



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA

FACULTAD DE QUÍMICA

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS
FENÓLICOS POR CROMATOGRFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y POR
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA
EFICIENCIA. ESTUDIO COMPARATIVO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
Q U Í M I C O
P R E S E N T A
CITLALLI DOMÍNGUEZ GUTIÉRREZ



MÉXICO, D. F.



2004

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Prof. Ernestina Cervera Flores.

Vocal: Prof. Humberto Ramón Gómez Ruiz.

Secretario: Prof. José Alejandro Baeza Reyes.

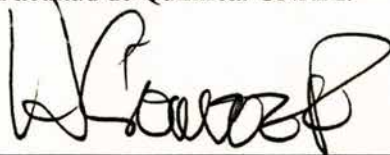
1er Suplente: Prof. Georgina Artemisa Duarte Lisci.

2do Suplente: Prof. Ruth Esther Villanueva Estrada.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Química Analítica Ambiental 108: Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.

ASESOR DEL TEMA:



M. en C. Humberto Ramón Gómez Ruiz

SUPERVISOR TÉCNICO:



Q. Adolfo García Osuna

SUSTENTANTE:



Citlalli Domínguez Gutiérrez

ÍNDICE

	<i>Página</i>
<i>CAPÍTULO 1</i> <i>Introducción</i>	1
<i>CAPÍTULO 2</i> <i>Objetivos</i>	6
<i>CAPÍTULO 3</i> <i>Marco Teórico</i>	
<i>3.1 Fenoles</i>	
3.1.1 Historia	7
3.1.2 Estructura Química	8
3.1.3 Propiedades Físicas	8
3.1.4 Reacciones	14
3.1.5 Usos	19
<i>3.2 Cromatografía</i>	
3.2.1 Historia	20
3.2.2 Definición	21
3.2.3 Modalidades de la Cromatografía	22
3.2.4 Teoría de Cromatografía	23
3.2.4.1 Cromatograma	23
3.2.4.2 El proceso cromatográfico	24
3.2.4.3 Posición de pico	25

3.2.4.4 Selectividad (α)	26
3.2.4.5 Ancho de pico (W)	27
3.2.4.6 Eficiencia (N)	28
3.2.4.7 Resolución (R_s)	33
3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	
3.3.1 Formas de Cromatografía Líquida	36
3.3.2 Instrumental	39
3.3.2.1 Fase móvil	39
3.3.2.2 Recipiente de la fase móvil	41
3.3.2.3 Tuberías	42
3.3.2.4 Uniones	43
3.3.2.5 Bomba	44
3.3.2.6 Inyector	47
3.3.2.7 Columna	50
3.3.2.7.1 Fase estacionaria	51
3.3.2.8 El proceso de elución	54
3.3.2.9 Detector	55
3.3.2.10 Sistema de Registro	61
3.4 Cromatografía de Gases	
3.4.1 Tipos de Cromatografía Gaseosa	63
3.4.2 Instrumental	64
3.4.2.1 Gas Portador	65
3.4.2.2 Sistema de Inyección de Muestra	67

3.4.2.3 Horno	71
3.4.2.4 Columna	71
3.4.2.4.1 Fase estacionaria	73
3.4.2.5 Detector	75
3.5 Espectrometría de Masas	
3.5.1 Equipo de Espectrometría de Masas	85
3.5.1.1 Introducción de Muestra	85
3.5.1.2 Sistema de Vacío	86
3.5.1.3 Cámara de Ionización	86
3.5.1.4 Analizador	86
3.5.1.5 Detector	87
3.5.2 Desventajas de la Espectrometría de Masas	88
3.6 Sistema acoplado, CG/EM	88
3.7 Límite de Detección (LD)	90
3.7.1 Límite de detección efectivo	93
3.7 Límite de Cuantificación (LC)	96
CAPÍTULO 4 Desarrollo Experimental	
4.1 Evaluación de CG/EM para la determinación de fenoles	
4.1.1 Instrumentación	98

4.1.2 Equipo y Material	98
4.1.3 Reactivos	99
4.1.4 Preparación de disoluciones	101
4.1.4.1 Disolución madre de Nitrobenceno	101
4.1.4.2 Disolución secundaria de Nitrobenceno	101
4.1.4.3 Disolución madre de fenoles	102
4.1.4.4 Disolución secundaria de fenoles	103
4.1.4.5 Disoluciones patrón de fenoles I	103
4.1.4.6 Disoluciones patrón de fenoles II	103
4.1.5 Evaluación de Parámetros Cromatográficos	104
4.1.6 Determinación de LD y LC	106
<i>4.2 Evaluación de HPLC para la determinación de fenoles</i>	
4.2.1 Instrumentación	109
4.2.2 Equipo y Material	109
4.2.3 Reactivos	111
4.2.4 Preparación de disoluciones	114
4.2.4.1 Disolución madre de fenoles I	114
4.2.4.2 Disolución madre de fenoles II	114
4.2.4.3 Disolución secundaria de fenoles I	115
4.2.4.4 Disolución secundaria de fenoles II	115
4.2.4.5 Disoluciones patrón de fenoles	115
4.2.5 Evaluación de Parámetros Cromatográficos	117
4.2.6 Determinación de LD y LC	120

<i>CAPÍTULO 5</i>	<i>Resultados y Discusión de Resultados</i>	
5.1	Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas	122
5.2	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia	145
<i>CAPÍTULO 6</i>	<i>Conclusiones</i>	165
<i>CAPÍTULO 7</i>	<i>Bibliografía</i>	169
<i>APÉNDICE 1</i>	<i>Cromatogramas</i>	
<i>APÉNDICE 2</i>	<i>Espectros de Masas</i>	
<i>APÉNDICE 3</i>	<i>Características de los Compuestos Fenólicos</i>	
<i>APÉNDICE 4</i>	<i>Cálculos</i>	

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los fenoles son compuestos en los cuales los átomos de hidrógeno de sistemas aromáticos han sido reemplazados por uno o más grupos hidroxilo (-OH). ⁽¹⁾

El fenol y los fenoles sustituidos, particularmente los clorofenoles son contaminantes ambientales importantes debido a sus efectos tóxicos sobre los peces y otros organismos acuáticos, así como también, para muchos mamíferos incluyendo a los seres humanos. ^(4, 10, 13, 17)

Debido a su toxicidad potencial, tanto la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, US-EPA, por sus siglas en inglés, la Comisión Europea del Medio Ambiente, EEC, por sus siglas en inglés y la Comisión Nacional del Agua, CNA, por sus siglas en español, han incluido al fenol y otros 10 fenoles sustituidos, principalmente nitrofenoles y clorofenoles, en sus listas de “contaminantes prioritarios”. ^(5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14)

Estos compuestos son formados en el curso de muchos procesos industriales, incluyendo los de la industria del petróleo, pulpa y papel, producción de plásticos, pinturas, explosivos, detergentes, estabilizantes, antioxidantes y como resultado de la hidrólisis, oxidación y degradación de algunos pesticidas clorados. ^(3, 4, 5, 6, 10, 11, 12)

También los fenoles pueden ser producidos en el proceso de cloración para la purificación del agua potable formando clorofenoles. Los clorofenoles tienen un efecto adverso en el olor y sabor del agua potable. (6, 4, 10, 13)

El nitrofenol se forma fotoquímicamente en la atmósfera a partir de emisiones de los escapes de los automóviles, motivo por el cual es encontrado en niveles de ppb en la neblina, lluvia y nieve. (6)

Además de las fuentes industriales, los compuestos fenólicos son formados naturalmente durante la descomposición de la madera y las hojas en los bosques. (15)

Su toxicidad y la influencia en el olor y el sabor son las razones por las que estos compuestos son analizados en el agua potable y en aguas superficiales. (10, 17)

La CNA establece las siguientes concentraciones máximas permisibles de algunos fenoles en las fuentes descritas. (14)

<i>Compuesto</i>	<i>Usos</i>		
	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
2-clorofenol	0.03	0.04	0.1
2,4-diclorofenol	0.03	0.02	NR
2,4-dimetilfenol	0.4	0.02	NR
2,4-dinitrofenol	0.07	0.002	0.05
Dinitro-o-cresol	0.01	NR	0.01
Fenol	0.001	0.1	0.06
2-nitrofenol	0.07	0.002	0.05
4-nitrofenol	0.07	0.002	0.05
Pentaclorofenol	0.03	0.0005	0.0005
2,4,6-triclorofenol	0.01	0.01	NR

Notas:

NR: No reportado en la Ley Federal de Derechos en Materia de Agua.

Uso 1: Fuente de abastecimiento para uso público urbano.

Uso 2: Protección a la vida acuática: Agua dulce

Uso 3: Protección a la vida acuática: Aguas costeras y estuarios.

La EEC establece que la concentración máxima permisible de fenoles en agua destinada para el consumo humano debe ser menor de 0.5 $\mu\text{g} / \text{l}$ para el contenido total y 0.1 $\mu\text{g} / \text{l}$ para compuestos individuales; en agua para el aseo personal la cantidad máxima permisible es de 5 $\mu\text{g} / \text{l}$. Por lo tanto para poder medir este tipo de compuestos se requiere de técnicas altamente selectivas y sensibles, además de técnicas de preparación de muestra que permitan su concentración. ^(8, 10, 12, 18)

Existen numerosos métodos para analizar compuestos fenólicos en muestras de agua. El método espectrofotométrico para la determinación de la concentración de fenoles totales en agua ha sido usado durante muchos años, sin embargo los fenoles difieren considerablemente en su toxicidad, y el método no los distingue particularmente. Esto aceleró el desarrollo de varios métodos para el análisis de fenoles individuales a niveles de trazas, haciendo uso de la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos ^(2, 3, 6, 7, 11, 16, 17, 19)

Aunque el método más comúnmente usado para la determinación de compuestos fenólicos incluyendo los enlistados por la US-EPA, es la cromatografía líquida en fase inversa, la cromatografía de gases es preferida debido a la alta resolución y el fácil acoplamiento con detectores sensibles y selectivos. Sin embargo a bajas concentraciones algunos fenoles no pueden ser analizados por cromatografía de gases debido a que presentan descomposición térmica en el inyector o reaccionan irreversiblemente con los sitios activos de la columna cromatográfica, presentándose así el fenómeno de coleo de pico o de descriminación de pico. ^(2, 3, 5, 6)

Aún con el uso de columnas capilares “inertes” el fenómeno de “descriminación” puede ser observado para el pentaclorofenol y para algunos nitrofenoles a bajos niveles de concentración. Para resolver este tipo de problemas, los fenoles tienen que ser derivatizados con reactivos

adecuados, tales como, anhídrido acético, cloruro de pentafluorobenzoílo o diazometano. ⁽⁶⁾

La optimización de las condiciones para una mejor separación cromatográfica es fundamental para el análisis de contaminantes ambientales especialmente en los casos en donde estos contaminantes se encuentran presentes en un amplio intervalo de concentraciones, en mezclas complejas en varias matrices ambientales. ⁽⁵⁾

El presente trabajo comprende un estudio comparativo de las técnicas cromatografía de gases / espectrometría de masas (CG/EM) y cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) para la separación, determinación y cuantificación del fenol y 16 compuestos fenólicos sustituidos con distintos grupos funcionales de diferentes polaridades entre los que se encuentran los clorofenoles, nitrofenoles, fluorofenoles y aminofenoles, la mayoría de los cuales son considerados por la EPA como contaminantes prioritarios.

En la primera parte del estudio se realizó la optimización de las condiciones analíticas para obtener la mejor separación de los 17 compuestos fenólicos basándose en parámetros cromatográficos como son eficiencia, resolución y selectividad. Con las condiciones óptimas encontradas en cada técnica se determinó el límite de detección y cuantificación del método para cada compuesto.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

- Optimizar los parámetros cromatográficos para la separación y determinación de fenoles en distintas matrices por CG/EM y por HPLC.
- Encontrar el intervalo lineal de concentración de 17 compuestos fenólicos en la técnica de HPLC.
- Determinar los límites de detección y cuantificación de 17 compuestos fenólicos por las técnicas de CG/EM y HPLC.
- Evaluar las ventajas y desventajas de ambas técnicas para la separación y determinación de fenoles apoyándose en parámetros cromatográficos y límites de detección y cuantificación.

CAPÍTULO 3

MARCO TEÓRICO

3.1 Fenoles

3.1.1 Historia

El fenol fue aislado del alquitrán de hulla en 1834 por Runge, quien le dio el nombre de “ácido carbólico”.

Laurent lo obtuvo en forma cristalina en 1841, determinó su composición y le llamó “ácido fenólico”.

Antes de 1888, casi todo el fenol se obtenía del alquitrán de hulla, y su principal uso era como desinfectante. Una de las primeras preparaciones antisépticas de fenol fue el “lisol”, el cual se obtiene hirviendo una mezcla de aceites pesados de alquitrán con aceites vegetales en presencia de un álcali fuerte, como por ejemplo hidróxido de sodio o potasio.

En la última década del siglo XIX, el derivado trinitro del fenol (ácido pícrico) adquirió importancia como explosivo. Después de la primera Guerra Mundial adquirió mucha importancia el uso del fenol en resinas fenólicas y la producción natural del fenol fue reemplazada por la síntesis.

En 1944 el doctor Heinrich Hock demostró que bajo condiciones apropiadas el isopropilbenceno (cumeno) se puede oxidar a hidroperóxido de cumeno, el cual, bajo la influencia de un catalizador ácido, se puede descomponer en fenol y acetona. ⁽¹⁾

Actualmente el método de preparación industrial de fenol más importante a nivel mundial, es la oxidación del cumeno. La fusión de los

ácidos arenosulfónicos con hidróxido alcalino es otra ruta excelente para la preparación de fenol a nivel industrial y la hidrólisis de las sales de diazonio es principalmente una técnica de laboratorio. ⁽²⁰⁾

3.1.2 Estructura Química

Los fenoles son compuestos en los cuales los átomos de hidrógeno de sistemas aromáticos han sido reemplazados por uno o más grupos hidroxilo (-OH). Según el número de grupos hidroxilo unidos directamente al núcleo aromático, los fenoles se llaman monohídricos, dihídricos, trihídricos, etc..

En general, los fenoles reciben sus nombres del radical aromático que contienen. Los fenoles dimetilsustituídos y trimetilsustituídos se designan frecuentemente por un nombre derivado de sus hidrocarburos precursores.

(1)

3.1.3 Propiedades Físicas

El fenol puro y los fenoles sustituidos son compuestos generalmente sólidos, incoloros, de bajo punto de fusión, cristalinos y de olor característico.

Los fenoles son sensibles a la oxidación y se deterioran rápidamente a temperatura ambiente, según el grado de exposición a la luz y al aire, y como resultado de ello, muchos fenoles son de color rosa o café debido a las impurezas provenientes de la oxidación. El curso de la descomposición es complejo e influye sobre ella la estructura del fenol.

La solubilidad en agua de los fenoles disminuye rápidamente a medida que aumenta el peso molecular y es insignificante por encima del C₈.

Al aumentar el número de grupos –OH en el anillo aromático incrementa en gran medida la solubilidad en agua. Esto se atribuye al puente de hidrógeno entre el agua y el grupo –OH.

Entre un grupo cualquiera de fenoles isoméricos, los isómeros *para* tienen generalmente el punto de fusión más alto y los isómeros *orto* la mayor volatilidad. Estas diferencias facilitan el fraccionamiento y la purificación de los fenoles. Por ejemplo el *o*-nitrofenol es un sólido de bajo punto de fusión que puede destilarse sin dificultad. Asimismo presenta una solubilidad muy baja en agua en comparación con los isómeros *meta* y *para*, lo cual señala que no experimenta un puente de hidrógeno intramolecular en un grado considerable con moléculas semejantes o con moléculas de agua.

La siguiente figura muestra la interacción de los grupos –NO₂ y –OH en el *o*-nitrofenol y el *p*-nitrofenol

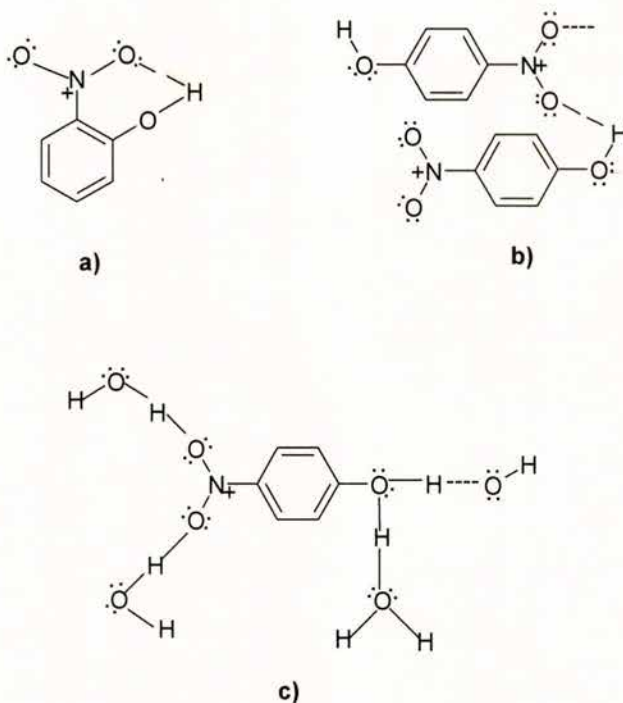


Figura 3.1.1 Interacciones de los grupos $-\text{NO}_2$ y $-\text{OH}$ en: **a)** *o*-nitrofenol (puente de hidrógeno intramolecular), **b)** *p*-nitrofenol (puente de hidrógeno intermolecular), **c)** *p*-nitrofenol disuelto en agua (puente de hidrógeno con el agua).

Debido al puente de hidrógeno intramolecular (*figura 3.1.1 (a)*), el *o*-nitrofenol, no puede enlazarse fuertemente con otras moléculas o con el disolvente, reduciendo así su solubilidad en agua, y sus puntos de fusión y ebullición.

Por otra parte, el *m* y el *p*-nitrofenol, dadas sus restricciones geométricas, no tienen otra posibilidad más que formar un puente de

hidrógeno con el disolvente o entre sí. Este puente mantiene unidas a las moléculas en mayor grado, de modo que se debe proporcionar más energía para disociar estos enlaces; de esta manera, hierven y funden a temperaturas mucho más altas. ⁽²¹⁾

La propiedad más característica de los fenoles, es su naturaleza ácida. Las constantes de acidez de los fenoles a 25° C son del orden de 10^{-10} . Aunque estructuralmente los fenoles son similares a los alcoholes, son ácidos mucho más fuertes, sus constantes de acidez son alrededor de 100 millones de veces más grandes.

La acidez de los fenoles en relación con la de los alcoholes se puede explicar aplicando la teoría de resonancia. Sin embargo es conveniente considerar primero en términos generales la teoría ácido-base.

Las reacciones ácido-base, son reacciones reversibles y las concentraciones relativas del ácido y la base conjugados que se forman dependen del equilibrio químico.

Por lo tanto, con las reacciones ácido-base es posible confirmar los efectos de las variaciones en la estructura sobre el K_a . Los factores estructurales que estabilizan a la base conjugada, A^- , en mayor medida que al ácido, HA, hacen que el valor de K_a sea mayor. Entonces, HA será un ácido más fuerte.

Es frecuente que los efectos de resonancia sean un factor importante en las reacciones ácido-base, y por lo general dichos efectos estabilizan más a la base conjugada que al ácido. En la *figura 3.1.2*, se observa que las formas canónicas del fenol requieren de la separación de las cargas opuestas, mientras que las formas canónicas correspondientes del ion

fenóxido no. Para separar cargas opuestas se necesita más energía, y por lo tanto se puede concluir que la resonancia estabiliza más al ion fenóxido (base conjugada) que al fenol (ácido).

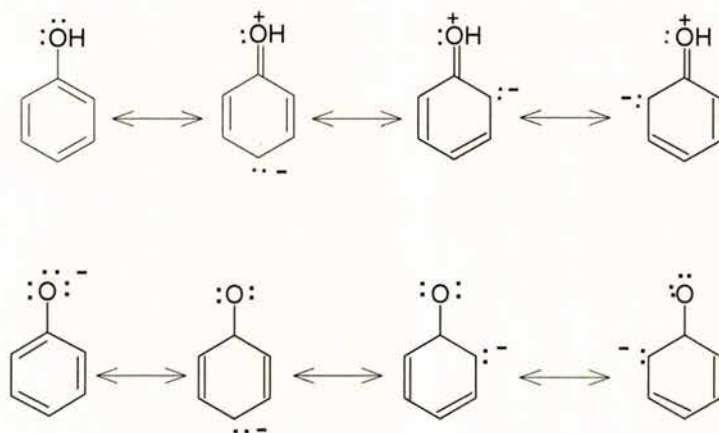


Figura 3.1.2 Formas canónicas del fenol y su anión

La estabilización por resonancia del ion fenóxido posee una importancia particular, porque la carga negativa se deslocaliza en los átomos de carbono del anillo. ⁽²²⁾

Los fenoles que tienen sustituyentes que atraen electrones ($-X$, $-\text{NO}_2$, $-\text{CN}$, $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CHO}$, $-\text{COR}$, $-\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$) ayudan a la deslocalización de la carga negativa de los aniones del fenol. Por lo tanto, estos grupos ayudan a estabilizar al anión y aumentan la acidez del fenol. Por otra parte, los fenoles que contienen sustituyentes que liberan

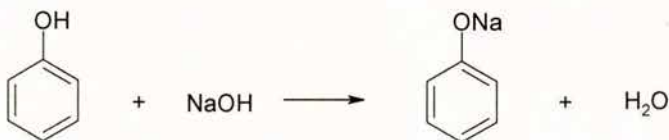
electrones ($-\text{CH}_3$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OCH}_3$ etc.) unidos al anillo reducen la acidez debido al efecto inductivo. ⁽²³⁾

3.1.4 Reacciones ^(1, 21, 22, 23)

Las reacciones de los fenoles se dividen en dos grupos: 1) Reacciones del grupo hidroxilo; 2) Sustitución en el anillo aromático.

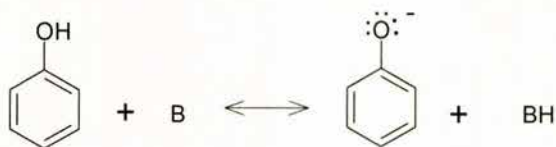
Reacciones del grupo hidroxilo.

- **Formación de la sal.** Puesto que los fenoles son ácidos débiles, sólo pueden ser neutralizados por los álcalis fuertes:

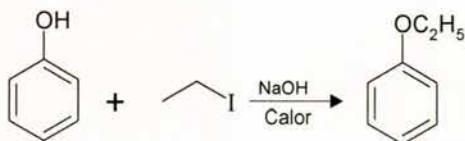


Las sales de los fenoles están en gran parte hidrolizadas en agua, pero pueden prepararse en estado puro por la reacción de un fenol con alcóxido de sodio o potasio. Las sales del fenol se llaman fenóxidos, fenolatos o fenatos.

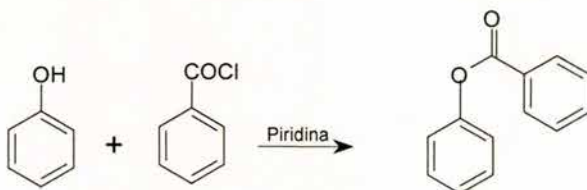
- **Oxidación.** Los fenoles son fácilmente atacados por los oxidantes. El paso inicial es la separación de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo con formación de un radical fenoxi, que existe en equilibrio con el fenol.



- **Reducción.** Un fenol puede reducirse a el hidrocarburo correspondiente por destilación con Zinc.
- **Eterificación y Esterificación.** Los fenóxidos de los metales alcalinos reaccionan fácilmente con haluros o sulfatos de alquilo para dar éteres (Síntesis de Williamson):



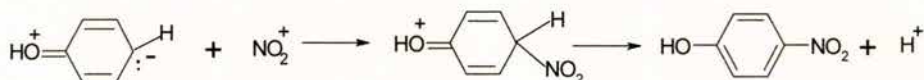
Los fenoles reaccionan con cloruros de acilo o anhídridos para formar ésteres (Reacción de Schotten Baumann):



Un ejemplo de la reacción del fenol con un anhídrido de un ácido aromático dibásico es la reacción con el anhídrido ftálico para formar fenolftaleína.

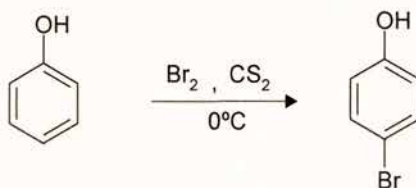
Reacciones de sustitución

- **Halogenación, nitración y sulfonación.** En presencia de reactivos electrófilos y bajo condiciones de reacción suaves, empleando reactivos diluidos, bajas temperaturas, etc., pueden obtenerse derivados *monoorto* o *monopara* ya que estas posiciones se ven favorecidas debido a que son centros de densidad electrónica elevada. Por ejemplo en la nitración el paso esencial es el ataque de un ion nitronio NO_2^+ , derivado del ácido nítrico, en las posiciones *orto* y *para*.

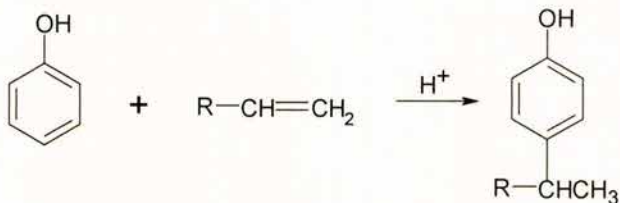


En la nitración directa del fenol con ácido nítrico concentrado se obtiene como producto de reacción el 2,4,6-trinitrofenol (ácido pícrico). En la sulfonación interviene un mecanismo análogo.

La halogenación se lleva a cabo tratando el fenol con un halogenuro en presencia de disulfuro de carbono. Sí se emplean reactivos concentrados o si el producto es insoluble en el medio de reacción, se obtienen derivados disustituídos o trisustituídos.

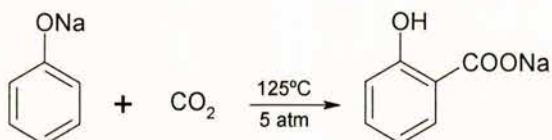


- **Alquilación.** Los alquilfenoles se obtienen de la reacción de los fenoles con olefinas, catalizada con un ácido:

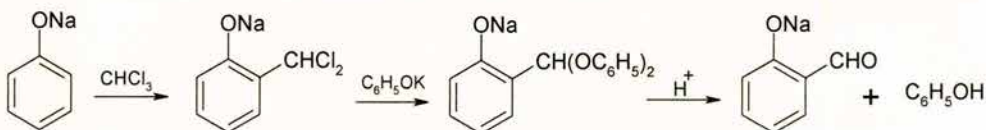


Dependiendo de las condiciones experimentales y el catalizador empleado, se pueden producir alquilfenoles disustituidos o trisustituidos.

- **Reacción de Kolbe.** Los fenoles pueden ser carboxilados introduciendo dióxido de carbono en fenóxido de sodio seco a temperaturas y presiones controladas:



- **Reacción de Reimer-Tiemann.** En esta reacción se produce un aldehído aromático por la reacción del cloroformo con una solución concentrada de un fenóxido:

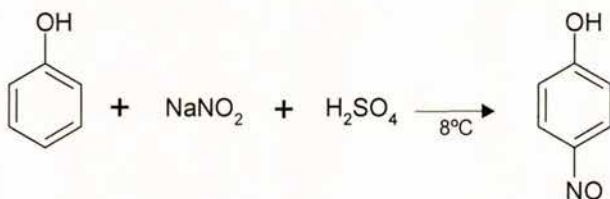


- **Reacciones de copulación.** Las sales de diazonio se combinan con los fenoles en condiciones muy suaves, siempre que el pH de la solución se mantenga en alcalinidad apropiada usando sales amortiguadoras como acetato o carbonato de sodio

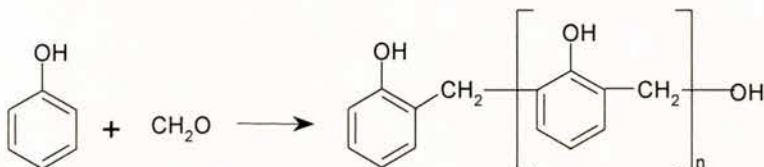


La copulación se produce preferentemente en la posición *para* del fenol; pero si esta posición está ocupada, el grupo diazo entra en la posición *orto*.

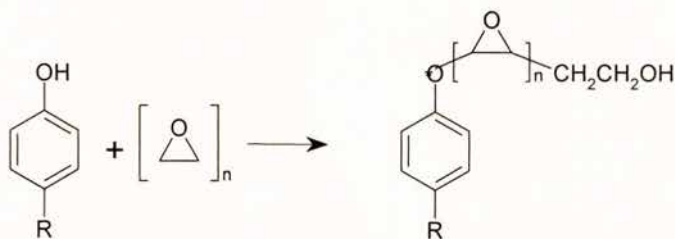
Con la reacción diazo se relaciona la reacción de nitrosación, en la cual el ácido nitroso reacciona con el fenol para dar p-nitrosfenol.



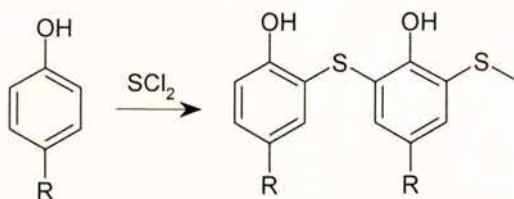
- **Condensación.** La condensación con formaldehído es una de las reacciones más importantes del fenol desde el punto de vista industrial, porque sirve de base para la fabricación de las resinas del tipo baquelita.



Por reacción con óxidos de alquileo en exceso, los fenoles producen éteres glicopolietilénicos, algunos de los cuales poseen alto grado de actividad superficial y son útiles como detergentes y como agentes remojantes.



- **Sulfuración.** La reacción de los fenoles con cloruros de azufre conduce a la formación de monosulfuros, disulfuros y polisulfuros, según las condiciones de reacción. Las sales metálicas de los fenoles sulfurados son utilizados como estabilizadores para los aceites lubricantes.



3.1.5 Usos ⁽¹⁾

Los principales usos de los fenoles son los siguientes:

- Fabricación de plásticos de fenol-formaldehído y de resinas de fenol-formaldehído para revestimientos y como agentes de unión en productos laminados. Los cresoles son utilizados en la fabricación del fosfato tricresílico, que es un plastificante útil para el acetato de celulosa, la nitrocelulosa, la etilcelulosa y los plásticos de vinilo.
- Preservadores para la madera, desinfectantes e insecticidas. Los nitrofenoles principalmente se usan como insecticidas.
- Los fenoles clorados son bactericidas y funguicidas activos. El pentaclorofenol es un importante preservador para la madera; se usa también para suprimir las algas en los canales y acequias, en insecticidas y en la curtición de pieles. El 2,4,5-triclorofenol se usa principalmente en la fabricación de herbicidas.
- Refinación del petróleo. La extracción con fenol como disolvente es un método importante para la refinación de aceites lubricantes.
- Hormonas vegetales y detergentes. Grandes cantidades de fenol se utilizan en la fabricación de herbicidas del tipo 2,4-D.
- Medicamentos, perfumes y saborizantes.
- Colorantes, fotografía y explosivos. Algunos aminofenoles son útiles como colorantes y reveladores fotográficos. Los cresoles butilados son antioxidantes y estabilizadores para grasas no comestibles y aceites aislantes. Los anisoles se usan como estabilizadores en la industria alimenticia.

3.2 Cromatografía

3.2.1 Historia

La cromatografía fue empleada por primera vez por Ramsey en 1905 para separar mezclas de gases y vapores, los cuales eran adsorbidos en carbón activado. Al año siguiente el botánico ruso Mikhail Tswett empleó la cromatografía de elución para separar la clorofila de extractos vegetales. En una columna de vidrio rellena de carbonato de calcio finamente dividido, introdujo el extracto vegetal disuelto en éter de petróleo. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justifica el nombre que eligió para el método (del griego *chroma* que significa “color” y *graphein* que significa “escribir”).⁽²⁴⁾

En 1941, Martín y Synge, introdujeron la “cromatografía de reparto gas-líquido”, lo que les valió el premio Nobel de Química en 1952.

En 1952, Martín y James, introdujeron la cromatografía de gases, la cual se ha convertido en una de las técnicas analíticas más útiles para el análisis de gases y compuestos orgánicos volátiles.

A pesar de que el primer experimento sobre cromatografía fue una forma de cromatografía líquida, no fue sino hasta 1968 que se produjo un avance considerable en esta técnica, surgiendo así lo que actualmente se conoce como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, acrónimo del inglés High Performance Liquid Chromatography).⁽²⁵⁾

3.2.2 Definición

Según define la IUPAC, “La Cromatografía es un método, usado primariamente para la separación de los componentes de una mezcla, en la cual los componentes se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es estacionaria, mientras la otra es móvil. La fase estacionaria puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel. La fase estacionaria puede estar extendida como una capa o distribuida como una película. La fase móvil puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico”.⁽²⁶⁾

3.2.3. Modalidades de la Cromatografía

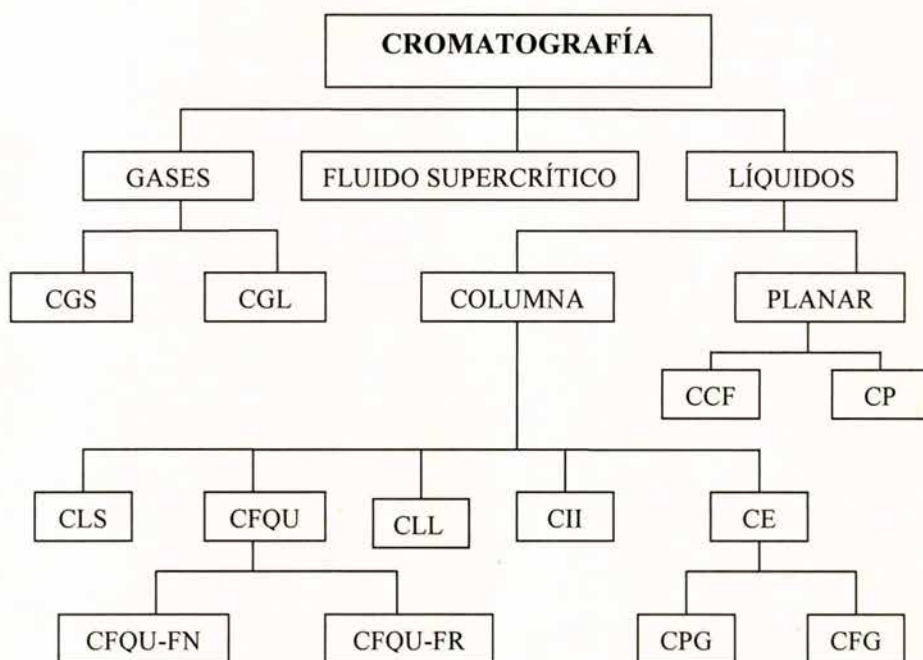


Figura 3.2.1 Clasificación de los métodos cromatográficos; CGS = Cromatografía de Gas-Sólido; CGL = Cromatografía de Gas-Líquido; CCF = Cromatografía de Capa Fina; CP = Cromatografía de Papel; CLS = Cromatografía de Líquido-Sólido; CFQU = Cromatografía de fase Químicamente Unida, FN = Fase Normal, FR = Fase Reversa; CLL = Cromatografía Líquido Líquido; CII = Cromatografía de Intercambio Iónico; CE = Cromatografía de Exclusión; CPG = Cromatografía de Permeación en Gel; CFG = Cromatografía de Filtración en Gel. ⁽²⁵⁾

3.2.4. Teoría de Cromatografía

3.2.4.1 Cromatograma ⁽²⁷⁾

Un cromatograma es el registro gráfico de la respuesta del detector en función del tiempo. Cuando sólo sale de la columna el eluyente, aparecerá dibujada una línea recta, la *línea base*. Cuando se eluyen los primeros picos de la muestra, se dibuja el perfil de su concentración, obteniéndose así los parámetros: *tiempo de retención y área del pico*.

El tiempo de retención (t_r) es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta el momento en que se obtiene el punto máximo de la señal o pico. (*figura 3.2.2*).

El tiempo de retención ajustado (t'_r) es el tiempo que la muestra permanece retenida en la fase estacionaria. (*figura 3.2.2*).

El tiempo muerto (t_0) es el tiempo requerido para eluir un soluto no retenido en la columna. Es una medida del tiempo que la muestra permanece en la fase móvil. (*figura 3.2.2*).

El área de pico permite determinar la concentración de cada componente separado en la columna. (*figura 3.2.2*).

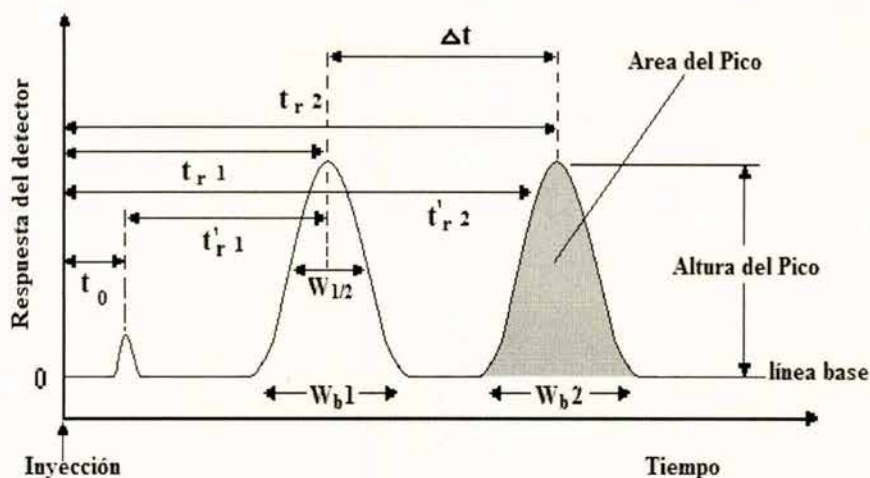


Figura 3.2.2 Cromatograma típico y algunos parámetros de medición frecuente.

3.2.4.2 El Proceso Cromatográfico

Dentro de la columna, la muestra se reparte entre las dos fases y es arrastrada por la fase móvil extendiéndose en una distribución de concentración de tipo gaussiano o de campana (t_1 en la figura 3.2.3). A medida que pasa el tiempo, el pico se ensancha y disminuye su altura (t_2 en la figura 3.2.3) pero conserva su forma gaussiana. ⁽²⁷⁾

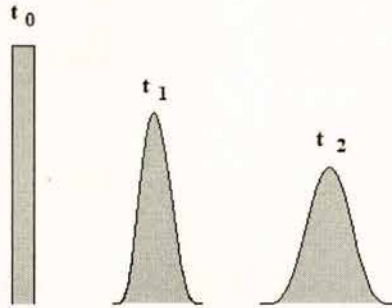


Figura 3.2.3 *Dispersión de Pico.*

3.2.4.3 *Posición de pico*

La posición del pico está determinada por la velocidad del flujo y el factor de capacidad k , el cual es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles del soluto en la fase móvil

El factor de capacidad k se relaciona con el tiempo de retención mediante la siguiente ecuación:

$$t_r = t_0 + t_0 k$$

El factor de capacidad k puede relacionarse con el coeficiente de reparto K mediante la ecuación:

$$K = k\beta$$

donde β es la relación de fases, que se representa por:

$$\beta = \text{volumen de fase móvil} / \text{volumen de fase estacionaria}$$

Por lo tanto el coeficiente de reparto K relaciona la concentración de la muestra en la fase estacionaria (C_S) entre la concentración de muestra en la fase móvil (C_M).

$$K = \frac{C_S}{C_M}$$

El coeficiente de reparto K es una constante termodinámica que mide la solubilidad de la muestra en la fase líquida. Depende de la temperatura de manera inversa, al aumentar la temperatura disminuye K y reduce la solubilidad y el tiempo pasado en la fase líquida. ⁽²⁷⁾

3.2.4.4 Selectividad (α)

Es el cociente entre los factores de capacidad (k) de un par de picos contiguos. Si no existe separación, α es igual a la unidad y su valor aumenta cuando aumenta la separación. La selectividad α de dos picos A y B se calcula como:

$$\alpha = \frac{t_{r,A}}{t_{r,B}} = \frac{t_r(A) - t_0}{t_r(B) - t_0}$$

α no depende de la fuerza de elución, sino de la afinidad del soluto respecto de la fase móvil y de la columna. Así, una disminución de la fuerza de elución de la fase móvil produce un aumento de la retención, que en general no se acompaña de cambios de selectividad. La variación de α puede lograrse variando el tipo de interacción entre las variables del sistema, es decir, soluto - fase móvil - fase estacionaria. ⁽²⁶⁾

3.2.4.5 Ancho de pico

Esta medición se ha establecido para facilitar el uso de integradores y programas computacionales para cálculos de integración y medición de parámetros cromatográficos. Idealmente los picos cromatográficos son gaussianos, sin embargo se presentan efectos en los que el pico “colea” o “cabecea”, generando un mayor ensanchamiento en la base y es por ello que se ha convenido en medir el ancho a distintas posiciones:

- 60.7 % de la altura del pico (W_i). En este lugar se encuentran los puntos de inflexión y en una distribución normal, la sección horizontal de la curva corresponde a dos desviaciones estándar (2σ).
- 50 % de la altura del pico ($W_{1/2}$).
- En la base del pico (W_b). Este valor se obtiene prolongando la línea base en la parte baja del pico y midiendo el segmento de esta línea, delimitado por la extrapolación de las ramas ascendente y descendente del pico. Ver *figura 3.2.4.* ⁽²⁶⁾

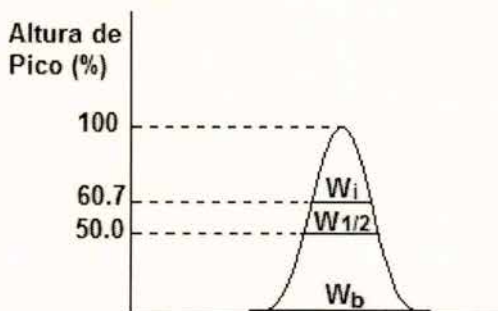


Figura 3.2.4 Anchos de pico empleados para el cálculo de N .

3.2.4.6 Eficiencia ^(27, 28)

La columna puede subdividirse en cortes transversales imaginarios en cada uno de los cuales se consigue un equilibrio de distribución transitorio de los analitos de la muestra entre la fase móvil y la fase estacionaria. Cada corte se llama “plato” y su largo “altura equivalente a un plato teórico” (H).

La eficiencia de una columna cromatográfica y por lo tanto su “poder” separativo se mide en función de el número de platos teóricos (N).

Un plato teórico evalúa el ensanchamiento de la banda del soluto a medida que pasa a través de la columna, y puede calcularse en función del tiempo de retención y el ancho de la base del pico como:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{w_b} \right)^2$$

Con frecuencia es preferible medir el ancho del pico a la mitad de su altura pues esta medición es menos sensible a la asimetría por coleo o cabeceo de los picos.

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

La mayoría de los parámetros operacionales de la columna pueden evaluarse por su efecto sobre la altura equivalente a un plato teórico (H). Entonces, para una columna de longitud L , con N platos teóricos, la altura del plato resulta:

$$H = \frac{L}{N}$$

Donde L es la longitud de la columna expresada en centímetros o milímetros. H indica la longitud de la columna necesaria para generar un plato; mientras mayor sea el número de platos, más pequeña es H y más eficiente es la columna.

La ecuación de Van Deemter, relaciona los parámetros operacionales de la columna con su eficiencia. En la forma simplificada:

$$H = A + B/\bar{\mu} + C\bar{\mu}$$

Donde H es la altura equivalente a un plato teórico.

A es la difusión parásita o efecto de camino múltiple, que es el resultado de la heterogeneidad en las velocidades del flujo y en la longitud de los caminos alrededor de las partículas del empaque, por lo que las moléculas de la muestra se mueven a diferente velocidad lineal provocando el ensanchamiento de los picos disminuyendo la eficiencia de la columna.

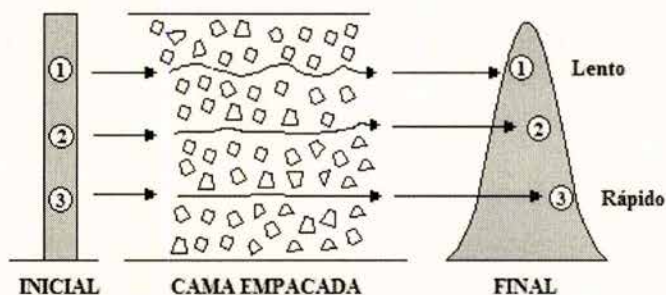


Figura 3.2.5 Efecto de Camino Múltiple.

B es la difusión molecular longitudinal o axial, es decir el soluto emigra de las zonas de alta concentración a las de menor concentración dentro de la fase móvil, y depende de la velocidad media de la fase móvil.

La difusión provoca una dispersión gaussiana que disminuye la eficiencia de la columna.

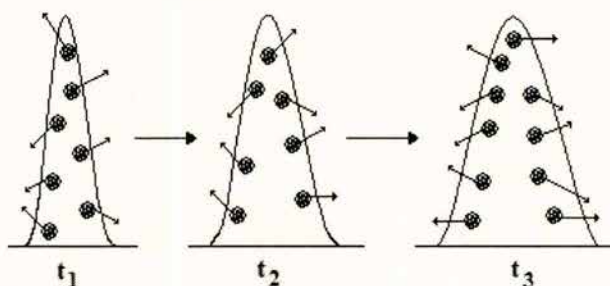


Figura 3.2.6 Difusión Longitudinal.

C es la resistencia a la transferencia de masa del soluto. El movimiento molecular lento dentro de la fase estacionaria significa un mayor tiempo de residencia en esta fase mientras que otras moléculas avanzan con la fase móvil. Conforme la fase móvil se mueve más rápido a través de la columna y más lenta sea la transferencia de masa, más ancha será la banda del soluto que eluye de la columna. C depende del factor de capacidad y de la velocidad de flujo de la fase móvil.

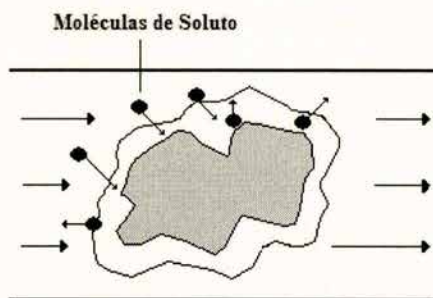


Figura 3.2.7 *Transferencia de Masa Lenta.*

$\bar{\mu}$ es la velocidad lineal promedio de la fase móvil, en la que la columna funciona con su máxima eficiencia y puede determinarse a partir de la longitud de la columna, L ; y el tiempo muerto t_0 .

$$\bar{\mu} = \frac{L}{t_0}$$

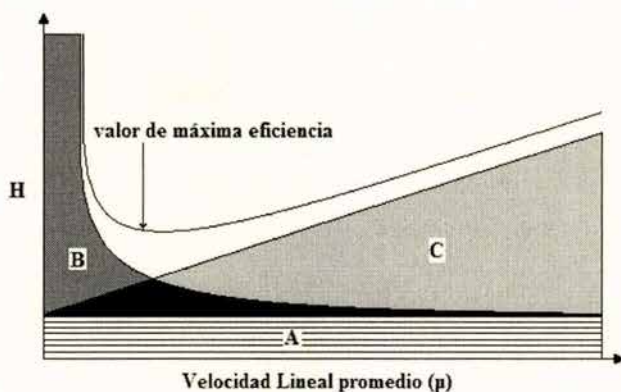


Figura 3.2.8 Representación esquemática de la ecuación de Van Deemter.

