precipitados, filtros etc.).

Debido al problema anterior, algunos investigadores han considerado que la EFS no es un método adecuado para recuperar solutos muy hidrofóbicos de muestras de agua. Otros han propuesto diversas estrategias para reducir la pérdida de analitos, como silanización de todo el material de vidrio con dimetilclorosilano o bien adición de un pequeño volumen de disolvente orgánico en el frasco de muestreo antes de comenzar el tratamiento de la muestra.

Con respecto a los HAP's en el laboratorio de cromatografía de líquidos de la DEPg, Facultad de Química, UNAM, se desarrolló hace algunos años un método que permite determinar 10 de estos compuestos a niveles de trazas en agua. Este método, basado en el acoplamiento en línea de la EFS con la cromatografía fue únicamente aplicado en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's.

En el presente trabajo se decidió retomar la metodología antes desarrollada, optimizándola, adaptándola e implementándola para la determinación del grupo completo de los 16 HAP's considerados en la lista de contaminantes prioritarios. Asimismo, se procedió a certificar la calidad del nuevo método con muestras de agua dopadas a concentraciones comprendidas entre las partes por trillón (ng/l) y las partes por billón ($\mu\text{g/l}$). Finalmente, el método modificado se aplicó en muestras "reales", una de agua potable y otra de agua de río proveniente de una zona susceptible a la contaminación por HAP's.

I. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES

I.1 Contaminación del Agua y Presencia de los HAP's

Efecto Contaminante de los HAP's

Los hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP's) son considerados como verdaderos contaminantes aunque se encuentran naturalmente presentes en el petróleo y también son sintetizados por algunas bacterias. Sin embargo, sus concentraciones naturales son muy bajas y su presencia en el ambiente es fundamentalmente de origen antropogénico.

El transporte y dispersión de los HAP's se verifica principalmente por la vía Eólica (transporte atmosférico), de manera que estos compuestos pueden hallarse incluso en los casquetes polares¹. En los medios acuáticos, debido a su alta hidrofobicidad, se encuentran asociados preferentemente a sustancias lipofílicas como las que existen en el plancton o en otros organismos marinos¹.

Es importante especificar que cuando se habla de contaminación por petróleo, ésta no puede ser simplemente evaluada en función de la cantidad de hidrocarburos ya que no todos los constituyentes del petróleo poseen características primordiales de un contaminante. En la revista *Analytical Chemistry News and Features* publicada en marzo de 1998 se consideran como factores condicionantes del efecto contaminante la Abundancia, la Biodisponibilidad, la Persistencia en tejidos y la Toxicidad. En la tabla I.1 se reporta la evaluación de estas características para los diferentes constituyentes del petróleo. Como puede observarse, los hidrocarburos aromáticos policíclicos caen dentro de la clasificación de "alta" en abundancia y biodisponibilidad y "variable" en persistencia en tejidos y toxicidad².

En 1999, la revista *Environment Impact Assess Review* publicó el enfoque impulsado por el gobierno de E.U. para la regulación de los desechos peligrosos en función de su contenido de contaminante. Entre los criterios retenidos para la clasificación de los desechos se incluyen la toxicidad aguda, la persistencia y la carcinogenicidad. De acuerdo con esto, los HAP's quedaron incluidos dentro del grupo de sustancias para las cuales se establecen límites regulatorios³. En efecto, un análisis de los desechos considerados como peligrosos de los años 1989 a 1991 y 1994 permitió obtener datos sobre la persistencia de los HAP's, la cual combinada con su bioacumulación y toxicidad aguda los ubica como constituyentes peligrosos para el humano y los seres vivos².

Tabla L1.1 Constituyentes del petróleo en el aceite crudo

| Clase | Abundancia | Biodisponibilidad* | Persistencia en tejidos | Toxicidad |
|---|------------|--------------------|--------------------------------------|-----------|
| Hidrocarburos alifáticos | Alta | Alta | Baja | Baja |
| Hidrocarburos Alicíclicos. Cicloalcanos Cicloalquenos | Alta | Alta | Baja | Baja |
| Aromáticos sin sustituciones e hidrocarburos aromáticos alquílicos, N- y heterocíclicos | Alta | Alta | Variable dependiente de las especies | Variable |
| Compuestos polares (Ej. Ácidos, Fenoles, Tioles y Tiofenoles) | Baja | Baja | Baja | Baja |
| Elementos (Azufre, Vanadio, Níquel y Hierro) | Baja | Baja | Baja | Baja |
| Compuestos insolubles (Ej. Asfaltenos, Resinas y Alquitrán) | Baja | Baja | Baja | Baja |

*Biodisponibilidad es aquella porción de la concentración total de un químico que está potencialmente disponible para absorción por organismos acuáticos.

Contaminación de Mantos Acuíferos en México

De acuerdo con información publicada por la Comisión Nacional del Agua (CNA), para conocer la calidad del agua en aproximadamente dos millones de kilómetros cuadrados del país se requiere monitorear 300 cuerpos de agua: lagos, litorales o lagunas costeras y acuíferos. La tarea de evaluación de estos recursos hídricos está a cargo de la Gerencia de Saneamiento y Calidad del Agua del CNA y es realizada mediante la Red Nacional de Monitoreo. Todo esto está regido por diversas normas y leyes⁴.

En 1973, en el marco de la Ley Federal de Protección al Ambiente, se estableció como prioridad fundamental por parte del gobierno federal el conocer la calidad del agua. Así la Secretaría de Recursos Hidráulicos creó los sistemas de información con base en la medición de algunas variables ambientales; además entró en vigor el reglamento para prevenir y controlar la contaminación de agua. Para 1974 la Red de Monitoreo evaluaba 145 cuerpos de agua (ríos, lagos, lagunas y manantiales) por medio de 239 estaciones a nivel nacional, lo que se estima corresponde a un 48% del volumen de agua del país. Para 1982, se monitoreaban 209 cuerpos de agua (65% del volumen de agua del país).

En 1992 entró en vigor la ley de Aguas Nacionales y en 1994 el reglamento correspondiente, en el que se hace explícito el mandato de la CNA de llevar a cabo el estudio y monitoreo de las aguas continentales y marinas en los términos presentados por la ley.

Del total de sitios de monitoreo actual, 226 corresponden a los acuíferos principales o sobreexplotados, que se ven influenciados por cambios de calidad. Respecto al uso que se le da al agua, se ha determinado que 80% es para riego y 20% para uso doméstico e industrial, pesca, vida acuática y recreación. Por otra parte, estudios recientes muestran que las grandes urbes aportan 80% del total de contaminación.

Con el fin de establecer un marco de prioridades para atender los problemas ocasionados por la contaminación de agua generada por la industria, el Instituto Nacional de Ecología (INE) realizó en 1995 un estudio apoyado por un crédito del Banco Mundial. Combinando datos de su Sistema de Proyección de Contaminantes en la Industria con datos obtenidos durante el estudio y con las estadísticas provenientes del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) se estimaron los giros que más contribuyen a la contaminación del agua, así como la generación de residuos peligrosos, en diferentes ciudades del país.

En lo que respecta a la contaminación del agua, los giros industriales que más contribuyen comprenden:

- ❖ Fabricación y/o ensamble de equipo electrónico
- ❖ Industria automotriz
- ❖ Elaboración de productos de plástico
- ❖ Hilado, tejido y acabado de fibras blandas
- ❖ Industria de la bebida
- ❖ Imprenta y editoriales
- ❖ Otros productos metálicos
- ❖ Manufactura de celulosa y papel
- ❖ Fabricación de sustancias químicas básicas
- ❖ Industria Azucarera
- ❖ Refinación del petróleo
- ❖ Petroquímica básica
- ❖ Industria del cuero, pieles y sus productos

Existe otra clasificación referida a los giros que generan más residuos peligrosos en la cual se mencionan a la mayoría de a la mayoría de los años citados destacando los relacionados con la industria del petróleo y en no menor proporción casi toda la industria química⁴.

Cuencas Hidrológicas mas Contaminadas

En lo que respecta a la contaminación del agua se han identificado veinte cuencas hidrológicas entre las mas contaminadas, las cuatro primeras reciben el 79% de la carga orgánica: Lerma-Santiago, Pánuco, San Juan, Blanco, Culiacán, Colorado, Fuerte, Nazas, Jamapa, La Antigua, Coatzacoalcos, Sonora, Guayalejo, Yaqui, Salado, Conchos, Armería, Conhuayana, Tijuana y Bravo.

Para evaluar los posibles efectos sobre la salud, derivados de la contaminación del agua en tres de las cuencas anteriormente identificadas como las más contaminadas y establecer prioridades de acción, el INE promovió en 1994 un estudio empleando información generada de 1988 a la fecha del estudio por diferentes dependencias: Secretarías de Desarrollo Social y Salud, Comisión Nacional del Agua, Petróleos Mexicanos y la Comisión Federal de Electricidad.

La evaluación y priorización de los riesgos a la salud se llevaron a cabo de acuerdo a las siguientes consideraciones:

Caracterización de las áreas más afectadas⁵

- ❖ Identificación de los contaminantes ambientales que representan un riesgo para la población al ser sus concentraciones superiores a las normas vigentes.
- ❖ Determinación de la ingesta de contaminantes en el agua de bebida
- ❖ Estimación del exceso de cada contaminante con relación a los límites máximos permisibles, para cada sitio estudiado.
- ❖ Cálculo de la Dosis Ambiental Estimada (DAE) o dosis que un individuo normal puede absorber de un contaminante presente en el agua.
- ❖ Comparación de la DAE con las Dosis de Referencia (DRf) conocidas para cada contaminante por la vía de ingestión del agua (DRf = valor estimado de una exposición diaria durante toda la vida que no representa un riesgo apreciable de efectos adversos para la salud).

- ❖ Cálculo del Índice de Riesgo Individual de Efectos no Carcinogénicos a una Dosis Ambiental Estimada (IRIDAE). A partir del cociente DAE/DRf, se estimó el riesgo que la exposición representa para la salud humana; entre más elevado el valor obtenido, mayor la probabilidad de que ocurran efectos adversos.
- ❖ Estimación del Riesgo Individual de Padecer Cáncer (RIC), derivado de la exposición a compuestos potencialmente carcinogénicos (calculado a partir de la potencia carcinogénica de la sustancia o unidades de riesgo y la concentración de la sustancia en el agua).
- ❖ Jerarquización de las cuencas y ciudades afectadas de acuerdo con: Tamaño de la población potencialmente expuesta, Magnitud de la contaminación ambiental calculada como el cociente de la concentración de cada uno de los contaminantes encontrados y el límite permisible, el IRIDAE y, cuando fue el caso, el RIC para las poblaciones expuestas.

Datos sobre las cuencas más contaminadas del país

La cuenca del Río Coatzacoalcos se encuentra en los estados de Oaxaca y Veracruz, en ella los contaminantes mas frecuentes fueron HAP's, Pb, Hg, Mn y Fenoles. En la población del Chapo y en las ciudades de Coatzacoalcos y Minatitlán, en Veracruz, los HAP's rebasaron considerablemente la norma (33,333 veces en la primera y 16333 en las segundas). Por otra parte se considera a Coatzacoalcos como una de las cuencas de hidrocarburos más grande del mundo, con una producción superior a las cuatrocientos mil toneladas métricas por día y sujeta a un intenso tráfico de buques petroleros que movilizan mas de 5 millones de barriles diarios. Los buques arrojan al mar aproximadamente 7 millones de barriles al año por el lavado de sus tanques.

También se han detectado en otras zonas importantes niveles de concentración de hidrocarburo: El Río Tuxpan, Puerto de Veracruz, Laguna de Ostión y el Río Tonalá en el edo. de Veracruz; las lagunas El Carmen, La Machoan y Meacoacán, en Tabasco; el sistema lagunar de Términos en Campeche y la Laguna de Bojórquez en Quintana Roo.

El 50% de los sistemas costeros estudiados rebasaron el límite permisible de 10 ppb de hidrocarburos para aguas superficiales no contaminadas, establecido por la UNESCO. La Laguna de Términos es la que registra el nivel mas alto de hidrocarburos, con 48 ppb, seguida por el Río Tuxpan y La Laguna del Ostión. Las lagunas de Tabasco presentan niveles menores a la norma establecida por la UNESCO y pueden considerarse zonas no contaminadas por hidrocarburos.

Golfo de México

Respecto a los registros de hidrocarburos en mar abierto, tanto en el Golfo como el Mar Caribe, rebasan de manera significativa el valor nominativo de 10 ppb. Campeche ocupa el primer lugar en los hidrocarburos detectados en aguas superficiales, con un promedio de 48 ppb; le sigue Veracruz con 15.1 ppb y el Caribe con 15.0 ppb.

Niveles en Sedimentos

Para el caso de los niveles en sedimentos, en los 17 sitios considerados para la zona costera del Golfo de México, aproximadamente la mitad rebasa la norma establecida por la UNESCO, de 70 ppm para zonas no contaminadas. El sistema estuario del Río Tonalá ocupa el primer lugar, con un valor promedio de hidrocarburos en sedimentos de 1189 ppm; lo siguen los del Río Coatzacoalcos (680 ppm) y los de La Laguna del Ostión (120 ppm). Los datos de esta región muestran que es uno de los sitios costeros más contaminados del mundo, pues las concentraciones que presenta superan a los valores reportados en otras áreas industrializadas del planeta.

Las lagunas costeras de Mecoaacán y Términos presentan niveles altos de hidrocarburos en sedimentos de la plataforma continental, se reporta la presencia de HAP's en el área. Las concentraciones obtenidas son mayores que las reportadas para sedimentos del Golfo Pérsico y concuerdan con las reportadas para sedimentos de la costa de los Estados Unidos (Texas, Louisiana y Florida), los cuales tienen una gran afluencia e intenso tráfico de buques petroleros.

Niveles en organismos

Los estudios mas detallados son los que se emprendieron en la década anterior en la región del Río Coatzacoalcos donde se analizaron tejidos de peces, moluscos y crustáceos, provenientes de sus ríos y pantanos. Las mayores concentraciones de HAP's en intervalos que varían de 77 a 877 ppb, se detectaron en mojarra, la almeja grande, la almeja chica y el mayacaste grande, todos provenientes del estuario de Coatzacoalcos.⁵

I.2 Propiedades Físico-Químicas de los HAP's

Los HAP's son moléculas constituidas por 2 o mas anillos de benceno o ciclopentadieno fusionados y sus derivados¹. Entre sus propiedades mas importantes destaca el punto de ebullición, punto de fusión, solubilidad y peso molecular. En la tabla I.2.1 se presentan las propiedades mencionadas^{6,7}. Para los 16 HAP's que se estudian en este trabajo y en la figura I.2.1 se muestra su estructura.

TABLA I.2.1
Algunas propiedades de los HAP's estudiados en este trabajo

| Compuesto | Peso molecular | Punto de Fusión °C | Punto de ebullición °C |
|-----------------------|----------------|--------------------|------------------------|
| Naftaleno | 128 | 81 | 176.5 |
| Acenafteno | 154 | 93 | 279 |
| Acenaftileno | 152 | 93 | 280 |
| Fluoreno | 166 | 114 | 295 |
| Fenantreno | 178 | 101 | 340 |
| Antraceno | 178 | 216 | 340 |
| Fluoranteno | 202 | 111 | 375 |
| Pireno | 202 | 156 | 393 |
| Criseno | 228 | 256 | 448 |
| Benzo (a) antraceno | 228 | 162 | 435 |
| Benzo(b)fluoranteno | 228 | 168 | 481 |
| Benzo (k) fluoranteno | 252 | 217 | 480 |
| Benzo (a) pireno | 252 | 177 | 495 |
| Dibenzoantraceno | 278 | 206 | 518 |
| Benzo(ghi) perileno | 276 | 277 | 525 |
| Indeno (1,2,3) pireno | 276 | 163 | 534 |

Cabe señalar que aunque la solubilidad en agua es un parámetro muy importante, que puede servir como guía cuando se diseña un método analítico y en particular un método de preparación de muestra, en el caso de los HAP's algunos de los datos encontrados en la literatura son francamente contradictorios y por ello no se incluyen en la tabla I.2.1.

J. Reza⁸ menciona que en la mayoría de los trabajos reportados sobre la solubilidad en agua de HAP's, las determinaciones se efectúan agregando un exceso del compuesto de interés en agua y agitando mecánicamente la muestra durante períodos largos de tiempo. Sin embargo este proceso da lugar a la formación de micelas o agregados moleculares de las sustancias hidrofóbicas y si éstos no son eliminados totalmente se incurre en graves errores al determinar la solubilidad ya que se analiza una dispersión en vez de una disolución verdadera del soluto. Un método alternativo en el cual se evita el problema de formación de emulsiones es el de "la columna generadora". Este consiste en circular agua a través de una columna empacada con un soporte inerte el cual se ha impregnado previamente con el soluto de interés; este procedimiento permite generar una disolución acuosa saturada con el compuesto en estudio. En el caso de los HAP's se ha demostrado que los datos de solubilidad obtenidos por la técnica de agitación de fases pueden llegar a ser hasta 100% más grandes que los obtenidos por la técnica de la columna generadora. Esto explica en gran medida la fuerte dispersión de los datos de solubilidad en agua de HAP's que se encuentran reportados en la literatura.

En todo caso la solubilidad en agua de los 16 HAP's estudiados en este trabajo comprende un amplísimo intervalo de valores de concentración⁷; desde algunas decenas de partes por millón (mg/l) para el naftaleno hasta valores del orden de la parte por billón ($\mu\text{g/l}$) o menores para los HAP's más voluminosos. Esto refleja la enorme variabilidad de hidrofobicidad dentro del grupo, lo que implica grandes dificultades en el diseño de un método analítico que permita la determinación conjunta de los 16 compuestos.

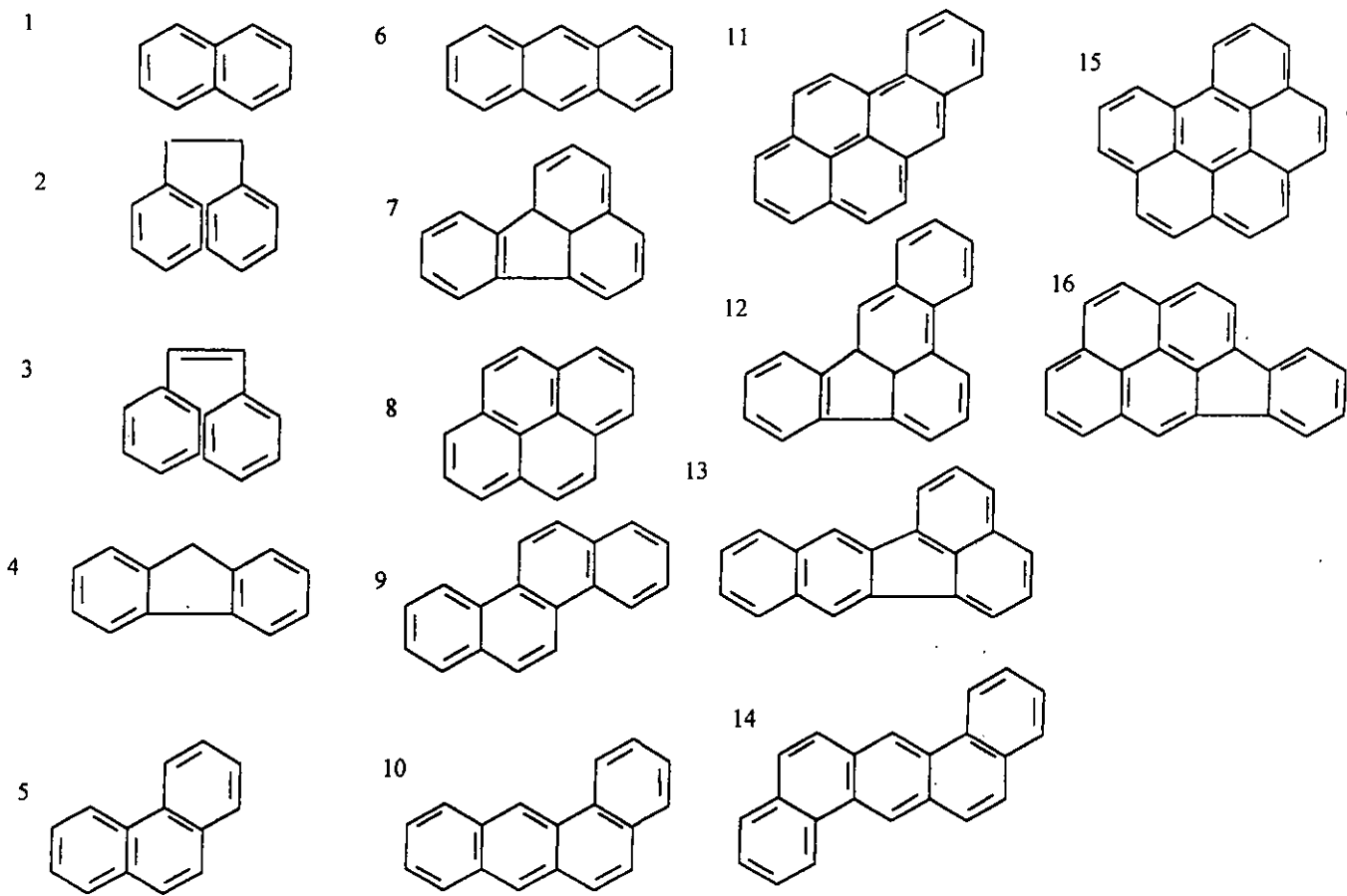


Figura 1.1.1 Fórmulas de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's): Naftaleno (1), Acenafteno (2), Acenaftileno (3), Fluoreno (4), Fenantreno (5), Antraceno (6), Fluoranteno (7), Pireno (8), Benzo(a)antraceno (9), Criseno (10), Benzo(b)fluoranteno (11), Benzo(k)fluoranteno (12), Benzo(a)pireno (13), Dibenzoantraceno (14), Benzo(ghi)perileno (15) e Indeno (1,2,3)pireno.

I.3 Métodos de Pretratamiento de Muestra.

A. Criterios para la preparación de la muestra

La preparación de la muestra es una etapa decisiva en todo método de análisis en especial en la determinación de microcomponentes y en los casos donde la matriz que rodea al analito es muy compleja. La selección mas apropiada depende de muchos factores como son^{9,10,11}:

- **Propiedades físicas y químicas del analito**

El conocimiento de algunas de las características fisico-químicas del analito como la estructura química, el peso molecular, la solubilidad, las propiedades ácido-base (pKa) y la respuesta frente al tipo de detector seleccionado es de gran ayuda para el diseño de una apropiada preparación de muestra. Por ejemplo, muchos analitos tienen una pobre respuesta frente a los detectores de uso común en cromatografía de líquidos como el UV y de fluorescencia, en estos casos es donde se dice que realmente existen problemas de detección y se hace necesario la introducción de una etapa de derivatización ya sea pre o postcolumna

- **Concentración del analito en la muestra**

Este factor es de vital importancia. Para analitos en altas concentraciones en general se requieren preparaciones de muestras sencillas como la solubilización y filtración. Analitos en bajas concentraciones requieren de metodologías mas elaboradas como extracción líquido-líquido, con fluidos supercríticos, extracción en fase sólida, etc. Logrando con esto una concentración detectable y/o cuantificable.

- **Naturaleza de la matriz de la muestra**

La remoción de los componentes de la matriz puede ser un paso crítico en los casos donde el analito en la muestra se detecta con dificultad o no se detecta, cuando existen impurezas que interfieren con el pico del analito de interés, o cuando las sustancias presentes pueden dañar irreversiblemente a los instrumentos o las columnas cromatográficas.

- **Forma en la que se presenta el analito en la muestra**

Se refiere a si presenta alguna afinidad específica por la matriz muestral como lo son las muestras biológicas o ciertas características de polaridad muy peculiares en determinadas matrices (analitos hidrofóbicos en medios acuosos).

- **Compatibilidad de los medios de solubilización y extracción con el sistema cromatográfico**

En cromatografía de líquidos de alta resolución se requiere que la solución a inyectar sea compatible y miscible con la fase móvil. Es recomendable que el solvente de disolución de la muestra sea la misma fase móvil o, en su defecto, un solvente débil (por ejemplo agua en fase reversa).

Un caso típico es la extracción líquido-líquido del analito desde un medio acuoso hasta un medio orgánico ya sea por sus características no polares propias o adquiridas por alguna modificación del medio. En estos casos la muestra final se encuentra disuelta en un solvente lipofílico (cloroformo, hexano, éter) por lo cual no resulta conveniente inyectarla en un sistema convencional de fase reversa que contiene mezclas de solventes orgánicos con agua como la fase móvil. Una solución consiste en evaporar el solvente a sequedad (desventaja en el % de recuperación de analito) y disolver el residuo en la fase móvil o inyectar en fase normal la solución resultante.

- **Tipo y compatibilidad del Detector**

La sensibilidad y selectividad del detector juegan un importante papel en la preparación de muestra, ya que dependiendo de ellos será el grado de preconcentración y limpieza que requerirá la muestra y por lo tanto la mayor o menor dificultad en su preparación. Por otra parte, buenos solventes como el tolueno y la acetona no pueden constituir el medio en que se encuentra disuelta la muestra final cuando se utiliza un detector UV, debido a la fuerte señal que registran estos solventes en prácticamente todo el intervalo de longitudes de onda de la región UV. Aún cuando el pico de solvente eluya al inicio del cromatograma, la intensa señal puede opacar a los picos de analitos poco retenidos.

Uno de los casos mas favorables desde el punto de vista analítico es cuando los compuestos de interés presentan propiedades fluorescentes. En efecto el detector de fluorescencia es uno de los mas sensibles y selectivos en cromatografía de líquidos. De hecho, la mayoría de los hidrocarburos aromáticos policíclicos puede ser detectada por fluorescencia con gran especificidad si se cuenta con detector con monocromadores en excitación y emisión.

B. Metodología para la extracción en fase sólida (EFS)

La metodología está constituida por: lavado y activación de la columna, aplicación de la muestra, lavado de la columna previo a la elución de la muestra y la propia elución del analito en si.

- **Lavado y activación de la columna.**

Esta etapa tiene por objeto eliminar sustancias residuales de operaciones previas, solvatar los grupos funcionales del adsorbente empleado para la extracción y ponerlo en contacto con un medio adecuado (solvente débil) para una máxima interacción subsecuente con los solutos de interés. Los analitos no pueden interactuar con el adsorbente si sus grupos no se encuentran suficientemente activados. Por ejemplo, en fase reversa cuando se utilizan fases estacionarias monoméricas C₈ o C₁₈, las cadenas alquílicas deben "estirarse" para lograr la interacción.¹²

En el caso de muestras acuosas, la EFS generalmente se lleva a cabo en el modo de fase reversa. La etapa de lavado y activación suele realizarse percolando, aproximadamente, dos volúmenes de columna de un solvente orgánico polar (metanol, acetonitrilo, THF, etc.) y luego dos volúmenes de columna de agua. En el primer paso se eliminan los residuos de muestras anteriores que quedaron retenidos en la columna y también se asegura la solvatación (o recubrimiento) de la fase estacionaria apolar con el disolvente orgánico. En el segundo paso la columna se equilibra con un solvente igual o similar al que constituye el medio de disolución de las muestras

- **Aplicación de la muestra**

La muestra se aplica en la columna utilizando un flujo apropiado que dependerá de la cinética de adsorción del material de relleno.

Cuando el flujo es demasiado rápido para la columna en cuestión, el frente de migración de los solutos se ensancha excesivamente y la fuga de estos ocurre rápidamente¹³. En estas condiciones, el volumen de muestra que puede percolarse a través de la columna será muy pequeño si se busca una recuperación cuantitativa de los analitos; esto significa que sólo podrá lograrse un grado de preconcentración muy bajo de la muestra durante la EFS. Alternativamente, es posible percolar volúmenes mayores de muestra y obtener un mayor grado de preconcentración de los analitos pero su recuperación será baja.

Si las columnas de EFS se empaquetan con las fases estacionarias utilizadas en cromatografía de líquidos (partículas pequeñas de diámetros similares y baja resistencia a la transferencia de masa), la cinética de adsorción-desorción será rápida y en las condiciones usuales (flujos hasta aprox. 5ml/min) no se observarán efectos de la velocidad de flujo sobre el volumen de fuga de los analitos o su % de recuperación

Dependiendo de los fines de la EFS, el procedimiento a seguir durante la aplicación de la muestra será diferente:

Cuando solo se requiere limpieza de la muestra y no preconcentración de los analitos.

En este caso, una alícuota pequeña de la solución que constituye la muestra se hace pasar a través de la columna de EFS y el eluato obtenido se recupera para su posterior análisis, finalizando aquí la preparación de la muestra.

Evidentemente el empaque de la columna y el solvente en que se encuentra disuelta la muestra deberán ser seleccionados cuidadosamente para lograr que los compuestos indeseables o impurezas queden retenidos y que el analito no presente ninguna afinidad por el adsorbente de la columna de EFS.

