



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

*DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA PARA LA
DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS IONES
 Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} POR MEDIO DE CROMATOGRAFÍA
DE IONES CON DETECCIÓN CONDUCTIMÉTRICA EN MUESTRAS
AMBIENTALES*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

VIVIANA BERENICE GALINDO ZAVALA



MÉXICO, D.F.

2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Jose Luz González Chávez**

VOCAL: **Profesora: Araceli Patricia Peña Álvarez**

SECRETARIO: **Profesora: Olivia Zamora Martínez**

1er. SUPLENTE: **Profesora: Minerva Monroy Barreto**

2do. SUPLENTE: **Profesora: Selená Gutiérrez Flores**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Cromatografía, Depto. de Edafología, Instituto de Geología, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Olivia Zamora Martínez

SUSTENTANTE (S):

Viviana Berenice Galindo Zavala



AGRADECIMIENTOS

Con mucho cariño y respeto a la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa y por enseñarme que con esfuerzo y dedicación se puede lograr un cambio.

A la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de obtener los conocimientos necesarios para lograr este objetivo en mi vida.

Agradezco al Comité Técnico de Becas del Instituto de Geología de la UNAM por brindarme la beca para la realización de este trabajo durante los semestres 2016-1 y 2016-2.


A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PE101316 del Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME): “Diseño y desarrollo de materiales para el fortalecimiento de la enseñanza de técnicas de análisis ambiental de los estudiantes de las Ciencias de la Tierra”.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto PE102113 del Programa de Apoyo a Proyectos de Innovación y Mejoramiento de la Enseñanza (PAPIME): “Aprendizaje de procesos de interacción geosférica a través de experiencias en campo”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través de proyecto CONACyT Ciencia básica 221789: “Alteración de las comunidades microbianas edáficas por el cambio de uso de suelo y sus implicaciones en los procesos biogeoquímicos”.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CONACyT CB-2013-220489

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) a través del proyecto IN105715 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): “Transporte de atrazina en suelos tipo Pheozem con diferente tiempo bajo riego con agua residual cruda”.





AGRADECIMIENTOS

A los alumnos del curso de Monitoreo Ambiental del Posgrado de Ciencias de la Tierra UNAM, quienes colectaron las muestras en campo.

A mi asesora la Dra. Olivia Zamora Martínez por brindarme su amistad, su apoyo y compartir sus conocimientos y su valioso tiempo para poder realizar el presente proyecto.

A mis sinodales por sus comentarios y sugerencias para mejorar este trabajo.


A la M. en C. Iris Suárez Quijada por su confianza, su amistad y por brindarme su apoyo así como compartirme de sus conocimientos en la realización de mi servicio social.

A la Dra. Edith Garay por su confianza y su valiosa amistad en mi estancia en este Instituto.

A Luis Galindo y Adriana Ángeles por brindarme su ayuda, tiempo y paciencia.

A mis amigos y compañeros de laboratorio, Mario Rodríguez, Itzel Ramírez, Alberto Colín y Mariana Velázquez, por todo su apoyo y ayuda.

A quienes me brindaron su amistad y compartieron de su tiempo y ayuda en mi estancia en esta Institución, haciéndola más interesante y amena.





Dedico este trabajo a mis padres Paula Zavala e Ignacio Galindo y a mis hermanos Luis y Arturo, por su cariño y acompañarme en cualquier momento, brindarme su apoyo incondicional y apoyarme en cada proyecto de mi vida.

A mi periquito "Cuyi" por todas esas desveladas y malcomidas que pasamos juntos, te quiero :)

¡GRACIAS!



ABREVIATURAS

Administración de Alimentos y Medicamentos	<i>FDA</i>
Altura equivalente a un plato teórico	<i>H, HETP</i>
Ancho a mitad de altura de pico	<i>W_{h/2}</i>
Ancho de base	<i>W_b</i>
Asimetría de pico	<i>A_s</i>
Centro para la Evaluación e Investigación de Fármacos	<i>CDER</i>
Coefficiente de distribución o de reparto	<i>K</i>
Coefficiente de variabilidad	<i>% CV</i>
Cromatografía de iones o cromatografía iónica	<i>IC</i>
Cromatografía de líquidos de alta resolución, alta presión o alto desempeño	<i>HPLC</i>
Desviación estándar	<i>s</i>
Desviación estándar relativa	<i>% RSD</i>
Factor de retención o de capacidad	<i>k'</i>
Grado centígrado	<i>°C</i>
Gramo	<i>g</i>
Ion amonio	<i>NH₄⁺</i>
Ion calcio	<i>Ca²⁺</i>
Ion magnesio	<i>Mg²⁺</i>
Ion potasio	<i>K⁺</i>
Ion sodio	<i>Na⁺</i>
Límite de cuantificación	<i>LOQ</i>
Límite de detección	<i>LOD</i>
Media aritmética	<i>\bar{x}</i>
Megaohm	<i>MΩ</i>
Microlitro	<i>μL</i>
Micrometro	<i>μm</i>
Miliequivalentes por litro	<i>meq/L</i>
Miligramo por litro	<i>mg/L</i>

ABREVIATURAS

Mililitro	<i>mL</i>
Milimetro	<i>mm</i>
Milimol por litro	<i>mmol/L, mM</i>
Mol por litro	<i>mol/L, M</i>
Número de ensayos	<i>n</i>
Número de platos teóricos	<i>N</i>
Ordenada al origen	<i>b</i>
Organización Internacional de Normalización	<i>ISO</i>
Partes por billón	<i>ppb</i>
Partes por millón	<i>ppm</i>
Partes por trillón	<i>ppt</i>
Pendiente de la recta	<i>m</i>
Recobro	<i>% R</i>
Resolución	<i>R_s</i>
Retención relativa o factor de capacidad	<i>α</i>
Sistema Internacional de Unidades	<i>SI</i>
Tiempo de retención	<i>t_R</i>
Tiempo de retención ajustado	<i>t_R'</i>
Tiempo muerto	<i>t_M</i>
Unión Internacional de Química Pura y Aplicada	<i>IUPAC</i>
Velocidad lineal de flujo	<i>u_x</i>
Volumen de retención	<i>V_R</i>
Volumen de retención ajustado	<i>V_R'</i>
Volumen muerto	<i>V_M</i>

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
Resumen	1
Introducción	2
CAPÍTULO I. Objetivos	
1.1 Objetivo General	3
1.2 Objetivos Particulares	3
CAPÍTULO II. Marco Teórico	
2.1 El agua	4
2.1.1 El agua como componente de los organismos vivos	4
2.1.2 Los ecosistemas de agua dulce	4
2.1.3 Salinidad y composición iónica de las aguas continentales	5
2.1.4 Función biológica del sodio, potasio, magnesio y calcio	5
2.1.5 Efectos en los seres humanos e impacto ambiental debido al sodio, potasio, magnesio y calcio	6
2.1.6 Presencia del ion amonio en el agua	7
2.1.7 Impacto ambiental a consecuencia del amonio	8
2.2 Aguas residuales	8
2.2.1 Composición del agua residual doméstica e industrial	9
2.3 Cromatografía	10
2.3.1 Definición y fundamento de la cromatografía	10
2.3.2 Clasificación de los métodos cromatográficos	10
2.3.3 El cromatograma	12
2.3.3.1 El pico cromatográfico	13
2.3.4 Definiciones y parámetros cromatográficos	14
2.3.5 Eficiencia de la separación	19
2.3.5.1 Altura equivalente a un plato teórico	20
2.3.5.2 Número de platos teóricos	20
2.3.6 Resolución	21

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
2.3.7 Ecuación de van Deemter de altura de plato	23
2.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución	25
2.4.1 Instrumentación general	25
2.4.2 Fases móviles	28
2.4.3 Tipos de elución	29
2.4.4 Fases estacionarias	30
2.5 Cromatografía de iones	31
2.5.1 Fundamento de la cromatografía de iones	32
2.5.2 Modelos de retención	33
2.5.3 Selectividad en el intercambio iónico	34
2.5.4 Fases estacionarias	35
2.5.5 Fases móviles	37
2.5.6 Tipos de detectores en cromatografía de iones	38
2.5.7 Técnicas de detección	40
2.6 Validación de métodos analíticos	40
2.6.1 Definiciones de Validación	41
2.6.2 ¿Cuándo es necesario validar un método?	41
2.6.3 Parámetros de desempeño a validar en un método de análisis	42
2.7 Trazabilidad	48
2.7.1 Definición internacional de trazabilidad	48
2.7.2 La carta de trazabilidad	49
CAPÍTULO III. Parte experimental	
3.1 Instrumentación	50
3.1.1 Equipos y materiales	50
3.1.2 Reactivos y disolventes	50
3.2 Desarrollo del método cromatográfico	51

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
3.2.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}	51
3.3 Validación del método cromatográfico	51
3.3.1 Intervalo lineal	52
3.3.2 Precisión	52
3.3.3 Exactitud	52
3.3.4 Límite de detección	52
3.3.5 Límite de cuantificación	53
3.4 Aplicación del método cromatográfico desarrollado	53
3.4.1 Recobros	53
3.4.2 Evaluación de interferencias: selectividad del ion amonio	53
3.4.3 Evaluación de la coelución (sodio y amonio)	54
3.5 Descripción y conservación de las muestras de trabajo	54
CAPÍTULO IV. Resultados y discusión	
4.1 Desarrollo del método cromatográfico	56
4.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}	56
4.1.1.1 Evaluación de la columna C4 100	56
4.1.1.2 Evaluación de la columna C6 250	58
4.1.2 Parámetros cromatográficos de las fases estacionarias	60
4.1.2.1 Evaluación de la columna C4 100	60
4.1.2.2 Evaluación de la columna C6 250	61
4.2 Validación del método cromatográfico	63
4.2.1 Evaluación del blanco	63
4.2.2 Intervalo lineal	64
4.2.3 Precisión	65
4.2.4 Exactitud	66

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Página</i>
4.2.5 Límites de detección y cuantificación experimentales	67
4.3 Aplicación del método cromatográfico desarrollado	68
4.3.1 Recobros	68
4.3.2 Evaluación de interferencias: selectividad del ion amonio	69
4.3.3 Evaluación de la coelución (sodio y amonio)	70
CAPÍTULO V. Conclusiones	71
ANEXOS	
Anexo I. Cromatogramas obtenidos para el intervalo lineal en las condiciones óptimas de trabajo.	72
Anexo II. Índice de coelución calculado al 10 % de altura de pico.	73
Anexo III. Pruebas de hipótesis sobre la pendiente (curvas de calibración).	75
Referencias bibliográficas	76

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Número de figura</i>	<i>Página</i>
Figura 1. Ejemplo de cromatograma de una mezcla de componentes.	13
Figura 2. Ejemplo de pico debido a un solo componente y un pico sin resolver.	13
Figura 3. Representación de algunos parámetros cromatográficos.	14
Figura 4. Procedimiento para la estimación de la varianza de un pico.	16
Figura 5. Determinación del factor de asimetría de un pico cromatográfico.	17
Figura 6. Equilibrio de distribución del soluto entre la fase estacionaria y la móvil.	18
Figura 7. Eficiencia de la separación.	20
Figura 8. Definición de la resolución en un sistema cromatográfico.	22
Figura 9. Valores de resolución entre dos picos cromatográficos.	22
Figura 10. Relación entre H y la velocidad lineal.	24
Figura 11. Esquema básico de un cromatógrafo de líquidos.	28
Figura 12. Proceso de elución: etapas sucesivas de intercambio del analito por el disolvente.	29
Figura 13. Esquema general de la trazabilidad del resultado de una medición.	48
Figura 14. Localización de los sitios de muestreo de agua residual del canal de riego en Las Palmas (LPC).	55
Figura 15. Cromatograma obtenido con la columna C4 100 de un estándar de 10 mg/L de los cinco cationes de interés (flujo de fase móvil de 0.9 mL/min y volumen de inyección = 10 μ L).	56
Figura 16. Cromatograma de un estándar de 50 mg/L, flujo fase móvil: 0.9 mL/min, volumen de inyección: 10 μ L.	57
Figura 17. Cromatograma obtenido con la columna C6 250 de un estándar de 10 mg/L de los cinco cationes de interés (flujo de fase móvil de 0.9 mL/min y volumen de inyección = 10 μ L).	58
Figura 18. Cromatogramas de estándares de a) 50 y b) 100 mg/L, flujo fase móvil: 0.9 mL/min y volumen de inyección: 10 μ L.	59

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Número de figura</i>	<i>Página</i>
Figura 19. Cromatograma obtenido del blanco en las condiciones óptimas de trabajo.	63
Figura 20. Gráficos de calibración obtenidos para los cinco analitos de estudio.	65
Figura 21. Evaluación de la selectividad en el análisis del ion amonio.	69
Figura 22. Relaciones sodio-amonio evaluadas: a) 1:1, b) 10:1, c) 100:1 y d) 1000:1.	70

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Número de tabla</i>	<i>Página</i>
Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos según la naturaleza de las fases.	11
Tabla 2. Valor de conductividad equivalente de algunos iones a dilución infinita en agua a 25 °C.	39
Tabla 3. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de prueba.	43
Tabla 4. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna C4 100.	60
Tabla 5. Evaluación de la eficiencia de la columna C4 100.	60
Tabla 6. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna C6 250.	61
Tabla 7. Evaluación de la eficiencia de la columna C6 250.	61
Tabla 8. Análisis de regresión lineal para los cinco cationes (n = 3).	64
Tabla 9. Evaluación de la precisión en tres niveles de concentración (n = 5).	66
Tabla 10. Determinación de la exactitud en tres niveles de concentración (n = 5).	66
Tabla 11. LOD y LOQ determinados para los cinco analitos de interés (n = 7).	67
Tabla 12. Análisis de recobros para los cinco cationes en muestras reales (n = 3).	68

Se realizó el diseño y la validación de un método cromatográfico con detección conductimétrica para llevar a cabo la determinación simultánea de los iones mayoritarios presentes en muestras acuosas ambientales: Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Por medio del método propuesto es posible llevar a cabo la detección y cuantificación de NH_4^+ , aún en presencia de altas concentraciones de Na^+ , su principal interferente en este tipo de muestras. Se obtuvieron los parámetros típicos en una validación analítica como lo son el límite de detección y cuantificación, exactitud, precisión, así como el intervalo lineal y de trabajo. Al realizar la evaluación estadística de los resultados obtenidos experimentalmente para los cinco cationes evaluados, se determinó que este método analítico presenta linealidad en un intervalo de concentraciones que va desde 0.1 a 100 mg/L. Los límites de detección encontrados son de 0.14, 0.04, 0.28, 0.10 y 0.09 mg/L para Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente. Mientras que los límites de cuantificación encontrados fueron de 0.56, 0.05, 0.60, 0.50 y 0.24 mg/L para Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , respectivamente. Este método cromatográfico demostró ser preciso (% RSD < 3) y exacto (% exactitud = 90 - 110 %). Se evaluó el desempeño del método propuesto en este trabajo de investigación, analizando muestras acuosas reales, agua residual proveniente del Valle del Mezquital, encontrándose por medio de experimentos de recobro, que para este tipo de muestras la metodología propuesta no presenta interferencias.

INTRODUCCIÓN

El agua dulce es imprescindible para la vida, pero la cantidad de la que podemos disponer es escasa y su distribución es desigual, además de que varía a lo largo del año y está sujeta a cambios provocados por la actividad humana. Los usos más importantes están relacionados con la agricultura, el consumo industrial y el doméstico.^[1]

La escasez cada vez mayor de las aguas dulces debido al crecimiento demográfico, a la urbanización y, probablemente, a los cambios climáticos, ha dado lugar al uso creciente de aguas residuales para la agricultura, la acuicultura, la recarga de aguas subterráneas y otras áreas. En algunos casos, las aguas residuales son el único recurso hídrico de las comunidades pobres que subsisten por medio de la agricultura. Si bien el uso de aguas residuales en la agricultura puede aportar beneficios (incluidos los beneficios de salud como una mejor nutrición y provisión de alimentos para muchas viviendas), su uso no controlado generalmente está relacionado con impactos significativos sobre la salud humana.^[2]

El uso de aguas residuales puede tener un impacto ambiental positivo, así como el aumento de los rendimientos agrícolas y acuícolas. Entre los resultados de mejora del medio ambiente incluyen el evitar la contaminación de las aguas superficiales, que se produce cuando las aguas residuales sin usar se descargan en los ríos o lagos, la conservación y uso más racional de los recursos de agua dulce, reducir el uso de fertilizantes artificiales. Por otro lado, la contaminación del suelo y de las aguas subterráneas son posibles desventajas, pero éstas pueden minimizarse al tener una buena planificación.^[3]

Debido a lo anteriormente mencionado, es necesario contar con metodologías lo suficientemente sensibles y libres de interferencias para llevar a cabo el monitoreo de los diferentes componentes del agua residual, siendo los iones un conjunto de especies de amplio interés en cuestiones de tipo ambiental. Dentro de los iones, las concentraciones presentes de los cationes mayoritarios como son: Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , resultan ser muy importantes.



CAPÍTULO I

OBJETIVOS

1.1 OBJETIVO GENERAL

- ◆ Desarrollar y validar una metodología para la determinación simultánea de los cationes Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica en muestras acuosas ambientales.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- ◆ Optimización de los parámetros cromatográficos de separación: selección de fase estacionaria, composición de la fase móvil.
- ◆ Validación de método, obteniendo los parámetros típicos de validación: intervalo lineal y de trabajo, precisión, exactitud, límites de detección y cuantificación.
- ◆ Evaluación de la metodología desarrollada sobre la cuantificación de amonio en medios con altas concentraciones de sodio.
- ◆ Aplicación de la metodología propuesta para la determinación de cationes mayoritarios en muestras reales.



CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 EL AGUA

2.1.1 El agua como componente de los organismos vivos

El agua es el componente que aparece con mayor abundancia en la superficie terrestre ya que cubre cerca del 71 % de la corteza de la Tierra, además es un constituyente de todos los organismos vivos.^[4]

El agua interviene en diversas funciones vitales de plantas y animales. Las plantas verdes realizan la fotosíntesis a partir de agua y dióxido de carbono, por medio de sus raíces captan los nutrientes cuando están disueltos en agua. En los animales, el agua participa en importantes reacciones bioquímicas que se desarrollan dentro de las células. Además disuelve y transporta las sustancias necesarias para la alimentación celular y las sustancias tóxicas que el organismo expulsa en forma de sudor y orina.^[1]

2.1.2 Los ecosistemas de agua dulce

El *agua dulce* es aquel tipo de agua que contiene cantidades mínimas de sales disueltas, distinguiéndose así del agua de mar o del agua salobre.^[5]

El aporte potencial de agua dulce se ve reducido a causa de diversos factores, entre éstos podemos encontrar la pluviosidad, la cual no se encuentra repartida equitativamente sobre la superficie de la tierra, además de que el ser humano no se ha distribuido en proporción a las concentraciones de agua. El segundo factor se debe a que el consumo total de agua ha ido aumentando exponencialmente con el desarrollo demofórico (ciclo de degradación de la biosfera a consecuencia de la incidencia de la producción sobre el ambiente y el consumo de productos tecnológicos). Un tercer factor, el cual es potencialmente más grave y derivado del desarrollo demofórico, es la gran degradación de la calidad del agua por polución (contaminación producida por los residuos procedentes de la actividad humana o de procesos industriales o biológicos). El resultado de esto consiste en una fuerte disminución de la cantidad de agua para otros fines.^[6]

2.1.3 Salinidad y composición iónica de las aguas continentales

Normalmente la salinidad iónica total de las aguas continentales es determinada completamente por cuatro cationes principales, calcio (Ca^{2+}), magnesio (Mg^{2+}), sodio (Na^+) y potasio (K^+); y por los aniones carbonato (CO_3^{2-}), sulfato (SO_4^{2-}) y cloruro (Cl^-). Esta salinidad es determinada por los aportes debidos al lavado de las rocas de la cuenca de drenaje, por la precipitación atmosférica y por el equilibrio entre evaporación y precipitación. Las proporciones de los principales iones muestran una tendencia a presentar las relaciones siguientes: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} \geq \text{Na}^+ > \text{K}^+$, y $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{Cl}^-$. En terminología química, la salinidad corresponde a la suma de la composición iónica, expresada en mg/L o meq/L. ^[6]

La salinidad de las aguas superficiales es altamente variable, dependiendo de las influencias iónicas del drenaje e intercambio con la tierra circundante, de las sustancias atmosféricas derivadas de la tierra, del océano y de la actividad humana, así como del equilibrio e intercambio del volumen de agua con los sedimentos. La adsorción de estos iones depende de la disponibilidad de los cationes, de sus concentraciones, de sus proporciones en la disolución del suelo o en el agua de lavado, de la naturaleza y número de posiciones de intercambio en el complejo de intercambio de los suelos, y el volumen de agua en contacto con dicho complejo. ^[6]

2.1.4 Función biológica del sodio, potasio, magnesio y calcio

Los seres vivos están conformados por los mismos elementos que la Tierra sólo que en diferentes proporciones, a estos elementos se les denomina *bioelementos*. Entre éstos se encuentran el sodio, potasio, magnesio y calcio. ^[6,7]

De forma general, algunas de las características importantes que presentan estos bioelementos son:

Sodio y potasio. Los cationes monovalentes de sodio y potasio están implicados principalmente en el transporte e intercambio iónico. Aunque el potasio tiene un

comportamiento químico similar al sodio, éste no puede sustituir al sodio. La presencia de sodio y potasio en forma de cationes altamente solubles de numerosas sales es tan abundante que la alteración del contenido de las aguas dulces es poco frecuente. La presencia del potasio es de gran importancia para la salud del suelo, el crecimiento de las plantas y la nutrición animal, además es requerido en proporciones relativamente elevadas por las plantas en desarrollo. ^[6,7]

Calcio. El calcio actúa de distintas formas sobre el crecimiento y la dinámica de las poblaciones florísticas y faunísticas de las aguas dulces. Normalmente el calcio se precisa en forma de micronutriente. Es un componente esencial para la preservación del esqueleto y dientes de los humanos. La cantidad de calcio utilizada por los seres vivos es tan pequeña al compararla con las cantidades disponibles de este elemento químico. ^[6,7]

Magnesio. Todas las plantas con clorofila precisan de magnesio en forma del componente magnesioporfirina de las moléculas de clorofila, y como micronutriente en las transformaciones enzimáticas de los organismos. Las demandas metabólicas de magnesio son mínimas si las comparamos con las cantidades disponibles generalmente en las aguas dulces. ^[6]

2.1.5 Efectos en los seres humanos e impacto ambiental debido al sodio, potasio, magnesio y calcio

El sodio es un mineral de alimentación parcialmente responsable de funciones del sistema nervioso. Un consumo excesivo en forma de cloruro de sodio causa aumento de la presión sanguínea, arteriosclerosis, edemas e hiperosmolaridad. La falta de éste puede causar convulsiones, deshidratación, parálisis muscular, disminución del crecimiento y entumecimiento general. ^[8]

Por otro lado cuando nuestros riñones no funcionan bien se puede dar la acumulación de potasio, lo cual puede llevar a cabo una perturbación en el ritmo cardiaco. Las consecuencias de niveles bajos de potasio se muestran por variedad de síntomas: restricción del crecimiento, reducción del florecimiento, cosechas menos abundantes y menor calidad de producción. Al contrario, niveles elevados de potasio soluble en el agua pueden causar daños a las semillas en germinación, inhibir la toma de otros minerales y reducir la calidad del cultivo.^[9]

El término *dureza* se usa frecuentemente como un parámetro indicador de la calidad del agua. La dureza de un agua está regida por el contenido de sales de calcio y de magnesio, combinados principalmente con bicarbonato y carbonato, conocida como dureza temporal; y con sulfatos, cloruros y otros aniones de ácidos minerales, denominada como dureza permanente.^[6]

Los iones calcio disueltos en el agua forman depósitos en tuberías y calderas cuando el agua es dura. El consumo mayor a 2.5 gramos de calcio por día sin una necesidad médica puede llevar a cabo el desarrollo de piedras en los riñones, esclerosis y problemas en los vasos sanguíneos. La falta de calcio es una de las causas principales de la osteoporosis. El calcio trabaja conjuntamente con el magnesio para formar nueva masa ósea. El fosfato de calcio es muy tóxico para los organismos acuáticos.^[10]

Los iones magnesio disueltos en el agua también forman depósitos en tuberías y calderas cuando el agua es dura. En forma de óxido de magnesio se ha establecido una toxicidad en el agua en 1000 ppm. Con grandes dosis de magnesio se producen vómitos y diarrea.^[11,12]

2.1.6 Presencia del ion amonio en el agua

El amonio es el principal producto final de la descomposición de la materia orgánica realizada por las bacterias heterótrofas (proteínas y urea, así como de otros

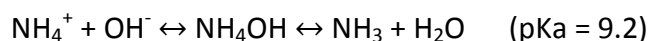
compuestos orgánicos nitrogenados). A pesar de que el amonio constituye uno de los principales productos de excreción de los animales acuáticos, la cantidad de nitrógeno obtenida por esta vía es muy inferior a la derivada de la descomposición.^[6]

El amonio en el agua se presenta principalmente en la forma de NH_4^+ y como NH_4OH no disociado, siendo este último altamente tóxico para los organismos, en especial para los peces. El amonio, nitrito y nitrato son típicos indicadores de contaminación del agua. Además de que el amoniaco y el nitrito son tóxicos para los peces incluso en concentraciones pequeñas.^[6,13]

2.1.7 Impacto ambiental a consecuencia del amonio

El amonio es un indicador de contaminación del agua producida por heces y productos de descomposición. La presencia de amonio no tiene significado toxicológico, pero un pequeño contenido puede indicar un estado no higiénico en el agua, que se manifiesta en contenidos aumentados en bacterias fecales, gérmenes patógenos, etc. En aguas ácidas y neutras existe exclusivamente en forma iónica como NH_4^+ , y a partir de pH 8 aumenta la proporción de NH_3 libre.^[13]

El equilibrio que se presenta es el siguiente:



En el ciclo del nitrógeno, la fijación de nitrógeno es inhibida en presencia de nitrógeno combinado accesible en forma de nitrato o amonio.^[6]

2.2 AGUAS RESIDUALES

En general, se puede definir el *agua residual* como aquel tipo de agua de composición variada proveniente de las descargas de usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas, de tal modo que ha sufrido degradación o alteración en su calidad original.^[14,15]

Dependiendo de su procedencia, las aguas residuales pueden ser:

- *aguas residuales de proceso*. Es aquel tipo de agua resultante de la producción de un bien o servicio comercializable.^[14]
- *agua residual industrial*. Toda el agua descargada después de ser utilizada o resultante de un proceso industrial o durante el transcurso de éste, y que no tiene ningún valor inmediato.^[16]
- *aguas residuales domésticas*. Tipo de agua proveniente del uso particular de las personas y del hogar.^[14]
- *aguas crudas*. Se refiere a las aguas residuales sin tratamiento o el agua que entra a una planta para un tratamiento posterior.^[16]
- *aguas residuales tratadas*. Agua residual que mediante procesos individuales o combinados de tipo físicos, químicos, biológicos u otros, se ha adecuado para hacerla apta para su reuso en servicios al público.^[17]

2.2.1 Composición del agua residual doméstica e industrial

Debido a que cualquier tipo de agua natural (subterránea, de lluvia, de tormenta, superficial, etc.) contiene sales, el agua residual también las tiene.^[18]

Además, el *agua residual doméstica* contiene materias que la enturbian, sustancias coloidales y sustancias solubles, tales como la urea, las sales, los detergentes.^[19]

El *agua residual industrial* contiene materiales que son transformados o producidos en las empresas o desechos de fabricación. Puede contener sustancias orgánicas e inorgánicas, sustancias solubles o insolubles; las cuales pueden ser de naturaleza ácida o alcalina, con o sin color, etc.^[19]

Debido a la diversidad de las especies que puede contener un tipo de agua y de su nivel de concentración, en la actualidad se ha visto la necesidad de contar con numerosos métodos de preparación y análisis de muestras que permitan el monitoreo de estas especies. Para el análisis de iones una de las más utilizadas es la cromatografía de iones.

2.3 CROMATOGRAFÍA

2.3.1 Definición y fundamento de la cromatografía

La IUPAC define a la cromatografía como “método físico de separación en el que los componentes a separar se distribuyen entre dos fases, una de las cuales permanece en reposo (fase estacionaria) mientras que la otra (fase móvil) se mueve en una dirección definida”.^[20]

La cromatografía es un método analítico que agrupa un conjunto importante y diverso de métodos que permite separar, determinar e identificar componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas.^[21,22]

Cuando una molécula de analito se encuentra en la fase móvil, avanza a la misma velocidad media que ésta, pero al entrar en la fase estacionaria, su velocidad media es cero. Si los componentes de la mezcla difieren en su afinidad por alguna de las fases, sus velocidades medias de avance a lo largo del sistema serán diferentes. Como consecuencia se obtiene la separación. Las dos fases (móvil y estacionaria) se eligen de tal manera que, los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ellas.^[22,23]

2.3.2 Clasificación de los métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se pueden clasificar con base en la disposición geométrica en la que se encuentran las fases. La *cromatografía en columna*, en la cual la fase estacionaria se encuentra dentro de un tubo con diámetro pequeño y la fase móvil pasa a través del tubo bajo presión o por gravedad y la *cromatografía en plano*, en la que la fase estacionaria es sostenida por una placa plana o en los poros de un papel, mientras que la fase móvil se desplaza en la fase estacionaria por capilaridad o por influencia de la gravedad.^[21-23]

Para poder clasificar a la cromatografía se toman en cuenta dos criterios, el primero es establecer la naturaleza de las fases (**tabla 1**) y el segundo es en función del mecanismo de interacción entre el analito y la fase estacionaria.^[23,24]

Tabla 1. Clasificación de los métodos cromatográficos según la naturaleza de las fases.

Fase móvil \ Fase estacionaria	Gas	Fluido supercrítico	Líquido
Líquido	gas-líquido (GLC)	fluidos supercríticos (SFC)	líquido-líquido (LLC)
Sólido	gas-sólido (GSC)	fluidos supercríticos (SFC)	líquido-sólido (LSC)

a) Cuando la fase estacionaria es un líquido, el mecanismo de separación predominante es el de reparto, por lo que se le denomina *cromatografía de reparto*.

b) Si la fase estacionaria es un sólido, pueden existir varios mecanismos y dependiendo de su naturaleza se clasifican en:

- *cromatografía de adsorción*. El analito se adsorbe en la superficie de las partículas sólidas, la cual se basa en la distinta magnitud de las interacciones de la mezcla con la superficie activa de la fase estacionaria.

- *cromatografía de reparto*. El analito está en equilibrio entre el líquido estacionario y la fase móvil.

- *cromatografía de intercambio iónico*. La fase estacionaria es un sólido con capacidad para intercambiar iones con la fase móvil. Los iones cargados en disolución son atraídos por los grupos funcionales de carga opuesta presentes en la fase estacionaria por fuerzas electrostáticas.

- *cromatografía de exclusión molecular*. La fase estacionaria es un sólido reticular con tamaños de retícula del mismo orden que las moléculas de la muestra a separar. Separa a las moléculas con base en su tamaño. No hay interacción atractiva entre la fase estacionaria y el soluto.

- *cromatografía de afinidad*. Emplea interacciones específicas entre una clase de moléculas de analito y una segunda molécula que está unida covalentemente a la fase estacionaria.

Otro criterio que se debe tomar en cuenta al realizar la clasificación es conocer la relación de polaridad entre la fase móvil y la fase estacionaria:

- cuando la fase móvil es menos polar que la fase estacionaria se le denomina *cromatografía en fase normal (NP)*.^[23]
- cuando la fase móvil es más polar que la fase estacionaria se le denomina *cromatografía en fase inversa o reversa (RP)*.^[23]

Y finalmente, de acuerdo con cómo se lleva a cabo el proceso cromatográfico, se puede clasificar en:

- *cromatografía frontal*. En la que se introduce la muestra de forma continua en el sistema cromatográfico, siendo ella misma la fase móvil.^[23]
- *cromatografía de desplazamiento*. En la fase móvil se encuentra presente un componente que es más afín a la fase estacionaria y el cual es capaz de desplazar a los componentes de la muestra.^[23]
- *cromatografía de elución*. La muestra se introduce en un momento determinado y la fase móvil circula continuamente. Los componentes de la muestra salen de la columna como zonas (picos cromatográficos), que en el caso ideal presentan una distribución gaussiana de concentración y están separadas unas de otras.^[23]

2.3.3 El cromatograma

Un *cromatograma* es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución o del volumen de fase móvil añadido. Es decir, si un detector se coloca en el extremo de la columna y éste responde a la propiedad de interés del analito, la señal obtenida lleva a una gráfica en la cual se obtienen una serie de picos simétricos, dando como resultado lo que se conoce como cromatograma (**Fig. 1**).^[21,24]

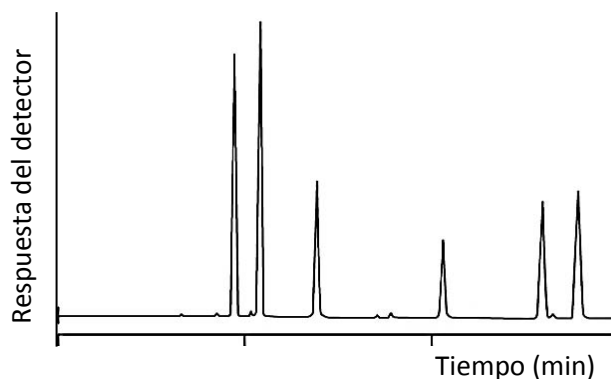


Figura 1. Ejemplo de cromatograma de una mezcla de componentes.

Un cromatograma es útil para un análisis cualitativo y cuantitativo, de modo que la posición de los picos en el eje del tiempo puede servir para identificar los componentes de la muestra y el área bajo los picos es una medida de la cantidad de cada componente.^[22]

2.3.3.1 El pico cromatográfico

El pico es la porción del cromatograma que se genera a partir de la respuesta del detector cuando un solo componente es eluido de la columna.^[25] Pero si la separación es incompleta, dos o más componentes pueden eluir como un pico sin resolver (**Fig. 2**).

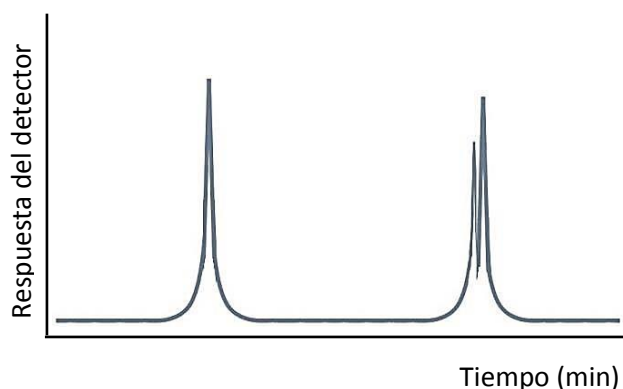


Figura 2. Ejemplo de pico debido a un solo componente (izquierda) y un pico sin resolver (derecha).

2.3.4 DEFINICIONES Y PARÁMETROS CROMATOGRÁFICOS

En cromatografía en columna algunos términos importantes son los siguientes:

Tiempo muerto (t_M). Es el tiempo requerido para eluir un analito que no puede ser retenido por la fase estacionaria (**Fig. 3**).^[26]

Tiempo de retención (t_R). Es el tiempo transcurrido desde que se realiza la inyección de la muestra hasta la aparición del máximo del pico, es decir, es el tiempo que pasa cada analito en la columna (**Fig. 3**).^[26]

Este valor es usado para identificación. Los tiempos de retención son característicos de los compuestos que representan, pero no son únicos. Los tiempos de retención que coincidan entre una muestra y una sustancia de referencia pueden ser usados para elaborar un perfil de identidad pero esto no es suficiente para lograr establecer su identidad.^[24,25]

Tiempo de retención ajustado (t'_R). Mide el tiempo que el analito permanece en la fase estacionaria^[26], y se calcula como:

$$t'_R = t_R - t_M$$

En la **figura 3** se presenta un cromatograma en el que se muestran algunos parámetros cromatográficos, como son: tiempo muerto, tiempo de retención, la altura del pico (h), entre otros.

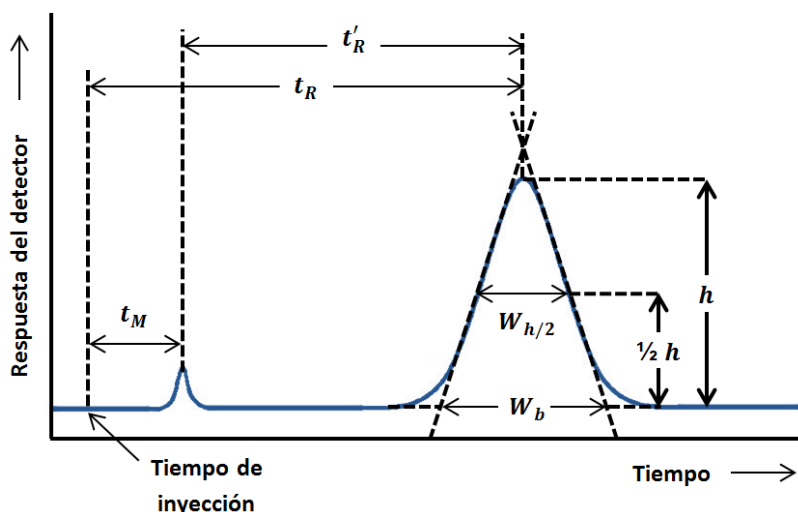


Figura 3. Representación de algunos parámetros cromatográficos.

Volumen muerto (V_M). Es el volumen de fase móvil que se requiere para eluir un analito que no es retenido por la fase estacionaria. Se puede calcular a partir del tiempo muerto y de la velocidad de flujo o caudal (u_V , volumen de disolvente que pasa por la columna por unidad de tiempo en mL/min).^[25]

$$V_M = t_M * u_V$$

Volumen de retención (V_R). Es el volumen de fase móvil necesaria para eluir un analito determinado desde el punto de inyección, pasando por la columna hasta el detector. Se puede calcular a partir del tiempo de retención correspondiente (t_R) por la velocidad de flujo.^[26]

$$V_R = t_R * u_V$$

Volumen de retención ajustado (V'_R).^[26] Representa el volumen gastado en el tiempo en que el analito permanece en la fase estacionaria y está dado por:

$$V'_R = V_R - V_M$$

Ancho de base (W_b). Es la porción de la línea base intersectada por las tangentes trazadas en las porciones de mayor pendiente de la curva, para un pico gaussiano, es definido como 4 veces la desviación estándar del pico, 4σ . Este parámetro es usado para el cálculo de la eficiencia del sistema (**Fig. 4**).^[24]

Ancho a mitad de altura de pico ($W_{h/2}$). Es el ancho de pico medida a una altura igual a la mitad de la altura del pico. Una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema (platos teóricos) (**Fig. 3 y 4**).^[24]

En la **figura 4** se muestra la determinación del ancho de base y el ancho a mitad de altura de pico.^[27]

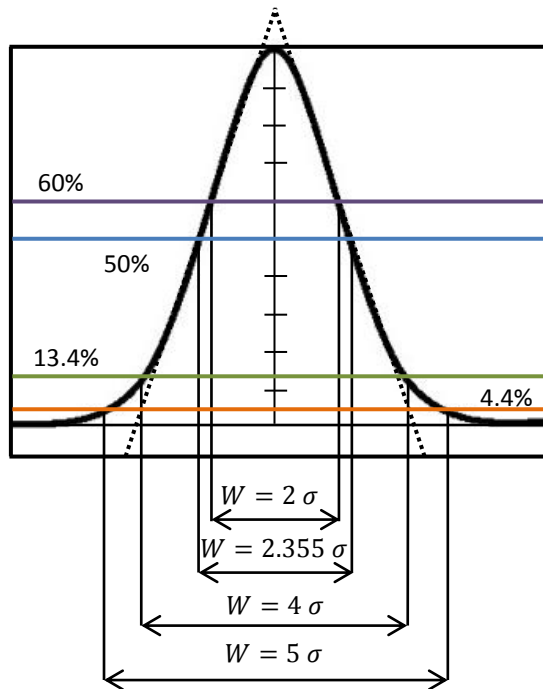


Figura 4. Procedimiento para la estimación de la varianza de un pico.