La curva que se obtiene de la ecuación de Van Deemter indica que existe un valor de flujo óptimo en el cual H es mínimo y por lo tanto se obtiene la mayor eficiencia. (figura 3.2.8).

3.2.4.7 Resolución ^(27, 28, 29)

La separación de dos picos se mide por la resolución R_s . La resolución está determinada por dos factores: Δt y W . Δt es una medida de la separación de los máximos de dos picos y W (ancho de pico) es una medida de la eficiencia de la columna.

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2(w_2 + w_1)}$$

La resolución es una función de tres factores:

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k}{1 + k} \right]$$

EFICIENCIA SELECTIVIDAD CAPACIDAD

La ecuación anterior muestra que la resolución es proporcional a la raíz cuadrada de N . Por lo tanto, duplicando la longitud de la columna la resolución aumenta en raíz cuadrada de 2.

Por otro lado, la resolución aumenta al aumentar el factor de capacidad k . Aumentar el factor de capacidad es equivalente a aumentar la fracción de tiempo que pasa un soluto en la fase estacionaria. Hay un límite práctico de aumento del factor de capacidad, porque los tiempos de retención se hacen demasiado grandes y los picos demasiado anchos. Esta ecuación también nos dice que la resolución aumenta al aumentar α . Ya que α está relacionada con los coeficientes de reparto de los solutos en las dos fases, para cambiar la retención relativa, α , hay que cambiar la fase estacionaria en cromatografía de gases y la fase estacionaria y la fase móvil en HPLC.

3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica de separación de componentes no volátiles o térmicamente inestables, entre los que se encuentran: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarburos, ácidos grasos, carbohidratos, fenoles, pesticidas, antibióticos, etc.; los cuales son disueltos en un disolvente adecuado y son forzados por medio de altas presiones a pasar a través de una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución.

La HPLC ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70's, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en los laboratorios de análisis modernos, ya sea esté dedicado a la investigación básica o aplicada, industrial o biológica.

Entre las ventajas de la HPLC se encuentran:

- Rapidez de los análisis, ya que se usan columnas cortas de partículas pequeñas.
- Alta resolución.
- Versatilidad, cualquier muestra que se pueda disolver.
- Buenos análisis cuantitativos.

Las limitaciones de HPLC son:

- Instrumentación y consumibles costosos.
- No existen detectores universales / sensibles.
- Largos periodos de capacitación para los analistas.
- Requiere de métodos complementarios (espectroscopias) para la confirmación.

3.3.1 Formas de Cromatografía Líquida ^(25, 28)

La cromatografía líquida puede clasificarse de la siguiente forma: (ver figura 3.2.1)

- **Cromatografía Líquido-Sólido (CLS) o de Adsorción.**

El mecanismo de separación en este tipo de cromatografía, se basa en la competencia que existe entre las moléculas de la muestra y las de la fase móvil (generalmente disolventes no polares) por ocupar los sitios activos en la superficie de un sólido. Algunos de los sólidos utilizados con más frecuencia son alúmina y sílica gel.

Este tipo de cromatografía es aplicable a muestras no polares y semi-polares, de peso molecular no mayor de 1000 uma. Las columnas utilizadas normalmente varían entre 15 y 25 cm de longitud y entre 2 y 3 mm de diámetro interno.

- **Cromatografía Líquido-Líquido (CLL) o de Partición.**

El mecanismo de separación en este caso, se basa en la distinta solubilidad que presenta una molécula de la muestra en la fase móvil y en la fase estacionaria. De ahí que los compuestos más solubles en la fase estacionaria sean selectivamente retenidos por ella en tanto que los menos solubles son transportados más rápidamente por la fase móvil.

La cromatografía líquido-líquido se utiliza para compuestos moderadamente polares, cuyo peso molecular es inferior a 1500 uma.

Las columnas comúnmente utilizadas son de 15 a 50 cm de longitud y de 3 a 4 mm de diámetro interno.

- ***Cromatografía de Fase Químicamente Unida (CFQU).***

Sí las fases estacionarias se tratan químicamente, es posible hacer reaccionar diferentes grupos químicos sobre la superficie, inmovilizándolos y haciéndolos resistentes al desgaste mecánico por la fase móvil de esta manera es posible obtener diferencias en la selectividad. Dichos grupos pueden ser de naturaleza polar, como el grupo amino (-NH₂) y el grupo nitrilo (-CN) en el caso de la cromatografía de fase normal, o bien no polar en donde los grupos pueden ser: octilo (-C₈H₁₇), octadecilo (-C₁₈H₃₇), fenilo (-C₆H₅), etc. en el caso de la cromatografía de fase inversa.

La cantidad de fase estacionaria que es posible unir a la superficie de un soporte (generalmente partículas de sílice) es limitada y como consecuencia la cantidad de muestra usada en estas columnas es necesariamente reducida (<1 mg).

El mecanismo de separación de esta técnica no ha sido completamente elucidado, sin embargo el 90% de las separaciones modernas se efectúa sobre material químicamente modificado.

Este tipo de cromatografía es aplicable a compuestos solubles en agua o metanol, proteínas, péptidos, azúcares, ácidos grasos y fármacos.

- ***Cromatografía de Intercambio Iónico (CII).***

En este caso se emplean rellenos en los cuales la partícula está constituida por un polímero o por silicagel modificada, en cada caso unida a un grupo funcional aniónico o catiónico (típicamente sulfónico, $-\text{SO}_3^-$, para el intercambio de cationes, amonio cuaternario, $-\text{NH}_4^+$, para el intercambio de aniones). La separación se basa en la adsorción reversible de iones en la fase estacionaria con grupos funcionales de cargas opuestas.

Este tipo de separación se aplica a compuestos ionizados, aniones, cationes, azúcares, ácidos carboxílicos, aminas, etc..

- ***Cromatografía de Exclusión (CE).***

En este tipo de cromatografía, la separación se efectúa de acuerdo con el tamaño de las moléculas. En ella se emplean materiales de porosidad controlada, que funcionan como un filtro o tamiz que clasifica las moléculas de la muestra según un orden decreciente de tamaño molecular. El mecanismo de separación es tal que el tiempo de retención es inversamente proporcional al volumen de las moléculas en la fase móvil y por lo tanto proporcional al peso molecular; las moléculas más grandes son las primeras en eluir, y las más pequeñas son las últimas. Si se dispone de estándares apropiados, de peso molecular conocido, puede evaluarse el peso molecular de un compuesto desconocido. Este tipo de cromatografía es aplicable a compuestos de pesos moleculares elevados tales como los polímeros orgánicos.

3.3.2 Instrumental

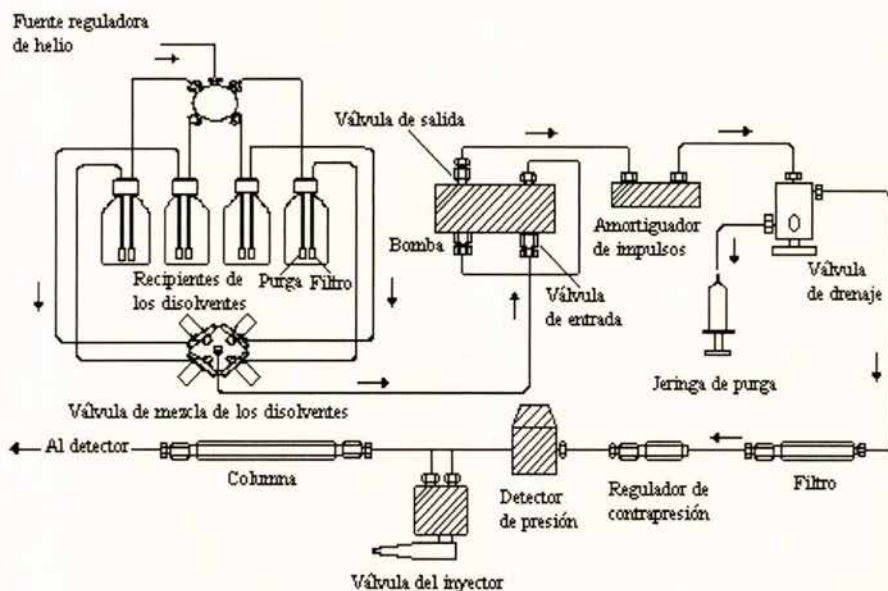


Figura 3.3.1 Esquema de un Cromatógrafo de Líquidos.

3.3.2.1 Fase móvil ^(25, 26)

La fase móvil en HPLC cumple un papel fundamental, ya que puede por sí misma modificar la selectividad de las separaciones.

Las características que debe presentar toda fase móvil para ser útil en HPLC son las siguientes:

- Alto poder solubilizante de las muestras.
- No degradar o disolver la fase estacionaria.
- Baja viscosidad.

- Compatibilidad con el detector utilizado.
- Adecuado punto de ebullición.
- Alto grado de pureza.
- Polaridad adecuada para permitir la retención conveniente de la muestra en la columna. Un valor de k (sección 3.2.4.3) entre 2 y 10 es aceptable.

Es esencial que la muestra sea soluble en la fase móvil, si esto no es posible, debe tenerse en cuenta la miscibilidad entre el disolvente de la muestra y la fase móvil, ya que puede ocurrir precipitación de la muestra dentro del inyector o en la columna si el disolvente de la muestra y la fase móvil son muy diferentes en polaridad.

Los disolventes con un elevado grado de reactividad, tales como las olefinas, nitrocompuestos, aldehídos o cetonas, deben evitarse, ya que pueden reaccionar con la muestra, la fase estacionaria, o los componentes del equipo cromatográfico.

La viscosidad de la fase móvil está estrechamente relacionada con la presión del sistema. Con disolventes viscosos, la eficiencia de la separación es menor debido a que el coeficiente de difusión de la muestra se reduce, y se dificulta la transferencia de masa entre la fase móvil y la fase estacionaria.

El aumento de viscosidad reduce la permeabilidad de la columna, y al mismo caudal la presión será mayor que la producida por un disolvente de baja viscosidad.

La fase móvil debe ser compatible con el detector empleado. Considerando que el detector más difundido es el espectrofotométrico de UV-VIS, es habitual elegir un disolvente “transparente” a la longitud de onda de trabajo. Esa transparencia puede evaluarse por la longitud de onda de corte λ_c , que es la longitud de onda a la cual la absorbancia del solvente, en una celda de 1 cm de paso óptico, es igual a 1 unidad de absorbancia empleando aire como referencia.

La fase móvil debe ser de alta pureza, usualmente grado espectroscópico o bien grado cromatográfico. La presencia de impurezas puede, por un lado, inducir modificaciones de la selectividad de la fase móvil, y por otro contribuir a una señal de base importante en el detector.

3.3.2.2 Recipiente de la fase móvil ⁽²⁶⁾

Es el recipiente que contiene la fase móvil, normalmente es un frasco de vidrio o polímero resistente, con tapa adecuada para prevenir el ingreso de partículas al sistema. Puede ubicarse dentro en un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el disolvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.

Al extremo del tubo de salida del disolvente se conecta un filtro de acero con 2 o 10 μm de porosidad que impide el ingreso de partículas a la bomba.

La capacidad del frasco varía de acuerdo al tipo de cromatografía que se trabaje; 0.5 l en el modo microbore, 1 litro en los métodos convencionales y hasta varios litros en cromatografía preparativa.

Los sistemas que necesitan procesos de degasificación continua están provistos de una tapa especialmente diseñada para tal fin, en la cual se encuentra un orificio para la entrada del gas inerte de degasificación, otro para la salida del disolvente y una válvula que permite una presión positiva del gas sobre el disolvente venteando el exceso. Actualmente los equipos están provistos de degasificación al vacío.

3.3.2.3 *Tuberías* ⁽²⁶⁾

La fase móvil empleada en HPLC debe circular por tuberías que conecten el recipiente del disolvente con la bomba, la bomba con el inyector, y éste con uno o más detectores conectados en serie, y eventualmente con un colector de fracciones o válvulas de distribución. Las tuberías deberán de ser inertes y de acuerdo a su ubicación en el sistema cromatográfico, resistentes a altas presiones. Así, se emplean tubos de acero inoxidable (316 o 304) o poliméricas (polipropileno, polietilencetona o teflón) siendo las tuberías de acero 316 y las de teflón las más comúnmente utilizadas. Las tuberías de acero se utilizan para conectar los componentes sometidos a alta presión (entre bomba e inyector, inyector y columna, columna y detector y entre detectores conectados en serie) y los materiales poliméricos para conectar los componentes donde la presión es atmosférica o ligeramente superior (recipiente de fase móvil-bomba, último detector-frasco de residuos).

Las tuberías de acero tienen un diámetro externo estandarizado: 1/16 pulgadas. Sin embargo su diámetro interno es variable y se selecciona la de sección más fina para conectar los instrumentos por los cuales circula

la muestra (entre inyector y detector, de modo de no provocar dilución de la muestra) y la de sección más gruesa para conectar aquellos componentes del sistema por los que no circula la muestra, y en los cuales un diámetro interno delgado sólo aumentaría la presión del sistema. Las conexiones por donde no circula la muestra son de diámetro interno entre 0.5 y 0.7 mm, y aquellos por donde circula la muestra son de hasta 0.2 mm.

3.3.2.4 Uniones ⁽²⁶⁾

Las uniones permiten conectar las tuberías, y con ellas, los distintos componentes del sistema cromatográfico. Básicamente, existen dos tipos de uniones: convencionales y universales:

Una unión convencional consiste en dos piezas de acople perfecto, la unión “macho”, consiste en una férula que se afirma a la tubería conectora y un tornillo que se ajusta a la unión “hembra”, presente en un conector o componente de un módulo, dejando un volumen interno libre al disolvente prácticamente nulo (volumen muerto cero).

En una unión universal la férula está constituida por un polímero o metal (Bronce) deformable y el tornillo posee una cabeza mayor y fresada, de manera que permite el ajuste manual de la unión.

Las uniones deben reunir determinadas características, entre ellas:

- Deben ser inertes a fases móviles y muestras.
- Deben cerrar herméticamente.

3.3.2.5 Bomba ^(25, 26)

Las bombas de HPLC impulsan la fase móvil proveniente del recipiente del disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna. Su caudal de trabajo puede ser muy variable. De acuerdo con las características de funcionamiento y de diseño, se pueden considerar básicamente dos tipos de bombas: Bombas mecánicas y Bombas neumáticas. En lo que atañe a las primeras, las hay de dos tipos distintos:

1. *Bombas recíprocas.*

Existen varios tipos de bombas recíprocas: de un solo pistón, de dos pistones, de tres pistones, bomba Tándem, y bomba a pistón y diafragma.

Son bombas que desplazan flujos de volumen constante en forma no continua, sino más bien pulsante. La forma en como operan estas bombas es la siguiente: Mediante el movimiento de un pistón, y a través de un sistema de válvulas que alternadamente se abren y se cierran, se llena y se vacía, de modo alternativo, una pequeña cámara. Normalmente la válvula de entrada se ubica en la parte inferior y la de salida en la parte superior del cabezal de la bomba. Este diseño permite que las burbujas que accidentalmente entren al sistema sean fácilmente eliminadas.

Las bombas recíprocas permiten variar el caudal entregado por alguno de los siguientes mecanismos:

- Variando el recorrido del pistón.
- Variando la velocidad de movimiento del pistón.

El volumen de la cámara del pistón es pequeño, normalmente entre 35 y 400 μl . Este volumen permite cambiar fácilmente la fase móvil, y disminuye el tiempo de demora para hacer efectivo un cambio de la composición del disolvente durante un gradiente de elución.

La bomba de un solo pistón es el modelo más sencillo de las bombas recíprocas. Esta bomba impulsa a la fase móvil en ciclos alternados dados por los ciclos de llenado y vaciado de la cámara de bombeo. En uno de los ciclos el pistón entrega el disolvente contenido en la cámara y en el ciclo complementario cierra su comunicación con la columna y toma disolvente del recipiente.

El empleo de bombas de dos pistones de funcionamiento sincrónico reduce los pulsos en los cuales no circula fase móvil. En este caso, los pistones están montados sobre engranes individuales a una distancia de 180° pero movidos por un solo engrane central que provee el sincronismo, de modo que cuando un pistón llena su cámara el restante entrega disolvente, y cuando el primero entrega disolvente, el segundo llena su cámara. Sistemas más sofisticados emplean incluso tres pistones en fase de 120° .

Otra alternativa para la reducción de pulsos está dada por la bomba Tándem. Esta bomba contiene un cabezal con dos pistones de diferente tamaño, movidos a distinta velocidad. Por ejemplo, el pistón inferior es de mayor diámetro y se mueve al doble de velocidad que el superior. Cuando el pistón superior entrega disolvente, el inferior llena su cámara. Cuando el pistón superior retrocede para llenar su cámara, el inferior impulsa la fase móvil, tanto hacia la cámara superior como hacia la columna.

- ***Bomba a diafragma.***

La bomba a diafragma es un tipo particular de bomba recíproca. En lugar de pistón, contiene un diafragma que separa el mecanismo de la cámara de bombeo.

El disolvente llega a la cámara impulsado por una bomba de baja presión, a través de la válvula de entrada. Luego, un pistón bombea aceite que presiona sobre el diafragma, el que impulsa el disolvente contenido en la cámara hacia la válvula de salida. Al reducirse la presión de la cámara por salida de la fase móvil, se reduce paralelamente la presión del aceite y se abre la válvula de entrada. En este punto, la bomba de baja presión llena nuevamente la cámara, iniciando otro ciclo.

2. Bomba de desplazamiento continuo.

Llamada también bomba de émbolo o bomba de tipo jeringa, es a diferencia de las bombas recíprocas, un dispositivo de desplazamiento continuo. Es decir, el disolvente contenido en un cilindro es impulsado hacia el inyector por medio de un movimiento continuo y hacia delante del pistón. El recorrido del pistón, y el volumen desplazado es, en los casos en que se aplica, suficiente para efectuar un número determinado de ensayos completos, sin necesidad de recargar su cámara.

La principal ventaja de estas bombas es la total ausencia de pulsos ya que la cámara no necesita ser recargada, mientras que la principal desventaja está dada por el tiempo necesario para recargar esa cámara cuando se vacía.

Bomba neumática.

En este sistema de bombeo el líquido es desplazado mediante la presión ejercida por un gas inerte, ya sea en forma directa sobre el líquido o bien sobre el recipiente comprimible que lo contiene.

Los flujos obtenidos están libres de pulsaciones y son de presión constante, lo cual significa que si la caída de presión de la columna cambia, el flujo también cambiará.

Las desventajas de este tipo de bomba son la capacidad limitada en el volumen total que pueden bombear y la difusión que presenta el gas en el líquido.

3.3.2.6 Inyector

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en disolución sin interrumpir el caudal del disolvente a través del sistema.

Los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el caudal hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un bucle (loop) en el cual se introduce la disolución a inyectar. Las válvulas pueden accionarse manual o automáticamente.

Están constituidas por un cuerpo fijo, un rotor con un sello que gira y un “loop” de muestra externo que contiene la muestra. El “loop” es intercambiable, de modo que la cantidad de muestra inyectada puede escogerse entre una serie de medidas estándar (en los inyectores convencionales, entre 5 y 2000 μl).⁽²⁶⁾

La *figura 3.3.2* muestra la secuencia de muestreo e inyección de muestra de un inyector automático. Antes de iniciar la secuencia de

inyección, la válvula de inyección se encuentra en posición “mainpass” (*figura 3.3.2 (b)*), en la cual, la fase móvil fluye a través del “loop” de muestra y aguja, asegurando que todas las partes que están en contacto con la muestra, se laven durante el análisis. Cuando la secuencia de muestreo se inicia, la válvula cambia a la posición “bypass”, en la cual el disolvente, desde la bomba, entra en la válvula por la vía 1 y fluye directamente a la columna a través de la vía 6.

Posteriormente, se eleva la aguja y el vial es colocado debajo de la aguja. La aguja se inserta en el vial y se introduce la muestra en el “loop”. (*figura 3.3.2 (a)*). Cuando el “loop” es llenado, la aguja se levanta y el vial vuelve a colocarse en la bandeja. La aguja desciende a su asiento y la válvula de inyección vuelve a la posición “mainpass”, introduciendo la muestra en la columna. ⁽³⁰⁾

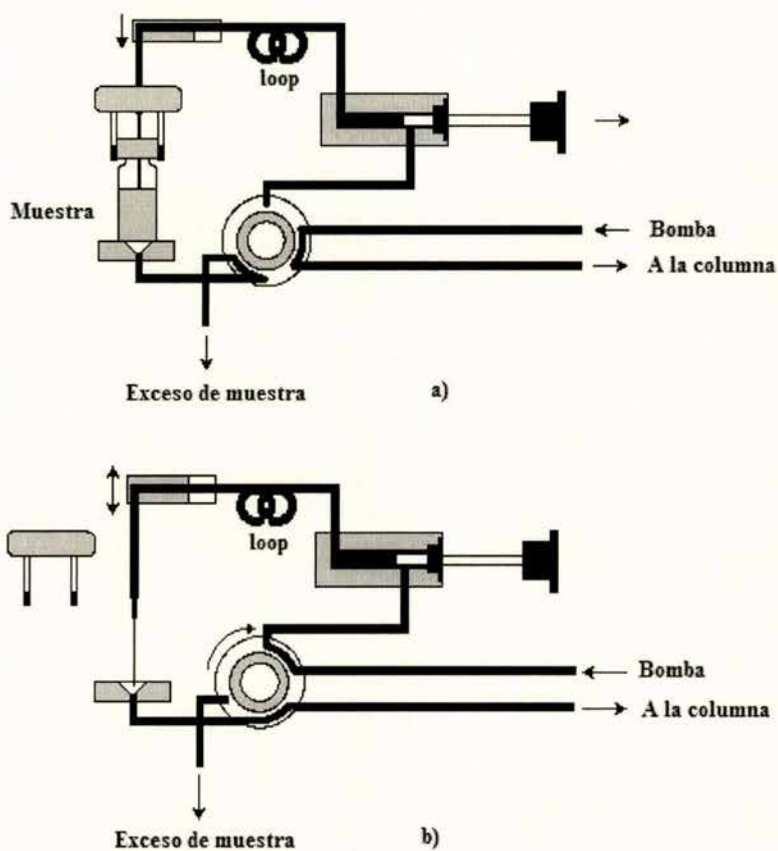


Figura 3.3.2 Válvula de inyección en posición de: **a)** Toma de muestra y **b)** Inyección de muestra.

3.3.2.7 *Columna* ^(25, 29)

La columna es la parte del sistema cromatográfico en donde se lleva a cabo la separación de los componentes de una mezcla. Consiste en un segmento de tubo de material inerte, de diámetro uniforme y capaz de resistir altas presiones.

Algunos equipos cuentan con un termostato para controlar la temperatura de la columna a unos cuantos grados por encima de la temperatura ambiente. Esto mejora la reproducibilidad de los tiempos de retención y las áreas de pico.

El calentamiento de la columna disminuye la viscosidad del disolvente, reduciéndose así la presión del sistema. Al aumentar la temperatura se acortan los tiempos de retención y mejora la resolución porque la desorción es más rápida.

En HPLC se emplean columnas de acero empacadas comúnmente de sílica gel. La longitud de éstas es de 5-30 cm y el diámetro interno de 1-5 mm. El tamaño típico de las partículas de la fase estacionaria en HPLC es de 3-10 μ m. La eficiencia de una columna empacada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria (*figura 3.3.3*).

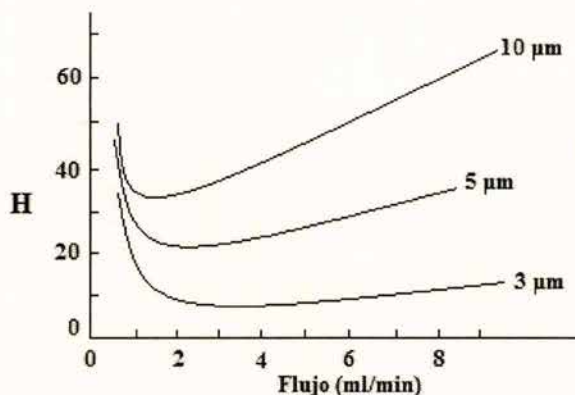


Figura 3.3.3 Ensanchamiento de banda en función del flujo para un tamaño de partícula de 10, 5 y 3 µm

Una razón de por qué las partículas pequeñas originan mejor eficiencia es que permiten un flujo más uniforme a través de la columna, reduciendo así el término de camino múltiple (A) de la ecuación de Van Deemter (sección 3.2.4.6). Otra razón es que el camino que debe recorrer el soluto en su difusión en la fase móvil que hay entre las partículas es del orden del tamaño de las partículas. Cuanto más pequeñas son las partículas, menor es la distancia en la que debe difundirse el soluto en la fase móvil.

3.3.2.7.1 Fase estacionaria

La fase estacionaria comprende un soporte de partículas de sílica gel de diversas formas (figura 3.3.4), que son permeables al disolvente, y que tienen un área superficial de varios centenares de m^2/g . La sílica se

disuelve en agua a pH superior a 8 por lo que no puede utilizarse por encima de ese pH. ⁽²⁹⁾

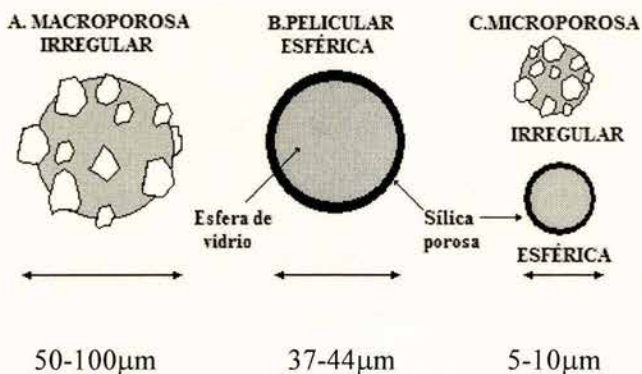


Figura 3.3.4 Formas de partícula de sílica gel. ⁽²⁸⁾

La superficie de la sílica (*figura 3.3.5*) tiene hasta 8 μmoles de grupos silanol (Si-OH) por m². Todos los grupos silanol están prácticamente protonados si el pH es ~2 - 3. Se disocian formando Si-O⁻ en un amplio intervalo de pH por encima de 3. ⁽²⁹⁾

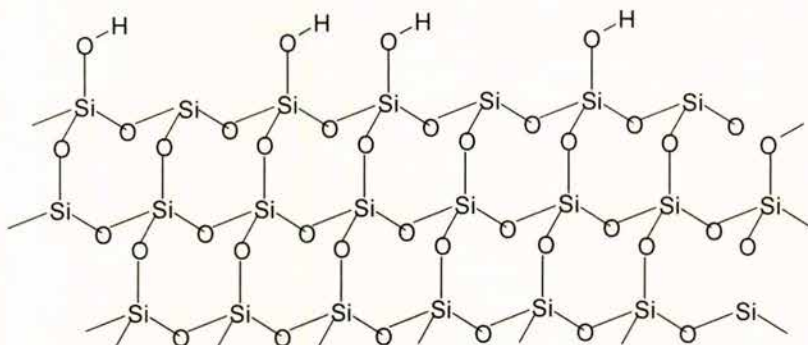


Figura 3.3.5 Esquema de la estructura de un polímero de sílica gel. ⁽²⁸⁾

Los grupos residuales de silanol se recubren con grupos de trimetilsilil por reacción con $\text{ClSi}(\text{CH}_3)_3$, eliminando así los puntos de adsorción polar (figura 3.3.6). ⁽²⁹⁾

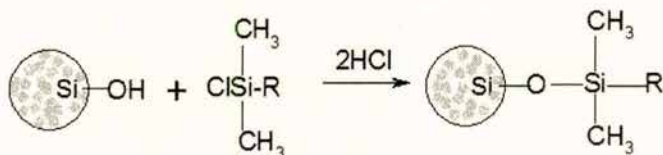


Figura 3.3.6 Síntesis de empaques de cromatografía químicamente unida.

Tabla 3.3.1 Fases estacionarias comunes en HPLC.

<i>Fases polares comunes</i>		<i>Fases no polares comunes</i>	
R = (CH ₂) ₃ NH ₂	Amino	R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Octadecilo
R = (CH ₂) ₃ C≡N	Ciano	R = (CH ₂) ₇ CH ₃	Octilo
R = (CH ₂) ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Diol	R = (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	Fenilo

El enlace siloxano (Si-O-Si-R) se hidroliza por debajo de pH = 2, de modo que la HPLC con una fase enlazada en soporte de sílice está limitada al intervalo de pH de 2 a 8. ⁽²⁹⁾

3.3.2.8 El proceso de elución ⁽²⁹⁾

En cromatografía de adsorción el disolvente compite con las moléculas del soluto por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria. La diferente capacidad de los distintos disolventes para eluir un determinado soluto del adsorbente es prácticamente independiente de la naturaleza del soluto. Se puede describir la elución como el desplazamiento de un soluto de la fase estacionaria por un disolvente.

La cromatografía de adsorción sobre sílice pura es un ejemplo de *cromatografía de fase normal*, que se caracteriza por usar una fase estacionaria polar y un eluyente no polar. Un disolvente polar tiene mayor fuerza eluyente. La fuerza eluyente (ϵ°) es una medida de la energía de adsorción del disolvente. *La cromatografía de fase inversa*, que es la más utilizada, se caracteriza porque la fase estacionaria es no polar o débilmente polar y el disolvente es polar.

La elución de los componentes se puede llevar a cabo de forma isocrática (con un único disolvente o una mezcla de disolventes fija), o bien sí un disolvente no permite una elución suficientemente rápida de todos los componentes, se puede usar una elución gradiente. En este caso, se van añadiendo cantidades crecientes de un disolvente B a un disolvente A de manera que vaya aumentando la fuerza de elución. En una separación con fase inversa, la fuerza eluyente disminuye a medida que el disolvente se hace más polar.

3.3.2.9 *Detector* ⁽²⁶⁾

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite detectar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los detectores pueden clasificarse en universales y selectivos. Los **detectores universales** miden el cambio de alguna propiedad física de la fase móvil que contiene el analito en comparación con la misma fase móvil pura. Ejemplos típicos son el detector de índice de refracción y el de conductividad. Los **detectores selectivos** son aquellos sensibles a alguna propiedad física característica del soluto, por ejemplo el detector de UV, que produce una señal proporcional a la absorbancia del soluto a una longitud de onda dada. Otro ejemplo es el detector de fluorescencia, empleado para la detección de solutos con fluorescencia natural o conferida por reacción con un reactivo fluorogénico.

Detectores Universales

Detector de Índice de Refracción

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra. Es un detector universal y no destructivo. Es muy poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es muy afectado por cambios de temperatura. No puede utilizarse con gradiente de elución porque el cambio de la composición de la fase móvil se acompaña del cambio de su índice de refracción.

Detectores selectivos

Detector UV

Es el detector más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad e intervalo lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede emplearse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que estos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. En general permiten cambiar el volumen de su celda, típicamente con volúmenes de 1 a 12 μl . Es un detector muy poco sensible a los cambios de caudal y temperatura. El detector UV opera en el intervalo de 190 a 350 nm, y en algunos equipos se puede extender a la zona del visible del espectro (350 a 700 nm) recibiendo así el nombre de detector UV / Visible. La concentración del analito en la muestra se determina por aplicación de la ley de Beer $A = \epsilon * b * c$, donde A es la absorbancia, ϵ es la

absortividad molar del analito, b es la longitud de la celda en cm y c es la concentración de analito en la muestra expresada en moles / l.

Existen dos tipos de detectores UV; los de longitud de onda fija y los de longitud de onda variable.

Detector de onda fija o fotométrico

Este detector opera a longitudes de onda predeterminadas por las líneas de emisión de su lámpara, habitualmente de mercurio de baja presión. Como longitudes de onda de trabajo se utilizan las bandas de emisión de la lámpara de mercurio, especialmente la fuerte línea de 254 nm. El verdadero monocromador del instrumento es la propia emisión de la lámpara pero, para eliminar líneas de otras longitudes de onda lejanas a la línea de trabajo se utilizan filtros de interferencia. Además de la longitud de onda de 254 nm, suelen emplearse filtros que permiten trabajar a 313, 334, 365 nm. El empleo de filtros de óxidos de fósforo permite trabajar incluso a 280 nm. La lámpara de mercurio no emite a 280 nm, pero estos filtros, al ser irradiados con la lámpara de mercurio emiten a esa longitud de onda.

El cambio de lámpara permite incluso trabajar a otras longitudes de onda, por ejemplo a 214 nm con una lámpara de Zn, y a 229 nm con una lámpara de Cd.

Detector de onda variable o espectrofotométrico

Este detector es simplemente un espectrofotómetro, en el cual se reemplaza el compartimiento de cubetas por una celda de flujo.

Es mucho más versátil que el detector de longitud de onda fija ya que al tener red de difracción permite seleccionar libremente la longitud de onda de trabajo, así se puede escoger la longitud de onda de máxima absorción del analito para aumentar la sensibilidad de medición. Emplea una lámpara de emisión continua, de Deuterio o de Xenón. La luz emitida por la lámpara se enfoca en un monocromador, habitualmente una red holográfica de difracción, y la luz monocromática escogida se dirige hacia la celda de medida y de allí hacia el fotomultiplicador.

Otro detector de UV es el denominado de arreglo de diodos, en este detector se emplea un sistema óptico invertido: la celda se ilumina con luz “blanca”, es decir, no monocromada y la luz emergente de la celda llega a la red de difracción, la cual esta ubicada antes de la celda, y allí es dispersada hacia el elemento fotosensible. En lugar de una fotocélula se emplea un conjunto de fotocélulas o fotodiodos montados en un chip de silicio. De esta forma, se consigue medir no solo la luz transmitida a una longitud de onda, sino todo el espectro de absorción del eluido en tiempo real.

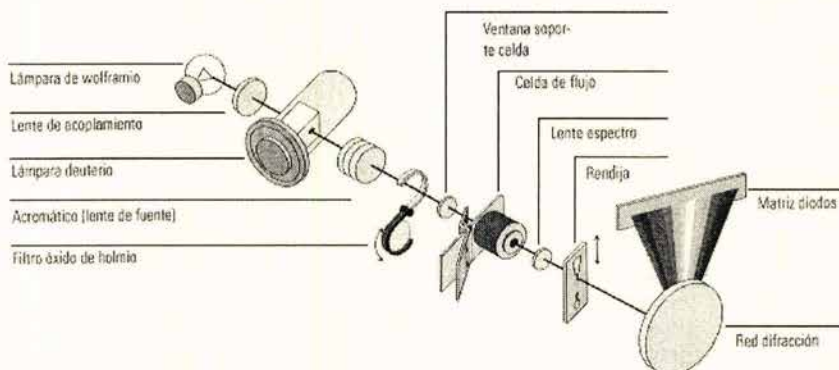


Figura 3.3.7 Sistema óptico de un Detector de UV de arreglo de diodos.

Detector de Fluorescencia

El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia “natural” o conferida por derivatización con un reactivo fluorogénico. Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a dos factores:

- Existen pocas sustancias de fluorescencia nativa y las reacciones de derivatización implican la presencia de un grupo funcional derivatizable en la molécula del analito.
- Se utilizan dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una longitud de onda dada, varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirán además a la longitud de onda elegida.

En un detector espectrofluorométrico típico, la luz emitida por la lámpara de Xenón se dirige al monocromador de excitación por medio de un espejo cóncavo, a través de una ranura de entrada. El haz monocromador sale por una segunda ranura, se focaliza en un espejo esférico e incide en un separador de onda. De aquí casi la totalidad de haz luminoso entra en la celda de medida y un 7% incide en un fotomultiplicador para el control de la intensidad. La emisión del haz luminoso que sale de la celda pasa al monocromador de emisión, formado por una tercera ranura de salida y un espejo plano, una red de difracción cóncava y una cuarta ranura de salida siendo detectado por el fotomultiplicador que va a generar la señal de salida. La lámpara de Xenón es la fuente de emisión más ampliamente difundida por producir un espectro continuo en el intervalo de 260 a 660 nm.

Detector Electroquímico

Es un detector muy sensible, unas 1000 veces más sensible que el detector de UV, y altamente selectivo. La selectividad se debe, no sólo a que detecta compuestos capaces de ser oxidados y reducidos, sino que puede reducirse el número de esos compuestos detectados por una cuidadosa elección del potencial aplicado.

La detección ocurre en la superficie de un electrodo interpuesto en el paso del eluido de la columna. Este detector emplea tres electrodos: el electrodo de trabajo, el de referencia y el auxiliar. La reacción redox es inducida en el electrodo de trabajo, mientras el electrodo auxiliar provee la carga de neutralización complementaria. Entre estos electrodos se fija el

voltaje apropiado para la detección. El electrodo de referencia, por su parte, produce un potencial fijo y estable contra el cual se mide el potencial del electrodo de trabajo, y un potenciostato provee una diferencia de potencial estable entre el electrodo de trabajo y el auxiliar, el cual es monitoreado por el electrodo de referencia. Un amplificador de corriente de nanoamperes produce una señal de salida, proveniente del flujo de corriente entre los electrodos auxiliar y de referencia, causada por la transferencia de electrones del proceso de óxido-reducción.

Su principal limitación está dada por el tipo de fase móvil a emplear, que necesariamente debe ser conductiva, limitando su campo de aplicación a la cromatografía de fase reversa e intercambio iónico. Por otra parte, es evidente su naturaleza destructiva respecto al analito.

La degasificación es muy importante en el modo “reductivo”, ya que la presencia de aire disuelto en la fase móvil da lugar al gasto de potencial en la reducción de este oxígeno, generándose señales ruidosas y baja sensibilidad de detección. En estos casos se recomienda la degasificación continua, en general por burbujeo de Helio. Esta precaución no reviste la misma importancia en la detección en modo “oxidativo”, pudiendo emplearse los métodos convencionales de degasificación.

3.3.2.10 Sistema de registro y procesamiento de datos ⁽²⁶⁾

El resultado del ensayo cromatográfico es, por un lado, la obtención de fracciones separadas de los componentes de la muestra, y por el otro, la de un gráfico o cromatograma (*sección 3.2.4.1*), de cuya interpretación pueden extraerse conclusiones cualitativas y cuantitativas. Este registro se

obtiene a partir de la señal proveniente del detector por medio de un sistema de registro y procesamiento de datos, entre los que se pueden citar:

- Registrador gráfico, que convierte la señal en un gráfico del tipo X - Y .
- Integrador, que permite no solo obtener un registro gráfico (cromatograma) sino también su tratamiento matemático para el cálculo de las concentraciones.
- Computadora. Con un software apropiado es posible obtener tanto el registro gráfico del cromatograma como los cálculos correspondientes, la manipulación de datos, el almacenamiento de ensayos, generación de reportes, e incluso el manejo global de varios cromatógrafos.

3.4 Cromatografía de Gases

La Cromatografía de gases (CG) es una técnica que permite la separación de mezclas que contienen compuestos orgánicos volátiles, que fluyen en una corriente gaseosa a través de una fase estacionaria fijada a un tubo largo y fino.

Entre las principales desventajas de esta técnica se encuentran la identificación cualitativa de los componentes separados, dificultades para analizar muestras que no son volátiles, que se descomponen a altas temperaturas o poseen alto peso molecular, así como, muestras complejas que requieren de extracción, limpieza o derivatización o poseen elevada polaridad. Se ha estimado que sólo un 20% de las sustancias orgánicas conocidas pueden separarse por CG sin tratamiento previo.

3.4.1 Tipos de cromatografía gaseosa

Existen dos tipos de cromatografía de gases: la *cromatografía gas-sólido* y la *cromatografía gas-líquido*. (ver figura 3.2.1)

La *cromatografía gas-sólido* se basa en una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos como consecuencia de la adsorción física.

La *cromatografía gas-líquido* se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte.

En la cromatografía *gas-líquido*, la fase móvil se denomina gas portador, ya que es un gas inerte (nitrógeno, helio o hidrógeno) cuya

finalidad es transportar las moléculas de la muestra a través de la columna.

Los líquidos orgánicos de alto punto de ebullición constituyen la fase estacionaria. La fase líquida se extiende como una película delgada sobre un sólido inerte llamado soporte sólido. La base para la separación es la partición de la muestra dentro o fuera de esta película líquida.

3.4.2 Instrumental

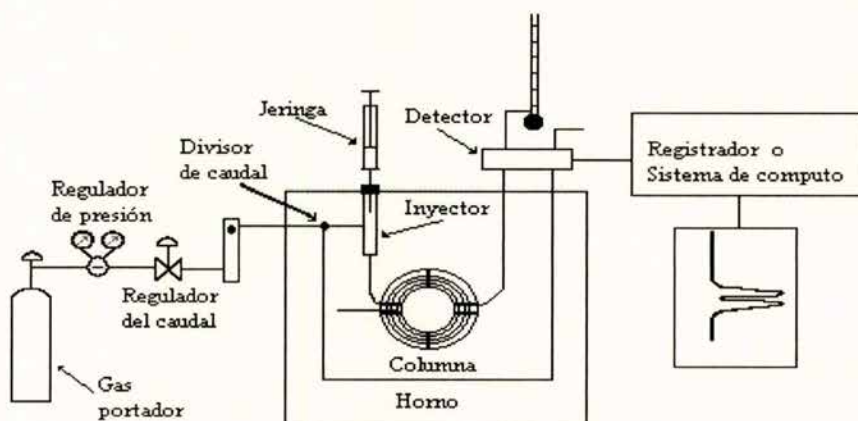


Figura 3.4.1 Esquema de un Cromatógrafo de Gases.

3.4.2.1 Gas Portador ⁽²⁷⁾

El propósito primario del gas portador es transportar los componentes volátiles de la muestra a través de la columna. El propósito secundario es el de obtener una matriz adecuada para que el detector mida el componente de la muestra.

El gas portador deberá ser inerte y no reaccionar ni con la muestra ni con la fase estacionaria.

Es importante que el gas portador sea de alta pureza, ya que impurezas como el agua o el oxígeno pueden alterar químicamente la fase estacionaria y en consecuencia modificar los tiempos de retención o producir señales de fondo en el detector o picos fantasmas.

Los gases comúnmente utilizados son: hidrógeno, helio y nitrógeno.

Se puede escoger entre optimizar la eficiencia de la columna o reducir el tiempo de análisis. En una determinada columna, un gas portador de peso molecular más elevado generará más platos teóricos, pero el tiempo de análisis será mayor.

Sí se desea optimizar la velocidad del análisis, aunque disminuya la eficiencia, es mejor escoger un gas portador ligero, como el helio o el hidrógeno. (*figura 3.4.2*).

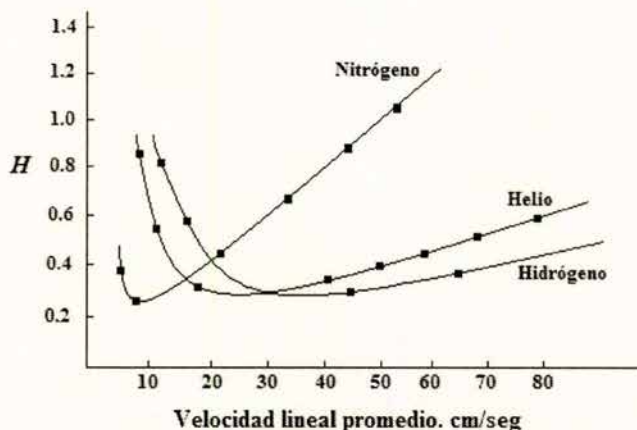


Figura 3.4.2 Gráfica de Van Deemter para gases portadores.

En la figura anterior, el nitrógeno está en un mínimo de H a la velocidad lineal del gas de 7.5 cm/seg. y el helio a 18 cm/seg. Si ambos gases se desplazaran al mínimo de H , el nitrógeno generaría alrededor de 15% más de platos teóricos, pero con un tiempo de análisis 2.4 veces mayor que con el helio.

Los caudales se controlan mediante reguladores de presión de dos niveles colocados en el cilindro de gas y se determinan mediante un rotámetro situado en la cabeza de la columna o por medio de un burbujómetro. Actualmente los cromatógrafos de gases están equipados con medidores electrónicos controlados por un ordenador para mantener el caudal al nivel deseado.

3.4.2.2 Sistema de Inyección de Muestra ⁽²⁴⁾

El método más común de inyección de muestra implica el uso de una microjeringa graduada (de capacidad de 0.5 a 10 μL) para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un diafragma o “septum” de goma de silicón, en una cámara de vaporización instantánea (inyector) situada en la cabeza de la columna (el inyector normalmente está unos 50°C por encima del punto de ebullición del componente menos volátil de la muestra).

La cantidad de muestra inyectada depende del tipo de columna, de la cantidad de fase estacionaria contenida en la columna o del espesor de la película en el caso de los capilares de película fina, de la polaridad del soluto y del disolvente y de la temperatura.

En las columnas empacadas, las cantidades óptimas de muestra se encuentran entre 0.1 y 1 μl . Las columnas capilares exigen cantidades mucho menores ($\approx 10^{-3}$ μl); en estos casos se emplea la técnica de inyección «split» (por su nombre en inglés) en la cual solo una pequeña fracción de la muestra inyectada entra a la columna y la mayor parte es desechada por un sistema de purga. (Figura 3.4.3). Normalmente la proporción del flujo de purga es 100 veces más que el flujo de la columna, por lo tanto, solamente 1/100 del total de la muestra entra en la columna. La técnica de split es aplicable a muestras muy concentradas.

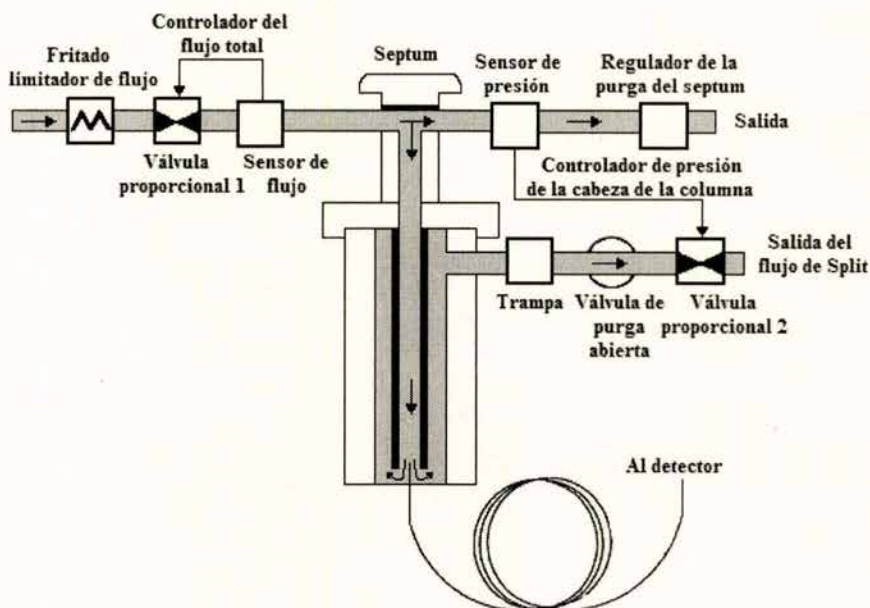


Figura 3.4.3 Diagrama de inyección en Split. ⁽³²⁾

Un método de trabajo especial para el análisis de cantidades traza es la inyección sin división de flujo «splitless» (por su nombre en inglés). Esta técnica aumenta la sensibilidad ya que casi toda la muestra entra en la columna. Durante la inyección, la válvula de purga permanece cerrada. Después de que la muestra se vaporiza en el inyector y pasa a la columna, la válvula vuelve a abrirse para purgar el inyector.