Cuando se requiere preconcentrar los analitos y eventualmente eliminar compuestos de la matriz e interferencias.

Aquí, un volumen relativamente grande de la muestra se hace pasar por la columna. El eluato obtenido en esta etapa se descarta. La preparación de muestra continúa con las etapas de lavado y elución.

En este caso el soluto debe presentar una gran afinidad por el empaque de la columna. El solvente de la muestra debe ser suficientemente débil para permitir la interacción soluto-adsorbente. Algunos compuestos presentes en la muestra que no tienen afinidad por el adsorbente son eliminados durante esta etapa, lográndose una limpieza parcial de la muestra.

Por ejemplo en la EFS de muestras acuosas en fase reversa, las sales inorgánicas y algunos compuestos orgánicos muy polares o iónicos son eliminados durante la etapa de aplicación de la muestra

- **Lavado de la columna previo a la elución de la muestra**

En esta etapa, un solvente de fuerza ligeramente superior a la del solvente en que originalmente se encontraba la muestra se hace pasar por la columna de EFS en la cual se encuentran retenidos los analitos. Este solvente tiene por función eluir algunas (de preferencia la mayor parte posible) de las impurezas que quedaron retenidas en la columna durante la fase de aplicación de la muestra, pero sin eluir a los analitos de interés. Por lo tanto el volumen y la fuerza del disolvente de lavado deben ser ajustados cuidadosamente.

En la EFS de fase reversa es común utilizar como disolvente de lavado una solución acuosa de pH diferente al de la muestra original con una pequeña proporción de metanol o acetonitrilo. Obviamente el pH del disolvente de lavado no debe provocar la ionización de los analitos de interés.

- **Elución del analito**

Finalmente, el analito se eluye de la columna de extracción con un pequeño volumen de un disolvente de fuerza apropiada. El disolvente a utilizar debe ser suficientemente fuerte para lograr la elución completa de los analitos con un volumen lo mas pequeño posible; de esta manera se logran altos factores de concentración de la muestra. Sin embargo, también es deseable que el disolvente no sea tan fuerte para evitar que eluyan impurezas fuertemente retenidas en la columna; así, durante esta etapa se puede contribuir también a la limpieza de la muestra.

En el caso de la modalidad "en línea" de la EFS, esta última etapa no se lleva a cabo. El extracto de la muestra, preconcentrado y purificado en la columna de EFS es transferido directamente hacia la columna analítica de un cromatógrafo de líquidos para su separación y determinación¹

C. Adsorbentes utilizados en columnas de EFS

La extracción en fase sólida se puede llevar a cabo en discos o filtros recubiertos de una delgada capa adsorbente (discos Empore) en cartuchos plásticos o en pequeñas columnas de acero inoxidable (precolumnas) empacadas con el adsorbente o en una jeringa cuya aguja tiene la punta recubierta por una microfibras de material adsorbente (microextracción en fase sólida).

Los adsorbentes utilizados en los cartuchos, discos y precolumnas son en esencia idénticos y solo difieren en cuanto a su granulometría. Para los dos primeros, el diámetro de partícula del adsorbente es típicamente de 40 μm , lo que permite percolar la muestra por succión de vacío o, en el caso de los cartuchos, por la presión ejercida mediante el émbolo de una jeringa que se adapta al cartucho.

El empaque de las precolumnas es básicamente el mismo que se utiliza para las columnas analíticas de Cromatografía Líquida, es decir, granulometría muy pequeña ($\leq 10 \mu\text{m}$) y con una estrecha distribución de tamaños de partícula. En este caso la muestra es percolada a través de la precolumna por medio de una bomba.

En cuanto a la naturaleza del adsorbente, esta puede ser muy diversa y comprende materiales orgánicos e inorgánicos, desde los muy polares, como la sílica, hasta los muy apolares como el carbón grafitizado. En la tabla I.3.1 se muestran algunos de los empaques más utilizados en EFS y en la tabla I.3.2 se presentan condiciones experimentales típicas para la preparación de muestra. Existen además otros adsorbentes menos difundidos a nivel analítico pero de gran aplicación a nivel industrial como las resinas Amberlite XAD-2, XAD-4 y XAD-7, cuyo uso en EFS ha sido reportado en la literatura^{11,13}.

En general la capacidad de retención de solutos de una columna de extracción en fase sólida depende del tipo de material de relleno, del tamaño de la columna, del tipo de analito y las condiciones de extracción. El conocimiento exacto de esta capacidad no resulta de vital importancia si se asume que estas columnas se utilizan para concentrar compuestos al nivel de trazas.

La extracción en fase sólida tiene lugar mediante mecanismos sorción-desorción de los analitos en la superficie activa del adsorbente. Las fuerzas de interacción entre el soluto y el adsorbente son de naturaleza diversa dependiendo de la estructura y propiedades de ambas entidades.

En fase normal (sílice, diol, CN) predominan las fuerzas electrostáticas clásicas y la formación de puentes de hidrógeno; en fase reversa (C_8 , C_{18} y copolímero estireno-DVB) el fenómeno fundamental es la hidrofobicidad del analito y del adsorbente por lo que el área hidrocarbonada de ambos jugará un papel determinante en la retención; en intercambio iónico (sílices y resinas intercambiadoras) la interacción se da por atracción eléctrica, siendo la densidad de carga del soluto iónico solvatado y la capacidad de intercambio del adsorbente los factores que determinan el grado de retención.

Al igual que en Cromatografía de Líquidos, la fase reversa es la modalidad más utilizada en EFS. El mecanismo de retención de los solutos en esta técnica es explicado con base en la teoría solvofóbica que establece que la interacción entre moléculas de soluto y solvente es mucho más débil que la interacción de las moléculas de solvente entre sí. Como consecuencia, el soluto es expulsado de la fase móvil y forzado a penetrar en la fase estacionaria que actúa como un receptor pasivo. Así, la retención del analito será mayor cuanto más grande sea el área hidrocarbonada de su molécula y por lo tanto la superficie de contacto con la fase estacionaria apolar. Por el contrario, las funciones polares del soluto favorecerán la interacción con los solventes polares que constituyen la fase móvil y reducirán la retención. En el caso de las fases reversas químicamente ligadas, se ha reportado¹⁴ que la retención del soluto aumenta al aumentar la longitud de la cadena de la fase estacionaria hasta un cierto punto, denominado longitud de cadena crítica, después del cual la retención permanece constante. Entre más grande es la molécula del soluto mayor deberá ser la longitud de la cadena hidrocarbonada de la fase estacionaria para maximizar la superficie de contacto; es decir, mayor será la longitud de cadena crítica.

En un estudio comparativo realizado por Liu et al.¹⁵ con diferentes fases ligadas se observó que la fase polimérica C_{18} mostraba la más alta selectividad para la separación de los HAP's, debido no sólo a su alto contenido de carbono sino también a una mayor superficie de contacto con los HAP's de peso molecular más alto. Las fases C_8 , fenilo y la fase monomérica C_{18} mostraron menores diferencias entre los coeficientes de distribución de los HAP's. En la tabla I.3.3 se mencionan algunas propiedades de las fases químicamente unidas estudiadas por estos investigadores y en la tabla I.3.4 se reportan los valores del coeficiente de selectividad que obtuvieron con estas fases para algunos HAP's.

TABLA I.3.1. Adsorbentes de uso común para extracción en fase sólida

| Adsorbentes | Características |
|--|---------------------------------|
| Diamino** $-\text{CH}_2 \text{CH}(\text{NH}_2) \text{CH}_2\text{NH}_2$ | Intercambiador aniónico débil |
| Amonio cuaternario** $\text{RN}^+ \text{R}_3 \text{Cl}^-$ | Intercambiador aniónico fuerte |
| Acido carboxílico ** RCOOH | Intercambiador catiónico débil |
| Acido sulfónico* * RSO_3H | Intercambiador catiónico fuerte |
| Alúmina | Sorbente polar |
| Silicagel | Sorbente polar |
| Ciano* $-(\text{CH}_2)_3 \text{CN}$ | Sorbente de polaridad media |
| Amino* $-(\text{CH}_2)_3 \text{NH}_2$ | Sorbente de polaridad media |
| Fenilo* $-\text{C}_6\text{H}_5$ | Sorbente no polar |
| Octilo* $-\text{C}_8\text{H}_{17}$ | Sorbente no polar |
| Copolímero estireno -divinilbenceno | Sorbente no polar |

*fases ligadas a un soporte de sílica

** fases ligadas a un soporte de sílica o copolímeros estireno-DVB funcionalizados

TABLA I.3.2 Sistemas típicos para preparación de muestra

| Material de relleno | Tipo de analitos | Naturaleza de la matriz | Activación de la columna | Solvente de elución |
|--------------------------------------|--|--|------------------------------|---|
| C ₁₈ /C ₈ | Moléculas neutras no polares | Acuosa | Metanol (1) Agua (2) | Metanol, Acetonitrilo o sus mezclas con agua o buffers de pH adecuado |
| Silice, Diol CN | Sustancias polares | Solución en solventes no polares y aceites | Cloroformo (1) Hexano (2) | Solventes orgánicos de Polaridad media o alta |
| Aniónico | Aniones Carboxilatos/sulfonatos | Soluciones acuosas de baja fuerza iónica | Metanol (1) Buffer (2) | Buffer de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con metanol o acetonitrilo. |
| Catiónico | Cationes aminas | Soluciones acuosas de baja fuerza iónica | Metanol (1) Buffer (2) | Buffer de alta fuerza iónica y pH adecuado. Sólo o en mezclas con metanol o acetonitrilo. |
| Copolímeros Estireno-DVB PRP, PLRP-S | Moléculas neutras Medianamente polares | Acuosa | Metanol (1) Agua (2) | Metanol, Acetonitrilo o sus mezclas con agua o buffers de pH adecuado |

TABLA I.3.3 Propiedades físicas de fases reversas químicamente unidas

| Tipo de fase | Peso molecular | Carga de carbón (%) |
|----------------------------|----------------|---------------------|
| C ₈ | 171 | 6.12 |
| Fenil | 163 | 4.46 |
| Monomérica C ₁₈ | 311 | 10.38 |
| Polímerica C ₁₈ | 315 | 18.18 |

Tabla I.3.4 Selectividades de fases ligadas para HAP's

| selectividad | Fase estacionaria | | | |
|--------------|-------------------|-------|----------------------|----------------------|
| | C ₈ | fenil | Mono-C ₁₈ | poly-C ₁₈ |
| α2/1 | 25.0 | 7.8 | 16.6 | 4.0 |
| α3/1 | 25.1 | 12.2 | 18.8 | 54.3 |
| α4/1 | 29.4 | 18.0 | 20.0 | 70.6 |

Compuestos utilizados: (1) tolueno, (2) naftaleno, (3) antraceno y (4) 9-etil y y fenantreno.

Por otra parte, las fases reversas constituidas por un copolímero de estireno-divinilbenceno (DVB) y comercializadas bajo los nombres PRP (Hamilton), PLRP-S (Polymer Labs) y MCI-gel (Mitsubishi) presentan algunas ventajas con respecto a las fases químicamente ligadas, las mas importantes son:

- 1) **Estables en todo el intervalo del pH.** Esto amplía su aplicabilidad en EFS ya que permite trabajar en medios alcalinos para suprimir la ionización y extraer solutos que en medios ácidos o neutros se encuentren ionizados (p. ej. algunas aminas). Por el contrario, las fases químicamente ligadas, cuyo soporte es la sílice, son atacadas en medios alcalinos.
- 2) **Mayor poder de retención que las fases ligadas debido a la mayor área hidrocarbonada.** Esta característica permite utilizar los copolímeros de estireno-DVB para extraer y concentrar no sólo compuestos apolares sino también compuestos de polaridad media y alta (p. Ej. fenoles, anilinas etc.), que no alcanzan a ser suficientemente retenidos en las fases ligadas .

Por el contrario , las principales desventajas de los copolímeros estireno-DVB son:

- 1) Menor resistencia a la presión.
- 2) Cambios de hinchamiento al cambiar el disolvente en contacto con la fase. Esto se presenta en particular con los copolímeros de bajo grado de entrecruzamiento (p. ej. MCI-gel).
- 3) Mayor resistencia a la transferencia de masa debido a la red polimérica.
- 4) Menor selectividad, debido precisamente a su alto poder de retención.

Considerando lo anterior, en el caso de los compuestos poco polares en matrices complejas (como los HAP's en aguas ambientales) es mas conveniente realizar la EFS con fases reversas ligadas, aunque debe tenerse en mente que el grado de preconcentración que puede alcanzarse es menor que con los copolímeros.

D. Extracción en fase sólida en línea

La principal diferencia entre la extracción en fase sólida fuera de línea y la extracción en fase sólida en línea se presenta como ya se ha mencionado en la etapa de elución. En la EFS fuera de línea, un solvente de fuerza suficiente es percolado a través del cartucho para lograr la elución de los analitos con el mínimo volumen posible; en la operación mas simple, una alícuota del eluato obtenido es inyectada al cromatógrafo de gases o de líquidos para la separación y análisis de los compuestos de interés. Sin embargo, en muchas ocasiones el eluato es parcialmente evaporado, para lograr un mayor factor de preconcentración, o bién es evaporado a sequedad y reconstituido en un disolvente compatible con el sistema de análisis.

En los sistemas de EFS en línea la columna de extracción se encuentra montada entre dos puertos de una válvula de conmutación. A su vez esta última se inserta entre el inyector y la columna analítica de un cromatógrafo de líquidos. Las primeras etapas de la EFS (activación de la columna, aplicación de la muestra y lavado) se realizan por medio de una bomba isocrática auxiliar, manteniendo la válvula de conmutación en una cierta posición. Posteriormente, la válvula se rota, lo que provoca que la columna de EFS quede en línea con el sistema de cromatografía de líquidos, y los analitos son eluidos y transferidos hacia la columna analítica por el paso de la fase móvil proporcionada por las bombas del cromatógrafo. De esta manera, todo el extracto es analizado dando como resultado una mayor sensibilidad en el análisis. Evidentemente en los sistemas en línea la columna de EFS debe cumplir ciertas condiciones¹⁶⁻²⁰.

1° Tanto el material de empaque como el material de la columna misma deben resistir altas presiones.

2° La columna debe ser de pequeñas dimensiones y el empaque de granulometría muy fina ($\leq 10 \mu\text{m}$ de diámetro de partícula) para no generar un excesivo ensanchamiento de las bandas de los solutos.

Usualmente se emplean para la EFS en línea las llamadas precolumnas o guardacolumnas que son de acero inoxidable y pequeñas dimensiones (1-3 cm de longitud x 1-2 mm de diámetro interno). Como adsorbente se utiliza un empaque lo mas parecido posible al que constituye la fase estacionaria de la columna analítica, tanto en lo que se refiere a su naturaleza como a su diámetro de partícula. En estas condiciones, el ensanchamiento de banda provocado por el acoplamiento de la columna de EFS a la columna analítica es despreciable. Cabe mencionar que cuando se acoplan en línea fases reversas con muy diferente poder de retención, p. ej. una columna EFS de copolímero con una columna analítica C_8 o C_{18} , se produce un ensanchamiento relativamente importante de los picos de los solutos, especialmente los menos polares y más hidrofóbicos. Este efecto es menos marcado si la fase móvil contiene acetonitrilo (en vez de metanol) y si se trabaja por gradiente de elución^{21,22}.

Una desventaja de la EFS en línea es que, dadas las pequeñas dimensiones de la columna, los volúmenes que pueden percolarse sin que se fuguen los analitos son menores que en EFS fuera de línea. En efecto, la cantidad de adsorbente en las precolumnas es del orden de aprox. 40 mg, mientras que los cartuchos comerciales para EFS fuera de línea contienen usualmente 100 mg, 500 mg o hasta 1 g de adsorbente. Sin embargo, esta diferencia de capacidad de muestra llega a compensarse porque en el sistema en línea todo el extracto es analizado.

El desarrollo de un método analítico que incluya una EFS en línea es generalmente más complicado que cuando se trabaja con sistemas fuera de línea, por todos los detalles que hay que optimizar cuidadosamente (montajes, manipulación de válvulas, compatibilidad de fases, etc.) Sin embargo, una vez establecido el método se obtienen ventajas muy interesantes como^{1,11,20}:

- Mayor rapidez de análisis
- Menor manipulación de muestra
- Mayor precisión y exactitud
- Mínimo consumo de solventes
- Menores costos
- Posibilidad de automatización para análisis de rutina

I.4 Métodos de Determinación de Compuestos Aromáticos Policíclicos en Agua

La bibliografía referente a los métodos de determinación de HAP's en agua es sumamente extensa. Por ello, nos limitaremos a mencionar algunas características de los métodos analíticos más interesantes reportados en los últimos 10 años y que utilizan la EFS en línea o fuera de línea como método de preparación de muestra (Tabla I.4.1).

TABLA I.4.1 Métodos de determinación de HAP's en matrices acuosas con preparación de muestra por EFS

| Compuesto | Muestra (método) | R (%) | DER (%) | LDM (ng/l) | Referencia |
|-----------|------------------------------------|--------|---------|------------|---|
| 10 HAP's | Agua g. Reactivo (EFS en línea) | 75-113 | 2-8 | 4-1200 | Vera y Covarrubias 1993 ²⁰ |
| 16 HAP's | Agua superficial (EFS en línea) | 90-100 | 1-8.5 | 0.6-150 | Brouwer et al. 1994 ²³ |
| 13 HAP's | Agua g. Reactivo (EFS en línea) | 75-104 | 3-16 | 30-130 | Lai y White 1995 ²⁴ |
| 23 HAP's | Agua natural (EFS diferido) | 28-131 | 2-49 | 9-56 | Michor et al. 1996 ²³ |
| 16 HAP's | Agua de lluvia (EFS en línea) | 10-98 | 3-32 | 0.1-36 | Kiss et al. 1996 ²⁶ |
| 16 HAP's | Agua g. Reactivo (MEFS en línea) | 30-85 | 9-32 | 10-4440 | Santos et al. 1996 ²⁷ |
| 16 HAP's | Agua superficial (EFS en línea) | 39-70 | 1-6 | 0.3-12 | Bouzige et al. 1998 ²⁸ |
| 6 HAP's | Agua de desecho (MEFS en línea) | 76-104 | 4-29 | 1000-5000 | Negrao y Alpendurada 1998 ²⁹ |
| 29 HAP's | Agua de nieve (EFS diferido) | 80-100 | 3-20 | 1.4-35 | Carrera et al. 1998 ³⁰ |
| 16 HAP's | Agua de río (MEFS en línea) | 69-105 | 3-24 | 90-500 | Ruey et al. 2000 ³¹ |

R: recuperación

DER: desviación estándar relativa

LDM: límite de detección

MEFS: microextracción en fase sólida

II. DESARROLLO EXPERIMENTAL

II.1 Equipo y Accesorios

A. Equipo

- Cromatógrafo de líquidos Varian, modelo 5000, con capacidad para gradiente de elución binaria.
- Detector Ultravioleta-Visible de longitud de onda variable Thermo Separations modelo 3200.
- Detector de Fluorescencia Gilson 121 con Filtro de excitación de 305-395 nm y Filtro de emisión de 430-470 nm.
- Dos integradores-graficadores Hewelett-Packard modelo 3396.
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOpure, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Sistema de ultrasonido para desgasificar las fases móviles, Sonicor modelo SC-100.
- Bomba isocrática Beckman modelo 110B.
- Balanza analítica Ohaus.
- Sistema de empaqueo de columnas y precolumnas de alta presión, Haskel modelo 29426.

B. Accesorios

- Válvula de conmutación de 6 puertos, Rheodyne 7000.
- Columnas analíticas Envirosep-pp de Phenomenex, 125 x 3.2 mm D.I. y 125 x 4.6 mm. D.I., empaçadas con fase reversa de 5 μ m, especialmente diseñada para separación de hidrocarburos poliaromáticos.
- Jeringa, Hamilton de 100 μ l
- Precolumna de acero inoxidable de 20 x 2 mm D.I., (Upchurch scientific, modelo c-130B) empaçada en el laboratorio con fase reversa Spherisorb ODS-2, 5 μ m, de Phase Separations.
- Sistema de filtración de vidrio, Millipore modelo 0M 027.

- Micropipetas de volumen variable, Scorex, modelo 811/821 de 5-50 μl , 50-200 μl y 200-1000 μl .
- Inyector Rheodyne 7125 con rizo de 20 μl (nominal).
- Membranas de filtración de nylon 66 de 47 mm de diámetro, con poro de 0.45 μm , Phenomenex AFO-0504.
- Material de vidrio diverso (vasos de precipitados, pipetas, matraces, etc.).

C. Empacado de la precolumna

Dada la gran hidrofobicidad de los hidrocarburos aromáticos polinucleares se consideró que la capacidad de retención de las fases químicamente enlazadas C-18 era suficiente para realizar en ellas la extracción y preconcentración de los analitos a partir de muestras acuosas.

Se utilizó una precolumna comercial vacía de acero inoxidable de 20 x 2 mm D.I., cuyas pequeñas dimensiones permiten asegurar que la contribución al ensanchamiento de banda por introducción de la precolumna en el sistema cromatográfico será mínima. La fase de empaque fue una fase reversa Spherisorb ODS-2 de 5 μm ; esta fase es similar en naturaleza (fase químicamente enlazada a un soporte de sílice) y tamaño de partícula a la fase estacionaria de la columna analítica, por lo que no se espera una deformación de los picos por la transferencia de una fase a la otra.

El empaque se realizó con un sistema de bombeo Haskel (bomba a presión constante) especialmente diseñado para este objeto. Se preparó una suspensión de aproximadamente 30 mg de fase C-18 en una mezcla Tetracloruro de carbono-etanol, 50:50(v/v), sometiéndola a ultrasonido para dispersar bien las partículas. La precolumna vacía, con uno de sus extremos tapado, se llenó con la misma mezcla de disolventes se conectó al reservorio para la suspensión e inmediatamente este último se llenó hasta el borde con la suspensión y se conectó al resto del sistema previamente presurizado a 3000 psi. Rápidamente la válvula de paso del sistema se abrió de golpe al mismo tiempo que se destapaba el extremo de la precolumna. Esta operación provoca la proyección a alta presión y velocidad de las partículas del empaque desde el reservorio hasta la precolumna, lográndose un empaque compacto y homogéneo. El flujo de disolvente (etanol) a presión se mantuvo por 5 minutos, luego se detuvo la bomba y, cuando el sistema se despresurizó totalmente, se retiró la precolumna, se niveló con una navaja el empaque en el borde superior y finalmente se le colocó el filtro de acero poroso y el conector.

La precolumna ya empacada se lavó y activó haciendo circular a través de ella 40 ml de mezcla metanol-agua 50:50 (v/v) y 50 ml de agua pura. Después de este tratamiento la precolumna queda lista para ser usada en los experimentos de preconcentración.

D. Calibración del rizo del inyector

Para efectuar el cálculo de recuperación de los analitos en las muestras de agua dopadas y tratadas por EFS, es necesario comparar el área de los picos obtenidos al eluir y analizar los solutos adsorbidos en la precolumna con el área de los picos obtenidos por inyección directa de una cantidad conocida de estándares de los mismos compuestos, analizados bajo las mismas condiciones. Esto significa que es necesario conocer el volumen exacto del rizo del inyector.

La calibración del rizo se realizó in situ manteniendo condiciones análogas a las de una inyección típica. Se empleó una disolución de HClO_4 5.36 M previamente valorado con una disolución estandarizada de NaOH 0.1 M. El inyector se cargó con un exceso de disolución del ácido para asegurar el llenado del rizo; posteriormente, se rotó la válvula y se desalojó el ácido mediante un flujo de agua pura proporcionada por la bomba del cromatógrafo. El efluente se recogió en un matraz Erlenmeyer y se tituló con la disolución de sosa antes mencionada. El volumen real del rizo se determinó a partir del volumen consumido de titulante para alcanzar el punto de equivalencia.

La valoración se repitió 3 veces obteniéndose un volumen promedio del rizo de 24.7 μl con una desviación standard de 0.1 μl .

II.2 Disolventes, Reactivos y Disoluciones

A. Disolventes y reactivos

- Acetonitrilo grado HPLC, Prolabo Francia.
- Agua grado reactivo, Tipo I. Obtenida del sistema purificador NANOpure.
- Acido Perclórico reactivo analítico, 70-72%, Aldrich Chemical Co.
- Hidróxido de Sodio. en lentejas, grado reactivo, J.T. Baker.
- Fases móviles
 - Fase móvil A (débil) : acetonitrilo-agua 10:90 (v/v).
 - Fase móvil B (fuerte) : acetonitrilo.

- Hidrocarburos aromáticos polinucleares (HAP's):

Naftaleno, Acenafteno, Acenaftileno, Fenantreno, Fluoreno, Pireno, Antraceno, Fluoranteno, Criseno, Benzo(b)fluoranteno, Benzo(a)antraceno, Indeno(1,2,3)pireno, Benzo(k)fluoranteno, Benzo(ghi)perileno, 1,2:5,6-Dibenzoantraceno y Benzo(a)pireno.

Estos reactivos fueron obtenidos de Chem Service Co. con grado de pureza certificado $\geq 97\%$, excepto para el acenaftileno.*

B. Preparación de soluciones Estandar de HAP's.

Se prepararon soluciones stock individuales de los 16 HAP's en acetonitrilo con las concentraciones indicadas en la Tabla II.2.1. En el caso del acenaftileno, la concentración reportada en la Tabla toma en cuenta que solo 89% de la cantidad pesada corresponde a este soluto.

TABLA II.2.1 Disoluciones stock de HAP's.

| Nombre del Analito | Concentración |
|--------------------------|---------------|
| Fluoranteno | 140 ppm |
| Antraceno | 116 ppm |
| Fenantreno | 104 ppm |
| Fluoreno | 128 ppm |
| Naftaleno | 116 ppm |
| Criseno | 104 ppm |
| Pireno | 136 ppm |
| Benzo(b)fluoranteno | 200 ppm |
| Benzoantraceno | 104 ppm |
| Acenaftileno* | 131.7 ppm |
| Indeno (1,2,3)pireno | 128 ppm |
| Acenafteno | 196 ppm |
| Benzo(k)fluoranteno | 104 ppm |
| Benzo(ghi)perileno | 108 ppm |
| 1,2:5,6-Dibenzoantraceno | 164 ppm |
| Benzo(a)pireno | 108 ppm |

* En este reactivo el proveedor especifica la siguiente composición: 89% acenaftileno y 11% acenafteno.

Posteriormente, se prepararon disoluciones diluidas individuales de cada soluto y mediante algunas pruebas preliminares se determinó cuáles de los hidrocarburos podían ser detectados por Fluorescencia y cuáles tendrían que ser detectados por UV. Para estos últimos se hicieron ensayos utilizando un detector UV y se observó que todos ellos presentan una buena absorbancia alrededor de 262 nm por lo que se decidió fijar esta longitud de onda para el trabajo posterior.

Asimismo, se compararon entre sí las respuestas de los solutos a determinar en cada detector con el fin de preparar mezclas stock tal que, al inyectar un estándar diluido preparado a partir de ellas, diera como resultado picos del mismo orden de tamaño en el cromatograma del detector considerado.

Las mezclas stock se prepararon a partir de las disoluciones stock individuales tomando alícuotas adecuadas de cada soluto y aforando a 25 ml con acetonitrilo. A manera de ilustración en la tabla II.2.2 se presentan las concentraciones de los compuestos en una de las mezclas stock. La concentración de acenafteno se calculó considerando la alícuota tomada de la disolución de acenafteno y la cantidad de este soluto contenida en la alícuota tomada de la disolución acenaftileno.

En la Tabla II.2.2 también se indica el detector que se utilizó para la determinación de cada soluto en este trabajo. Cabe mencionar que el pireno puede ser detectado por UV o Fluorescencia, sin embargo se seleccionó el primer modo de detección por presentar menos interferencias para la integración del pico. En efecto, el fluoranteno que eluye inmediatamente antes que el pireno da una respuesta comparativamente muy grande en fluorescencia, mientras que a 262 nm en UV su respuesta es mínima. También es interesante mencionar el par constituido por criseno y 1,2-benzoantraceno; para una concentración dada, el criseno da una buena respuesta en UV y ninguna respuesta en fluorescencia, por el contrario, el benzoantraceno da una respuesta adecuada en fluorescencia pero su respuesta en UV es mucho menor que la del criseno. Este hecho es afortunado ya que estos solutos son uno de los pares más difíciles de separar en el grupo de los 16 HAP's.

II.3 Condiciones Cromatográficas

Utilizando los estándares de trabajo se hicieron diversos ensayos variando el flujo de la fase móvil, la forma del gradiente binario acetonitrilo-agua y la sensibilidad de los detectores para optimizar la separación cromatográfica y establecer las condiciones de detección según el nivel de concentración de los solutos.