Asimetría de pico (A_s). La asimetría de pico es una medida de la calidad de la columna. Con la edad de la columna la simetría de pico generalmente se deteriora; por lo tanto, se observan picos con “coleo”. Esto es indeseable, ya que afecta la calidad de la integración de pico, especialmente cuando la relación señal-ruido es baja o cuando los picos se resuelven sólo parcialmente.^[27]

Existen varias formas de medir el “coleo” de pico. Una muy común es la relación de la anchura de la cola del pico a la anchura de la parte frontal del pico a 5 ó 10 % de la altura del pico. Una manera de calcularlo es con la ecuación:

$$A_s = \frac{t_p}{f_p}$$

Donde f_p representa el ancho de pico desde la parte frontal del pico hasta el máximo de pico y t_p representa el ancho de pico desde el máximo de pico hasta la cola de pico, medidas a una altura apropiada (**Fig. 5**).^[27]

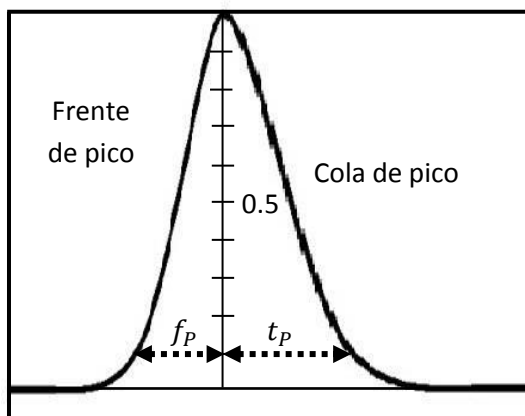


Figura 5. Determinación del factor de asimetría, en este caso al 10 % de altura de pico.

Velocidad lineal de flujo (u_x). Cuando establecemos un método cromatográfico, debemos seleccionar una velocidad de flujo. Se sabe que la elección de la velocidad de flujo influye en la contrapresión ejercida por la columna y el tiempo que tarda en completarse un análisis. Sin embargo, el parámetro subyacente que determina la hidrodinámica del sistema es la *velocidad lineal*. La velocidad lineal es nada más que una manera de normalizar la velocidad de flujo de la sección transversal de la columna.^[27]

La velocidad lineal es la distancia en centímetros recorrida por el disolvente en la fase estacionaria en un minuto^[24], y se obtiene con la siguiente ecuación:

$$u_x = \frac{L}{t}$$

Coefficiente de distribución o de reparto (K). Cuando un analito entra al sistema cromatográfico inmediatamente se reparte o distribuye entre la fase móvil y la fase estacionaria, estableciéndose un equilibrio de distribución entre el analito y las dos fases (**Fig. 6**). La concentración de analito en cada fase está dada por el coeficiente termodinámico de partición o de reparto:

$$K = \frac{C_s}{C_m}$$

Donde C_s y C_m son las concentraciones del analito en la fase estacionaria y móvil respectivamente. Cuando $K = 1$, el analito se encuentra igualmente distribuido entre las dos fases. El coeficiente de reparto determina la velocidad promedio de cada zona de analito, más específicamente, del centro de la zona de analito conforme la fase móvil avanza a lo largo de la columna. [26]

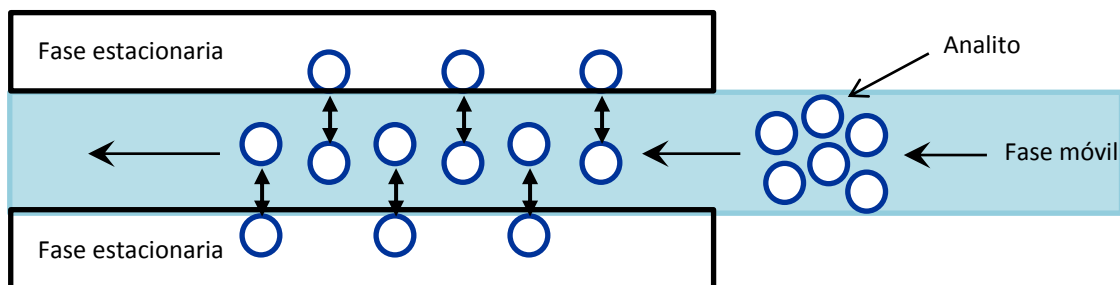


Figura 6. Equilibrio de distribución del analito entre la fase estacionaria y la móvil.

Factor de retención o de capacidad (k'). Es una medida de la retención del analito por la columna, es decir, es una medida del tiempo transcurrido en el que el analito permanece en la fase estacionaria en relación con el tiempo que permanece en la fase móvil. [26] Este factor relaciona el equilibrio de distribución de la muestra dentro de la columna con las propiedades termodinámicas de la columna y con la temperatura. [28] Se define como el cociente de los moles de un analito en la fase estacionaria entre los moles en la fase móvil:

$$k' = \frac{C_s V_s}{C_m V_m} = \frac{t'_R}{t_M} = K \frac{V_s}{V_m} = \frac{t_s}{t_m}$$

Donde V_s es el volumen de la fase estacionaria, V_m es el volumen de la fase móvil, t_s es el tiempo que pasa el analito en la fase estacionaria y t_m es el tiempo que pasa el analito en la fase móvil. El cociente V_m/V_s conocido como relación de fases, se denota por β , de manera que $k' = K/\beta$. [26]

La retención del analito en la fase estacionaria depende de la afinidad y de los factores que puedan afectar a la misma. [23]

Retención relativa o factor de selectividad (α). Es una medida de la habilidad de una columna para separar dos componentes. ^[26]

Si en la muestra existen dos componentes 1 y 2 (en donde el componente 1 eluye antes que el componente 2), la retención relativa se puede expresar como:

$$\alpha = \frac{t'_{R_2}}{t'_{R_1}} = \frac{V'_{R_2}}{V'_{R_1}} = \frac{K_2}{K_1} = \frac{k'_2}{k'_1}$$

En donde si $t'_{R_2} > t'_{R_1}$, se tiene que $\alpha > 1$. Cuanto mayor es la retención relativa, mayor es la separación entre los dos componentes. ^[26]

Los valores que puede tomar α dependen de:

- 1) la composición química de las fases estacionaria y móvil; y
- 2) la temperatura de operación de la columna.

Al escoger las fases para componentes difíciles de separar se debe procurar ser lo más selectivo posible. ^[23,24,29]

2.3.5 Eficiencia de la separación

Cuando se inyecta una pequeña cantidad de analito en una columna, se forma una banda estrecha en la parte superior de la columna. A medida que el analito migra a través de la columna, la banda se vuelve más amplia. En un lecho uniforme, la anchura del pico aumenta con la raíz cuadrada de la longitud que la banda ha viajado (**Fig. 7**). Si se inyecta una mezcla que contiene dos analitos en la parte superior de la columna, forman una banda estrecha. Si sus afinidades hacia la columna son ligeramente diferentes, éstos migrarán a velocidades ligeramente diferentes hacia el final de la columna. A medida que continúan migrando, la distancia entre los centros de las dos bandas aumenta en una relación directamente proporcional a la longitud que las bandas han recorrido (**Fig. 7**). ^[27] Dado que la distancia entre las bandas aumenta con la longitud recorrida, pero la anchura de cada uno de las bandas aumenta sólo con la raíz cuadrada de esta longitud, estas bandas en algún momento estarán completamente separadas. Cuanto más lejos migran, mejor separación tendrán. ^[27]

En la **figura 7** se muestra como el analito o analitos se desplazan a lo largo de la columna cromatográfica después de ser inyectados.

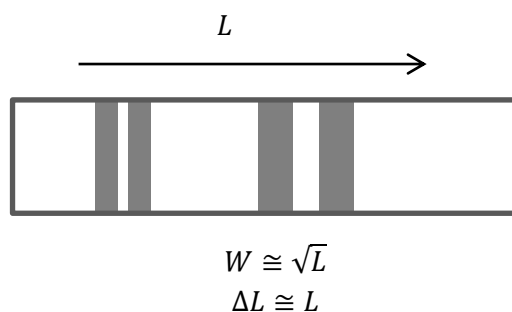


Figura 7. Conforme el analito migra a través de la columna, la banda se hace más amplia.

2.3.5.1 Altura equivalente a un plato teórico

La altura equivalente a un plato teórico (*HETP*, H), es la distancia que se mueve el analito para lograr un equilibrio y depende del diseño del sistema. La altura del plato está relacionada con la anchura del pico (cuanto más pequeña es la altura del plato, más estrecha es la banda) del analito y la distancia que recorre dentro de la columna:

$$H = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{L}{N}$$

La altura de plato puede relacionarse directamente a las condiciones experimentales y los parámetros de operación. ^[24] Para una columna eficiente H es un número pequeño.

2.3.5.2 Número de platos teóricos

La eficiencia de la columna está relacionada con el ensanchamiento de la banda que se encuentra en la columna y se expresa como un número de platos teóricos. Las columnas cromatográficas consisten de un número de zonas adyacentes en cada una de las cuales hay suficiente espacio para que un analito esté en equilibrio entre las dos fases. Cada una de estas zonas se conoce como plato teórico (de los que hay N en

cada columna) y representa un equilibrio teórico de distribución del analito entre las dos fases. ^[28,30]

Para picos gaussianos se calcula con la ecuación:

$$N = \frac{L}{H} = 16 \left(\frac{t_R}{W_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{t_R}{W_{h/2}} \right)^2$$

El número total de platos teóricos de una columna representa el poder de separación de la columna. Una buena columna tiene un número alto de platos teóricos. ^[24,26]

El valor de N es diferente para cada analito, por lo que depende del analito en estudio, así como de las condiciones de funcionamiento, tales como la velocidad de flujo y la temperatura de la fase móvil, la calidad y uniformidad del empaquetamiento dentro de la columna, el diámetro interno y la longitud de la columna. Por lo que es importante que las comparaciones sean hechas bajo condiciones idénticas. Además, sólo se puede determinar el valor de N en cromatogramas isocráticos y no en cromatogramas de gradiente, ya que el procedimiento es diferente. ^[25,27]

2.3.6 Resolución

El grado de separación o resolución de dos picos adyacentes se define como la distancia entre los centros de los picos dividida entre el promedio del ancho de los picos. ^[27]

Si la retención y el ancho de los picos se mide en unidades de tiempo (**Fig. 8**), la resolución está dada por:

$$R_s = \frac{2 (t_{R,2} - t_{R,1})}{W_{b,1} + W_{b,2}}$$

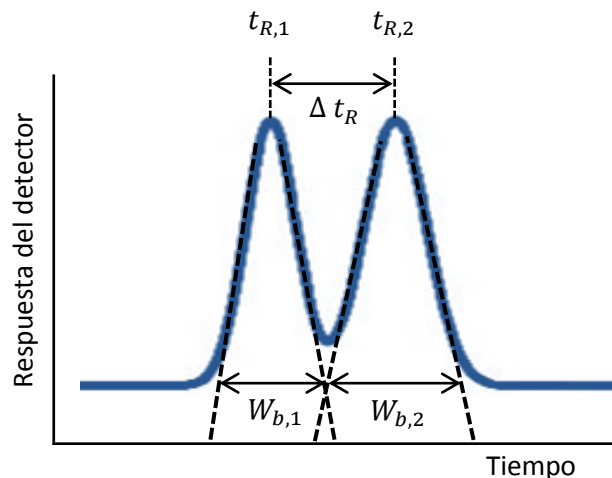


Figura 8. Definición de la resolución en un sistema cromatográfico.

La resolución mínima aceptable para mezclas sencillas es de 1.0, mientras que un valor de 1.5 representa una separación a la línea base de picos de tamaño similar (Fig. 9).^[27,28] Una buena separación hace que se puedan medir los tamaños de pico apropiadamente por lo que se obtiene una cuantificación fiable.

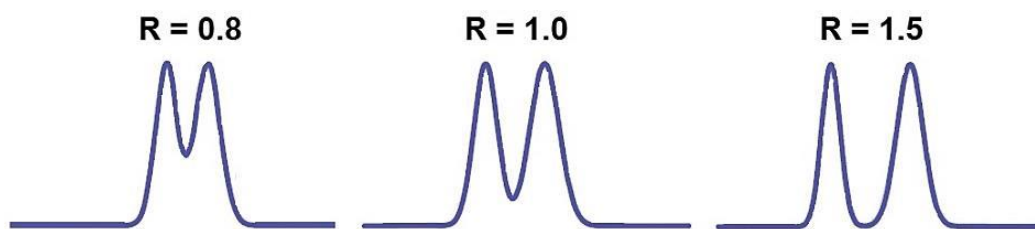


Figura 9. Valores de resolución entre dos picos cromatográficos.

La resolución está en función de la selectividad, la eficiencia y la capacidad del sistema cromatográfico, dado que son los tres parámetros más importantes en una columna cromatográfica, su expresión analítica es:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k'_2}{1 + k'_{prom}} \right)$$

Donde N es el número de platos teóricos, α es la retención relativa de los dos picos, k'_2 es el factor de capacidad del componente más retenido y k'_{prom} es el promedio de

los factores de capacidad de ambos componentes. En el caso de que el valor de N de los dos picos sea diferente se deberá sustituir \sqrt{N} por $\sqrt{N_1 N_2}$ y k'_2 por k'_{prom} .^[24,27]

De esta ecuación se deduce que la resolución depende de la retención y la selectividad de manera proporcional. Por lo que a mayor selectividad y retención se tiene mayor resolución. Para lograr una buena separación se recomienda trabajar con $k' > 2$ y $\alpha \approx 1$.^[24,30]

La separación de los picos se mejora a mayores valores de R_s (**Fig. 9**). La separación de dos picos es mejor si éstos son de igual tamaño, por lo que se requiere que aumente el valor de R_s para picos que no sean iguales. De esta forma, la resolución que presentan dos picos adyacentes se puede mejorar aumentando la separación de los picos o disminuyendo el ancho de los mismos.^[30] Un valor de resolución bajo puede deberse a que el método utilizado no es el apropiado ya que no puede discriminar entre los solutos o que el tamaño de la muestra inyectada en la columna cromatográfica es muy grande.^[30]

2.3.7 Ecuación de van Deemter de altura de plato

La ecuación de van Deemter nos da una idea de cómo influye la columna y el caudal en la altura de plato:

$$H = A + \frac{B}{u_x} + C u_x$$

Donde u_x es la velocidad lineal del flujo y A , B y C son constantes para una columna y una fase estacionaria dadas. Es decir, al cambiar la columna y la fase estacionaria cambian los valores de A , B y C .^[24]

En esta ecuación el primer término, conocido como término de los *camino múltiples* o anteriormente de *difusión de Eddy* (independiente de la velocidad lineal), está en función del tamaño y distribución de los canales entre partículas y otras

uniformidades en el empaquetamiento. El segundo término (término de la *difusión longitudinal*), que es inversamente proporcional a la velocidad lineal, describe la difusión molecular a lo largo del eje de la columna. El último término (conocido como *tiempo de equilibrado* o *término de transferencia de masa*, y que se debe al tiempo finito que necesita el analito para alcanzar el equilibrio entre las fases estacionaria y móvil) es directamente proporcional a la velocidad lineal y contiene todos los términos relacionados con la transferencia de masa: resistencia a la transferencia en la fase móvil y la resistencia de transferencia de la fase estacionaria (**Fig. 10**).^[27]

En la **figura 10** se muestra la gráfica de la ecuación de van Deemter así como de cada uno de sus términos individuales.^[26]

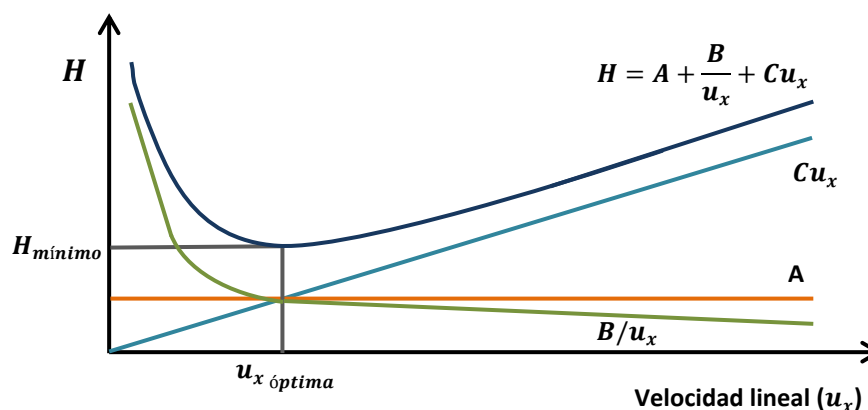


Figura 10. Relación entre H y la velocidad lineal.

La ecuación de van Deemter nos dice que existen diferentes mecanismos de ensanchamiento de banda que son proporcionales a la velocidad de flujo, otros inversamente proporcionales a la velocidad de flujo y otros independientes de la velocidad. Todos estos términos contribuyen al ensanchamiento de banda cuando se usan columnas empaquetadas, es decir, A, B y $C \neq 0$.^[24]

2.4 CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN

La *cromatografía de líquidos de alta resolución, alta presión o alto desempeño* (HPLC por sus siglas en inglés) comprende todas las técnicas cromatográficas en las que se requiere el uso de presiones elevadas para forzar el paso del disolvente (fase móvil) a través de una columna que contiene partículas muy finas, dando como resultado separaciones de gran resolución. Es por lo cual en ocasiones se le conoce como cromatografía de líquidos de alta presión. La cromatografía HPLC es una técnica analítica de separación que permite detectar y cuantificar analitos de interés en matrices y mezclas más o menos complejas. Además, se utiliza para separar y purificar compuestos. Una de las ventajas que se presenta al utilizar esta técnica, es que no está limitada por la volatilidad o la estabilidad térmica de la muestra, de modo que se pueden separar macromoléculas y especies iónicas, productos naturales lábiles, materiales poliméricos y una gran variedad de otros grupos polifuncionales con alta masa molecular.^[27,28]

De acuerdo con la naturaleza de las fases, las modalidades de HPLC más utilizadas son las de *reparto*, de *adsorción*, en *fase inversa*, *intercambio iónico*, *pares iónicos* y *exclusión molecular*, además de la cromatografía de líquidos *quiral* y la cromatografía de *afinidad*.^[23,25]

2.4.1 Instrumentación general

La cromatografía en columna se realiza en un equipo instrumental (**Fig. 11**) que consta de las siguientes partes fundamentales:

- 1) **fuelle de fase móvil** – Recipiente elaborado con un material que es inerte a la fase móvil y además depende fundamentalmente del tipo de fluido que se utilice.^[23]
- 2) **sistema de bombeo** – Es el sistema de regulación y medida del caudal o la presión de la fase móvil. Para conocer la calidad de una bomba en HPLC es necesario conocer si se produce un flujo constante, reproducible y controlado. De tal forma que un caudal que fluctúa origina ruido en el detector por lo que no se podrían ver señales

débiles. Las bombas usadas en HPLC deben estar construidas de un material inerte a la fase móvil, poder trabajar a presiones elevadas y suministrar flujos adecuados al diámetro de la columna empleada y libre de pulsaciones para no disminuir la sensibilidad de la detección.^[23]

3) **sistema de inyección de la muestra** – Dispositivo que permite introducir la muestra en la corriente de fase móvil.^[23]

4) **columna cromatográfica** – Es la parte fundamental ya que en ella se lleva a cabo la separación. Para seleccionar una columna para una aplicación en particular, se debe tener en mente: a) la selección de la química del empaquetamiento que sea el más apropiado para llevar a cabo la separación y b) la selección de las propiedades físicas de la columna, especialmente el tamaño de partícula y las dimensiones de la columna. La columna cromatográfica es un tubo construido de diversos materiales (metal, vidrio, sílice fundida, polímeros, etc.) de una longitud que puede oscilar entre varios centímetros y más de un centenar de metros, cuyo diámetro interno varía entre varios micrómetros y varios centímetros.^[23]

5) **controlador de temperatura** – Es un recipiente termostatado que controla la temperatura de la columna. Al elevar la temperatura dentro de la columna, disminuye la viscosidad del disolvente reduciendo así la presión requerida o permitiendo un mayor caudal. Al aumentar la temperatura se acortan los tiempos de retención y se mejora la resolución ya que se aumenta la velocidad de difusión de los analitos. Pero por otro lado, al aumentar la temperatura se puede degradar la fase estacionaria y a su vez reducir la vida útil de la columna.^[24] En cromatografía de líquidos es frecuente trabajar a temperatura ambiente, en cuyo caso se prescinde de este componente.^[23]

6) **sistema de detección** – Es el dispositivo que mide en continuo y transforma en una señal eléctrica una propiedad, generalmente física, de la fase móvil, que se ve ampliamente alterada por la presencia de pequeñas concentraciones de otras sustancias (componentes de la muestra). Un detector ideal no debe ensanchar los picos del cromatograma y no debe ser sensible a variaciones de temperatura ni a la composición del disolvente.^[23]

Características esenciales de los detectores

En las técnicas de HPLC se han usado diferentes tipos de detectores, pero la elección del detector conveniente debe hacerse siempre con base en el problema a resolver.^[31]

Los puntos más importantes a cubrir por un detector son:

- a) alta sensibilidad en la medición y tiempos de respuesta cortos,
- b) señal de medición proporcional a la concentración del analito (con intervalo lineal grande),
- c) cambios pequeños en la señal de fondo,
- d) ruido de fondo bajo y
- e) disminuir el volumen como sea posible para reducir el ensanchamiento al máximo.