Inicialmente la cantidad de muestra que entra en la columna es muy grande, esto se compensa porque la temperatura inicial del horno es de 25 a 40 °C menor que el punto de ebullición del disolvente en el cual esta

disuelta la muestra, por lo que el disolvente actúa como fase estacionaria, atrapando y concentrando los componentes de la muestra. Conforme la temperatura de la columna aumenta se vaporiza el disolvente permitiendo que los componentes de la muestra se separen.

En ambas técnicas un pequeño flujo de gas portador (purga del septum) pasa a través del septum para evitar que los componentes de la muestra sean absorbidos en él. ⁽²⁹⁾

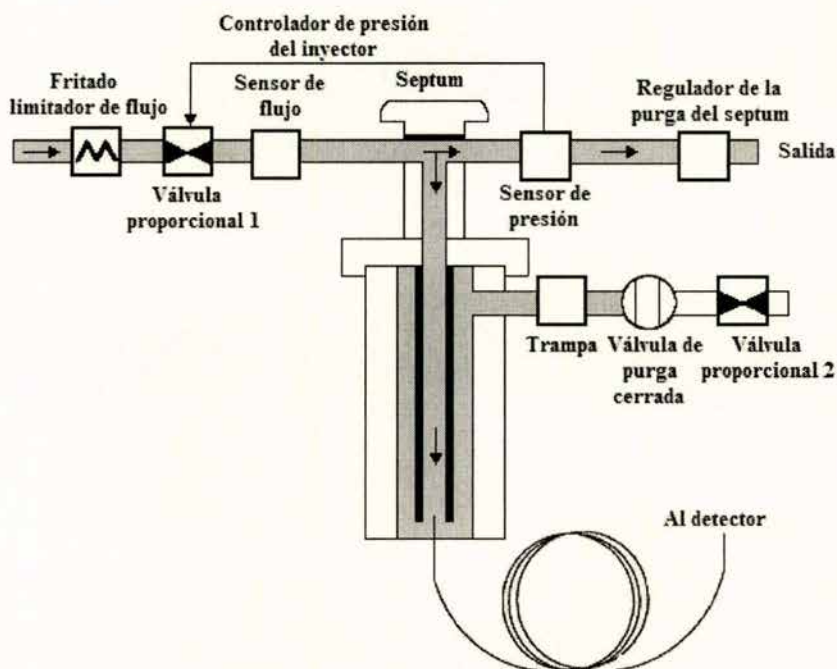


Figura 3.4.4 Diagrama de inyección en Splitless. ⁽³²⁾

Otra técnica de inyección es la llamada On Column (por su nombre en inglés), la cual es particularmente utilizada para el análisis de compuestos termolábiles o mezclas que tienen un amplio intervalo de puntos de ebullición. Inicialmente el inyector se encuentra frío por lo que la muestra no se vaporiza. La inyección se lleva a cabo por medio de una fina aguja que entra directamente a la columna. Después de la inyección, el inyector es rápidamente calentado y se lleva a cabo la separación. ⁽³³⁾

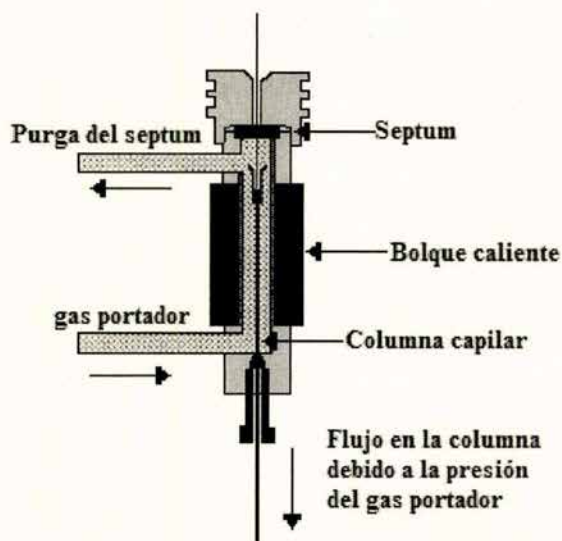


Figura 3.4.5 Diagrama de inyección on Column. ⁽³³⁾

3.4.2.3 Horno ⁽²⁴⁾

El control de la temperatura de la columna es una variable importante para promover la separación, por ello la columna normalmente se introduce dentro de un horno de temperatura controlada. La temperatura óptima de la columna depende del punto de ebullición de la muestra y del grado de separación requerido. Para obtener tiempos de retención reproducibles, la temperatura del horno debe ser controlada en un orden de ± 0.1 °C.

El análisis cromatográfico puede realizarse a una sola temperatura de la columna (análisis isotérmico) o bien con programación de la temperatura en el caso de muestras cuyos componentes presentan un amplio intervalo de puntos de ebullición.

En un análisis isotérmico, los componentes de la muestra con puntos de ebullición bajos, salen de la columna con tal rapidez que varios picos se superponen, mientras que los componentes de mayor punto de ebullición salen con mucho retraso como picos anchos.

Con la temperatura programada, se utiliza una temperatura inicial baja y así los picos iniciales quedan bien resueltos. A medida que aumenta la temperatura, los compuestos de punto de ebullición elevado salen como picos bien resueltos, de forma bien definida y en un tiempo total de análisis más corto que en la operación isotérmica.

3.4.2.4 Columna ⁽²⁴⁾

La columna es la parte del cromatógrafo de gases en donde se lleva a cabo la separación de los compuestos. Es un tubo flexible que puede ser

de acero inoxidable, vidrio o sílica fundida; dentro de él se encuentra la fase estacionaria. En cromatografía de gases se usan dos tipos generales de columnas, las empacadas en las que la fase estacionaria es un sólido adsorbente o un líquido poco volátil adherido a un sólido inerte (usualmente tierra de diatomáceas de procedencia natural). Generalmente son de diámetro interno grande (3 mm) y las tubulares abiertas o capilares en las que la fase estacionaria se encuentra recubriendo, como una delgada película, el interior del tubo. Son de diámetro interno muy pequeño (0.2 – 0.4 mm). Actualmente, las columnas capilares son las de mayor uso debido a la mayor eficiencia y rapidez en los análisis.

Las columnas capilares son de tres tipos básicos:

- Columnas Capilares Support Coated Open Tubular, (SCOT, por sus siglas en inglés). En este tipo de columnas, la superficie interna está recubierta de una capa delgada ($\sim 30 \mu\text{m}$) de un material de soporte tal como tierra de diátomeas, que se cubre a su vez con la fase líquida.
- Columnas Capilares Wall Coated Open Tubular, (WCOT, por sus siglas en inglés). Son capilares de sílica fundida con la pared interna recubierta de una fina capa de fase estacionaria.
- Columnas Capilares Porous Layer Open Tubular, (PLOT, por sus siglas en inglés). La superficie interna está recubierta por una fase estacionaria adsorbente.

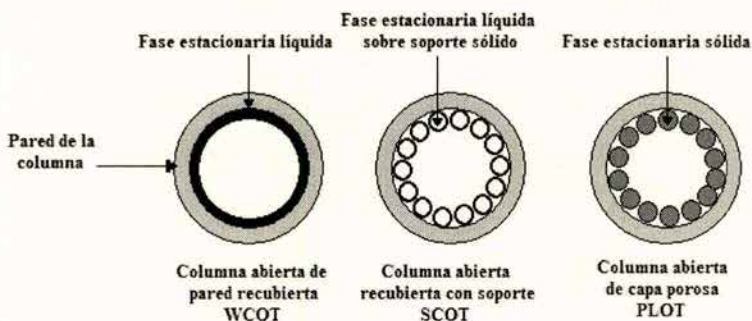


Figura 3.4.6 Sección transversal de columnas de pared recubierta de fase estacionaria líquida, sólida y de capa porosa.

3.4.2.4.1 Fase estacionaria ⁽²⁴⁾

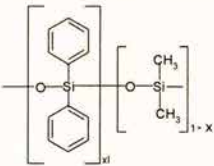
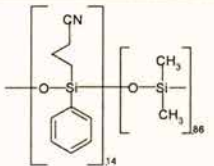
Las propiedades de una fase estacionaria en una columna cromatográfica gas-líquido comprenden: (1) baja volatilidad (idealmente, el punto de ebullición del líquido debe ser al menos 100 °C mayor que la temperatura de trabajo máxima de la columna); (2) estabilidad térmica; (3) químicamente inerte; (4) características de disolvente tales que los valores de k y de α de los solutos a resolver estén dentro de un intervalo conveniente.

Para que una especie tenga un tiempo de residencia razonable en la columna, debe presentar cierto grado de solubilidad en la fase estacionaria. La polaridad es el efecto del campo eléctrico en la inmediata vecindad de una molécula, y se mide por el momento dipolar de la

especie. Las fases polares contienen grupos funcionales tales como $-\text{CN}$, $-\text{CO}$ y $-\text{OH}$. Las fases estacionarias del tipo hidrocarbonado y dialquilsiloxanos son no polares, mientras que las fases poliéster son altamente polares.

En la *tabla 3.4.1* se muestran algunas fases estacionarias de uso común en cromatografía de gases capilar, así como la polaridad de cada una de ellas.

Tabla 3.4.1 Fases estacionarias de uso frecuente en cromatografía de gases capilar.

Estructura	Polaridad	Intervalo de Temperatura
 <p>x (difenil) 1-x (dimetil) polisiloxano</p>	<p>x = 0 No polar x = 0.005 No polar x = 0.35 Polaridad intermedia x = 0.65 Polaridad</p>	<p>-60°C – 320°C -60°C – 320°C 0°C – 300°C 50°C – 370°C</p>
 <p>14 (cianopropilfenil) 86 (dimetil) polisiloxano</p>	<p>Polaridad intermedia</p>	<p>-20°C – 280°C</p>

$\left[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O} \right]_n$ <p>Carbowax Polietilenglicol</p>	Muy polar	40°C – 250°C
--	-----------	--------------

3.4.2.5 Detector

El detector es un dispositivo que mide la concentración de cada uno de los componentes de la muestra y genera una señal eléctrica proporcional a dicha concentración. Cuando la concentración es alta tiende a ser no lineal, pero a bajas concentraciones la cantidad mínima detectable está definida como la concentración cuya respuesta es tres veces mayor que su nivel de ruido. Las características de un detector son las siguientes:

1. Sensibilidad. Denota la cantidad de señal generada para determinada concentración de una muestra, puede medirse como la pendiente de la gráfica de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra.
2. Ruido. Es la máxima amplitud de la combinación de los términos de ruido largos y cortos en un período de tiempo dado. Estas perturbaciones que se producen en la línea base del detector se deben a las propiedades eléctricas del instrumento, a problemas relacionados con las variaciones de temperatura, oscilaciones de la tensión de la línea eléctrica, o a fluctuaciones en el caudal.

3. Respuesta universal. Significa que el detector genera una respuesta para todos los componentes de la muestra, exceptuando el gas portador.
4. Respuesta selectiva: Significa que el detector sólo responde a determinados tipos de compuestos.
5. Intervalo lineal. En un gráfico logarítmico de la respuesta del detector en función de la concentración de la muestra, es el intervalo en el cual la curva es lineal y tiene una pendiente de $1.0 \pm 5\%$.⁽²⁴⁾

- ***Detector de conductividad térmica (DCT)***. Fundamento físico. Cuando un gas se mezcla con otra sustancia gaseosa, su conductividad térmica varía respecto al que poseería cuando estaba puro. Por otra parte, al variar la temperatura de un filamento metálico, se modifica el valor de su resistencia.

Estos dos hechos físicos son la base del detector de conductividad térmica. Si en el interior de una celda, cuyas paredes se mantienen a temperatura constante, se encuentra un filamento calentado eléctricamente y por dicha celda circula a flujo constante un gas puro, la disipación de calor por parte del filamento es constante y, en consecuencia, también lo será su temperatura y resistencia; en el momento en que aparezca un vapor de distinta naturaleza, junto con el gas, en el interior de la celda, se producirá una variación de la conductividad térmica del gas, también la disipación térmica del filamento será distinta y se modificará la temperatura del

mismo, y, por lo tanto su resistencia. La variación de esta resistencia produce una señal eléctrica, que es proporcional a la cantidad de muestra que entró en la celda. ⁽³¹⁾

- ***Detector de ionización de Flama (DIF)***. Principio. El funcionamiento de este tipo de detectores se basa en el principio de que la conductividad eléctrica de un gas es directamente proporcional a la concentración de las partículas cargadas dentro del gas.

El gas portador fluye desde la columna hasta una flama de hidrógeno-aire, la cual ioniza algunas de las moléculas orgánicas presentes en la corriente gaseosa. La presencia de partículas cargadas (iones positivos, iones negativos y electrones) en el espacio entre dos electrodos origina una corriente de ionización que fluye en éste y a través de una resistencia que los mide. La magnitud de esta resistencia está determinada por el número de partículas cargadas que contiene. Con un flujo constante de gas portador puro habrá entre los electrodos una concentración muy baja de partículas cargadas, originándose así una corriente constante. Esta corriente constante se llama corriente de fondo, y se establece al someter la flama a una diferencia de potencial. Cuando un componente orgánico entra en la flama, se quema y se forman partículas cargadas, lo cual produce un aumento de la corriente de fondo que se traduce en una señal

amplificada y dibujada como un pico sobre un registrador gráfico. ⁽³¹⁾

- **Detector de captura de electrones (DCE).** El detector de captura de electrones mide las disminuciones de una señal en vez del aumento de la corriente eléctrica. A medida que el gas portador nitrógeno fluye a través del detector, una lámina de tritio o ⁶³Ni radioactivo ioniza las moléculas de nitrógeno y forma electrones lentos. Estos electrones se desplazan hacia el ánodo de un electrodo, cuyo potencial es de 90 voltios positivos. Al colectarse estos electrones lentos, se produce una corriente constante que se amplifica por un electrómetro. Esta corriente de fondo es de unos 10^{-8} amperios. Si en ese momento se introduce en el detector una muestra que contenga moléculas que capturen electrones (haluros de alquilo, carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos y compuestos organometálicos), se reducirá esta corriente. La disminución de la corriente es una medida de la cantidad y afinidad electrónica de los compuestos de la muestra, por lo tanto puede relacionarse la pérdida de la corriente con la concentración de la muestra. ⁽³¹⁾
- **Detector de Nitrógeno-Fósforo (DNF).** El detector de nitrógeno y fósforo, también llamado detector termoiónico (DTI), es un detector selectivo de los compuestos orgánicos

que contienen fósforo y nitrógeno. Tiene una configuración similar al detector de flama. El efluente de la columna se mezcla con hidrógeno, pasa a través de la flama, y se quema. El gas caliente fluye alrededor de una bola de silicato de rubidio calentada eléctricamente, la cual se mantiene a unos 180 V con respecto al colector. La bola caliente forma un plasma que alcanza una temperatura de 600 a 800 °C, resultando una gran corriente de iones, la cual se utiliza para la determinación de compuestos que contienen nitrógeno y fósforo. ⁽³¹⁾

- **Detector Fotométrico de Flama (DFE).** Es un detector selectivo sensible principalmente a los compuestos que contienen azufre y fósforo. En este detector, el eluyente se hace pasar a través de una flama de hidrógeno-aire a baja temperatura, la cual convierte parte del fósforo a una especie HPO que emite bandas de radiación centradas alrededor de 510 y 526 nm. El azufre de la muestra se convierte simultáneamente en S₂, el cual emite una banda en 394 nm. Para aislar las bandas se emplean filtros ópticos que permiten que la luz de la longitud de onda deseada, pase por un fotomultiplicador y produzca una señal. ⁽²⁴⁾
- **Detector de Conductividad Electrolítica (DCEL).** Es un detector selectivo usado para detectar compuestos que

contienen, halógenos, azufre o nitrógeno. En este detector, se mezcla el eluyente con un gas de reacción en un tubo de níquel en donde se lleva a cabo una reacción de oxidoreducción provocando cambios en la conductividad de la mezcla de reacción. En el caso del análisis de halógenos, el eluyente es reducido con H_2 a $850^\circ C$, produciendo ácidos fuertes tales como HCl. Los gases producidos se disuelven en propanol y se determina el cambio en la conductividad del disolvente. ⁽³⁵⁾

- **Detector de emisión atómica (DEA).** En este dispositivo, el efluente se introduce en un plasma de helio obtenido con microondas, que se acopla a un espectrómetro óptico de emisión de diodos en serie. El plasma es suficientemente energético como para atomizar todos los elementos de una muestra, excitarlos, y así obtener sus espectros de emisión atómica característicos. Estos espectros son recogidos en un espectrómetro que utiliza una serie de diodos configurados en un plano móvil, que es capaz de detectar la radiación emitida desde 170 a 780 nm. ⁽³¹⁾
- **Detector de fotoionización (DFI).** Este detector utiliza una fuente ultravioleta al vacío para ionizar compuestos aromáticos y no saturados. Los componentes de la muestra son excitados por los fotones provenientes de la lámpara de

UV y se ionizan. Las partículas cargadas son medidas entre dos electrodos con potenciales de 50 a 200 volts. El tipo de lámpara usada determina la energía del fotón, y por lo tanto los compuestos son detectados de acuerdo a su potencial de ionización. ⁽³⁵⁾

Tabla 3.4.2 Características generales de los detectores más comunes en CG. ⁽³⁵⁾

<i>Detector</i>	<i>Tipo</i>	<i>Selectivo para:</i>	<i>Rango dinámico lineal</i>
DIL	Selectivo	Materiales ionizables por una flama de H ₂ /aire	10 ⁷
DCT	Universal	Cualquier muestra de conductividad diferente a la del gas portador	10 ⁶
DCE	Selectivo	Compuestos electrófilos, tales como carbonilos conjugados, nitrilos, nitratos, etc.	10 ⁴
DFI	Selectivo	Compuestos aromáticos e insaturados	10 ⁷
DNF	Selectivo	N, P, Heteroátomos	10 ³ (N) – 10 ⁴ (P)
DCEL	Selectivo	Halógenos, N, S	10 ⁴ (S) – 10 ³ (X)
DFF	Específico	P, S	10 ³ (S) – 10 ⁴ (P)
DEA	Universal	Cualquier elemento	10 ⁴

3.5 Espectrometría de Masas ^(29, 36)

La espectrometría de masas (EM, por sus siglas) es una metodología espectroscópica en la cual se generan espectros característicos y únicos para las moléculas de distintos compuestos.

El principio bajo el cual operan los espectrómetros de masas es el de promover la ionización de las moléculas de un compuesto y posteriormente separar y cuantificar los distintos iones que se han producido. Cuando una molécula interacciona con una fuente de alta energía (ca. ≈ 70 eV) se promueve la salida de un electrón del orbital molecular, con ello se genera un ion que se denomina ion molecular (M^+); si el ion queda con un exceso de energía que no es capaz de estabilizar, se fragmenta expulsando un fragmento neutro (mx) y formando un fragmento (A^+) de menor masa, como se muestra en la *figura 3.5.1*.

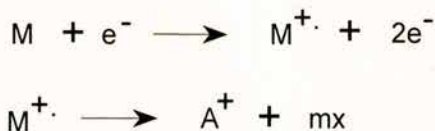


Figura 3.5.1 Proceso de Ionización.

Si el ion fragmento A^+ aún posee un exceso de energía que no pueda estabilizar, éste continuará fragmentándose expulsando más fragmentos neutros y produciendo iones de masa cada vez menores.

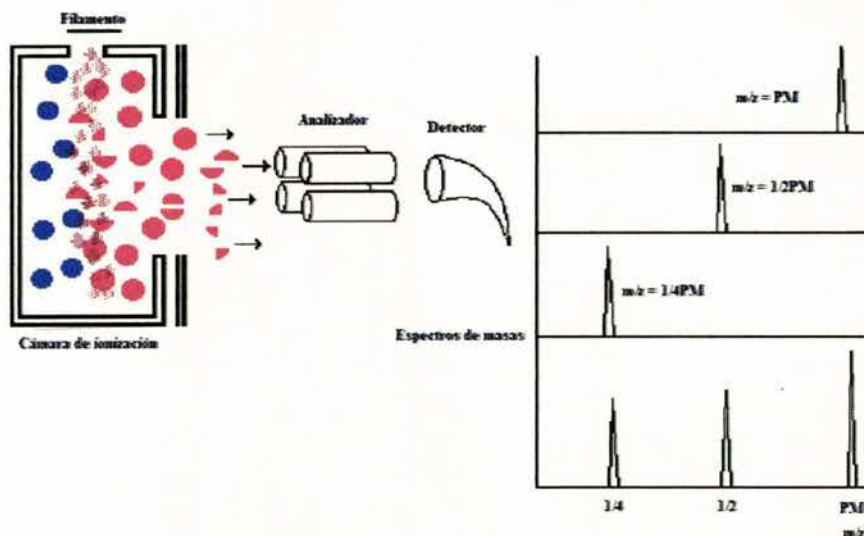


Figura 3.5.2 Obtención de un espectro de masas.

Cualquiera de los iones formados puede seguir distintos mecanismos de fragmentación, sin embargo para un compuesto determinado existirán ciertas estructuras iónicas que son más estables y que generarán iones preferentes. Esto depende solamente de la cantidad de energía que recibió la molécula durante la ionización, todos los mecanismos de fragmentación que puede seguir una molécula constituyen un patrón de fragmentación y éste es característico y único para una molécula (*figura 3.5.3*).

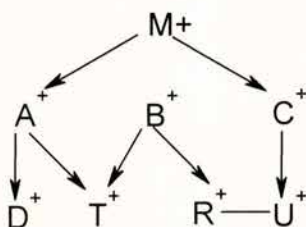


Figura 3.5.3 Patrón de Fragmentación.

Los procesos en espectrometría de masas son unimoleculares, consecutivos y competitivos, esto quiere decir que cada molécula de un compuesto se comportará en una forma distinta e independiente de las demás.

Sí después de la ionización los iones formados son separados en función de su masa, se obtendrá la información de la masa molecular original (definida por el valor de M^+) y también el registro de los distintos fragmentos de dicha molécula.

Los espectrómetros de masas están diseñados para separar los iones de distinta masa que se producen en la ionización según su relación masa a carga (m/z); sin embargo la mayoría de los iones producidos en este tipo de ionización se forman con una sola carga ($Z=1$), por lo que la relación masa a carga es igual a la masa ($m/z = m$). El otro valor que se registra en los espectrómetros de masas, es el del número de iones de un mismo valor m/z que se generan y se define como la intensidad de las señales, el valor de intensidad está directamente relacionado con la estabilidad del ion formado y esto es un reflejo de la estructura del mismo.

Un espectro de masas está constituido por una serie de señales en un sistema de dos ejes, uno es la escala másica o de valores de m/z y el otro corresponde a la intensidad de las señales o abundancia de los iones.

3.5.1 Equipo de Espectrometría de Masas

Los espectrómetros de masas requieren de una fuente de producción de iones y un separador de iones de acuerdo a su relación m/z , un detector que permita registrar los iones y su intensidad y un registrador.

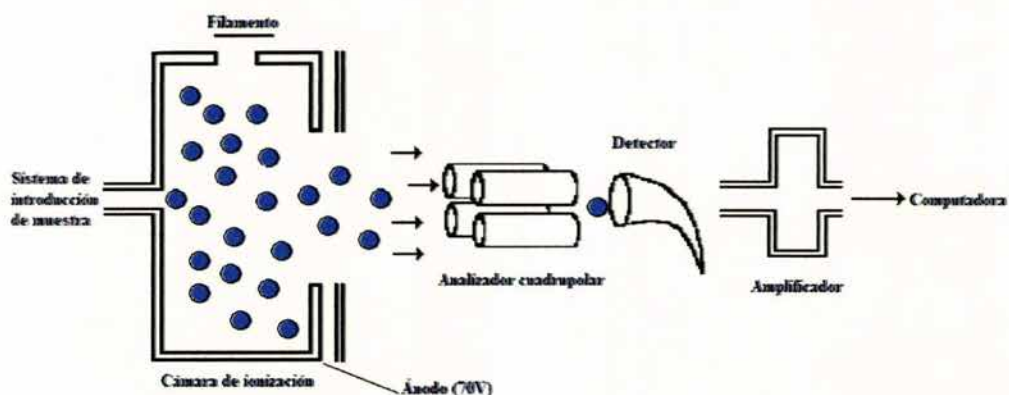


Figura 3.5.4 Esquema de un equipo de Espectrometría de masas de cuadrupolo.

3.5.1.1 Introducción de muestra

Dado que el instrumento se encuentra al vacío, se requieren de sistemas especiales de introducción de muestras; primero que permitan

gasificar los compuestos y después que no rompan el sistema de vacío del equipo.

3.5.1.2 Sistema de vacío

El proceso requiere que los iones que se introduzcan puedan llegar hasta el detector sin haber sufrido cambios, para esto se requiere que no exista otro gas presente que pueda dar lugar a colisiones ion-molécula. Esto se logra con alto vacío (de 1×10^{-6} a 1×10^{-7} torr) y es por ello que los espectrómetros de masas cuentan con bombas mecánicas y bombas de difusión o turbomoleculares que permiten alcanzar estos niveles de vacío.

3.5.1.3 Cámara de ionización

La cámara de ionización es el principal elemento de un espectrómetro de masas, ya que la obtención de un buen espectro de masas depende de que se haya realizado una buena ionización. La mayoría de los espectrómetros de masas cuentan con una cámara de ionización por impacto electrónico (IE), a la cual fluyen las moléculas de muestra gasificada y dentro de ella, interaccionan con un haz de electrones, producido por el paso de corriente a través de un filamento de Renio o Tungsteno, la energía de los electrones se establece por la diferencia de potencial en el filamento.

3.5.1.4. Analizador

Este elemento, también conocido como separador másico, tiene la función de separar el haz iónico en todos sus componentes según su

relación m/z . Los analizadores cuadrupolares, son actualmente los más populares. Este separador consiste de cuatro barras metálicas paralelas a las que se aplica un voltaje oscilante de radiofrecuencia. El campo eléctrico desvía los iones, haciéndoles seguir trayectorias diversas a medida que van de la cámara de ionización hacia el detector, y permitiendo que sólo lleguen al detector los que tienen una relación m/z determinada. Los demás iones chocan con las barras, y se pierden antes de llegar al detector. Variando rápidamente los voltajes aplicados, se seleccionan los iones de diferentes masas que llegan al detector.

Existen también otros tipos de analizadores, tales como, el analizador de sector magnético, el cual separa los iones a medida que pasan por un campo magnético perpendicular a la dirección de su trayectoria. El analizador de tiempo de vuelo, mide cuanto tarda cada ion en recorrer una distancia fija hasta el detector. El analizador de trampa de iones utiliza un campo eléctrico de radiofrecuencia para atrapar todos los iones haciéndoles seguir una trayectoria estable dentro de una cavidad metálica. Aplicando otro campo oscilante entre los extremos de la cavidad se recoge a los iones de un determinado valor de m/z a través de los agujeros que se encuentran al final de la cavidad.

3.5.1.5 Detector

Es un dispositivo multiplicador de iones (o electrones) que permite una respuesta rápida y además genera una señal proporcional al número de iones que llegan a él.

3.5.2 Desventajas de la Espectrometría de Masas

El espectro de masas de un compuesto puro, es una gráfica que contiene una serie de señales en un sistema de dos ejes uno de relación m/z y otro de intensidad. El número de señales en teoría sería una por cada unidad de masa que la molécula posea, sin embargo no todas las señales poseen la misma intensidad y un buen número de ellas es muy pequeña.

Los espectros de masas con los que se realiza la interpretación están normalizados, esto es, se mide la intensidad del pico más grande y se le asigna el valor de 100% y las demás señales se refieren a él como un porcentaje relativo, descartando las señales menores a un determinado valor (por lo general de $<1\%$) con esto un espectro de masas se simplifica. Un espectro de masas de una mezcla presentaría señales juntas de todos los compuestos, de manera que sería casi imposible el asignar que señal corresponde a que compuesto. Es por esto que es indispensable que las muestras a analizar por EM sean de alta pureza.

3.6 Sistema acoplado Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

Esta metodología permite resolver el principal problema que se tiene con la técnica de CG, que es la identificación cualitativa de los componentes separados, ya que esta no es absoluta y tan sólo se tiene como parámetros el tiempo de retención (t_r), las características de operación y la fase estacionaria.

La Espectrometría de Masas nos permite la identificación cualitativa de los eluatos en cromatografía.

El acoplamiento CG/EM ha dado como resultado una herramienta analítica muy poderosa para el análisis de compuestos orgánicos y se ha logrado que los niveles de sensibilidad se incrementen notablemente. Con este sistema de acoplamiento es posible registrar sustancias en el nivel de picogramos.

La principal ventaja de los equipos CG/EM radica en el poder identificar y cuantificar los componentes de una mezcla compleja en un tiempo corto y con cantidades muy pequeñas de muestra.

3.7 Límite de detección (LD).⁽³⁹⁾

Es conocido que la medición de compuestos en bajas concentraciones produce resultados muy variables por ello el reportar el valor de límite de detección se ha convertido en una práctica común en los laboratorios analíticos al pretender demostrar que un método se ha aplicado en forma correcta y que por consiguiente los resultados obtenidos son significativos.

En general, el límite de detección se define como un número expresado en unidades de concentración (o cantidad) que define la menor concentración (o cantidad) de un compuesto (o elemento) que un químico analítico puede determinar y que sea estadísticamente diferente de la señal generada por un blanco⁽³⁷⁾. Según la IUPAC; el límite de detección, expresado como una concentración C_L (o cantidad Q_L) se deriva de la medición más pequeña, X_L , que pueda ser detectada con un razonable nivel de confianza, para un procedimiento analítico.

Para generar una curva de calibración (recta de calibración) con el objeto de determinar el límite de detección, es práctica común el fortificar un blanco o una matriz con el analito. La fortificación se inicia en un valor de concentración cercano al valor esperado de límite de detección y se incrementa la concentración hasta por lo menos 10 veces ese valor esperado. Cada matriz o blanco entonces se somete a todo el proceso analítico.

Con los valores obtenidos se procede a construir una curva (recta) de calibración, y a través de un análisis de regresión se establece la ecuación de la curva (recta) de calibración para el procedimiento analítico.

En los casos en los que no se cuenta con información que permita estimar el valor del límite de detección se procede en forma inversa, se preparan blancos o matrices fortificadas con concentraciones de analito altas y se someten a todo el proceso analítico, de igual forma por un análisis de regresión se determina la ecuación de la curva (recta) de calibración y a partir de ello se evalúa el ajuste de la curva con el valor de coeficiente de correlación (r).

A partir de esa curva inicial se van añadiendo puntos procesados de igual forma pero de concentraciones continuamente menores, hasta alcanzar el límite de detección.

Con el objeto de definir en forma clara el límite de detección y obtener una evaluación correcta de la curva, se utilizan en el análisis de regresión tan solo los últimos cinco puntos. De manera que al añadir un punto de menor concentración se elimina el de más alta concentración y en cada ocasión se evalúa r y se compara con el valor de r anterior; en el momento en el que el valor de r cambia en más de 5% esto indica que la curva de calibración pierde linealidad y que por lo tanto se está cerca del valor de límite de detección. En caso de requerirse una determinación más precisa del valor de límite de detección se puede preparar otra matriz o blanco con una concentración de analito intermedia entre los valores en donde ocurrió el cambio del valor de r .

Para la determinación matemática-estadística del límite de detección se deberán considerar la curva (recta) de calibración y los intervalos de confianza de la misma. Los valores en el eje de las y 's (intercepto) de las rectas correspondientes a los intervalos de confianza de la curva (recta) de

calibración, representan los valores (probabilidad) de la señal que sería generada por un blanco o matriz sin fortificar. De manera que el intercepto de la recta superior del intervalo de confianza en el eje de las y's representa la altura máxima que podría ser generada por un blanco (figura 3.7.1).

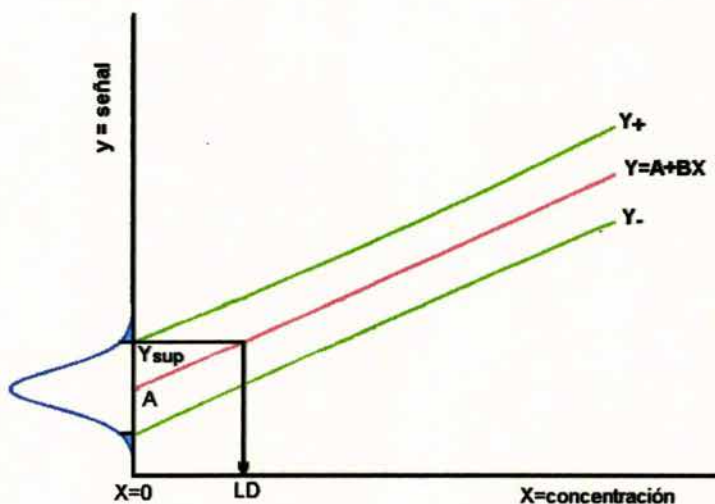


Figura 3.7.1 Representación gráfica de la señal generada por un blanco.

El valor del intervalo de confianza superior para la recta de calibración se determina para una probabilidad del 95% que es suficiente para la mayoría de los análisis que se realizan en laboratorios ambientales. Dado que solo el valor superior es de interés y no el máximo y el mínimo al mismo tiempo, se tiene un estudio estadístico de una sola cola. De manera que el valor estadístico se considera al 95% para una prueba de 1 cola y para un único análisis futuro.

Las ecuaciones de los intervalos de confianza para la curva (recta) de calibración corresponden en realidad a funciones hiperbólicas, sin embargo con un trabajo analítico adecuado y empleando un intervalo de concentraciones corto, estas hipérbolas se comportan como líneas rectas, paralelas a la curva (recta) de calibración. Sin embargo esto no importa cuando se realiza el tratamiento matemático-estadístico, ya que las ecuaciones desarrolladas representan las características hiperbólicas reales de la calibración.

El valor del intercepto del intervalo de confianza de la curva (recta) de calibración en algunas ocasiones llega a generar valores negativos.

3.7.1 Límite de detección efectivo

Cuando se repite el análisis de una muestra conteniendo trazas del analito, se obtienen diferentes valores de concentración debidas a la dispersión en la medición de las señales generadas. Los valores de concentración encontrados para esa muestra dan lugar a una distribución de tipo gaussiano. Si ahora se prepara un blanco o matriz fortificada a una concentración equivalente al valor de LD y se repitiera el análisis un número grande de veces encontraríamos también que los valores de concentración calculados estarían dispersos (también con una distribución de tipo gaussiano) alrededor del valor de LD. Si se practicase un número grande de repeticiones se encontraría que el 50% de los valores estarían por debajo de LD y el otro 50% estaría por arriba de LD. De manera que en un 50% de los casos el analito sería detectado y en otro 50% de los casos se reportaría como no detectado. (*figura 3.7.2*).

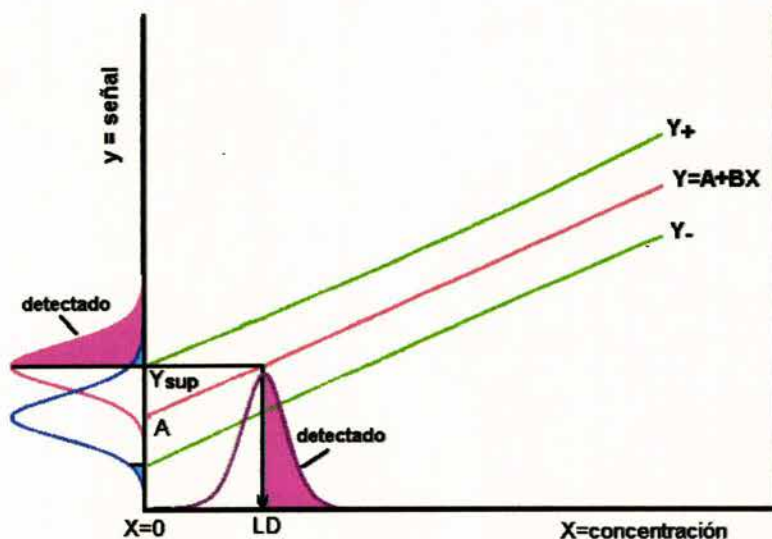


Figura 3.7.2 Distribución gaussiana del límite de detección

Al fijar el límite de detección en el valor del intercepto de la recta superior del intervalo de confianza hace que en un análisis exista un error de identificación del 50%.

Lo que es deseable es disminuir la posibilidad de error en la detección de la presencia de analitos en las muestras y para ello es necesario fijar un nivel de confianza más alto (95%). Al hacer esto entonces estaremos asumiendo que para que una señal real de un analito presente se distinga inequívocamente de la señal que podría generar un blanco, las curvas de distribución de probabilidad no deben de traslaparse como se muestra en la *figura 3.7.3*.

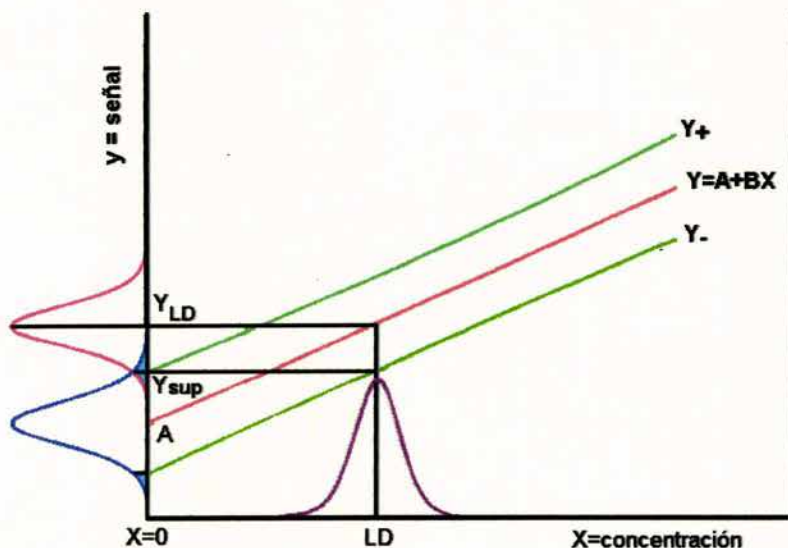


Figura 3.7.3 Definición de límite de detección.

En la *figura 3.7.3* se aprecia claramente que la intersección del valor de LD correspondiente a el punto de intersección de la curva Y_+ extrapolada a su intersección con la curva Y_- coincide con el valor mínimo de la curva de distribución probabilística de una señal real en el método. Es de esta forma que se evita el cometer un error del 50% en la detección de un analito en la muestra.

Definiendo así el LD se tendrá la certeza absoluta de que una señal generada por un analito en la matriz efectivamente corresponde al analito y no es un efecto del blanco por co-extracción de otros componentes de la matriz.

3.8 Límite de cuantificación (LC)

El límite de cuantificación se define como la menor concentración de un analito o sustancia en una muestra que puede ser cuantificada con precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones en las que se lleva a cabo el método. Este límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. la definición para el límite de cuantificación se puede expresar de la siguiente forma: ⁽⁴⁵⁾

$$LC = y_B + 10 S_B$$

CAPÍTULO 4

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El trabajo experimental de esta tesis se encuentra dividido en dos partes:

- I. Evaluación del método de cromatografía de gases / espectrometría de masas para la determinación de fenoles.
 - Optimización del programa de temperatura
 - Técnicas de inyección; split, split pulsado, splitless, splitless pulsado.
 - Evaluación de parámetros cromatográficos; eficiencia, resolución, selectividad.
 - Determinación de los límites de detección y cuantificación.

- II. Evaluación del método de cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la determinación de fenoles.
 - Optimización del gradiente de elución.
 - Variación de fase estacionaria (fase inversa y fase normal).
 - Evaluación de parámetros cromatográficos; eficiencia, resolución, selectividad y factor de capacidad.
 - Determinación de los límites de detección y cuantificación.

4.1 EVALUACIÓN DE CG / EM PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

4.1.1 Instrumentación.

Sistema acoplado CG/EM

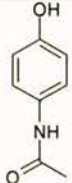
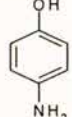
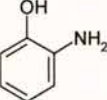
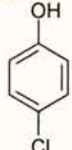
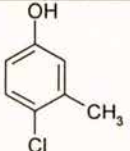
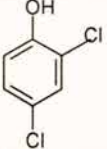
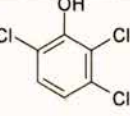
- Cromatógrafo de Gases marca Hewlett Packard modelo HP 6890.
- Detector Selectivo de Masas marca Hewlett Packard modelo HP 5973.
- Inyector automático marca Agilent modelo 7683.
- Gas portador: Helio de ultra pureza marca Praxair.

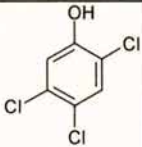
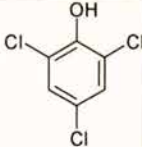
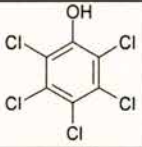
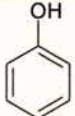
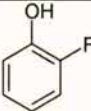

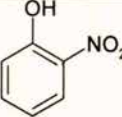

4.1.2 Equipo y Material

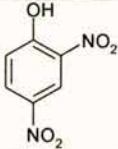
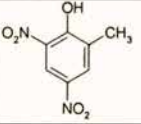

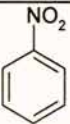
- Balanza analítica electrónica marca OHAUS con precisión de 0.1 mg.
- Espátula.
- Naves para pesar.
- Vaso de precipitados de 100 ml.
- Micropipeta marca GILSON de capacidad de 50 a 200 μ l.
- Micropipeta marca Labsystems de capacidad de 200 a 1000 μ l.
- Matraces volumétricos de 10 ml clase A.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Viales de vidrio silanizado con tapa de PTFE de capacidad de 2 ml marca Agilent.

4.1.3 Reactivos

Tabla 4.1.1 Reactivos utilizados para la preparación de disoluciones.

<i>Compuesto</i>	<i>Estructura</i>	<i>Pureza</i>	<i>Compañía</i>	<i>Lote</i>
4-acetilaminofenol		NR	E. Merck AG Darmstadt	8484345
4-aminofenol		98%	Merck	2554526
o-aminofenol		NR	Matheson Coleman & Bell	P2753AX1080
4-clorofenol		98%	Merck Schuchardt	9153022
4-cloro-3-metilfenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01727LY
2,4-diclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05729EZ
2,3,6-triclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05030KK

2,4,5-triclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	07126KY
2,4,6-triclorofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01808EZ
Pentaclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	07203TY
Fenol		NR	E. Merck AG Darmstadt	S/N
2-fluorofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01516KY
Pentafluorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01519JY
2-nitrofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	07615DZ
4-nitrofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	00605MT

2,4-dinitrofenol		90-95%	Sigma Chemical Co.	12H5001
4,6-dinitro-o-cresol		90%	Aldrich Chemical Company Inc.	07025JX
Metanol		99.9%	J.T.Baker Mallinckrodt Baker (*)	V20C02 V44C14 X41C21 *H488KPCJ
Nitrobenceno		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	03807AZ

Nota: NR: No reportado en la etiqueta, sin embargo se asume una pureza mayor al 99% debido a que en el cromatograma obtenido para estos compuestos no se presentan señales atribuibles a impurezas.

4.1.4 Preparación de Disoluciones

4.1.4.1 Disolución madre de Nitrobenceno (Estándar Interno, EI) (1370 mg/l). Se pesó aproximadamente y con precisión 13.7 mg de Nitrobenceno y se llevó al aforo con 10 ml de metanol.

4.1.4.2 Disolución secundaria de Nitrobenceno (Estándar Interno, EI) (137 mg/l). Se tomó una alícuota de 1 ml de la disolución madre de Nitrobenceno y se llevó al aforo con 10 ml de metanol.

4.1.4.3 Disolución madre de fenoles (aproximadamente 1000 mg/l). Se pesó aproximadamente y con precisión 10 mg de cada uno de los 17 compuestos fenólicos. La mezcla de fenoles se disolvió en metanol y se llevó al aforo a un volumen de 10 ml. Las cantidades pesadas de cada compuesto fenólico fueron las siguientes:

Tabla 4.1.2 Cantidades pesadas de los compuestos fenólicos para la preparación de la disolución madre.

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad Pesada [mg]</i>	<i>Concentración [mg/l]</i>
4-acetil-aminofenol	10.5	1050
o-aminofenol	10.7	1070
p-aminofenol	10.7	1070
4-clorofenol	11.0	1100
4-cloro-3-metilfenol	10.2	1020
2,4-diclorofenol	11.0	1100
2,3,6-triclorofenol	10.5	1050
2,4,5-triclorofenol	10.1	1010
2,4,6-triclorofenol	10.2	1020
Pentaclorofenol	9.9	990
Fenol	10.1	1010
2-fluorofenol	12.4	1240
pentafluorofenol	12.9	1290
2-nitrofenol	11.3	1130
4-nitrofenol	10.7	1070
2,4-dinitrofenol	10.9	1090
4,6-dinitro-o-cresol	10.3	1030

4.1.4.4 Disolución secundaria de fenoles (aproximadamente 100 mg/l). Se tomó una alícuota de 1 ml de la disolución madre de fenoles y se llevó al aforo con 10 ml de metanol.

4.1.4.5 Disoluciones patrón de fenoles I. De la disolución madre de fenoles se tomaron alícuotas de 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, y 0.2 ml. Cada alícuota se diluyó en metanol y se le adicionó 0.365 ml de la disolución madre de nitrobenceno, finalmente cada disolución se llevó al aforo con 10 ml de metanol. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en estas disoluciones es de 100, 80, 60, 40 y 20 mg/l, respectivamente. La concentración del estándar interno en estas disoluciones es de 50 mg/l.

4.1.4.6 Disoluciones patrón de fenoles II. De la disolución secundaria de fenoles se tomaron alícuotas de 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, y 0.1 ml. Cada alícuota se diluyó en metanol y se le adicionó 0.365 ml de la disolución intermedia de nitrobenceno, finalmente cada disolución se llevó al aforo con 10 ml de metanol. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en estas disoluciones es: 10, 8, 6, 4, 2 y 1 mg/l, respectivamente. La concentración del estándar interno en estas disoluciones es de 5 mg/l.

4.1.5 Evaluación de Parámetros Cromatográficos

Para evaluar los parámetros cromatográficos, como son eficiencia, resolución, y selectividad, se utilizó la disolución secundaria de fenoles (aproximadamente 100 mg/l), utilizando una sola columna de polaridad intermedia de fase estacionaria 5%fenil - 95%metilsiloxano.

Los estudios que se realizaron son los siguientes :

- Se optimizó el programa de temperatura para encontrar las mejores condiciones de separación de los 17 fenoles estudiados.
- Debido a que el cromatógrafo de gases cuenta con un sistema de control electrónico de presión, se inyectó en los 4 modos de inyección que se tienen (split, split pulsado, splitless y splitless pulsado) buscando las mejores condiciones de inyección.
- Se realizaron cálculos de número de platos teóricos (N), altura equivalente a un plato teórico (H), resolución (R_s) y selectividad (α), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Número de platos teóricos (N)

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

Altura equivalente a un plato teórico (H)

$$H = \frac{L}{N}$$

Resolución (R_s)

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2(w_2 + w_1)}$$

Selectividad (α)

$$\alpha = \frac{t_{rA}}{t_{rB}} = \frac{t_r(A) - t_0}{t_r(B) - t_0}$$

Tabla 4.1.3 Condiciones analíticas del Cromatógrafo de Gases / Espectrómetro de Masas.

