

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA
(UNAN – León)
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**



**ESTUDIO PRELIMINAR PARA EL DESARROLLO DEL MÉTODO
“DETERMINACION DE ANIONES EN AGUAS NATURALES POR
CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IÓNICO”.**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE:
LICENCIADO EN QUÍMICA.**

PRESENTADA POR:

**Br: Gina V. Osorio Zapata
Br: Edwin E. Picado Peñalba**

TUTORES:

**Msc. Amada Carrasco Montoya
Dr. Leonardo Mendoza Blanco**

LEON - NICARAGUA

DICIEMBRE 2005.

INDICE

I. RESUMEN.....	3
II. INTRODUCCIÓN.....	4
III. OBJETIVOS.....	5
IV. MARCO TEÓRICO.....	6
IV.1 GENERALIDADES.....	6
IV.2 PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS.....	6
IV.3 NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE FLUORURO, CLORURO, NITRITO Y NITRATO EN AGUAS NATURALES.....	10
IV.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANIONES EN AGUA.....	11
IV.5 FUNDAMENTO DE LA CROMATOGRAFÍA.....	14
IV.6 MECANISMOS DE SEPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.....	19
IV.7 SELECCIÓN DEL MODO DE SEPARACIÓN.....	20
IV.8 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	21
IV.8 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	22
IV.9 DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD.....	22
IV.10 IDENTIFICACIÓN DE ANIONES.....	23
IV.11 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANIONES.....	23
IV.12 CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON COLUMNA SUPRESORA.....	25
IV.13 CROMATOGRAFÍA IÓNICA SIN COLUMNA SUPRESORA.....	25
V. PARTE EXPERIMENTAL.....	26
V.1 EQUIPO Y MATERIAL.....	26
V.2 REACTIVOS.....	27
V.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.....	27
V.4 OBTENCIÓN DE AGUA DESIONIZADA.....	28
V.5 CONDICIONES DE TRABAJO DEL EQUIPO CROMATOGRÁFICO.....	28
V.6 PROCEDIMIENTO.....	29
V.6.1. REPETIBILIDAD EN LA MEDICIÓN.....	29

V.6.2. CURVA DE CALIBRACIÓN NORMAL, LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.	29
V.6.3. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN.	29
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
VI.1. REPETIBILIDAD DE LA MEDICIÓN.	30
VI.2. LINEALIDAD.	33
VI.2.1. EVALUACIÓN DEL MODO DE INTEGRACIÓN DE LAS AREAS AUTOMÁTICO Y MANUAL DEL SOFTWARE	36
VI.3 CONTROL DE CALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN NORMAL.	37
VI.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.	40
VI.5. EXACTITUD DE MÉDICION: PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN. ¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.....	43
VI.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE MATRIZ.	43
VI.7. COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON UN MÉTODO DE REFERENCIA.	45
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. RECOMENDACIONES.	48
IX. ANEXOS.	50
X. BIBLIOGRAFÍA.¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.	

I. RESUMEN.

Se evaluaron las condiciones analíticas para el desarrollo del método de determinación de aniones en agua naturales por cromatografía iónica directa, tales como: tiempo de análisis, conductividad y pH de la fase móvil.

Se evaluó el modo de integración automática realizado por el software con respecto a la integración manual, comparando los parámetros de regresión obtenidos por análisis de regresión lineal ponderado (ARLP), comprobando que los resultados entre ambas integraciones no son significativamente diferentes, por tanto se procedió a trabajar con las integraciones de las áreas realizadas por el software del equipo cromatográfico.

Se realizó una evaluación de los parámetros analíticos para el desarrollo del método: repetibilidad de la medición, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y porcentaje de recuperación, obteniendo una buena linealidad con un coeficiente de determinación (r^2) para fluoruro 0.9886, cloruro 0.9999, nitrito 0.9997 y nitrato 0.9996.

A las curvas de calibración, se les realizó un estudio de repetibilidad utilizando una carta de control que considera los valores obtenidos para el intercepto (b_0) y la pendiente (b_1), comprobando que no existe repetibilidad en diferentes días.

Los límites de detección y los límites de cuantificación fueron respectivamente para los aniones: fluoruro 0,383 mg/l y 1,166 mg/l, cloruro 0,245 mg/l y 0,747 mg/l, nitrito 0,100 mg/l y 0,301 mg/l, nitrato 0,399 mg/l y 1,215 mg/l.

Finalmente se calculó el porcentaje de recuperación para cloruro y nitrato obteniendo 89,65% y 117,5% respectivamente, valores que están dentro del rango de porcentaje de recuperación recomendado para las metodologías analíticas.

II. INTRODUCCIÓN.

Muchas sustancias provenientes de las diferentes actividades humanas, pueden incorporarse a las aguas de abastecimiento de una determinada población, ocasionando de esta forma, contaminación que ponen en riesgo la salud de sus habitantes.

Las aguas superficiales son más susceptibles a la contaminación que las aguas subterráneas y ésta suele ser evidente y de efectos adversos inmediatos. La contaminación de fuentes subterráneas es por el contrario, un proceso inicialmente inadvertido pero de efectos mucho más persistentes, y técnicamente difíciles de remediar.

En el análisis físico químico del agua, la determinación y cuantificación de aniones es de gran interés, ya que la información generada de dichos análisis resulta ser clave en la evaluación de la calidad del agua, de la cual depende en gran medida la calidad de vida de la población humana, debido a que algunos de estos aniones, al encontrarse en elevadas concentraciones o en presencia de otros compuestos pueden llegar a causar efectos nocivos a la salud y al medioambiente.

Concentraciones altas de cloruro pueden contribuir a la salinización de las aguas; altas concentraciones de nitrato pueden ser una consecuencia del uso de fertilizantes sintéticos que contiene este ión, como nutriente de las plantas.¹

Los iones fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato pueden ser determinados de forma individual por métodos convencionales: colorimétricos, volumétricos o espectrofotométrico. El uso de estos métodos exigen mayor tiempo de análisis requiere algunas veces procesos de preparación de la muestra. La cromatografía iónica permite la determinación simultánea de los aniones de interés en una muestra en una sola etapa, requiriendo de esta manera, menos tiempo para el análisis.