- *Sensibilidad*. Un detector debe ser sensible a pequeñas concentraciones de analito. La sensibilidad se define como la relación entre la señal generada por el detector en un momento dado (ΔR) y la concentración (ΔQ) del analito que la produce ^[23], es decir:

$$S_D = \frac{\Delta R}{\Delta Q}$$

- *Línea base*. Es la señal que se obtiene cuando no llega al detector más sustancia que la fase móvil, estando el detector operando y conectado todo el sistema. Esta señal corresponde a la fase móvil o tampón de separación más las impurezas del sistema. En condiciones idóneas debe tener un valor relativamente constante. ^[23]

- *Deriva*. Es la pendiente media de la línea base a lo largo del tiempo. Puede ser positiva, negativa o variable, aunque lo deseable es que sea cero. Se produce por causas muy diversas pero que tienen en común la variación de un parámetro de control de la separación (temperatura, composición de la fase móvil, presión, intensidad del campo eléctrico, etc.). ^[23]

- *Ruido de fondo*. Se denomina *ruido* a cualquier alteración de la línea base producida durante un cromatograma por causas ajenas a los compuestos inyectados. Cualquier tipo de ruido puede producir interferencias en la detección y determinación cuantitativa de las sustancias. ^[23]

- *Tiempo de respuesta*. El cual refleja la *inercia* del sistema de detección frente a cambios bruscos de la concentración de los analitos.^[23]

En HPLC los detectores más comunes son los de ultravioleta, de índice de refracción, de dispersión de luz, electroquímicos, de fluorescencia, de conductividad y en sistema acoplado a un espectrómetro de masas.

7) **integrador o registrador** – Es el sistema de amplificación y tratamiento de la señal eléctrica generada en el detector. El tratamiento puede incluir la adquisición y almacenamiento de datos y ciertos cálculos mediante un sistema informático.^[23]

En la **figura 11** se presenta el esquema básico de un sistema cromatográfico de líquidos, el cual está constituido de un reservorio que contiene la fase móvil, un sistema de bombeo de alta presión, un inyector, la columna cromatográfica o analítica, un detector y un sistema de registro y procesamiento de datos.

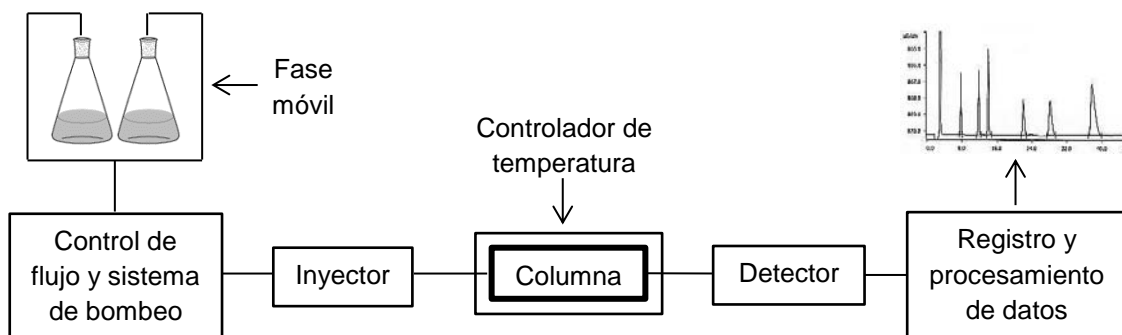


Figura 11. Esquema básico de un cromatógrafo de líquidos.

2.4.2 Fases móviles

La fase móvil tiene un papel primordial en el proceso de cromatografía de líquidos en lo que respecta a las interacciones con el analito. En HPLC la naturaleza de la fase móvil se puede cambiar de manera casi ilimitada, de tal forma que su modificación permite variar ampliamente la *selectividad* y controlar la separación de los componentes de la muestra, aun cuando se cuente con un número limitado de fases estacionarias. Al variar las relaciones de fase móvil y fase estacionaria, así como otros

parámetros de operación, se puede afectar el grado de retención, desde obtener la retención total hasta la migración libre.^[23]

2.4.3 Tipos de elución

En cromatografía de adsorción el disolvente compite con las moléculas del analito por ocupar los sitios activos de la fase estacionaria (**Fig. 12**).^[24] Se denomina *fuerza eluyente* o *poder de elución* de una fase móvil a su capacidad de eluir un analito dado desde una fase estacionaria determinada. Es decir, un disolvente D_1 presentará mayor fuerza eluyente que otro disolvente D_2 si un analito tiene un factor de retención menor en la misma columna cuando se emplea D_1 como fase móvil que cuando se emplea D_2 .^[23]

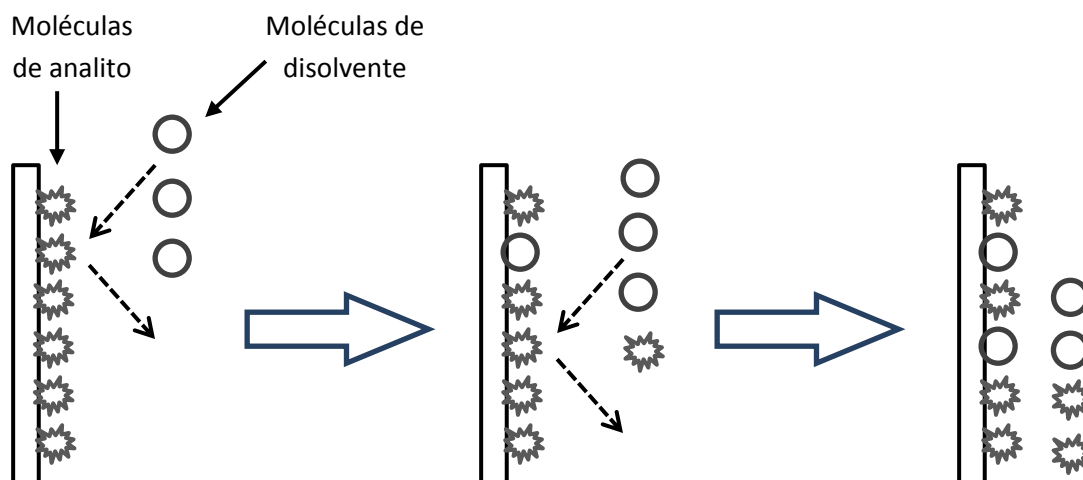


Figura 12. Proceso de elución: etapas sucesivas de intercambio del analito por el disolvente.

Por ejemplo, en la cromatografía de líquidos de fase inversa, cualquier disolvente orgánico (metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano) es un disolvente fuerte en comparación con el agua, que es el disolvente más débil utilizado en esta técnica. En una fase móvil formada por la mezcla de agua y un disolvente orgánico, cuanto mayor sea la proporción de este último mayor será la fuerza eluyente, debido a que los analitos estarán menos retenidos cuanto mayor sea la concentración de disolvente orgánico en la fase móvil.^[23]

En cromatografía de líquidos existen dos estrategias generales para llevar a cabo una separación:

- *Elución isocrática*. Todas las condiciones y configuraciones de la separación permanecen constantes. La fuerza eluyente de la fase móvil permanece constante durante el análisis. Se emplea generalmente cuando los componentes de la muestra presentan factores de retención semejantes, por lo que casi siempre es posible encontrar una composición de fase móvil en la cual todos los analitos se eluyen con un intervalo de retenciones razonable con una resolución óptima. ^[23]

- *Elución en gradiente*. En este tipo de elución uno o más parámetros cambian de forma continua, en la mayoría de los casos sólo se varía un parámetro. Por ejemplo, se modifica el poder de elución de la fase móvil a lo largo del análisis. Esto se logra cambiando la composición de la fase móvil que entra en la columna. También se puede usar un gradiente de temperatura o un gradiente de flujo. Se emplea en la separación de mezclas complejas, formadas por analitos de distinta naturaleza y que poseen un amplio intervalo de factores de retención. ^[23]

2.4.4 Fases estacionarias

La eficacia de una columna empaquetada aumenta al disminuir el tamaño de las partículas de la fase estacionaria. Una razón por la que al usar partículas pequeñas se obtiene mejor resolución es porque permiten que haya un flujo más uniforme a través de la columna. Otra razón es que entre más pequeñas sean las partículas, menor es la distancia en la que se debe difundir el analito en la fase móvil. Por el contrario, la desventaja que se presenta con las partículas pequeñas es que oponen resistencia al flujo del disolvente. ^[24]

En HPLC el soporte más común son las partículas microporosas de forma esférica de sílice muy pura, que son permeables al disolvente y tienen un área superficial de

varios centenares de metros cuadrados por gramo. La sílice se disuelve en agua a pH superior a 8, por lo que se recomienda que no se use por arriba de este valor. Dependiendo de la calidad de sílice, se puede obtener estabilidad hasta valores de pH de 9 ó 10. Cuando se analizan compuestos con pH básico, entre 8 y 12, se pueden usar soportes poliméricos, como el poliestireno.^[24]

2.5 CROMATOGRAFÍA DE IONES

La cromatografía de iones o cromatografía iónica (IC por sus siglas en inglés) es una técnica analítica usada para la separación y determinación de analitos iónicos presentes generalmente en agua.^[32]

Los tipos de analitos que pueden ser determinados usando esta técnica son:

- aniones inorgánicos como Br^- , F^- , Cl^- , NO_3^- , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} , etc.,
- cationes inorgánicos como metales alcalinos, alcalinotérreos, metales de transición, a excepción de complejos metálicos neutros,
- ácidos orgánicos como los ácidos carboxílicos, ácidos sulfónicos, etc.,
- bases orgánicas como las aminas y
- compuestos organometálicos iónicos.

Dentro de la IC se encuentra la cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión de iones y la cromatografía de formación de pares iónicos.^[31]

- La *cromatografía de intercambio iónico* se basa en reacciones químicas estequiométricas de intercambio entre iones presentes en una solución y una sustancia sólida que contiene grupos funcionales cargados eléctricamente, los cuales atraen a los iones como resultado de las interacciones electrostáticas.^[31]

Para los *intercambiadores aniónicos*, existen grupos cargados positivamente en la fase estacionaria y atraen los aniones del analito. En los *intercambiadores catiónicos*, la fase estacionaria contiene puntos cargados negativamente (unidos covalentemente) que atraen los cationes del analito.^[24]

- La *cromatografía de exclusión de iones* se aplica particularmente en la separación de ácidos y bases débiles tales como ácidos carboxílicos, carbohidratos, fenoles y aminoácidos. En este procedimiento no hay implicada una interacción química o física entre los analitos y la fase estacionaria. ^[31]

- La *cromatografía de formación de pares iónicos* se utiliza para la separación y determinación de especies iónicas. La fase móvil está constituida por una disolución acuosa amortiguadora que contiene un disolvente orgánico que puede ser metanol o acetonitrilo y un compuesto iónico que aporta un contraion de carga opuesta a la del analito. Este contraion se combina con el ion del analito para formar una pareja de iones que es neutra, la cual es retenida por la fase estacionaria. ^[31]

Existen dos tipos de cromatografía iónica: *basadas en supresores* y de *columna sencilla*. Difieren en el método usado para evitar que la conductividad del electrolito que se eluye interfiera con la medición de la conductividad de los analitos. ^[21,24]

2.5.1 Fundamento de la cromatografía de iones

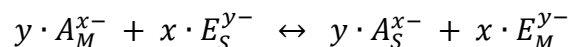
La IC favorece la separación de iones y compuestos polares. En esta técnica se utilizan fases estacionarias que contengan zonas iónicas que son capaces de crear interacciones dipolares con los analitos contenidos en la muestra. Aquellos componentes que posean mayor carga son retenidos fuertemente por la fase estacionaria por lo que se mueven lentamente con el flujo de la fase móvil. Por otro lado, los componentes que se unen débilmente a la fase estacionaria se mueven con mayor rapidez. ^[22,33]

La selectividad en la cromatografía de intercambio iónico depende no sólo de la naturaleza y número de grupos iónicos en la matriz, sino también depende del pH y de la fuerza iónica. ^[28]

2.5.2 Modelos de retención

En IC la retención de un analito se determina por la afinidad que presenta hacia los grupos funcionales encontrados en la fase estacionaria. ^[31]

Cromatografía de aniones. Para el caso más sencillo en el que los eluyentes sólo contienen un anión, se tiene que al inicio del proceso cromatográfico los sitios de intercambio en una columna de separación son ocupados por los aniones encontrados en el eluyente (E^{y-}). Estos posteriormente son intercambiados por los aniones del analito (A^{x-}), esto es debido a que existe una competencia entre éstos por los grupos funcionales encontrados en la fase estacionaria:



Cuando en la fase móvil se encuentra un anión se debe tener en consideración que:

- se aumenta la elución al incrementar la concentración del eluyente [E^{y-}],
- los analitos multivalentes (A^{nx-}) son retenidos más fuertemente que los analitos monovalentes (A^{x-}),
- los eluyentes multivalentes (E^{ny-}) tienen mayor poder de elución que los eluyentes monovalentes (E^{y-}).

En la práctica varias especies se encuentran presentes en el eluyente, pero la especie que esté presente depende fuertemente del pH del eluyente.

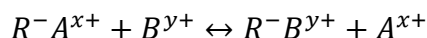
Si A y B tienen carga diferente, entonces la selectividad ($\alpha_{A,B}$) depende del factor de retención de uno o de los dos analitos. ^[31]

Cromatografía de cationes: la cromatografía de cationes se debe dividir en dos grupos de modelos de retención. Uno de ellos es para los cationes alcalinos, alcalinotérreos, amonio y aminos de cadena corta, los cuales sólo requieren de un sistema de elución basado en el desplazamiento isoiónico (como en el caso de la cromatografía de aniones). Por otro lado, en la separación de iones con dos o más cargas se usa un agente complejante. ^[31]

Si varias especies catiónicas de un mismo metal están presentes, normalmente sólo se obtiene un pico en el cromatograma. Se obtiene solamente un pico si los equilibrios de formación de complejos se alcanzan más rápidamente en la fase móvil en comparación con el tiempo de residencia del complejo en la fase estacionaria. Si el proceso de formación del complejo ocurre lentamente entonces los picos obtenidos serán múltiples o asimétricos.^[31]

2.5.3 Selectividad en el intercambio iónico

La selectividad y la fuerza de elución dependen de parámetros como el tipo y concentración de iones en la fase móvil y el pH. Además de la concentración del contraion, su naturaleza también influye sobre su retención a través de la constante de equilibrio del intercambio:



Donde se tiene que:

$$K = \frac{[R^-B^{y+}][A^{x+}]}{[R^-A^{x+}][B^{y+}]}$$

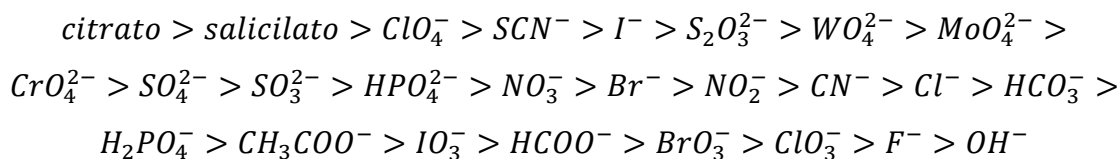
Al valor de K se le conoce como *coeficiente de selectividad* y refleja la relación de afinidad del intercambiador iónico por el analito y el contraion.^[23]

La selectividad^[32] que presente el intercambiador se ve afectada por:

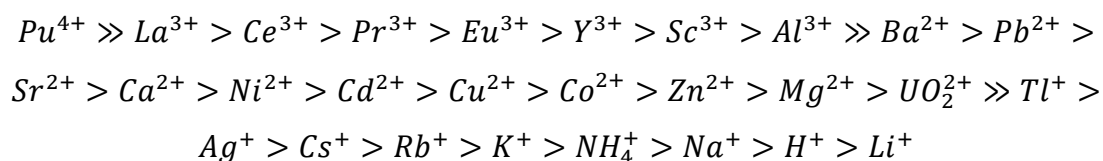
- la carga del ion,
- el tamaño del ion solvatado,
- el grado de entrecruzamiento del intercambiador,
- la polarizabilidad que presenta el ion,
- la capacidad intercambiadora de la fase estacionaria,
- el tipo de grupos funcionales presentes en la fase estacionaria y
- la amplitud de las interacciones con la matriz de la fase estacionaria.

Generalmente, los intercambiadores iónicos fijan preferentemente los iones que tienen mayor carga, menor radio hidratado y mayor polarizabilidad.^[23,24,32]

Los analitos presentes en una muestra, dependiendo de la naturaleza del anión en la fase móvil, presentan el siguiente orden de selectividad:



Y un orden general de selectividad para cationes es:



2.5.4 Fases estacionarias

Las fases estacionarias deben presentar una distribución granulométrica comprimida (monodispersa), tener gran superficie específica, presentar resistencia mecánica, permanecer estables a valores de pH ácidos o básicos y ser capaces de asegurar una transferencia rápida de iones. Para que la IC sea eficiente se requiere que los materiales de empaquetamiento estén hechos de partículas muy pequeñas, tan esféricas como sea posible, éstas por lo general presentan un diámetro que va de los 2 a 10 μm . Se pueden usar diferentes materiales orgánicos e inorgánicos, lo que todos tienen en común es que en sus superficies contienen grupos funcionales que son aptos para llevar a cabo el intercambio de iones. Los materiales más empleados son las resinas orgánicas poliméricas modificadas, sílica gel modificada, sales inorgánicas, cristales, zeolitas, óxidos metálicos y derivados de celulosa. Todas las fases estacionarias se pueden diferenciar de acuerdo con el tipo de aplicación (cromatografía catiónica o aniónica) y con el tipo de estructura del grupo funcional. Aunque tengan un buen funcionamiento al momento de la separación y una buena estabilidad mecánica, su inestabilidad química indica que sólo pueden ser utilizadas en valores de pH entre 2 y 12. ^[31,33]

En los *intercambiadores de aniones* aparentemente los únicos grupos funcionales utilizados son los basados en nitrógeno (desde aminas primarias hasta las aminas cuaternarias, todas tienen en común que presentan carga positiva), los cuales son fijados en el polímero correspondiente. El uso de compuestos de nitrógeno es debido principalmente a su buena e inusual estabilidad química y al número ilimitado de sustituyentes posibles.^[31]

En los *intercambiadores de cationes* se utilizan materiales basados en sílica gel y materiales basados en polímeros.^[31]

Intercambiadores de cationes basados en sílica gel. En este tipo de intercambiadores existen dos grupos, los basados en *sílica funcionalizada*, donde un grupo funcional está químicamente unido a las partículas de sílica; y los basados en sílica cubierta de un polímero, en ellos las partículas de sílica son recubiertos con una capa de polímero, el cual puede ser poliestireno, silicona o fluorocarbono. Las fases estacionarias que son a base de sílica tienen las ventajas de que presentan buena eficiencia cromatográfica, estabilidad y durabilidad a altas presiones.^[32]

A pesar de esto, presentan ciertas desventajas, la primera es que presentan un intervalo de pH limitado ($2 < \text{pH} < 7$).^[31,32]

- a pH menor a 2 los enlaces entre el silicón y los grupos funcionales se hacen más débiles; esto lleva a una erosión de los grupos funcionales y genera una disminución en su capacidad intercambiadora.

- a pH mayor a 7 aumenta considerablemente la solubilidad de la sílica gel, lo que genera una reducción en la estabilidad mecánica del empaque.