CG(HP 6890)	
Columna Capilar	Sílica fundida (WCOT) HP-5. 5% fenil-metil siloxano 25m (L) x 0.2mm (di) x 0.33 μ m(ϕ)
Programa de temperatura	100°C (1min) hasta 200°C a 10°C/min
Gas Portador	Helio, 1.2 ml/min
Temperatura del inyector	250°C
Volumen inyectado	1 μ l
Relación de Split	1:20
Split pulsado	30 psi por 0.5 min
Splitless	0.5 min
Splitless pulsado	20 psi por 1 min

EM(HP 5973)	
Tipo de ionización	Impacto electrónico
Analizador	Cuadrupolar
Fuente de impacto electrónico	70 eV
Barrido másico	33-550 uma
Tiempo de retardo (solvent delay)	1 min

El tiempo muerto en la columna HP-5 fue determinado por inyección de 1µl del disolvente con el cual están preparadas las disoluciones, que en este caso es metanol.

4.1.6 Determinación de los límites de detección y límites de cuantificación (LD y LC).

Para la determinación de los límites de detección y cuantificación se analizaron por CG/EM los 17 fenoles, 11 de los cuales se encuentran en las listas de contaminantes prioritarios de la US-EPA.

Se realizaron inyecciones por triplicado de las disoluciones patrón de fenoles I y II preparadas a partir de la disolución madre de fenoles de 1000 mg/l (*secciones 4.1.4.5 y 4.1.4.6*), en las condiciones instrumentales citadas en la *tabla 4.1.3*, utilizando la técnica de inyección de Split pulsado. El intervalo de concentración fue de 100 - 10 mg/l aproximadamente de cada fenol en incrementos de 20 mg/l, con una concentración de 50 mg/l de Estándar Interno y de 8 - 1 mg/l aproximadamente de cada fenol en incrementos de 2 mg/l, con una concentración de Estándar Interno de 5 mg/l.

Por otro lado se realizaron inyecciones por triplicado de las disoluciones patrón de fenoles II (*sección 4.1.4.6*), con las condiciones instrumentales mencionadas anteriormente y detectando en el espectrómetro de masas por el modo de monitoreo selectivo de iones (SIM, por sus siglas en inglés). El intervalo de concentración para este estudio fue de 10 - 1 mg/l aproximadamente de cada fenol en incrementos de 2 mg/l, con una concentración de Estándar interno de 5 mg/l.

En la selección de los iones para la detección por SIM (*Tabla 4.1.4*), se consideró el pico base de los espectros de masas de cada fenol. (*Apéndice 2*).

Tabla 4.1.4. Iones seleccionados para la detección por SIM.

<i>Compuesto Fenólico</i>	<i>t.r. (min)</i>	<i>m/z</i>
2-fluorofenol	1.86	112
Pentafluorofenol	2.36	184
Fenol	2.51	94
Nitrobenceno (EI)	3.71	77
2-nitrofenol	4.21	139
2,4-diclorofenol	4.60	162
4-clorofenol	4.78	128
o-aminofenol	5.03	109
p-aminofenol	5.63	109
4-cloro-3-metilfenol	5.95	107
2,4,6-triclorofenol	6.86	196
2,4,5-triclorofenol	6.93	196

2,3,6-triclorofenol	7.26	196
2,4-dinitrofenol	8.73	184
4-nitrofenol	8.92	139
4,6-dinitro-o-cresol	10.02	198
4-acetil-aminofenol	10.79	109
Pentaclorofenol	11.67	266

Con los datos obtenidos se construyeron las gráficas correspondientes a las curvas de calibración para cada compuesto fenólico, siendo el eje de las abscisas la relación de concentraciones [Fenol/EI] y el eje de las ordenadas la relación de áreas [Fenol/EI].

Se evaluaron los parámetros de límite de detección y límite de cuantificación, estos últimos parámetros se evaluaron de acuerdo al método descrito en el *apéndice 4*.

4.2 EVALUACIÓN DE HPLC PARA LA DETERMINACIÓN DE FENOLES

4.2.1 Instrumentación

Cromatógrafo de Líquidos modular marca Hewlett Packard serie 1100. Este equipo consta de los siguientes módulos:

- Contenedor de cuatro botellas de un litro para disolventes.
- Degasificador de vacío HP 1100.
- Bomba de gradiente de cuatro canales HP 1100.
- Inyector automático HP 1100.
- Compartimento termostatzado para columnas HP 1100.
- Detector de arreglo de diodos HP 1100, con celda de micro flujo de 6mm de paso óptico y volumen interno de 1.7 μ l.

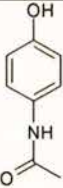
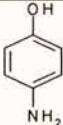
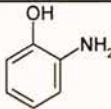
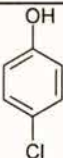
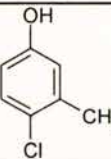
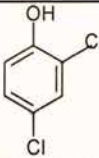
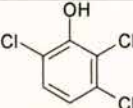
4.2.2 Equipo y Material

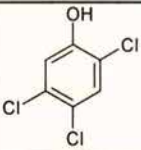
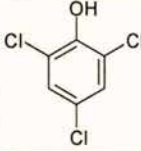
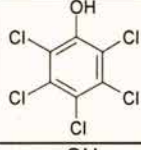
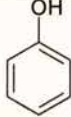
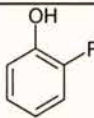

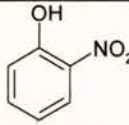

- Balanza analítica electrónica marca OHAUS con precisión de 0.1 mg.
- Espátula.
- Naves para pesar.
- Vaso de precipitados de 100 ml.
- Micropipeta marca GILSON de capacidad de 50 a 200 μ l.
- Micropipeta marca Labsystems de capacidad de 200 a 1000 μ l.
- Matraces volumétricos de 10ml clase A.
- Pipetas Pasteur desechables.
- Matraz volumétrico de 1000 ml clase A.

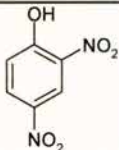
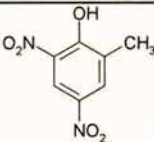
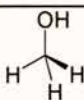

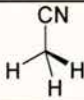
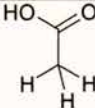
- Viales de vidrio silanizado con tapa de PTFE de capacidad de 2 ml marca Agilent.
- Pipeta volumétrica de 10 ml.
- Embudo de vidrio.
- Potenciómetro marca Cole Parmer, modelo 05669-20 con electrodo combinado de pH.

4.2.3 Reactivos

Tabla 4.2.1 Reactivos utilizados para la preparación de disoluciones.

<i>Compuesto</i>	<i>Estructura</i>	<i>Pureza</i>	<i>Compañía</i>	<i>Lote</i>
4-acetilaminofenol		NR	E. Merck AG Darmstadt	8484345
4-aminofenol		98%	Merck	2554526
o-aminofenol		NR	Matheson Coleman & Bell	P2753AX1080
4-clorofenol		98%	Merck Schuchardt	9153022
4-cloro-3-metilfenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01727LY
2,4-diclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05729EZ
2,3,6-triclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05030KK

2,4,5-triclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	07126KY
2,4,6-triclorofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01808EZ
Pentaclorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	07203TY
Fenol		NR	E. Merck AG Darmstadt	S/N
2-fluorofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	01516KY
Pentafluorofenol		99%	Aldrich Chemical Company Inc.	01519JY
2-nitrofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	07615DZ
4-nitrofenol		98%	Aldrich Chemical Company Inc.	00605MT

2,4-dinitrofenol		90-95%	Sigma Chemical Co.	12H5001
4,6-dinitro-o-cresol		90%	Aldrich Chemical Company Inc.	07025JX
Metanol		99.9%	J.T.Baker Mallinckrodt Baker (*)	V20C02 V44C14 X41C21 *H488KPCJ
Agua		-----	-----	-----
Acetonitrilo		99.99%	J.T.Baker	V36C53
Ácido acético		99.9%	Mallinckrodt	2504V02D53
Acetato de sodio	CH ₃ COONa	NR	J.T. Baker	M-37074
Hidróxido de sodio	NaOH	98.8%	J.T. Baker	K52477
Fosfato dibásico de potasio	K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	NR	Mallinckrodt	7088KJEY
Dietilftalato	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	10924BZ
Dimetilftalato	C ₁₀ H ₈ O ₂	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	05008EZ
Diocetilftalato	C ₂₄ H ₃₄ O ₄	99%	Aldrich Chemical Company Inc.	033312KZ
Hexano	C ₆ H ₆	95%	Mallinckrodt	4159T43E93
Diclorometano	CH ₂ Cl ₂	99.8%	J.T. Baker	T18282

Nota: NR: No reportado en la etiqueta.

4.2.4 Preparación de Disoluciones.

4.2.4.1 Disolución madre de fenoles I (aproximadamente 1000 mg/l). Se pesó aproximadamente y con precisión 10 mg de cada uno de los 17 compuestos fenólicos. La mezcla de fenoles se disolvió en metanol y se llevó al aforo a un volumen de 10 ml.

4.2.4.2 Disolución madre de fenoles II (aproximadamente 100 mg/l). Se pesó aproximadamente y con precisión 1 mg de cada uno de los 17 compuestos fenólicos. La mezcla de fenoles se disolvió en metanol y se llevó al aforo a un volumen de 10 ml.

Tabla 4.2.2 Cantidades pesadas de los compuestos fenólicos para la preparación de las disoluciones madre.

Compuesto	Disolución Madre I		Disolución Madre II	
	Cantidad pesada [mg]	Concentración [mg/l]	Cantidad pesada [mg]	Concentración [mg/l]
4-acetil-aminofenol	10	1000	1.2	120
o-aminofenol	10	1000	1.2	120
p-aminofenol	10	1000	1.4	140
4-clorofenol	10.4	1040	1.1	110
4-cloro-3-metilfenol	10	1000	1.8	180
2,4-diclorofenol	10.1	1010	1.4	140
2,3,6-triclorofenol	10.3	1030	1.2	120

2,4,5-triclorofenol	9.8	980	1.5	150
2,4,6-triclorofenol	9.8	980	1.4	140
Pentaclorofenol	10.4	1040	1.0	100
Fenol	10.4	1040	1.7	170
2-fluorofenol	10.7	1070	1.4	140
Pentafluorofenol	9.9	990	1.4	140
2-nitrofenol	10	1000	1.1	110
4-nitrofenol	10.4	1040	11	110
2,4-dinitrofenol	9.8	980	10	100
4,6-dinitro-o-cresol	10	1000	10	100

4.2.4.3 Disolución secundaria de fenoles I (aproximadamente 100 mg/l).

De la disolución madre de fenoles I se tomó una alícuota de 1 ml y se llevó al aforo con 10 ml de metanol.

4.2.4.4 Disolución secundaria de fenoles II (aproximadamente 0.5 mg/l).

De la disolución madre de fenoles II se tomó una alícuota de 0.05 ml y se llevó al aforo con 10 ml de metanol.

4.2.4.5 Disoluciones patrón de fenoles.

- De la disolución madre de fenoles I se tomaron alícuotas de 0.8, 0.6, 0.4, y 0.2 ml. Cada alícuota se diluyó en metanol y se llevó al aforo a 10 ml. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en estas disoluciones es de 80, 60, 40 y 20 mg/l, respectivamente.

- De la disolución secundaria de fenoles I se tomaron alícuotas de 1, 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 ml. Cada alícuota se diluyó en metanol y se llevó al aforo a 10 ml. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en estas disoluciones es de 10, 8, 6, 4 y 2 mg/l, respectivamente.
- De la disolución madre de fenoles II se tomó una alícuota de 0.1 ml, y se llevó al aforo con 10 ml de metanol. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en esta disolución es de 1 mg/l.
- De la disolución secundaria de fenoles II se tomaron alícuotas de 1 y 3 ml. Cada alícuota se diluyó en metanol y se llevó al aforo a 5 ml. La concentración aproximada de cada compuesto fenólico en estas disoluciones es de 0.1 y 0.3 mg/l, respectivamente.

Mezcla de agua - ácido acético al 1%. Se disolvieron 10 ml de ácido acético glacial en 500 ml de agua desionizada y se aforó a 1000 ml.

Mezcla de metanol - ácido acético al 1%. Se disolvieron 10 ml de ácido acético glacial en 500 ml de metanol y se aforó a 1000 ml.

Buffer de fosfato. Se pesó aproximadamente y con precisión 2.311 g de fosfato dibásico de sodio trihidratado y se aforó a un volumen de 1000 ml con agua desionizada. El pH de esta disolución fue de 9.09; se ajustó el pH a 7.08 por adición de HCl 1:1 en agua.

4.2.5 Evaluación de parámetros cromatográficos.

Por la técnica de HPLC se realizaron los siguientes estudios:

- Se optimizó el gradiente de elución para encontrar las mejores condiciones de separación de los 17 fenoles estudiados.
- Se probaron 8 columnas cromatográficas, de las cuales 7 son de fase inversa y 1 de fase normal

Tabla 4.2.3 Características de las columnas cromatográficas utilizadas.

	Marca	Fase Estacionaria	Dimensiones		Tamaño de Partícula
			longitud	di	
1	Zorbax eclipse XDB*	C8	150mm	4.6mm	5µm
2	Hypersil DBS*	C18	150mm	4.6mm	5µm
3	Waters Nova Pack	C18	150mm	3.9mm	5µm
4	Phenomenex Prodigy	C18	150mm	4.6mm	5µm
5	Phenomenex IB-SIL	C18	150mm	4.6mm	5µm
6	Whatman Partisil	C18	250mm	4.6mm	5µm
7	JT Baker*	Fenil	250mm	4.6mm	5µm
8	Hibar II	Diol	250mm	4.6mm	10µm

- En la columna 6 se modificó el valor de pH de la fase móvil de 3 a 5 y 7.
- Se realizaron cálculos de número de platos teóricos (N), altura equivalente a un plato teórico (H), resolución (R_s), selectividad (α) y factor de capacidad (k), de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Número de platos teóricos (N)

$$N = 5.54 \left(\frac{t_r}{w_{1/2}} \right)^2$$

Altura equivalente a un plato teórico (H)

$$H = \frac{L}{N}$$

Resolución (R_s)

$$R_s = \frac{t_{r2} - t_{r1}}{1/2(w_2 + w_1)}$$

Selectividad (α)

$$\alpha = \frac{t_{rA}}{t_{rB}} = \frac{t_r(A) - t_0}{t_r(B) - t_0}$$

Factor de capacidad (k)

$$k = t'_r / t_0$$

Las condiciones óptimas para cada una de las columnas fueron las siguientes:

Tabla 4.2.4 Condiciones óptimas para cada columna utilizada.

	<i>Fase Móvil</i>	<i>Flujo</i> [ml/min]	<i>Gradiente</i>	<i>Temp.</i>	<i>pH</i>	<i>Detector</i>
1	A:Metanol +1%AA B:Agua +1%AA	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3	UV 280nm
2	A:Metanol 1%AA B:Agua +1%AA A:Metanol B:Agua + K ₂ PO ₄	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3, 5, 7	UV 280nm
3	A:Metanol +1%AA B:Agua +1%AA	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3	UV 280nm
4	A:Metanol +1%AA B:Agua +1%AA	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3	UV 280nm
5	A:Metanol +1%AA B:Agua +1%AA	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3	UV 280nm

6	A:Metanol +1%AA B:Agua +1%AA	1.5	de 60%B a 100%B en 18 min.	22°C	3	UV 280nm
7	A:Metanol B:Agua +1%AA A:Metanol B:Agua + K ₂ PO ₄	1.5	de 80%B a 100%B en 18 min.	22°C	3, 5, 7	UV 280nm
8	A:Hexano B:Diclorometano	1.5	de 100%A a 50%A en 20 min	25°C	6	UV 280nm

En las columnas de fase inversa, t_0 fue determinado por la inyección de Nitrato de Potasio disuelto en agua y en el caso de la columna de fase normal t_0 se determinó por la inyección de Benceno disuelto en Cloruro de Metileno.

4.2.6 Determinación de los límites de detección y límites de cuantificación (LD y LC).

Dado que la columna en la cual se logró la mejor separación de los 17 fenoles fue la columna de fase estacionaria C-8 (sección 5.2), se determinaron los límites de detección y cuantificación para los compuestos fenólicos en esa columna.

Para determinar los límites de detección y cuantificación de los 17 compuestos fenólicos por el método de HPLC se realizaron inyecciones por triplicado de las disoluciones patrón de fenoles (sección 4.2.4.5). Las concentraciones aproximadas de cada fenol en estas disoluciones son de 100, 80, 60, 40, 20, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5, 0.3 y 0.1 mg/l. Por lo tanto el

intervalo de concentración para este estudio fue de 100 - 0.1 mg/l, con incrementos variables.

Las condiciones a las cuales se llevaron a cabo todas las inyecciones fueron las siguientes:

Columna: ZORBAX eclipse XDB C8.

Presión: 186 bar.

Fase móvil: A: Metanol + 1% ácido acético.

B: Agua + 1% ácido acético.

Gradiente de elución:

Tiempo (min)	0	18	22	25
% B	60	0	60	60

Flujo: 1.5ml/min

Volumen inyectado: 10 μ l

Detector: UV a $\lambda = 280$ nm, $\lambda_{ref} = 360$ nm

Con los datos obtenidos se construyeron las gráficas correspondientes a las curvas de calibración para cada compuesto fenólico, siendo el eje de las abscisas los valores de concentración de cada fenol y el eje de las ordenadas el valor del área de pico de cada fenol.

Se evaluaron los parámetros de límite de detección y límite de cuantificación, estos últimos parámetros se evaluaron de acuerdo al método descrito en el *apéndice 4*.

CAPÍTULO 5
RESULTADOS
Y
DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas (CG/EM)

El programa de temperatura en el cual se logró la mejor separación de los compuestos fenólicos en los primeros estudios realizados fue el siguiente:

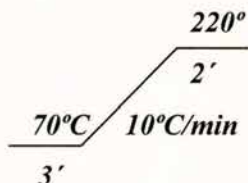


Figura 5.1.1 Programa de temperatura utilizado para las 4 técnicas de inyección en CG/EM.

Por la técnica de split se registró señal para 12 de los compuestos fenólicos. Los compuestos fenol y pentafluorofenol coeluyen en un tiempo de retención de 4.63 minutos. Los compuestos que no generan señal son: 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 4-acetil-aminofenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol y pentaclorofenol. (*figura A1-1*).

Por la técnica de split pulsado se observó señal para 16 compuestos fenólicos, excepto para el 2,4-dinitrofenol. Los compuestos fenol y pentafluorofenol coeluyen en un tiempo de retención de 4.29 minutos. (*figura A1-4*).

Por la técnica de splitless se registró señal para 12 compuestos fenólicos, sin embargo por esta técnica los picos presentaron asimetría principalmente los dos primeros. Los compuestos fenol y pentafluorofenol coeluyen en un tiempo de retención de 4.81 minutos. No se observó señal para 4-nitrofenol, 2,4-dinitrofenol, 4-acetil-aminofenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol y pentaclorofenol. (*figura A1-3*).

Por la técnica de splitless pulsado se registró señal para 13 compuestos fenólicos, al igual que por la técnica de splitless, los picos presentan asimetría principalmente los dos primeros. Los compuestos fenol y pentafluorofenol coeluyen en un tiempo de retención de 4.76 minutos. No se registró señal para 2,4-dinitrofenol, 4-acetil-aminofenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol y pentaclorofenol. (*figura A1-2*).

La técnica de inyección por la cual se registraron un mayor número de señales de compuestos fenólicos y que se acercan más a la forma gaussiana fue por split pulsado. (*figura 5.1.2*).

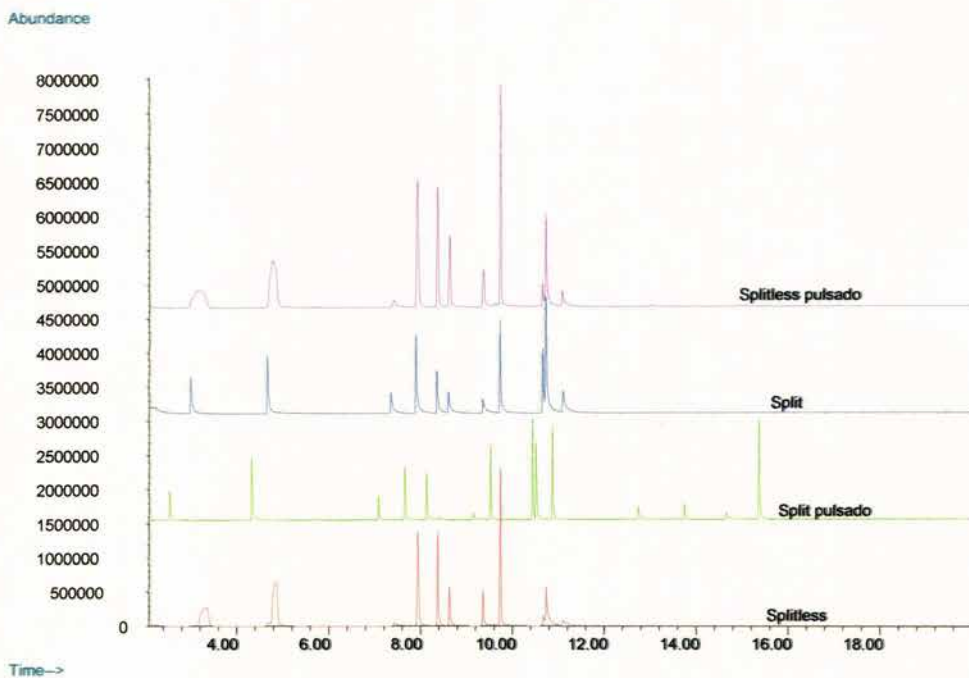


Figura 5.1.2 Cromatograma de la separación de fenoles por 4 técnicas de inyección.

Los parámetros cromatográficos calculados para cada una de las técnicas de inyección se presentan a continuación.

Tiempo muerto determinado para la columna HP-5: 0.84 min.

Tabla 5.1.1 Parámetros cromatográficos calculados por la técnica de split pulsado.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α
2-fluorofenol	2.50	0.64	38.16	0.48
Pentafluorofenol	4.29	0.23	64.41	0.55
Fenol	4.29	0.23	64.41	0.55
2-nitrofenol	7.05	0.06	14.15	0.91
2,4-diclorofenol	7.62	0.06	11.01	0.93
4-clorofenol	8.10	0.05	5.85	0.96
<i>o</i> -aminofenol	8.36	0.06	14.08	0.91
<i>p</i> -aminofenol	9.12	0.09	7.44	0.96
4-cloro-3-metilfenol	9.49	0.03	24.63	0.90
2,4,6-triclorofenol	10.41	0.02	1.89	0.99
2,4,5-triclorofenol	10.48	0.03	8.67	0.96
2,3,6-triclorofenol	10.84	0.03	39.91	0.84
4-nitrofenol	12.71	0.03	20.78	0.92
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	13.72	0.02	15.55	0.93
4-acetil-aminofenol	14.62	0.05	12.43	0.95
Pentaclorofenol	15.34	0.01		

Nota:



Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Tabla 5.1.2 Parámetros cromatográficos calculados por la técnica de split.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α
2-fluorofenol	2.96	0.63	31.86	0.56
Pentafluorofenol	4.63	0.23	45.76	0.58
Fenol	4.63	0.23	45.76	0.58
2-nitrofenol	7.32	0.16	9.42	0.92
2,4-diclorofenol	7.87	0.07	9.08	0.94
4-clorofenol	8.32	0.07	4.79	0.97
<i>o</i> -aminofenol	8.58	0.08	12.08	0.91
<i>p</i> -aminofenol	9.32	0.10	6.68	0.96
4-cloro-3-metilfenol	9.70	0.04	21.39	0.90
2,4,6-triclorofenol	10.63	0.03	1.36	0.99
2,4,5-triclorofenol	10.70	0.05	5.32	0.96
2,3,6-triclorofenol	11.07	0.11		

Nota:



Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Tabla 5.1.3 Parámetros cromatográficos calculados por la técnica de splitless.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α
2-fluorofenol	3.32	14.68	6.9	0.62
Pentafluorofenol	4.81	1.63	22.91	0.61
Fenol	4.81	1.63	22.91	0.61
2-nitrofenol	7.40	0.25	7.09	0.93
2,4-diclorofenol	7.91	0.11	7.87	0.94
4-clorofenol	8.34	0.07	5.16	0.97
<i>o</i> -aminofenol	8.59	0.06	15.88	0.91
<i>p</i> -aminofenol	9.32	0.04	8.98	0.96
4-cloro-3-metilfenol	9.70	0.03	19.41	0.90
2,4,6-triclorofenol	10.64	0.05	0.96	0.99
2,4,5-triclorofenol	10.71	0.10	3.44	0.96
2,3,6-triclorofenol	11.07	0.27		

Nota:



Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Tabla 5.1.4 Parámetros cromatográficos calculados por la técnica de *splitless pulsado*.

Compuesto	<i>t.r</i> (min)	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α
2-fluorofenol	3.11	42.09	4.94	0.58
Pentafluorofenol	4.76	3.46	16.23	0.60
Fenol	4.76	3.46	16.23	0.60
2-nitrofenol	7.38	0.51	5.05	0.93
2,4-diclorofenol	7.90	0.21	5.92	0.94
4-clorofenol	8.34	0.11	4.15	0.97
<i>o</i> -aminofenol	8.61	0.11	10.57	0.91
<i>p</i> -aminofenol	9.34	0.12	6.42	0.96
4-cloro-3-metilfenol	9.71	0.04	19.87	0.91
2,4,6-triclorofenol	10.63	0.04	1.38	0.99
2,4,5-triclorofenol	10.70	0.05	6.08	0.97
2,3,6-triclorofenol	11.06	0.06	23.37	0.84
4-nitrofenol	12.95	0.11		

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Como se observa de los datos que se presentan, los primeros compuestos en eluir se deforman y por consiguiente los valores de *H* son muy altos y se tiene una mala selectividad para estos compuestos. En el caso del fenol y pentafluorofenol que coeluyen en una sola señal en todos los casos estudiados, los datos de *H*, *Rs* y α son calculados para esa única señal. Como es de esperarse los valores de α no se alteran ya que α depende tan solo de las interacciones con la fase estacionaria, sin embargo

los valores de α para los dos primeros picos en todos los casos es muy baja debido a efectos del inyector.

En las técnicas de split, splitless y splitless pulsado la resolución para todos los compuestos es buena, excepto para el 2,4,6-triclorofenol y 2,4,5-triclorofenol los cuales presentan valores de R_s por debajo de 1.5, que es valor mínimo para obtener un análisis sin problemas de integración. En el caso de la técnica de split pulsado el valor de R_s para estos dos compuestos es de 1.89, valor aceptable para lograr un buen análisis cuantitativo.

Con el objeto de lograr la separación de los compuestos que coeluyen, se preparó una disolución de fenol y pentafluorofenol y se inyectó, variando el programa de temperatura de la siguiente forma:

Tabla 5.1.5 Variación de la temperatura en las inyecciones de fenol y pentafluorofenol.

Programa de Temperatura	Tiempos de Retención (min)	Resolución (R_s)
80°C (3min) hasta 200°C a 10°C/min	Pentafluorofenol: 3.18 Fenol: 3.28	1.11
75°C (3min) hasta 200°C a 10°C/min	Pentafluorofenol: 3.72 Fenol: 3.78	0.58
85°C (3min) hasta 200°C a 10°C/min	Pentafluorofenol: 2.71 Fenol: 2.84	1.34

90°C (3min) hasta 200°C a 10°C/min	Pentafluorofenol: 2.34 Fenol: 2.48	2.22
---------------------------------------	---------------------------------------	------

En los resultados anteriores se observa que iniciando a una temperatura de 90°C durante 3 minutos se tiene la mejor resolución, por lo tanto se adicionó a la disolución de fenol y pentafluorofenol el compuesto 2-fluorofenol, el cual aparece más próximo a estos dos compuestos en el cromatograma de la mezcla de 17 fenoles.

Se inyectó la mezcla de 3 fenoles en las condiciones antes mencionadas y se observa respuesta de los 3 fenoles a los siguientes tiempos de retención:

Tabla 5.1.6 *Tiempo de retención y resolución de 3 compuestos fenólicos.*

<i>Compuesto</i>	<i>Tiempo de Retención (min)</i>	<i>Resolución (Rs)</i>
2-fluorofenol	1.62	7.94
Pentafluorofenol	2.34	1.34
Fenol	2.48	

Dado que la resolución para pentafluorofenol y fenol no se logró optimizar más y para los demás compuestos es mayor de 1.5, se modificó el programa de temperatura, con el fin de recortar el tiempo de la corrida lo mas posible, entonces se volvió a inyectar la mezcla de 3 fenoles con los siguientes programas de temperatura:

Tabla 5.1.7 Variación de la temperatura en dos inyecciones de fenol, pentafluorofenol y 2-fluorofenol.

Programa de Temperatura	Tiempos de Retención (min)	Resolución (Rs)
90°C (1min) hasta 200°C a 10°C/min	2-fluorofenol: 1.59 Pentafluorofenol: 2.17 Fenol: 2.28	6.37 1.31
100°C (1min) hasta 200°C a 10°C/min	2-fluorofenol: 1.40 Pentafluorofenol: 1.78 Fenol: 1.90	4.57 1.33

El programa de temperatura con el cual se logró la mejor separación (figura 5.1.3) y en donde el tiempo de corrida fue más corto, es el siguiente:

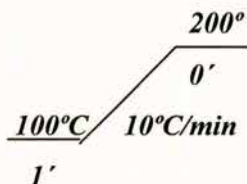


Figura 5.1.3 Programa de temperatura óptimo para la separación de fenol y pentafluorofenol

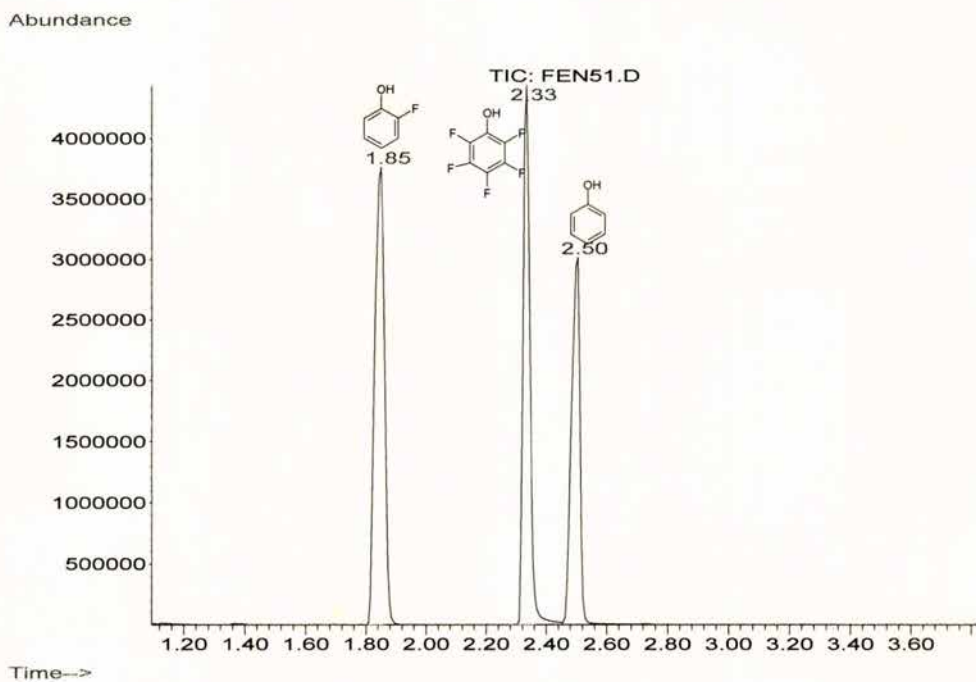


Figura 5.1.4 Cromatograma de la separación de 2-fluorofenol, pentafluorofenol y fenol por CG/EM.

Posteriormente se preparó una disolución de 2,4-dinitrofenol y se inyectó bajo las mismas condiciones anteriores y se obtuvo un pico en un tiempo de 12.4 minutos.

Los resultados que se obtuvieron para las inyecciones de la disolución de fenoles de 100 ppm por la técnica de split pulsado a diferentes presiones se muestran a continuación.

Tabla 5.1.8 Variación de la presión y el tiempo en 5 inyecciones por split pulsado.

Presión	20psi		20psi		25psi		30psi		40psi	
	1.0 min		0.5 min		0.5 min		0.5min		0.5 Min	
Tiempo	<i>t.r.</i> (min)	<i>Fr</i>	<i>t.r.</i> (min)	<i>Fr</i>	<i>t.r.</i> (min)	<i>Fr</i>	<i>t.r.</i> (min)	<i>Fr</i>	<i>t.r.</i> (min)	<i>Fr</i>
2-fluorofenol	1.40	27337	1.61	26790	1.55	21939	1.48	25273	1.61	23579
Pentafluorofenol	1.78	64428	1.97	32424	1.92	29701	1.87	29938	1.96	31130
Fenol	1.90	38165	2.07	33426	2.03	26026	1.99	30127	2.07	28744
2-nitrofenol	3.28	25784	3.39	26095	3.37	22518	3.37	23945	3.38	23643
2,4-diclorofenol	3.62	47364	3.71	48036	3.69	40687	3.69	41811	3.70	44227
4-clorofenol	3.83	39700	3.91	39815	3.89	33805	3.90	35697	3.90	37582
<i>o</i> -aminofenol	4.03	10925	4.11	10003	4.10	9052	4.10	8227	4.10	9859
<i>p</i> -aminofenol	4.59	13895	4.66	11513	4.64	10144	4.65	9866	4.65	11815
4-cloro-3-metilfenol	4.89	47798	4.95	50955	4.93	41699	4.94	43331	4.94	46802
2,4,6-triclorofenol	5.72	60674	5.76	62911	5.75	54963	5.76	54832	5.76	59770
2,4,5-triclorofenol	5.78	59767	5.83	61407	5.82	53670	5.83	52604	5.82	59097
2,3,6-triclorofenol	6.10	59987	6.14	60569	6.13	53665	6.14	52137	6.13	58354
2,4-dinitrofenol	7.52	25292	7.54	47305	7.54	120864	7.55	149338	7.54	87591
4-nitrofenol	7.77	20894	7.80	17992	7.78	20624	7.80	18855	7.79	25370
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	8.78	10616	8.79	14132	8.78	21055	8.79	21090	8.79	19175

4-acetil-aminofenol	9.61	15475	9.63	12217	9.62	13368	9.63	14535	9.63	11422
Pentaclorofenol	10.36	49337	10.37	56184	10.37	62505	10.38	54720	10.37	62386

Nota: Los cromatogramas individuales de este estudio se presentan en el apéndice 1. (figura A1-5 a figura A1-9).

El cromatograma que muestra las diferencias entre las inyecciones del estudio anterior es el siguiente:

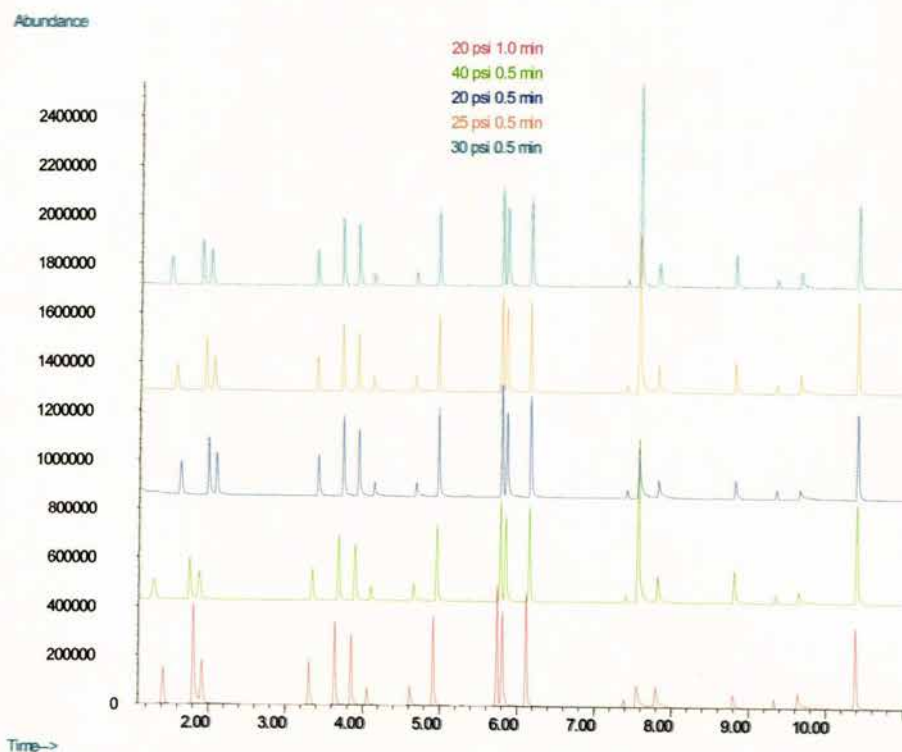


Figura 5.1.5 Cromatograma de la separación de fenoles por la técnica de split pulsado a diferentes presiones.

Con los estudios realizados se seleccionaron las mejores condiciones de análisis para los compuestos fenólicos, dando lugar al siguiente método de análisis:

Técnica de inyección: split pulsado, 30 psi por 0.5 minutos.

Temperatura del inyector: 250°C.

Programa de Temperatura: 100°C (1min) hasta 200°C a 10°C/min.

Estándar interno: Nitrobeneno.

Columna: Sílica fundida (WCOT) HP-5. 5% fenil-metil siloxano 25m (L) x 0.2mm (di) x 0.33µm (φ).

Gas portador: Helio, 1.2 ml/min.

Tipo de ionización: Impacto electrónico.

Analizador: Cuadrupolar.

Fuente de impacto electrónico: 70eV

Barrido másico: 33-550 uma.

Tiempo de retardo (solvent delay): 1 min

La figura siguiente muestra un cromatograma en donde se muestra la separación de los 17 compuestos fenólicos obtenido con las condiciones óptimas antes mencionadas.

Abundance

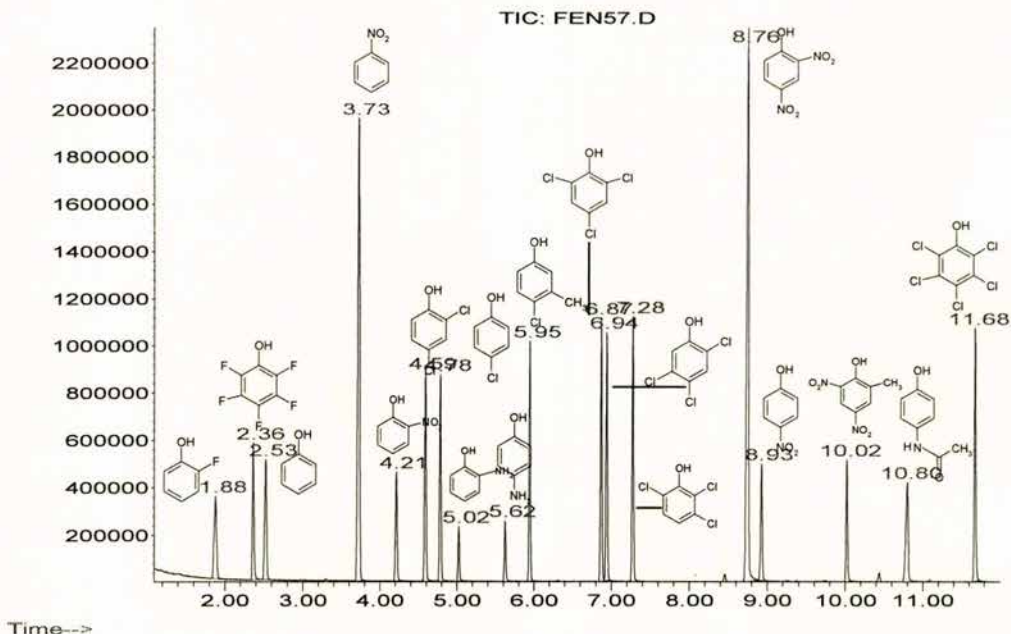


Figura 5.1.6 Cromatograma de la separación de 17 fenoles por CG/EM (concentración aproximada de 100 ppm).

Como puede observarse en estas condiciones de análisis se logra la separación de los 17 fenoles. Es necesario considerar que se trata de una mezcla de estándares y que en caso de tratarse de una muestra real, la resolución entre fenol y pentafluorofenol y la de los triclorofenoles sería un parámetro crítico a considerar. Cualquier modificación de la programación de la temperatura provocaría la coelución de estos compuestos.

En el estudio realizado por CG/EM en el modo SCAN Se obtuvieron curvas de calibración para 17 compuestos fenólicos en un intervalo de concentración de 100 – 20 ppm y para 12 compuestos fenólicos en un intervalo de concentración de 10 – 1 ppm. Los datos de la regresión lineal de estas curvas, así como las gráficas correspondientes se muestran en la *tabla 5.1.9*.

El método de CG/EM (SCAN) produce resultados satisfactorios para todos los fenoles estudiados (valores de $r > 0.99$ y $s < 0.2$) en el intervalo de concentración de 100 a 20 ppm. En el intervalo de 10 a 1 ppm varios fenoles ya no se registran por haber disminuido su concentración por debajo de su límite de detección (*ver tabla 5.1.9*).

El 2,4-dinitrofenol es el compuestos que presenta el valor de r más malo (0.9907), así como, el valor de m más pequeño. Este compuesto debido a su bajo factor de respuesta ($m = 0.65$), no se detecta en el intervalo de concentración de 10 a 1 ppm (*ver tabla 5.1.9*).

Tabla 5.1.9 Valores de regresión lineal para los datos obtenidos por SCAN

<i>Compuesto Fenólico</i>	<i>100-20 ppm</i>				<i>10-1 ppm</i>			
	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>s</i>
2-fluorofenol	-0.07	1.23	0.9990	0.04	-0.35	2.01	0.9955	0.18
Pentafluorofenol	-0.30	1.53	0.9999	0.01	-2.98	2.41	0.9998	0.03
Fenol	-0.09	1.37	0.9994	0.03	-0.47	2.26	0.9943	0.19
2-Nitrofenol	-0.11	1.16	0.9998	0.02	-0.75	1.37	0.9997	0.02
2,4-diclorofenol	-0.19	2.08	0.9998	0.03	-0.87	3.03	0.9919	0.33
4-clorofenol	-0.16	1.74	0.9998	0.03	-0.74	2.62	0.9927	0.27
<i>o</i> -aminofenol	-0.21	1.26	0.9996	0.02	-0.47	0.86	0.9937	0.06
<i>p</i> -aminofenol	-0.27	1.67	0.9998	0.02	-0.82	1.76	0.9895	0.20
4-cloro-3-metilfenol	-0.18	2.06	0.9998	0.02	-0.81	2.94	0.9905	0.32
2,4,6-triclorofenol	-0.25	2.52	0.9999	0.02	-2.71	4.35	0.9979	0.18
2,4,5-triclorofenol	-0.26	2.54	0.9999	0.02	-1.85	4.05	0.9930	0.36
2,3,6-triclorofenol	-0.25	2.51	0.9999	0.02	-2.91	4.32	0.9981	0.18
2,4-dinitrofenol	-0.35	0.65	0.9907	0.05	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
4-nitrofenol	-0.27	1.31	0.9994	0.03	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	-0.41	1.22	0.9999	0.005	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
4-acetil-aminofenol	-0.54	1.97	0.9978	0.09	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>
Pentaclorofenol	-0.99	3.41	0.9964	0.18	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>

Nota: *ND:* No detectado por CG/EM modo SCAN en el intervalo de concentración de 10 – 1 ppm.

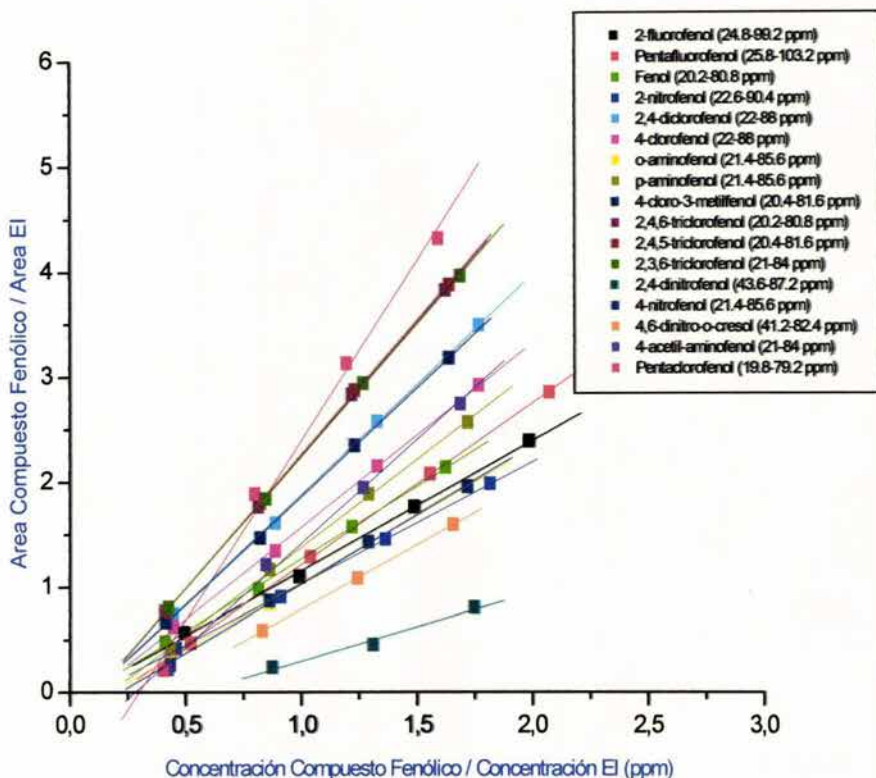


Figura 5.1.7 Curvas de calibración de 17 fenoles, obtenidas por la técnica CG/EM SCAN en un intervalo de concentración de 100 – 20 ppm de compuesto fenólico en relación a 50 ppm de Estándar Interno.

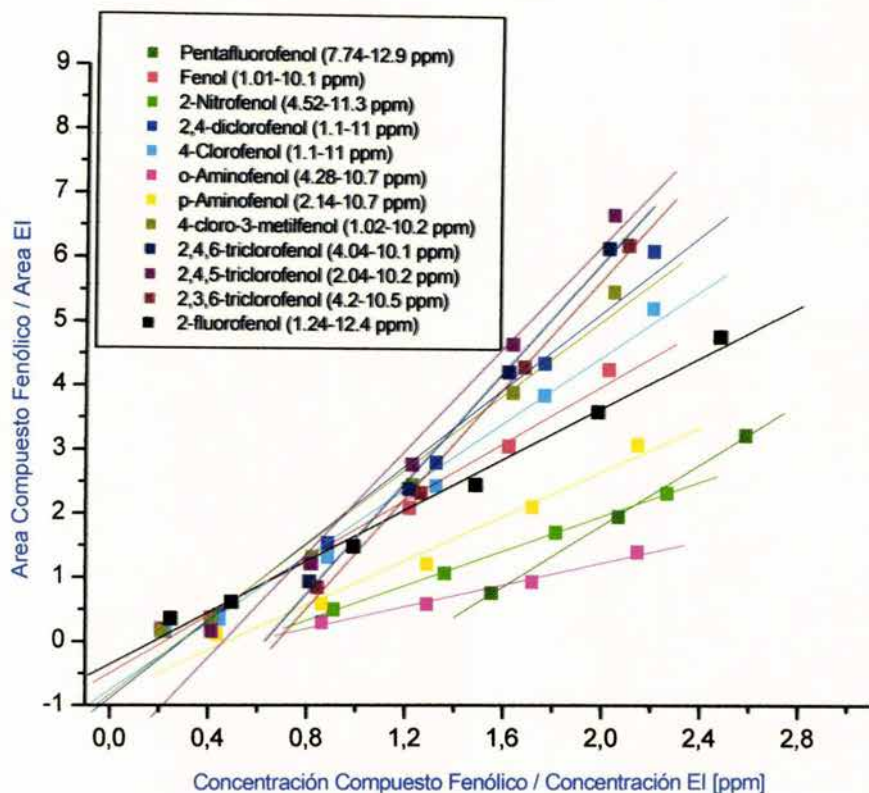


Figura 5.1.8 Curvas de calibración de 12 fenoles, obtenidas por la técnica CG/EMSCAN en un intervalo de concentración de 10 – 1 ppm de compuesto fenólico en relación a 5 ppm de Estándar Interno.