Con el presente trabajo se pretende identificar y evaluar los factores que pueden influir en el desarrollo del método analítico: repetibilidad, reproducibilidad, linealidad, intervalo dinámico lineal, porcentaje de recuperación, de un método de análisis por cromatografía iónica sin columna supresora o de modo directo, para la determinación simultánea de aniones en muestras de aguas naturales.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ✦ Identificar y estudiar los factores que afectan el desarrollo del método.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- ✦ Determinar las condiciones analíticas óptimas para el análisis de aniones: fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato en agua por cromatografía de intercambio iónico sin columna supresora.
- ✦ Evaluar los parámetros analíticos que afectan el desarrollo del método; repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud.

IV. MARCO TEÓRICO.

IV.1 GENERALIDADES.

El agua es uno de los elementos de mayor importancia para los seres vivos y su entorno, la calidad óptima del agua es un factor esencial para satisfacer las necesidades humanas.

Las aguas naturales son objeto de permanentes análisis, debido a que son expuestas a contaminación por diferentes compuestos químicos, los contaminantes pueden ser no tóxicos o inofensivos a medida que no provoquen daños irreversibles, tanto a la fuente de agua como en la salud de los seres vivos.

Muchos de los contaminantes del agua son de carácter tóxicos, éstos pueden hacerla inadecuada para sus diferentes usos en la actividades cotidianas, los aniones en elevadas concentraciones son causantes en gran parte de este tipo de contaminación. Por este motivo se han establecido normas (CAPRE, OMS) que regulan los niveles máximos de concentración permisibles en que deben encontrarse estos aniones, estas normas sirven de guía para organismos gubernamentales y no gubernamentales, ministerio de salud u otras entidades que se dedican al estudio de los parámetros fisicoquímicos y el grado de toxicidad en las aguas.

IV.2 PARÁMETROS FÍSICOS-QUÍMICOS.

El objetivo de realizar un análisis físico-químico es obtener información adecuada para definir los criterios de la calidad de las aguas naturales. Los parámetros físico-químicos a considerarse dependen de la procedencia de la muestra de agua de interés y del uso que se pretenda darle.

Importancia de los parámetros analíticos a considerar:

Fluoruro.

El fluoruro se caracteriza por tener una solubilidad limitada y contribuye ligeramente a la alcalinidad del agua, se hidroliza ligeramente. El fluoruro juega un papel muy importante en la conservación de la dentadura, a una concentración de 1 mg/l reduce la posibilidad de caries dental sin producir efecto tóxicos, y a concentraciones superiores a 1.5 mg/l pueden causar fluorosis (hipomineralización del esmalte dental por aumento de la porosidad) ⁱ

Cloruro.

Los cloruros son unas de las sales que están presentes en mayor cantidad en todas las fuentes de abastecimiento y drenaje. El sabor salado de las aguas, producido por los cloruros, es variable y dependiente de la composición química del agua, cuando el cloruro esta en forma de cloruro de sodio, el sabor salado es detectable a una concentración de 250 ppm de NaCl.

La concentración de cloruros en aguas es un parámetro importante relacionado con su utilización. Los cloruros en aguas naturales provienen de los cloruros lixiviados de las rocas y de los suelos con los que ella tiene contactos. En áreas costeras, la concentración de cloruros puede provenir de la intrusión de las aguas salinas. Otras fuentes potenciales de cloruros son las descargas de aguas residuales domesticas, industriales y agrícolas a las aguas superficiales.ⁱⁱ

Nitritos.

Los nitritos pueden estar en las aguas, por la reducción de los nitratos o por la oxidación del amoniaco en este caso es casi seguro que su presencia se deba a una contaminación reciente en las aguas. El nitrito tiene acción hipotensiva ya que oxida el hierro de la hemoglobina en la sangre e impide el transporte del oxígeno.

En las aguas subterráneas, se pueden encontrar nitritos como consecuencia de la existencia de un medio reductor ya que es inestable y se oxida fácilmente. Igualmente cuando contiene nitrato esta en contacto con metales fácilmente atacables, ya sea a pH alcalinos o ácidos, se pueden presentar nitritos.

Desde el punto de vista de los usos del agua, la presencia de nitritos en concentraciones elevadas la impotabiliza, debido a que su presencia indica una contaminación, con la consiguiente presencia de organismos patógenos.

Nitratos.

Actualmente existen en zonas aledañas a las pilas de tratamientos de aguas residuales un alto índice de contaminación por nitratos en las aguas naturales, esto representa un problema serio en la población que no poseen agua potable.

En el transcurso de los años, los efectos de las prácticas agrícolas, se han percibido en el medio ambiente, sobre todo en las zonas de cultivo. Los excesos de abonos nitrogenados, y su posterior arrastre, por las aguas de lluvia o riegos, provocan concentraciones elevadas de nitratos, en aguas superficiales y subterráneas.

Las principales fuentes de contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por nitratos, son la agricultura, ganadería, aguas residuales urbanas e industriales, no estando así clasificadas por ningún orden de importancia a la hora de evaluar sus secuelas en la naturaleza. En raras ocasiones el nitrato puede proceder de los minerales del suelo y de las aguas de lluvia que pueden contener nitrato provenientes del óxido de nitrógeno y del amoníaco presentes en la atmósfera.ⁱⁱⁱ

Las aguas de consumo con concentraciones altas de nitrato, puede alterar la salud del ser humano, por eso es importante regular las concentraciones de nitrato en las aguas naturales, altas concentraciones de nitratos produce cianosis y transmiten corrosividad (oxidaciones) al agua. En los lactantes, en los que la acidez del estómago es normalmente muy baja, se favorece la proliferación de bacterias que reducen el nitrato a nitrito. En determinadas circunstancias, se puede producir una alteración conocida como metahemoglobinemia, originada por la reacción del nitrito con la hemoglobina de la sangre, con formación de hierro ferroso y generación de metahemoglobina, que imposibilita el transporte de oxígeno, pudiendo dar lugar a un proceso de consecuencias fatales.^{iv}

A continuación se presenta un resumen de los niveles aceptables para los aniones fluoruros, cloruros, nitritos y nitratos presentes en las aguas naturales y los efectos que provocan en la salud tanto por deficiencia de los mismos como por exceso, estos valores pertenecen a la última edición (1995) según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la última edición (1994) de las Normas de Saneamiento de Agua Potable para Centroamérica, Panamá y República Dominicana (CAPRE).^v

Tabla 1. Niveles máximos permisibles (mg/l) en aguas naturales de los iones bajo estudio..