Otra desventaja que tienen es la afinidad que presentan los grupos de silanol libres de la superficie hacia los iones metálicos con alta densidad electrónica, como los metales de transición, ya que éstos son adsorbidos irreversiblemente en la superficie causando interferencias en los análisis.^[32]

Intercambiadores de cationes basados en polímeros orgánicos (resinas). La matriz consiste en resinas copolimerizadas de estireno-divinilbenceno (PS-DVB) o copolímeros de divinilbenceno-ácido acrílico o metacrílico (PMMA). Este tipo de materiales son estables en el intervalo de pH de 0 - 14 y son inertes gracias al fluoruro que contienen. Debido a que su resistencia a la presión es baja, en comparación con los que están basados en sílica gel, la longitud y velocidades de flujo son limitadas.^[31,32]

Intercambiadores de cationes peliculares. Un polímero conocido como látex, preparado a partir de un monómero portador de funciones orgánicas se deposita en forma de minúsculas esferas agregadas (0.1 - 0.2 μm de diámetro) para obtener una película continua de 1 - 2 μm de espesor sobre un soporte impermeable, constituido por microesferas de sílice, vidrio o poliestireno, con un diámetro de 25 - 50 μm . La fijación se lleva a cabo mediante interacciones electrostáticas e interacciones de van der Waals. La desventaja que presenta este tipo de materiales es su sensibilidad a los disolventes orgánicos y a fases móviles con fuerza iónica elevada.^[31,33]

2.5.5 Fases móviles

La fase móvil es el parámetro más fácil de modificar si se desea influenciar una separación. El poder de elución se puede controlar modificando la fuerza iónica, el tipo de aniones o el pH. Las fases móviles usadas en IC son normalmente disoluciones acuosas saturadas de iones salinos u orgánicos, y si es necesario, un poco de metanol o acetona para facilitar la disolución de ciertos componentes.^[31-33]

Para lograr una buena elección del eluyente^[31,32], se deben tomar en cuenta varios criterios:

- compatibilidad con el método de detección, con o sin supresión,
- la naturaleza química y concentración del ion del eluyente,
- el pH,

- la capacidad amortiguadora (buffer) y
- el contenido del disolvente orgánico (modificantes).

Según el tipo de relleno de la columna, los iones del eluyente pueden ser aportados por ácidos minerales u orgánicos (ácido perclórico, benzoico, ftálico, metasulfónico, etc.), así como también por bases (hidróxido de potasio, carbonato, etc.). El pH se ajusta en función de la separación a realizar. Una desventaja que presentan las disoluciones básicas es que presentan una tendencia a carbonatarse por absorción de dióxido de carbono del aire ambiental de modo que se ve afectado el tiempo de retención.^[33]

2.5.6 Tipos de detectores en cromatografía de iones

En IC existen diferentes tipos de detectores, entre ellos se encuentran los detectores de conductividad, detectores electroquímicos (amperométricos o coulombimétricos), detectores potenciométricos, detectores espectroscópicos y los detectores de reacción postcolumna.^[32]

El detector más frecuentemente usado en IC es el de *conductividad* ya que se basa en la propiedad que tienen los electrolitos de conducir la corriente eléctrica. Aquí se mide la conductancia (inverso de la resistencia) de la fase móvil entre dos microelectrodos que se encuentran en la salida de la columna. Para poder hacer una medida directa es necesario utilizar un eluyente con pequeña concentración de iones, que tenga una conductancia débil y disponer de una celda termostataada a 0.01 °C, debido al efecto pronunciado de la temperatura sobre la conductancia ($\sim 5\% \cdot ^\circ\text{C}^{-1}$). Se puede conocer la sensibilidad de la detección de un ion X (valencia Z y concentración molar C) conociendo su conductancia equivalente (Λ_X) y la del ion eluyente E (Λ_E). Se calcula el valor de ΔK , que dependiendo del signo el pico podrá ser positivo o negativo:

$$\Delta K = C \cdot z \cdot (\Lambda_X - \Lambda_E)$$

La conductancia $G = 1/R$ (en donde R es la resistencia medida entre dos electrodos en los que se mantiene una diferencia de potencial y que están sumergidos en la disolución conductora). La conductancia se expresa en unidades de *siemens* (S). Para un ion dado, la conductancia de la disolución varía según la concentración del electrolito. La relación es lineal para disoluciones muy diluidas. La conductancia específica (Sm^{-1}) o conductividad k es independiente de los parámetros de la celda:

$$k = G \cdot K_{cel}$$

El término $K_{cel} = d/S$ determina la constante de la celda (superficie S y separación d). Su valor no se obtiene por medición directa, sino que se determina a partir de una disolución patrón de la que se conoce la conductividad K .^[33]

La conductancia equivalente iónica ($\text{Sm}^2\text{mol}^{-1}$) (**tabla 2**) representa la conductividad de un ion de valencia Z , en disolución acuosa a 25 °C, en la que la concentración molar C (mol/L) tiende hacia cero en agua:

$$\Lambda_0 = 1.000 \cdot k/C \cdot Z$$

Tabla 2. Valor de conductividad equivalente de algunos iones a dilución infinita en agua a 25 °C.

Catión	$\Lambda_0 (\text{Sm}^2\text{mol}^{-1}) \times 10^{-4}$	Anión	$\Lambda_0 (\text{Sm}^2\text{mol}^{-1}) \times 10^{-4}$
H^+	350	OH^-	198
Na^+	50	F^-	54
K^+	74	Cl^-	76
NH_4^+	73	Br^-	78
$\frac{1}{2} \text{Mg}^{2+}$	53	HCO_3^-	45
$\frac{1}{2} \text{Ca}^{2+}$	60	H_2PO_4^-	33

2.5.7 Técnicas de detección

En un arreglo clásico de un sistema cromatográfico de líquidos, si se conecta la columna de separación directamente a un detector se le denomina *cromatografía de iones no suprimida*. El eluyente que contiene al analito deja la columna de separación y no es alterado químicamente. En este caso se debe considerar la compatibilidad del eluyente con el detector. En principio se pueden usar cualquier tipo de detectores en IC no suprimida.^[31]

Técnica de supresión (cromatografía de supresión de iones o cromatografía iónica con supresión química). En un eluyente fuertemente iónico puede ser difícil distinguir entre la señal producida por pequeñas concentraciones de iones. Por lo que para mejorar la sensibilidad en la detección, un supresor es introducido entre la columna de separación y el detector. Este supresor tiene como finalidad reemplazar los iones iniciales del eluyente por otros de conductividad más baja.^[31,33]

El fundamento de la cromatografía con supresión de iones es la *eliminación del electrolito que no interesa, antes de medir la conductividad*.^[24]

2.6 VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validar un procedimiento de ensayo es documentar su calidad, por lo que es necesario verificar experimentalmente que este procedimiento cumple con los criterios de calidad establecidos por el cliente o el usuario del procedimiento.^[34] Los criterios de calidad, parámetros de calidad u otras características de un método analítico se definen por la aplicación de este método a un determinado tipo de muestras. Por lo que si se cambia de muestra, método o laboratorio es necesario volver a verificar los criterios de calidad. Los criterios de la calidad en un método analítico pueden ser del tipo *estadístico, operativo y económico*.^[34]

2.6.1 Definiciones de Validación

La ISO define a la *Validación* como la “confirmación mediante examen y suministro de evidencia objetiva de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto”.^[35]

La validación es el proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.^[36]

Es una adaptación específica de una técnica analítica para un propósito de medición seleccionado, es un procedimiento para establecer por medio de estudio de laboratorio una base de datos que demuestren científicamente que un método analítico tiene las características de desempeño que son adecuadas para cumplir los requerimientos de las aplicaciones analíticas pretendidas.^[37]

Por lo que se puede decir que la *Validación de un Método* consiste en el proceso de establecer las características de desempeño y limitaciones de un método y la identificación de las influencias que pueden modificar esas características y hasta qué punto. Así también, es el proceso de verificación de que un método es adecuado a su propósito, es decir, es adecuado para resolver un problema analítico en particular.^[38]

2.6.2 ¿Cuándo es necesario validar un método?

Un método debe validarse cuando sea necesario verificar que sus parámetros de desempeño son adecuados^[38], por ejemplo:

- un nuevo método desarrollado para un problema específico;
- un método ya establecido revisado para incorporar mejoras o extenderlo a un nuevo problema;
- cuando el control de calidad indica que un método ya establecido está cambiando con el tiempo;

- cuando un método establecido es usado en un laboratorio diferente o con diferentes analistas o con diferente instrumentación;
- para demostrar la equivalencia entre dos métodos, por ejemplo, entre un método nuevo y uno de referencia.

La necesidad de validar un método es para cumplir con requisitos establecidos en normas o por organismos internacionales tales como las Normas Oficiales Mexicanas (NOM), la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), las Normas Mexicanas (NMX), los Métodos Oficiales del AOAC (Association of Official Analytical Chemists), Standard Methods, Environmental Protection Agency (EPA), Pesticide Analytical Manual (PAM), Collaborative International Pesticides Analytical Council (CIPAC), United States Pharmacopoeia (USP), British Pharmacopoeia (BP), American Society for Testing Materials (ASTM), International Standard Organization (ISO 17025 Acreditación de Laboratorios de Ensayo y de Calibración); ISO 15189 (Acreditación de Laboratorios Clínicos), Food and Agriculture Organization (FAO), la OMS, la ICH (Conferencia Internacional Tripartita sobre Armonización), Codex Alimentarius, Food and Drug Administration (FDA), European Commission (CE), United States Department of Agriculture (USDA).^[38,39]

2.6.3 Parámetros de desempeño a validar en un método de análisis

En un proceso de validación de método, los estudios para determinar los parámetros de desempeño se realizan usando equipos dentro de especificaciones, que están trabajando correctamente y que están adecuadamente calibrados. Asimismo, el operador que realiza los estudios debe ser técnicamente competente en el campo de trabajo bajo estudio y debe poseer suficiente conocimiento sobre el trabajo a realizar con el fin de que sea capaz de tomar decisiones apropiadas a partir de las observaciones hechas mientras avanza el estudio.^[38]

El laboratorio tiene que decidir cuáles de los parámetros de desempeño del método necesitan caracterizarse. De acuerdo con el tipo de método se recomienda evaluar ciertos parámetros, los cuales se muestran en la **tabla 3**.^[39]

Tabla 3. Parámetros recomendados a evaluar según el tipo de prueba.

Parámetro de desempeño	Tipo de prueba					
	Espectrofotométrica	Cromatográfica	Potenciométrica	Volumétrica	Gravimétrica	Física
Intervalo lineal y de trabajo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Límite de detección	Si ^a	Si ^a	No	No	No	Si ^b
Límite de cuantificación	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	Si ^a	No
Recuperación	Si	Si	No	Si	Si	No
Sesgo	Si	Si	Si	Si	Si	No
Repetibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Reproducibilidad	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Incertidumbre	Si	Si	Si	Si	Si	Si ^c
Sensibilidad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si ^e	Si ^d	No
Selectividad	Si ^d	Si ^d	Si ^{d,e}	Si	Si	Si ^b
Robustez	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d	Si ^d

^a Sólo para análisis a nivel de trazas (ppm, ppb, ppt)

^b Sólo métodos cualitativos

^c Sólo métodos cuantitativos

^d Sólo aplica para métodos no normalizados

^e Sólo para el análisis de aniones y cationes por ion selectivo.

Dentro de los términos que se usan comúnmente durante un proceso de validación se encuentran:

Linealidad. Medida de la capacidad de un método analítico para dar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo dado. ^[38,39]

Intervalo lineal. Se define como el intervalo de concentraciones del analito sobre el cual el método proporciona resultados de pruebas proporcionales a la concentración del analito. ^[38,39]

Intervalo de trabajo. Intervalo comprendido entre las concentraciones superior e inferior (incluyendo dichas concentraciones) y para las que se ha demostrado que el analito es cuantificado con un nivel satisfactorio de repetibilidad, recuperación y linealidad. ^[39]

Límite de detección. Es la concentración más baja a la cual puede detectarse el analito pero no necesariamente cuantificarse bajo las condiciones experimentales establecidas. ^[39]

En términos generales, el límite de detección (*LOD*) de un analito se puede describir como aquella concentración que proporciona una señal en el instrumento significativamente diferente de la señal del “blanco” o del “ruido de fondo”. ^[40]

Se define el límite de detección como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, x_B , más tres veces la desviación estándar del blanco, s_B :

$$LOD = x_B + 3s_B$$

Límite de cuantificación. El límite de cuantificación (*LOQ*) estrictamente es la concentración más baja del analito que puede ser determinada con un nivel aceptable de precisión, repetibilidad y veracidad. En general, los límites de cuantificación son característicos de desempeño que marcan la habilidad de un proceso de medición

química para ‘cuantificar’ adecuadamente un analito. ^[40] Se define como la concentración de analito que proporciona una señal igual a la señal del blanco, x_B , más diez veces la desviación estándar del blanco, s_B :

$$LOQ = x_B + 10s_B$$

Exactitud. La ISO la define como “proximidad de concordancia entre el resultado de una medición y el valor de referencia aceptado”. ^[41] La exactitud de un resultado individual puede estar afectada por dos tipos de errores, aleatorios y sistemáticos. ^[40]

La exactitud se reporta como porcentaje de error, y se calcula como:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{calculada}} - \text{Concentración}_{\text{real}}}{\text{Concentración}_{\text{real}}} \times 100$$

Precisión. La ISO define la precisión como “la proximidad de concordancia entre los resultados de pruebas independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas”. ^[41]

Las medidas de precisión más comunes son la “repetibilidad” y la “reproducibilidad”.

La evaluación de este parámetro puede ser realizado mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV). ^[40]

$$\text{Coeficiente de variabilidad (\% CV)} = \text{desviación estándar relativa (\% RSD)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

Recuperación. La recuperación es la fracción de analito adicionada a una muestra de prueba (muestra fortificada o adicionada) previa al análisis, que es determinada efectivamente por el método y que permite evaluar la eficiencia de la extracción. El porcentaje de recuperación (% R) entre las muestras fortificadas y sin fortificar se calcula como sigue:

$$\% R = \left[\frac{(CF - CU)}{CA} \right] \times 100$$

Donde CF es la concentración de analito medida en la muestra fortificada; CU es la concentración de analito medida en la muestra sin fortificar; CA es la concentración

del analito adicionado (valor medido, no determinado por el método) en la muestra fortificada.^[38]

Repetibilidad. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por un solo analista, usando los mismos instrumentos y método en intervalos cortos de tiempo.^[38,39]

Reproducibilidad. Es el grado de concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea por dos analistas o instrumentos diferentes, usando el mismo método en diferentes días.^[38,39]

Sensibilidad. Es el cambio en la respuesta del instrumento que corresponde a un cambio en la concentración del analito. Es la pendiente del intervalo de trabajo y cuanto mayor es ésta, mayor es la sensibilidad del método.^[38,39]

Selectividad. Es la capacidad de un método para determinar exacta y específicamente el analito de interés en presencia de otros componentes en una matriz de muestra bajo las condiciones de prueba establecidos.^[38]

Especificidad. Es la capacidad de un método analítico para medir solamente lo que se pretende que se mida.^[39]

Robustez. Es la medida de la capacidad del método analítico de permanecer inalterado por pequeñas, pero deliberadas variaciones (efecto de cambio en las condiciones) en los parámetros del mismo, proporcionando un índice de su confiabilidad durante su uso normal.^[38]

Matriz o placebo. Muestra que contiene todos los componentes de un producto a excepción del analito.^[39]

Efecto matriz. El efecto matriz se ve reflejado en el cambio de pendiente en una curva de calibrado o en la alteración de la sensibilidad producida por la matriz. Este efecto es debido a la forma química en la que se encuentra presente el analito en la muestra, así como de su entorno químico-físico (presencia de componentes en la muestra que interaccionan con el analito). Algunas causas de efecto matriz actúan selectivamente sobre algunos analitos y otras con efecto general.^[34]

Muestra adicionada o fortificada. Porción representativa del material a evaluar, a la que se le adicionan cantidades conocidas del analito de interés.^[39]

Blancos. El uso de varios tipos de blancos permite evaluar qué tanto de la señal medida es atribuible al analito y qué tanto se debe a otras causas, existen diferentes tipos.^[38]

- a) **Blancos de reactivos.** Son todos aquellos reactivos usados durante el proceso analítico (incluyendo los disolventes usados para la extracción y la disolución), se analizan por separado con el fin de ver si contribuyen o no a la señal de medición. La señal de medición que surge del analito puede entonces ser corregida adecuadamente.^[38]

- b) **Blancos de muestra.** Son esencialmente matrices sin analito. Son difíciles de obtener pero son necesarios para contar con una estimación realista de las interferencias que pueden encontrarse en el análisis de las muestras de prueba.^[38]

Materiales de referencia certificados (MRC). Es el material o sustancia en el cual uno o más valores de sus propiedades son suficientemente homogéneos y bien definidos. Es el material de referencia acompañado de un certificado, en el cual uno o más valores de sus propiedades están certificados por un procedimiento que establece trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual se expresan los valores de

la propiedad y en el que cada valor certificado se acompaña de una incertidumbre con un nivel declarado de confianza.^[38]

2.7 TRAZABILIDAD

2.7.1 Definición internacional de trazabilidad

La *trazabilidad* se define como la “propiedad del resultado de una medición o del valor de un patrón, tal que ésta pueda ser relacionada con referencias determinadas, generalmente patrones nacionales o internacionales, por medio de una cadena ininterrumpida de comparaciones (cadena de trazabilidad) teniendo todas las incertidumbres determinadas” (Fig. 13).^[42]

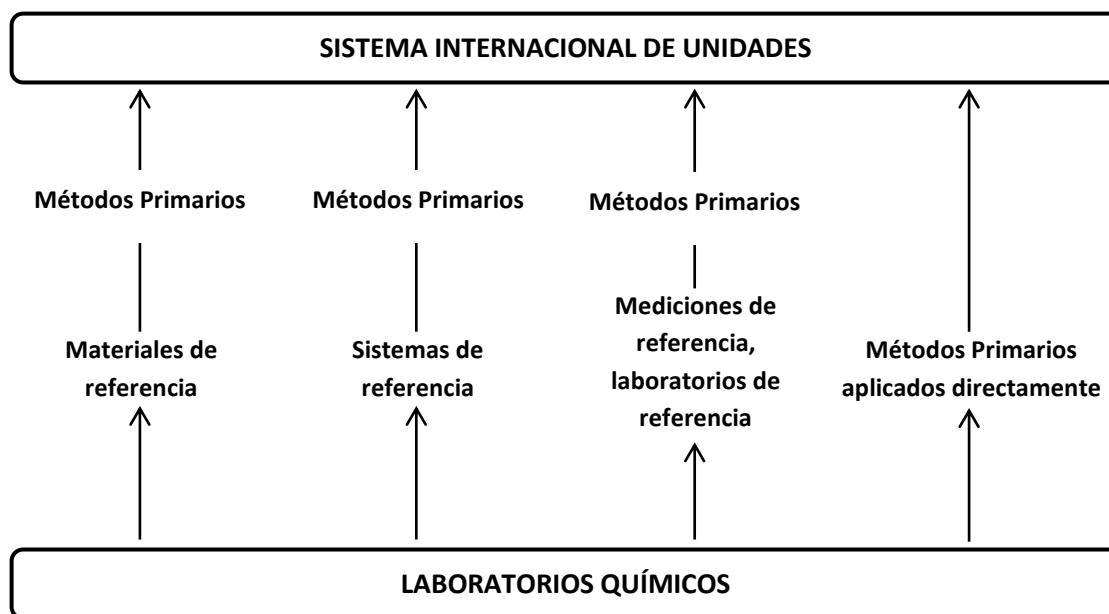


Figura 13. Esquema general de la trazabilidad del resultado de una medición.

La trazabilidad del resultado de una medición está relacionada con la diseminación de la unidad correspondiente a la magnitud que se mide. La expresión del valor de una magnitud incluye la referencia a una unidad de medida, la cual ha sido elegida por acuerdo, y por tanto, las medidas de la misma magnitud deben estar referidas a la misma unidad. Por lo que es conveniente lograr la uniformidad universal de las mismas mediante el uso de las unidades del Sistema Internacional de Unidades, SI.^[43]

Además, se establece que un *patrón* es una medida materializada, aparato de medición o sistema de medición destinado a definir, realizar, conservar o reproducir una unidad, o uno o varios valores conocidos de una magnitud, para servir de referencia.^[42]

2.7.2 La carta de trazabilidad

Una *carta de trazabilidad* de un resultado de medición específico o del valor de un patrón es un diagrama que muestra la relación de calibraciones o comparaciones entre este resultado y las referencias determinadas. Una carta de trazabilidad muestra los elementos que constituyen la cadena de trazabilidad respectiva, es decir, los sistemas de medición o los patrones y los métodos, las incertidumbres de cada calibración o medición, y la referencia al documento o procedimiento que soporta cada calibración o medición. En el caso de que el valor resultante de una medición se derive de la medición de varias magnitudes, se indica las cadenas relativas a cada una de esas magnitudes. El resultado de medición objeto de la carta puede ser el resultado de un proceso de certificación de un material de referencia, de un servicio de calibración o de una medición.^[42]

Una carta de trazabilidad es una herramienta para visualizar información relevante a la trazabilidad de una medición o calibración de manera resumida. Es útil para identificar los elementos de la trazabilidad, analizar la cadena de trazabilidad y mostrar la coherencia de los valores de las incertidumbres. Se espera que la información mostrada en la carta esté ampliamente respaldada mediante los documentos apropiados.^[42]



CAPÍTULO III

PARTE

EXPERIMENTAL

3.1 Instrumentación

3.1.1 Equipos y materiales

- Para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} se utilizó un cromatógrafo de líquidos constituido de dos bombas binarias de la marca Waters modelo 1525, un automuestreador marca Waters modelo 717 plus y un detector de conductividad de la marca Waters modelo 432.
- Columna catiónica metrosep C4 100 de 100 x 4.0 mm de Metrohm®, empacada con partículas de diámetro de 5 μm
- Columna catiónica metrosep C6 250 de 250 x 4.0 mm de Metrohm®, empacada con partículas de diámetro de 5 μm
- Purificador y desionizador de agua Milli-Q Modelo 185 de Millipore.
- Micropipeta Rainin Classic modelo 10824677G de 20 - 200 μL .
- Micropipeta Rainin Classic modelo E0905676G de 100 - 1000 μL .
- Micropipeta Rainin Classic modelo H0968503G de 500 - 5000 μL .
- Jeringas de plástico.
- Filtros de nylon para jeringa con tamaño de poro de 0.45 μm de la marca Millipore.