En el estudio realizado por CG/EM en el modo SIM Se obtuvieron curvas de calibración para 16 compuestos fenólicos en un intervalo de concentración de 10 – 1 ppm. Los datos de la regresión lineal de estas curvas, así como las gráficas correspondientes se muestran a continuación.

Tabla 5.1.10 Valores de regresión lineal para los datos obtenidos por SIM

Compuesto Fenólico	10-1 ppm			
	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>s</i>
2-fluorofenol	-0.10	1.80	0.9996	0.04
Pentafluorofenol	-0.17	1.28	0.9974	0.08
Fenol	-0.14	2.33	0.9996	0.04
2-Nitrofenol	-0.07	0.68	0.9973	0.04
2,4-diclorofenol	-0.22	1.97	0.9985	0.08
4-clorofenol	-0.21	2.24	0.9990	0.07
<i>o</i> -aminofenol	-0.10	0.75	0.9954	0.05
<i>p</i> -aminofenol	-0.24	1.67	0.9972	0.09
4-cloro-3-metilfenol	-0.24	2.19	0.9982	0.09
2,4,6-triclorofenol	-0.29	2.41	0.9961	0.14
2,4,5-triclorofenol	-0.37	2.74	0.9959	0.17
2,3,6-triclorofenol	-0.41	2.95	0.9973	0.15
2,4-dinitrofenol	ND	ND	ND	ND
4-nitrofenol	-0.15	0.79	0.9919	0.07
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	-0.08	0.18	0.9999	0.001
4-acetil-aminofenol	-0.25	1.13	0.9912	0.10
Pentaclorofenol	-0.12	0.51	0.9879	0.05

Nota: **ND:** No detectado por SIM en el intervalo de concentración de 10 – 1 ppm.

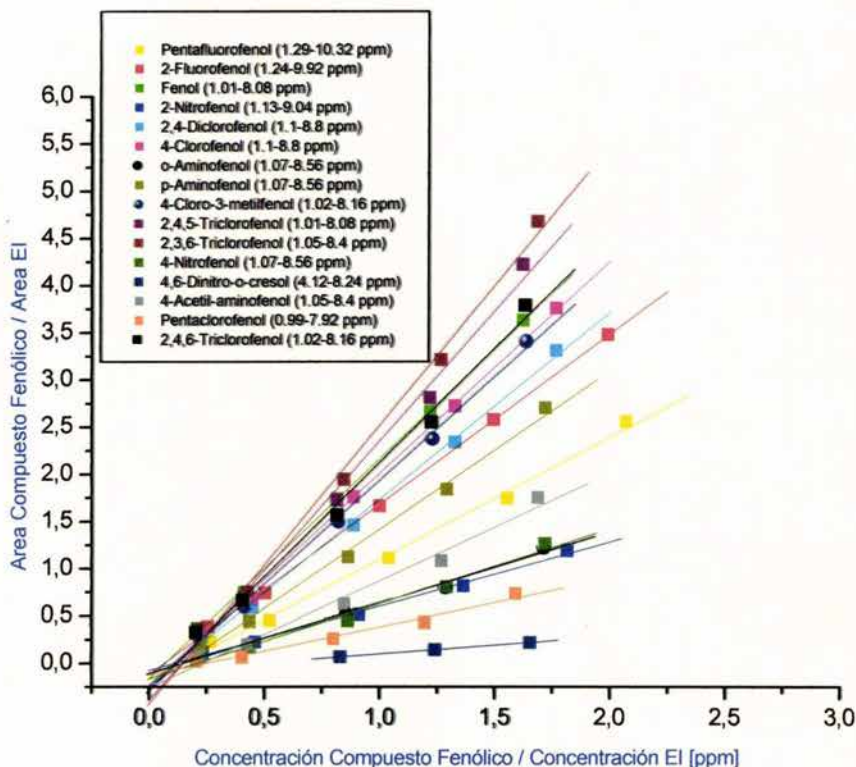


Figura 5.1.9 Curvas de calibración de 16 fenoles, obtenidas por la técnica CG/EM SIM en un intervalo de concentración de 10 – 1 ppm de compuesto fenólico en relación a 5 ppm de Estándar Interno.

Nota: Los cromatogramas correspondientes a este estudio se presentan en el apéndice 1 (figuras A1-11 y A1-12).

El compuesto 2,4-dinitrofenol no mejora su factor de respuesta ni aún en el método SIM, por lo que no se detecta en el intervalo de concentraciones de 10 a 1 ppm.

En los análisis por CG/EM es un hecho común el que se presente más dispersión de los datos en las disoluciones más concentradas, lo que provoca que al realizar un ajuste por mínimos cuadrados la ordenada al origen dé valores negativos. Esto se corrige fácilmente disminuyendo el intervalo de concentración empleado.

Tabla 5.1.11 Límites de detección y cuantificación determinados por las técnicas de SCAN y SIM para 17 compuestos fenólicos.

<i>Compuesto</i>	<i>SCAN</i>		<i>SIM</i>	
	<i>LD (ppm)</i>	<i>LC (ppm)</i>	<i>LD (ppm)</i>	<i>LC (ppm)</i>
2-fluorofenol	2.2	4.3	0.7	1.4
Pentafluorofenol	2.0	3.7	1.4	2.8
Fenol	1.9	3.8	0.6	1.2
2-nitrofenol	1.8	3.5	1.1	2.3
2,4-diclorofenol	2.4	4.8	0.9	1.8
4-clorofenol	2.3	4.5	1.0	2.1
<i>o</i> -aminofenol	1.9	3.7	1.5	2.9
<i>p</i> -aminofenol	2.6	5.1	1.3	2.5
4-cloro-3-metilfenol	2.3	4.6	0.9	1.8
2,4,6-triclorofenol	1.6	3.1	1.3	2.6
2,4,5-triclorofenol	2.2	4.2	1.3	2.5
2,3,6-triclorofenol	1.6	3.2	1.1	2.3

2,4-dinitrofenol	22.0*	40.2	<i>ND</i>	<i>ND</i>
4-nitrofenol	6.1*	12.1	1.9	3.7
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	6.8*	13.1	1.4	2.6
4-acetil-aminofenol	40.6*	78.9	2.0	4.0
Pentaclorofenol	10.6*	20.6	2.1	4.2

Notas:

ND: No detectado por SIM en el intervalo de concentración de 10 – 1 ppm.

- Determinados en un intervalo de concentración de 100 – 20 ppm.
- Los valores de la *tabla 5.1.11* se obtuvieron por medio de las ecuaciones descritas en el apéndice 4.

Los límites de detección y cuantificación instrumentales alcanzados permiten prever que al analizar muestras reales, empleando técnicas de preparación de muestra tales como la extracción en fase sólida (SPE, por sus siglas en inglés) fácilmente se pueden alcanzar concentraciones del orden de ppb's (factor de enriquecimiento de 100:1, como en las técnicas de análisis de agua).

5.2 Cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Tiempo muerto determinado para la columna Zorbax eclipse C-8: 0.958 min.

Tabla 5.2.1 Parámetros cromatográficos calculados para la columna Zorbax eclipse XDB C-8.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α	<i>k</i>
<i>p</i> -aminofenol	0.91	0.005	0.9	-2.75	-0.05
<i>o</i> -aminofenol	0.97	0.005	3.1	0.05	0.01
4-acetil-aminofenol	1.30	0.011	13.4	0.15	0.36
Fenol	3.27	0.002	2.8	0.84	2.41
2-fluorofenol	3.71	0.002	3.4	0.83	2.87
4-nitrofenol	4.27	0.001	1.6	0.92	3.46
2,4-dinitrofenol	4.55	0.001	2.6	0.89	3.75
2-nitrofenol	4.99	0.001	8.6	0.74	4.21
4-clorofenol	6.41	0.001	3.2	0.91	5.69
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	6.96	0.001	8.0	0.82	6.27
4-cloro-3-metilfenol	8.29	0.0004	4.2	0.92	7.65
2,4-diclorofenol	8.97	0.0003	1.7	0.97	8.36
Pentafluorofenol	9.25	0.0003	4.1	0.93	8.66
2,3,6-triclorofenol	9.92	0.0002	6.3	0.90	9.35
2,4,6-triclorofenol	10.95	0.0002	3.7	0.94	10.43
2,4,5-triclorofenol	11.54	0.0002	22.0	0.76	11.05
Pentaclorofenol	14.81	0.0001			14.46

Ver figura A1-13

Tiempo muerto determinado para la columna Hypersil BDS C-18

Tabla 5.2.2 Parámetros cromatográficos calculados para la columna Hypersil BDS C-18.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α	<i>k</i>
4-acetil-aminofenol	1.33	0.008	4.35	0.33	0.27
<i>o</i> -aminofenol	1.89	0.005	2.06	0.73	0.81
<i>p</i> -aminofenol	2.21	0.006	3.34	0.69	1.12
Fenol	2.73	0.002	2.56	0.83	1.61
2-fluorofenol	3.08	0.002	2.55	0.85	1.95
4-nitrofenol	3.44	0.002	2.55	0.86	2.30
2,4-dinitrofenol	3.82	0.001	3.83	0.83	2.66
2-nitrofenol	4.40	0.001	6.72	0.77	3.21
4-clorofenol	5.41	0.0007	6.16	0.82	4.18
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	6.38	0.0006	6.04	0.85	5.11
4-cloro-3-metilfenol	7.32	0.0004	4.99	0.89	6.01
2,4-diclorofenol	8.10	0.0004	7.03	0.87	6.76
Pentafluorofenol	8.10	0.0004	7.03	0.87	6.76
2,3,6-triclorofenol	9.20	0.0003	7.94	0.87	7.81
2,4,6-triclorofenol	10.44	0.0002	2.81	0.96	9.00
2,4,5-triclorofenol	10.88	0.0002	25.46	0.72	9.42
Pentaclorofenol	14.69	0.0001			13.07

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-14

Tiempo muerto determinado para la columna Waters Novapack C-18: 1.181 min.

Tabla 5.2.3 *Parámetros cromatográficos calculados para la columna Waters Novapack C-18.*

<i>Compuesto</i>	<i>t_r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	<i>α</i>	<i>k</i>
4-acetil-aminofenol	0.84	0.035	2.7	-1.13	-0.29
<i>o</i> -aminofenol	1.49	0.045	1.3	0.45	0.26
<i>p</i> -aminofenol	1.49	0.045	1.3	0.45	0.26
Fenol	1.86	0.016	1.1	0.70	0.57
2-fluorofenol	2.15	0.016	1.5	0.71	0.82
4-nitrofenol	2.54	0.007	1.5	0.79	1.15
2,4-dinitrofenol	2.91	0.008	2.5	0.74	1.46
2-nitrofenol	3.54	0.005	2.7	0.77	2.00
4-clorofenol	4.23	0.004	4.4	0.72	2.58
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	5.45	0.003	2.5	0.86	3.61
4-cloro-3-metilfenol	6.17	0.002	2.5	0.88	4.22
2,4-diclorofenol	6.88	0.002	4.5	0.82	4.83
Pentafluorofenol	6.88	0.002	4.5	0.82	4.83
2,3,6-triclorofenol	8.15	0.001	4.1	0.856	5.90
2,4,6-triclorofenol	9.26	0.001	1.8	0.94	6.84
2,4,5-triclorofenol	9.74	0.001	15.4	0.68	7.25
Pentaclorofenol	13.68	0.0003			10.58

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-15

Tiempo muerto determinado para la columna Phenomenex Prodigy: 1.072 min.

Tabla 5.2.4 Parámetros cromatográficos calculados para la columna Phenomenex Prodigy 5u ODS.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α	<i>k</i>
<i>p</i> -aminofenol	0.76	0.008	0.8	1.24	-0.29
<i>o</i> -aminofenol	0.82	0.008	6.1	-0.59	-0.24
4-acetil-aminofenol	1.49	0.008	13.9	0.17	0.39
Fenol	3.60	0.002	2.8	0.84	2.36
2-fluorofenol	4.07	0.002	4.8	0.78	2.80
4-nitrofenol	4.92	0.001	4.6	0.80	3.59
2,4-dinitrofenol	5.90	0.002	6.2	0.79	4.50
2-nitrofenol	5.90	0.002	6.2	0.79	4.50
4-clorofenol	7.22	0.001	7.2	0.82	5.74
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	8.62	0.001	3.6	0.91	7.04
4-cloro-3-metilfenol	9.32	0.0004	4.6	0.90	7.69
2,4-diclorofenol	10.21	0.0004	5.4	0.90	8.52
Pentafluorofenol	10.21	0.0004	5.4	0.90	8.52
2,3,6-triclorofenol	11.24	0.0003	7.2	0.89	9.49
2,4,6-triclorofenol	12.56	0.0002	2.6	0.96	10.72
2,4,5-triclorofenol	13.04	0.0002	20.7	0.77	11.16
Pentaclorofenol	16.72	0.0001			14.60

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-16

Tiempo muerto determinado para la columna Phenomenex IB-SIL: 1.054 min.

Tabla 5.2.5 *Parámetros cromatográficos calculados para la columna Phenomenex IB-SIL 5 C-18.*

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	<i>α</i>	<i>k</i>
4-acetil-aminofenol	1.36	0.011	8.3	0.18	0.29
Fenol	2.75	0.005	1.9	0.82	1.61
2-fluorofenol	3.13	0.004	2.0	0.83	1.97
4-nitrofenol	3.56	0.004	1.6	0.86	2.38
2,4-dinitrofenol	3.96	0.005	2.6	0.81	2.76
2-nitrofenol	4.64	0.003	2.8	0.81	3.40
4-clorofenol	5.46	0.003	3.8	0.79	4.18
4,6-dinitro-o-cresol	6.62	0.002	3.0	0.87	5.28
4-cloro-3-metilfenol	7.46	0.001	2.6	0.90	6.08
2,4-diclorofenol	8.17	0.001	4.5	0.85	6.75
Pentafluorofenol	8.17	0.001	4.5	0.85	6.75
2,3,6-triclorofenol	9.39	0.001	4.1	0.88	7.91
2,4,6-triclorofenol	10.49	0.001	1.5	0.96	8.95
2,4,5-triclorofenol	10.90	0.001	14.2	0.72	9.34
Pentaclorofenol	14.66	0.0003			12.91

-Nota:



Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-17

Tiempo muerto determinado para la columna Whatman partisol ODS: 1.844 min.

Tabla 5.2.6 Parámetros cromatográficos calculados para la columna Whatman Partisol 5 ODS-3.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α	<i>k</i>
<i>p</i> -aminofenol	1.93	0.013	1.6	0.24	0.05
<i>o</i> -aminofenol	2.18	0.008	3.6	0.37	0.18
4-acetil-aminofenol	2.76	0.006	11.3	0.32	0.50
Fenol	4.75	0.002	2.8	0.85	1.58
2-fluorofenol	5.26	0.002	4.6	0.79	1.85
4-nitrofenol	6.14	0.002	2.6	0.89	2.33
2,4-dinitrofenol	6.66	0.001	4.1	0.86	2.61
2-nitrofenol	7.46	0.001	2.7	0.91	3.05
4-clorofenol	7.99	0.001	8.0	0.79	3.33
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	9.60	0.001	2.0	0.95	4.21
4-cloro-3-metilfenol	10.01	0.001	3.3	0.92	4.43
2,4-diclorofenol	10.68	0.001	6.3	0.88	4.79
Pentafluorofenol	10.68	0.001	6.3	0.88	4.79
2,3,6-triclorofenol	11.94	0.0004	5.1	0.91	5.48
2,4,6-triclorofenol	12.91	0.0004	2.1	0.97	6.00
2,4,5-triclorofenol	13.31	0.0003	19.1	0.76	6.22
Pentaclorofenol	16.84	0.0002			8.13

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-18

En los datos presentados se observa que algunos valores de α son negativos, o muy pequeños esto se debe a que el tiempo de retención de esos compuestos es cercano o menor al tiempo muerto (t_0). Lo anterior se explica por la polaridad de dichos compuestos ya que es muy alta y prácticamente no interaccionan con la fase estacionaria.

El valor de k óptimo para el desarrollo de un método analítico robusto, requiere que se encuentre entre $2 < k < 10$, esto con el objeto de asegurar que exista interacción del analito con la fase estacionaria. El valor de k en HPLC fácilmente puede ser modificado cambiando la fuerza eluyente de la fase móvil (más disolvente orgánico).

Los valores de eficiencia de columna (H) obtenidos son excelentes ya que se alcanzan entre 54000 y 172000 platos teóricos.

Tiempo muerto determinado para la columna J.T. Baker Phenyl: 1.883 min.

Tabla 5.2.7 Parámetros cromatográficos calculados para la columna Fenil.

<i>Compuesto</i>	<i>t.r (min)</i>	<i>H</i>	<i>Rs</i>	α	<i>k</i>
4-acetil-aminofenol	3.82	0.003	10.1	0.52	1.03
Fenol	5.61	0.002	4.1	0.84	1.98
2-fluorofenol	6.33	0.001	8.2	0.75	2.36
4-nitrofenol	7.81	0.001	1.6	0.92	3.15
p-aminofenol	8.30	0.005	1.8	0.92	3.41
4-clorofenol	8.88	0.001	2.7	0.93	3.72
2-nitrofenol	9.37	0.001	3.7	0.91	3.98
2,4-dinitrofenol	10.08	0.001	2.7	0.94	4.35
Pentafluorofenol	10.08	0.001	2.7	0.94	4.35
4-cloro-3-metilfenol	10.57	0.0004	2.3	0.96	4.61
2,4-diclorofenol	10.96	0.0003	7.9	0.87	4.82
<i>o</i> -aminofenol	11.60	ND	ND	ND	5.16
2,3,6-triclorofenol	12.33	0.0004	1.8	0.97	5.55
2,4,6-triclorofenol	12.63	0.0002	1.0	0.98	5.71
2,4,5-triclorofenol	12.79	0.0004	16.4	0.79	5.79
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	12.79	0.0004	16.4	0.79	5.79
Pentaclorofenol	15.72	0.0002			7.35

Notas: **ND:** No detectado con la columna J.T. Baker Phenyl.



Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-19

De los datos calculados para esta columna se puede ver que los valores de k y H son buenos para el desarrollo de un método analítico, sin embargo los valores de R_s y simetría de pico, claramente indican que la columna no es buena.

Dadas las características de esta columna (sitios activos) se evaluó el efecto del pH sobre la disociación de los fenoles y su mecanismo de retención al cambiar el pH.

Tabla 5.2.8 *Tiempos de retención de 17 compuestos fenólicos con la comuna Fenil utilizando fase móvil de diferentes valores de pH.*

<i>Compuesto</i>	<i>t.r. [min] a pH 3</i>	<i>t.r. [min] a pH 5</i>	<i>t.r. [min] a pH 7</i>
4-acetil-aminofenol	3.82	4	3.96
<i>p</i> -aminofenol	8.30	3.1	3.1
<i>o</i> -aminofenol	11.60	4.1	3.96
4-clorofenol	8.88	8.7	8.6
4-cloro-3-metilfenol	10.57	10.4	10.3
2,4-diclorofenol	10.96	10.08	9.8
2,3,6-triclorofenol	12.33	11	5.8
2,4,5-triclorofenol	12.79	12.4	9.2
2,4,6-triclorofenol	12.63	11.7	6.6
Pentaclorofenol	15.72	10.8	9.2
Fenol	5.61	5.5	5.4
2-fluorofenol	6.33	6.2	5.8
Pentafluorofenol	10.08	7.5	3.1
2-nitrofenol	9.37	9.1	5.8

4-nitrofenol	7.81	7.5	* Negativo ~4.8
2,4-dinitrofenol	10.08	* Negativo ~4.4	* Negativo ~3.4
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	12.79	* Negativo ~7.1	* Negativo ~3.6

* En estos casos por el efecto hipocrómico la señal genera menor absorción que la fase móvil.

El resultado es que para algunos de los fenoles no se ve afectado el tiempo de retención por los cambios de pH, sin embargo para otros el cambio en el pH afecta en gran medida su tiempo de retención y por ende su interacción con la fase estacionaria.

Así el *p*-aminofenol presenta un $t_r = 8.3$ a $\text{pH} = 3$ y al subir el pH su tiempo de retención disminuye más de la mitad, eso significa que el grupo $-\text{OH}$ se disocia generando el ion fenolato que ya no interacciona con la fase estacionaria.

En el caso de los tres triclorofenoles se aprecia que el 2,3,6-triclorofenol se disocia a partir de $\text{pH} = 5$ y el 2,4,5-triclorofenol y el 2,4,6-triclorofenol se disocian hasta $\text{pH} = 7.0$, debido a que la presencia de dos grupos cloro en posición *orto* al grupo $-\text{OH}$ polarizan más a éste. Este efecto también se aprecia para el pentaclorofenol aunque con menor magnitud.

El efecto de disociación afecta a los nitrofenoles en el tiempo de retención pero también provoca cambios en la conjugación de dobles

ligaduras y esto se traduce en un efecto hipocrómico, generándose así señales negativas con respecto a la fase móvil.

La *figura 5.2.1* muestra los cromatogramas obtenidos de las inyecciones de una disolución de fenoles de 100 ppm aproximadamente utilizando una columna de fenil y una fase móvil de pH 3, 5, y 7.

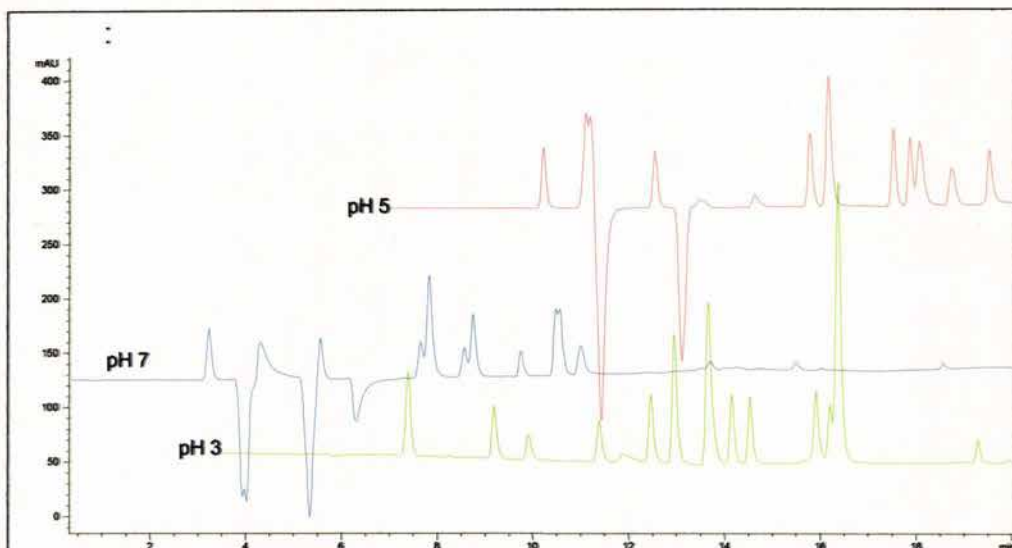


Figura 5.2.1 Cromatograma de la separación de fenoles con columna Fenil a diferentes valores de pH.

A continuación se muestra una figura en la cual se han incluido 7 cromatogramas correspondientes a las 7 columnas de fase reversa utilizadas para la separación de fenoles por HPLC.

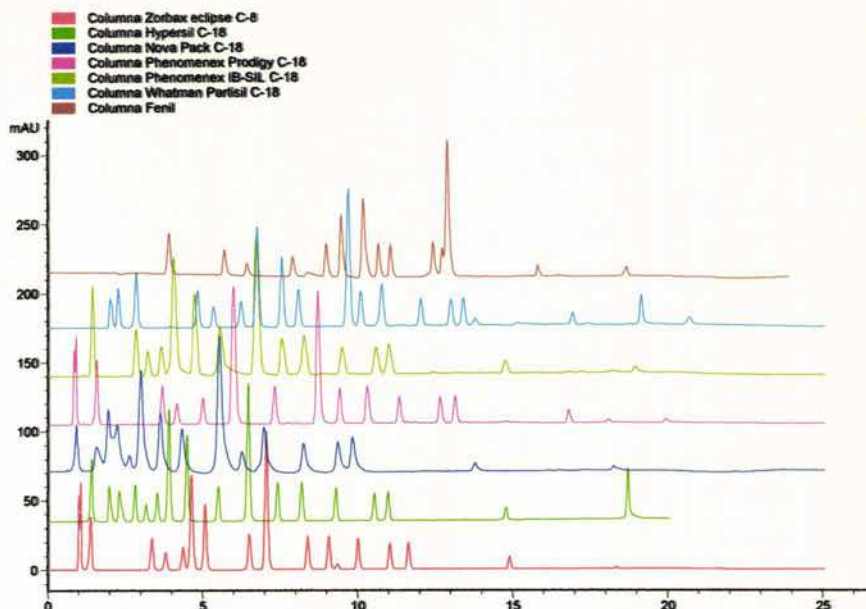


Figura 5.2.2 Cromatogramas de la separación de fenoles por HPLC utilizando 7 columnas de fase reversa diferentes.

En la figura anterior se observa que la única columna en la cual se logró separar los 17 compuestos fenólicos fue en la columna Zorbax eclipse C-8 ya que en las columnas de fase modificada con grupos octadecil y fenil se presenta coelución de los compuestos, así como asimetría de los picos.

Dado el efecto de disociación que presentan los fenoles debido a su pK_a se analizaron por cromatografía de fase normal, para ello se seleccionó una columna empacada con fase químicamente unida con grupos diol.

Los resultados obtenidos con la columna Hibar Lichrosorb Diol se encuentran en la *tabla 5.2.9*.


En esta columna el cambio de la química empleada en la separación no sólo cambia los parámetros de retención sino también el orden de elución.

Por otro lado la polaridad de la fase estacionaria genera efectos de coleo graves con lo que se genera una notable pérdida de eficiencia en comparación con los otros sistemas estudiados.

Tiempo muerto determinado para la columna Lichrosorb Diol: 2.066 min.

Tabla 5.2.9 *Parámetros cromatográficos calculados para la columna Lichrosorb Diol.*

Compuesto	t.r. (min)	H	Rs	α	k
2-nitrofenol	2.39	0.004	0.4	0.83	0.16
4,6-dinitro-o-cresol	2.46	0.008	1.3	0.48	0.19
4-nitrofenol	2.88	0.043	8.4	0.17	0.39
2,4,6-triclorofenol	7.02	0.008	4.6	0.71	2.40
2,3,6-triclorofenol	7.02	0.008	4.6	0.71	2.40
2,4-diclorofenol	9.05	0.003	4.1	0.83	3.38
Pentaclorofenol	10.50	0.002	7.1	0.76	4.08
2,4,5-triclorofenol	13.15	0.002	1.5	0.94	5.36
Fenol	13.83	0.002	3.8	0.84	5.69
4-cloro-3-metilfenol	16.02	0.003	3.6	0.88	6.75
4-clorofenol	17.99	0.001			7.71

Nota:  Los compuestos coeluyen en una sola señal.

Ver figura A1-20

Por la técnica de HPLC se obtuvieron curvas de calibración para 17 compuesto fenólicos en un intervalo de concentración de 1 – 0.1 y de 100 – 2 ppm. Los datos de la regresión lineal de estas curvas, así como las gráficas correspondientes se muestran a continuación.

Tabla 5.2.10 Valores de regresión lineal para los datos obtenidos por HPLC.

Compuesto Fenólico	100-2 ppm				1-0.1 ppm			
	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>s</i>	<i>b</i>	<i>m</i>	<i>r</i>	<i>s</i>
<i>p</i> -aminofenol	-1.03	3.66	0.9999	1.51	0.21	3.14	0.9974	0.13
<i>o</i> -aminofenol	3.80	4.58	0.9999	1.89	4.91	3.47	0.9895	0.33
4-acetil-aminofenol	-2.56	5.92	0.9999	2.55	1.05	2.01	0.9828	0.23
Fenol	-1.44	3.86	0.9999	1.72	0.41	2.96	0.9986	0.12
2-fluorofenol	-1,20	2.13	0.9999	1.27	0.22	1.65	0.9983	0.06
4-nitrofenol	-1.78	2.83	0.9999	1.61	ND	ND	ND	ND
2,4-dinitrofenol	-5.54	12.74	0.9999	5.28	0.66	11.76	0.9972	0.42
2-nitrofenol	-3.16	8.63	0.9999	3.63	0.32	5.91	0.9969	0.24
4-clorofenol	-1.49	4.28	0.9999	1.92	0.25	5	0.9972	0.19
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	-6.09	17.01	0.9999	7.40	0.83	18.14	0.9972	0.64
4-cloro-3-metilfenol	-0.77	4.09	0.9999	1.87	0.27	1.56	0.9924	0.16
2,4-diclorofenol	-2.29	4.24	0.9999	1.63	0.21	3.77	0.9970	0.19
Pentafluorofenol	-0.77	0.54	0.9995	0.66	0.25	0.14	0.9901	0.01
2,3,6-triclorofenol	-1.64	2.96	0.9999	1.38	0.11	3.15	0.9980	0.11

2,4,6- triclorofenol	0.04	3.11	0.9999	1.34	0.35	2.83	0.9931	0.22
2,4,5- triclorofenol	-1.23	3.18	0.9999	1.70	0.70	3.0	0.9844	0.38
Pentaclorofenol	0.33	1.26	0.9999	0.45	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>	<i>ND</i>

Nota: ND: No detectado por HPLC con la columna Zorbax eclipse XDB-C8 en el intervalo de concentración de 1.0 – 0.1 ppm.

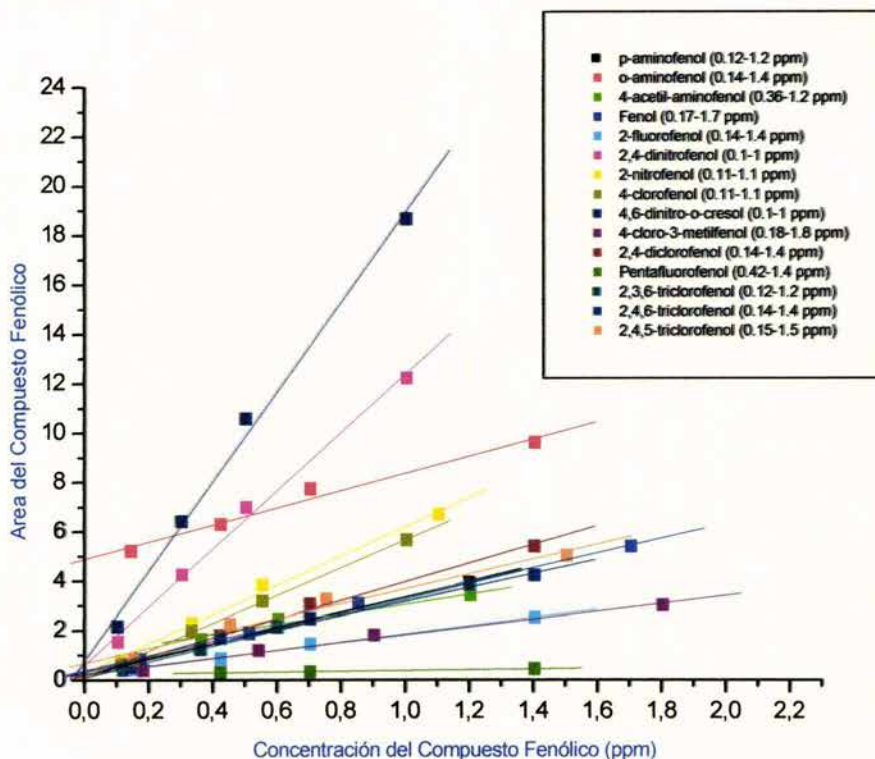


Figura 5.2.3 Curvas de calibração de 15 fenóis obtidas por a técnica de HPLC en un intervalo de concentración de 1 – 0.1 ppm.

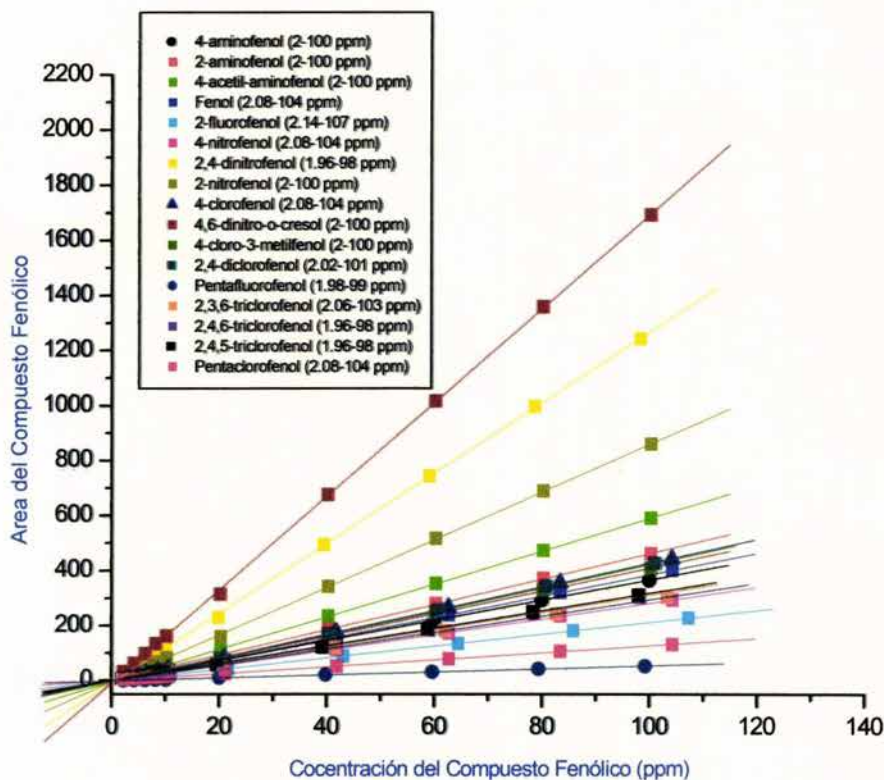


Figura 5.2.4 Curvas de calibración de 17 fenoles obtenidas por la técnica de HPLC en un intervalo de concentración de 100 – 2 ppm.

Tabla 5.2.11 Límites de detección y cuantificación determinados por la técnica de HPLC.

Compuesto	0.1 – 1ppm		2 – 100 ppm	
	LD ppm	LC ppm	LD ppm	LC ppm
<i>p</i> -aminofenol	0.15	1.7	1.8	3.3
<i>o</i> -aminofenol	0.39	2.0	1.6	3.0
4-acetil-aminofenol	0.62	2.4	1.8	3.3
Fenol	0.23	1.7	1.8	3.5
2-fluorofenol	0.31	1.9	2.5	5.1
4-nitrofenol	ND	ND	2.3	4.5
2,4-dinitrofenol	0.14	1.7	1.6	3.2
2-nitrofenol	0.16	1.7	1.7	3.2
4-clorofenol	0.15	1.7	1.8	3.6
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	0.13	1.7	1.7	3.3
4-cloro-3-metilfenol	0.43	1.9	1.8	3.6
2,4-diclorofenol	0.2	1.7	1.3	2.9
Pentafluorofenol	0.9	2.7	4.9	9.5
2,3,6-triclorofenol	0.17	1.7	1.9	3.8
2,4,6-triclorofenol	0.34	1.9	1.8	3.2
2,4,5-triclorofenol	0.54	2.1	2.2	4.2
Pentaclorofenol	ND	0.9	2.0	5.2

Notas:

- **ND:** No detectado por HPLC con la columna Zorbax eclipse XDB-C8 en un intervalo de concentración de 1.0-0.1 ppm.
- Los valores de la *tabla 5.2.11* se obtuvieron por medio de las ecuaciones descritas en el apéndice 4.

En este caso el estudio de los límites de detección para fenoles muestra que a concentraciones de 100 a 2 ppm los valores de coeficiente de correlación (r) es para casi todos los compuestos de 0.9999 y en el intervalo de 1 a 0.1 ppm es del orden de 0.99 lo que indica que se tiene un buen método de detección de trazas.

En el intervalo de 100 a 2 ppm el compuesto que presenta las peores condiciones de sensibilidad es el pentafluorofenol ya que la pendiente de la curva de calibración es de apenas 0.54.

El compuesto con menor detectabilidad es el 4,6-dinitro-*o*-cresol con una pendiente de 17 y similarmente el 2,4-dinitrofenol con una pendiente de 12.7.

El pentaclorofenol que presenta una pendiente de 1.26 en el intervalo de 100 a 2 ppm cuando se baja la concentración ya no es detectado. Lo mismo ocurre con el 4-nitrofenol que en dicho intervalo presenta una pendiente de 2.83 y a concentraciones más bajas ya no es detectado.

Lo observado es explicable por el hecho de que a concentraciones altas se dan interacciones de tipo dipolo o bien formación de puentes de hidrógeno que favorecen la conjugación y por ende aumenta el coeficiente de extinción, efecto que se pierde por dilución provocando un cambio en el factor de respuesta y por consecuencia en la pendiente de la curva de calibración. Este efecto se aprecia con mayor o menor intensidad en todos los fenoles estudiados.

CAPITULO 6

CONCLUSIONES

Una limitante de la técnica de CG/EM es el hecho de que dada la polaridad de los compuestos fenólicos estos forman puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo superficiales de los materiales de construcción de la columna, originándose así un intenso coqueo, lo que provoca que no se obtenga un buen análisis cuantitativo. Esto se refleja en los altos valores de límite de detección.

Otro problema en la técnica de CG/EM modo SCAN es que ciertos compuestos tales como el 2,4-dinitrofenol, 4-nitrofenol, 4,6-dinitro-*o*-cresol, 4-acetil-aminofenol y pentaclorofenol tienen límites de detección de 22, 6.1, 6.8, 40.6 y 10.6 ppm respectivamente. Este problema se disminuye al realizar un monitoreo selectivo de iones, ya que se logra bajar los límites de detección de los compuestos antes mencionados hasta 1.9, 1.4, 2, y 2.1 ppm, excepto para el 2,4-dinitrofenol cuyo límite de detección es de 22 ppm.

La mejor técnica de inyección para el análisis de fenoles por CG/EM es split pulsado, dado que por esta técnica solamente entra a la columna una pequeña fracción (entre 0.2 y 2%) de la cantidad total de la inyección, mientras que por la técnica de splitless casi toda la muestra entra en la columna (cerca del 80%), esto explica que los primeros compuestos que salen de la columna tengan una forma asimétrica, ya que la concentración

de los solutos es muy grande y por lo tanto los valores de selectividad se ven afectados.

En la técnica de HPLC, de las columnas de fase inversa que se probaron solamente se logró la separación de los 17 compuestos fenólicos con la columna ZORBAX eclipse C_8 y en todos los casos en los que se utilizó columnas con fase modificada con el grupo octadecilo ($C_{18}H_{27}$) no se logró la separación de los 17 compuestos fenólicos y se observó coelución y asimetría de pico.

En el caso de la columna con fase modificada con el grupo fenilo ($-C_6H_5$) no se logró la separación de los compuestos pentafluorofenol y 2,4-dinitrofenol.

El cambio de fase estacionaria a fase normal no favorece la separación de los fenoles ya que en esta columna las interacciones con la fase estacionaria son con la parte polar de los fenoles y la elución depende de los diferentes grupos funcionales que contenga el anillo.

Por otro lado, en la técnica de HPLC se observa que a concentraciones altas los fenoles presentan un cambio en el valor del coeficiente de absortividad molar (ϵ) debido a la formación de dímeros entre moléculas de fenoles, principalmente en aquellos cuyos grupos funcionales polarizan más al grupo hidroxilo.

Lo anterior se observa en el cambio de pendiente de las curvas de calibración; cuando el intervalo de la curva de calibración es de 1 a 0.1 ppm la pendiente es menor que la de la curva de calibración de intervalo de 100 a 2 ppm. Esto es, cuando la concentración es menor la pendiente es muy pequeña, lo cual nos indica que existe menos probabilidad de formación de dímeros, ya que la cantidad de moléculas de fenoles es menor en comparación con la cantidad de moléculas del disolvente, en el cual se encuentran disueltos.

En HPLC los valores de límite de detección de todos los compuestos fenólicos se encuentran entre 1.3 y 2.5 ppm excepto el del pentafluorofenol cuyo valor de límite de detección es de 4.9 ppm. Comparando estos valores con los obtenidos por la técnica de CG/EM resulta que todos son mas bajos aún comparándolos con los obtenidos por CG/EM en el modo SIM. Únicamente en el caso del compuesto 4-nitrofenol el límite de detección en HPLC es de 2.3 ppm solamente 0.4 ppm más alto que por SIM.

Con lo realizado se ha podido establecer dos métodos de análisis que comparándolos a través de el límite de detección y los problemas de coelución de compuestos (resolución y selectividad) dan como resultado que la técnica de HPLC es una mejor herramienta analítica para el análisis de fenoles.

En cuanto a los tiempos de análisis las corridas por HPLC son un poco más largas que en CG/EM; sin embargo ya que en CG/EM se usa programación de temperatura es necesario esperar un tiempo para que el horno se enfríe antes de proceder a inyectar nuevamente, hecho que no sucede en HPLC ya que el tiempo de equilibrio del sistema por el gradiente que se realiza es menor. De manera que ambas técnicas son comparables en cuanto a tiempo de análisis.

Es necesario puntualizar que en el presente estudio se seleccionaron muchos fenoles y de una gran diversidad de grupos funcionales y aunque no necesariamente en muestras reales se van a encontrar juntos todos ellos, los datos contenidos en el presente trabajo resultan una referencia importante para poder optimizar los parámetros cromatográficos de análisis en muestras reales.

Quedaría aún por realizar un estudio comparativo de las distintas técnicas de preparación y concentración de muestras disponibles y poder evaluar en forma simultánea con estos procedimientos analíticos instrumentales las eficiencias de recobro, los límites de detección y cuantificación de todo el procedimiento analítico a partir de muestras específicas que contengan estos fenoles.

CAPÍTULO 7
BIBLIOGRAFÍA

1. Kirck, R.E.; Othmer, D.F., “Enciclopedia de Tecnología Química” tomo VII, 1ª edición, Unión Tipográfica, editorial Hispano-Americana. México (1962).
2. Saitta Marcelo; Lo Curto Simona; Salvo Francesco; Di Bella Giuseppa; Dugo Giacomo, *Analytica Chimica Acta*, **466** (2002) 335-344.
3. Makuch Bougumila; Gazda Krystyna y Kaminski Marian, *Analytica Chimica Acta*, **284** (1993) 53-58.
4. Frébortová Jitka y Tatarkovicová Vêra, *The Analyst*, **119** (1994) 1519-1523.
5. Chee K.K.; Lan W.G.; Wong M.K.; Lee H.K., *Analytica Chimica Acta*, **312** (1995) 271-280.
6. Jáuregui O.; Galceran M.Teresa, *Analytica Chimica Acta*, **340** (1997) 191-199.
7. Heberer Thomas; Stan Hans-Juergen.J., *Analytica Chimica Acta*, **341** (1997) 21-34.

8. Di Corcia Antonio; Marchese Stefano y Samperi Roberto, *Journal of Chromatography*, **642** (1993) 175-184.
9. Gatti R.; Gioia M.G.; Di Pietra A.M.; Cavrini V., *Analytica Chimica Acta*, **447** (2001) 89-99.
10. Urbanczyk Andrezej; Steniewski Jacek; Szymanowski Jan, *Analytica Chimica Acta*, **466** (2002) 151-159.
11. Galceran M. Teresa; Jáuregui Olga, *Analytica Chimica Acta*, **304** (1995) 75-84.
12. Puig D.; Barceló D., *Analytica Chimica Acta*, **311** (1995) 63-69.
13. Nakamura Sadao; Takino Masahiko y Daishima Shigeki, *The Analyst*, **126** (2001) 835-839.
14. Ley Federal de Derechos en Materia de Agua, Comisión Nacional del Agua. México. (2000).
15. Hajslová, J.; Kocourek, V.; Zemanová, I.; Pudil, F.; Davídek, J., *Journal of Chromatography*, **439** (1988) 307-316.
16. Lamparski, L.L.; Nestricks, T.J., *Journal of Chromatography*, **156** (1978) 143-151.

17. Armentrout, D.N.; McLean, J.D.; Long, M.W., *Analytical Chemistry*, **51**, 7 (1979) 1039-1044.
18. Schmidt Luther; Jeffrey J.; Sun y James S. Fritz; Hagen Donald F.; Markell Craig G.; Wisted Eric E., *Journal of Chromatography*, **641** (1993) 57-61.
19. Escarpa, A.; González M.C., *Analytica Chimica Acta*, **427** (2001) 119-127
20. Streitwieser, A.; Heathcock, C.H., "Química Orgánica", editorial Interamericana. México (1985).
21. Wingrove, A.S.; Caret, R.L., "Organic Chemistry", Harper & Row Publicaciones. Estados Unidos (1981).
22. Solomons, T.W., "Fundamentos de Química Orgánica", 3ª edición, editorial Limusa. México (1995).
23. Morrison, R.T.; Boyd, R.N., "Organic Chemistry", 6ª edición, editorial Prentice Hall. Estados Unidos (1992).
24. Skoog, D.A.; Holler, F.J.; Nieman, T.A., "Principios de Análisis Instrumental" 5ª edición, editorial McGraw Hill. España (2001).

25. McNair, H.M.; Esquivel, B.H., "Cromatografía Líquida de Alta Presión", 1ª edición, Monografía No.10, Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Estados Unidos (1973).
26. Quattrocchi, O.A.; Abelaira, S.; Laba, R.F., "Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica", Merck. Argentina (1992).
27. McNair, H.M., "Cromatografía de Gases", Monografía No. 23, Secretaria General de la Organización de los Estados Unidos, programa regional de desarrollo científico y tecnológico. Estados Unidos (1981).
28. McNair, H.M.; Polite, L., "Memorias del curso de HPLC", ABC Instrumentación. México (2001).
29. Harris, D.C., "Análisis Químico cuantitativo", 2ª edición, editorial Reverté. España (2001).
30. Manual de referencia de inyector automático HP 1100, 2ª edición, Hewlett Packard. Alemania (1995).
31. Dabrio Bañuls, M.V., y cols. "Cromatografía de gases ", 1ª edición, tomo I, editorial Alambra. España (1971).