ANIÓN	NORMAS OMS	NORMAS CAPRE	EFFECTOS EN LA SALUD
Fluoruro (F ⁻)	1.5	1.5	1 mg/l, reduce la posibilidad de caries dental sin producir efectos tóxicos en la salud. A concentraciones superiores causa fluorosis (hipomineralización del esmalte dental por aumento de la porosidad).
Cloruro (Cl ⁻)	250	250	Prácticamente nulo, pero a niveles superiores de 250 mg/l, transmiten sabor salado al agua.
Nitrito (NO ₂ ⁻)	3	1	A niveles superiores oxida el hierro de la hemoglobina en la sangre e impide el transporte del oxígeno
Nitrato (NO ₃ ⁻)	50	50	Produce Cianosis, transmiten corrosividad al agua, y causa la enfermedad metahemoglobinemia en los lactantes.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

CAPRE: Normas de Saneamiento de Agua Potable para Centroamérica, Panamá y República Dominicana.

IV.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANIONES EN AGUA.

Para la determinación de aniones en aguas naturales se emplean varios métodos analíticos recomendados por los Métodos Normalizados para el Análisis de Aguas Potables y Residuales tales como^{vi}:

Método volumétrico (determinación del anión Cloruro): en el análisis volumétrico, la concentración del analito se determina midiendo su capacidad de reacción con un reactivo patrón. La valoración implica conocer el volumen de solución patrón necesario para llevar a cabo la reacción completa con el analito, contenido en un peso o volumen de muestra.

La volumetría es una de las técnicas analíticas de mayor utilidad. Es bastante rápido aunque el análisis se divide en varias ramas y permite lograr buena exactitud.

Método argentométrico.

En una solución neutra o ligeramente alcalina, el cromato potásico (K_2CrO_4) puede indicar el punto final de la titulación de cloruros con nitratos de plata. Se precipita cloruro de plata cuantitativamente antes de formarse el cromato de plata rojo. Este método es adecuado para aguas relativamente claras, cuando la porción de agua titulada contenga de 0.15 a 10 mg de Cl.^{vi}

Método del nitrato mercúrico.

El cloruro se puede valorar con nitrato mercúrico $Hg(NO_3)_2$, por que se forma cloruro mercúrico soluble, ligeramente dissociado en la zona de pH de 2,3 a 2,8 la difenilcarbazona indica el punto final de la valoración por formación de un complejo púrpura con los iones mercúricos en exceso.

Método potenciométrico.

Se determina el cloruro por titulación potenciométrica con solución de nitrato de plata ($AgNO_3$) y un conjunto de electrodo de vidrio y plata-cloruro de plata. Durante la valoración se utiliza un voltímetro electrónico para detectar el cambio de potencial

entre los dos electrodos. El punto final de la valoración es la lectura del aparato a la que se produce el máximo cambio de voltaje para un incremento pequeño y constante del nitrato de plata añadido. Es adecuado para muestras turbias o coloreadas cuando el punto final podría ser difícilmente observable. ^{vi}

Método Espectrofotométrico (determinación del anion nitrato, nitrito y fluoruro).

Uno de los métodos fisicoquímicos más empleados en análisis es el de la medida de la absorción de energía radiante. El método es en general, aplicable a las determinación exacta de cantidades de constituyentes muchos menores que con los métodos gravimétricos o volumétricos.

Método SPADNS para la determinación de fluoruro:

El método Colorimétrico SPADNS se basa en la reacción entre fluoruros y una laca coloreada de circonio. El fluoruro reacciona con la laca coloreada, disociando una parte de ella para dar un anion complejo incoloro (ZrF_6^{2-}) y el colorante. Al aumentar contenido de fluoruro, el color producido se hace cada vez más pálido la tasa de reacción entre los iones fluoruros y circonios tienen una gran influencia de la acidez de la mezcla reaccionante. Presenta un margen analítico comprendido entre 0 y 1.40 mg/l de F^- , con un desarrollo de color virtualmente instantáneo. La determinación de color habrá de realizarse fotométricamente.

Método de Zambelli para la determinación de nitrito:

El nitrito (NO_2^-) se determina por la formación de un colorante azo púrpura rojizo, producido a pH 2 - 2.5 por acoplamiento de sulfanilamida diazotizada con diclorohidrato de N-(1-naftil)-etilendiamina (diclorohidrato de NED). El rango de aplicación del método para medidas espectrofotométrica es de 10 a 1000 μg de NO_2^- -N/l.

Método Ultravioleta Selectivo para la determinación de nitratos:

Esta técnica se utiliza solamente en muestras con bajo contenido en materia orgánica, es decir, aguas naturales incontaminadas y suministros de agua potable. La curva de calibrado de NO_3^- verifica la ley de Beer hasta las 11 mg N/l.

La medida de la absorción UV a 220 nm hace posible la determinación rápida de nitrato. Dado que la materia orgánica disuelta puede absorber también a 220 nm y nitrato no lo hace a 275 nm, se puede utilizar una segunda medida a 275 nm para corregir el valor de nitrato.^{vi}

Método de la Brucina para la determinación de nitratos:

Este método se basa en la reacción de los iones nitratos de una muestra de agua con la brucina en un medio ácido sulfúrico formándose un complejo de color amarillo medible a 410 nm.