3.1.2 Reactivos y disolventes

- Disolución acuosa de ácido 2,6-piridindicarboxílico (ácido dipicolínico), grado cromatográfico, de concentración 0.02 M, Sigma-Aldrich.
- Ácido nítrico al 70 %, grado reactivo, Sigma-Aldrich.
- Estándar multielemental, HIGH-PURITY STANDARDS accredited to: ISO/IEC 17025 Guide 34, que contiene los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en agua, en una concentración equivalente a (100 ± 1) mg/L cada cation.
- Estándar que contiene Na^+ en agua, grado reactivo, con una concentración igual a 1000 mg/L, Sigma-Aldrich.

- Estándar que contiene NH_4^+ en agua, grado reactivo, con una concentración igual a 1000 mg/L, Sigma-Aldrich.
- Agua ultrapura, resistividad $18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.2 Desarrollo del método cromatográfico

3.2.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}

Para la determinación de estos cationes se utilizaron las dos fases estacionarias descritas en el apartado de equipo y materiales. Para la columna C4 100 se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido nítrico y ácido dipicolínico de concentraciones 1.7 mM y 0.7 mM, respectivamente, mientras que para la columna C6 250 la fase móvil fue una disolución constituida por HNO_3 y ácido dipicolínico en una concentración equivalente a 1.7 mM de cada uno. En ambos casos se trabajó en modo isocrático y a un flujo de 0.9 mL/min.

Se realizaron inyecciones de varias disoluciones stock de concentraciones variadas de los cationes de interés, las cuales fueron preparadas por dilución del estándar de referencia trazable al NIST (IC-4 High-Purity Standards), utilizando agua ultra pura tipo I como disolvente (MilliQ).

3.3 Validación del método cromatográfico

En el caso de la fase estacionaria C6 250 y la fase móvil constituida por HNO_3 y ácido dipicolínico en una concentración equivalente a 1.7 mM, se determinaron los parámetros típicos de una validación analítica: intervalo lineal, exactitud, precisión, límites de detección y de cuantificación, selectividad y recuperación de acuerdo con lo siguiente:

3.3.1 Intervalo lineal. Con este fin se prepararon estándares de concentración de los cinco analitos comprendidos entre 0.05 y 100 mg/L en agua MilliQ. Cada nivel de concentración se preparó por triplicado.

3.3.2 Precisión. Se determinó para tres niveles de concentración (1, 25 y 75 mg/L) de cada analito. Cada nivel de concentración que contenía los cinco cationes de interés, fueron preparados por quintuplicado de manera independiente (de acuerdo con FDA, CDER, 2001^[44]). La evaluación de este parámetro de calidad se realizó mediante el cálculo del porcentaje del coeficiente de variabilidad (% CV) de las áreas de la señal analítica determinadas para cada uno de los cationes en los tres niveles de concentración.

$$\% \text{ desviación estándar relativa (\% RSD)} = \frac{S}{\bar{x}} * 100$$

3.3.3 Exactitud. El parámetro de exactitud fue calculado a partir de la inyección de cinco disoluciones independientes que contenían Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} en tres niveles de concentración: 5, 50 y 100 mg/L de cada catión (de acuerdo con FDA, CDER, 2001^[44]). Con los valores de área determinados para cada uno de los cationes de trabajo y los parámetros de regresión calculados de sus respectivas curvas de calibración, se determinó la concentración de cada estándar y se comparó con el valor conocido. Se calculó el porcentaje de error de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ error} = \frac{\text{Concentración}_{\text{calculada}} - \text{Concentración}_{\text{real}}}{\text{Concentración}_{\text{real}}} * 100$$

3.3.4 Límite de detección (*LOD*). Se realizaron siete inyecciones de disoluciones de muy baja concentración de cada analito (0.5 mg/L o menores). Con los valores de área determinados se calcularon la media (\bar{x}) y su desviación estándar (*s*). El límite de detección se reporta de acuerdo con lo establecido por Miller y Miller (2002)^[40]:

$$LOD = x_B + 3s_B$$

Posteriormente con la ecuación de la curva de calibración se obtuvo el límite de detección en unidades de concentración.

3.3.5 Límite de cuantificación (*LOQ*). Se realizó el mismo procedimiento experimental y tratamiento de datos que el reportado para el límite de detección. El límite de cuantificación se reporta de acuerdo con lo establecido por Miller y Miller (2002)^[40]:

$$LOQ = x_B + 10s_B$$

3.4 Aplicación del método cromatográfico desarrollado

3.4.1 Recobros

Este parámetro se determinó al realizar el análisis directo de 13 muestras de agua residual, las cuales posteriormente fueron fortificadas con una concentración conocida de los 5 cationes de interés (10 mg/L). Con los valores de área determinados al realizar su análisis y con los parámetros de regresión calculados de las respectivas curvas de calibración, se determinaron las concentraciones correspondientes a los procesos de fortificación para cada uno de los cationes. Los procesos de fortificación fueron realizados por triplicado.

3.4.2 Evaluación de interferencias: selectividad del ion amonio

Para poder evaluar la selectividad del sistema cromatográfico desarrollado sobre la detección del ion amonio, fueron necesarios dos experimentos: 1) el análisis con la metodología propuesta, de muestras reales que no contienen amonio y 2) el análisis de éstas cuando fueron fortificadas con 10 mg/L de amonio.

3.4.3 Evaluación de la coelución (sodio y amonio)

Ya que los analitos más comprometidos en cuestiones de separación, debido a que presentan tiempos de retención muy cercanos, son el sodio y el amonio, y que las muestras de agua residual presentan altas concentraciones de sodio con respecto al amonio, se decidió evaluar hasta qué relación máxima de concentraciones sodio/amonio era posible realizar, con una calidad analítica aceptable, una determinación con el método de análisis propuesto.

3.5 Descripción y conservación de las muestras de trabajo

Las muestras de agua residual utilizadas para realizar los experimentos de fortificación, fueron tomadas en el canal de riego en Las Palmas (LPC N 20°07'50'', W 099°12'31'') (**Fig. 14**), en la localidad de Tlahuelilpan, en el centro del Valle del Mezquital en el estado de Hidalgo, localizada aproximadamente a 80 km al Norte de la Ciudad de México.^[45]

Para llevar a cabo el muestreo (realizado para cada una de las muestras), primero se enjuagó el recipiente muestreador en tres ocasiones, después con este mismo recipiente se extrajo la muestra, posteriormente se transfirió la muestra del recipiente muestreador a un recipiente de polipropileno con capacidad para 50 mL haciéndola pasar a través de un filtro Sterivex®-HV de 0.45- μm . Cada recipiente fue sellado herméticamente y etiquetado debidamente (número de muestra, fecha y hora de muestreo, punto de muestreo), y finalmente fueron conservadas en hieleras para garantizar su estabilidad hasta su llegada al laboratorio, en donde fueron colocadas bajo refrigeración a 4 °C hasta su posterior análisis.^[15,45]

PARTE EXPERIMENTAL

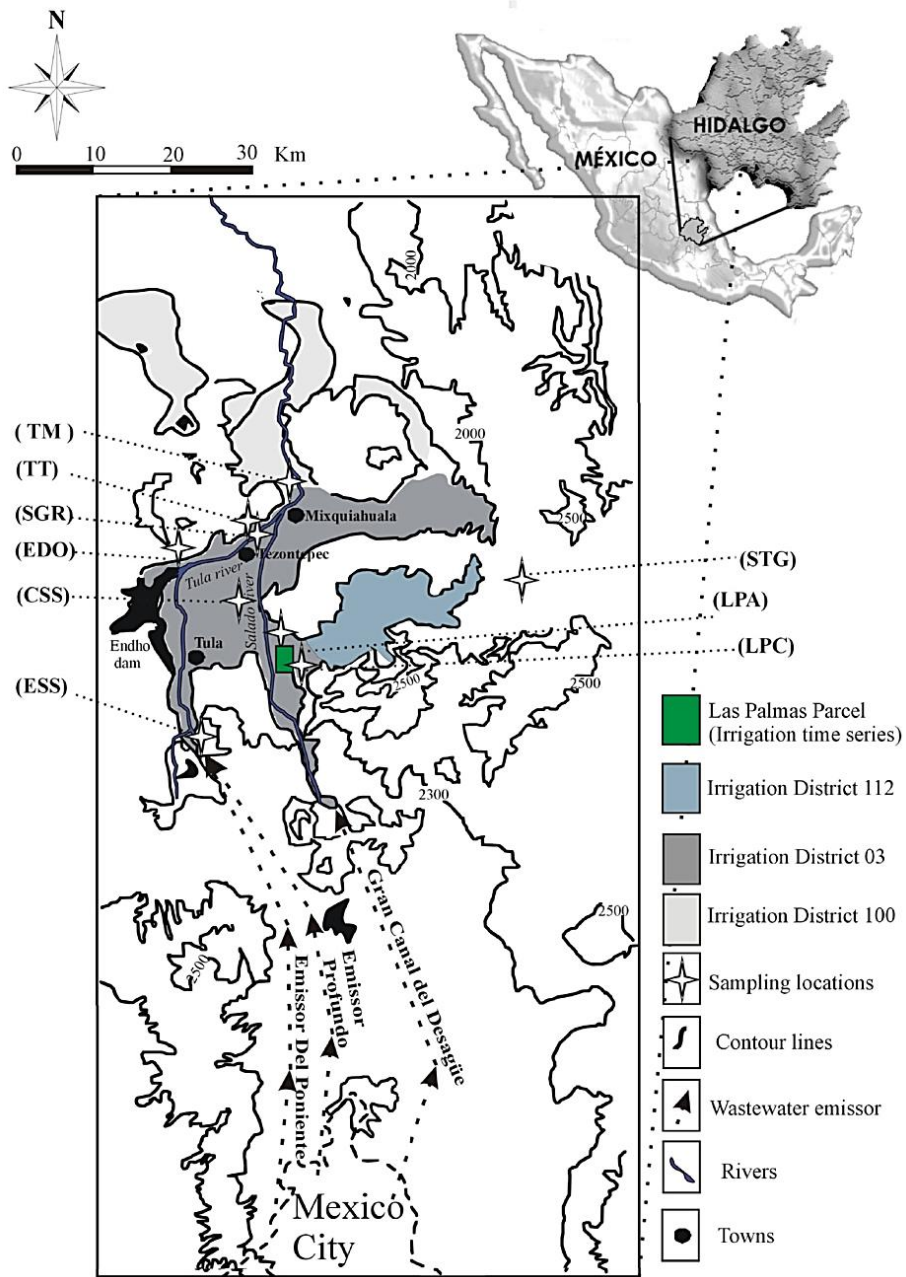


Figura 14. Localización de los sitios de muestreo de agua residual del canal de riego en Las Palmas, LPC (Imagen tomada de Guédron et. al. 2014).



CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Y

DISCUSIÓN

4.1 Desarrollo del método cromatográfico

4.1.1 Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación simultánea de los iones Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+}

4.1.1.1 Evaluación de la columna C4 100

Al utilizar la columna C4 100 y como fase móvil la mezcla de ácido nítrico 1.7 mM y ácido dipicolínico 0.7 mM, fue posible realizar la adecuada separación y detección de los componentes de una disolución que sólo contenía a los cinco analitos de interés en una concentración de 10 mg/L de cada uno de ellos, en un tiempo de análisis total relativamente corto, de alrededor de 15 minutos. En la **figura 15** se muestra el cromatograma obtenido.

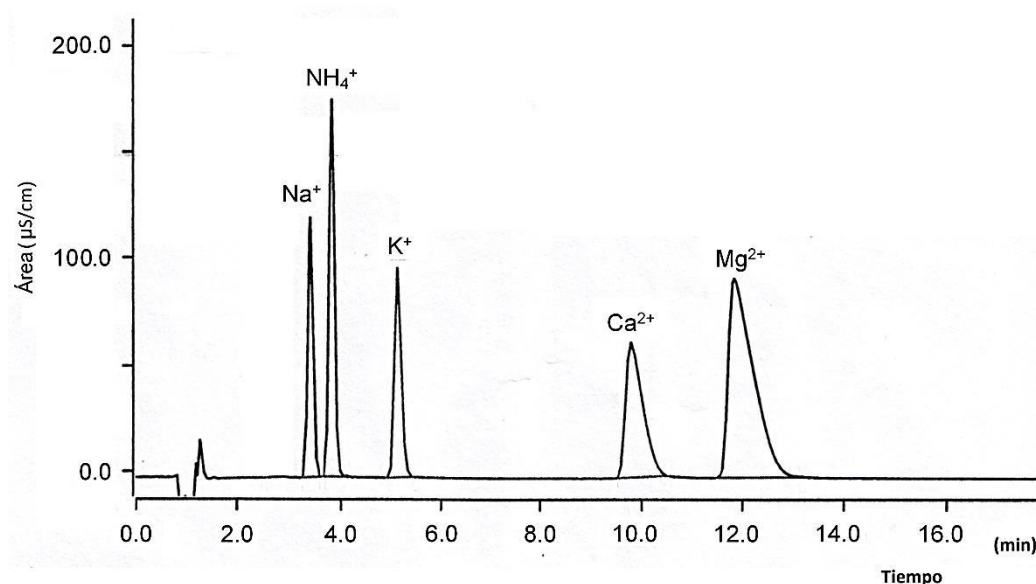


Figura 15. Cromatograma obtenido con la columna C4 100 de un estándar de 10 mg/L de los cinco cationes de interés (flujo de fase móvil de 0.9 mL/min y volumen de inyección = 10 μL).

En el cromatograma se puede observar que al trabajar con un nivel de concentración igual a 10 mg/L de cada catión, se puede obtener una buena separación y detección de los cinco analitos de interés. Sin embargo, al trabajar con estándares de mayor

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

concentración de los cationes de estudio, se presentó el traslape de las señales generadas por los iones sodio y amonio. En la **figura 16** se presenta el cromatograma obtenido al inyectar un estándar que contenía 50 mg/L de cada uno de los cationes de interés.

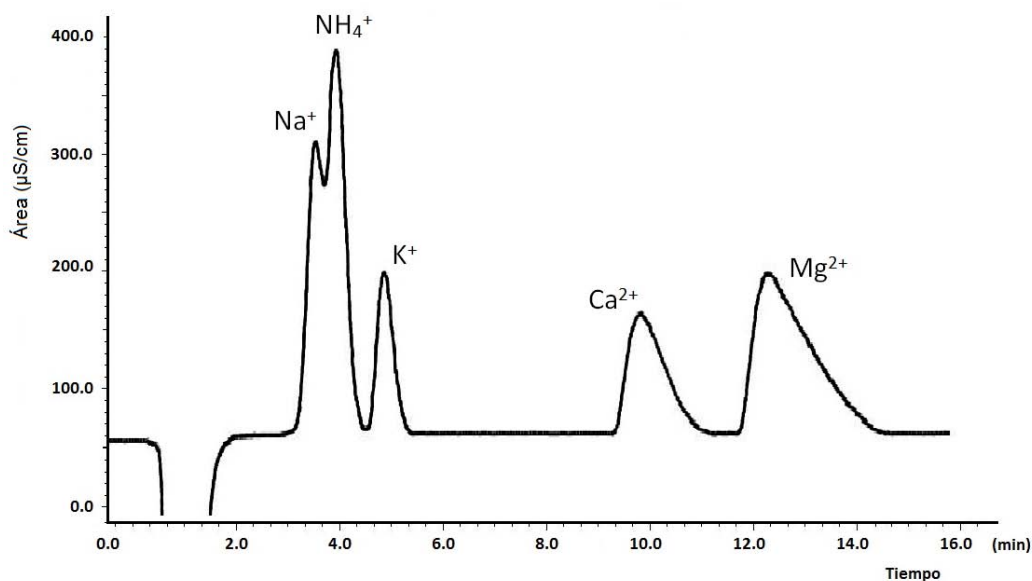


Figura 16. Cromatograma de un estándar de 50 mg/L, flujo fase móvil: 0.9 mL/min, volumen de inyección: 10 μL .

En este cromatograma se puede observar que el traslapamiento de las señales generadas por el sodio y amonio se incrementa al trabajar con disoluciones de mayor concentración de ambos cationes.

El problema de la baja resolución de estos dos picos resulta ser más evidente cuando la relación sodio/amonio o viceversa se incrementa, debido a que el pico generado por el analito más concentrado se va ensanchando y por lo tanto cubre casi en su totalidad el pico generado por el analito que se encuentra en menor concentración, el traslapamiento de señales se atribuye a que estos dos analitos eluyen en tiempos cercanos, con una diferencia en el mejor de los casos de 0.4 minutos. Este inconveniente no pudo ser eliminado aun cuando se trabajó con un flujo de fase móvil

menor a 1 mL/min y se diluyó la composición de la mezcla de ácidos: nítrico y dipicolínico.

4.1.1.2 Evaluación de la columna C6 250

Debido a lo obtenido en el punto anterior, se trabajó con la columna C6 250. En esta ocasión se utilizó como fase móvil una mezcla de ácido nítrico y ácido dipicolínico con una concentración igual a 1.7 mM de cada uno. Al utilizar esta columna, aunque con un incremento del tiempo total de análisis, ahora de 45 minutos, se pudo realizar de mejor forma la separación y detección de los cinco analitos de interés, ya que la diferencia de los tiempos de retención entre sodio y amonio fue en este caso de 2 minutos.

En la **figura 17** se muestra el cromatograma obtenido cuando se inyectó un estándar de 10 mg/L que contenía los cinco cationes de trabajo y analizado bajo las condiciones propuestas.

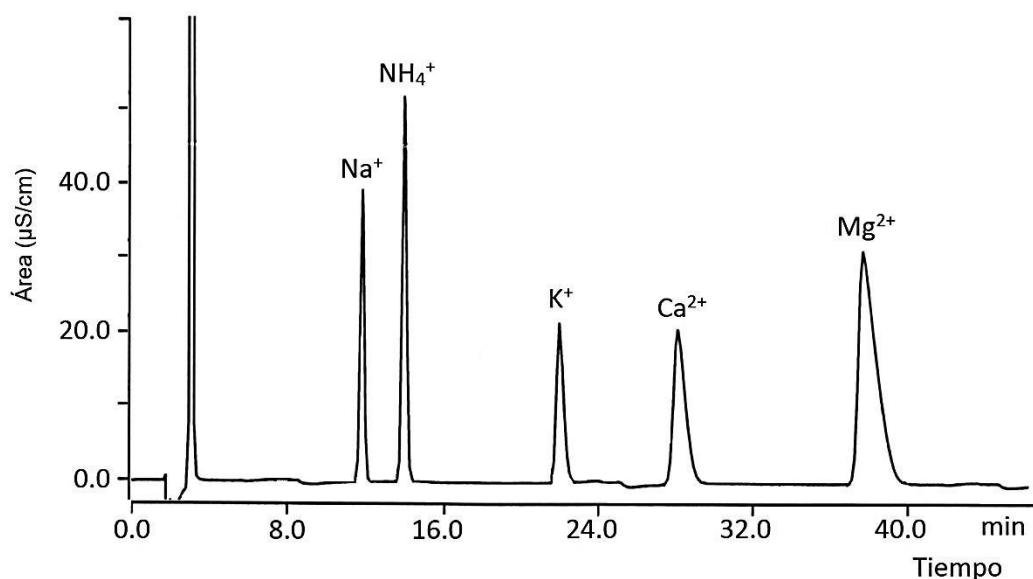


Figura 17. Cromatograma obtenido con la columna C6 250 de un estándar de 10 mg/L de los cinco cationes de interés (flujo de fase móvil de 0.9 mL/min y volumen de inyección = 10 μL).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este cromatograma se puede observar que los cinco cationes presentan una buena separación y detección. Como se mencionó con anterioridad, las señales generadas por los iones sodio y amonio no se encuentran tan cercanas, disminuyendo con ello la posible coelución, como lo fue en el caso de la columna C4 100. Sin embargo, fue necesario evaluar con esta metodología disoluciones más concentradas de los cationes de trabajo (50 y 100 mg/L). Al obtener los cromatogramas no se observó la coelución de los iones sodio y amonio, para estos dos niveles de concentración (**Fig. 18**).