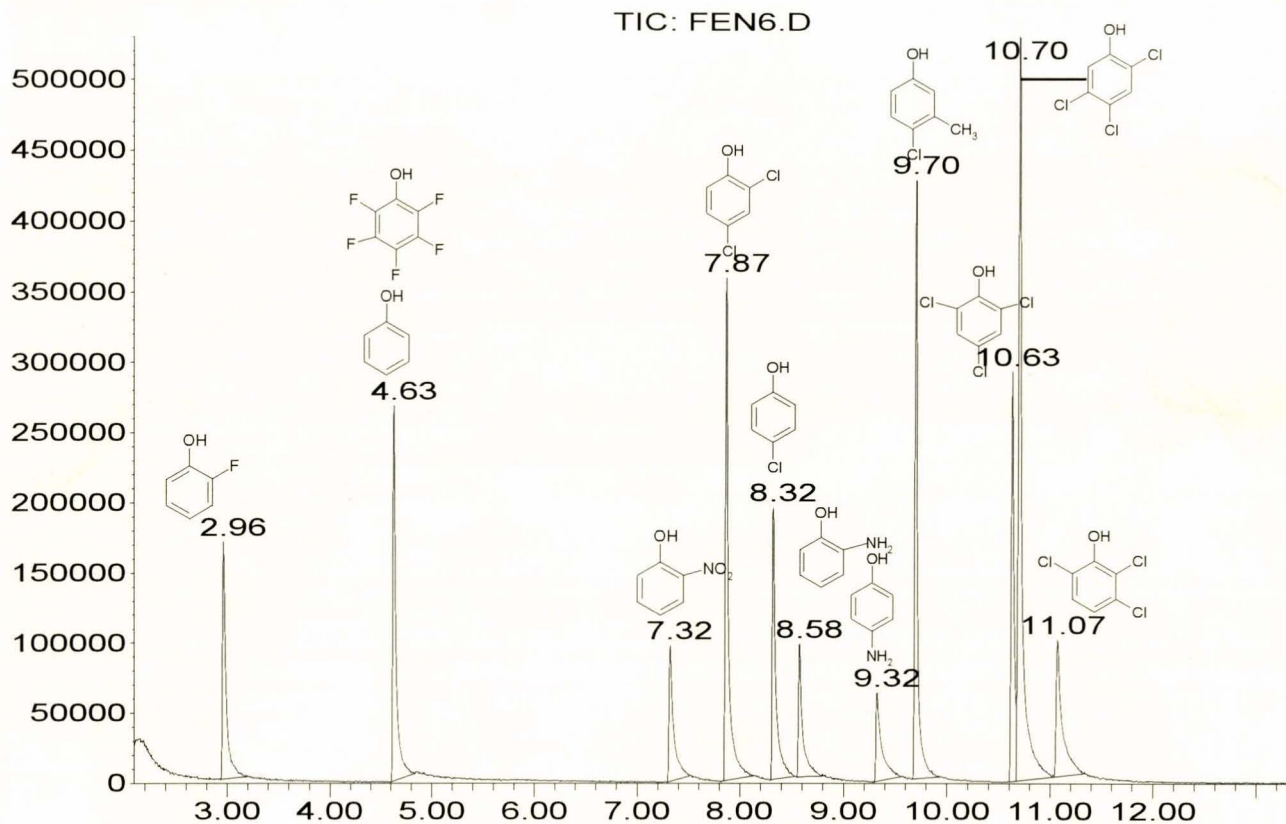
32. Manual de operación del cromatógrafo de gases HP 6890, 1ª edición, volumen 2, "Inyectores", Hewlett Packard. Estados Unidos (1996).
33. Tutorial de Cromatografía de Gases CGC-20 versión 1, capítulo 4, Savant (1998).
34. McNair, H.M.; Bonelli, E.J., "Basic Gas Chromatography", 4ª edición, Varian. Estados Unidos (1968).
35. Buffington, R.; Wilson, M.K., "Detectors for Gas Chromatography" A Practical Primer, Hewlett Packard. Estados Unidos.
36. Gómez Ruiz, H., "Memorias del curso ¿Qué son? y ¿Para que sirven? Los equipos acoplados de Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas", Facultad de Química UNAM (1997).
37. Gómez Ruiz, H., "Memorias del curso Control de Calidad en Resultados Analíticos", Facultad de Química UNAM (1998).
38. Miller, J.C.; Miller, J.N., "Estadística para Química Analítica", 2ª edición, editorial Addison Wesley Iberoamericana. Estados Unidos (1993).

39. Vogelgesang, J.; Hädrich, J., *Acree Qual Assur*, **3** (1998), 242-245.
40. Budavari, S. y cols., "The Merck Index" 30 edición, Merck & Co.,INC. Estados Unidos (2001).
41. Dean, A.J., "Manual de Química", 13ª edición, McGraw Hill. México (1989).
42. Lenga E. Robert, "The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data", 2a edición, volumen I y II. Estados Unidos. (1988).
43. Lewis, J. y cols., "Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials", 8ª edición, vol. 1, 2 y 3, editorial Van Nostrand Reinhold. Estados Unidos (1989).
44. Dreisbach, "Manual de Toxicología Clínica", 6ª edición, editorial Manual Moderno. México (1988).

APÉNDICE 1

CROMATOGRAMAS

Abundance



Time-->

Figura A1-1 Cromatograma de la separación de fenoles por CG/EM. Técnica de inyección de Split.

Abundance

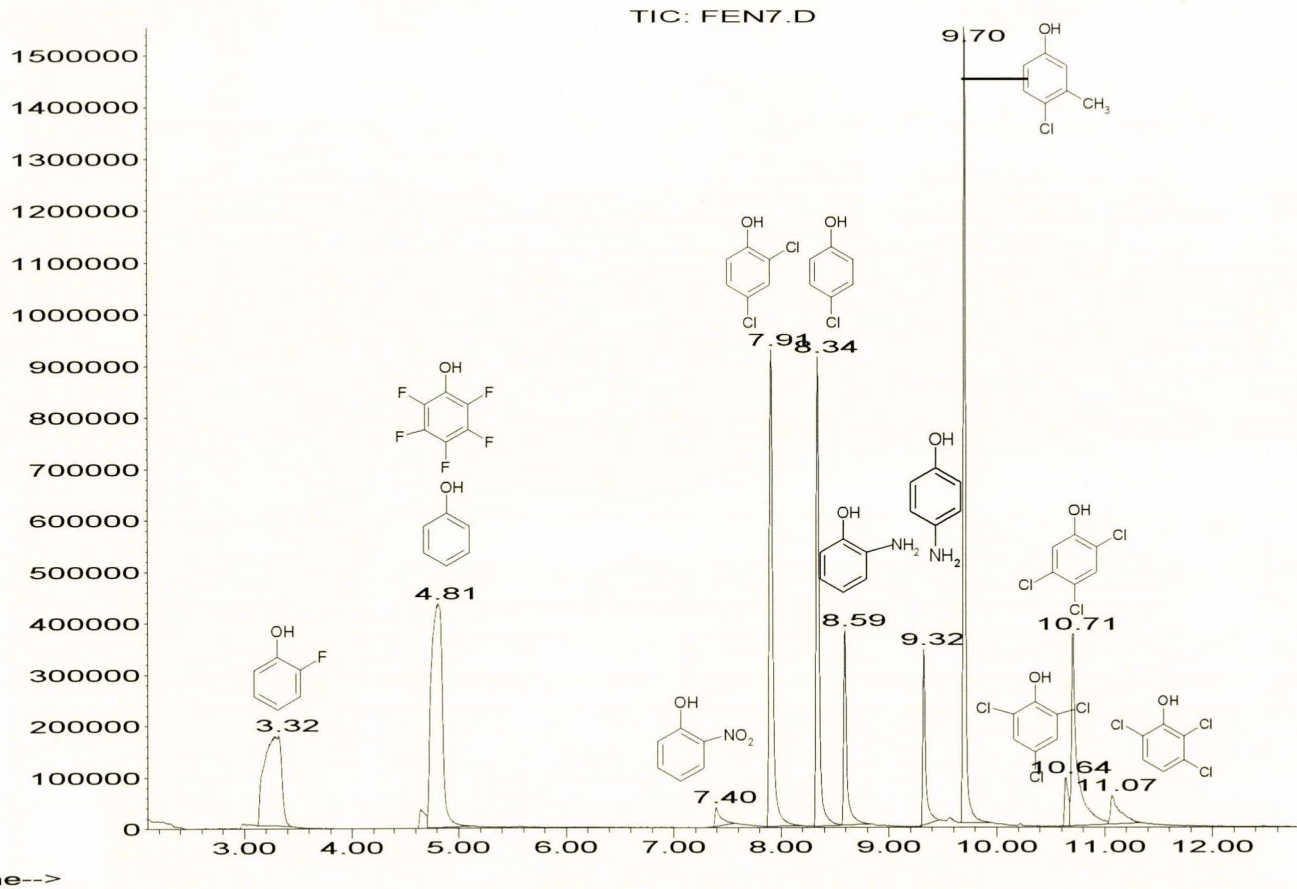


Figura A1-2 Cromatograma de la separación de fenoles por CG/EM. Técnica de inyección por Splitless.

Abundance

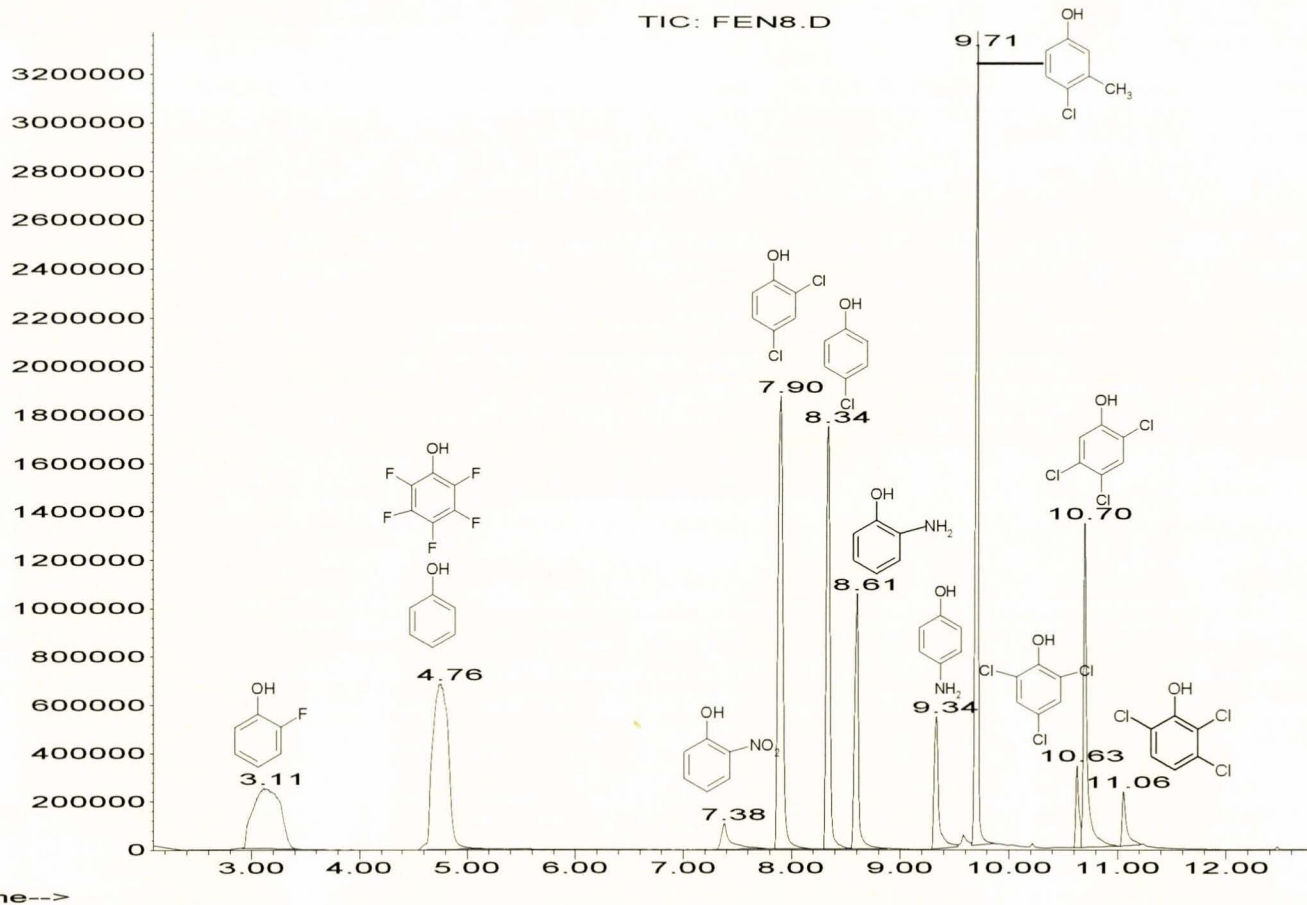


Figura A1-3 Cromatograma de la separación de fenoles por CG/EM. Técnica de inyección por Splitless pulsado.

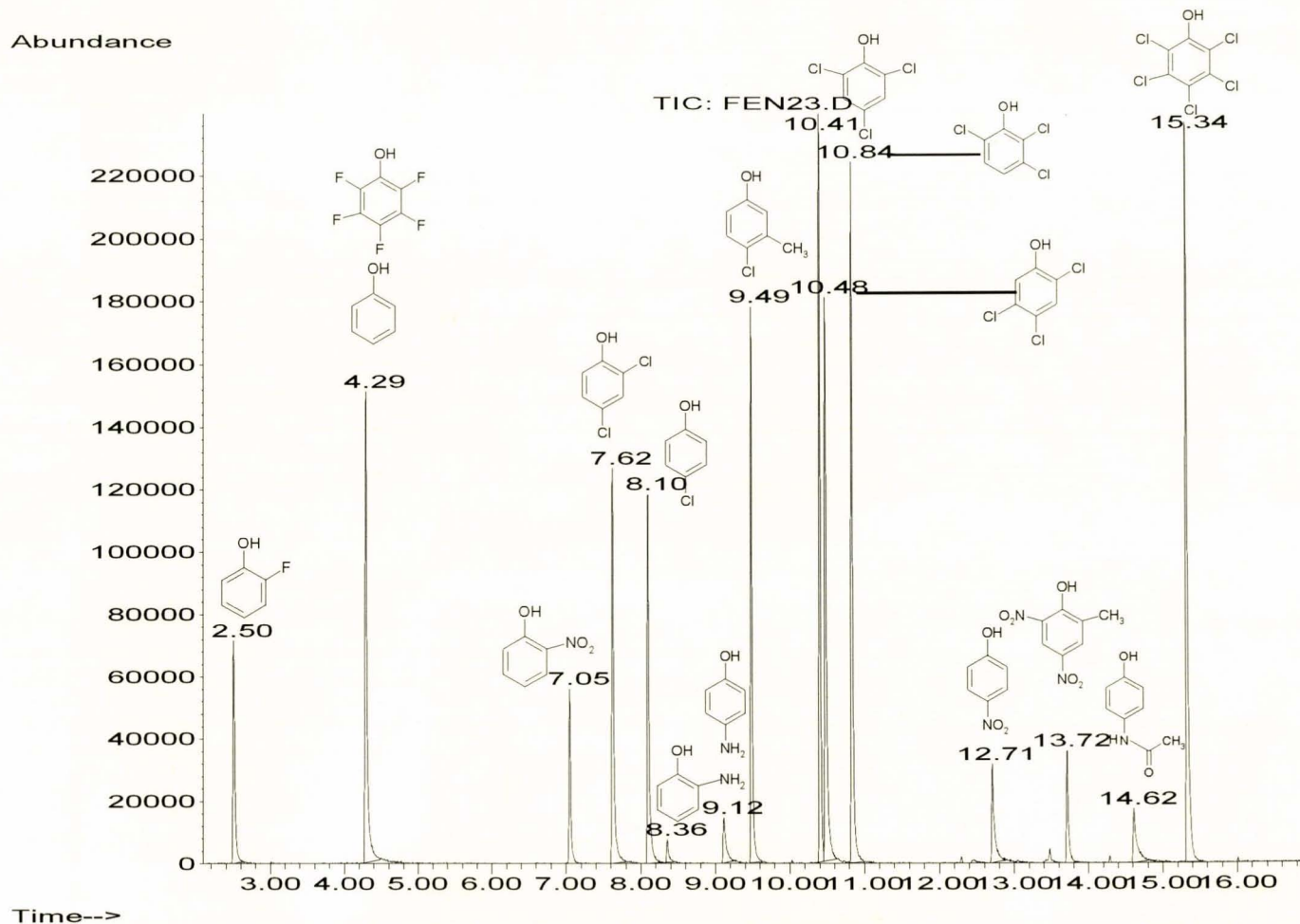


Figura A1-4 Cromatograma de la separación de fenoles por CG/EM. Técnica de inyección por Split pulsado.

Abundance

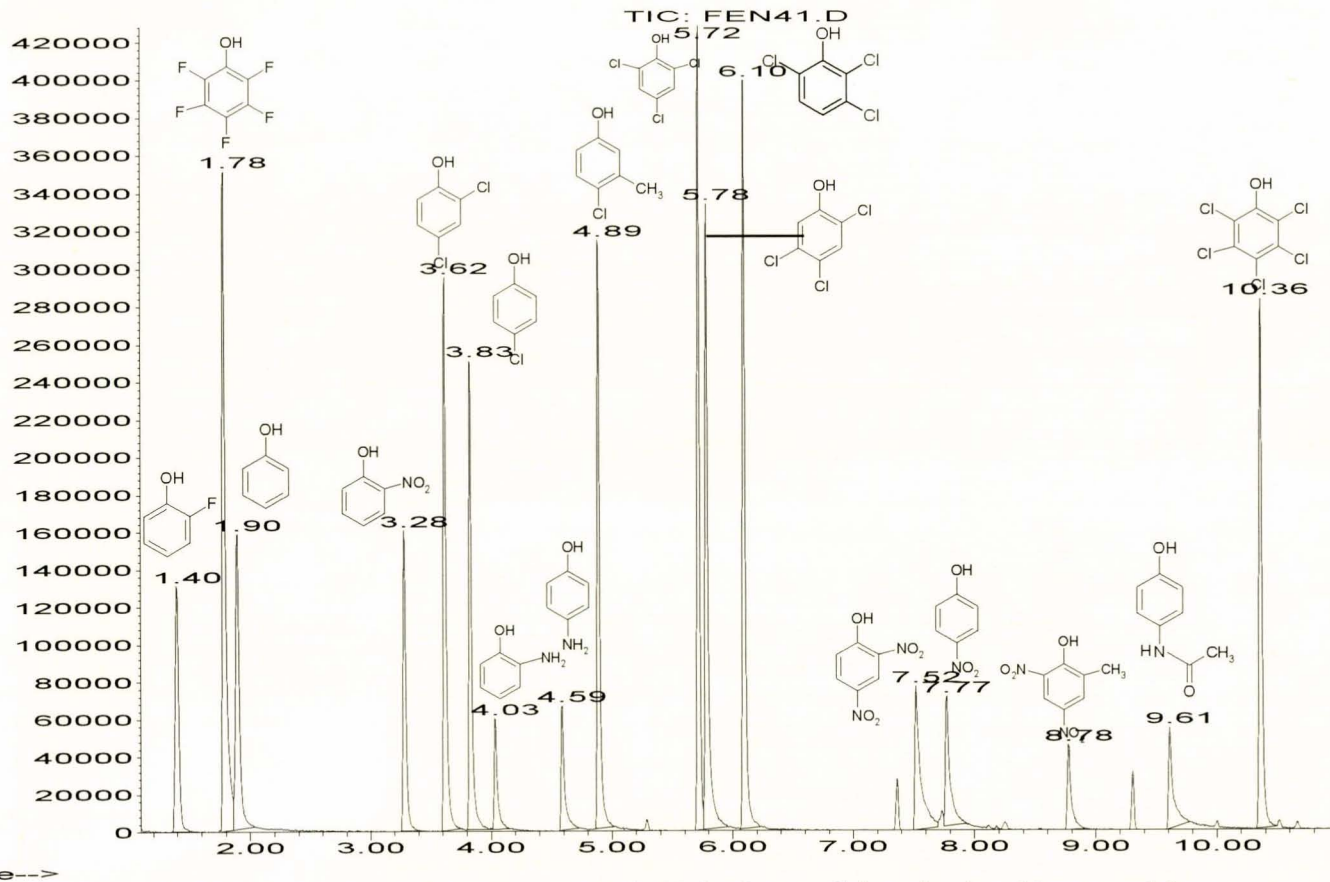


Figura A1-5 Cromatograma de la separación de 17 fenoles por Split pulsado a 20 psi por 1.0 min.

Abundance

TIC: FEN43.D

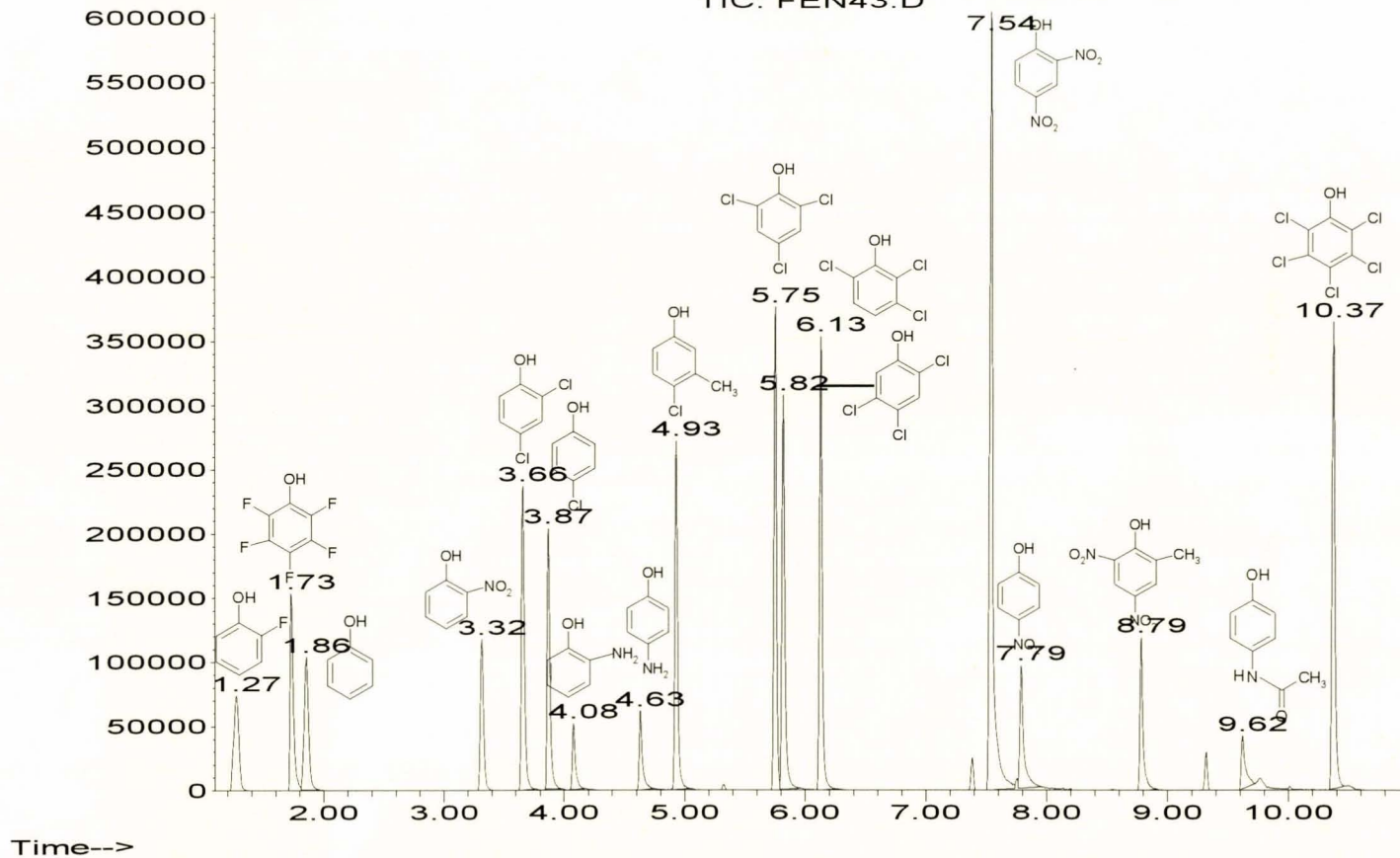
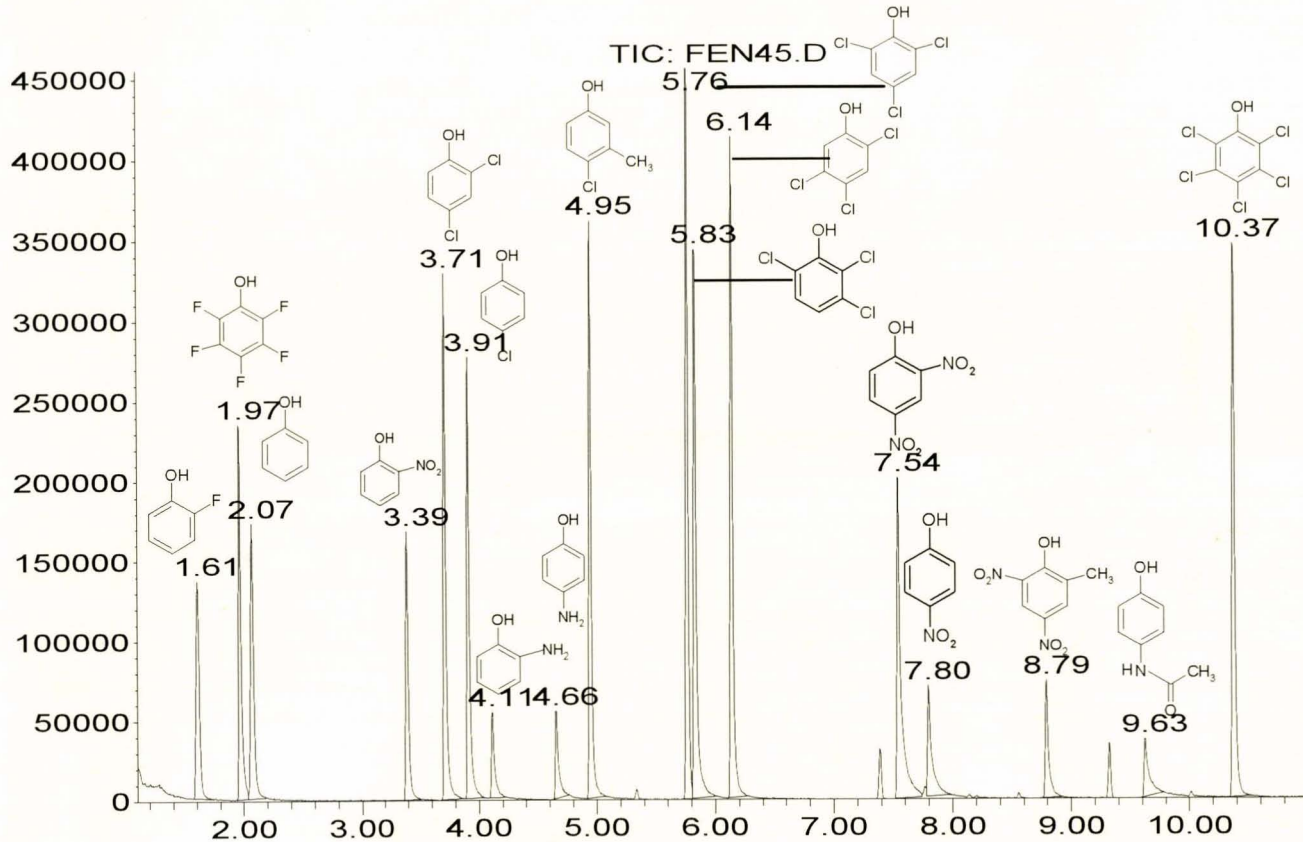


Figura A1-6 Cromatograma de la separación de 17 fenoles por Split pulsado a 40 psi por 0.5 min.

Abundance

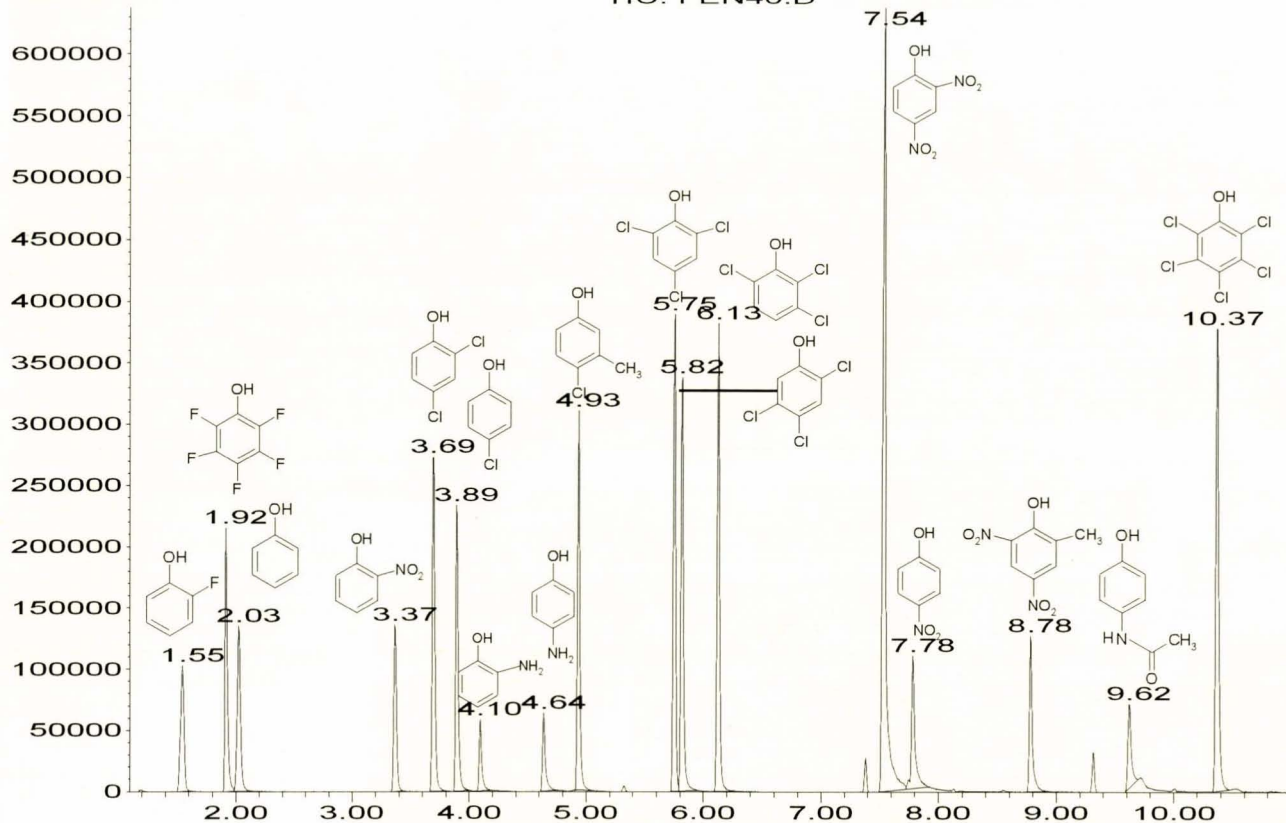


Time-->

Figura A1-7 Cromatograma de la separación de 17 fenoles por Split pulsado a 20 psi por 0.5 min.

Abundance

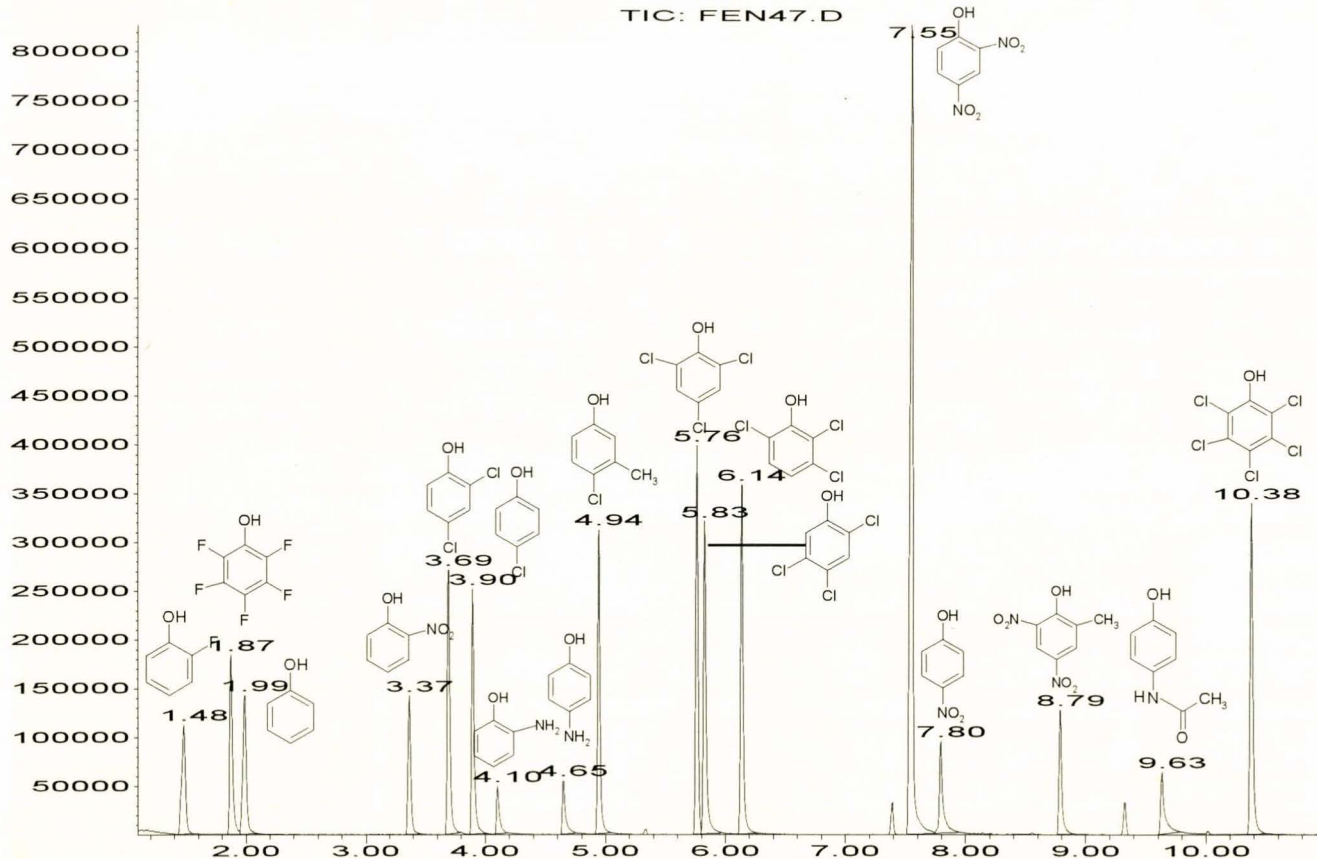
TIC: FEN46.D



Time-->

Figura A1-8 Cromatograma de la separación de 17 fenoles por Split pulsado a 25 psi por 0.5 min.

Abundance



Time-->

Figura A1-9 Cromatograma obtenido por Split pulsado a 30 psi por 0.5 min para la separación de fenoles.

Abundance

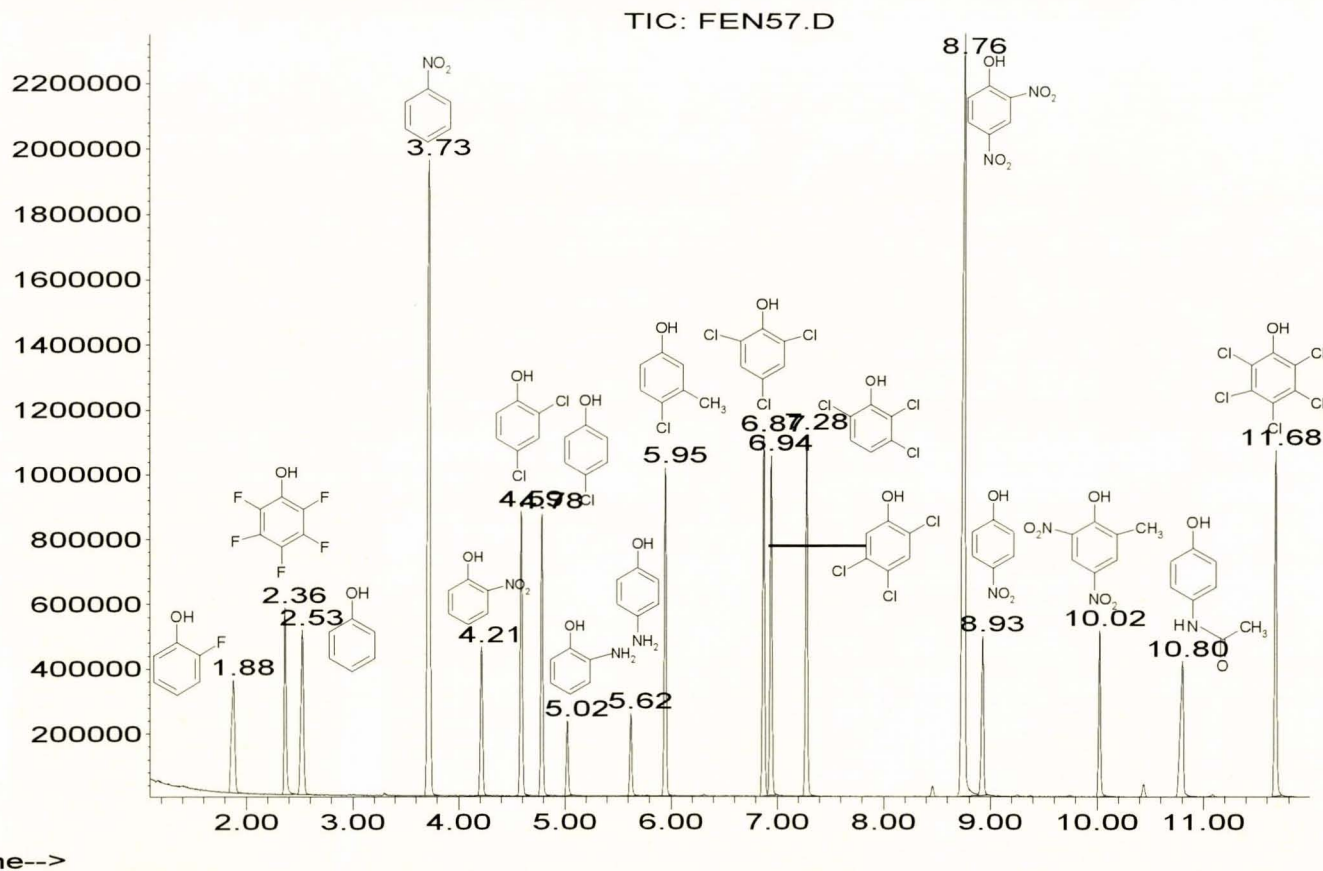
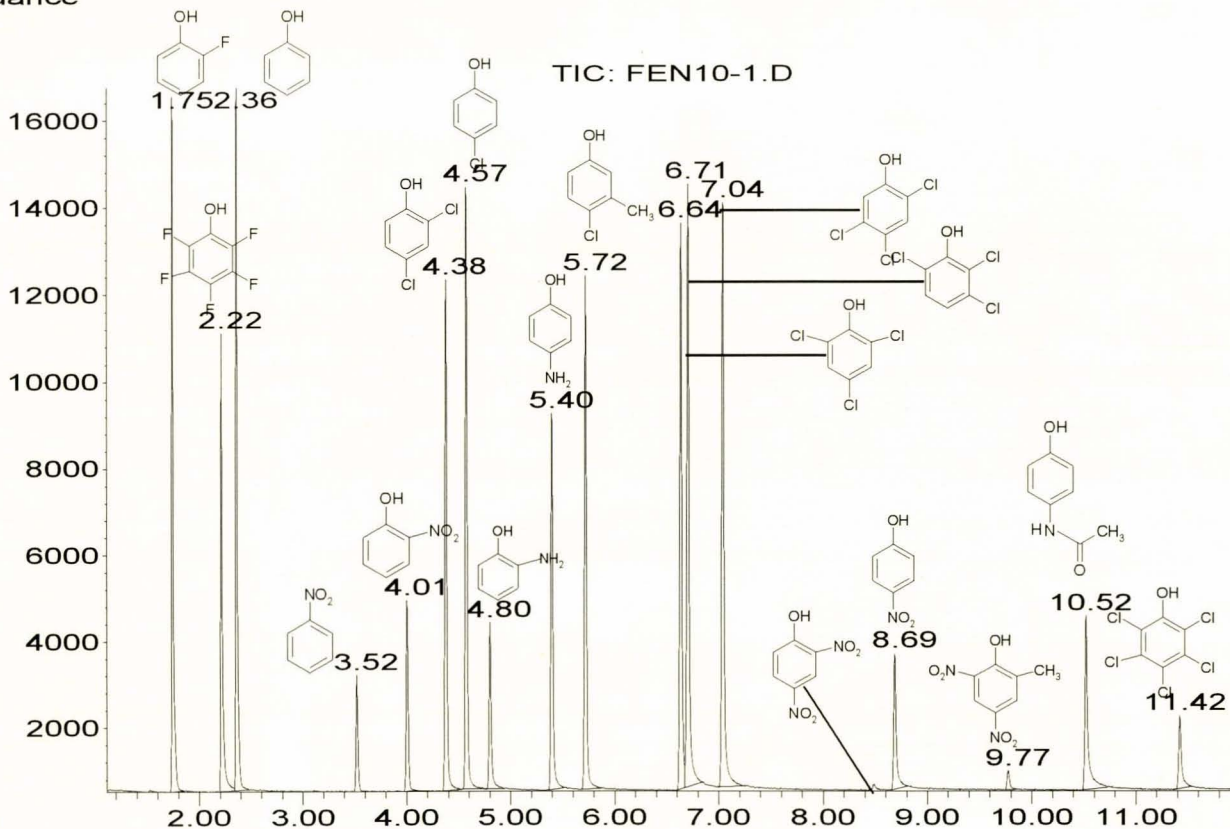


Figura A1-10 Cromatograma obtenido por CG/EM modo SCAN para la separación de fenoles (100 ppm).

Abundance

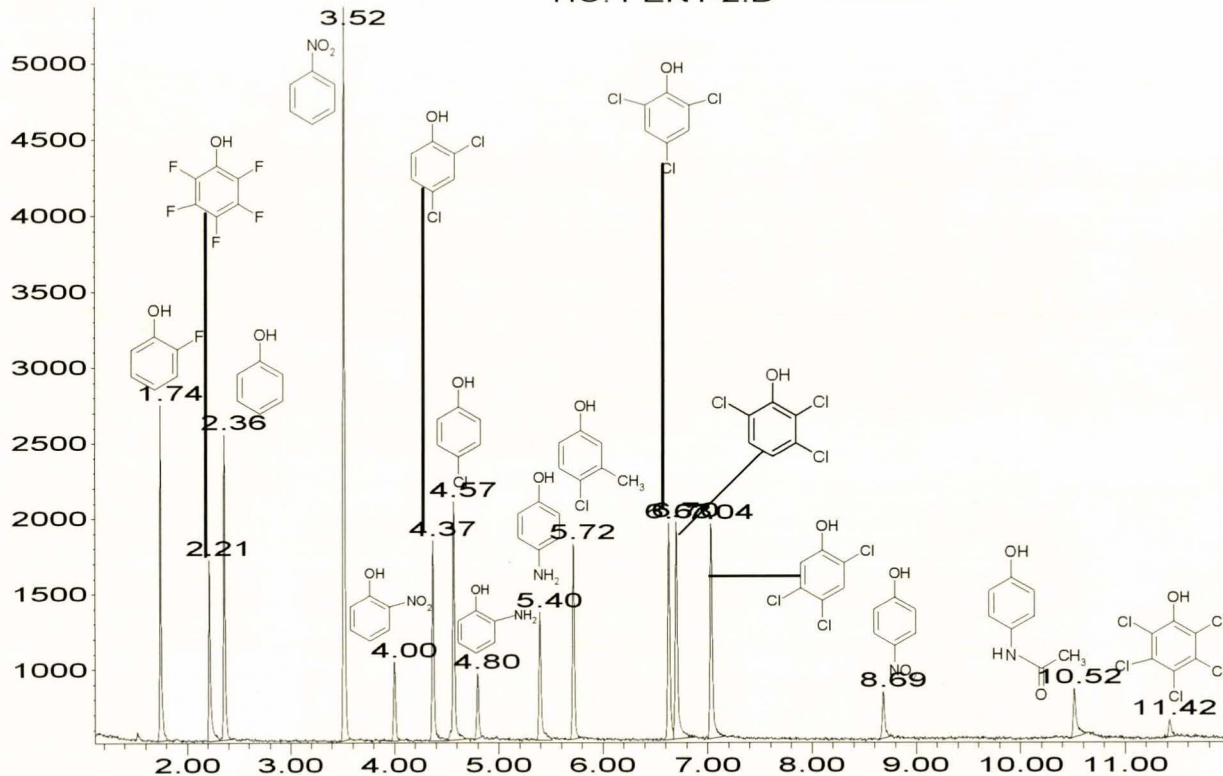


Time-->

Figura A1-11 Cromatograma obtenido por CG/EM modo SIM para una disolución de fenoles de concentración aproximada de 10 ppm.

Abundance

TIC: FEN1-2.D



Time-->

Figura A1-12 Cromatograma obtenido por CG/EM modo SIM para una disolución de fenoles de concentración aproximada de 1 ppm.