La intensidad del color amarillo es proporcional a la concentración del ión nitrato de la muestra.

Método Cromatográfico (determinación de aniones fluoruro, cloruro, nitrito, nitrato):

La cromatografía iónica como una técnica innovadora, es uno de los métodos más eficaces para la determinación simultánea de aniones, se lleva a cabo mediante el empleo de un medio acuoso iónico como fase móvil y una resina de intercambio iónico como fase estacionaria, y un detector de conductividad. El desarrollo cromatográfico se produce tras introducir la muestra por el sistema de inyección de la columna. Seguidamente, se hace circular la fase móvil de forma continua, arrastrándose así los componentes de la muestra, los cuales se distribuyen entre la fase móvil y la estacionaria según los valores de sus coeficientes de distribución.

Los compuestos de una mezcla se separan porque su distribución entre la fase móvil y la estacionaria es desigual. Si no existiese interacción entre los compuestos y la fase estacionaria estos se desplazarían a la misma velocidad que la fase móvil.^{vii}

Existen dos métodos de análisis por cromatografía iónica, ambos bajo la modalidad de detección conductimétrica con o sin columna supresora previa a la detección. El uso de columna supresora es para eliminar o atenuar la conductividad de la fase móvil antes de llegar al detector, sin embargo este método no es muy eficaz debido a que permite una

baja resolución en los análisis, produce ensanchamiento de banda y restringe el número de inyecciones debido a que este tipo de columna requiere de un regeneramiento periódico. La cromatografía iónica sin columna supresora es un método más sencillo y puede ser usado en el caso que la fase móvil presente una baja conductividad.^{viii}

El método de cromatografía iónica sin columna supresora tiene numerosas ventajas sobre otros métodos tradicionales, esta técnica permite realizar el análisis de forma directa de todos los aniones de interés en un solo proceso, requiere menos tiempo de análisis, alta resolución, apta para el análisis cuantitativo, permite realizar análisis de mezclas complejas eficazmente y evita la necesidad de usar reactivos que contaminan el medio ambiente.^{ix}

IV.5 FUNDAMENTO DE LA CROMATOGRAFÍA.

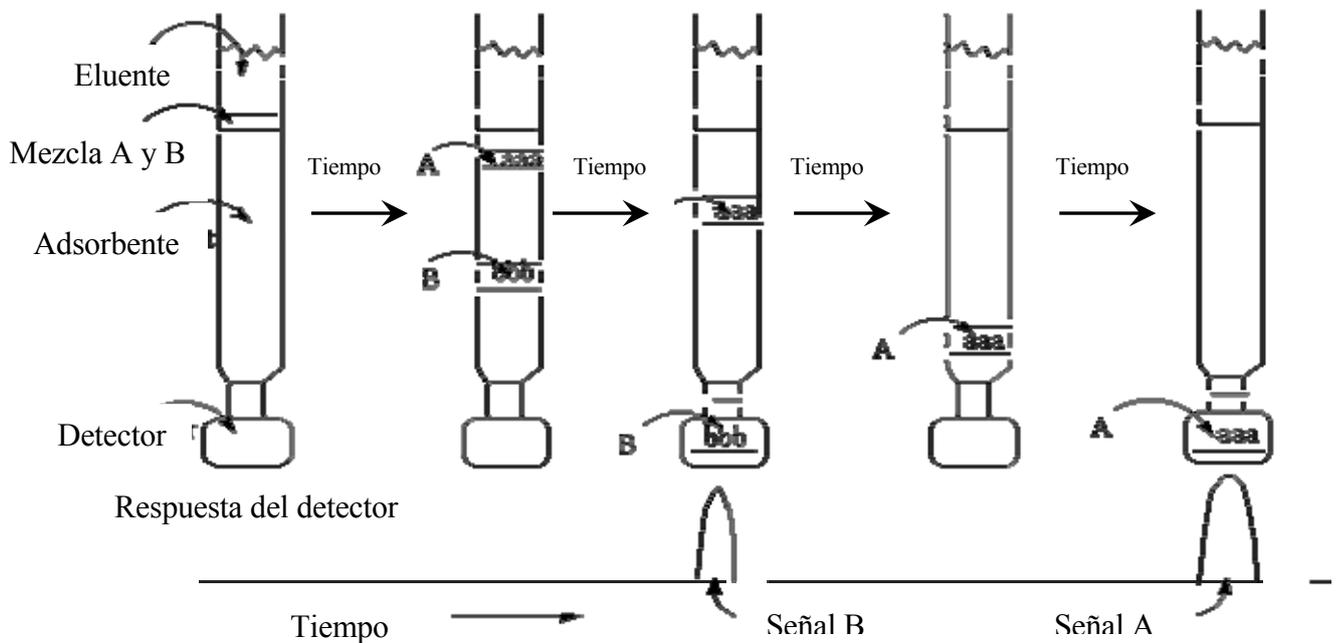
¿Que es la cromatografía?

La cromatografía es una técnica de separación analítica la cual consiste en hacer pasar un soluto de una fase a otra, donde una fase permanece fija (estacionaria) mientras que la otra se mueve pasando a través de la primera (fase móvil).^x

Desarrollo cromatográfico.

El siguiente esquema general muestra una disolución que contiene los solutos A y B que se depositan en la entrada de la columna empaquetada con partículas sólidas y llenas con disolventes, se añade un nuevo disolvente y la mezcla se eluye de la columna mediante un flujo continuo de disolventes. Si el soluto A se absorbe más fuertemente que el soluto B en la partícula sólida, entonces el primero está libre en disolución en menor tiempo. El soluto A desciende por la columna más lentamente que el soluto B y emerge por la sólida después del soluto B, de ese modo se separa una mezcla en sus componentes por cromatografía.^{xi}

Figura. 2 Esquema general del desarrollo cromatográfico.



En cromatografía, la fase móvil (el disolvente que desciende a través de la columna) es un líquido o un gas. La fase estacionaria (la que se encuentra fija en el interior) es frecuentemente un líquido que recubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna.