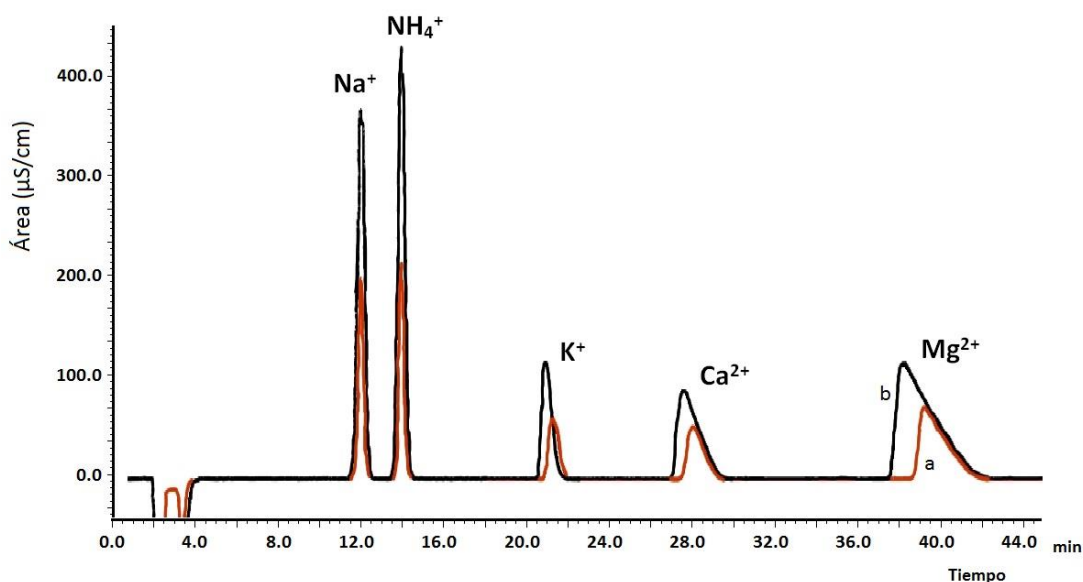


Figura 18. Cromatogramas de estándares de a) 50 y b) 100 mg/L, flujo fase móvil: 0.9 mL/min y volumen de inyección: 10 µL.

Al trabajar con esta columna se observó que se pueden determinar y separar de forma simultánea, y sin algún tipo de interferencia, los cinco cationes de interés hasta concentraciones alrededor de los 100 mg/L. También se observó que los iones sodio y amonio no presentan coelución en estos niveles de concentración, por lo que se puede decir que la columna C6 250 presenta un mayor poder de separación y eficiencia con respecto a la columna C4 100.

4.1.2 Parámetros cromatográficos de las fases estacionarias

4.1.2.1 Evaluación de la columna C4 100

Al trabajar con la columna C4 100 y la composición establecida de la fase móvil (HNO₃ 1.7 mM y ácido dipicolínico 0.7 mM), a partir del cromatograma obtenido al analizar una muestra de 10 mg/L de cada catión (flujo = 0.9 mL/min), se hicieron los cálculos correspondientes para obtener los parámetros cromatográficos más importantes para los cinco cationes de interés, esto para verificar que las condiciones establecidas fueran las óptimas para llevar a cabo la separación. En las **tablas 4 y 5** se muestran los resultados correspondientes.

Tabla 4. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna C4 100.

Analito	Tiempo muerto t_M (min)	Tiempo de retención t_R (min)	Tiempo de retención corregido t'_R (min)	Factor de capacidad (k')	Selectividad (α)		Resolución (R_s)	
Na ⁺	1.0	3.4	2.4	2.4	1.2	-	1.0	-
NH ₄ ⁺		3.8	2.8	2.8		1.5		3.2
K ⁺		5.2	4.2	4.2	2.1	5.5	1.5	
Ca ²⁺		9.8	8.8	8.8				
Mg ²⁺		11.9	10.9	10.9	-	-		

Tabla 5. Evaluación de la eficiencia de la columna C4 100.

Analito	Número de platos teóricos (N)	Altura equivalente a un plato teórico (H , en mm)
Na ⁺	1366	0.07
NH ₄ ⁺	1444	0.07
K ⁺	1878	0.05
Ca ²⁺	1067	0.09
Mg ²⁺	803	0.12

4.1.2.2 Evaluación de la columna C6 250

Al trabajar con la columna C6 250 y la composición establecida de la fase móvil (HNO₃ y ácido dipicolínico 1.7 mM cada uno), a partir del cromatograma de una disolución de 10 mg/L (flujo = 0.9 mL/min), se prosiguió con el cálculo de los parámetros cromatográficos más importantes para los cinco cationes de interés, esto para verificar que las condiciones establecidas fueran las óptimas para llevar a cabo la separación. En las **tablas 6 y 7** se muestran los resultados correspondientes.

Tabla 6. Parámetros cromatográficos obtenidos para la columna C6 250.

Analito	Tiempo muerto t_M (min)	Tiempo de retención t_R (min)	Tiempo de retención corregido t'_R (min)	Factor de capacidad (k')	Selectividad (α)		Resolución (R_s)	
Na ⁺	2.3	12.0	9.7	4.2	1.2	-	2.5	-
NH ₄ ⁺		14.0	11.7	5.1		1.7		6.4
K ⁺		21.8	19.5	8.5	1.4	3.8	4.6	
Ca ²⁺		29.0	26.7	11.6				
Mg ²⁺		42.0	39.7	17.3	-	-		

Tabla 7. Evaluación de la eficiencia de la columna C6 250.

Analito	Número de platos teóricos (N)	Altura equivalente a un plato teórico (H , en mm)
Na ⁺	2421	0.10
NH ₄ ⁺	2604	0.10
K ⁺	4226	0.06
Ca ²⁺	2262	0.11
Mg ²⁺	2807	0.09

La FDA (FDA, CDER, 1994 ^[46]) recomienda que para validar un método para cromatografía de líquidos de alta resolución, el valor del factor de capacidad (k') debe

ser mayor que 2; se debe presentar una selectividad (α) mayor a la unidad (de preferencia mayor a 1.2) y existir una resolución mayor a 2 ($R_s > 2$) entre los dos picos más comprometidos, ya que así se obtiene una cuantificación aceptable y por último, el número de platos teóricos (N) debe ser mayor que 2000, ya que éste tiene una estrecha relación con la eficiencia de la columna.

Por lo mencionado anteriormente y con base en los resultados obtenidos, se puede decir que con ambas columnas se puede lograr una buena separación ya que los valores obtenidos en la selectividad (α) son mayores a la unidad, pero en el caso de la columna C4 100 los picos generados por el sodio y el amonio se encuentran comprometidos a niveles de concentración mayores a 10 mg/L.

El factor de capacidad (k') nos da información sobre el grado de interacción entre los cinco cationes y la fase estacionaria, a valores mayores de k' el catión será más retenido. En ambos casos los valores de k' son mayores que dos, lo que indica que los cinco cationes presentan interacción con la fase estacionaria. A partir de los valores de k' calculados se observa que la columna C6 250 presenta mayor interacción con cada uno de los cinco cationes, y a su vez el orden de interacción que presenta es: $Mg^{2+} > Ca^{2+} > K^+ > NH_4^+ > Na^+$, ya que la fase estacionaria interacciona fuertemente con iones de mayor carga, menor radio hidratado y mayor polarizabilidad.

La resolución (R_s) nos da información sobre el grado de separación entre dos picos y entre mayor sea su valor, mejor será la separación entre dos picos. A partir de los valores de R_s determinados para la columna C4 100, es evidente que no se lograría una buena separación entre los picos generados por el sodio y el amonio (sobre todo en disoluciones con mayor concentración de estas especies), por lo que resultaría complicado realizar un análisis cuantitativo a concentraciones mayores a 10 mg/L. En cambio para la columna C6 250 el valor de resolución determinado indica que es posible la separación adecuada de los cinco cationes de estudio.

Al realizar el análisis de la eficiencia de las dos columnas, se puede observar que la columna C4 100 presenta valores de N menores a 2000 y la columna C6 250 presenta valores de N mayores a 2000, de tal manera que la columna C4 100 no cumple con el valor recomendado para N . Por tal motivo la columna C6 250 resulta ser más eficiente que la columna C4100. Para ambas columnas los valores de H son similares y pequeños. El valor de H se recomienda que sea pequeño, ya que al tener valores pequeños de H se generan picos estrechos, con lo que se pueden mejorar las separaciones.

Como la columna C4 100 no cumple con todos los valores recomendados de α , R_s , N y H y por ende no logra separar de manera adecuada los analitos comprometidos (sodio y amonio), mientras que la columna C6 250 si lo hace, se decidió seguir trabajando con ésta y proceder con la validación de la metodología.

4.2 Validación del método cromatográfico

4.2.1 Evaluación del blanco

Para poder llevar a cabo la validación de la metodología propuesta, como primer paso se realizó el análisis de un blanco, el cual sólo contenía agua ultrapura, resistividad 18.2 $M\Omega \cdot cm$ a 25 °C, el cromatograma correspondiente se presenta en la **figura 19**.

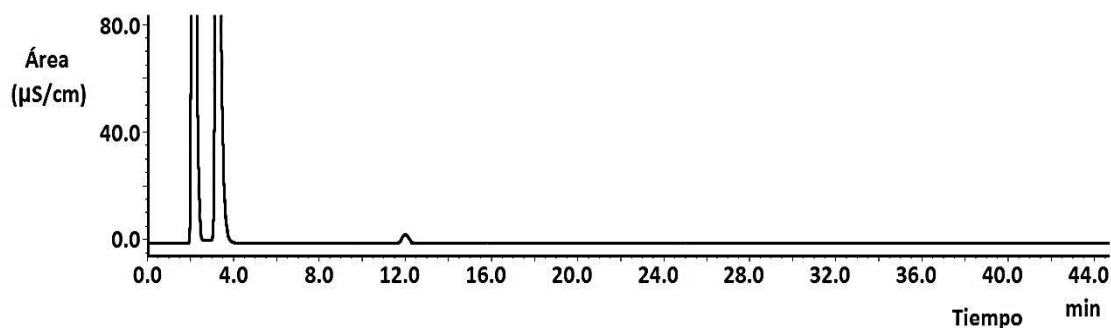


Figura 19. Cromatograma obtenido del blanco en las condiciones óptimas de trabajo.

Al obtener el cromatograma correspondiente al blanco se puede observar un pico muy pequeño, el cual se atribuye al ion sodio, y se observó que no afectaba significativamente en los resultados obtenidos posteriormente, por lo que se decidió continuar con la validación del método cromatográfico.

4.2.2 Intervalo lineal

Se prepararon disoluciones con 10 niveles de concentración, cada disolución se realizó por triplicado. En el **Anexo I** se presentan los cromatogramas obtenidos con los estándares en los diferentes niveles de concentración y en el **Anexo II** sus respectivos índices de coe.

A partir de los cromatogramas obtenidos para cada disolución, se procedió a integrar el área bajo la curva del pico correspondiente a cada analito, para posteriormente realizar los gráficos de calibración y el análisis de regresión lineal. Los resultados se trabajaron a un nivel de confianza del 95 %. En la **tabla 8** se presentan los parámetros de: intervalo lineal, pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación.

Tabla 8. Análisis de regresión lineal para los cinco cationes (n = 3).

Analito	Intervalo lineal de concentración (mg/L)	Pendiente (m)	Ordenada al origen (b)	Coficiente de correlación (r)
Na ⁺	0.3-100	80270 ± 800	58000 ± 29000	0.9997
NH ₄ ⁺	0.2-100	88240 ± 150	6200 ± 5800	0.9999
K ⁺	0.5-100	40330 ± 190	8000 ± 7900	0.9999
Ca ²⁺	1-100	61110 ± 400	16000 ± 18000	0.9999
Mg ²⁺	0.1-100	142590 ± 470	-14000 ± 16000	0.9999

Los gráficos de calibración para cada uno de los cinco cationes de estudio se muestran en la **figura 20**.

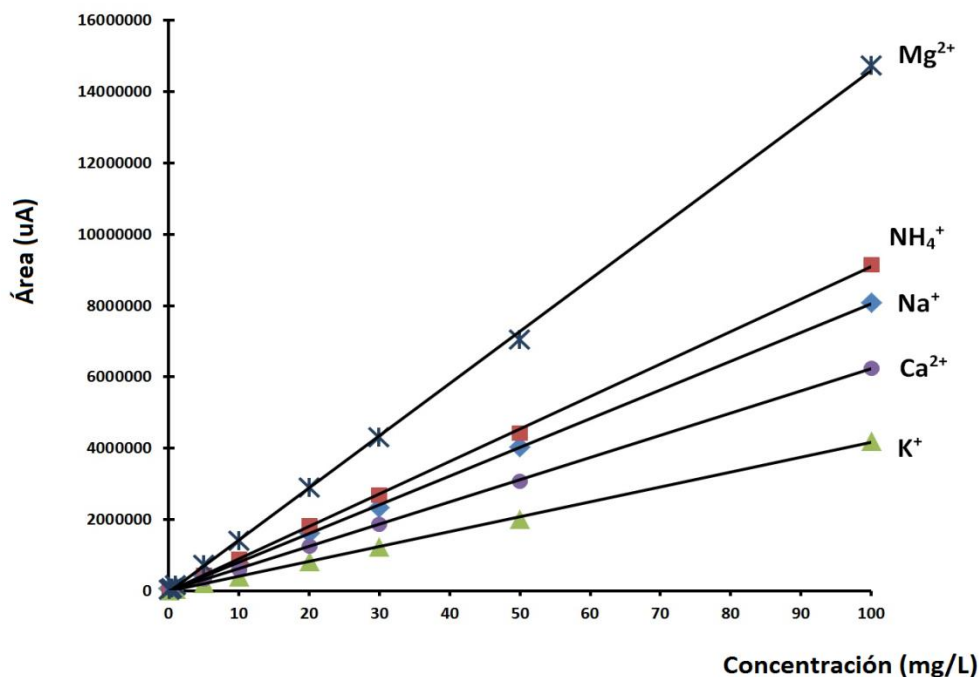


Figura 20. Gráficos de calibración obtenidos para los cinco analitos de estudio.

A partir de los datos obtenidos se observa que para cada curva de calibración se tiene que el modelo matemático que describe mejor su comportamiento es el de la forma $y = mx + b$ (*respuesta del detector = m * concentración + b*). El valor de la pendiente de la recta es mayor a cero ($m > 0$), lo cual indica que el detector es sensible a los cambios de concentración (ver **Anexo III**). Para conocer si existe una relación lineal entre la respuesta del detector y la concentración de analito, se utilizaron los valores del coeficiente de correlación (r), el cual se sugiere sea > 0.999 , este valor indica que la señal generada por el detector es proporcional a la concentración, y esto se cumple para los cinco analitos en estudio.

4.2.3 Precisión

La repetibilidad del sistema cromatográfico se evaluó para tres niveles de concentración, estas disoluciones se prepararon 5 veces de manera independiente. Los resultados obtenidos de los valores de desviación estándar relativa (% RSD) se muestran en la **tabla 9**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 9. Evaluación de la precisión en tres niveles de concentración (n = 5).

Nivel de concentración (mg/L)	% RSD				
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
1	3.0	2.9	1.1	2.4	2.2
25	1.6	1.7	1.9	1.5	1.3
75	0.2	0.3	0.4	0.6	0.3

Taverniers et al. ^[47] recomiendan que para que un sistema de medición se considere preciso, los valores obtenidos de % RSD deben ser menores que 3. Para los cinco cationes se obtuvieron valores de % RSD < 3 por lo que se puede decir que se cuenta con un sistema de medición preciso.

4.2.4 Exactitud

La exactitud del método desarrollado se evaluó en tres niveles de concentración, las disoluciones también se elaboraron por quintuplicado. Los porcentajes de exactitud obtenidos se muestran en la **tabla 10**.

Tabla 10. Determinación de la exactitud en tres niveles de concentración (n = 5).

Concentración (mg/L)	% exactitud				
	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
5	98.0 ± 1.3	98.6 ± 2.7	108.0 ± 2.0	104.2 ± 3.4	101.7 ± 4.0
50	110.3 ± 3.1	103.6 ± 2.8	111.0 ± 2.7	110.2 ± 2.9	104.4 ± 3.8
100	114.5 ± 0.4	106.6 ± 0.3	114.1 ± 0.3	114.0 ± 0.5	108.4 ± 0.5

Taverniers et al. ^[47] recomiendan que para que un sistema de medición se considere exacto, los valores obtenidos de % exactitud se deben de encontrar en el intervalo de (100 ± 10) %. Para los cinco cationes analizados, los valores de % exactitud calculados se encuentran dentro de este intervalo, por lo que se puede decir que también se cuenta con un sistema de medición exacto.

4.2.5 Límites de detección y cuantificación experimentales

Debido a que al realizar el análisis del blanco (**Fig. 18**) no se observan los picos generados por los iones de interés a excepción del ion sodio, y con el objetivo de determinar los valores del límite de detección y cuantificación se procedió en la elaboración de disoluciones que presentaran concentraciones pequeñas de los cinco cationes de interés y se realizaron siete inyecciones de cada disolución. Posteriormente se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los valores de *LOD* y *LOQ*, los cuales se encuentran en la **tabla 11**.

Tabla 11. *LOD* y *LOQ* determinados para los cinco analitos de interés (n = 7).

Analito	Límite de detección <i>LOD</i> (mg/L)	Límite de cuantificación <i>LOQ</i> (mg/L)
Na ⁺	0.14	0.56
NH ₄ ⁺	0.04	0.05
K ⁺	0.28	0.60
Ca ²⁺	0.10	0.50
Mg ²⁺	0.09	0.24

Los valores de *LOD* y *LOQ* se reportan de acuerdo con lo establecido por Miller y Miller: $LOD = \bar{x} + 3s$ y $LOQ = \bar{x} + 10s$.

Con base en los resultados obtenidos se puede observar que para los cinco cationes se tienen valores de *LOD* y *LOQ* menores que 1 mg/L, lo cual indica que el sistema cromatográfico es capaz de detectar muy pequeñas concentraciones. Los valores de *LOQ* indican que el método es capaz de cuantificar concentraciones del orden de los mg/L de los cationes en estudio de forma confiable, además estos valores son muy cercanos a la concentración más baja que forma parte de su respectivo intervalo lineal de concentración.

4.3 Aplicación del método cromatográfico desarrollado

4.3.1 Recobros

Para poder evaluar el desempeño del método propuesto, se seleccionaron y analizaron 13 muestras acuosas ambientales presentes en el laboratorio. Antes de cada análisis las muestras reales fueron filtradas y analizadas en dos condiciones diferentes: 1) sin adición de los cinco cationes Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; y 2) adicionadas con una concentración de 10 mg/L de los cinco cationes Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Las muestras adicionadas se elaboraron por triplicado. Los resultados se muestran en la **tabla 12**.

Tabla 12. Análisis de recobros para los cinco cationes en muestras reales (n = 3).

Clave de muestra	% recobro				
	Na^+	NH_4^+	K^+	Ca^{2+}	Mg^{2+}
M1	89.7	80.5	93.0	95.2	109.2
M2	88.5	101.9	96.7	96.0	101.4
M3	87.5	80.8	95.4	99.8	108.5
M4	97.8	84.4	90.6	83.0	92.7
M5	89.1	82.5	88.5	88.9	94.3
M6	99.4	81.6	86.9	90.1	96.2
M7	103.4	80.4	86.5	93.3	98.3
M8	94.9	86.2	87.4	85.3	95.2
M9	93.8	83.0	97.2	100.7	103.5
M10	90.5	83.2	95.2	101.9	106.9
M11	81.1	84.4	81.5	87.8	92.8
M12	110.5	86.6	88.1	86.2	94.3
M13	100.4	82.5	82.4	87.2	95.9

4.3.2 Evaluación de interferencias: selectividad del ion amonio

Para poder evaluar la selectividad del sistema cromatográfico desarrollado sobre la detección del ion amonio, el ion con la detección más crítica debido a sus bajos valores de concentración y el posible traslapamiento de su señal con la del ion sodio presente en altas concentraciones en las muestras de agua residual, fue necesario dos experimentos: 1) el primero consistió en el análisis con la metodología propuesta de muestras reales que no contienen amonio y 2) su posterior análisis cuando éstas fueron fortificadas con 10 mg/L de ion amonio. En la **figura 21** se muestran los cromatogramas obtenidos de dichos análisis.