Para la separación cromatográfica se tomó en cuenta que, en el análisis de muestras reales preconcentradas, es común la elución de un gran " pico de matriz " al inicio del cromatograma. Para que este pico interfiera lo menos posible en la cuantificación de los analitos es necesario que el primer pico de interés eluya por lo menos a los 10 minutos. Por otra parte, la separación fue puesta a punto con la precolumna de concentración acoplada en línea a la columna analítica para estar en condiciones idénticas a las del análisis de las muestras.

Las condiciones cromatográficas finalmente establecidas fueron las siguientes:

- Columna analítica Envirosep de Phenomenex, 125 x 3.2 mm D.I., empacada con fase reversa (patente del fabricante) de 5 μ m.
- Precolumna de acero inoxidable 20 x 2 mm D.I. empacada con fase reversa Spherisorb ODS-2, 5 μ m, de Phase Separations.
- Gradiente binario de fase móvil
Fase A : acetonitrilo-agua 10:90 (v/v)
Fase B : acetonitrilo

| Tiempo (minutos) | % B |
|------------------|-----|
| 0 | 25 |
| 8 | 25 |
| 10 | 50 |
| 14 | 50 |
| 28 | 100 |
| 50 | 100 |

- Flujo de fase móvil : 0.5 ml/min.

- **Detector Ultravioleta.**
Longitud de onda: 262 nanómetros
Sensibilidad: 0.05 A.U.F.S. y 0.2 A.U.F.S. (para las concentraciones mas altas)
(AUFS, del inglés: Absorbance Units Full Scale)
- **Detector de Fluorescencia**
Filtro de excitación de 305-395 nm y Filtro de emisión de 430-470 nm.
Sensibilidad: 0.02 F.U.F.S. y 0.1 F.U.F.S.(para las concentraciones mas altas)
(FUFUS, del inglés: Fluorescence Units Full Scale)

II.4 Descripción del Procedimiento para la Preconcentración y Análisis en Línea de HAP's

A. Montaje

Las figuras II.4.1.A y II.4.1.B muestran el diagrama del montaje experimental utilizado. La precolumna (PC) empacada con fase reversa C-18 se colocó entre los puertos 1 y 4 de una válvula de conmutación. La bomba isocrática (P_2), empleada para percolar la muestra a través de la precolumna (bomba de muestra), se conectó al puerto 5 de la válvula de conmutación, insertando entre ambas una válvula de purga (Vp). Todo el conjunto anterior se conectó al sistema cromatográfico, uniendo el puerto 2 de la válvula de conmutación al inyector (i) y el puerto 3 a la columna analítica (c).

La figura II.4.1 muestra las líneas de flujo en las dos posiciones de la válvula de conmutación. En la "posición de carga" (Fig. II.4.1.A), la bomba (P_1) del cromatógrafo (bomba HPLC) envía la fase móvil inicial directamente hacia la columna analítica para equilibrarla, simultáneamente, en el otro circuito se puede realizar la carga de la precolumna según el procedimiento descrito posteriormente.

En la "posición de inyección" (Fig. II.4.1.B) la precolumna se encuentra acoplada en línea con el sistema cromatográfico y, mediante el gradiente de elución binario proporcionado por la bomba HPLC, los analitos son desorbidos y enviados hacia la columna analítica para su separación y detección por absorción en el ultravioleta (UV) y por fluorescencia (F).

Finalmente, en la misma posición mostrada en la fig. II.4.1.B se realiza la inyección del estándar de trabajo.

Cabe mencionar que debido a la gran hidrofobicidad de los HAP's, especialmente los compuestos con mayor número de anillos aromáticos, fue necesario realizar modificaciones en la bomba de muestra. En efecto todas las bombas están equipadas con un tubo de Teflón para la aspiración de la fase móvil; sin embargo por estudios previos realizados²⁰, se sabe que los HAP's más pesados se adsorben fuertemente en las paredes internas de dicho tubo cuando se encuentran disueltos en soluciones acuosas, aún si estas últimas contienen una pequeña proporción de metanol o acetonitrilo. Por lo tanto, el tubo de Teflón fue sustituido por un tubo de acero inoxidable de 1/8" de diámetro externo.

Por otra parte, el procedimiento diseñado para la EFS de los HAP's requiere de varios disolventes además de la muestra. Lo ideal hubiera sido utilizar una válvula selectora de baja presión a la entrada de la bomba de muestra; sin embargo, el cuerpo y las líneas de la válvula con que se contaba son de material plástico por lo que había riesgo de tener pérdida de analitos por adsorción. Debido a lo anterior, en vez de la válvula selectora se adaptó una válvula de purga de alta presión, con cuerpo de acero inoxidable, a la salida de la bomba de la muestra. De esta manera fue posible realizar los cambios de disolvente requeridos durante el procedimiento a gran velocidad.

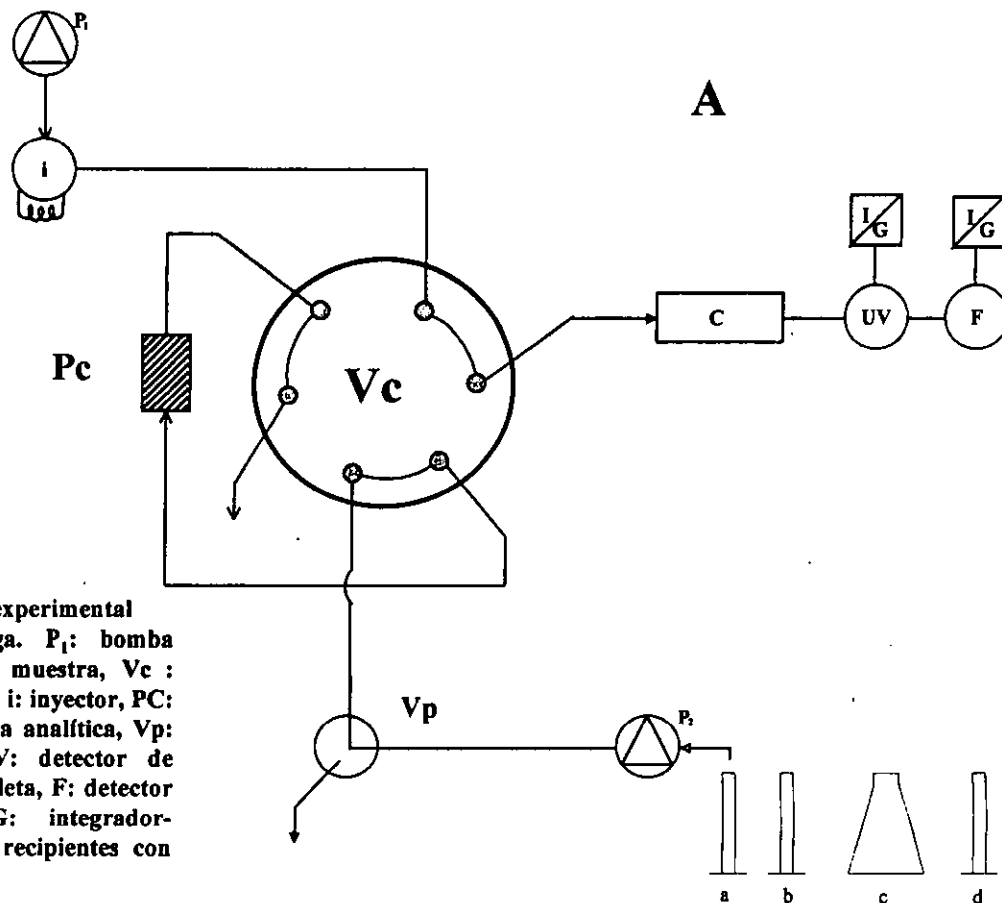


Figura II.1.A Montaje experimental
 (A) Posición de carga. P_1 : bomba HPLC, P_2 : bomba de muestra, V_c : válvula de conmutación, i : inyector, PC : precolumna, C : columna analítica, V_p : válvula de purga, UV : detector de absorción en el ultravioleta, F : detector de fluorescencia, I/G : integrador-graficador, a, b, c, d : recipientes con disolventes y muestra.

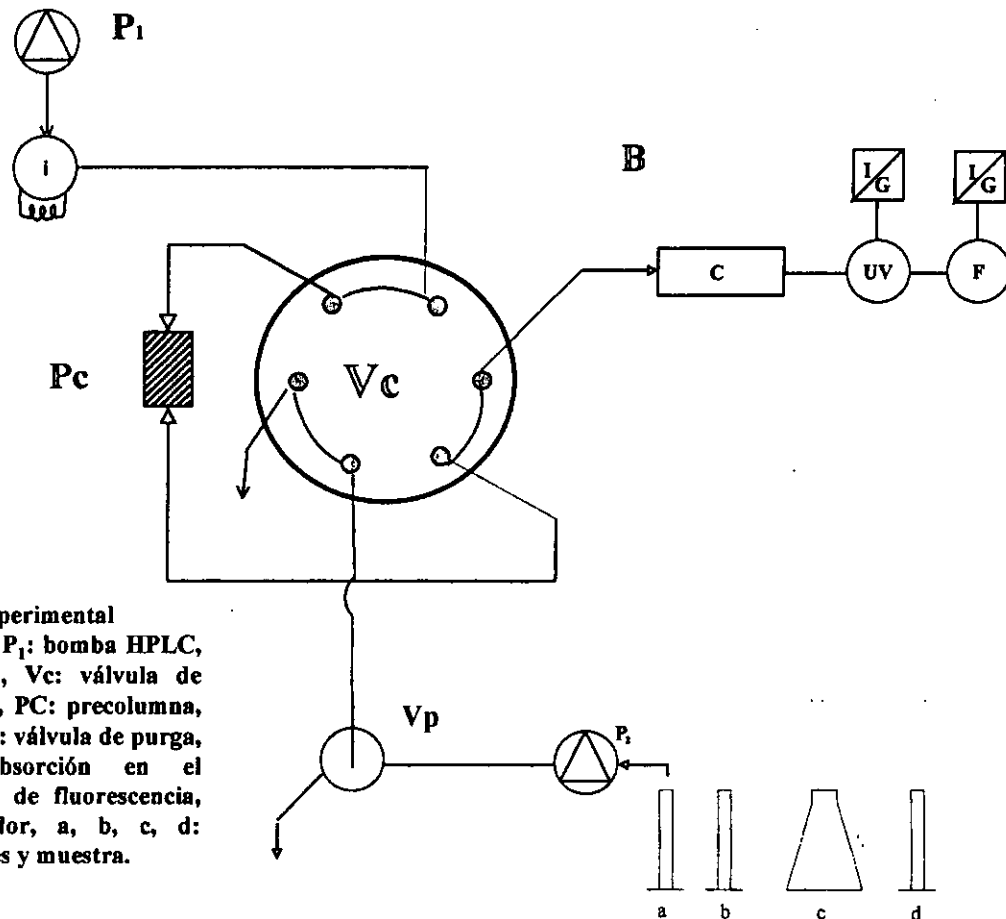


Figura II.1.B Montaje experimental

(B) Posición de elución. P₁: bomba HPLC, P₂: bomba de muestra, V_c: válvula de conmutación, i: inyector, P_c: precolumna, C: columna analítica, V_p: válvula de purga, UV: detector de absorción en el ultravioleta, F: detector de fluorescencia, I/G: integrador-graficador, a, b, c, d: recipientes con disolventes y muestra.

B. Preparación previa de la muestra

Las muestras de aguas naturales contienen, generalmente, sólidos suspendidos por lo que no pueden ser cargadas directamente en las precolumnas ya que taparían los filtros de acero inoxidable que se encuentran en la entrada y salida de éstas. Adicionalmente, con analitos tan hidrofóbicos como los HAP's, se tiene el problema de pérdidas considerables por adsorción de los solutos en las paredes de los recipientes que contienen la muestra acuosa²⁰ (frasco de muestreo y reservorio de la bomba).

Por lo tanto es indispensable diseñar cuidadosamente el proceso de preparación de la muestra para obtener buenas recuperaciones de los analitos de interés. Dada la enorme diferencia en hidrofobicidad entre los HAP's considerados, no fue posible encontrar condiciones comunes convenientes para todos ellos. El procedimiento descrito a continuación incluye dos condiciones diferentes, una para los HAP's ligeros (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno) y otra para los HAP's pesados (criseno, 1,2 benzoantraceno, benzo(h)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, 1,2:5,6-dibenzoantraceno, benzo(ghi)perileno e indeno (1,2,3) pireno).

- 1) Para las muestras sintéticas: En un frasco ámbar con capacidad de aproximadamente 75 ml colocar 25 ml de agua pura y dopar con 100 μ l del estándar de trabajo a utilizar. Cerrar el frasco y agitar vigorosamente. Añadir 25 ml mas, cerrar y agitar. Adicionar los últimos 25 ml de agua, para completar 75 ml de muestra, cerrar y agitar.
- 2) En el sistema de filtración Millipore se coloca una membrana de filtración de Nylon 66 con poro de 0.4 μ m previamente acondicionada. La muestra (sintética o natural) se filtra al vacío utilizando una varilla de vidrio para dirigir el líquido al centro de la membrana, procurando evitar el contacto con las paredes del recipiente de filtración. El filtrado se recibe en un matraz Kitazato de vidrio con capacidad de 125 ml. Para el acondicionamiento de la membrana de Nylon, ésta se deposita en una caja Petri y se cubre con acetonitrilo, dejándola sumergida por lo menos 2 horas. Luego se coloca en el sistema de filtración, se lava con 3 ml de acetonitrilo fresco y con 20 ml de agua pura, descartando los líquidos de lavado. Después de este procedimiento la membrana queda lista para el filtrado de la muestra.
- 3) Para los HAP's ligeros, agregar 5 ml de acetonitrilo al frasco ámbar que contenía la muestra (frasco de muestreo), cerrar y agitar perfectamente. Pasar este disolvente a través de la misma membrana que se empleó para filtrar la muestra, utilizando nuevamente la varilla de vidrio para dirigir el líquido al centro de la membrana. Es conveniente en esta operación disminuir o suspender el vacío para maximizar el contacto del disolvente con la membrana y lograr arrastrar mejor a los solutos eventualmente adsorbidos en ella. El filtrado se recoge en el mismo Kitazato en que se colectó la muestra.

- 4) Para los HAP's pesados, repetir la operación del paso anterior 5 veces. Es decir, se agregan al frasco de muestreo y se pasan por la membrana 5 porciones de 5 ml cada una de acetonitrilo, secuencialmente. Al terminar este paso, el volumen del líquido en el Kitazato es de 100 ml.
- 5) Para los HAP's ligeros, agregar 20 ml de agua pura al Kitazato que contiene la muestra y el acetonitrilo, de modo que el volumen total del líquido sea de 100 ml.
- 6) Retirar el Kitazato del sistema de filtración, taparlo con papel aluminio y agitar suavemente durante 1 minuto para homogeneizar la mezcla. El Kitazato se emplea directamente como reservorio de la bomba de muestra para las operaciones en línea

El procedimiento diseñado para la preparación previa de la muestra presupone que el muestreo se realiza utilizando frascos ámbar con capacidad aproximadamente de 75 ml, los cuales se llenan hasta el inicio de la rosca con el agua a analizar.

Dada la variabilidad que puede haber en los frascos, el volumen de muestra podrá encontrarse entre 73 y 77 ml, sin embargo el protocolo desarrollado puede aceptar esta variabilidad sin requerir ninguna modificación. No obstante, para la cuantificación de los analitos se requiere conocer con mayor exactitud el volumen de la muestra; por lo tanto, es necesario marcar el menisco del líquido en la pared externa del frasco antes de empezar el tratamiento para poder determinar posteriormente el volumen real de muestra.

C. Carga de la precolumna y análisis de los HAP's.

Una vez preparada la solución de carga, el siguiente procedimiento permite realizar en línea la extracción, preconcentración y análisis de los HAP's.

- 1) Con la válvula de conmutación en la " posición de carga ", arrancar la bomba HPLC y enviar la fase móvil inicial (75% fase A y 25% de fase B) hacia la columna analítica a un flujo de 0.5 ml/min. Simultáneamente abrir la válvula de purga y llenar la tubería y la cabeza de la bomba de muestra con acetonitrilo (flujo 5ml/min, 1min).
- 2) Disminuir el flujo de la bomba de muestra, cerrar la válvula de purga y bombear 10ml de acetonitrilo hacia la precolumna (flujo 2ml/min, 5 min).
- 3) Transferir el tubo de entrada de la bomba de muestra al recipiente con la disolución de acondicionamiento,
 - Para los HAP's ligeros: acetonitrilo-agua 5:95 (v/v)
 - Para los HAP's pesados: acetonitrilo-agua 25:75 (v/v)Llenar las líneas (flujo 5ml/min, 1 min, purga abierta)

- 4) Pasar 20 ml de solución de acondicionamiento por la precolumna (flujo 2 ml/min, 10 min, purga cerrada).
- 5) Transferir el tubo de entrada de la bomba de muestra al recipiente con la solución de carga. Llenar las líneas (flujo 5ml/min, 2 min, purga abierta).
- 6) Pasar 25 ml de solución de carga por la precolumna (flujo 2 ml/min, aprox. 12.5 min, purga cerrada). El líquido se recibe en la puerta 6 de la válvula de conmutación en un matraz aforado de 25 ml para asegurar que el volumen cargado en la precolumna corresponde exactamente al valor mencionado.
- 7) Transferir el tubo de entrada de la bomba de muestra a un recipiente con agua pura. Llenar las líneas (flujo 5 ml/min, 1 min).
- 8) Pasar 0.5 ml de agua pura por la precolumna (flujo 0.5 ml/min, 1 min).
- 9) Rotar la válvula de conmutación y correr el gradiente de fase móvil con la bomba HPLC. Apagar la bomba de muestra.
- 10) Con la válvula de conmutación en la "posición de inyección", equilibrar la precolumna y columna analítica con la fase móvil inicial (flujo 0.5 ml/min, 30 min). En esta operación el inyector deberá ponerse en la posición de carga y deberá llenarse el rizo con el estándar de trabajo adecuado.
- 11) Correr el gradiente de fase móvil con la bomba HPLC para analizar el estándar.

Repetir los pasos 1-9 cargando en el paso 6 la muestra complementaria. Es decir, si inicialmente se cargó la muestra para HAP's ligeros, cargar ahora la muestra para HAP's pesados o viceversa.

Nota:

El mismo estándar inyectado y analizado en los pasos 10 y 11 sirve como referencia para el análisis de los HAP's ligeros y los HAP's pesados en la muestra.

La Tabla II.4.1 resume el procedimiento expuesto, indicando la posición de las válvulas, el estado de las bombas y las disoluciones o disolventes usados en cada paso del método para la extracción, preconcentración y análisis de HAP's.

Según se muestra, el tiempo total para un análisis completo (HAP's ligeros, HAP's pesados y estándar inyectado) es de 4 horas 7 minutos. Cabe hacer notar que la EFS de la muestra solo requiere 33.5 min y que este proceso se realiza mientras la columna analítica se equilibra a las condiciones iniciales para la siguiente corrida cromatográfica. Es decir que, en este procedimiento en línea el tiempo de análisis está determinado exclusivamente por las corridas cromatográficas y su respectivo equilibrio de columna.

TABLA II.4.1 Operación del sistema durante los diferentes pasos del método

| Paso | Vp | Vc | i | P ₁ (ml/min) | P ₂ (ml/min) | Solvente P ₁ | Solución P ₂ | Tiempo (min) | Tiempo acumulado (min) |
|---|----|----|-----|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------|---------------------------|
| 1 | A | L | L/I | ON (0.5) | ON (5) | inicial | a | 1 | 1 |
| 2 | C | L | L/I | ON (0.5) | ON (2) | inicial | a | 5 | 6 |
| 3 | A | L | L/I | ON (0.5) | ON (5) | inicial | b | 1 | 7 |
| 4 | C | L | L/I | ON (0.5) | ON (2) | inicial | b | 10 | 17 |
| 5 | A | L | L/I | ON (0.5) | ON (5) | inicial | c | 2 | 19 |
| 6 | C | L | L/I | ON (0.5) | ON (2) | inicial | c | 12.5 | 31.5 |
| 7 | A | L | L/I | ON (0.5) | ON (5) | inicial | d | 1 | 32.5 |
| 8 | C | L | L/I | ON (0.5) | ON (0.5) | inicial | d | 1 | 33.5 |
| 9 | - | I | L/I | ON (0.5) | OFF | gradiente | - | 50 | 83.5 |
| 10 | - | I | L | ON (0.5) | OFF | inicial | - | 30 | 113.5 |
| 11 | - | I | I | ON (0.5) | OFF | gradiente | - | 50 | 163.5 |
| Repetir 1-9 para el análisis de la carga complementaria | | | | | | | | 83.5 | 247 |

Vp: válvula de purga, A: abierta, C: cerrada; Vc: válvula de conmutación, L: posición de carga.

I: posición de inyección, i: inyector, P₁: bomba HPLC, ON: prendida, OFF: apagada, inicial:

fase A 75% + fase B 25%; P₂: bomba de muestra, a: acetonitrilo, b: solución de acondicionamiento de la precolumna, c: muestra preparada, d: agua grado reactivo.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III.1 Separación y Detección de los HAP's.

La columna analítica Envirosep-pp es una columna de fase reversa químicamente enlazada a la sílice (patente del fabricante), que ha sido especialmente diseñada para la separación de los 16 HAP's clasificados como contaminantes prioritarios por la EPA.

Cabe hacer notar que este grupo de compuestos es bastante difícil de separar tanto por Cromatografía de gases como por Cromatografía de líquidos. De hecho, algunos ensayos preliminares realizados por la última técnica con columnas convencionales C-18 no dieron resultados satisfactorios ya que solo se pudieron resolver completamente 10 HAP's. Sin embargo la columna Envirosep permitió obtener una separación bastante aceptable de los 16 solutos como lo muestra el cromatograma de la figura III.1.1, obtenido por inyección directa de una mezcla estándar relativamente concentrada utilizando detección UV. Por otra parte en la figura III.1.2 se presenta el cromatograma obtenido con el detector de fluorescencia al inyectar la misma mezcla estándar de HAP's que en la figura III.1.1. Por comparación de ambas figuras se puede entender fácilmente la selección que se hizo del modo de detección para cada soluto en el capítulo anterior (tabla II.2.2).

La detección dual, UV y Fluorescencia, permitió alcanzar muy bajos límites de detección para todo el conjunto de solutos. Por inyección directa de mezclas estándar se pudieron detectar concentraciones límites de HAP's entre 6 y 140 ppb dependiendo del soluto considerado.

Las figuras III.1.3 y III.1.4 muestran los cromatogramas obtenidos en UV y Fluorescencia, respectivamente, al inyectar mezclas estándar de HAP's a concentraciones cercanas a los límites de detección.

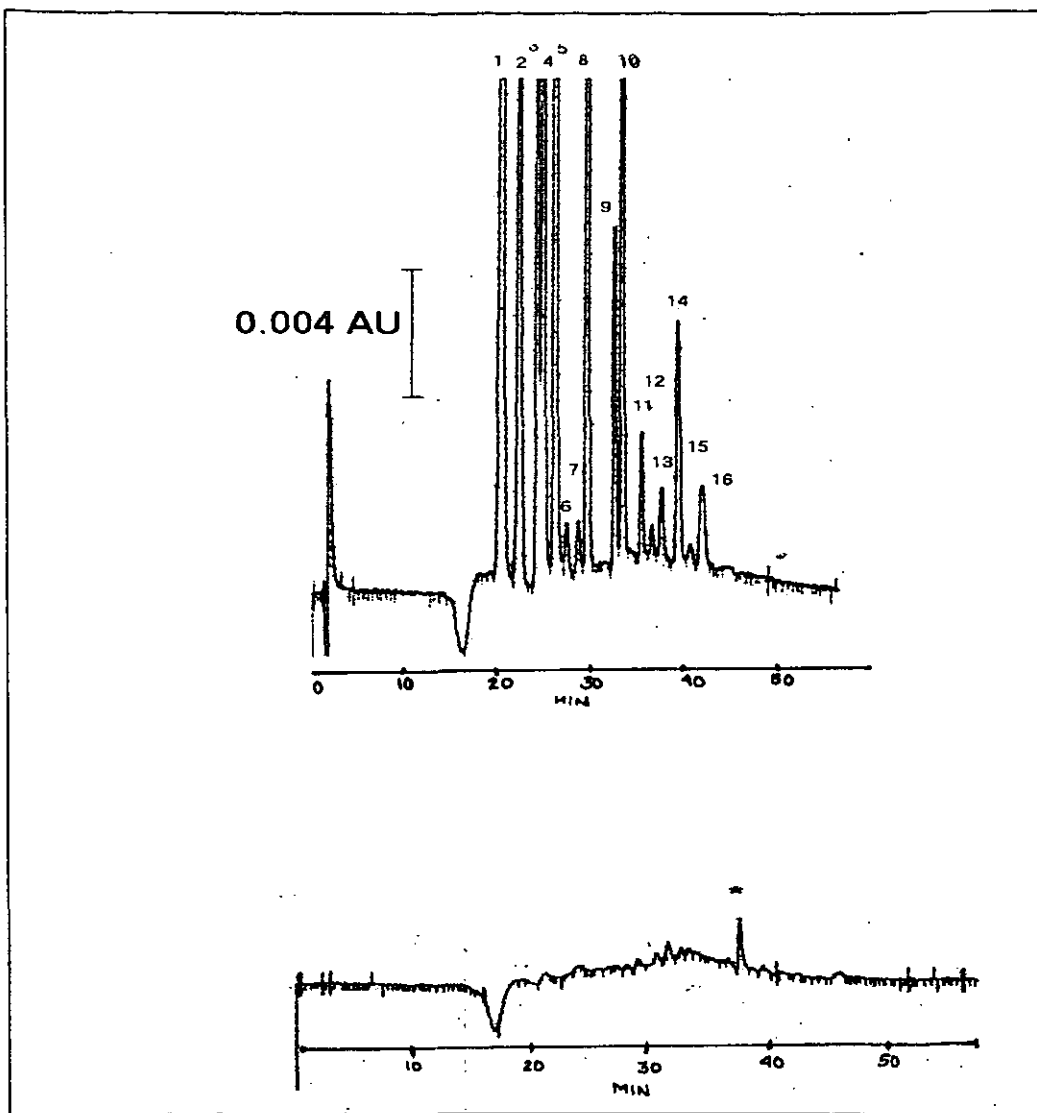


Figura III.1.1 Separación de una mezcla de poliaromáticos a alta concentración (UV).

Condiciones experimentales: Inyección de 24.7 μ l, columna envirossep (125 x 3.2 mm D.I.) empacada con fase reversa de 5 μ m, precolumna (20 x 2 mm) empacada con Spherisorb ODS-2 de 5 μ m, elución por gradiente acetonitrilo-agua, detección UV a 262 nm. Solutos: (1) Naftaleno 1609 ppb, (2) Acenafteno 950 ppb, (3) Acenaftileno 1826 ppb, (4) Fluoreno 341 ppb, (5) Fenantreno 555 ppb, (6) Antraceno 186 ppb, (7) Fluoranteno 149 ppb, (8) Pireno 182 ppb, (9) Benzo(a)antraceno 333 ppb, (10) Criseno 421 ppb, (11) Benzo (a)pireno 86.4 ppb, (12) Benzo(b)fluoranteno 107 ppb, (13) Benzo(k)fluoranteno 83.2 ppb, (14) 1.2.5.6 Dibenzoantraceno 1049 ppb, (15) Benzo(ghi)perileno 86.4 ppb y (16) Indeno-(1,2,3)-pireno 86.4 ppb. Figura inferior: Blanco de inyección mostrando pico de gradiente (*).

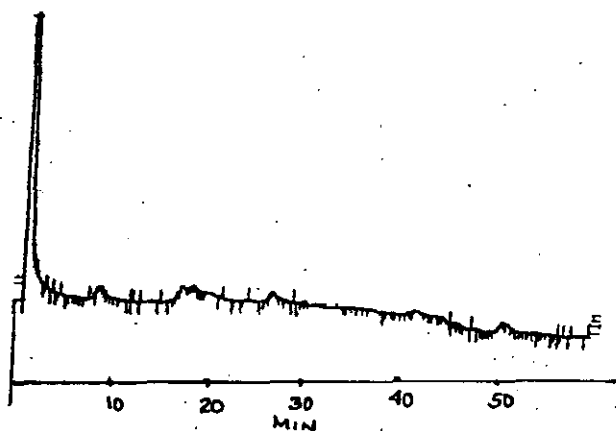
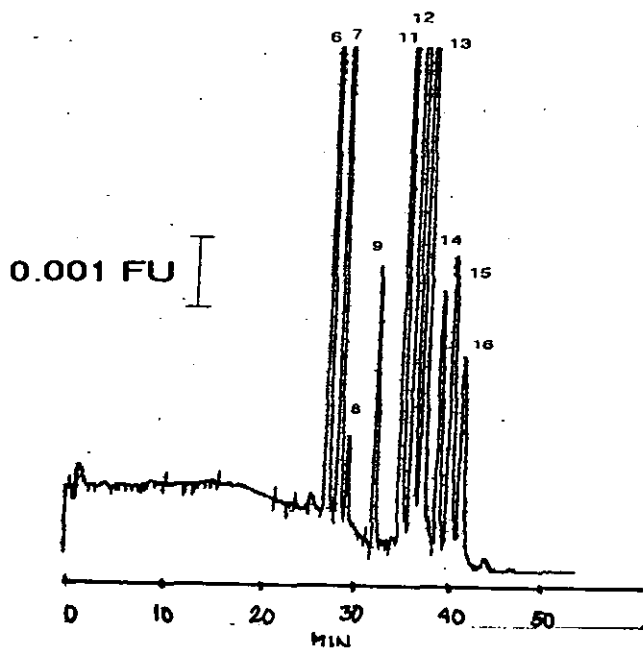


Figura III.1.2 Separación de una mezcla de poliaromáticos a alta concentración. Condiciones experimentales, solutos y concentraciones como en la figura III.1.1 excepto detección por fluorescencia con filtro de excitación de 305-395 nm y filtro de emisión de 430-470 nm. Figura inferior blanco de inyección.