Las columnas pueden ser empaquetadas o de tubos abiertos. Una columna empaquetada se llena con partículas que contienen la fase estacionaria. La columna de tubo abierto es un capilar hueco estrecho con la fase estacionaria cubriendo las paredes interiores.

Cromatograma.

Un cromatograma es un gráfico que representa la respuesta del detector en función del tiempo de elución.^x

Tiempo de retención (t_r).

El tiempo de retención (t_r) es el tiempo necesario después de la inyección de una mezcla en la columna hasta que ese componente llega al detector.^x

Tiempo muerto (t_m).

Es el tiempo requerido para eluir una muestra no retenida en la columna y se determina midiendo el tiempo de retención de la fase móvil misma o bien de una muestra similar.

x

Tiempo de retención ajustado (t'_r).

Es la diferencia entre t_r y t_m es decir la medida del tiempo que la muestra permanece retenida en el material de relleno de la columna. x

El tiempo de retención ajustado se expresa de la siguiente manera:

$$t'_r = t_r - t_m \quad \text{Ec. 1}$$

Eficacia de separación.

Existen dos factores para determinar el grado con que se puede separar los compuestos por cromatografía. Uno es la diferencia de tiempo de elución de los respectivos picos: cuanto mas distante sean, mejor será la separación. Otro factor es la anchura de los picos: cuanto mas ancho sean los picos, peor será la separación.

Resolución.

Al pasar por la columna cromatográfica, los solutos tienden a difundirse de acuerdo con una curva gaussiana, de desviación estándar σ . Cuanto más tiempo pasa el soluto en la columna, mas ancha se hace la banda. x

En cromatografía se define la resolución entre dos picos como:

$$R \text{ resolución} = \frac{\Delta t_r}{W_{pt}} = \frac{\Delta V_r}{W_{pr}} \quad \text{Ec. 2}$$

Donde Δt_r o ΔV_r es la separación entre los picos (en unidades de tiempo o de volúmenes), y W_{pr} es el promedio de anchura de los picos en las unidades correspondientes (la anchura de los picos se mide en la base).

Difusión.

Una banda de soluto se ensancha a medida que pasa por una columna cromatográfica. Teóricamente, una banda infinitamente estrecha en la entrada de la columna sale de ella en forma de una curva gaussiana. En circunstancias menos ideales, la banda se hace asimétrica.

Una causa importante del ensanchamiento de banda es la difusión. El coeficiente de difusión mide la velocidad a que se mueve al azar una sustancia desde una región de mayor concentración a otra de menor concentración.

Altura de plato.

Es la constante de proporcionalidad entre la varianza (σ^2) de la banda y la distancia que ha recorrido (X). El nombre está tomado de la teoría de destilación, en la que la separación se lleva a cabo en pasos discretos llamados platos. La altura de plato también se llama la altura equivalente a un plato teórico. En cromatografía no existen “platos” físicos, de manera que se debe considerar la altura de plato como un término que relaciona la anchura de una banda con la distancia que ha recorrido a través de la columna. Cuanto más pequeña es la altura de plato, más estrecha es la banda.^x

La capacidad de una columna para separar componentes de una mezcla mejora al disminuir la altura de plato. Decimos que una columna eficaz tiene más platos teóricos que una columna ineficaz. En cromatografía HPLC valen aproximadamente 10 μm .

La altura de plato se expresa con la siguiente fórmula:^x

$$H = \frac{\sigma^2}{X} = \frac{L}{N} \quad \text{Ec. 3}$$

Donde σ^2 es la desviación estándar de la banda gaussiana y X es la distancia recorrida a través de la columna. Para un soluto que sale de una columna de longitud L , el número de platos teóricos (N) en toda la columna es la longitud L dividida por la altura de plato.

www.monografias.com/trabajos/geohidro/geohidro.shtm/

www.bonatura.com/agua.htm

www.bfhd.wa.gov/form/brochures/nitrates

<http://html.rincondelvago.com/contaminacion-por-nitratos-en-las-aguas-subterranas.html>

^v www.cepis.ops-oms/busacg/e/normas2/norma-nic.pdf

^{vi} APHA, AWWA, WPCP, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20th, **1998**.

^{vii} S. Morales Muñoz, “Curso Teórico Práctico de Cromatografía” Consejo Nacional de Universidades (CNU), **2004**

^{viii} S. C. Stefanovic, T. Bolanca, L. Curkovic, Simultaneous determination of six inorganic anions in drinking Water by non-suppressed ion chromatography, Journal of Chromatography A, **2001**, 918, 325–334.

^{ix} J. S. Fritz, Early milestones in the development of ion-exchange Chromatography: a personal account, Journal of Chromatography A, **2004**, 1039, 3–12.

^x D. C. Harrys, Análisis Cuantitativos, Reverte, **2001**.

^{xi} www.calvin.edu/academic/chemistry/faculty/sinniah/chem329/cintro.htm

Ensanchamiento de banda.

La banda de un soluto se ensancha irremediabilmente a medida que recorre una columna cromatográfica, y al llegar al detector con una desviación estándar (σ). Cada uno de los mecanismos individuales que contribuyen al ensanchamiento produce una desviación estándar σ_i . La varianza observada (σ_{obs}^2) es la suma de las varianzas de todos los mecanismos. ¡Error! Marcador no definido.

$$\text{La varianza es aditiva} \quad \sigma_{obs}^2 = \sigma_1^2 + \sigma_2^2 + \sigma_3^2 + K = \sum \sigma_i^2 \quad \text{Ec. 1}$$

Ensanchamiento fuera de la columna

Los solutos no se pueden aplicar a la columna en forma de una zona infinitamente fina; de modo que la banda tiene una anchura finita incluso antes de entrar a la columna. Si la banda se aplica como un segmento de anchura Δt (medida en unidades de tiempo), su contribución a la varianza de la anchura de banda final es: ¡Error! Marcador no definido.

$$\text{Varianza debido a la inyección o detección.} : \sigma_{inyección}^2 = \sigma_{detector}^2 = \frac{(\Delta t)^2}{12} \quad \text{Ec. 2}$$

Ecuación de altura de plato.