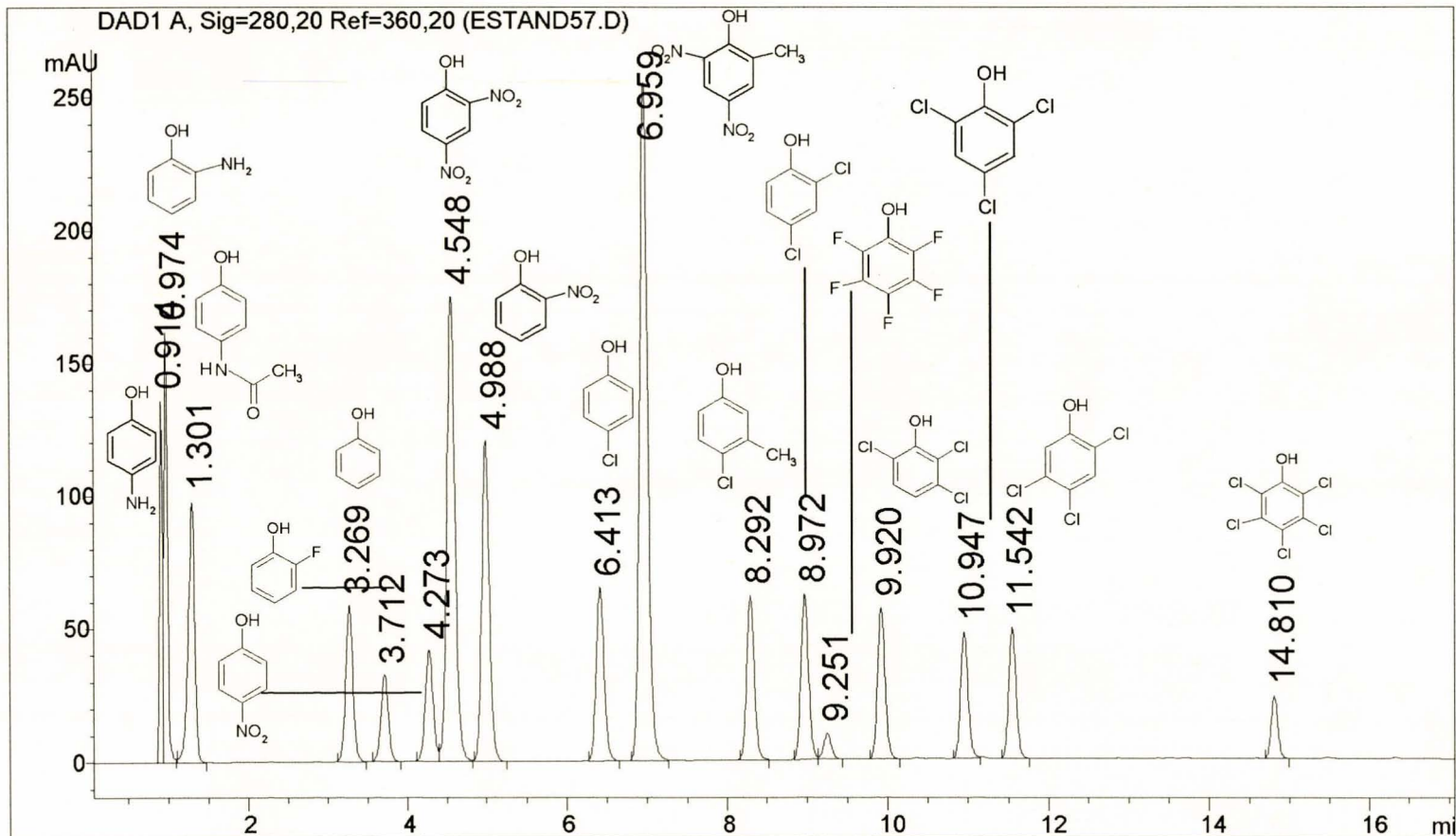


Figura A1-13 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Zorbax eclipse XDB C-8.

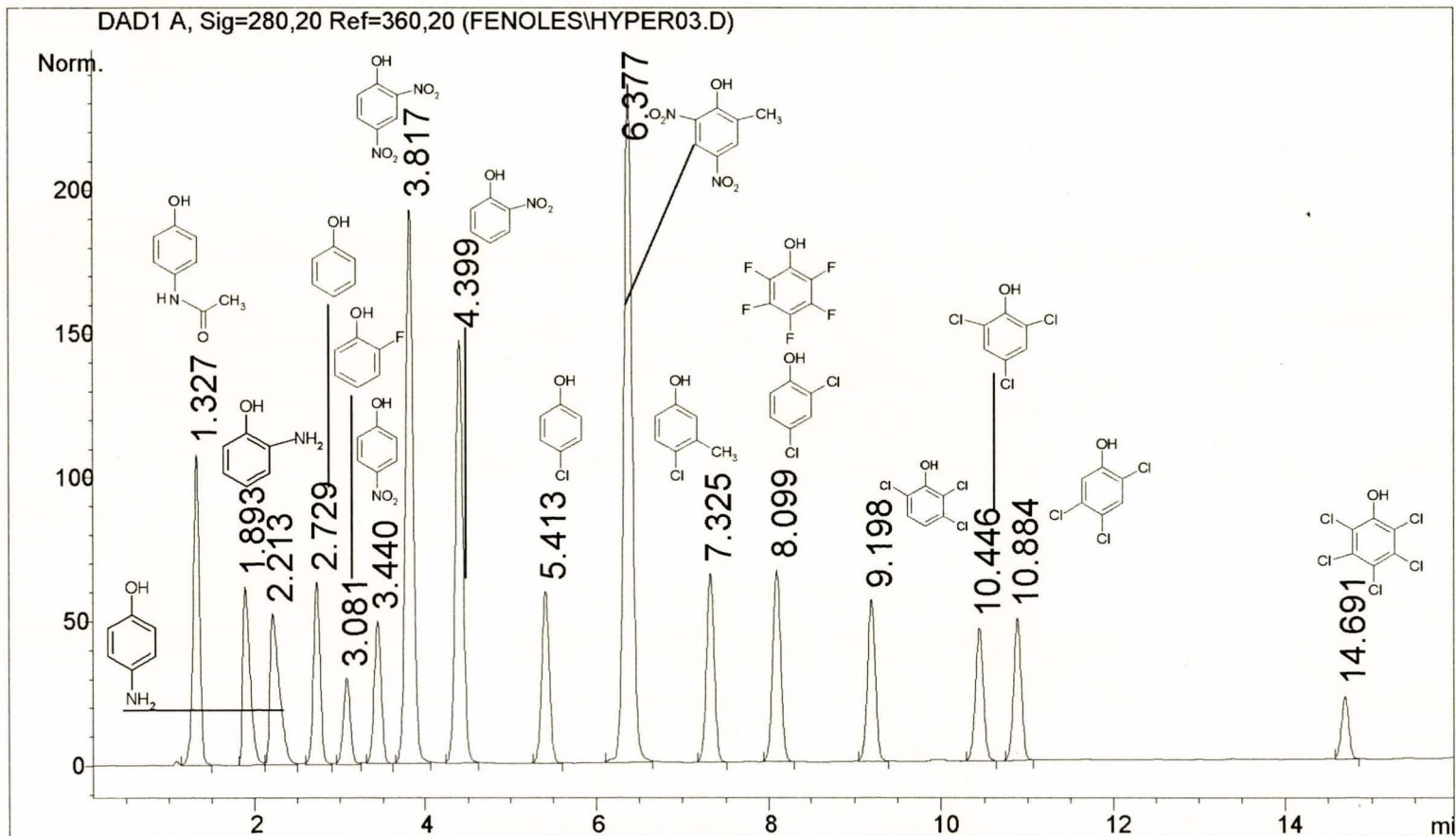


Figura A1-14 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Hypersil BDS C-18.

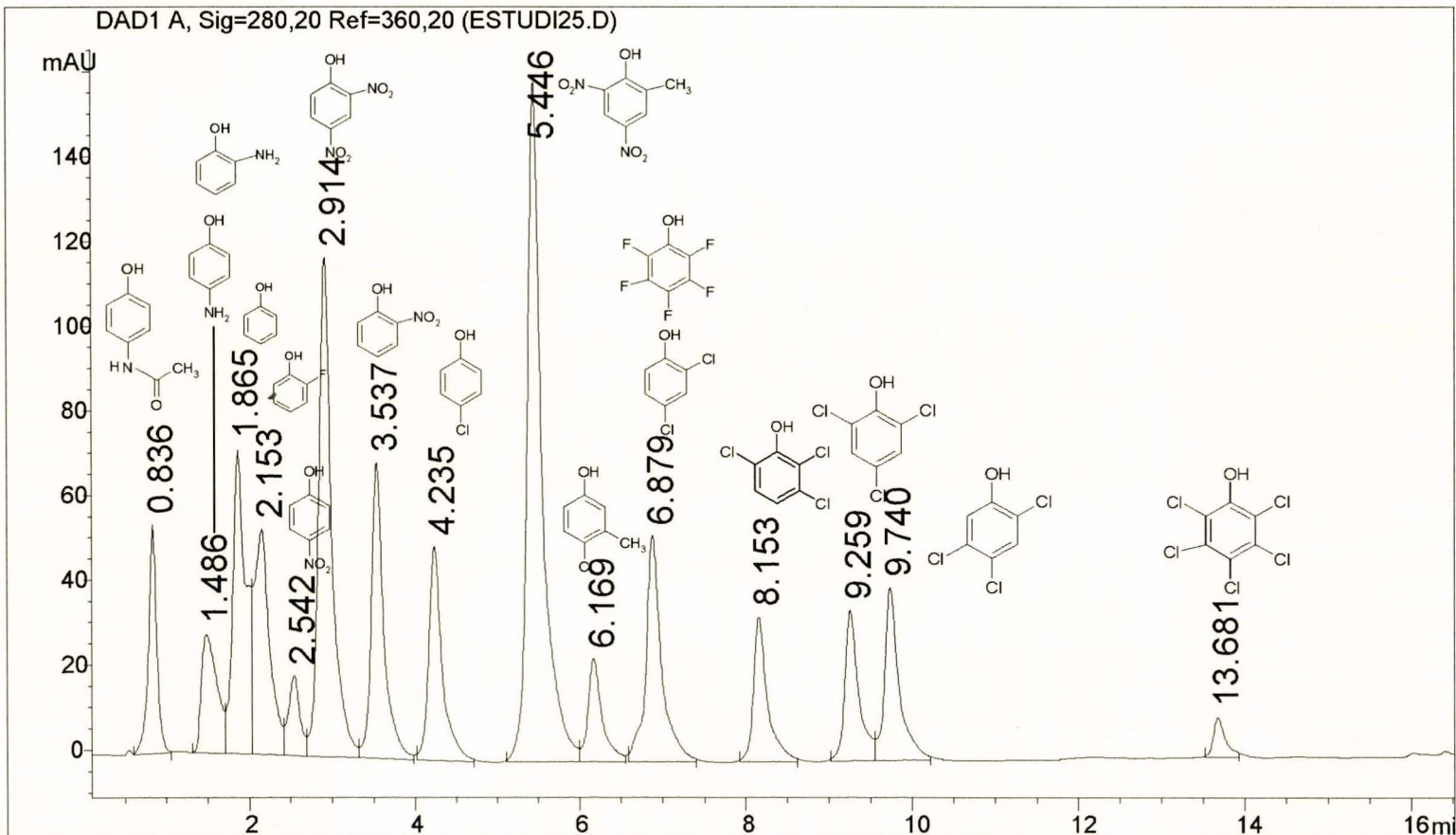


Figura A1-15 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Waters Novapack C-18.

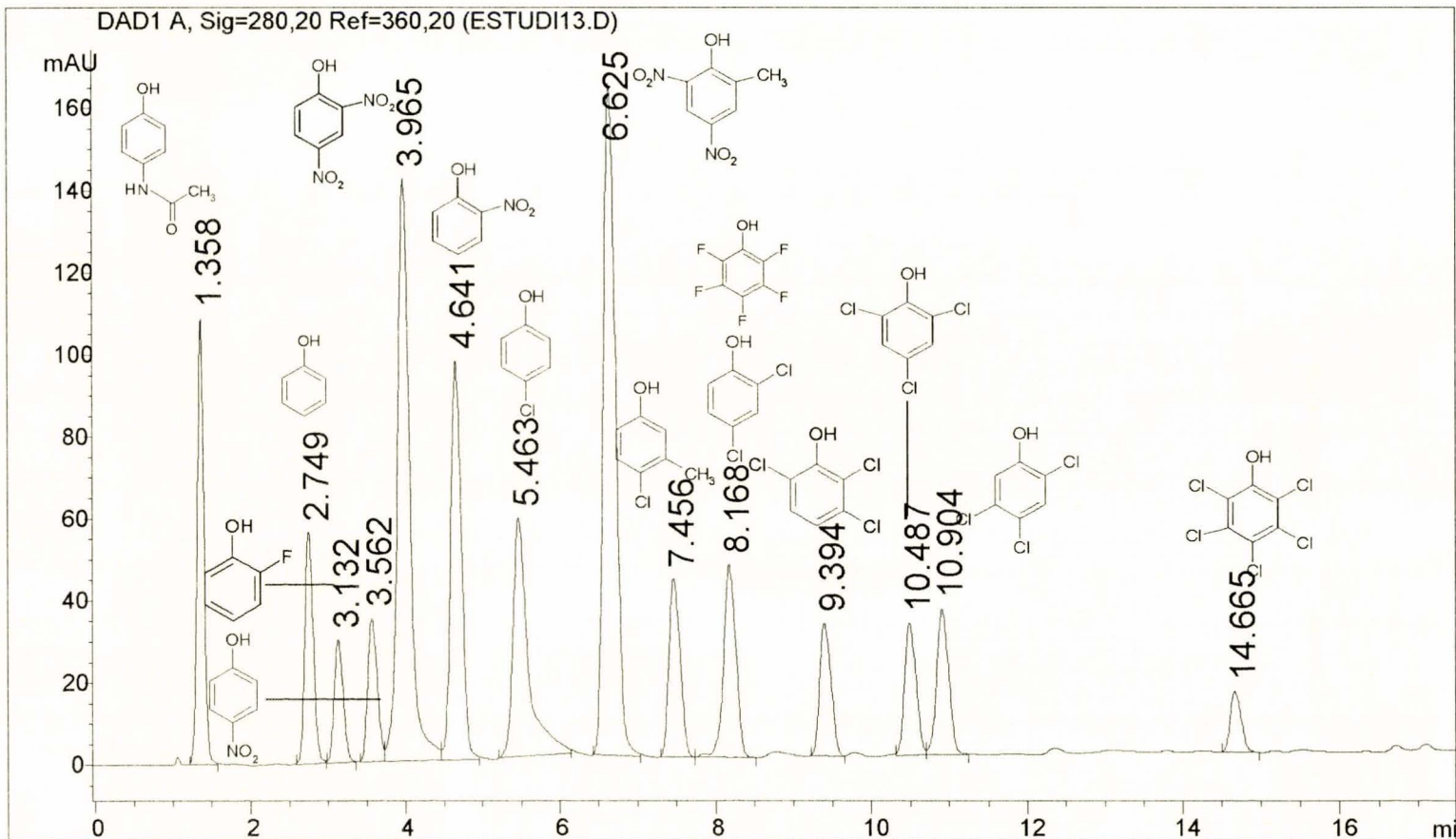


Figura A1-17 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Phenomenex IB-SIL 5 C-18.

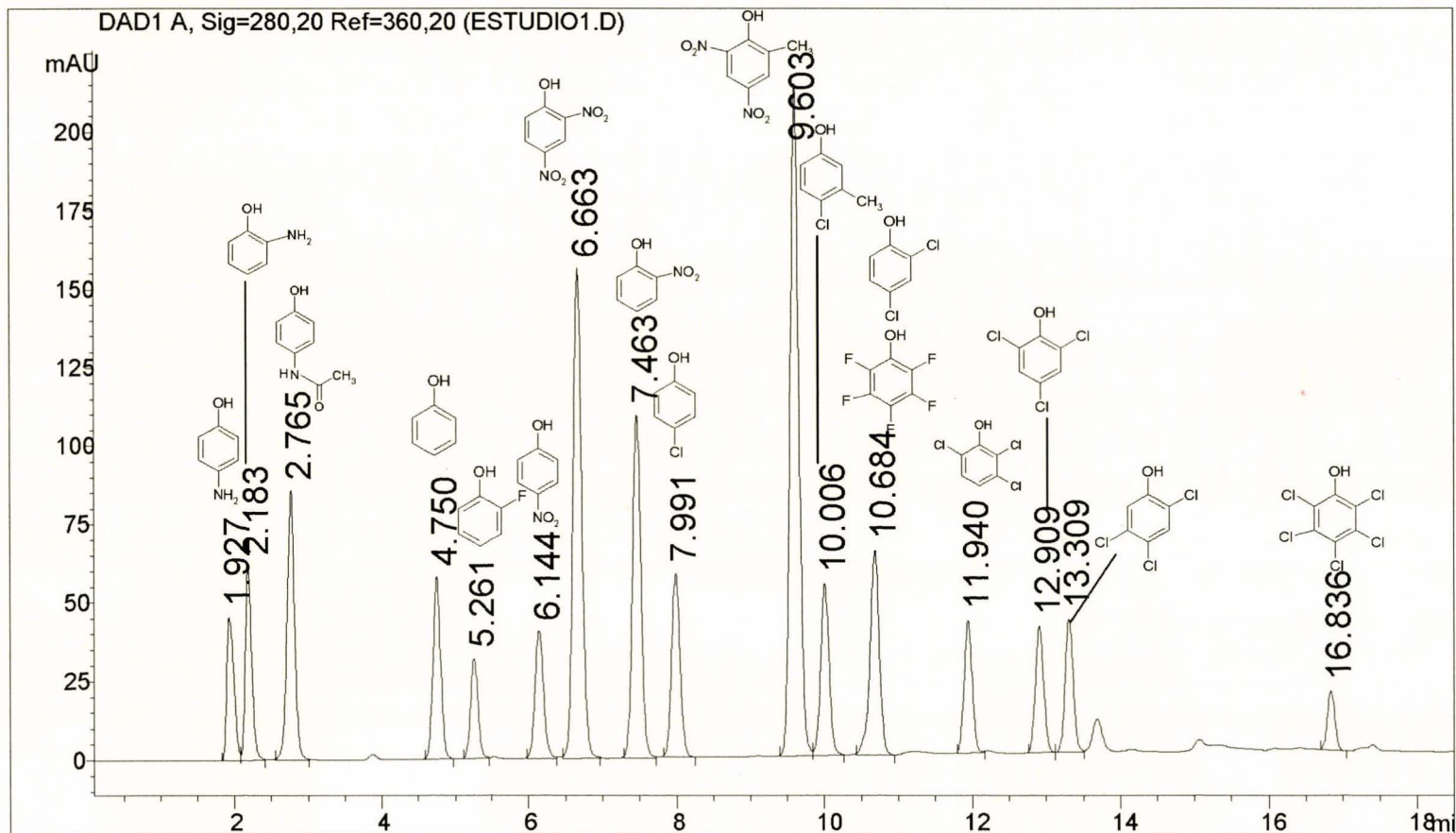


Figura A1-18 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Whatman Partisil 5ODS-3.

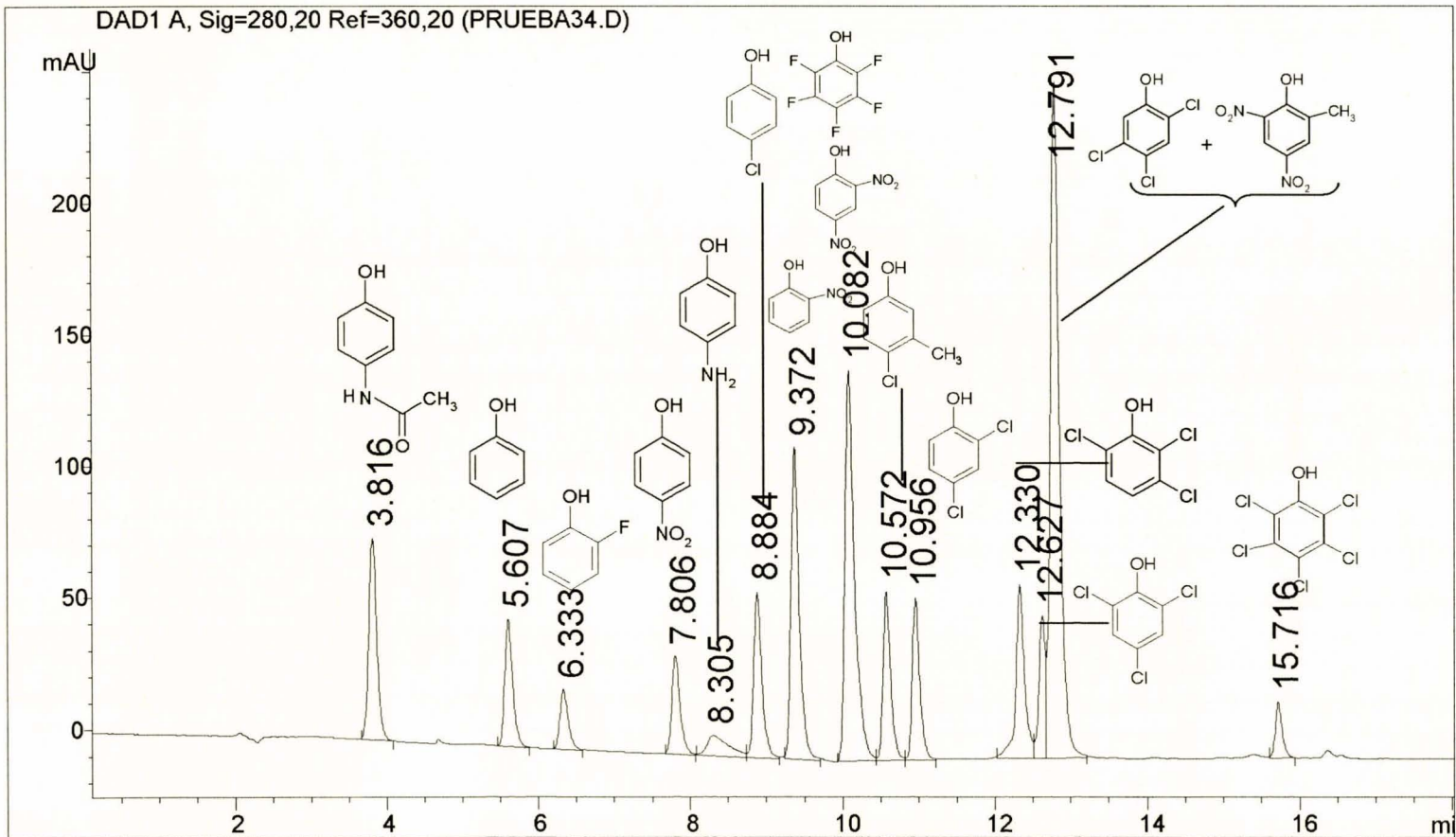


Figura A1-19 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Baker Phenyl.

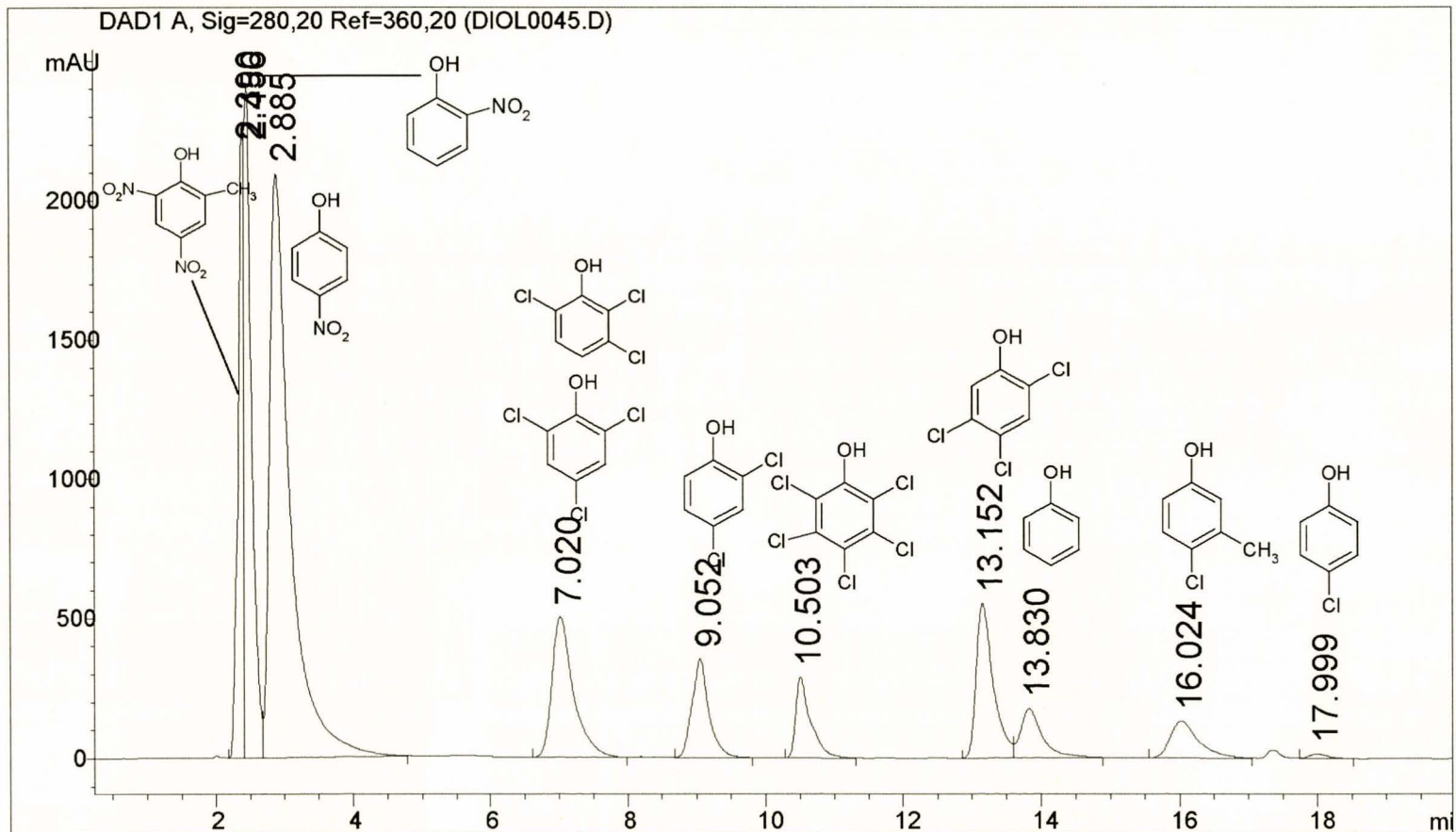


Figura A1-20 Cromatograma de la separación de fenoles por HPLC con la columna Lichrosorb DIOL.

APÉNDICE 2

ESPECTROS DE MASAS

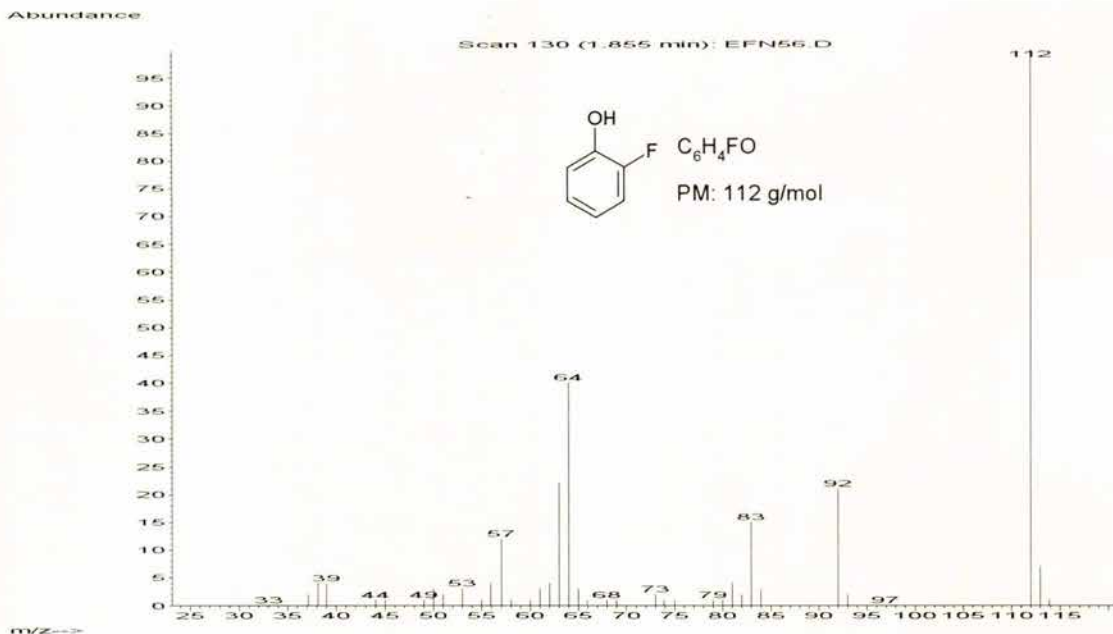


Figura A2-1. Espectro de masas del 2-fluorofenol.

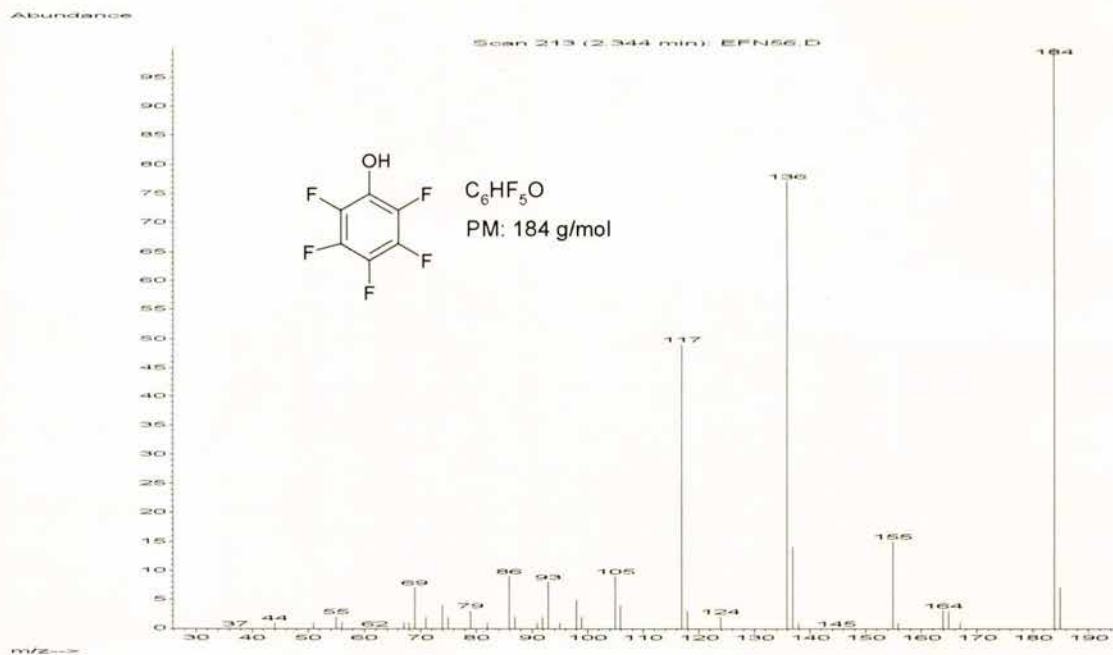


Figura A2-2. Espectro de masas del Pentafluorofenol.

Abundance

Scan 241 (2.510 min): EFN56.D

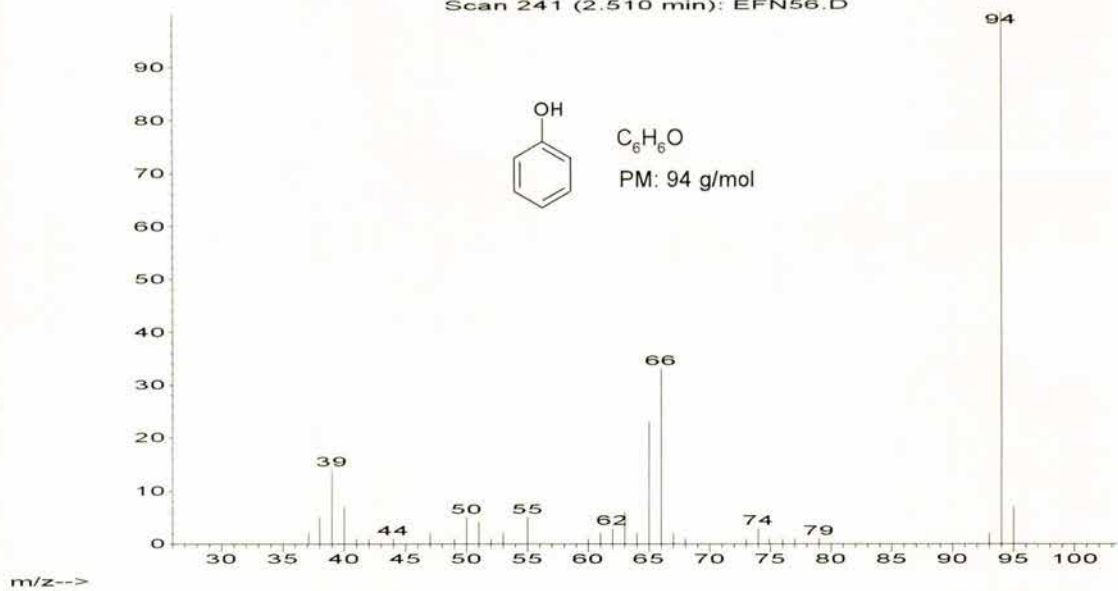


Figura A2-3. Espectro de masas del Fenol.

Abundance

Scan 444 (3.707 min): EFN56.D

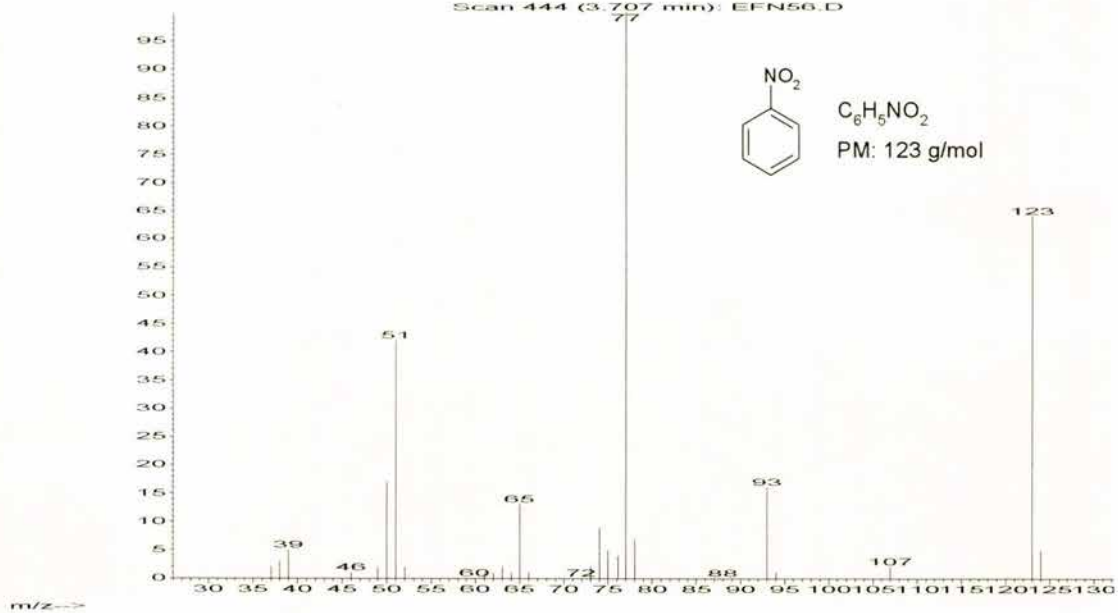


Figura A2-4. Espectro de masas del Nitrobenzeno.

Abundance

Scan 527 (4.196 min): EFN56.D

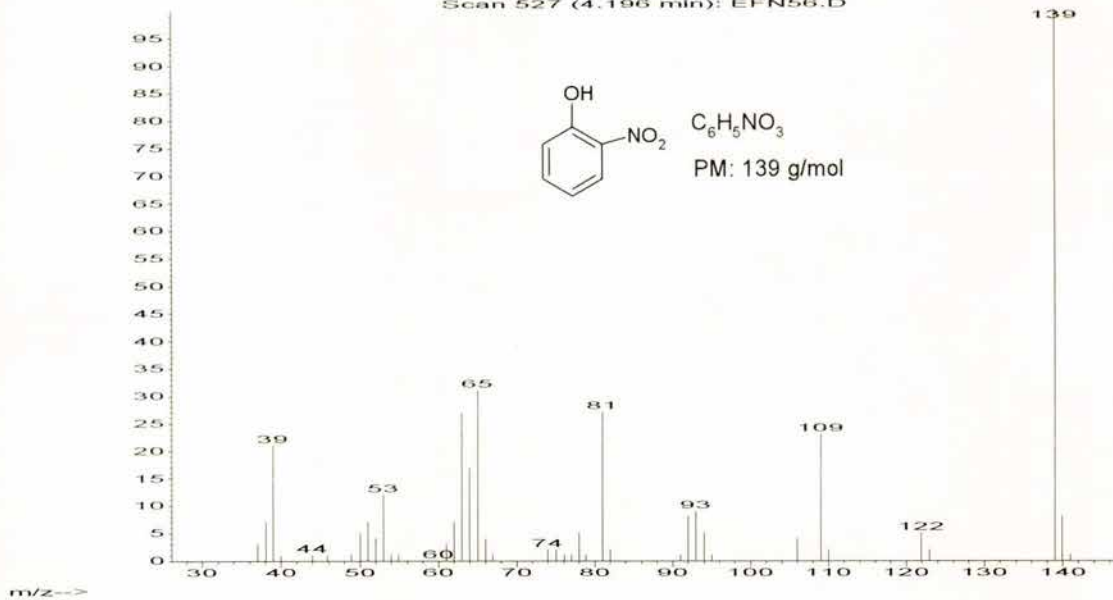


Figura A2-5. Espectro de masas del 2-nitrofenol.

Abundance

Scan 591 (4.573 min): EFN56.D

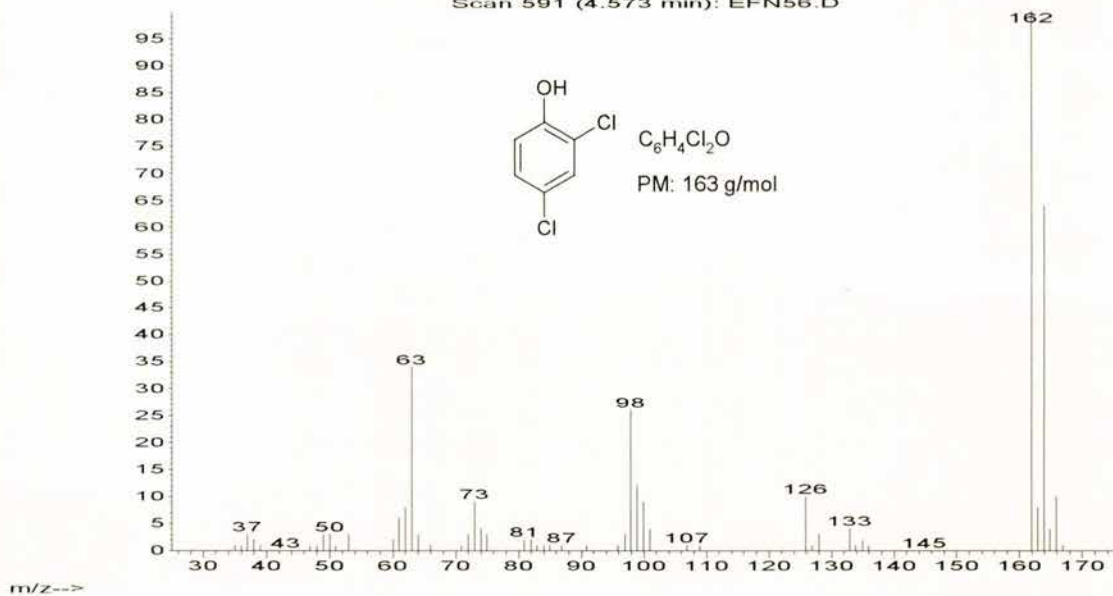


Figura A2-6. Espectro de masas del 2,4-diclorofenol.

Abundance

Scan 625 (4.774 min): EFN56.D

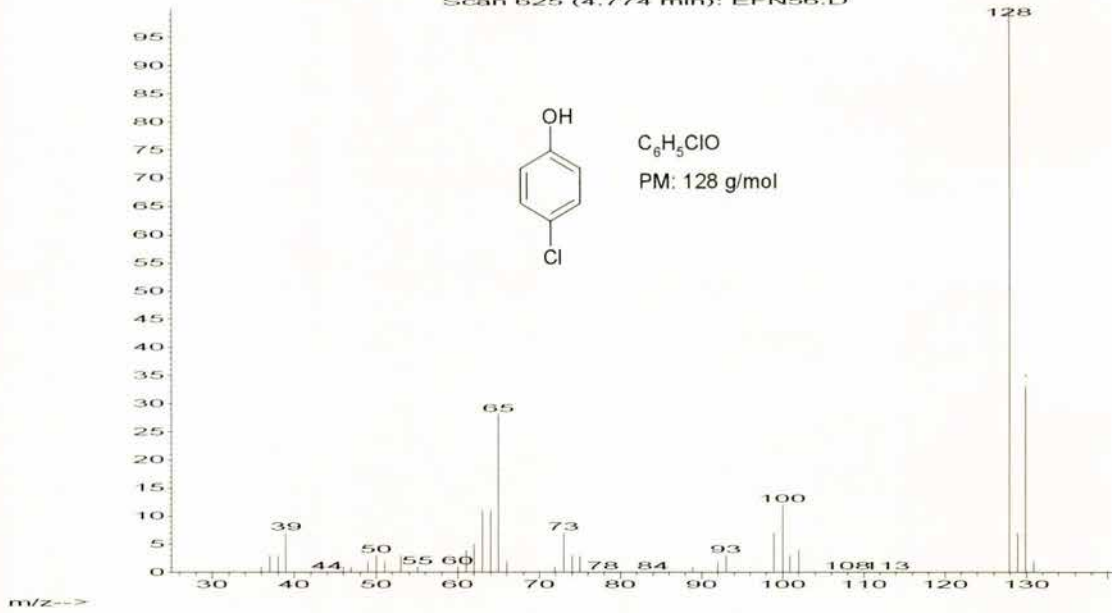


Figura A2-7. Espectro de masas del 4-clorofenol.

Abundance

Scan 666 (5.016 min): EFN56.D

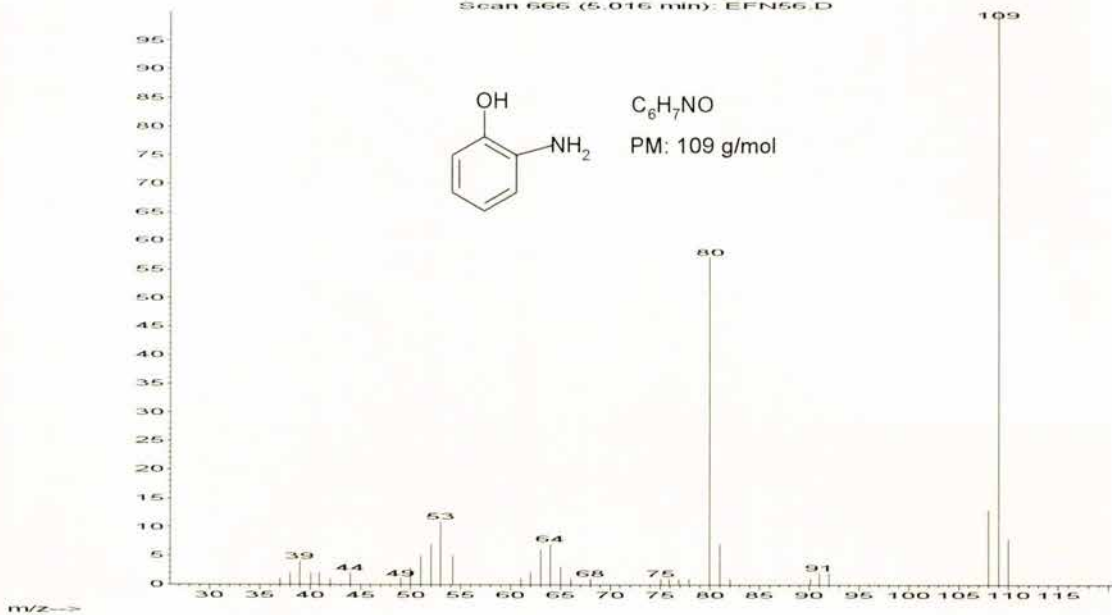


Figura A2-8. Espectro de masas del o-aminofenol

Abundance

Scan 768 (5.617 min): EFN56.D

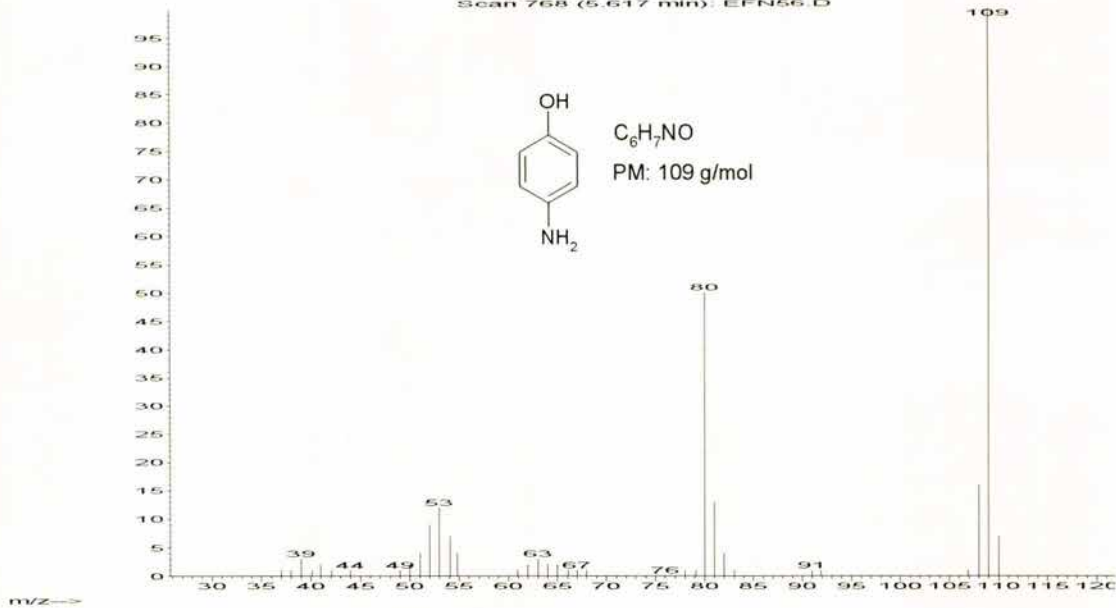


Figura A2-9. Espectro de masas del p-aminofenol

Abundance

Scan 822 (5.936 min): EFN56.D

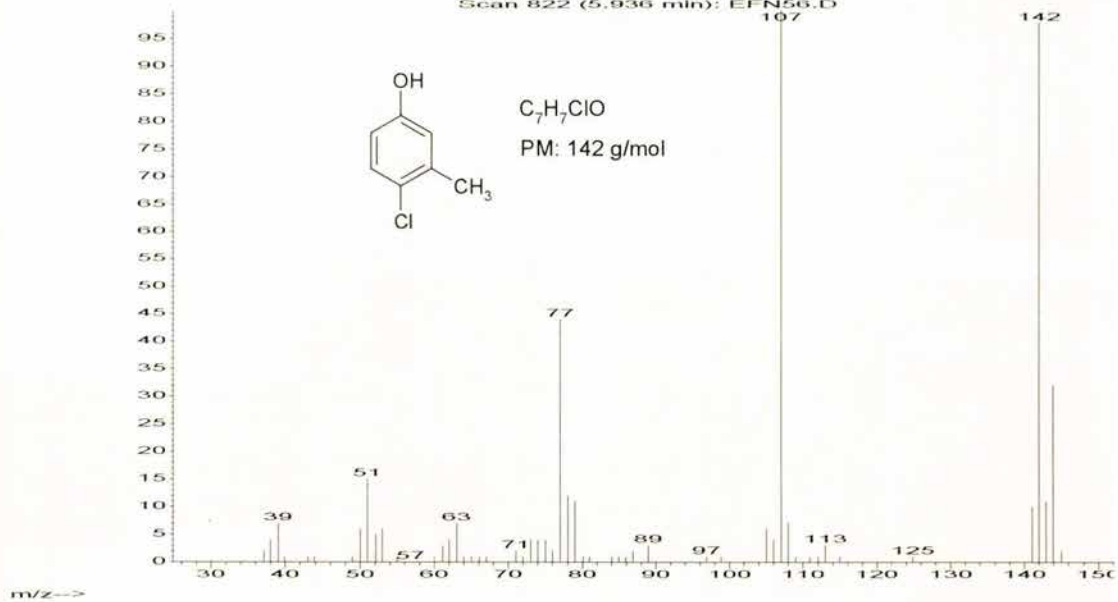
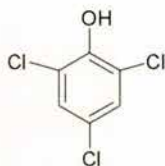


Figura A2-10. Espectro de masas del 4-cloro-3-metilfenol.