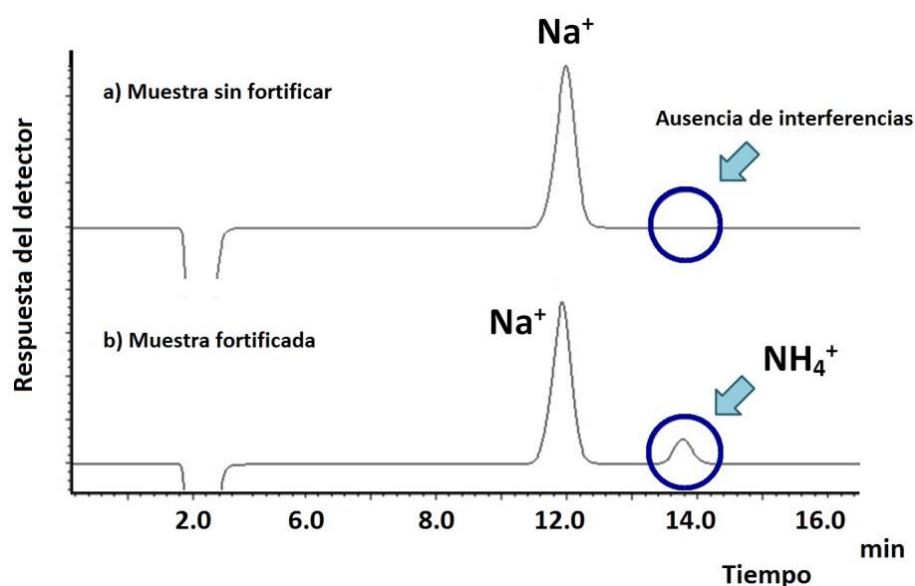


Figura 21. Evaluación de la selectividad en el análisis del ion amonio.

En la figura se puede observar que en el cromatograma de la muestra sin fortificar no hay presencia de una señal en el tiempo de retención que corresponde al ion amonio, mientras que en la fortificada se aprecia la señal debida a éste. Con base en estos resultados se puede decir que se cuenta con un método de análisis libre de interferencias.

4.3.3 Evaluación de la coelución (sodio y amonio)

Para poder evaluar el alcance de la metodología propuesta en el presente trabajo, se realizó el análisis de varias disoluciones que presentaban diferentes relaciones sodio amonio y cuyos resultados indicaran la relación máxima que el sistema cromatográfico podía resolver. En la **figura 22** se muestran las relaciones sodio:amonio evaluadas.

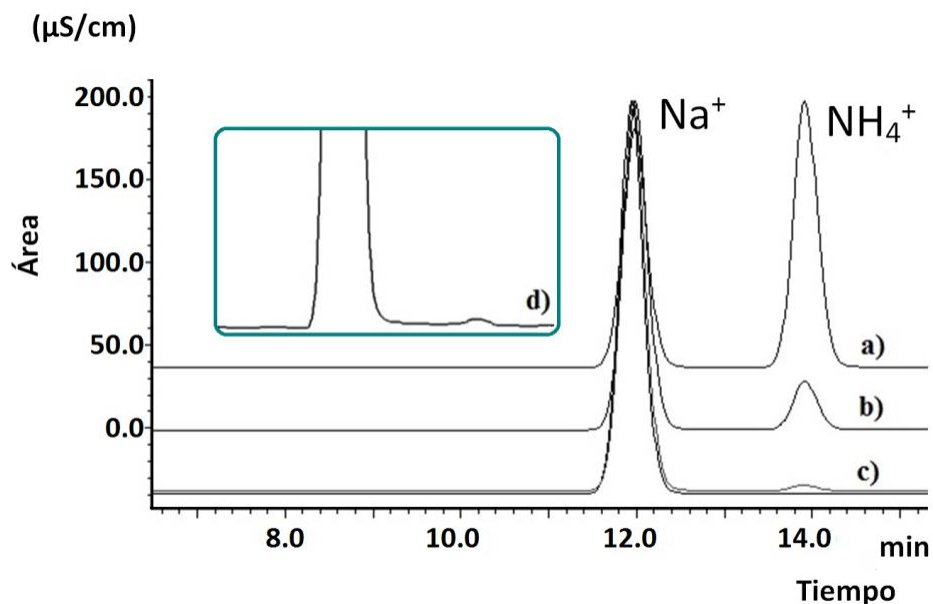


Figura 22. Relaciones sodio-amonio evaluadas: a) 1:1, b) 10:1, c) 100:1 y d) 1000:1.

En esta figura se puede observar que en las cuatro relaciones evaluadas, aún en la que existe mil veces más sodio en relación al amonio, es posible lograr la adecuada separación cromatográfica de los 2 analitos comprometidos y no existe alguna posible interferencia al momento de realizar su cuantificación. Por lo que se cuenta con un método de análisis lo suficientemente selectivo.



CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

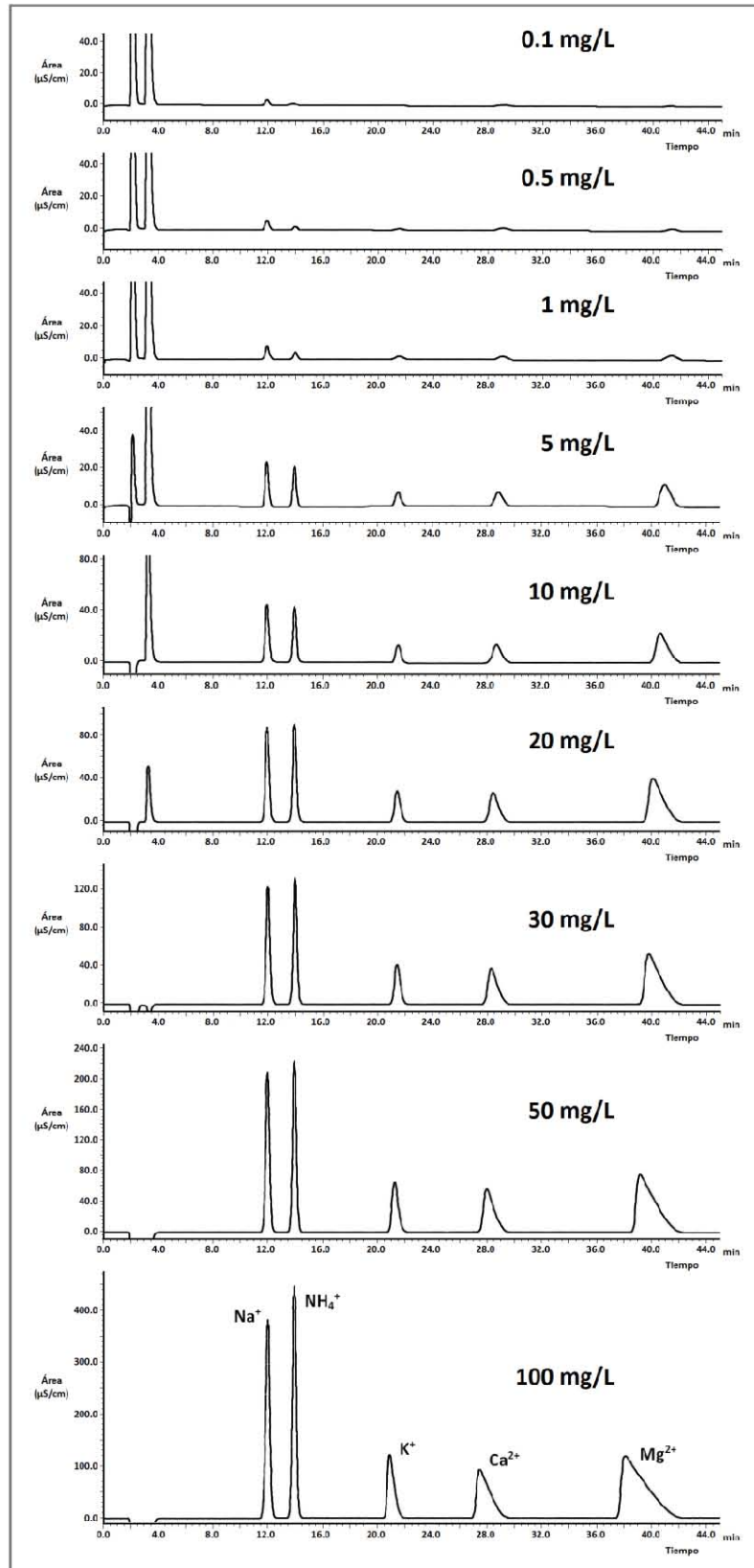
- ✓ Se desarrolló una metodología confiable por medio de cromatografía de iones con detección conductimétrica, para la determinación simultánea de cinco cationes: Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , en un tiempo de análisis de alrededor de 45 minutos, el cual permite cuantificar concentraciones menores a 1 mg/L de cada catión.
- ✓ Se optimizaron los parámetros cromatográficos (fase estacionaria, composición de la fase móvil) para obtener las mejores condiciones de separación y cuantificación simultánea de los cationes Na^+ , NH_4^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} .
- ✓ Se determinó que la fase estacionaria que presenta el mejor desempeño para llevar a cabo la determinación de los analitos de interés es la columna C6 250, ya que ésta permite la separación adecuada de los cinco cationes de interés, aun cuando la relación de concentraciones de los analitos más comprometidos (sodio y amonio) es muy grande, encontrándose que aun existiendo mil veces más sodio en relación al amonio, es posible lograr la adecuada separación cromatográfica de estos 2 analitos ($R_s = 2.5$).
- ✓ Se obtuvieron los parámetros típicos de un proceso de validación como lo son: el intervalo lineal, la precisión, la exactitud, los recobros y los límites de detección y cuantificación. Para todos los cationes, el intervalo lineal es de al menos dos órdenes de magnitud, los valores de % RSD ($< 3\%$) indican que es preciso, los valores de exactitud (98 - 114.5 %) indican que el método es exacto, mientras que los valores de recobro (80.4 - 110.5 %) indica la ausencia de interferencias de matriz en las muestras de agua residual.
- ✓ Se logró determinar que el orden de retención que presentan los cationes hacia la fase estacionaria es $\text{Na}^+ < \text{NH}_4^+ < \text{K}^+ < \text{Ca}^{2+} < \text{Mg}^{2+}$, con un tiempo de retención de 12, 14, 22, 29 y 42 minutos respectivamente.



ANEXOS

ANEXO I

Cromatogramas obtenidos para el intervalo lineal en las condiciones óptimas de trabajo.



Índice de coleo calculado al 10 % de altura de pico

Cromatograma de la figura 15

Analito	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Índice de coleo	1.0	1.0	1.0	1.5	2.5

Cromatograma de la figura 16

Analito	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Índice de coleo	pico traslapado	pico traslapado	1.5	2.3	3.3

Cromatograma de la figura 17

Analito	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
Índice de coleo	1.0	1.0	1.0	1.5	2.0

Cromatogramas de la figura 18

Índice de coleo					
Concentración (mg/L)	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺
50	1.0	1.0	1.5	2.0	4.0
100	1.0	1.0	2.0	5.0	10.0

Cromatogramas obtenidos para los gráficos de calibración (Anexo I)

Índice de coleo					
Concentración (mg/L)	Na⁺	NH₄⁺	K⁺	Ca²⁺	Mg²⁺
0.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.3
10	1.0	1.0	1.0	1.5	2.0
20	1.0	1.0	1.0	2.0	3.0
30	1.0	1.0	1.0	2.0	4.0
50	1.0	1.0	1.5	2.0	4.0
100	1.0	1.0	2.0	5.0	10.0

Pruebas de hipótesis sobre la pendiente (curvas de calibración)

	Hipótesis nula, H_0	Hipótesis alterna, H_1
Curva de calibración Na^+		
	$m = 80270$, riesgo $\alpha = 0.05$	$t_{\text{cal}} = 210.43$
	$H_0 : m = 0$	$t_{\text{tabla}} = 1.72$
	$H_1 : m > 0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tabla}}$ por lo que se rechaza H_0
Curva de calibración NH_4^+		
	$m = 88240$, riesgo $\alpha = 0.05$	$t_{\text{cal}} = 1207.63$
	$H_0 : m = 0$	$t_{\text{tabla}} = 1.71$
	$H_1 : m > 0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tabla}}$ por lo que se rechaza H_0
Curva de calibración K^+		
	$m = 40330$, riesgo $\alpha = 0.05$	$t_{\text{cal}} = 449.92$
	$H_0 : m = 0$	$t_{\text{tabla}} = 1.72$
	$H_1 : m > 0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tabla}}$ por lo que se rechaza H_0
Curva de calibración Ca^{2+}		
	$m = 61110$, riesgo $\alpha = 0.05$	$t_{\text{cal}} = 318.57$
	$H_0 : m = 0$	$t_{\text{tabla}} = 1.73$
	$H_1 : m > 0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tabla}}$ por lo que se rechaza H_0
Curva de calibración Mg^{2+}		
	$m = 142590$, riesgo $\alpha = 0.05$	$t_{\text{cal}} = 617.96$
	$H_0 : m = 0$	$t_{\text{tabla}} = 1.69$
	$H_1 : m > 0$	$t_{\text{cal}} > t_{\text{tabla}}$ por lo que se rechaza H_0



REFERENCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Nociones ambientales básicas para profesores rurales y extensionistas. Departamento de Montes. Depósito de documentos de la FAO. *TEMA 4: EL AGUA*, (en línea). Disponible en <http://www.fao.org/docrep/006/w1309s/w1309s06.htm#TopOfPage> (2015, 20 de junio).
- [2] OMS. *Agua Saneamiento y Salud - El uso de aguas residuales*, (en línea). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/es/ (2015, 2 de junio).
- [3] OMS - Agua, Saneamiento y Salud (ASS) - *Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture* (en línea). Disponible en: http://www.who.int/water_sanitation_health/wastewater/wastreusexecsum.pdf?ua=1 (2015, 2 de junio).
- [4] Definición de agua - Qué es, Significado y Concepto, (en línea). Disponible en: <http://definicion.de/agua/#ixzz3h2H2QZCz> (2015, 20 de junio).
- [5] GreenFacts® Facts on Health and the Environment, Cogeneris sprl. Disponible en: <http://www.greenfacts.org/es/glosario/abc/agua-dulce.htm> (2015, 20 de junio).
- [6] Wetzel R. G. (1981). *Limnología*. Barcelona: Ediciones Omega S. A.
- [7] Ochiai, E. (2003). *Química Bioinorgánica*. España: Reverté, S. A.
- [8] Lenntech BV (en línea). Disponible en: <http://www.lenntech.es/sodio-y-agua.htm> (2015, 1 de julio).
- [9] Lenntech BV (en línea). Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/k.htm> (2015, 1 de julio).
- [10] Lenntech BV (en línea). Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/ca.htm> (2015, 1 de julio).
- [11] Lenntech BV (en línea). Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/mg.htm> (2015, 1 de julio).
- [12] Lenntech BV (en línea). Disponible en: <http://www.lenntech.es/magnesio-y-agua.htm> (2015, 1 de julio).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [13] Rodríguez, R. (2000). *Aportaciones al conocimiento del estado medioambiental de hidrosistemas de interés internacional situados en Castilla-La Mancha*. Tesis Doctoral, Universidad de Castilla-La Mancha, España.
- [14] NOM-002-SEMARNAT-1996 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
- [15] NMX-AA-003-1980 Aguas residuales. Muestreo.
- [16] NMX-AA-089/1-SCFI-2010. Protección al ambiente – Calidad del agua – Vocabulario – Parte 1.
- [17] NOM-003-SEMARNAT-1997 Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.
- [18] NMX-AA-051-SCFI-2001. Análisis de agua – determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas – Método de prueba.
- [19] Valter W., Kuznia O. y Jedlitschka J. (1989) *Módulos de formación y de perfeccionamiento del personal de las plantas de tratamiento de aguas residuales*, [en línea]. Disponible en: <http://www.bvsde.ops-oms.org/bvsacd/scan/022518/022518-07.pdf> (2015, 25 de mayo).
- [20] IUPAC (1997). *Compendium of Chemical Terminology (the "Gold Book")* (2nd ed). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- [21] Skoog, D. A., West, D. M. y Holler, F. J. (1995). *Química Analítica* (6a. ed.). México: McGraw Hill.
- [22] Skoog, D. A., Holler, F. J. y Nieman, T. A. (2001). *Principios de Análisis instrumental* (5a. ed.). España: McGraw Hill.
- [23] Dabrio, M. V., Blanch, G. P., Cifuentes, A., Díez-Masa, J. C., de Frutos, M., Herraiz, M., Martínez, I. y Sanz, J. (2000). *Cromatografía y electroforesis en columna*. Barcelona: Springer-Verlag Ibérica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [24] Harris, D.C. (2001). *Análisis químico cuantitativo* (2a. ed.). Barcelona: Reverté S. A.
- [25] USP 29–NF 24, Capítulo General <621> *Chromatography*.
- [26] Willard, H. H., Merritt, L. L. y Dean, J. A. (1974). *Instrumental Methods of Analysis* (5a. ed.). New York: D. Van Nostrand Company.
- [27] Neue, U. D. (1997). *HPLC COLUMNS Theory, Technology, and Practice*. New York: WILEY-VCH.
- [28] Romero, A. S. (2002). *Cromatografía curso de métodos*, [en línea]. México: Instituto de Biotecnología, UNAM. Disponible en: <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/Cromatografia.pdf> (2014, 9 de septiembre).
- [29] Gomis, V. (2008). *Tema 2. Cromatografía* [en línea]. Disponible en: <http://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/8246/7/T2cromagraf.pdf> (2015, 3 de abril).
- [30] *Técnicas Cromatográficas* (2007). México: Facultad de Química, UNAM. Disponible en: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.Pdf (2015, 4 de abril).
- [31] Viehweger, K. H. (2007). *Practical Ion Chromatography An Introduction* (2a. ed.). Metrohm Monograph.
- [32] Levin, S. (1997). *Analysis of Ions Using High Performance Liquid Chromatography: Ion-Chromatography*, [en línea]. Medtechnica-analytical department. Disponible en: http://www.forumsci.co.il/HPLC/ion_chrm.html (2015, febrero).
- [33] Rouessac, F. y Rouessac, A (2003). *Análisis Químico Métodos y Técnicas Instrumentales Modernas*. España: McGraw Hill.
- [34] Ramis, G. y García, C. (2001). *Quimiometría*. España: Síntesis.
- [35] ISO 8402:1994. Quality – Vocabulary.
- [36] USP 32–NF 27, Capítulo General <1225> *Validación de métodos farmacopéicos*.
- [37] EMA, CENAM. (2008). *Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados para el laboratorio clínico*. (1a. ed.) México.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [38] CENAM. (2005). *Guía EURACHEM. MÉTODOS ANALÍTICOS ADECUADOS A SU PROPÓSITO. Guía de Laboratorio para la Validación de Métodos y Temas Relacionados*. (2a. ed.). México.
- [39] CCAyAC-P-058 (2011). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos* (1a. ed). México.
- [40] Miller J., Miller J. (2002). *Estadística y Quimiometría para química analítica*. España: Prentice Hall.
- [41] ISO 3534-1:1993. "Statistics - Vocabulary and symbols - Part 1: Probability and general statistical terms".
- [42] *ELABORACIÓN DE CARTAS DE TRAZABILIDAD EN EL CENAM*. Recomendación GIT 3/2005. Centro Nacional de Metrología. < www.cenam.mx > México, diciembre de 2005.
- [43] *Guía técnica sobre trazabilidad e incertidumbre en las mediciones analíticas que emplean las técnicas de cromatografía de gases (CG) y cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)*, Centro Nacional de Metrología, México, mayo de 2004.
- [44] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration (2001, mayo). *Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation*.
- [45] Guédron S., Duwig C., Prado B. L., Point D., Flores M.G., Siebe C. (2014). *(Methyl)Mercury, Arsenic, and Lead Contamination of the World's Largest Wastewater Irrigation System: the Mezquital Valley (Hidalgo State-Mexico)*. *Water Air Soil Poll.* 225(2045), 3-21.
- [46] Center for Drug Evaluation and Research (CDER), US Food and Drug Administration (1994, noviembre). *Reviewer Guidance. Validation of Chromatographic Methods*.
- [47] Taverniers I., De Loose M., Van Bockstaele E. (2004). *Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance*. *TrAC*, 23(8), 535-552.