La altura de plato (H) es proporcional a la varianza de la banda cromatográfica. Cuanto menor es la altura de plato, más estrecha es la banda. La ecuación de Van Deemter expresa como influye la columna y el caudal en la altura de plato. ¡Error! Marcador no definido.

$$\text{Ecuación de Van Deemter} : H = A + \frac{B}{U_x} + C u_x \quad \text{Ec. 3}$$

Selectividad (α).

Valores elevados de α significan mejores separaciones.

$$\alpha = \frac{t'_{r2}}{t'_{r1}} \quad \text{Ec. 4}$$

En forma práctica se puede decir que α es una medida de la solubilidad diferencial de dos compuestos en la fase estacionaria. ¡Error! Marcador no definido.



IV.6 MECANISMOS DE SEPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE CROMATOGRAFÍA.

La cromatografía se define en varias categorías en función del mecanismo de interacción del soluto con la fase estacionaria:

- ✦ Cromatografía de adsorción: La fase estacionaria es sólida y la fase móvil es líquida o gaseosa.
- ✦ Cromatografía de reparto: la fase estacionaria es un líquido que forma una fina película sobre la superficie de un soporte sólido
- ✦ Cromatografía de afinidad: Esta forma de cromatografía, que es la más selectiva, se basa en las interacciones específicas entre una clase de moléculas de soluto y una segunda molécula que está unida covalentemente (inmovilizada) a la fase estacionaria.
- ✦ Cromatografía de exclusión molecular (conocida también como Cromatografía de filtración por gel o de permeación por gel): Separa moléculas por su tamaño; las moléculas grandes pasan más rápidamente que las pequeñas, la fase móvil líquida o gaseosa pasa a través del gel poroso. Los poros son bastante pequeños para excluir a los solutos grandes pero no a los pequeños.
- ✦ Cromatografía de intercambio iónico: En este tipo de cromatografía existen aniones tales como SO_3^- ó cationes tales como $\text{N}(\text{CH}_3)_3^+$ covalentes unidos a la fase estacionaria sólida, que es una resina. Los iones en disolución de carga opuesta son atraídos a la fase estacionaria por fuerzas electrostática. La fase móvil es un líquido.^{¡Error! Marcador no definido.}



IV.7 SELECCIÓN DEL MODO DE SEPARACIÓN.

En cromatografía líquida existen varios modos de separar los componentes de una mezcla dada con respecto al peso molecular de los solutos. ^{¡Error! Marcador no definido.}

Diagrama. 1 Modos de separación en base a peso molecular < 2000.