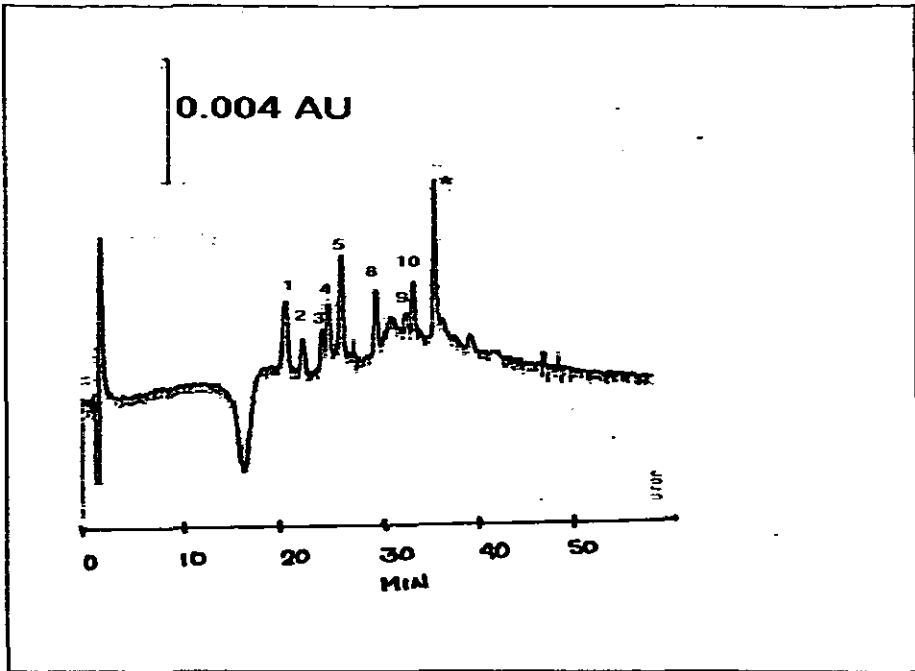


Figura III.3 Cromatograma de UV obtenido a niveles muy cercanos al límite de detección. Las condiciones cromatográficas son similares a la mencionadas en la figura III.1.1. Solutos : (1) Naftaleno 80 ppb, (2) Acenafteno 85 ppb, (3) Acenaftileno 81 ppb, (4) Fluoreno 17 ppb, (5) Fenantreno 27 ppb, (8) Pireno 18 ppb, (9) Benzo(a)antraceno 33.3 ppb, (10) Criseno 42 ppb y (*) pico de gradiente.

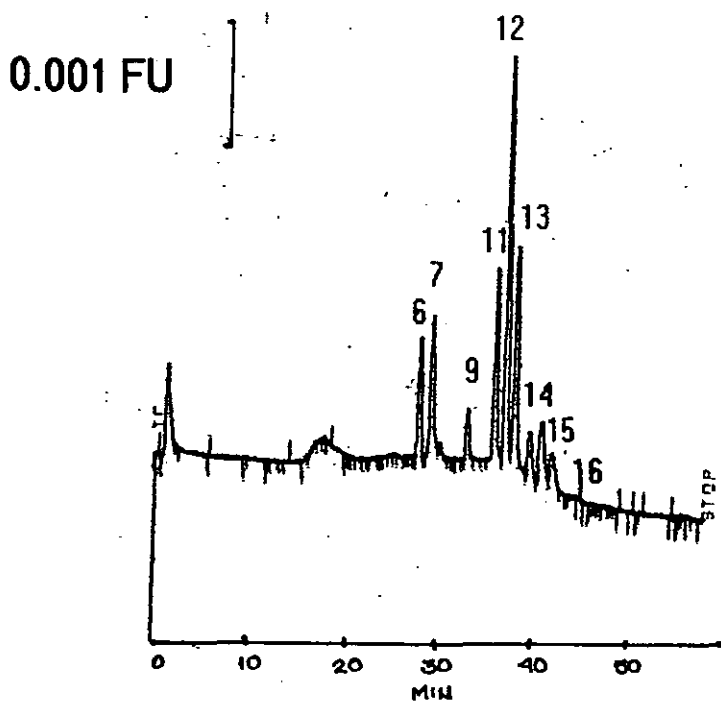


Figura III.1.4 Cromatograma de Fluorescencia obtenido a niveles muy cercanos al límite de detección.

Las condiciones son similares a las mencionadas en la figura III.1.1(excepto detección por fluorescencia). Solutos:

(6) Antraceno 37.2 ppb, (7) Fluoranteno 15 ppb, (9) Benzo(a)antraceno 33.3 ppb,(11) Benzo(a)pireno 8.6 ppb, (12) Benzo(b)fluoranteno 10.7 ppb, (13) Benzo(k)fluoranteno 8.3 ppb(14) 1,2,5,6- Dibenzoantraceno 105 ppb, (15) Benzo(ghi)perileno 8.6 ppb y (16) Indeno-(1,2,3)-pireno 8.6 ppb.

III.2 Linealidad y Exactitud Multinivel del Método

Una vez desarrollado el método analítico para la determinación de trazas de HAP's en agua, es necesario certificarlo para determinar las condiciones (particularmente el intervalo de concentraciones) en que éste puede ser aplicado y la confiabilidad de los resultados que se obtienen a través de él.

Para realizar este estudio, se prepararon muestras sintéticas con agua grado reactivo dopadas con mezclas estándar de los HAP's a diferentes niveles de concentración. La preparación, extracción, preconcentración y análisis de las muestras se llevó a cabo según los procedimientos descritos en el capítulo anterior. Cabe aclarar que las mezclas estándar utilizadas para dopar el agua contenían a los 16 HAP's; sin embargo, en las muestras preparadas según el procedimiento para HAP's ligeros solo se cuantificaron: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno y pireno. Similarmente, en las muestras preparadas según el procedimiento para HAP's pesados sólo se cuantificaron: criseno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzoantraceno, benzo(ghi)perileno e indeno (1,2,3)pireno.

En efecto, la cantidad de acetonitrilo (5ml) usada en el procedimiento de HAP's ligeros para enjuagar el frasco de muestreo (frasco ámbar de 75 ml en que se coloca y se prepara la muestra sintética para simular condiciones de una muestra real) y la membrana de filtración no es suficiente para arrastrar completamente los HAP's pesados fuertemente adsorbidos en estos materiales. Adicionalmente, también se puede decir que esta cantidad de acetonitrilo no es suficiente para evitar que en el kitazato donde se recibe la muestra filtrada o en las tuberías de la bomba de muestra, (P_2 en la figura II.4.1) se adsorban los HAP's pesados. Como resultado de lo anterior, puede verse claramente en los cromatogramas obtenidos que los picos correspondientes a los HAP's pesados son sumamente pequeños o ni siquiera aparecen.

Por otra parte, cuando se emplea el procedimiento para HAP's pesados, la cantidad de acetonitrilo usada para enjuagar el frasco de muestreo y la membrana de filtración (25ml) es demasiado elevada para lograr una retención adecuada de los HAP's ligeros durante la fase de extracción y preconcentración en fase sólida. En consecuencia, una gran parte de estos solutos se fuga durante la carga de la precolumna. En este caso, en los cromatogramas obtenidos son los picos correspondientes a los HAP's ligeros que desaparecen o están muy pequeños.

Algunos compuestos como el fenantreno, el antraceno, el fluoranteno y el pireno se encuentran en la frontera entre los dos grupos de HAP's. Por experimentos anteriores realizados en el laboratorio se sabe que éstos pueden determinarse con resultados similares utilizando el procedimiento de preparación de muestra de HAP's ligeros o el de HAP's pesados.

En todo los experimentos efectuados con las muestras sintéticas la cantidad de compuestos recuperados se calculó comparando las áreas de los cromatogramas de la muestra (UV y Fluorescencia) con las de los cromatogramas obtenidos por inyección directa de una mezcla estándar. Dicha inyección fue realizada justo antes o justo después del análisis de la muestra para evitar errores por variabilidad de la respuesta de los detectores con el tiempo.

Para cada muestra, el estándar inyectado fue el mismo que se utilizó para dopar la muestra en cuestión, ya que de esta manera la cantidad inyectada de cada soluto correspondía muy cercanamente con la cantidad presente en el volumen de muestra analizado, suponiendo una recuperación del 100%.

En las tablas III.2.1 a III.2.16 se reportan para cada poliaromático los resultados obtenidos en las muestras analizadas.

Para cada concentración estudiada se presentan la cantidad teóricamente cargada en la precolumna (es decir, considerando que no hay pérdidas durante la preparación de la muestra) y la cantidad recuperada.

En la figuras III.2.1. a III.2.16. se presentan las gráficas de cantidad de soluto recuperado versus cantidad de soluto teóricamente analizado. La ecuación de la recta de regresión calculada por el método de mínimos cuadrados y el coeficiente de determinación correspondiente se presentan en cada figura.

TABLA III.2.1 Recuperación del Naftaleno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 161 | 3.0 | 3.7 |
| 241 | 4.5 | 4.5 |
| 483 | 9.0 | 8.8 |
| 1609 | 30 | 29 |
| 2412 | 45 | 41 |

Figura III.2.1 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Naftaleno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

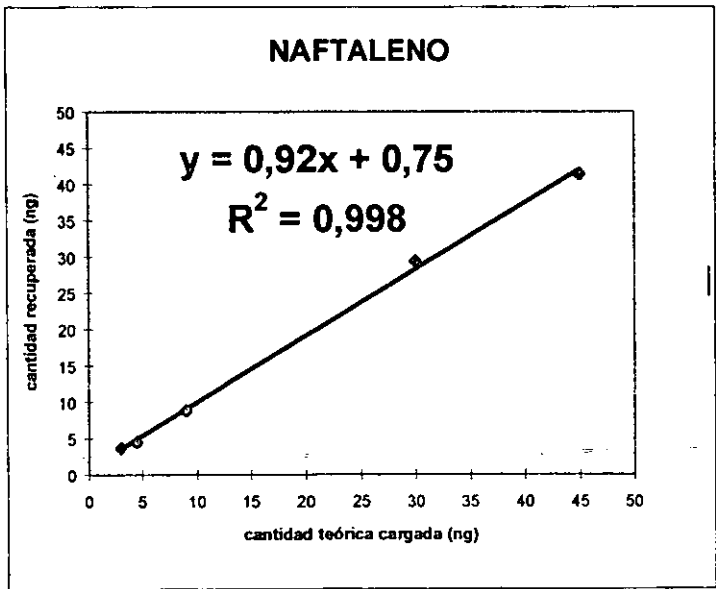


TABLA III.2.2 Recuperación del Acenafteno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 190 | 3.6 | 3.4 |
| 285 | 5.3 | 5.1 |
| 569 | 11 | 12 |
| 950 | 18 | 15 |
| 4744 | 89 | 96 |

Figura III.2.2 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Acenafteno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

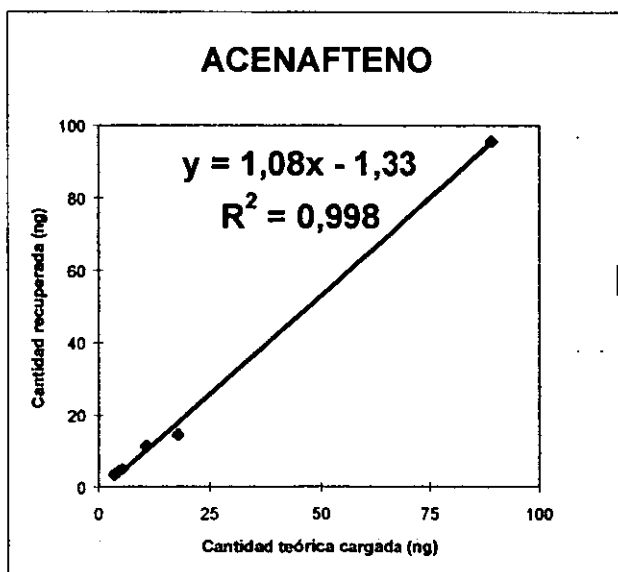


TABLA III.2.3 Recuperación del Acenaftileno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 183 | 3.4 | 3.4 |
| 274 | 5.1 | 5.0 |
| 548 | 10 | 11 |
| 1826 | 34 | 31 |
| 4565 | 86 | 93 |

Figura III.2.3 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Acenaftileno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

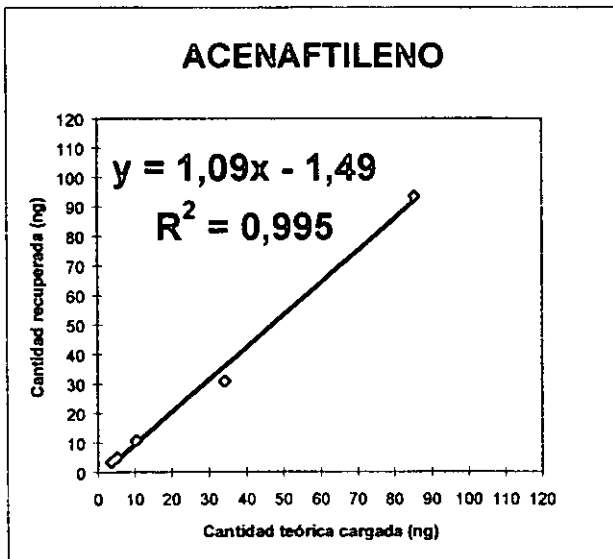


TABLA III.2.4 Recuperación del Fluoreno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 34.1 | 0.64 | 0.60 |
| 51.2 | 0.96 | 0.90 |
| 102 | 1.9 | 2.0 |
| 341 | 6.4 | 5.8 |
| 853 | 16 | 17 |

Figura III.2.4 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Fluoreno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

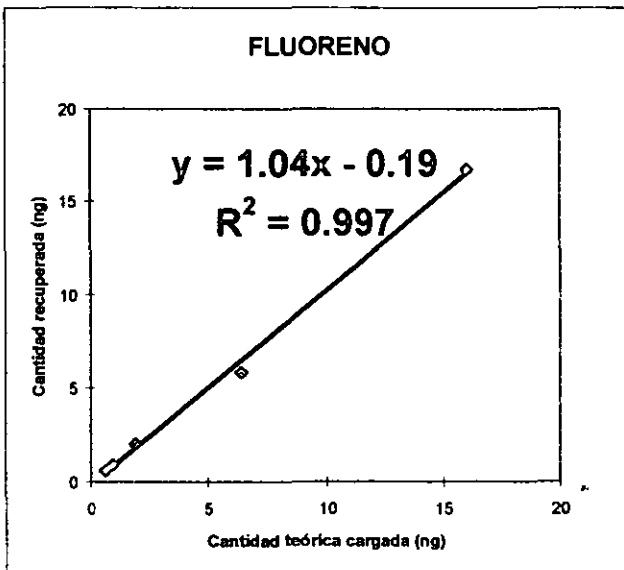


TABLA III.2.5 Recuperación del Fenantreno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 55.5 | 1.0 | 1.0 |
| 83.2 | 1.6 | 1.6 |
| 166 | 3.1 | 2.7 |
| 555 | 10 | 11 |
| 1387 | 26 | 26 |

Gráfica III.2.5 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Fenantreno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

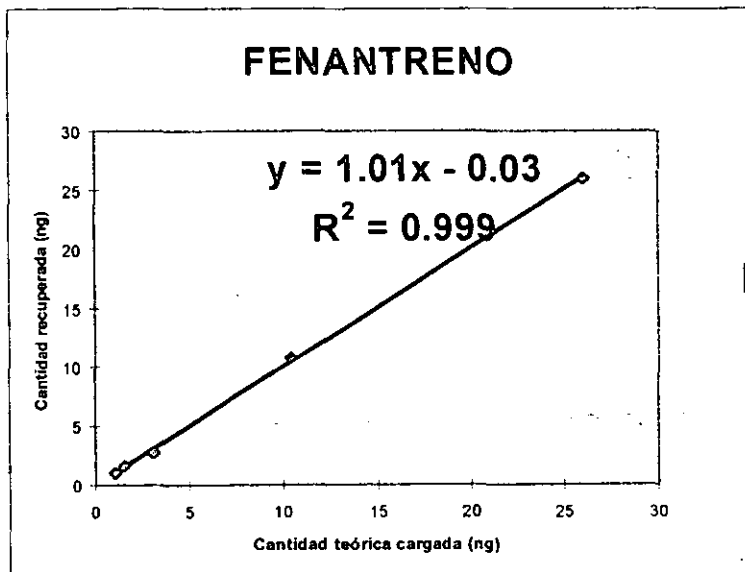


TABLA III.2.6 Recuperación del Antraceno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 18.6 | 0.35 | 0.36 |
| 111 | 2.1 | 2.0 |
| 186 | 3.5 | 3.3 |
| 372 | 7.0 | 6.7 |
| 928 | 17 | 17 |

Figura III.2.6 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Antraceno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

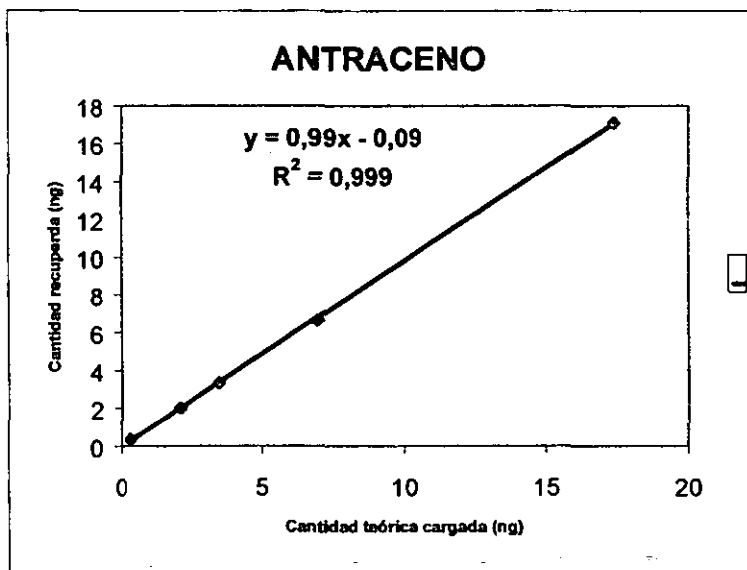


TABLA III.2.7 Recuperación del Fluoranteno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 15 | 0.28 | 0.23 |
| 30 | 0.56 | 0.48 |
| 149 | 2.8 | 2.9 |
| 299 | 5.6 | 5.3 |
| 747 | 14 | 15 |

Figura III.2.7 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Fluoranteno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

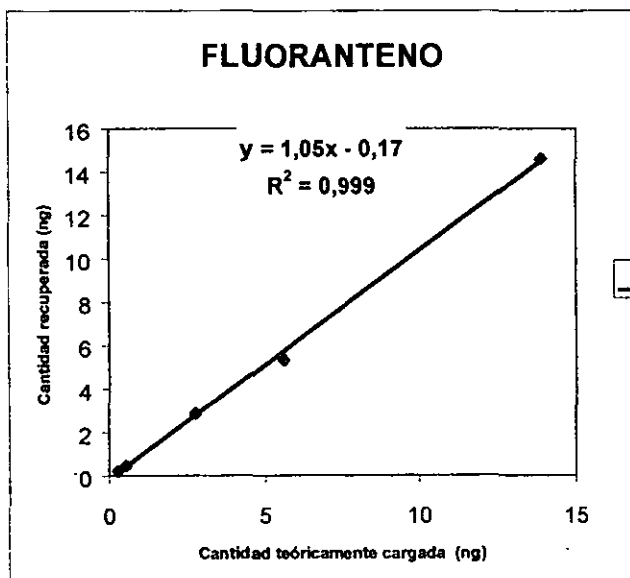


TABLA III.2.8 Recuperación del Pireno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración.

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 54.4 | 1.0 | 1.1 |
| 109 | 2.0 | 1.9 |
| 544 | 10 | 11 |
| 910 | 17 | 15 |
| 1813 | 34 | 36 |

Figura III.2.8 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Pireno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumaa

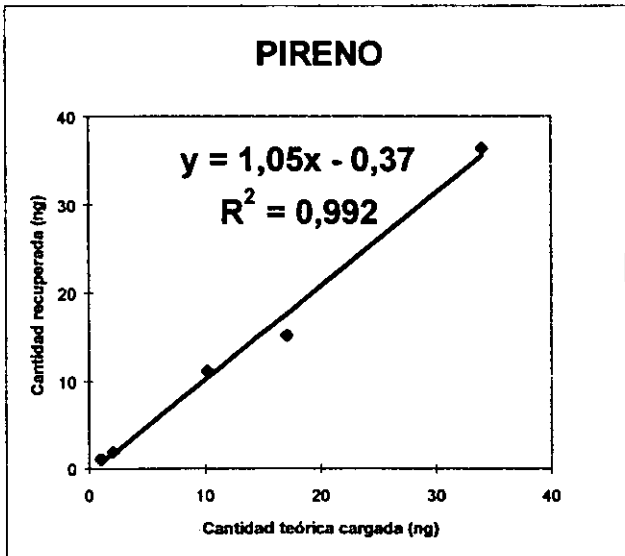


TABLA III.2.9 Recuperación del Benzo(a) Antraceno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 33.3 | 0.62 | 0.5 |
| 66.6 | 1.3 | 1.3 |
| 99.8 | 2.0 | 2.0 |
| 200 | 3.7 | 3.6 |
| 333 | 6.2 | 5.9 |
| 666 | 13 | 13 |
| 998 | 19 | 19 |
| 1664 | 31 | 33 |

Figura III.2.9 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Benzo(a)Antraceno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

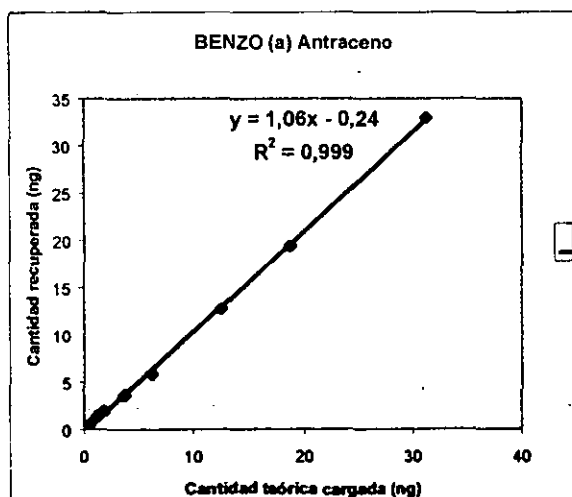


Tabla III.2.10 Recuperación de Criseno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 42.1 | 0.79 | 0.94 |
| 84.3 | 1.6 | 1.7 |
| 126.0 | 2.4 | 2.2 |
| 253.0 | 4.7 | 4.9 |
| 421.0 | 7.9 | 8.1 |
| 843.0 | 16 | 15 |
| 1264.0 | 24 | 24 |
| 2107.0 | 40 | 41 |

Figura III.2.10 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Criseno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

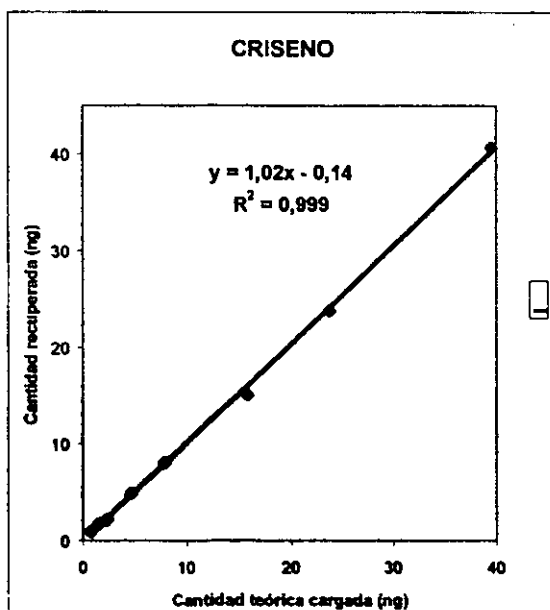


TABLA III.2.11 Recuperación del Benzo(a) Pireno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 8.6 | 0.16 | 0.18 |
| 17.3 | 0.32 | 0.33 |
| 25.9 | 0.49 | 0.45 |
| 51.8 | 0.97 | 0.99 |
| 86.4 | 1.6 | 1.5 |
| 173 | 3.2 | 2.9 |
| 259 | 4.9 | 4.8 |
| 432 | 8.1 | 8.2 |

Figura III.2.11 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Benzo(a) Pireno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

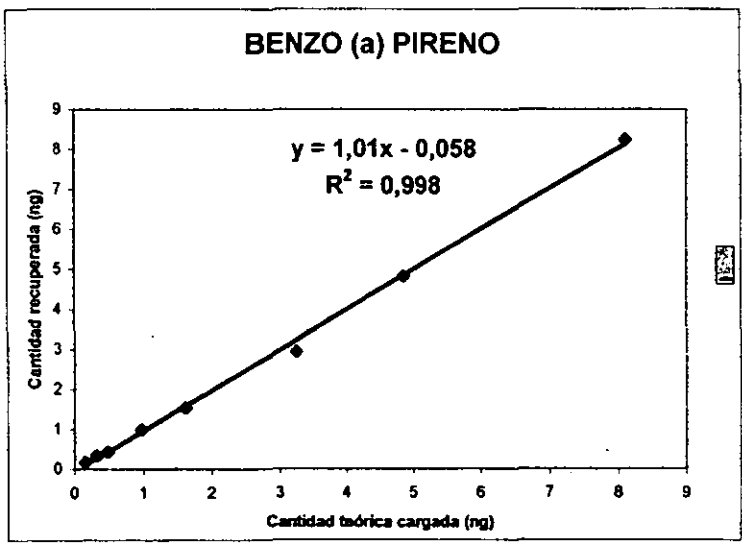


Tabla III.2.12 Recuperación del Benzo(b) Fluoranteno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 10.7 | 0.20 | 0.18 |
| 21.3 | 0.40 | 0.37 |
| 32 | 0.60 | 0.52 |
| 64 | 1.2 | 1.1 |
| 107 | 2.0 | 1.8 |
| 213 | 4.0 | 3.7 |
| 320 | 6.0 | 5.9 |
| 533 | 10 | 10 |

Figura III.2.12 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Benzo(b)Fluoranteno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

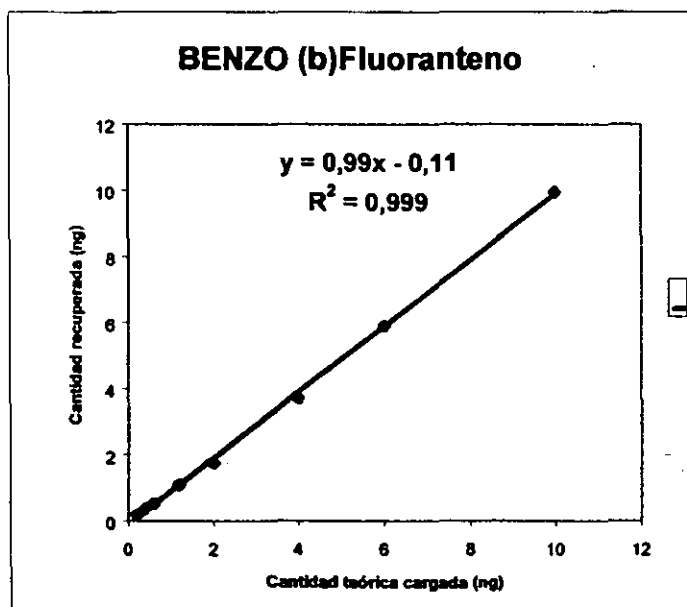


Tabla III.2.13 Recuperación de Benzo(k) Fluoranteno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 8.3 | 0.15 | 0.13 |
| 16.6 | 0.31 | 0.28 |
| 25.0 | 0.47 | 0.40 |
| 49.9 | 0.94 | 0.83 |
| 83.2 | 1.6 | 1.4 |
| 166.0 | 3.1 | 2.9 |
| 250.0 | 4.7 | 4.6 |
| 416.0 | 7.8 | 7.9 |

Figura III.2.13 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Benzo(k)Fluoranteno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.