Abundance

Scan 979 (6.861 min): EFN56.D



$C_6H_3Cl_3O$

PM: 197 g/mol

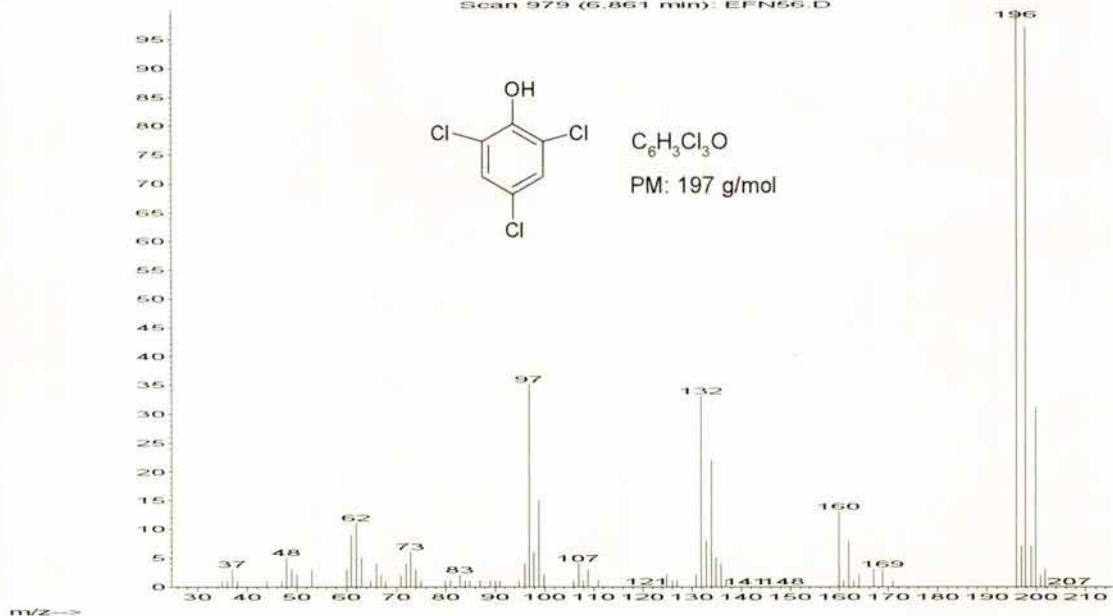
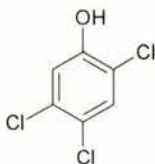


Figura A2-11. Espectro de masas del 2,4,6-triclorofenol.

Abundance

Scan 991 (6.932 min): EFN56.D



$C_6H_3Cl_3O$

PM: 197 g/mol

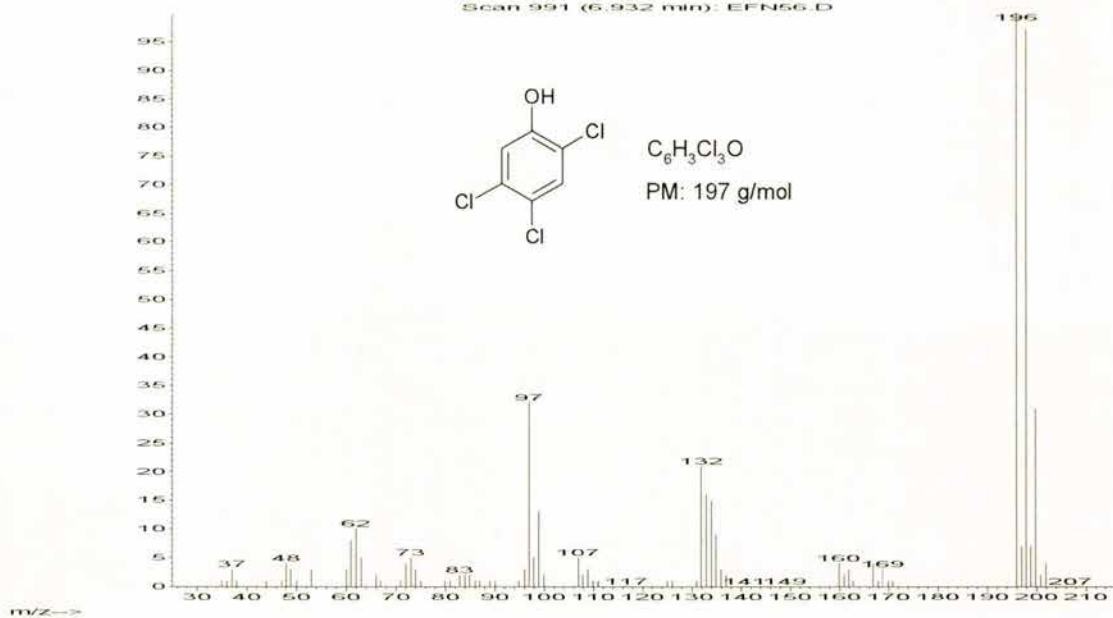


Figura A2-12. Espectro de masas del 2,4,5-triclorofenol.

Abundance

Scan 1048 (7.268 min): EFN56.D

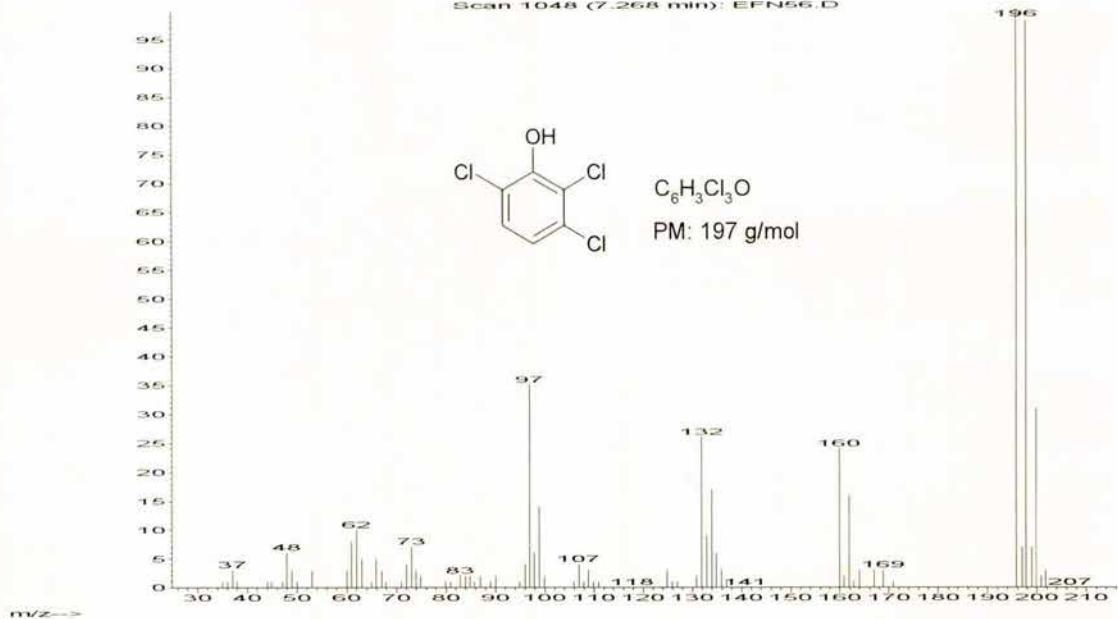


Figura A2-13. Espectro de masas del 2,3,6-triclorofenol.

Abundance

Scan 1298 (8.742 min): EFN56.D

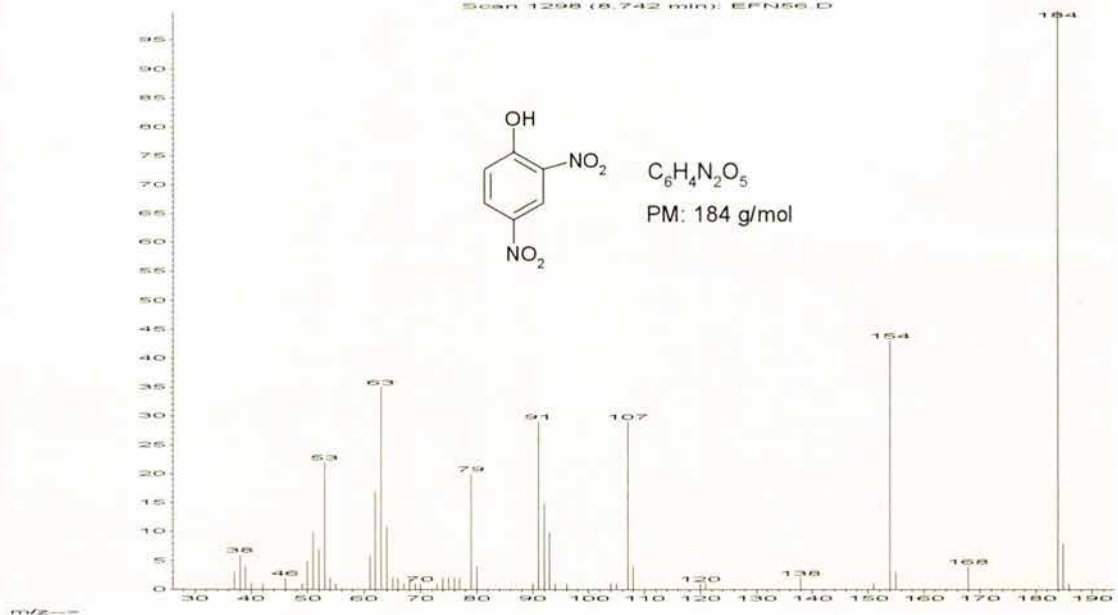


Figura A2-14. Espectro de masas del 2,4-dinitrofenol.

Abundance

Scan 1329 (8.925 min): EFN56.D

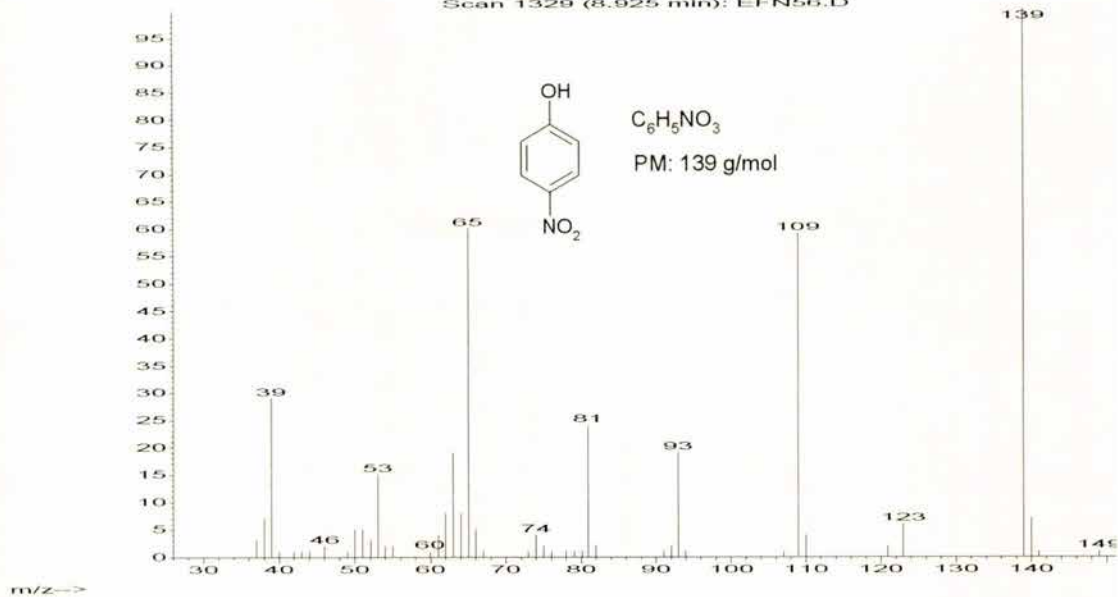


Figura A2-15. Espectro de masas del 4-nitrofenol.

Abundance

Scan 1514 (10.015 min): EFN56.D

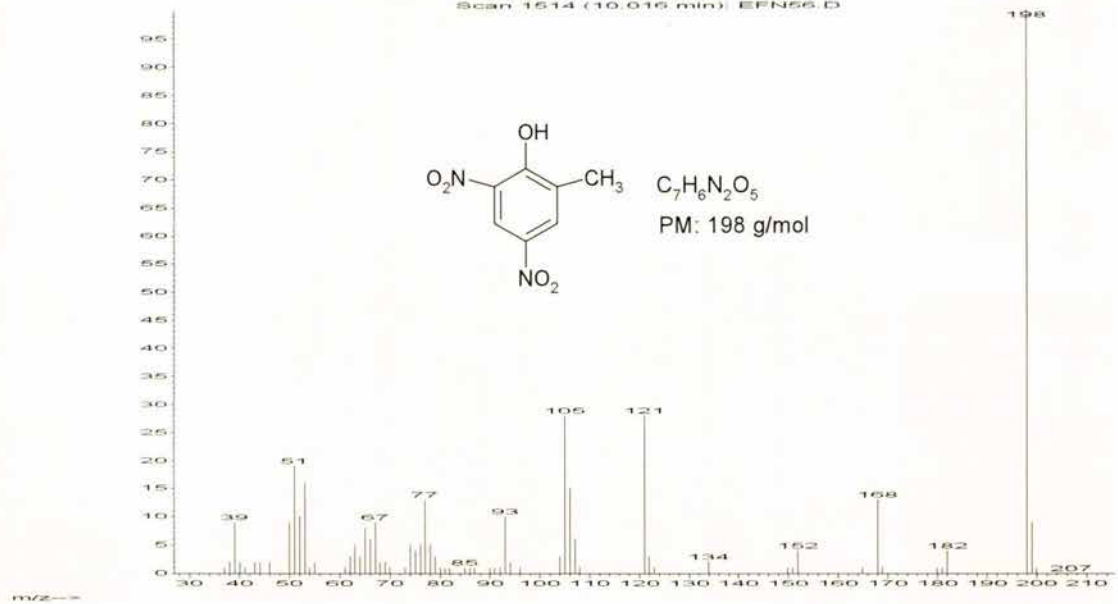


Figura A2-16. Espectro de masas del 4,6-dinitro-o-cresol.

Abundance

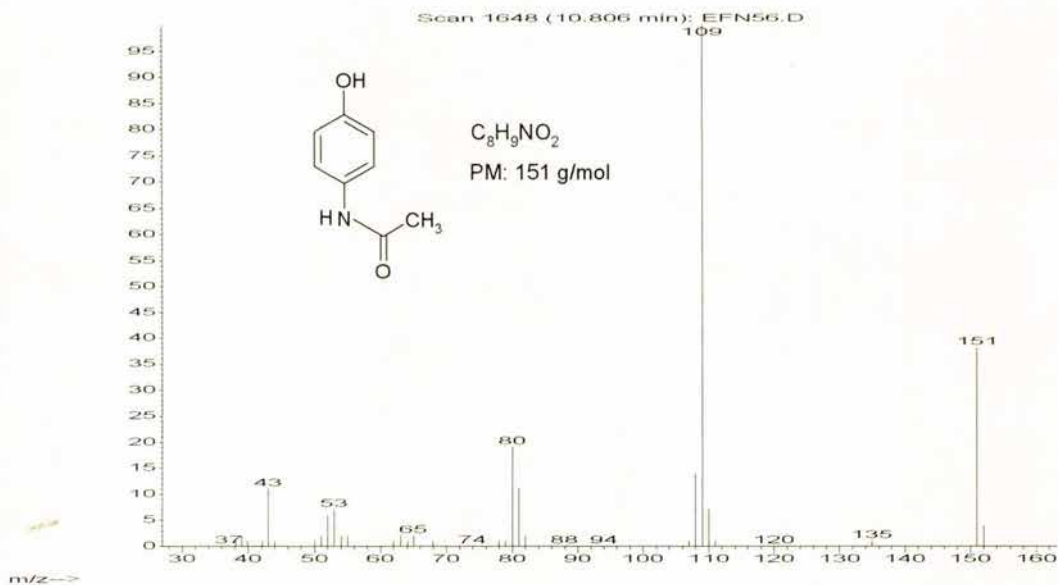


Figura A2-17. Espectro de masas del 4-acetil-aminofenol.

Abundance

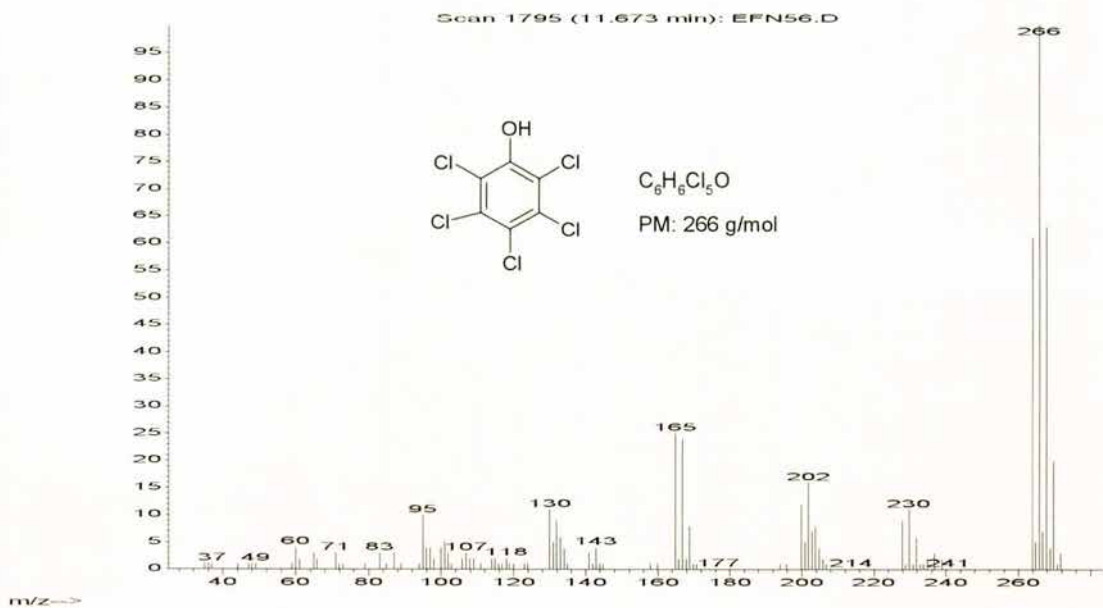
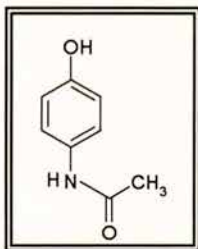


Figura A2-18. Espectro de masas del Pentaclorofenol.

APÉNDICE 3

CARACTERÍSTICAS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

4-acetil-aminofenol



Sólido cristalino de color blanco

Sinónimos: acetaminofen; *N*-(4-hidroxifenil) acetamida; *p*-acetaminilida; *p*-acetamidofenol; Paracetamol; Acamol; Panadol; Valadol.

Fórmula mínima: C₈H₉NO₂

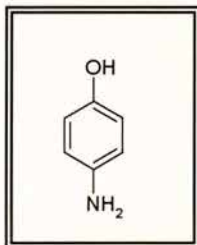
Peso molecular: 151.16 g/mol

Punto de fusión: 169-170.5°C

pK: -0.37

Solubilidad: Poco soluble en agua. Soluble en metanol, etanol, dimetilformamida, acetona, acetato de etilo, ligeramente soluble en éter, prácticamente insoluble en éter de petróleo, pentano y benceno.

4-aminofenol



Sólido cristalino de color blanco.

Sinónimos: *p*-hidroxianilina; 4-amino-1-hidroxibenceno; Azol; Rodinal; Ursol P.

Fórmula mínima: C₆H₇NO

Peso molecular: 109.13 g/mol

Punto de fusión: 186°C

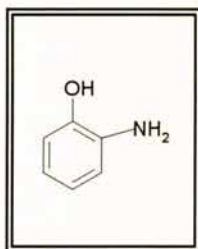
Punto de ebullición: 284°C (con descomposición)

pK1: 8.5

pK2: 10.3

Solubilidad: Soluble en agua (0.39% a 13°C), étil-metil-cetona (9.3% a 58.5°) y etanol. Prácticamente insoluble en benceno y cloroformo.

2-aminofenol



Sólido cristalino de color café

Sinónimos: o-aminofenol; 2-amino-1-hidroxibenceno; 2-hidroxianilina.

Fórmula mínima: C₆H₇NO

Peso molecular: 109.13 g/mol

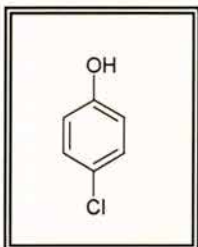
Punto de fusión: 170-174°C

pK1: 9.28

pK2: 9.72

Solubilidad: Soluble en agua (1g/50ml) y alcohol (1g/23ml). Muy soluble en éter. Ligeramente soluble en benceno.

4-clorofenol



Sólido cristalino incoloro de olor característico y desagradable.

Fórmula mínima: C₆H₅ClO

Peso molecular: 128.56 g/mol

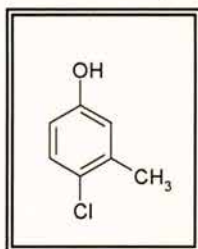
Punto de fusión: 43.2-43.7°C

Punto de ebullición: 220°C

pK: 9.43

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, muy soluble en alcohol, glicerina, éter y cloroformo.

4-cloro-3-metilfenol



Sólido de color blanco, inoloro cuando se encuentra puro, pero usualmente tiene olor a fenol.

Sinónimos: 4-cloro-*m*-cresol; clorocresol; *p*-cloro-*m*-cresol; 6-cloro-*m*-cresol; 6-cloro-3-hidroxitolueno.

Fórmula mínima: C₇H₇ClO

Peso molecular: 142.59 g/mol

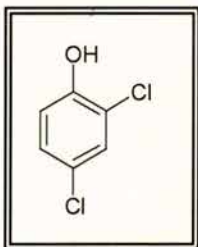
Punto de fusión: 66°C

Punto de ebullición: 235°C

pK: 9.55

Solubilidad: Soluble en agua (1g/260ml a 20°C), alcohol, benceno, cloroformo, éter. Acetona y éter de petróleo.

2,4-diclorofenol



Sólido cristalino blanco en forma de agujas de olor muy penetrante

Fórmula mínima: C₆H₄Cl₂O

Peso molecular: 163.0 g/mol

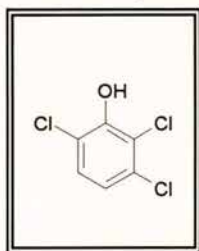
Punto de fusión: 45°C

Punto de ebullición: 209-211°C

pK: 7.85

Solubilidad: Poco soluble en agua. Soluble en metanol, etanol y tetracloruro de carbono.

2,3,6-triclorofenol



Fórmula mínima: $C_6H_3Cl_3O$

Peso molecular: 197.45 g/mol

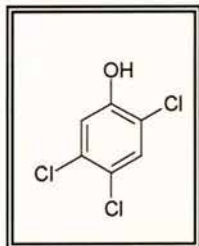
Punto de fusión: 55-57°C

Punto de ebullición: 197.5°C

pK: 5.8

Solubilidad: muy soluble en etanol, benceno y éter etílico.

2,4,5-triclorofenol



Sinónimo: Colunosol.

Fórmula mínima: $C_6H_3Cl_3O$

Peso molecular: 197.45 g/mol

Punto de fusión: 67°C

Punto de ebullición: 248°C

pK: 7.37

Solubilidad:

Acetona (615g/100g de disolvente a 25°C)

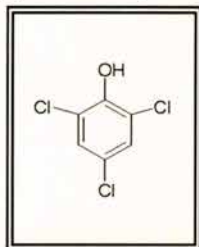
Benceno (163g/100g de disolvente a 25°C)

Tetracloruro de carbono (51g/100g de disolvente a 25°C)

Éter (525g/100g de disolvente a 25°C)

Agua (<0.2g/100g de disolvente a 25°C)

2,4,6-triclorofenol



Sólido cristalino blanco en forma de agujas de olor penetrante

Fórmula mínima: $C_6H_3Cl_3O$

Peso molecular: 197.45 g/mol

Punto de fusión: 69°C

Punto de ebullición: 246°C

pK: 5.99

Solubilidad:

Acetona (525g/g de disolvente)

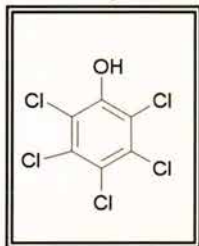
Benceno (113g/g de disolvente)

Tetracloruro de carbono (37g/g de disolvente)

Metanol (525g/g de disolvente)

Agua (< 0.1g/g de disolvente)

Pentaclorofenol



Sólido cristalino blanco en forma de agujas de olor muy penetrante

Sinónimos: penclorol; santofen 20; PCP

Fórmula mínima: C_6HCl_5O

Peso molecular: 266.34 g/mol

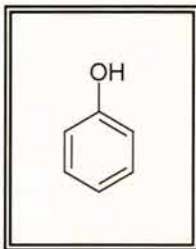
Punto de fusión: 190-191°C

Punto de ebullición: ~309-310°C

pK: 4.74

Solubilidad: Casi insoluble en agua (8mg/100ml). Soluble en alcohol, éter y benceno.

Fenol



Sólido cristalino incoloro, de olor picante y nauseabundo.

Sinónimos: ácido carbólico; ácido fenílico; hidróxido de fenilo; hidroxibenceno; oxibenceno.

Fórmula mínima: C₆H₆O

Peso molecular: 94.11 g/mol

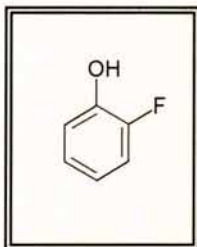
Punto de fusión: 40.85°C

Punto de ebullición: 182°C

pK: 9.99

Solubilidad: Agua (1g/15ml), Benceno (1g/12ml). Muy soluble en alcohol cloroformo, éter, glicerol y disulfuro de carbono. Insoluble en éter de petróleo.

2-fluorofenol



Líquido incoloro de olor picante.

Fórmula mínima: C₆H₄FO

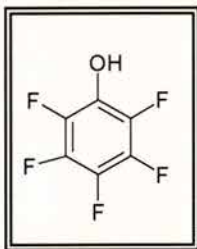
Peso molecular: 112.10 g/mol

Punto de fusión: 16.1°C

Punto de ebullición: 171°C

pK: 8.73

Pentafluorofenol



Sólido incoloro de olor picante.

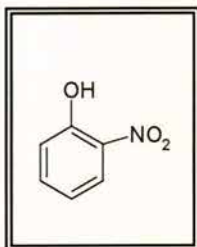
Fórmula mínima: C_6HF_5O

Peso molecular: 184.06 g/mol

Punto de fusión: 34-36°C

Punto de ebullición: 143°C

2-nitrofenol



Sólido cristalino en forma de agujas de color amarillo y de olor aromático peculiar.

Fórmula mínima: $C_6H_5NO_3$

Peso molecular: 139.11 g/mol

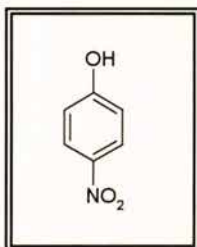
Punto de fusión: 44°C

Punto de ebullición: 214-216°C

pK: 7.22

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol, benceno, éter, y disulfuro de carbono.

4-nitrofenol



Sólido granular de color amarillo.

Fórmula mínima: C₆H₅NO₃

Peso molecular: 139.11 g/mol

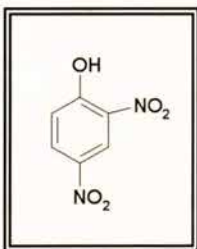
Punto de fusión: 113-115°C

Punto de ebullición: 279°C

pK: 7.15

Solubilidad: Ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol, benceno, éter, y disulfuro de carbono.

2,4-dinitrofenol



Sólido cristalino de color amarillo

Sinónimos: α-Dinitrofenol; Aldifen.

Fórmula mínima: C₆H₄N₂O₅

Peso molecular: 184.11 g/mol

Punto de fusión: 112-114°C

pK: 4.08

Solubilidad:

Agua (0.137g/g de disolvente a 54.5°C)

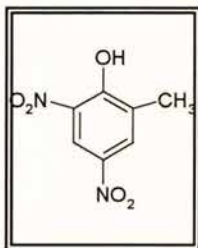
Acetato de etilo (15.55g/g de disolvente)

Acetona (35.9g/g de disolvente)

Cloroformo (5.39g/g de disolvente)

Piridina (20.08g/g de disolvente)

4,6-dinitro-o-cresol



Sólido de color amarillo

Sinónimos: 2-metil-4,6-dinitrofenol; Dinitrol; Elgetol, Ditrosol; Prokarbol.

Fórmula mínima: C₇H₆N₂O₅

Peso molecular: 198.13 g/mol

Punto de fusión: 83-85°C

Solubilidad: ligeramente soluble en agua. Muy soluble en etanol, metanol, acetona y éter etílico.

(40) Budavari, S., y cols., "The Merck Index" 30 edición, Merck & Co.,INC. Estados Unidos (2001).

(41) Dean, A.J., "Manual de Química", 13ª edición, McGraw Hill. México (1989).

(42) Lenga E. Robert, "The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data", 2a edición, volumen I y II. Estados Unidos. (1988).

Tabla A3-1. Toxicidad de algunos compuestos fenólicos.

<i>Compuesto</i>	<i>No. CAS</i> <i>1</i>	<i>DL₅₀² oral</i> <i>(mg/kg)</i>	<i>Sintomatología</i>
4-acetil-aminofenol	103-90-2	338	Tóxicos cuando se ingieren, se inhalan o se absorben a través de la piel. Causan irritación de ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio.
o-aminofenol	95-55-6	1300	
p-aminofenol	123-30-8	375	
p-clorofenol	106-48-9	6700	Causa irritación de ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio. La inhalación puede causar asma, formación de metahemoglobina y en algunos casos cianosis.
4-cloro-3-metilfenol	59-50-7	1830	Compuesto tóxico que puede provocar convulsiones, disnea y coma. Produce una fuerte irritación en los tejidos, mucosas, ojos, piel y tracto respiratorio. La inhalación puede provocar inflamación de laringe y bronquios, así como neumonitis y edema pulmonar. La exposición a este material provoca dolor de cabeza, náuseas y vómito.
2,4-diclorofenol	120-83-2	580	
2,3,4-triclorofenol	933-75-5	-----	Tóxicos cuando se inhalan, se ingieren o se absorben a través de la piel. Producen una fuerte irritación en los tejidos, mucosas, ojos, piel y tracto respiratorio. Dependiendo de la intensidad y la duración de la exposición, los efectos pueden ser desde irritación leve hasta destrucción severa de los tejidos o quemaduras.
2,4,6-triclorofenol	95-95-4	8200	
2,4,5-triclorofenol	88-06-2	8200	
Pentaclorofenol	87-86-5	146	Provocan coloración roja, edema en la piel, así como quemaduras severas. Provocan conjuntivitis, ritis y lesiones en la córnea, así como irritación en la nariz y faringe. Son posibles cancerígenos y agentes mutagénicos (excepto 2,4,6-triclorofenol el cual es un cancerígeno confirmado).
			Provoca dolor de cabeza, mareos, aumento en la transpiración, náusea, vómito, disnea, dolor de pecho, debilidad, fiebre y convulsiones, así como irritación en ojos, nariz y garganta. Es un posible cancerígeno, teratógeno y agente mutagénico.

Fenol	108-95-2	530	<p>Agente mutagénico en humanos, teratogénico³ experimental y posible cancerígeno.</p> <p>Dstrucción de muchas clases de fibras nerviosas. Provoca lesiones necróticas blancas en la boca, esófago y estómago así como dolor abdominal, vómito y diarrea sanguinolenta. Palidez, aumento en la transpiración, debilidad, dolor de cabeza, shock, pulso irregular y débil, respiraciones entrecortadas, cianosis, disminución de la temperatura corporal. Provoca edema pulmonar. Pérdida de conciencia y convulsiones, orina escasa y oscura, metahemoglobinemia e hiperbilirubinemia.</p>
2-fluorofenol	367-12-4	-----	<p>Tóxico cuando se inhala se ingiere o se absorbe a través de la piel. Produce una fuerte irritación en los tejidos, mucosas, ojos, piel y tracto respiratorio. Dependiendo de la intensidad y la duración de la exposición, los efectos pueden ser desde irritación leve hasta destrucción severa de los tejidos o quemaduras.</p>
per ttafluorofenol	771-61-9	322 (subcutánea)	<p>Envenenamiento por ingestión y por la ruta subcutánea. Moderadamente tóxico por contacto con la piel.</p>
c-nitrofenol	88-75-5	1297	<p>Altamente tóxicos cuando se ingieren, se inhalan o se absorben a través de la piel. Causan irritación de ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio.</p> <p>La absorción dentro del cuerpo lleva a la formación de metahemoglobina y en algunos casos causa cianosis.</p>
p-nitrofenol	100-02-7	467	
2,4-dinitrofenol	51-28-5	30	<p>Agente mutagénico y fitotóxico</p> <p>Provoca fatiga, sed y transpiración intensas, ruborización de la cara, formación de cataratas y erupciones cutáneas. Provoca náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea. Causa intranquilidad, ansiedad, excitación y convulsiones. Aumento de la temperatura corporal que puede provocar hiperpirexia grave. Taquicardia, disnea, cianosis, orina escasa, hepatitis tóxica y dolores</p>

			musculares. Pérdida de conciencia y fallo respiratorio.
4,6-c initro-o-cresol	534-52-1	10	Altamente tóxico cuando se ingiere, se inhala o se absorbe a través de la piel. Causa irritación de ojos, piel, mucosas y tracto respiratorio. La absorción dentro del cuerpo lleva a la formación de metahemoglobina y en algunos casos causa cianosis.

Notas:

1. Designación numérica asignada por la Sociedad Americana de Química que identifica de manera única un compuesto químico específico. Este número permite la identificación de un compuesto sin tomar en cuenta el nombre o el sistema de denominación utilizado.
2. Dosis Letal Media . Dosis calculada de cualquier material que se espera que cause muerte a 50% de una población animal experimental definida. Se determina a partir de la exposición de la población al material por cualquier ruta exceptuando la inhalación.
3. Cambios no transmisibles producidos en la descendencia.

(40) Budavari, S., y cols., "The Merck Index" 30 edición, Merck & Co.,INC. Estados Unidos (2001).

(42) Lenga E. Robert, "The Sigma Aldrich Library of Chemical Safety Data", 2a edición, volumen I y II. Estados Unidos. (1988).

(43) Lewis, J., y cols., "Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials", 8a edición, vol. 1, 2 y 3, editorial Van Nostrand Reinhold. Estados Unidos (1989).

APÉNDICE 4

CÁLCULOS

Cálculos para la preparación de disoluciones.

Ejemplo:

4-acetil-aminofenol

Se pesaron 10.5 mg

y se aforó a 10 ml

Si ppm = mg / l, entonces, la concentración en la disolución madre es:

$$10.5 \text{ mg} / 0.01 \text{ l} = \mathbf{1050 \text{ ppm}}$$

Para preparar las disoluciones patrón se consideró la siguiente ecuación:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

donde:

C_1 = concentración de la disolución patrón

V_1 = volumen del matraz

C_2 = concentración de la disolución madre

V_2 = volumen de la alícuota

Despejando V_2 de la ecuación anterior, tenemos:

$$V_2 = C_1V_1 / C_2$$

Para una disolución patrón de 100 ppm

$$V_2 = (105 \text{ ppm}) (10 \text{ ml}) / 1050 \text{ ppm} = \mathbf{1 \text{ ml}}$$

Cálculo de la absorptividad molar (ϵ) de los compuestos fenólicos

La absorptividad molar se calculó a partir de la ley de Lambert-Beer, que se escribe

$$A = \epsilon bc$$

donde:

[c] = Concentración de la muestra. Normalmente tiene unidades de mol / l

[ϵ] = Absorptividad molar.

ϵ es característica de la sustancia y nos dice cuanta luz absorbe a una λ determinada. Tiene unidades de $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$

[b] = paso óptico a través del medio. Tiene unidades de cm

Cálculo de la concentración molar de los compuestos fenólicos.

Ejemplo:

o-aminofenol

Peso molecular del o-aminofenol: 109.13 g / mol

Concentración en ppm del o-aminofenol: 100 ppm

Conociendo que:

$$\text{ppm} = \text{mg} / \text{l},$$

Entonces la concentración será:

$$0.1 \text{ g/l} / 109.13 \text{ g/mol} = \underline{\underline{9.2 \times 10^{-4} \text{ mol / l}}}$$

Cálculo de el límite de detección y límite de cuantificación

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la “mejor” línea recta que pasa a través de los puntos de la curva de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en y , lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada. Algunas de esas desviaciones (conocidas como los residuos de y) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que “la línea debe pasar por el centro de gravedad de los puntos (\bar{x}, \bar{y}) ”.

Para la recta

$$y = a + bx \quad \text{.....ecuación 1}$$

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

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad \text{.....ecuación 3}$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor de $S_{y/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{calc})^2}{n - 2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 4}$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y sobre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 5}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 6}$$

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-producto, r :

$$r = \frac{\sum_i \{(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})\}}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \dots\dots\dots \text{ecuación 7}$$

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_{\pm} = \bar{y} + b(x_i - \bar{x}) \pm tS_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 8}$$

en donde t es el valor de la “t de student”, a dos colas, con un nivel de confianza s para $n-2$ grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_- . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un término auxiliar C :

$$C = b^2 - \frac{(t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \dots\dots\dots \text{ecuación 9}$$

por lo que, para la recta y_+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots\dots \text{ecuación 10}$$

y para la recta y_-

$$x_2 = \bar{x} - \frac{b}{C}(\bar{y} - y_o) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \dots\dots \text{ecuación 11}$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor calculado de y_+ para $x=0$ en la *ecuación 11*.

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y_+ para $x=LD$, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y . Este valor corresponde al límite de cuantificación.

Nota: Los valores de límite de detección y cuantificación presentados en las *tablas 5.1.11 y 5.2.11* se calcularon por medio de una hoja de cálculo, utilizando las *ecuaciones 10 y 11*.

Tabla A4-1 Concentración real de cada compuesto fenólico en las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración en HPLC.

Compuesto	Concentración (mol/l)													
	Disoluciones preparadas a partir de la disolución madre I										Disoluciones preparadas a partir de la disolución madre II			
4-acetil-aminofenol	6.6×10^{-4}	5.3×10^{-4}	4.0×10^{-4}	2.6×10^{-4}	1.3×10^{-4}	6.6×10^{-5}	5.3×10^{-5}	4.0×10^{-5}	2.6×10^{-5}	1.3×10^{-5}	7.9×10^{-6}	4.0×10^{-6}	2.4×10^{-6}	7.9×10^{-7}
o-aminofenol	9.2×10^{-4}	7.3×10^{-4}	5.5×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1.8×10^{-4}	9.2×10^{-5}	7.3×10^{-5}	5.5×10^{-5}	3.7×10^{-5}	1.8×10^{-5}	1.1×10^{-5}	5.5×10^{-6}	3.3×10^{-6}	1.1×10^{-6}
p-aminofenol	9.2×10^{-4}	7.3×10^{-4}	5.5×10^{-4}	3.7×10^{-4}	1.8×10^{-4}	9.2×10^{-5}	7.3×10^{-5}	5.5×10^{-5}	3.7×10^{-5}	1.8×10^{-5}	1.1×10^{-5}	5.5×10^{-6}	3.3×10^{-6}	1.1×10^{-6}
4-clorofenol	8.1×10^{-4}	6.5×10^{-4}	4.9×10^{-4}	3.2×10^{-4}	1.6×10^{-4}	8.1×10^{-5}	6.5×10^{-5}	4.9×10^{-5}	3.2×10^{-5}	1.6×10^{-5}	8.6×10^{-6}	4.3×10^{-6}	2.6×10^{-6}	8.6×10^{-7}
4-cloro-3-metilfenol	7.0×10^{-4}	5.6×10^{-4}	4.2×10^{-4}	2.8×10^{-4}	1.4×10^{-4}	7.0×10^{-5}	5.6×10^{-5}	4.2×10^{-5}	2.8×10^{-5}	1.4×10^{-5}	1.3×10^{-5}	6.3×10^{-6}	3.8×10^{-6}	1.3×10^{-6}
2,4-diclorofenol	6.2×10^{-4}	5.0×10^{-4}	3.7×10^{-4}	2.5×10^{-4}	1.2×10^{-4}	6.2×10^{-5}	4.9×10^{-5}	3.7×10^{-5}	2.5×10^{-5}	1.2×10^{-5}	8.6×10^{-6}	4.3×10^{-6}	2.6×10^{-6}	8.6×10^{-7}
2,3,6-triclorofenol	5.2×10^{-4}	4.2×10^{-4}	3.1×10^{-4}	2.1×10^{-4}	1.0×10^{-4}	5.2×10^{-5}	4.2×10^{-5}	3.1×10^{-5}	2.1×10^{-5}	1.0×10^{-5}	6.1×10^{-6}	3.0×10^{-6}	1.8×10^{-6}	6.1×10^{-7}
2,4,5-triclorofenol	5.0×10^{-4}	4.0×10^{-4}	3.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}	9.9×10^{-5}	5.0×10^{-5}	4.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	2.0×10^{-5}	9.9×10^{-6}	7.6×10^{-6}	3.8×10^{-6}	2.3×10^{-6}	7.6×10^{-7}
2,4,6-triclorofenol	5.0×10^{-4}	4.0×10^{-4}	3.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}	9.9×10^{-5}	5.0×10^{-5}	4.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	2.0×10^{-5}	9.9×10^{-6}	7.6×10^{-6}	3.8×10^{-6}	2.3×10^{-6}	7.6×10^{-7}
Pentaclorofenol	3.9×10^{-4}	3.1×10^{-4}	2.3×10^{-4}	1.6×10^{-4}	7.8×10^{-5}	3.9×10^{-5}	3.1×10^{-5}	2.3×10^{-5}	1.6×10^{-5}	7.8×10^{-6}	3.8×10^{-6}	1.9×10^{-6}	1.1×10^{-6}	3.8×10^{-7}
Fenol	1.1×10^{-3}	8.8×10^{-4}	6.6×10^{-4}	4.4×10^{-4}	2.2×10^{-4}	1.1×10^{-4}	8.8×10^{-5}	6.6×10^{-5}	4.4×10^{-5}	2.2×10^{-5}	1.8×10^{-5}	9.0×10^{-6}	5.4×10^{-6}	1.8×10^{-6}
2-fluorofenol	9.5×10^{-4}	7.6×10^{-4}	5.7×10^{-4}	3.8×10^{-4}	1.9×10^{-4}	9.5×10^{-5}	7.6×10^{-5}	5.7×10^{-5}	3.8×10^{-5}	1.9×10^{-5}	1.2×10^{-5}	6.2×10^{-6}	3.7×10^{-6}	1.2×10^{-6}
Pentafluorofenol	5.4×10^{-4}	4.3×10^{-4}	3.2×10^{-4}	2.2×10^{-4}	1.1×10^{-4}	5.4×10^{-5}	4.3×10^{-5}	3.2×10^{-5}	2.2×10^{-5}	1.1×10^{-5}	7.6×10^{-6}	3.8×10^{-6}	2.3×10^{-6}	7.6×10^{-7}
2-nitrofenol	7.2×10^{-4}	5.8×10^{-4}	4.3×10^{-4}	2.9×10^{-4}	1.4×10^{-4}	7.2×10^{-5}	5.8×10^{-5}	4.3×10^{-5}	2.9×10^{-5}	1.4×10^{-5}	7.9×10^{-6}	4.0×10^{-6}	2.4×10^{-6}	7.9×10^{-7}
4-nitrofenol	7.5×10^{-4}	6.0×10^{-4}	4.5×10^{-4}	3.0×10^{-4}	1.5×10^{-4}	7.5×10^{-5}	6.0×10^{-5}	4.5×10^{-5}	3.0×10^{-5}	1.5×10^{-5}	7.9×10^{-6}	4.0×10^{-6}	2.4×10^{-6}	7.9×10^{-7}
2,4-dinitrofenol	4.9×10^{-4}	4.0×10^{-4}	3.0×10^{-4}	2.0×10^{-4}	9.9×10^{-5}	4.9×10^{-5}	4.0×10^{-5}	3.0×10^{-5}	2.0×10^{-5}	9.9×10^{-6}	5.0×10^{-6}	2.5×10^{-6}	1.5×10^{-6}	5.0×10^{-7}
4,6-dinitro- <i>o</i> -cresol	5.4×10^{-4}	4.3×10^{-4}	3.3×10^{-4}	2.2×10^{-4}	1.1×10^{-4}	5.4×10^{-5}	4.3×10^{-5}	3.3×10^{-5}	2.2×10^{-5}	1.1×10^{-5}	5.4×10^{-6}	2.7×10^{-6}	1.6×10^{-6}	5.4×10^{-7}

Tabla A4-2 Concentración real de cada compuesto fenólico en las disoluciones utilizadas para las curvas de calibración en CG/EM.

Compuesto	Concentración (ppm)										
	124	99.2	74.4	49.6	24.8	12.4	9.92	7.44	4.96	2.48	1.24
2-fluorofenol	124	99.2	74.4	49.6	24.8	12.4	9.92	7.44	4.96	2.48	1.24
Pentafluorofenol	129	103.2	77.4	51.6	25.8	12.9	10.32	7.74	5.16	2.58	1.29
Fenol	101	80.8	60.6	40.4	20.2	10.1	8.08	6.06	4.04	2.02	1.01
2-nitrofenol	113	90.4	67.8	45.2	22.6	11.3	9.04	6.78	4.52	2.26	1.13
2,4-diclorofenol	110	88	66	44	22	11	8.8	6.6	4.4	2.2	1.1
4-clorofenol	110	88	66	44	22	11	8.8	6.6	4.4	2.2	1.1
o-aminofenol	107	85.6	64.2	42.8	21.4	10.7	8.56	6.42	4.28	2.14	1.07
p-aminofenol	107	85.6	64.2	42.8	21.4	10.7	8.56	6.42	4.28	2.14	1.07
4-cloro-3-metilfenol	102	81.6	61.2	40.8	20.4	10.2	8.16	6.12	4.08	2.04	1.02
2,4,6-triclorofenol	101	80.8	60.6	40.4	20.2	10.1	8.08	6.06	4.04	2.02	1.01
2,4,5-triclorofenol	102	81.6	61.2	40.8	20.4	10.2	8.16	6.12	4.08	2.04	1.02
2,3,6-triclorofenol	105	84	63	42	21	10.5	8.4	6.3	4.2	2.1	1.05
2,4-dinitrofenol	109	87.2	65.4	43.6	21.8	10.9	8.72	6.54	4.36	2.18	1.09
4-nitrofenol	107	85.6	64.2	42.8	21.4	10.7	8.56	6.42	4.28	2.14	1.07
4,6-dinitro-o-cresol	103	82.4	61.8	41.2	20.6	10.3	8.24	6.18	4.12	2.06	1.03
4-acetil-aminofenol	105	84	63	42	21	10.5	8.4	6.3	4.2	2.1	1.05
Pentaclorofenol	99	79.2	59.4	39.6	19.8	9.9	7.92	5.94	3.96	1.98	0.99