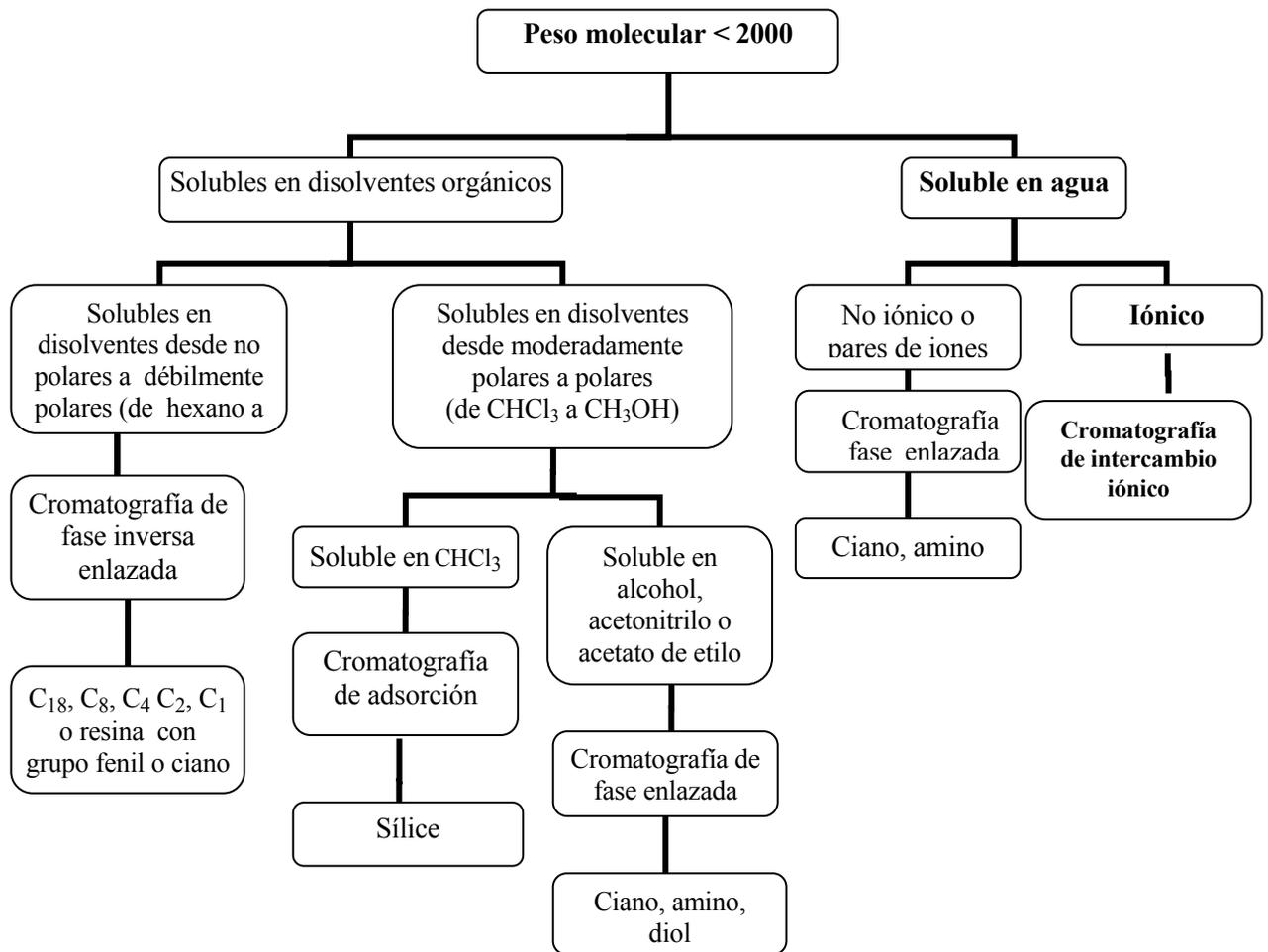
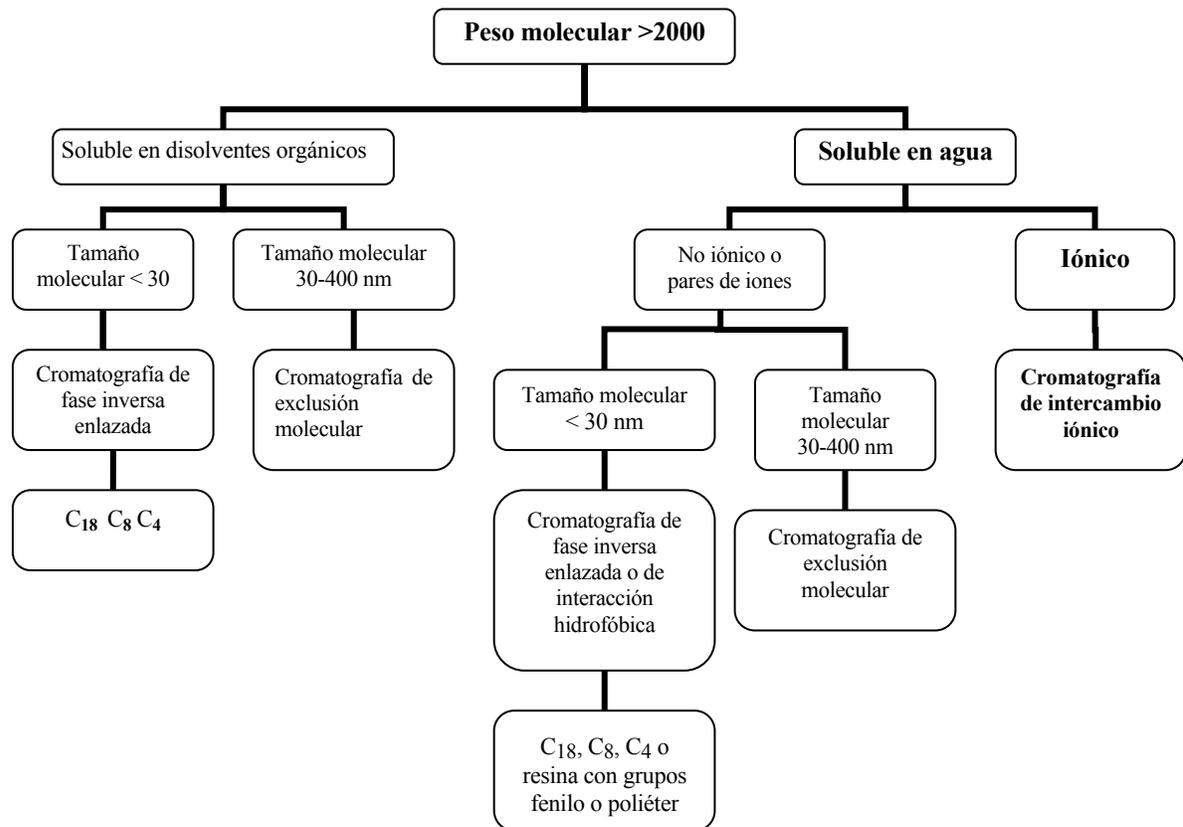




Diagrama. 2 Modos de separación en base a peso molecular < 2000.



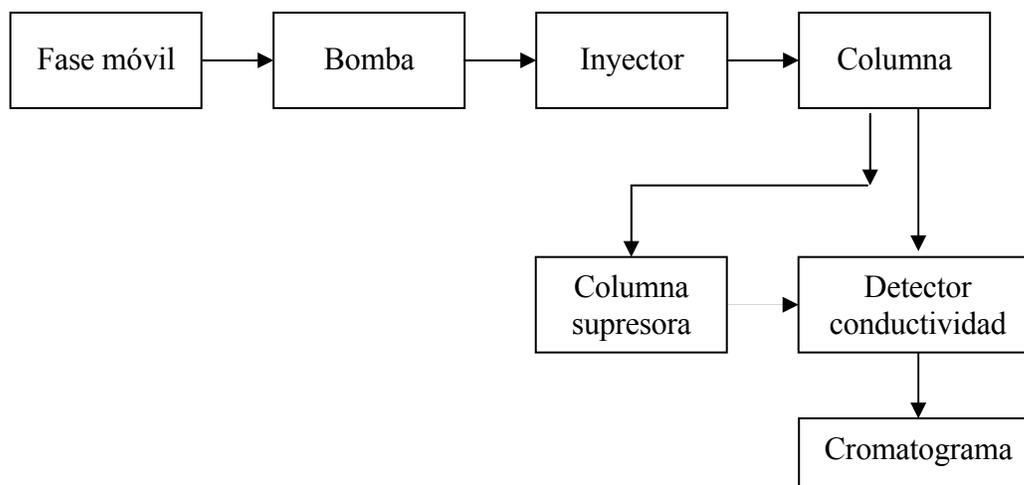


IV.8 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

La cromatografía de intercambio iónico, esta basada en la atracción entre iones del soluto y grupos funcionales cargados de la fase estacionaria. En el caso de intercambiadores aniónicos, grupos cargados positivamente en la fase estacionaria atraen aniones del soluto. Los intercambiadores catiónicos contienen grupos funcionales cargados negativamente, unidos por enlaces covalentes a la fase estacionaria, que atraen los cationes del soluto. ^{¡Error! Marcador no definido.}

En la siguiente figura se presentan los componentes principales de un cromatógrafo de intercambio iónico.