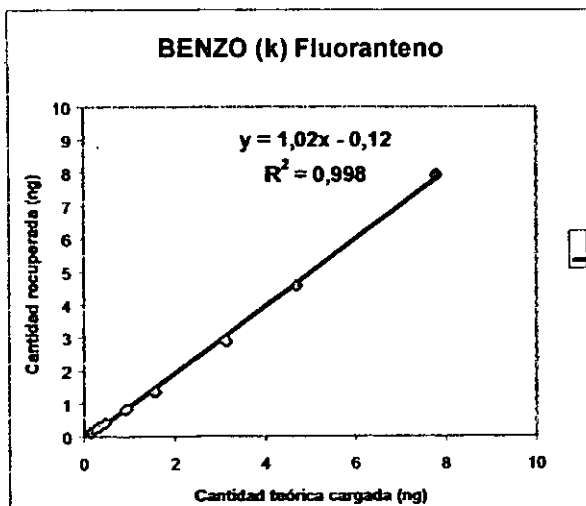


Tabla III.2.14 Recuperación de 1,2:5,6-Dibenzoantraceno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 105 | 2.0 | 1.5 |
| 210 | 3.9 | 3.4 |
| 314 | 5.9 | 6.3 |
| 628 | 12 | 14 |
| 1049 | 20 | 16 |
| 2099 | 39 | 33 |
| 3149 | 59 | 52 |
| 5248 | 98 | 94 |

Figura III.2.14 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de 1,2:5,6-Dibenzoantraceno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

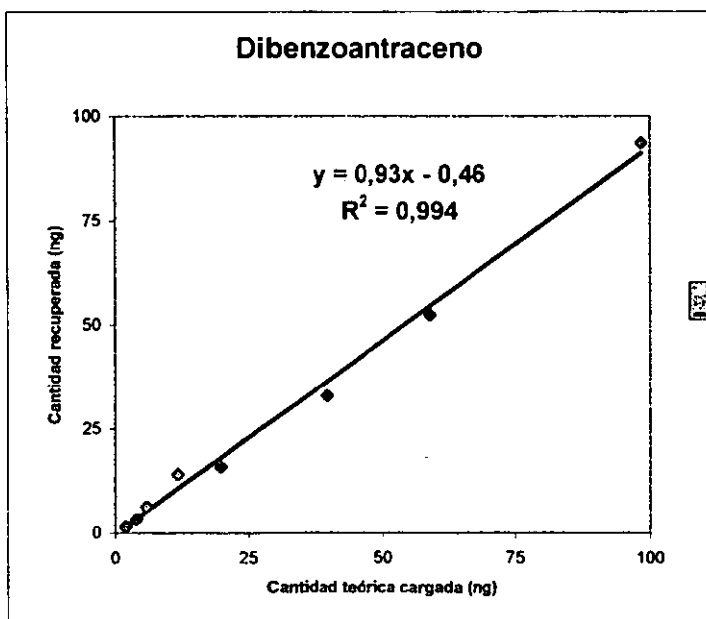


Tabla III.2.15 Recuperación de Benzo(ghi)perileno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 8.64 | 0.16 | 0.14 |
| 25.9 | 0.48 | 0.41 |
| 51.8 | 0.97 | 0.92 |
| 86.4 | 1.6 | 1.4 |
| 173 | 3.2 | 2.6 |
| 259 | 4.9 | 4.2 |
| 432 | 8.1 | 7.5 |
| 864 | 16 | 15 |

Figura III.2.15 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Benzo(ghi)perileno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna

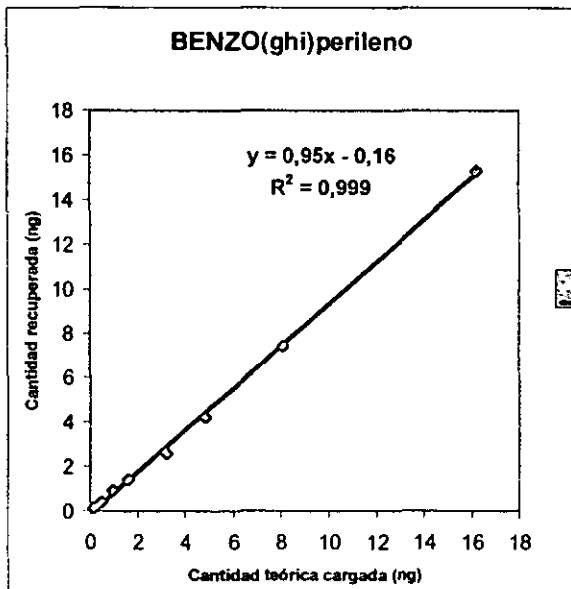
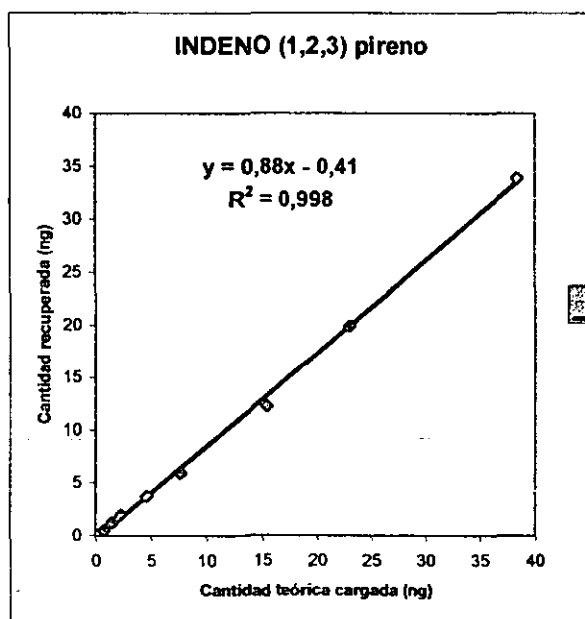


TABLA III.2.16 Recuperación de Indeno -(1,2,3)-Pireno en muestras sintéticas de agua grado reactivo dopadas con los HAP's a diferentes niveles de concentración

| Concentración en la muestra (ppt) | Cantidad teóricamente cargada (ng) | Cantidad recuperada (ng) |
|-----------------------------------|------------------------------------|--------------------------|
| 41 | 0.77 | 0.50 |
| 81.9 | 1.5 | 1.3 |
| 123 | 2.3 | 2.0 |
| 246 | 4.6 | 3.7 |
| 410 | 7.7 | 5.9 |
| 819 | 15 | 12 |
| 1229 | 23 | 20 |
| 2048 | 38 | 34 |

Figura III.2.16 Exactitud Multinivel del Método. Cantidad de Indeno- (1,2,3)-pireno recuperada en función de la cantidad teóricamente cargada en la precolumna.



Pruebas y límites de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de las rectas de regresión.

Las rectas de regresión que describen la variación de la cantidad de soluto recuperado en función de la cantidad teórica de soluto analizado son un buen indicador de la exactitud del método analítico desarrollado.

Si el método es exacto:

- La pendiente deberá tener un valor cercano a la unidad.
- La ordenada al origen deberá pasar por cero.

La primera condición significa que la cantidad de compuesto recuperado es igual a la cantidad de compuesto que teóricamente debió ser analizado, considerando la concentración inicial en la muestra, la dilución de la muestra durante su preparación y el volumen de muestra preparada cargado en la precolumna. Es decir, una pendiente igual a uno significa que no hay ninguna pérdida de soluto durante el proceso analítico. También significa que no hay “ganancia” de solutos por problemas de contaminación cruzada.

La segunda condición es una garantía de que no se presenta una tendencia constante o error sistemático. Cuando la ordenada al origen es estadísticamente diferente de cero, su valor corresponde a la magnitud del error sistemático. Las gráficas de las figuras III.2.1 a III.2.16 están representadas por la ecuación de ajuste:

$$y = bx + a$$

donde “b” y “a” son los estimadores de la pendiente y la ordenada al origen de la recta de regresión real:

$$y = Bx + A$$

Para saber si la recuperación de los solutos es del 100% empleando el método analítico desarrollado, se efectuó la siguiente prueba de hipótesis:

$$\text{Hipótesis nula} \quad H_0 : B = 1$$

$$\text{Hipótesis alterna} \quad H_1 : B \neq 1$$

Aplicando los tratamientos estadísticos convencionales (Anexo 1) a los coeficientes “b” de las ecuaciones de ajuste con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$, se obtienen los resultados presentados en las tablas III.2.17 y III.2.18.

TABLA III.2.17. Verificación de la hipótesis nula que establece que la pendiente de las rectas de regresión es igual a 1 al nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

| Analito * | t (Calculada) | n | t $\alpha/2$ (n-2 g.l.) (Tablas) | ¿Se rechaza la hipótesis nula? |
|--------------------------|------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------|
| Naftaleno | -3.61 | 5 | 3.18 | Si |
| Acenafteno | 2.95 | 5 | 3.18 | No |
| Acenaftileno | 2.05 | 5 | 3.18 | No |
| Fluoreno | 1.30 | 5 | 3.18 | No |
| Fenantreno | 0.37 | 5 | 3.18 | No |
| Antraceno | -2.39 | 5 | 3.18 | No |
| Fluoranteno | 2.31 | 5 | 3.18 | No |
| Pireno | 1.10 | 5 | 3.18 | No |
| Criseno | 1.69 | 8 | 3.18 | No |
| Benzo(a)antraceno | 6.13 | 8 | 2.45 | Si |
| Benzo(a)pireno | 0.54 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(b)fluoranteno | -0.10 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(k)fluoranteno | 0.99 | 8 | 2.45 | No |
| 1,2,5,6-dibenzoantraceno | 2.41 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(ghi)perileno | -3.84 | 8 | 2.45 | Si |
| Indeno (1,2,3)pireno | -7.45 | 8 | 2.45 | Si |

TABLA III.2.18 Intervalos de confianza de la pendiente de las rectas de regresión para un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

| Analito | INTERVALO DE CONFIANZA |
|--------------------------|------------------------|
| Naftaleno | 0.85 < b < 0.99 |
| Acenafteno | 0.99 < b < 1.17 |
| Acenaftileno | 0.95 < b < 1.23 |
| Fluoreno | 0.94 < b < 1.14 |
| Fenantreno | 0.96 < b < 1.05 |
| Antraceno | 0.97 < b < 1.01 |
| Fluoranteno | 0.98 < b < 1.12 |
| Pireno | 0.90 < b < 1.21 |
| Criseno | 0.99 < b < 1.05 |
| Benzo(a)antraceno | 1.04 < b < 1.08 |
| Benzo(a)pireno | 0.96 < b < 1.05 |
| Benzo(b)fluoranteno | 0.97 < b < 1.03 |
| Benzo(k)fluoranteno | 0.98 < b < 1.06 |
| 1,2,5,6-Dibenzoantraceno | 0.86 < b < 1.00 |
| Benzo(ghi)perileno | 0.91 < b < 0.98 |
| Indeno (1,2,3)pireno | 0.84 < b < 0.92 |

Similarmente; para verificar la ausencia de errores sistemáticos en el método se realizó la prueba de hipótesis sobre la ordenada al origen de las rectas de regresión:

$$\begin{aligned} \text{Hipótesis nula} & \quad H_0 : A = 0 \\ \text{Hipótesis alterna} & \quad H_1 : A \neq 0 \end{aligned}$$

Los resultados del tratamiento estadístico (anexo1) aplicado a los coeficientes "a" de las ecuaciones de ajuste con un nivel de significancia $\alpha=0.05$ se presentan en las tablas III.2.19 y III.2.20.

TABLA III.2.19. Verificación de la hipótesis nula que establece que la ordenada al origen de las rectas de regresión es igual a cero al nivel de significancia $\alpha=0.05$

| Analito | t (Calculada) | n | t $\alpha/2$ (n-2 g.l.) | ¿Se rechaza la hipótesis nula? |
|--------------------------|------------------|---|-------------------------|--------------------------------|
| Naftaleno | 1.34 | 5 | 3.18 | No |
| Acenafteno | -1.13 | 5 | 3.18 | No |
| Acenaftileno | 0.82 | 5 | 3.18 | No |
| Fluoreno | -0.76 | 5 | 3.18 | No |
| Fenantreno | -0.17 | 5 | 3.18 | No |
| Antraceno | -1.77 | 5 | 3.18 | No |
| Fluoranteno | 1.11 | 5 | 3.18 | No |
| Pireno | -0.60 | 5 | 3.18 | No |
| Criseno | -0.60 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(a)antraceno | -1.81 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(a)pireno | -0.89 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(b)fluoranteno | -2.12 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(k)fluoranteno | -2.14 | 8 | 2.45 | No |
| 1,2,5,6-dibenzoantraceno | -0.36 | 8 | 2.45 | No |
| Benzo(ghi)perileno | -1.66 | 8 | 2.45 | No |
| Indeno-(1,2,3)-pireno | -1.50 | 8 | 2.45 | No |

TABLA III.2.20 Intervalos de confianza de la ordenada al origen de las rectas de regresión para un nivel de significancia $\alpha=0.05$.

| Analito | INTERVALO DE CONFIANZA |
|----------------------|-------------------------------|
| Naftaleno | -1.03 < a < 2.53 |
| Acenafteno | -5.06 < a < 2.40 |
| Acenaftileno | -7.28 < a < 4.29 |
| Fluoreno | -0.98 < a < 0.60 |
| Fenantreno | -0.64 < a < 0.57 |
| Antraceno | -0.25 < a < 0.07 |
| Fluoranteno | -0.67 < a < 0.32 |
| Pireno | -3.17 < a < 2.16 |
| Criseno | -0.71 < a < 0.43 |
| Benzo(a)antraceno | -0.57 < a < 0.09 |
| Benzo(a)pireno | -0.22 < a < 0.10 |
| Benzo(b)fluoranteno | -0.24 < a < 0.02 |
| Benzo(k)fluoranteno | -0.26 < a < 0.02 |
| Dibenzoantraceno | -3.64 < a < 2.72 |
| Benzo(ghi)perileno | -0.39 < a < 0.07 |
| Indeno (1,2,3)pireno | -1.07 < a < 0.26 |

De acuerdo con los resultados presentados en las tablas III.2.17 y III.2.18 se observa que la recuperación de 12 de los 16 HAP's es estadísticamente igual a 100%. Los solutos cuya recuperación es inferior al 100% son: El naftaleno, el benzo (ghi) perileno, y el indeno (1,2,3) pireno. En el caso del naftaleno se pueden proponer dos explicaciones a la pérdida de soluto: 1) durante la filtración de la muestra se utiliza vacío el cual puede provocar pérdidas de naftaleno debido a la gran volatilidad de este compuesto, 2) dado que el naftaleno es el compuesto menos hidrofóbico del grupo de los HAP's ligeros, el volumen de muestra preparada cargada en la precolumna (25ml) puede sobrepasar ligeramente el volumen de fuga de este soluto en las condiciones experimentales utilizadas. Por otra parte, en lo que se refiere al benzo (ghi) perileno y el indeno (1,2,3) pireno, nos parece evidente que por su alta hidrofobicidad, una pequeña porción de ellos ha quedado adsorbida en la membrana de filtración o en las paredes de los recipientes que han estado en contacto con la muestra acuosa, a pesar de las precauciones tomadas para evitar pérdidas por adsorción.

En los tres casos mencionados sería posible aumentar la recuperación de los solutos mediante el ajuste de condiciones experimentales durante la preparación de la muestra, siempre y cuando se tratara de análisis individuales. En efecto un ajuste de condiciones en el análisis del grupo de los HAP's ligeros o el de los HAP's pesados provocaría que otro u otros compuestos del grupo no fueran recuperados completamente.

Es importante hacer notar que para estos tres solutos "problema" el intervalo de confianza para la pendiente muestra que la recuperación mínima esperada es superior al 80%, lo cual puede considerarse bastante aceptable tomando en cuenta las concentraciones extremadamente bajas a las cuales se realizó el estudio. De hecho, estos niveles de concentración están impuestos por la propia baja solubilidad de los HAP's en los medios acuosos. Por otra parte el benzo (a) antraceno es el único soluto para el cual se obtiene una recuperación estadísticamente superior al 100%. Puesto que este compuesto es detectado por fluorescencia y eluye en una región del cromatograma donde no hay otros picos cercanos (figuras III.1.2 y III.1.4), el error no puede ser atribuido a problemas en la integración del pico por falta de resolución. Una explicación que se podría proponer es la de la coelución de alguna impureza, (proveniente del acetonitrilo o el agua utilizados en la preparación de las muestras o bien liberada por la membrana de filtración), la cual fue también preconcentrada durante el paso de la muestra a través de la precolumna de extracción en fase sólida. Sin embargo el aplicar el método punto por punto, con los mismos reactivos y materiales a muestras de agua (obtenida del deionizador Nanopure) sin dopar, no se observó la presencia de señales que interfirieran con los picos de los HAP's (figuras III.2.17 y III.2.18).

Según la discusión anterior no es posible explicar el resultado en exceso que se obtiene para el benzo(a)antraceno, aunque cabe aclarar que el error es bastante pequeño ya que el intervalo de confianza para la pendiente se encuentra entre 1.04 y 1.08 (104% a 108% de recuperación).

En lo que se refiere a la ordenada al origen, las tablas III.2.19 y III.2.20 muestran que es estadísticamente igual a cero para todos los HAP's. Por lo tanto, se infiere que el método desarrollado no presenta errores sistemáticos.

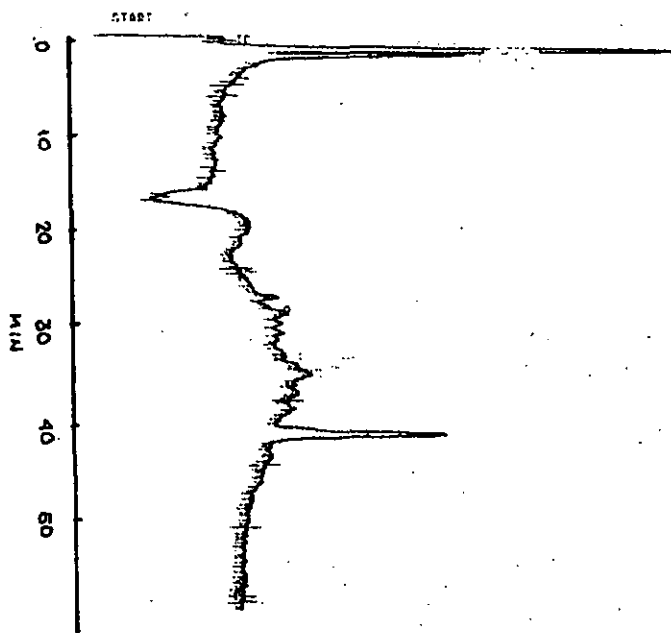


Figura III.2.17 Blanco de muestra (UV). Análisis de una muestra grado reactivo sin dopar tratada por el procedimiento de HAP's pesados.

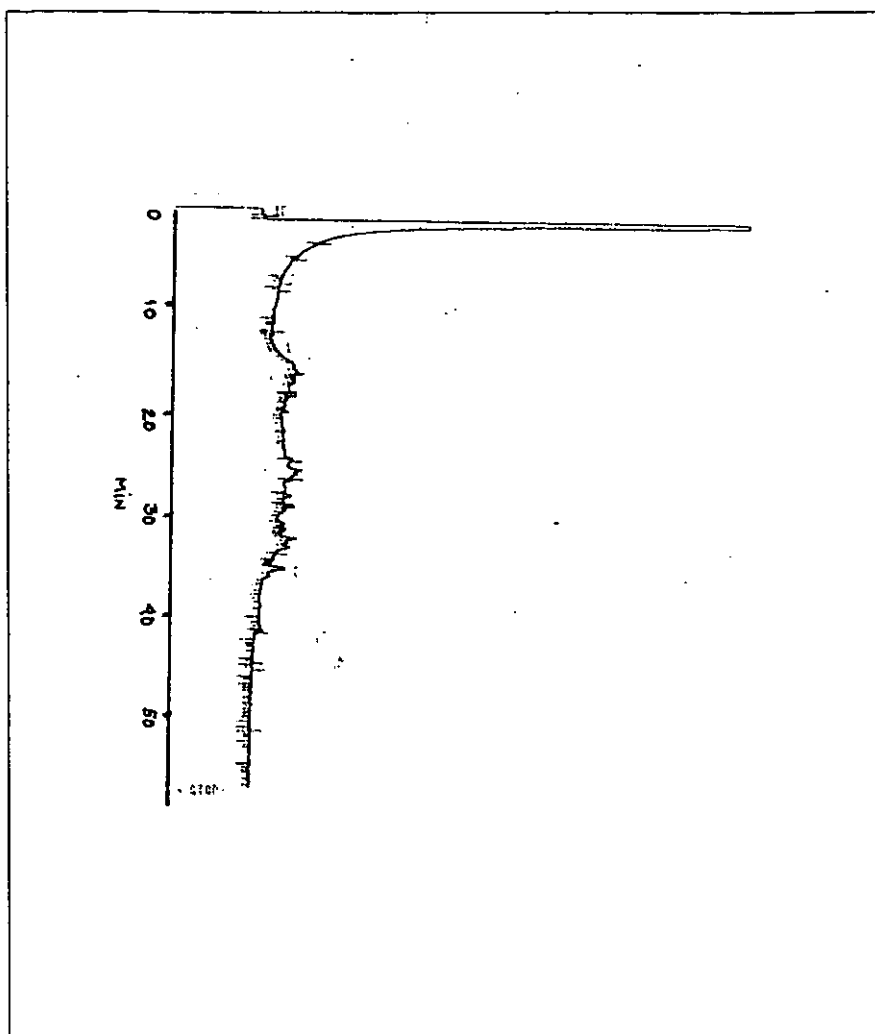


Figura III.2.18 Blanco de muestra (Fluorescencia). Análisis de una muestra de agua grado reactivo sin dopar tratada por el procedimiento de HAP's pesados.

III.3 Precisión y Exactitud a Concentraciones Cercanas a los Límites de Cuantificación del Método.

La precisión está relacionada con la dispersión de las medidas alrededor del valor medio y es expresada por la desviación standard (s) y el coeficiente de variación (CV). Ambos parámetros (s y CV), permiten evaluar la incertidumbre de un resultado debido al error aleatorio que se manifiesta en la dispersión de los datos alrededor de la media (ecuaciones ver anexo 1).

Existen diversos criterios para juzgar la validez de un método analítico en función de los rendimientos y el coeficiente de variación. Aunque estos criterios dependen fuertemente del uso final que se dará a los resultados del análisis (p.ej. certificación de fármacos, normatividad ambiental, diagnóstico clínico etc.), una componente importante para su establecimiento es la magnitud porcentual o la masa relativa del analito en la muestra. Así, para un valor dado de CV, la aceptación o rechazo dependerá si el analito es un componente principal en la muestra o si se encuentra a nivel de trazas.

Horwitz³² propone relacionar el CV con la concentración del analito en la muestra mediante una expresión empírica obtenida con base en 150 ensayos interlaboratorio de la AOAC, los cuales fueron realizados utilizando diferentes técnicas y metodologías. Dicha expresión es la siguiente:

$$CV = 2^{(1-0.5\log C)}$$

Donde, C es la concentración adimensional del analito. Por ejemplo, si la concentración del analito es de 1 ppm ($C = 10^{-6}$, mg de soluto/mg de muestra), el criterio de aceptación es $CV \leq 16\%$; para una concentración de 1 ppb ($C = 10^{-9}$) basta con un $CV \leq 45\%$.

Por otra parte, el CFR³³ (Código de Registros Federales) de E.U. , aplicado principalmente en análisis de fármacos en formulaciones y fluidos biológicos (p.ej. ensayos de bioequivalencia y biodisponibilidad), establece como criterios de aceptación los siguientes:

- El método es exacto si el rendimiento obtenido para cualquier punto en el intervalo de concentraciones definido por el método se sitúa entre $\pm 15\%$ con respecto al valor real y entre $\pm 20\%$ si se trata del límite de cuantificación.
- El método es preciso si, para cualquier punto del intervalo de concentraciones definido, el CV es $\leq 15\%$ y para el límite de cuantificación $\leq 20\%$.

En el caso del análisis de contaminantes en muestras ambientales, la NPS (National Pesticide Survey) y la EPA establecen como valores aceptables en muestras fortificadas al nivel de las ppb ($\mu\text{g/L}$) una recuperación de los analitos entre 70 y 130%³⁴.

TABLA III.3.1 Exactitud y precisión del método a muy bajos niveles de concentración de los HAP's en muestras de agua grado reactivo

| Analito | n | Recuperación (%) promedio | s (recuperación) | CV | Conc. ppt (ng/L) |
|--------------------------|---|---------------------------|------------------|------|------------------|
| Naftaleno | 4 | 129 | 4.01 | 3.1 | 161 |
| Acenafteno | 4 | 101 | 5.4 | 5.4 | 190 |
| Acenaftileno | 4 | 94 | 9.0 | 9.6 | 183 |
| Fluoreno | 4 | 99 | 6.4 | 6.4 | 34.1 |
| Fenantreno | 4 | 100 | 4.8 | 4.8 | 55.5 |
| Antraceno | 4 | 94 | 9.5 | 10.1 | 37.2 |
| Fluoranteno | 4 | 85 | 2.2 | 2.5 | 15.0 |
| Pireno | 4 | 77 | 2.7 | 3.4 | 36.3 |
| Criseno | 4 | 92 | 17.4 | 18.9 | 42.1 |
| Benzo(a)antraceno | 4 | 100 | 18.7 | 18.6 | 33.3 |
| Benzo(a)pireno | 4 | 107 | 3.7 | 3.5 | 8.6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 4 | 84 | 4.7 | 5.6 | 10.7 |
| Benzo(k)fluoranteno | 4 | 77 | 5.6 | 7.2 | 8.3 |
| 1,2,5,6 dibenzoantraceno | 4 | 72 | 7.1 | 9.9 | 105 |
| Benzo(ghi)perileno | 4 | 94 | 8.0 | 8.5 | 8.6 |
| Indeno(1,2,3)pireno | 4 | 82 | 9.9 | 12 | 41.0 |

En este trabajo se decidió estudiar la precisión y exactitud del método a las concentraciones mas bajas de los HAP's utilizadas en el estudio de linealidad, reportado en la sección anterior. El objetivo de ello fue el determinar si a estos niveles de concentración, del orden de las partes por trillón (ng/L), el método desarrollado cumplía con alguno(s) de lo(s) criterios de aceptación antes mencionados.

TABLA III.3.2 Intervalos de confianza para la recuperación de los HAP's a partir de muestras de agua grado reactivo dopadas a muy bajos niveles de concentración

| Analito | Intervalo de Confianza ($\alpha=0.05$) |
|--------------------------|---|
| Naftaleno | $122 \leq R \leq 135$ |
| Acenafteno | $92 \leq R \leq 109$ |
| Acenaftileno | $80 \leq R \leq 108$ |
| Fluoreno | $89 \leq R \leq 109$ |
| Fenantreno | $92 \leq R \leq 108$ |
| Antraceno | $79 \leq R \leq 109$ |
| Fluoranteno | $82 \leq R \leq 89$ |
| Pireno | $73 \leq R \leq 81$ |
| Criseno | $64 \leq R \leq 120$ |
| Benzo(a)antraceno | $70 \leq R \leq 130$ |
| Benzo(a)pireno | $101 \leq R \leq 113$ |
| Benzo(b)fluoranteno | $76 \leq R \leq 91$ |
| Benzo(k)fluoranteno | $68 \leq R \leq 86$ |
| 1,2,5,6 dibenzoantraceno | $61 \leq R \leq 84$ |
| Benzo(ghi)perileno | $81 \leq R \leq 106$ |
| Indeno(1,2,3)pireno | $67 \leq R \leq 98$ |

Con una mezcla estándar de los HAP's se doparon muestras de agua pura a las concentraciones señaladas en la tabla III.3.1 para cada analito. Se analizaron 4 muestras para los HAP's ligeros y 4 para los HAP's pesados según el método desarrollado. Los resultados obtenidos se reportan en la misma tabla. Los intervalos de confianza para el % de recuperación de los HAP's calculados a un nivel de confianza $\alpha=0.05$ (anexo1) se presentan en la tabla III.3.2.

Los resultados muestran que la recuperación promedio de todos los HAP's se sitúa entre 70% y 130% además el coeficiente de variación es inferior al 20%. Por lo tanto se puede decir que a estos niveles de concentración, el método desarrollado cumple con los criterios de aceptación de la NPS y la EPA respecto a la recuperación y muy holgadamente con el criterio propuesto por Horwitz³² para el CV. Asimismo, para todos los solutos se cumple con los criterios de aceptación para la precisión al límite de cuantificación establecido por el CFR³³. Sin embargo, 4 solutos no cumplen con el criterio de aceptación para la exactitud al límite de cuantificación establecido por este organismo. En realidad, en el área de aplicación de los preceptos del CFR, las concentraciones de los analitos en las muestras a determinar son generalmente superiores a la ppm. Por ello los criterios de aceptación son más exigentes que los de la EPA y la NPS que se refieren a concentraciones mil veces menores.

En conclusión, se puede afirmar que el método desarrollado cumple con los criterios de aceptación en cuanto a precisión y exactitud para los niveles de concentración estudiados. Estos niveles que podrían ser clasificados como ultratrazas, son de hecho entre 6 y 100 veces menores a la concentración (del orden de las ppb) que ha sido tomada como referencia para fijar los criterios de aceptación de la EPA y la NPS.

III.4 Límites de Detección y Cuantificación.

El límite de detección está definido como la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse. Su determinación se puede efectuar por comparación con la respuesta de un blanco, considerando como límite de detección la concentración de un analito cuya señal supere la relación señal/ruido en un factor de 3.

El límite de cuantificación corresponde a la menor concentración de analito que pueda determinarse con una precisión y exactitud establecidas. Tal como se discutió en la sección III.3. Otros criterios establecen el límite de cuantificación como aquella concentración del analito que produce una respuesta superior a la relación señal/ruido en un factor de 10.

Los límites de cuantificación también pueden estimarse a partir de la curva Área vs Concentración obtenida por el análisis de muestras sintéticas dopadas con el analito a diferentes niveles de concentración y analizadas según el método desarrollado. Usualmente se toma como límite de detección la concentración que corresponde a tres veces el valor de la desviación estándar de regresión, calculada a partir de los datos experimentales. El límite de cuantificación sería aquella concentración que corresponde a 10 veces el valor de dicha desviación estándar.

En los experimentos efectuados para el estudio de linealidad del método (sección III.2), el análisis de las muestras se hizo en diferentes días. Por ello el área de los picos de los analitos para los diferentes puntos no solo está afectada por la concentración y el error experimental, sino también por la variabilidad en las respuestas de los detectores de día a día. Por lo tanto no se consideró adecuado calcular los límites de detección con base en la curva Área vs Concentración.

Otra opción para la estimación de los límites de detección y cuantificación es utilizar la desviación estándar (en unidades de concentración) obtenida por el análisis de varias replicas de una muestra dopada a muy bajos niveles de concentración; de hecho cercanos a los límites de cuantificación, según este procedimiento (USEPA³⁵) el límite de detección del método (LDM) se estima a partir de la siguiente ecuación:

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

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 y n es el número de datos. Utilizando los resultados de los experimentos reportados en la tabla III.3.1, donde la concentración de los HAP's es cercana al límite de cuantificación, se calcularon las desviaciones estándar en unidades de concentración para cada compuesto (tablas III.4.1 y III.4.2). A partir de estos valores se determinó el límite de detección para cada HAP por medios de la ecuación (). Los resultados expresados en concentración (ppt) del analito en la muestra y en cantidad (ng) de soluto que pueden ser detectados por el método desarrollado, se presentan en la Tabla III.4.3.

Para el límite de cuantificación se optó por utilizar un valor de diez veces la desviación estándar calculada en unidades de concentración. Los resultados se muestran en la tabla III.4.4.

Tabla III.4.1 Desviación estándar de la concentración determinada para HAP's ligeros a niveles cercanos al límite de cuantificación

| Analito | N | S (ppt) |
|---------------------------------|---|------------|
| Naftaleno Conc. = 160.8 ppt | 4 | 6.48 |
| Acenafteno Conc. = 190.0 ppt | 4 | 10.3 |
| Acenaftileno Conc. = 182.4 | 4 | 16.5 |
| Fluoreno Conc. = 34.1 ppt | 4 | 2.17 |
| Fenantreno Conc. = 55.1 ppt | 4 | 2.64 |
| Antraceno Conc. = 37.2 ppt | 4 | 3.53 |
| Fluoranteno Conc. = 15.0 | 4 | 0.324 |
| Pireno Conc. = 36.2 ppt | 4 | 1.06 |

Tabla III.4.2. Desviación estándar de la concentración determinada para HAP's pesados a niveles cercanos al límite de cuantificación

| Analito (ppt) | N | S (ppt) |
|---|---|---------|
| Criseno Conc. = 42.1 | 4 | 7.33 |
| Benzo(a) antraceno Conc. = 33.3 | 4 | 6.21 |
| Benzo(a)pireno Conc. = 8.6 | 4 | 0.323 |
| Benzo(b)Fluoranteno Conc. = 10.7 | 4 | 0.504 |
| Benzo(k)Fluoranteno Conc. = 8.3 | 4 | 0.461 |
| 1,2,5,6 Dibenzoantraceno Conc. = 104.6 | 4 | 7.44 |
| Benzo(ghi) perileno Conc. = 8.6 | 4 | 0.685 |
| Indeno (1,2,3)pireno Conc. = 41.0 | 4 | 4.05 |

Tabla III.4.3 Límites de detección del método

| Analito | Límite de detección* Conc. = ppt | Límite de detección* (ng) | Límite de detección** Conc. = ppt |
|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| Naftaleno | 29.4 | 0.55 | 1800 |
| Acenafteno | 46.6 | 0.87 | 1800 |
| Acenaftileno | 74.9 | 1.40 | 2300 |
| Fluoreno | 9.8 | 0.18 | 210 |
| Fenantreno | 12.0 | 0.23 | 640 |
| Antraceno | 16.0 | 0.30 | 660 |
| Fluoranteno | 1.5 | 0.03 | 210 |
| Pireno | 4.8 | 0.09 | 270 |
| Criseno | 33.3 | 0.62 | 150 |
| Benzo(a)antraceno | 28.2 | 0.53 | 13 |
| Benzo(a)pireno | 1.5 | 0.03 | 23 |
| Benzo(b)fluoranteno | 2.3 | 0.04 | 18 |
| Benzo(k)fluoranteno | 2.1 | 0.04 | 17 |
| 1,2,5,6 Dibenzoantraceno | 33.8 | 0.63 | 30 |
| Benzo-(ghi)-perileno | 3.1 | 0.06 | 76 |
| Indeno-(1,2,3-cd)-pireno | 18.4 | 0.35 | 43 |

*Este método

**Método EPA 610³⁸

TABLA III.4.4 Límites de cuantificación del método

| Analito | Límite de cuantificación (ppt) | Límites de cuantificación (ng) |
|--------------------------|---|---|
| Naftaleno | 64.8 | 1.2 |
| Acenafteno | 103.0 | 1.9 |
| Acenaftileno | 165.0 | 3.1 |
| Fluoreno | 21.7 | 0.4 |
| Fenantreno | 26.4 | 0.5 |
| Antraceno | 35.3 | 0.7 |
| Fluoranteno | 3.24 | 0.06 |
| Pireno | 10.6 | 0.2 |
| Criseno | 73.3 | 1.4 |
| Benzo(a)antraceno | 62.1 | 1.2 |
| Benzo(a)pireno | 3.2 | 0.06 |
| Benzo(b)fluoranteno | 5.0 | 0.09 |
| Benzo(k)fluoranteno | 4.6 | 0.09 |
| 1,2,5,6 Dibenzoantraceno | 74.4 | 1.4 |
| Benzo(ghi)perileno | 6.8 | 0.1 |
| Indeno(1,2,3)pireno | 40.5 | 1.5 |

III.5 Aplicación del Método al Análisis de Muestras

Para todos los ensayos realizados en esta sección se utilizó una columna Envirosep nueva porque la columna empleada en todo el trabajo precedente empezó a tener problemas (cromatogramas muy sucios) que no pudieron corregirse a pesar de haberla sometido a un lavado exhaustivo con una serie de disolventes. Desafortunadamente, la nueva columna adquirida tenía un diámetro interno mayor, por lo que la retención de los solutos se corrió hacia tiempos mas grandes; sin embargo, se mantuvo una resolución similar entre los picos. El problema provino de un "pico fantasma" o "pico de gradiente", el cual, en la primera columna aparecía después del criseno en el cromatograma de UV, sin provocar interferencias para la cuantificación de los picos de interés, pero en la columna nueva el pico eluyó completamente traslapado con el criseno impidiendo la determinación de este soluto.

Cabe mencionar que la elución de un "pico fantasma" puede ser modificada por cambios en las pendientes del gradiente pero esto provocaría también cambios importantes en la retención de los HAP's y en la resolución entre los picos. Considerando que la certificación del método fue hecha bajo ciertas condiciones de resolución, se optó por no modificar el programa de gradiente. Por lo tanto en todos los experimentos que se reportan en esta sección no se presentarán resultados para criseno.

III.5.1 Estabilidad de los HAP's en muestras de agua pura mantenida a temperatura ambiente por 24 horas.

Para este experimento se fortificaron dos muestras de agua grado reactivo con la mezcla de los HAP's a las concentraciones presentadas en la tabla III.5.1. Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección II.4.B, una para HAP's ligeros y otra para HAP's pesados. Los kitazatos con las muestras ya preparadas se taparon con papel aluminio y se dejaron por 24 horas sobre la mesa de laboratorio expuestos a la luz y a la temperatura ambiente. Después de este tiempo se continuó con la preconcentración de las muestras y los subsecuentes pasos para su análisis.

La recuperación obtenida para cada analito se reporta en la tabla III.5.1. Dado que las concentraciones en este experimento están dentro del intervalo de concentraciones considerado en el estudio de linealidad (sección III.2), los resultados obtenidos se compararon con el intervalo de confianza determinado para la pendiente en dicho estudio (Tabla III.2.18).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

De esta comparación se deduce que hubo pérdidas importantes de antraceno, benzo(k)fluoranteno, benzo(ghi)perileno e indeno (1,2,3) pireno. También hubo una pequeña pérdida de fenantreno y benzo(b)fluoranteno (< 10%). Por el contrario, se observó un ligero incremento estadísticamente significativo en la concentración recuperada del benzo(a)antraceno (< 10%).

Estos resultados parecen indicar que algunos HAP's no son suficientemente estables en disolución acuosa, aún en presencia del acetonitrilo que se añadió a las muestras durante su preparación. Es de notar que esta degradación solo se produce en miembros del grupo de los HAP's pesados, a excepción del antraceno, el cual es de hecho un compuesto frontera entre los dos grupos.

TABLA III.5.1 Estabilidad de HAP's en la muestra de agua grado reactivo

| Nombre | % de Recuperación | Concentración (ppt)* |
|--------------------------|-------------------|----------------------|
| Naftaleno | 94.8 | 322 |
| Acenafteno | 106 | 379 |
| Acenaftileno | 102 | 365 |
| Fluoreno | 114 | 68.2 |
| Fenantreno | 94.3 | 111 |
| Antraceno | 72.5 | 74.2 |
| Fluoranteno | 107 | 59.7 |
| Pireno | 90.8 | 72.5 |
| Benzo(a)antraceno | 115 | 133 |
| Benzo(a)pireno | 99.0 | 34.6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 94.3 | 42.6 |
| Benzo(k)fluoranteno | 82.2 | 33.3 |
| 1,2,5,6 dibenzoantraceno | 96.2 | 420 |
| Benzo(ghi)perileno | 66.0 | 34.6 |
| Indeno(1,2,3)pireno | 60.4 | 164 |

*concentración nominal a la que fue dopada la muestra

III.5.2 Estabilidad de HAP's en muestras de agua potable mantenidas a temperatura ambiente por 24 horas

Las muestras fueron tomadas de la llave de suministro de agua potable al laboratorio de cromatografía de líquidos. Esta agua proviene de la planta potabilizadora de Ciudad Universitaria.

Las muestras de agua potable se doparon con la mezcla de poliaromáticos a las mismas concentraciones que en el ensayo con agua grado reactivo (sección III.5.1) con el objeto de comparar la estabilidad de los solutos en ambos medios. Las muestras fueron preparadas según los procedimientos para HAP's ligeros y HAP's pesados y se dejaron en reposo a temperatura y luz ambiente durante 24 horas. Posteriormente se continuó con la preconcentración y análisis de cada muestra.

Para la discusión posterior es importante recordar que las muestras preparadas según el procedimiento para HAP's ligeros se emplean en la determinación de: naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, fenantreno y pireno, que se detectan por UV, así como: antraceno y fluoranteno, que se detectan por fluorescencia. Por otra parte; los solutos determinados con la muestra preparada para HAP's pesados son: benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzoantraceno, benzo(ghi)perileno e indeno-(1,2,3)-pireno, que se detectan por fluorescencia; el criseno también pertenece al grupo de pesados y se detecta por UV, pero como ya se explicó anteriormente, no se cuantificó en estos ensayos debido a la coelución del pico de gradiente. Dentro de esta familia de HAP' los solutos fenantreno, antraceno, fluoranteno, y pireno se pueden considerar solutos frontera ya que, según lo observado en el trabajo previo, se recuperan bien tanto si se utiliza el procedimiento de preparación de muestra para HAP's ligeros como el diseñado para HAP's pesados.

Con estas consideraciones, en la Tabla III.5.2 se muestran los resultados de recuperación obtenidos para HAP's en el presente ensayo. Como puede observarse, hay una pérdida muy importante de la gran mayoría de estos solutos cuando se dejan durante 24 horas disueltos en agua potable. Algunos compuestos como acenafteno, acenaftileno, pireno y benzo(k)fluoranteno se degradaron totalmente. Para el resto del grupo, con dos excepciones, las recuperaciones oscilan entre el 20% y el 75%. Los únicos solutos que se recuperaron completamente fueron el fluoreno y el benzo(a)pireno. Para este último compuesto la recuperación se encuentra ligeramente arriba del 100%, lo cual puede atribuirse a la coelución de alguna pequeña impureza presente en el agua potable o formada durante la degradación de los otros HAP's. Comparando las tablas III.5.1 y III.5.2 se deduce que la estabilidad de los HAP's es mucho menor en agua potable que en agua grado reactivo, lo cual muy probablemente es debido al cloro residual en el agua potable.

TABLA III.5.2 Estabilidad de HAP's en la muestra de agua potable

| Nombre | % de Recuperación | Concentración (ppt)* |
|--------------------------|-------------------|----------------------|
| Naftaleno | 62.2 | 322 |
| Acenafteno | ----- | 379 |
| Acenaftileno | ----- | 365 |
| Fluoreno | 102 | 68.2 |
| Fenantreno | 54.9 | 111 |
| Antraceno | 21.3 | 74.2 |
| Fluoranteno | 55.0 | 59.7 |
| Pireno | ----- | 72.5 |
| Benzo(a)antraceno | 30.7 | 133 |
| Benzo(a)pireno | 109 | 34.6 |
| Benzo(b)fluoranteno | 73.9 | 42.6 |
| Benzo(k)fluoranteno | ----- | 33.3 |
| 1,2,5,6 dibenzoantraceno | 67.9 | 420 |
| Benzo(ghi)perileno | 25.5 | 34.6 |
| Indeno(1,2,3)pireno | 44.7 | 164 |

* concentración nominal a la que fue dopada la muestra

Por otra parte, es muy interesante comparar entre sí los cromatogramas obtenidos en estos experimentos. La figura III.5.1 muestra los cromatogramas UV obtenidos de la inyección del estándar con el que fue dopada el agua potable y del análisis de las muestras de HAP's ligeros y pesados. Aunque la línea base en los cromatogramas de la muestra presenta mucho ruido pueden observarse claramente los picos de los solutos de interés. En el cromatograma de HAP's ligeros sólo aparecen claramente definidos los picos de naftaleno, fluoreno, fenantreno y el pico de gradiente que engloba a la pequeña cantidad de criseno que alcanza a recuperarse en este análisis. Por comparación con el cromatograma del estándar se observa la disminución de los picos del naftaleno y fenantreno, así como la completa desaparición de acenafteno, acenaftileno y pireno. En el cromatograma de HAP's pesados se detectan pequeños picos de naftaleno y fluoreno (lo que alcanza recuperarse en este análisis), un pico de fenantreno similar al del estándar, un pequeño pico del pireno correspondiente a menos del 50% del pico del estándar y el pico del criseno coeluyendo con el pico de gradiente. Cabe mencionar que el pico de gradiente varía de tamaño aleatoriamente, razón por la cual aunque está englobado también en el pico de criseno del estándar, no es posible cuantificar este soluto.

De estas comparaciones se deduce que el pireno es ligeramente mas estable en la muestra de HAP's pesados y el fenantreno es completamente estable en esta muestra. Puesto que la única diferencia entre las muestras de HAP's ligeros y pesados es el contenido de acetonitrilo (5% y 25% respectivamente) se concluye que la presencia de este disolvente orgánico en el agua protege, hasta cierto punto, a los HAP's del ataque del cloro.

La figura III.5.2 muestra los cromatogramas de fluorescencia del estándar y de las muestras de agua potable dopadas. Como se observa, la línea base en los cromatogramas de las muestras es considerablemente menos ruidosa que la obtenida por UV. En el cromatograma de la muestra de HAP's ligeros se ve un paquete de picos que eluyen a bajos tiempos de retención (<30 min) que corresponden a productos formados por la degradación de los HAP's en el agua potable. Asimismo, el pico que eluye justo antes del benzo(a)antraceno corresponde a un producto de degradación. Los picos de antraceno y fluoranteno en esta muestra son pequeños comparados con los del estándar, indicando la fuerte destrucción de estos solutos; ambos picos presentan un pequeño hombro delantero debido a impurezas presentes en la muestra. En el cromatograma de los HAP's pesados se observa claramente la fuerte disminución de benzo(a)antraceno, benzo(ghi)perileno e indeno (1,2,3)pireno con respecto al estándar inyectado y es evidente la total destrucción del benzo(k)fluoranteno. También se observan algunos picos correspondientes a productos de degradación (uno antes del antraceno, otro junto al benzo(a)antraceno y un tercero que aparece como un hombro en el dibenzoantraceno). Sin embargo, hay muchos menos picos debidos a productos de degradación que en la muestra de HAP's ligeros. Son de notar particularmente las señales del antraceno y el fluoranteno; el primero ha desaparecido casi completamente, mientras que el segundo ha aumentado al grado que su recuperación calculada es del 150%. Esto indica que el antraceno no es protegido de la degradación por el mayor contenido de acetonitrilo en la muestra de HAP's pesados; de hecho el efecto puede ser contrario pues su grado de destrucción en la muestra de HAP's ligeros es menor. Por otra parte, el notable incremento del fluoranteno sólo puede ser explicado si se asume que: (1) este compuesto es estable en presencia de contenidos mayores de acetonitrilo en el agua potable y 2) el fluoranteno se forma como producto de degradación de HAP's mas pesados (por ej. El benzo(k)fluoranteno).

Por último es importante mencionar que aunque el benzo(a)pireno se recupera totalmente en la muestra de agua potable preparada para HAP's pesados, su estabilidad es debida al contenido de acetonitrilo. En efecto, en las muestras de agua grado reactivo preparadas para HAP's ligeros (con bajo contenido de acetonitrilo) su recuperación es del orden del 42 al 45%, debido a pérdidas por adsorción durante la preparación y filtración de la muestra; sin embargo en la muestra de agua potable para HAP's ligeros la recuperación del benzo(a)pireno fue de sólo 9%, lo que demuestra que no sólo hubo pérdidas por adsorción sino también hubo degradación del soluto remanente.

Como conclusión del estudio reportado en este inciso se puede establecer que la cloración del agua potable es un método eficaz para eliminar los HAP's de este medio, aún cuando se encuentren a muy bajos niveles de concentración (inferiores a la parte por billón). Se puede preveer que en muestras de agua potable, sin ningún disolvente orgánico, los HAP's estudiados podrían degradarse totalmente en un par de días. La única posible excepción es la del fluoreno que resistió muy bién el ataque del cloro en las muestras con bajo contenido de acetonitrilo. Por otra parte, es indudable que el método analítico desarrollado puede ser un buen medio para un estudio mas a fondo de la degradación de estos compuestos en el agua.

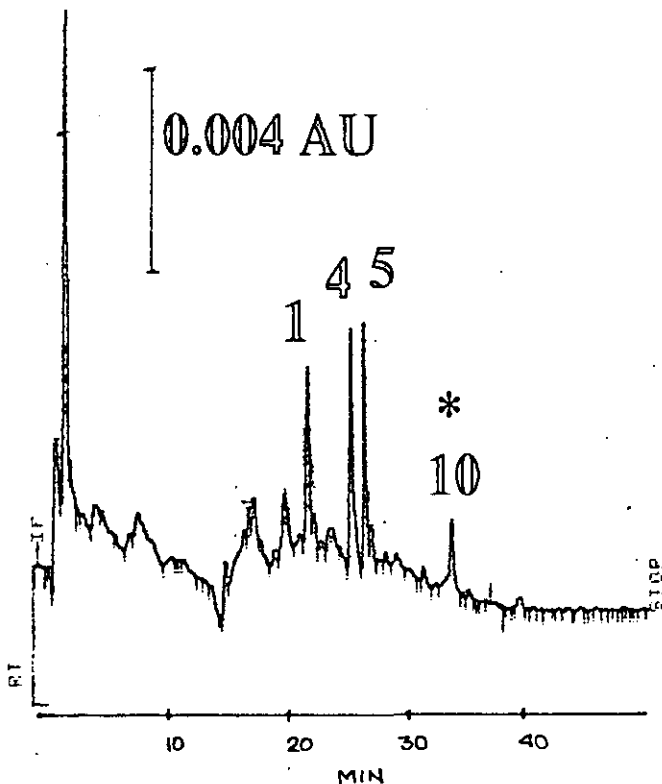


Figura III.5.1.a

Cromatograma UV obtenido de una muestra de agua potable de Ciudad Universitaria dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's ligeros. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm. (*) Pico de gradiente eluyendo con el criseno.

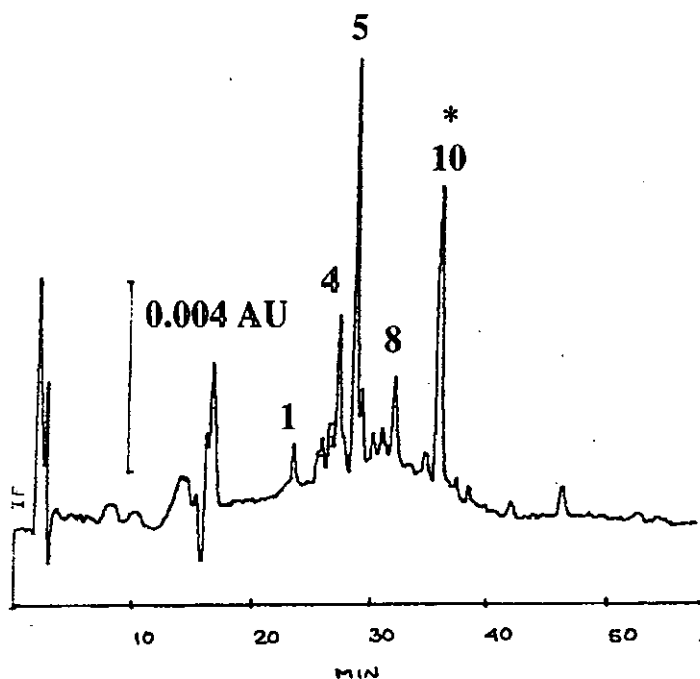


Figura III.5.1.b

Cromatograma UV obtenido de una muestra de agua potable de Ciudad Universitaria dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's pesados. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm. (*) Pico de gradiente eluyendo con el criseno.

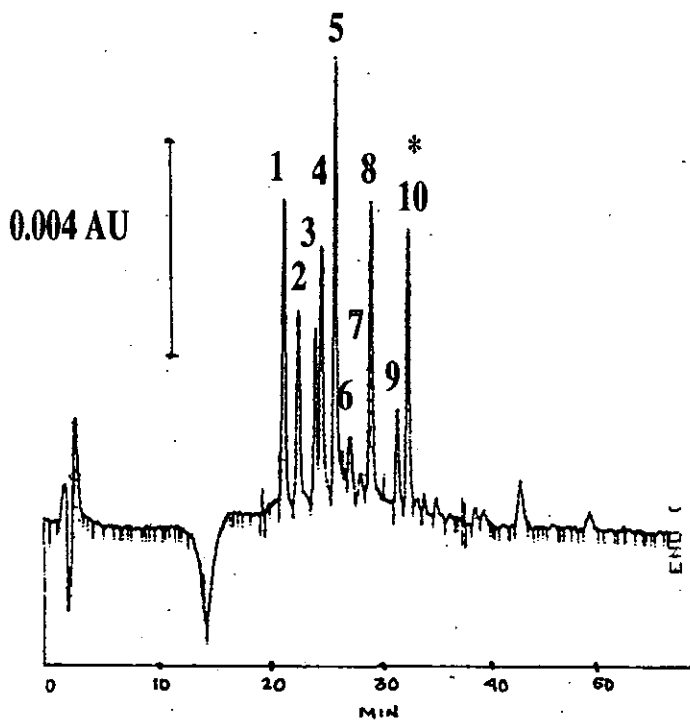


Figura III.5.1.c

Cromatograma UV del estándar de HAP's obtenido . La cantidad inyectada de cada soluto es similar a la cantidad teóricamente presente en 25 ml de la muestra de agua potable preparada. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm. (*) Pico de gradiente eluyendo con el criseno.

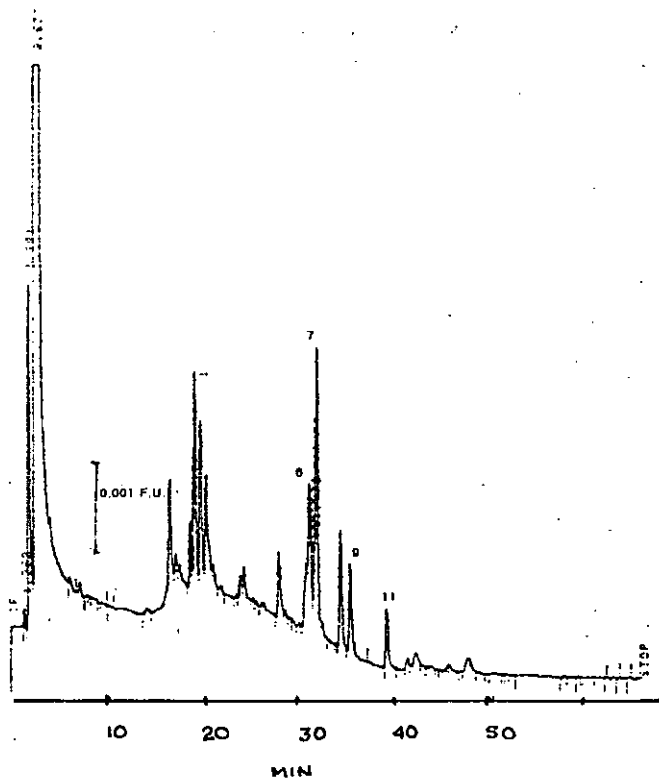


Figura III.5.2 a Cromatograma de fluorescencia obtenido de una muestra de agua potable de Ciudad Universitaria dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's ligeros. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.2.

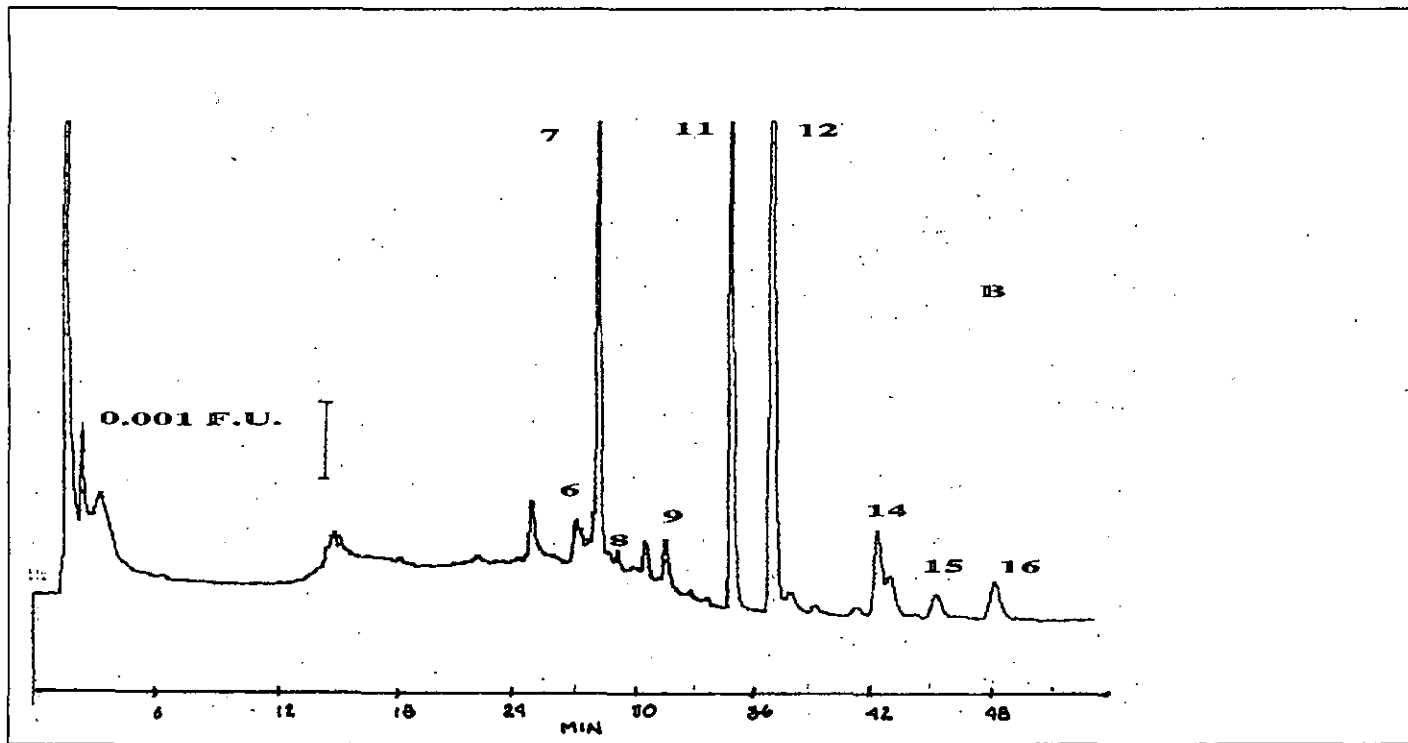


Figura III.5.2b Cromatograma de fluorescencia obtenido de una muestra de agua potable de Ciudad Universitaria dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's pesados. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.2.

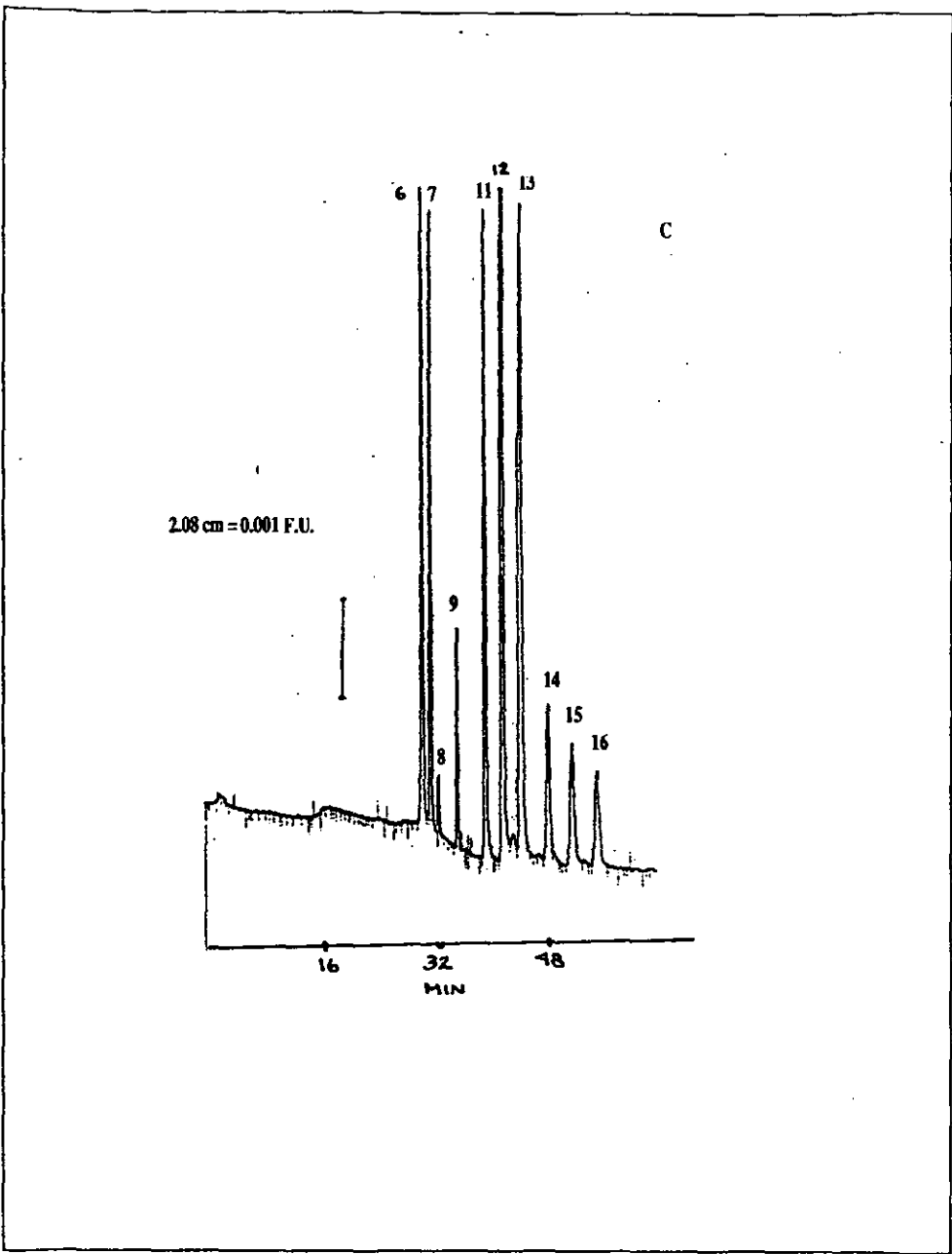


Figura III.5.2c Cromatograma de fluorescencia del estándar de HAP's . La cantidad inyectada de cada soluto es similar a la cantidad teóricamente presente en 25 ml de la muestra de agua potable preparada. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.2, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm.

III.5.3 Análisis de HAP's en una muestra de agua de río

Una de las ciudades inmersas en la zona petrolera de Tabasco es Paraíso, situado muy cerca de la terminal marítima de Dos Bocas. Por esta ciudad atraviesa un pequeño río llamado Río Seco, el cual fue seleccionado para probar el método desarrollado en una muestra real proveniente de una zona expuesta a la contaminación por HAP's.

Se colectó la muestra de agua de río a nivel superficial, en un envase de aluminio de aproximadamente 1 litro de capacidad con tapón hermético. El recipiente con la muestra se mantuvo a baja temperatura y se transportó vía aérea a la Ciudad de México para realizar el análisis. Cabe mencionar que no se colectó la muestra en los frascos de vidrio ambar de 75 ml sugeridos en el método porque se constató con un primer intentó fallido de transporte de muestra, que los frascos con los que se contaba no eran lo suficientemente herméticos y resistentes. Dado que, según nuestra experiencia, la adsorción de HAP's en superficies metálicas es mucho menor que en vidrio u otros materiales plásticos, se optó por emplear el envase de aluminio mencionado para la colección y transporte de la muestra. Una vez en el laboratorio, la muestra se vertió en los frascos de 75 ml y se guardó en refrigeración hasta su análisis.

La muestra blanco se preparó y analizó según los procedimientos para HAP's ligeros y pesados. Las figuras III.5.3 y III.5.4 muestran los cromatogramas de UV y Fluorescencia obtenidos. Como puede observarse, el perfil del cromatograma cambia drásticamente según el modo de preparación de la muestra. Los cromatogramas UV y Fluorescencia de las muestras tratadas según el procedimiento para HAP's ligeros presentan un gran pico de matriz al inicio del cromatograma. Posteriormente, en UV se observa un conglomerado (entre 17 y 37 min) con pequeños picos entre los cuales no destaca ninguno en particular pero, debido a que este conjunto eluye en el intervalo de tiempos de retención que corresponde a los HAP's ligeros que se cuantifican en UV, es evidente que en esta matriz los límites de detección inequívoca y cuantificación de estos compuestos serán mas altos que los determinados en agua grado reactivo. En lo que respecta al cromatograma correspondiente en fluorescencia, se observan también un conglomerado en el mismo intervalo de tiempo pero en este caso sí se observan varios picos grandes y bien definidos; entre ellos los únicos de interés son los últimos dos porque eluyen dentro del intervalo de tiempos de retención que corresponde a los HAP's que se cuantifican por fluorescencia. De hecho estos dos picos tienen tiempos de retención idénticos a los del antraceno y fluoranteno.

En los cromatogramas de las muestras preparadas por el procedimiento para HAP's pesados, el pico inicial de matriz es mucho mas pequeño y estrecho. Esto significa que una buena parte de las interferencias más polares presentes en la muestra se eliminan durante la etapa de concentración por fuga de la precolumna (se recuerda que en este procedimiento la solución de carga contiene 25% de acetonitrilo).

El conglomerado entre 17 y 37 minutos sigue apareciendo en los cromatogramas de los dos detectores, pero en fluorescencia las señales de los grandes picos han desaparecido casi completamente y sólo persisten los picos que eluyen a los tiempos de retención de antraceno y fluoranteno. Sin embargo, este último muestra una señal sobrepuesta que no apareció en el cromatograma de fluorescencia de HAP's ligeros. En cuanto al cromatograma UV de HAP's pesados, se observa un gran pico a los 18 min que no corresponde a ningún soluto de interés seguido de un conglomerado con algunas señales un poco más intensas y definidas que en el cromatograma de HAP's ligeros. En todo caso, el UV no se utiliza para cuantificar los HAP's pesados, excepto el criseno que como ya se ha mencionado no está considerado porque coeluye con un pico fantasma. De hecho este pico de gradiente se observa muy claramente al final del conglomerado en los dos cromatogramas de UV.

Como ya se ha mencionado, el antraceno y el fluoranteno son compuestos frontera que pueden determinarse tanto si la muestra se prepara por el procedimiento para HAP's ligeros como si se hace por el de HAP's pesados. Además, en las condiciones experimentales utilizadas, estos compuestos prácticamente no dan respuesta en UV (excepto a muy alta concentración) pero sí en fluorescencia. Considerando los 4 cromatogramas de la muestra de agua de río presentados en las figuras III.5.3 Y III.5.4 se puede asumir con bastante confiabilidad que los picos señalados en los cromatogramas de fluorescencia, que eluyen a los tiempos de retención de estos dos solutos, son efectivamente antraceno y fluoranteno.

La muestra de agua de río se fortificó con la mezcla de poliaromáticos a las mismas concentraciones estudiadas en las secciones anteriores con las muestras de agua grado reactivo y agua potable (tablas III.5.1 y III.5.2). Las muestras dopadas se prepararon por los procedimientos para HAP's ligeros y pesados y se analizaron.

Los objetivos de estos experimentos fueron:

1. Deducir si en el agua de río era posible detectar y cuantificar los HAP's a estas concentraciones.
2. Cuantificar al antraceno y al fluoranteno presentes en el blanco del agua de río.

Las figuras III.5.5 y III.5.6 muestran los cromatogramas obtenidos en UV y fluorescencia respectivamente. (En ambas figuras se presentan, el cromatograma de la muestra preparada para HAP's ligeros (cromatograma a) y el de la muestra preparada para HAP's pesados (cromatograma b). El estándar correspondiente es el mismo que se utilizó para el estudio de estabilidad en agua potable (figuras III.5.1c y III.5.2c)). La cantidad de cada soluto inyectado en el estándar corresponde aproximadamente a la cantidad que debería ser analizada en cada muestra si la recuperación fuera del 100%. La comparación cuidadosa de los cromatogramas muestra varios factores interesantes que se discuten a continuación.

Se observó que los picos de los HAP's en las muestras dopadas tienden a ser mas finos que en el estándar inyectado. Esto se ve claramente al comparar las alturas de los picos en el estándar y en la figura III.5.6b, que corresponde a las condiciones en las cuales se espera una recuperación cercana al 100% para los HAP's pesados. Las alturas de los picos 8 a 13 son significativamente mayores en la muestra. También se observa en la figura III.5.5b para los solutos frontera, fenantreno (pico 5) y pireno (pico 8). De hecho, en este último cromatograma se logra incluso separar el criseno (pico 10) del pico de gradiente por este particular efecto de afinación de los picos en la muestra. Se piensa que debido a la gran cantidad de materia orgánica que se acumula en la precolumna durante la etapa de carga y concentración de la muestra, se produce un efecto de compresión de bandas de los solutos y por lo tanto una afinación de los picos.

Los efectos que provoca la matriz en la forma de los picos, aunados al "ruido" o "absorbancia de fondo" de la propia matriz hacen inviable la cuantificación de los analitos por estandarización externa. En este caso el único método de cuantificación aceptable es por adiciones patrón.

Por otra parte, los cromatogramas obtenidos muestran que, a las concentraciones trabajadas, los HAP's ligeros que se determinan por UV se encuentran prácticamente al nivel del límite de detección en esta muestra. Por tanto, aún utilizando el método de adiciones patrón, su cuantificación a estas concentraciones resultaría poco confiable. Las únicas excepciones serían el fenantreno (pico 5) y el pireno (pico 8) cuyas señales son francamente superiores al ruido de fondo.

Por el contrario, todo los HAP's que se determinan por fluorescencia sí pueden ser cuantificados en esta matriz a los niveles de concentración trabajados, es decir del orden de algunas decenas o centenas de partes por trillón, dependiendo del analito considerado.

La cuantificación del antraceno y el fluoranteno presentes en el agua de río se realizó con base en los cromatogramas de la muestra blanco y la muestra dopada ambas preparadas por el procedimiento para HAP's ligeros.

Los cálculos se detallan en el anexo 1 y los resultados obtenidos se presentan en la tabla III.5.3. Una porción de la muestra se guardó en refrigeración y se analizó dos semanas después para ver si el antraceno y el fluoranteno permanecían estables en la matriz en estas condiciones. Los resultados de este análisis se reportan también en la tabla III.5.3.

TABLA III.5.3 Análisis de HAP's en una muestra de agua proveniente del Río Seco en Paraíso, Tab.

| Soluto | Concentración (ppt) | Observaciones |
|-------------|---------------------|--|
| Antraceno | 29 | Muestra analizada una semana después de ser colectada |
| Fluoranteno | 26 | |
| Antraceno | 25 | Muestra analizada tres semanas después de ser colectada. |
| Fluoranteno | 18 | |

De los resultados obtenidos en esta sección se concluye lo siguiente.

- a) El método desarrollado permite detectar naftaleno, acenafteno, acenaftileno y fluoreno a niveles de concentración ligeramente menores a 0.5 ppb en matrices acuosas complejas como el agua de río.
- b) Este método permite cuantificar fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, dibenzoantraceno, benzo(ghi)perileno e indeno-(1,2,3)-pireno a concentraciones inferiores a 0.5 ppb en aguas superficiales. De hecho la mayoría de estos compuestos pueden incluso cuantificarse a concentraciones inferiores a 0.1 ppb.
- c) Se detectó la presencia de antraceno y fluoranteno en una muestra de agua proveniente del Río Seco en Paraíso Tab. Las concentraciones determinadas 1 semana después de haber colectado la muestra fueron de 29 y 26 ng/L respectivamente. Sin embargo se observó una disminución de la concentración de estos solutos en la muestra que fue guardada en refrigeración por dos semanas. Por lo tanto se presume que la concentración de estos contaminantes en el río debió ser ligeramente mayor a los valores determinados.

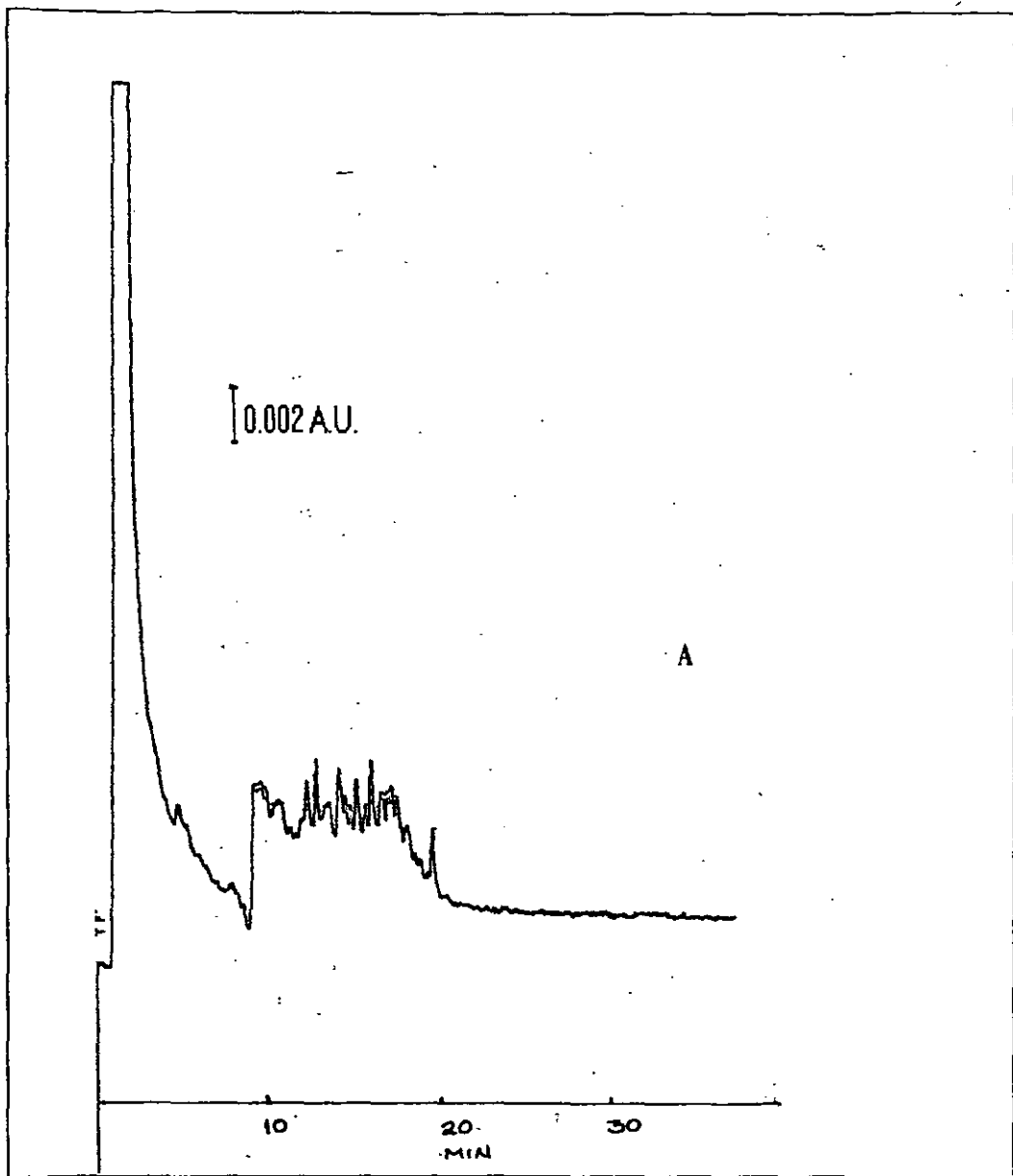


Figura III.5.3.a Cromatograma UV obtenido del análisis de una muestra del "Río Seco" sin dopar tratada por el procedimiento para HAP's ligeros. Condiciones cromatográficas como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm.

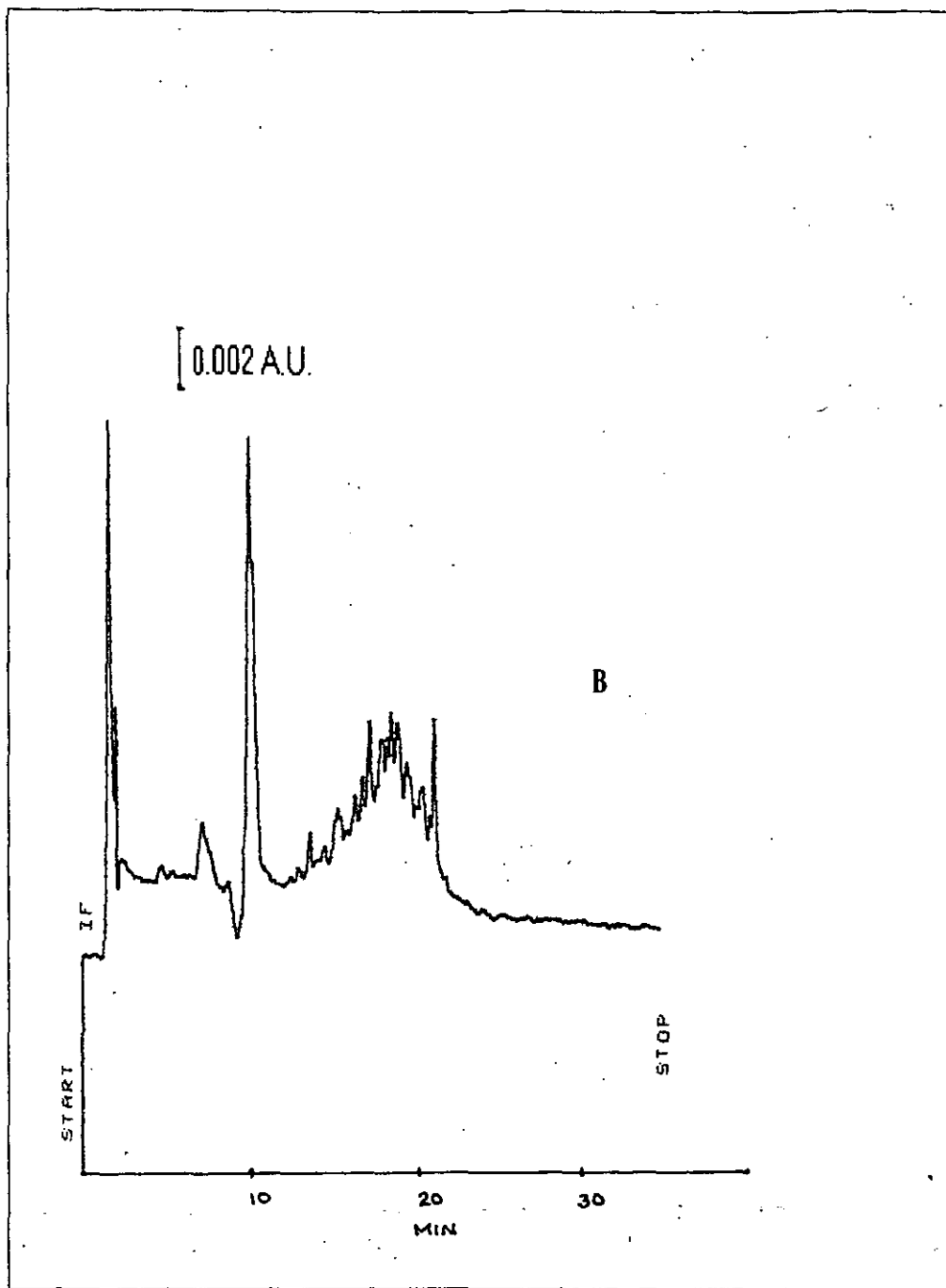


Figura III.5.3.b Cromatograma UV obtenido del análisis de una muestra del "Río Seco" sin dopar tratada por el procedimiento para HAP's pesados. Condiciones cromatográficas como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de la columna de 4.6 mm.

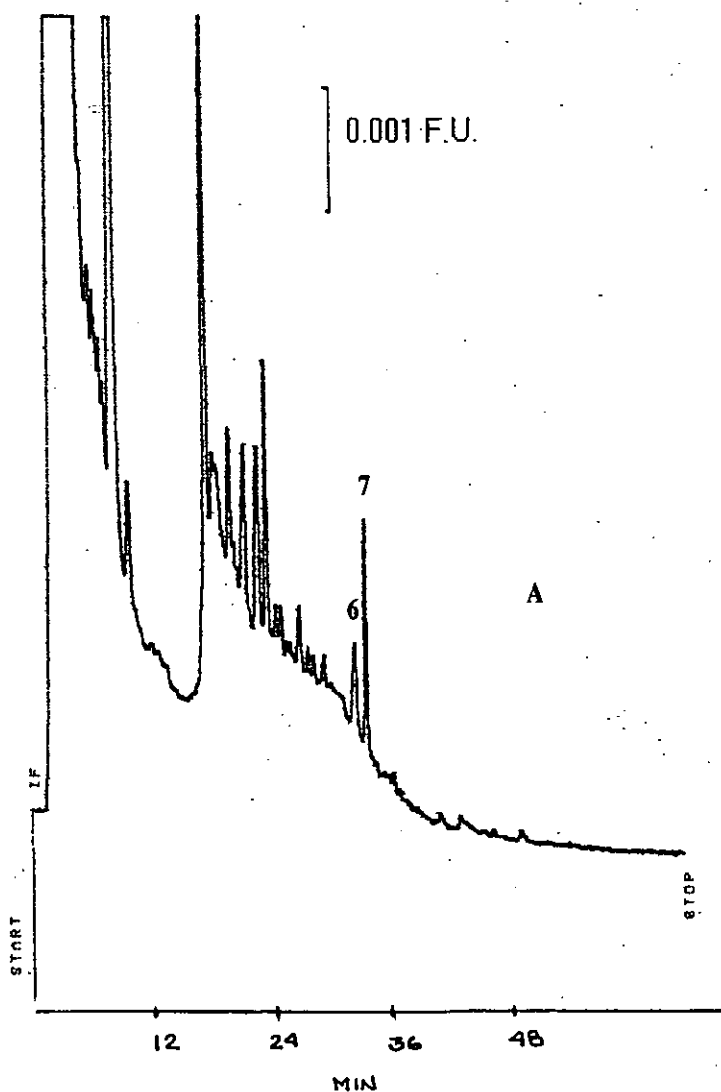


Figura III.5.4 a Cromatograma de fluorescencia obtenidos del análisis de una muestra de agua del "Río Seco" preparada por el procedimiento para HAP's ligeros . Los picos señalados corresponden probablemente a Antraceno y Fluoranteno. Condiciones cromatográficas como en la figura III.1.2.

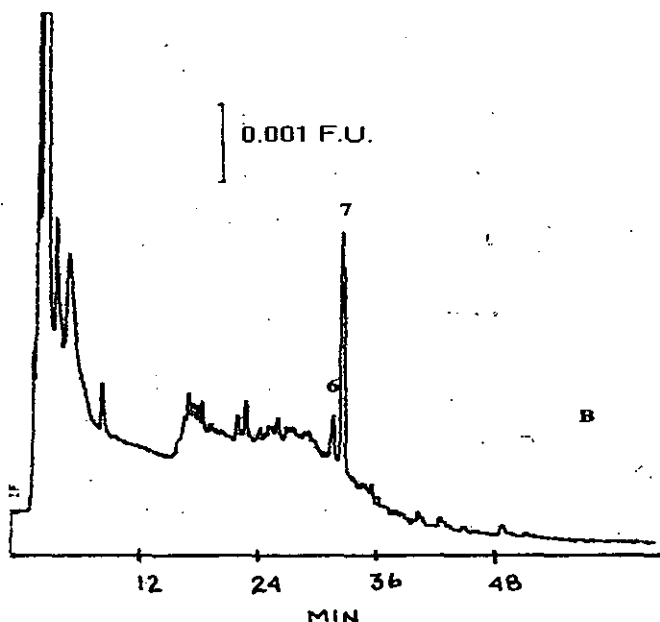


Figura III.5.4. b Cromatograma de fluorescencia obtenido del análisis de una muestra de agua de "Río Seco" preparada por el procedimiento para HAP's pesados. Los picos señalados corresponden probablemente a Antraceno y Fluoranteno. Condiciones cromatográficas como en la figura III.1.2, excepto diámetro interno de columna de 4.6 mm.

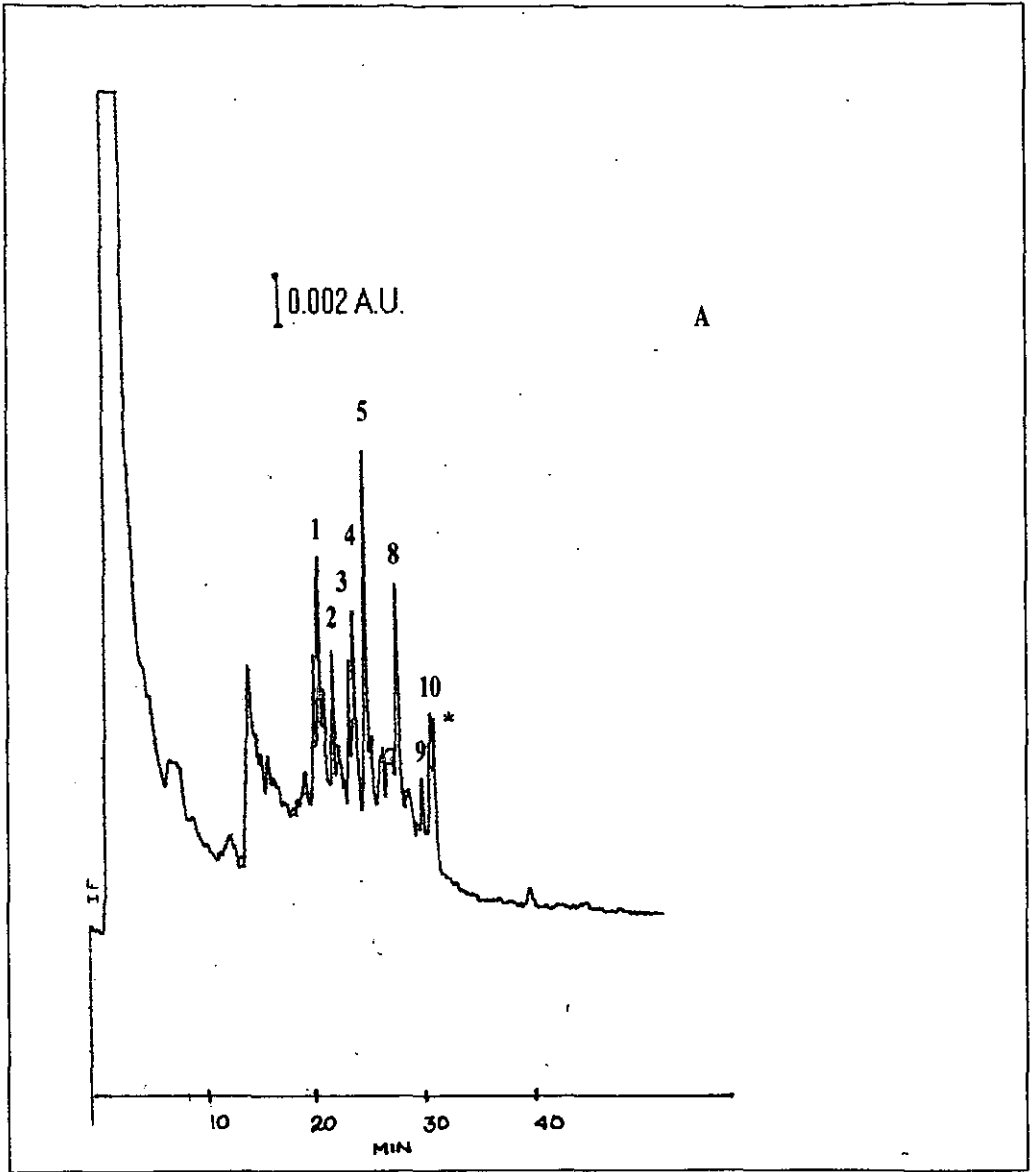


Figura III.5.5.a Cromatograma UV obtenido del análisis de una muestra de agua del "Río Seco" dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's ligeros. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de columna de 4.6 mm.

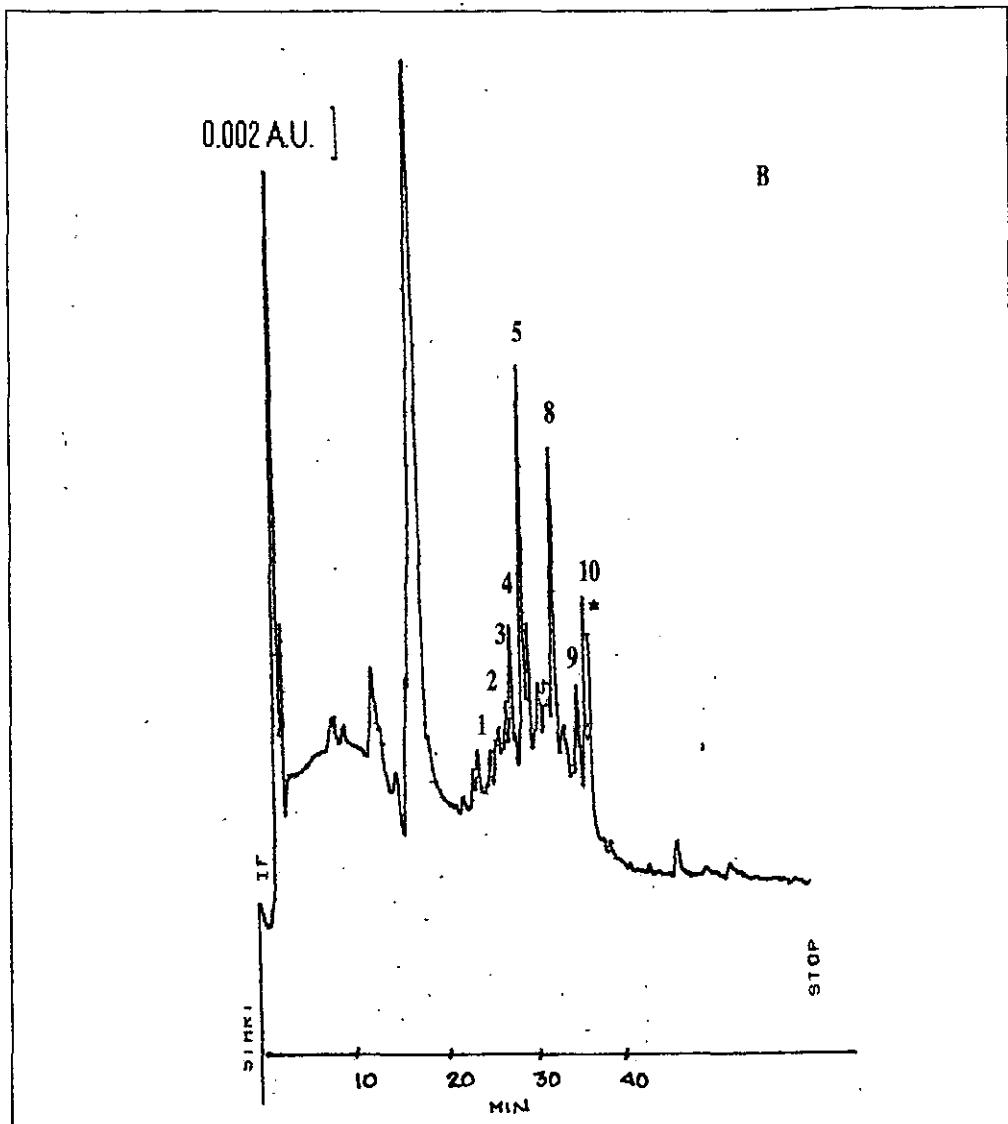


Figura III.5.5.b Cromatograma UV obtenido del análisis de una muestra de agua de "Río Seco" dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's pesados. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.1, excepto diámetro interno de columna de 4.6 mm.

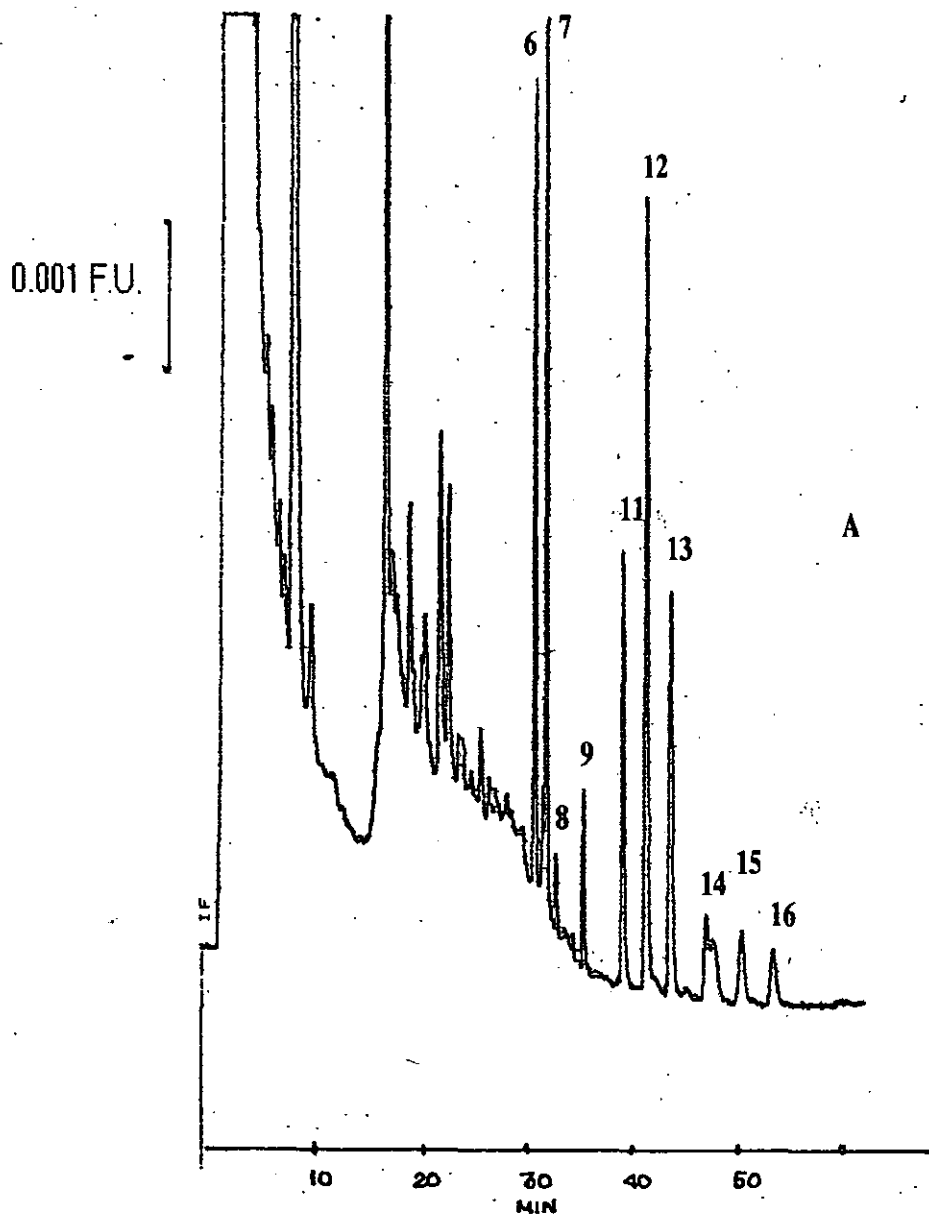


Figura III.5.6.a Cromatograma de fluorescencia obtenido de una muestra de agua del "Río Seco" dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para ligeros. Condiciones cromatográficas como en la figura III.1.2, excepto diámetro interno de columna de 4.6 mm.

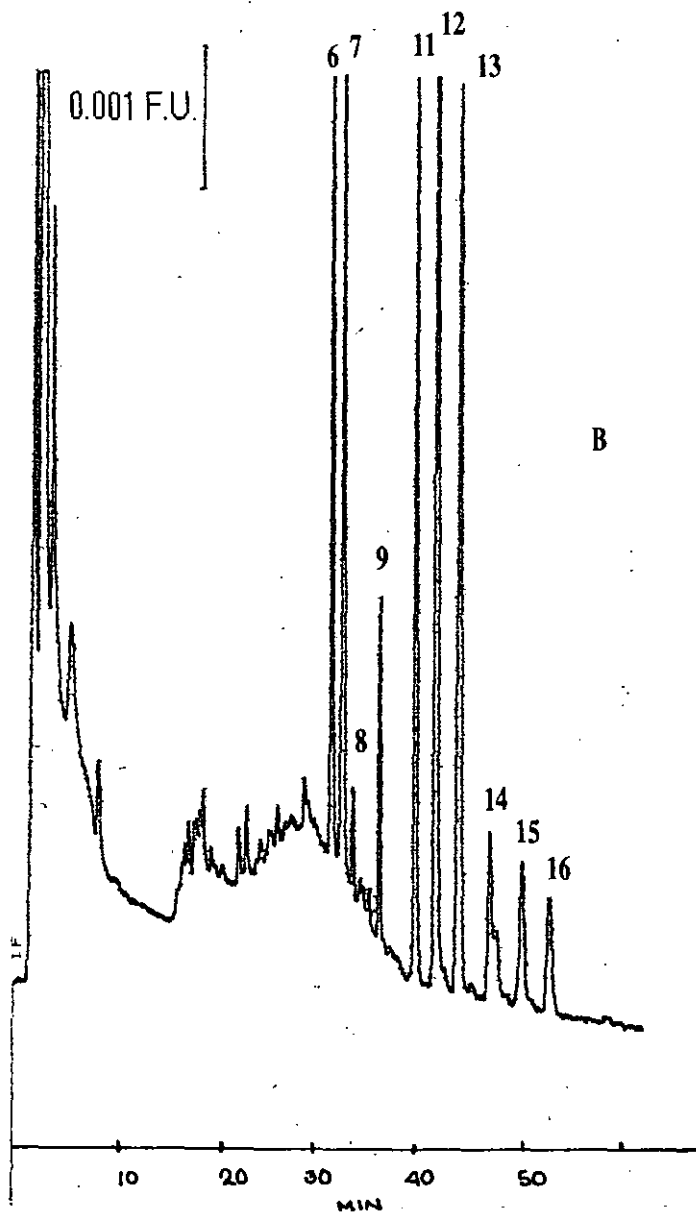


Figura III.5.6.b Cromatograma de fluorescencia obtenido de una muestra de agua del "Río Seco" dopada con los analitos a las concentraciones reportadas en la tabla III.5.1 y tratada por el procedimiento para HAP's pesados. Condiciones cromatográficas e identidad de picos como en la figura III.1.2, excepto diámetro interno de columna de 4.6 mm.

CONCLUSIONES

- ✓ Se implementó y certificó un método analítico que permite determinar 16 hidrocarburos aromáticos polinucleares a niveles inferiores a la ppb en muestras de agua.
- ✓ El método está basado en el acoplamiento en línea del proceso de extracción y preconcentración, por EFS, con el proceso de análisis, por HPLC. Esta tecnología permite optimizar y simplificar la preparación de muestra, reduciendo al mínimo su manipulación, lo que con lleva a las siguientes ventajas:
 - a) Mayor precisión y exactitud en las determinaciones
 - b) Menores riesgos para el analista por exposición a productos tóxicos
 - c) Volúmenes de muestra requeridos para una análisis completo relativamente pequeños (150 ml). Esto implica a su vez menor esfuerzo y costo para el transporte de muestras desde el sitio de recolección.
 - d) Mínimo consumo de disolventes orgánicos durante la etapa de preparación de la muestra.
 - e) Proceso más limpio que no requiere de la evaporación de disolventes.
 - f) Muy bajos límites de detección y cuantificación debido a que todo el soluto de interés contenido en la muestra es analizado.

En el intervalo de concentraciones estudiado, variable según el analito pero comprendido entre las 8 ppt y las 5 ppb, usando muestras de agua grado reactivo dopadas, se constató que el método reúne las siguientes características de calidad para todos los HAP's:

- a) Buena linealidad en las curvas de cantidad analizada vs cantidad recuperada ($R^2 > 0.99$).
- b) Recuperación promedio cercana al 100%, con intervalos de confianza comprendidos entre un mínimo de 84% y un máximo de 123%.
- c) Ausencia de errores sistemáticos; la ordenada al origen de las curvas de cantidad analizada vs cantidad recuperada es estadísticamente igual a cero.

- ✓ El estudio de exactitud y precisión del método en niveles de concentración cercanos al límite de cuantificación mostró que la recuperación promedio de los 16 HAP's se encuentra comprendida en el intervalo de 70 a 130% con coeficientes de variación inferiores al 20%. Estos resultados son excelentes para los niveles de concentración trabajados los cuales se sitúan entre 8 y 200 ppt según el analito considerado.
- ✓ Por otra parte, los límites de detección del método para los 16 HAP's en muestras de agua grado reactivo dopadas se encuentran comprendido entre 1.5 y 75 ppt según el soluto considerado.
- ✓ Finalmente, mediante algunos ejemplos se demostró la aplicabilidad del método para el seguimiento y determinación de estos contaminantes en aguas superficiales y tratadas.

ANEXO 1

A. Ecuaciones estadísticas^{36,37}

Linealidad, método de los mínimos cuadrados. Se supone una relación lineal entre la cantidad de materia cargada y la materia recuperada la cual esta dada por la ecuación:

$$Y = a + bX$$

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

Para la ordenada al origen de cada recta de regresión es necesario realizar una prueba estadística que verifique si las rectas pasan por el origen del sistema de coordenadas. Es decir probar si estadísticamente $a = 0$, para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Sea la hipótesis nula $H_0 : A = 0$, hipótesis alterna $H_1 : A \neq 0$ y nivel de significancia: 0.05

Criterio: Empleando el estadístico t (student), en un nivel de significancia dado se rechaza la hipótesis nula

si $t < -t_{\alpha/2}$ o $t > t_{\alpha/2}$, donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para $\alpha = 0.05$ con $(n-2)$ grados de libertad.

$$t = [(a-A) / S_e] * [n S_{xx} / (S_{xx} + (nx)^2)]^{1/2}$$

n = número de puntos sobre la recta de regresión

x = el valor promedio de los valores x_i

$$S_e = \sqrt{[S_{xx} S_{yy} - (S_{xy})^2 / n(n-2) S_{xx}]}$$

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

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

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

Intervalo de confianza:

$$a \pm t_{\alpha/2} S_e * [(S_{xx} + (nx)^2) / n S_{xx}]^{1/2}$$

Para el coeficiente b o pendiente de cada recta de regresión es necesario realizar una prueba estadística que verifique si b es igual a la unidad es decir si la fracción de soluto recuperada es igual a uno (exactitud multinivel) para un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

Sea la hipótesis nula $H_0 : B = 1$

Hipótesis alterna $H_1 : B \neq 1$

Nivel de significancia: 0.05

$$t = (b - B) / S_e * (S_{xx}/n)^{1/2}$$

Criterio: Empleando el estadístico t (student), en un nivel de significancia dado se rechaza la hipótesis nula

si $t < -t_{\alpha/2}$ o $t > t_{\alpha/2}$, donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para $\alpha = 0.05$ con $(n-2)$ grados de libertad.

Intervalo de confianza del coeficiente b:

$$b \pm t_{\alpha/2} S_e \cdot (n / S_{xx})^{1/2}$$

Precisión. Se expresa como la desviación estándar σ que es estimada por S expresado o también como el coeficiente de variación CV.

$$s = \left(\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 / (n-1) \right)^{1/2}$$

X_i es valor medido del ensayo

X es el estimador de la media poblacional μ

$$\text{Donde } X = \sum_{i=1}^n x_i / n$$

$$CV = (S \cdot 100) / X$$

Exactitud mononivel. Está definida por la diferencia del valor experimental con el valor asignado previamente como verdadero, en este caso el interés es probar estadísticamente si se ha logrado una recuperación equivalente al 100%. El estadístico empleado es el siguiente:

$$t = (X - \mu) / (s/n^{1/2})$$

Con una distribución t con (n-1) grados de libertad.

Sea la hipótesis nula $H_0 : \mu = 100$

hipótesis alterna $H_1 : \mu \neq 100$

Nivel de significancia: 0.05

Criterio: Empleando el estadístico t (student), en un nivel de significancia dado se rechaza la hipótesis nula

si $t < -t_{\alpha/2}$ o $t > t_{\alpha/2}$, donde $t_{\alpha/2}$ es el valor de la t student para $\alpha = 0.05$ con (n-1) grados de libertad.

Intervalo de confianza para un nivel de significancia: $\alpha = 0.05$

$$\bar{X} - t_{\alpha/2} * (S / (n)^{1/2}) \leq R \leq \bar{X} + t_{\alpha/2} * (S / (n)^{1/2})$$

B. Variables y ecuaciones utilizadas en la cuantificación de HAP's en agua de río

$A_{(m)}$ El área del pico del soluto de interés en el cromatograma de la muestra blanco.

$A_{(f)}$ El área del pico de soluto de interés en el cromatograma de la muestra fortificada.

$Q_{det(m)}$ Los nanogramos del soluto de interés determinados en la muestra blanco.

$Q_{det(f)}$ Los nanogramos del soluto de interés determinados en la muestra fortificada.

$Q_{det(ad)}$ Los nanogramos del soluto de interés determinados en la muestra fortificada que provenían de la adición patrón.

%R El % de recuperación del soluto de interés considerando posibles pérdidas por adsorción durante la preparación de la muestra o por fuga de la precolumna durante la carga de ésta con la muestra preparada. Se asume que el %R es idéntico para la muestra blanco y la muestra fortificada.

$q_{(m)}$ Los nanogramos de soluto que serían analizados en la muestra blanco si no hubiera ninguna pérdida.

$q_{(f)}$ Los nanogramos de soluto que serían analizados en la muestra fortificada si no hubiera ninguna pérdida.

$q_{(ad)}$ Los nanogramos de soluto provenientes de la adición patrón que serían analizados en la muestra fortificada si no hubiera pérdida.

Se puede establecer que:

$$Q_{det(m)} = q_{(m)} * \%R/100$$

$$Q_{det(ad)} = q_{(ad)} * \%R/100$$

$$Q_{det(f)} = Q_{det(m)} + Q_{det(ad)} = (q_{(m)} + q_{(ad)}) * \%R/100$$

$$A_{(m)} / A_{(f)} = Q_{det(m)} / Q_{det(f)} = \frac{q_{(m)} * (\% R/100)}{(q_{(m)} + q_{(ad)}) * (\% R/100)}$$

de donde:

$$q_{(m)} = \frac{A_{(m)} * q_{(std)}}{A_{(f)} - A_{(m)}}$$

$$q_{(std)} = Cstd * 100 \mu\text{l} / 75 \text{ ml} * 1 \text{ ml} / 1000 \mu\text{l} * 75 \text{ ml} / 100 \text{ ml} * 25 \text{ ml}$$

Donde: Cstd es la concentración del estándar (ng/ml) utilizado para fortificar la muestra; 100 μl es la alicuota de estándar adicionado a la muestra; 75 ml es el volumen de la muestra; (75ml/100 ml) es el factor de dilución de la muestra durante su preparación y 25 ml es volumen de muestra cargado en la precolumna.

Finalmente la concentración de soluto en la muestra blanco C_m queda dado por:

$$C_m = (q_{(m)} / 25 \text{ ml}) * (100 \text{ ml} / 75 \text{ ml})$$

REFERENCIAS

- 1) G. Huesgen and R. Schuster, HPLC for Environmental Analysis, Hewlett-Packard publication, number 125091-9750E, France 1994.
- 2) M. Krahn and J. Stein, Petroleum compounds in crude oil, Analytical Chemistry News & Features, 3 (1998) 186-192.
- 3) T. Loranger and D. Delistraty, Over- and under-regulating hazardous waste, Environ Impact Assess Rev, 19(1999) 99-108.
- 4) A. V. Botello y G. Ponce, Al rescate del Golfo de México, Ecológica, 3 (1998) 1-3.
- 5) C. Cortinas, Tóxicos Ambientales y Salud Pública en México", Natlaw Publication, Secretariado de la Organización de las Naciones Unidas, (1996) 1-14.
- 6) D. Mackay, W. Y. Shiu and K. Ching, Illustrated Handbook of Physical Properties and Environmental Fate for Organic Chemical, Vol. 1, editorial Lewis-publisher, Chelsea Mich, USA, 1991.
- 7) Spectral Atlas of Polycyclic Aromatic Compounds, Vol. 2, W. Karcher Ed. , Kluwer Academic Pub., Bruselas y Luxemburgo 1988, pp. 16, 21, 22.
- 8) J. Reza, A. Trejo and L. E. Vera, Water solubility and solution enthalpy of polycyclic aromatic hydrocarbons: Fourteenth Symposium on Thermophysical Properties. National Institute of Standards and Technology. University of Colorado at Boulder (2000) Boulder Co. U.S.A.
- 9) L. R. Snyder and J.J. Kirkland Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd ed., John Wiley & Sons, New York, USA, 1979.
- 10) O. A. Quattrocchi, S.I. Abelaira y R. F. Laba, Introducción a la HPLC , Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, Argentina, 1992.

REFERENCIAS

- 11) R. Soniassy, P. Sandra and Schlett, Water Analysis (Organic Micropollutants), Hewlett Packard publication, number 5962-6216E, Germany 1994.
- 12) R.P. Scott and C.F. Simpson, Solute-Solvent interactions on the surface of reversed phases. I. Stationary phase interactions and their dependence on bonding characteristics, *J. Chromatogr.*, 197 (1980) 11-20.
- 13) L. E.- Avila, J.L. Gallegos- Pérez, E. Camacho-Frias, Frontal analysis of aqueous phenol solutions in Amberlite XAD-4 columns. Implications on the operations and design of solid-phase extraction systems, *Talanta*, 50 (1999) 509-26.
- 14) E. Berendsen and L. De Galan, Role of the chain length of chemically bonded phases and the retention mechanism in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 196 (1980) 21-37.
- 15) Y. Liu, M. Lee, K. J. Hageman, Y. Yang and S. B. Hawtorne, Solid-phase microextraction of PAHs from aqueous sample using fibers coated with HPLC chemically bonded silica stationary phases, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 5001-5005.
- 16) K.A. Ramsteiner, Systematic approach to column switching, *J. Chromatogr.*, 456 (1988) 3-20.
- 17) N. C. Hennion and V. Coquart, Comparison of reversed-phase extraction sorbents for the on-line trace enrichment of polar organics compounds in environmental aqueous samples, *J. Chromatogr.* 642 (1993) 211-224.
- 18) N. C. Fladung Optimization of automated solid-phase extraction for quantitation of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous media by high- performance liquid chromatography- UV detection, *J. Chromatogr. A.* 692 (1995) 21-26.

REFERENCIAS

- 19) M.C. Hennion, C.Cau-Dit-Coumes and V. Pichon, Trace analysis of polar organic pollutants in aqueous samples. Tools for the rapid prediction and optimisation of the solid-phase extraction parameters, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 147-161.
- 20) L. E. Vera-Avila and R. Covarrubias, On-line trace enrichment and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 56 (1994) 33-47.
- 21) A. M. Nuñez Gaytán, Tesis de Maestría: Determinación de trazas de Cloro y nitrofenoles en agua por extracción en fase sólida en línea con cromatografía de líquidos, Fac. de Química, UNAM, México D.F., 1996.
- 22) A. García Ac., Tesis de Maestría: Determinación de trazas de bencidinas en agua por extracción en fase sólida en línea con HPLC, Fac. de Química, UNAM, México D. F., 2000.
- 23) E. R. Brouwer, A.N.J. Hermans, H. Lingeman and U.A. Th. Brinkman, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface water by column liquid chromatography with fluorescence detection, using on-line micelle-mediated sample preparation, *J. of Chromatogr. A*, 669 (1994) 45-57.
- 24) F. Lai and L. White, Automated precolumn concentration and high-performance liquid chromatographic analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons in water using a single pump and a single valve, *J. Chromatogr. A*, 692 (1995) 11-20.
- 25) G. Michor, J. Carron, S. Bruce and D.A. Cancilla, Analysis of 23 polynuclear aromatic hydrocarbons from natural water at the sub-ng/l level using solid-phase disk extraction and mass selective detection, *J. Chromatogr. A*, 732, 1 (1996) 85-99.

REFERENCIAS

- 26) G. Kiss, J. Varga and J. Hlavay, Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in precipitation using solid phase extraction and column liquid chromatography, *J. chromatogr. A*, 725, 2 (1996) 261-272.
- 27) F. J. Santos, M.T. Galcerán and D. Fraisse, Application of solid-phase micro-extraction to the analysis of volatile organic compounds in water, *J. Chromatogr.*, 742, 1-2 (1996) 181-189.
- 28) M. Bouzige, V. Pichon and M.C. Hennion, On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng l⁻¹ level, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 197-210.
- 29) M.R. Negro and M.F. Alpendurada, Solvent-free method for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in waste water by solid-phase microextraction-high performance liquid chromatography with photodiode-array detection, *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 211-218.
- 30) G. Carrera, P. Fernández, R. Villanova, Analysis of trace polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine compounds in atmospheric residues by solid-phase disk extraction. *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 189-196.
- 31) R.-Doong, S. Chang Y. Sun, Solid-phase microextraction for determining the distribution of sixteen U.S. Environmental Protection Agency polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 177-88.
- 32) Horwitz, Evaluation of analytical methods used for regulation of foods and drugs, *Anal. Chem.* 54, 1 (1982) 67A-76A

REFERENCIAS

- 33) Bioavailability and Bioequivalence Requirements, 21 CFR 320, 1992, pp 114-137.
- 34) S. Lacorte, N. Ehresmann and D. Barceló, Stability of organophosphorus pesticides on disposable solid-phase extraction precolumns, *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 2834-2841.
- 35) USEPA, Appendix B to part 136- Definition and procedure for the determination of the Method Detection Limit- Revision 1.11, *Fed. Regist.*, 49, 43430 (1984c).
- 36) I. Miller and J.E. Freund *Probability and Statistics for Engineers*. Ed. Reverté Mexicana (1967), México D.F.
- 37) J.C. Miller y J.N. Miller. *Estadística para Química Analítica*, 2ª. ed., Addison Wesley Iberoamericana, Wilmington, E.U., 1993 .
- 38) Method 610- Polynuclear aromatic hydrocarbons- *Fed. Regist.*, 49, No. 209 (1984) 112-120.