Figura. 1 Elementos básicos de un cromatógrafo de intercambio iónico.



IV.9 DETECTOR DE CONDUCTIVIDAD.

La conductividad eléctrica es una propiedad de las especies iónicas en solución. Los detectores de conductividad responden a todos los iones. En cromatografía con supresión es fácil medir un analito por que la conductividad de la fase móvil se reduce a cero gracias al paso de supresión. La supresión también nos permite usar gradientes de concentración en el eluyente.

En cromatografía aniónica sin supresor, la conductividad del anion del analito es mayor que la del eluyente, de manera que la conductividad aumenta cuando sale un analito de la columna. Los límites de detección normalmente se encuentran en el intervalo de ppb a ppm, pero pueden disminuir en un factor de 10 usando como eluyente ácido carboxílico en lugar de sales carboxilato. Usando eluyentes a base de benzoato o ftalato se puede conseguir una detección indirecta sensible (< 1 ppm) de aniones. ^{¡Error! Marcador no definido.}



IV.10 IDENTIFICACIÓN DE ANIONES.

Un cromatograma proporciona solo un elemento de información cualitativa acerca de cada uno de los aniones de una muestra, su tiempo de retención. Así, un cromatograma sirve para reconocer la presencia de componentes en mezclas. Hay que considerar que aunque los cromatogramas no conducen a una identificación positiva de todos los aniones presentes en una muestra, proporcionan la evidencia segura de la ausencia de ciertos compuestos. Así, si en la muestra no aparece un pico con el mismo tiempo de retención que el estándar en las mismas condiciones analíticas (el tipo de columna analítica, la concentración del eluyente, etc.), se puede asumir que el anión en cuestión está ausente (o presenta una concentración por debajo del límite de detección). ¡Error!

Marcador no definido.

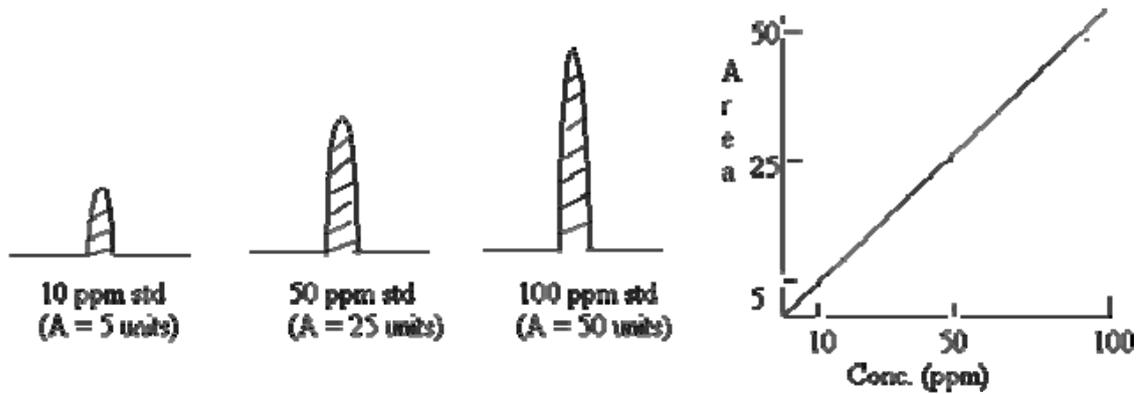
IV.11 ANÁLISIS CUANTITATIVO DE ANIONES.

Se puede conocer rápidamente la concentración de un anión en una muestra desconocida, basándose en el hecho de que la conductividad de una solución es directamente proporcional a la concentración de iones que esta contiene. Así, el pico más grande del ión determinado en un cromatograma le corresponde la concentración más grande, el área del pico en el cromatograma para un ión es proporcional a la concentración del ión en la solución. Para determinar la concentración de un ión en una solución desconocida es necesario comparar el área del pico del ión en la solución desconocida con el área del pico del ión en cualquier solución en la cual la concentración del ión es conocida, es decir, una solución estándar del analito. Los resultados cuantitativos son típicamente logrados usando estándares externos.

Supóngase que se desea determinar la concentración exacta de un anión en una solución desconocida. Primero, es necesario preparar soluciones estándares a diferentes concentraciones donde la concentración del anión es conocida. Luego cada solución es analizada en el cromatógrafo de los resultados se obtiene una relación entre las áreas y las concentraciones de los estándares, normalmente una relación que corresponde a una relación lineal, es decir ajustado a un modelo de regresión de primer orden u otro orden. Esta curva se obtiene graficando la altura del pico o el área contra la concentración del anión en cuestión, generando un gráfico, una línea recta. ¡Error! Marcador no definido.



Figura. 2 Esquema de un gráfico de una recta de regresión para una serie de estándares (área versus concentración)



Finalmente, la solución desconocida es analizada, midiendo el área del pico del anión (identificado por el tiempo de la retención), y comparándolo con la curva de regresión de los estándares, y se calcula la concentración del anión en la solución desconocida. ¡Error! Marcador no definido.



IV.12 CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON COLUMNA SUPRESORA.

La cromatografía de aniones con columna supresora consiste en la separación de una mezcla de aniones por intercambio iónico y su detección por conductividad, el rasgo fundamental de cromatografía con modalidad de columna supresora es la atenuación de la conductividad de la fase móvil que no interesa antes de medir la conductividad.

Cromatografía catiónica con columna supresora se lleva a cabo de una manera análoga, pero la columna supresora es una columna de intercambio aniónico cargada con OH^- .

El uso de columna supresora provoca el ensanchamiento de bandas y da como resultado una baja resolución, restringe el número de inyecciones debido a la capacidad de la columna supresora, este tipo de columna tienen que estar regenerando periódicamente para volver a convertir los rellenos en forma ácida o básica original. Actualmente, se dispone de supresores de membranas. ^{¡Error!}

Marcador no definido.

IV.13 CROMATOGRAFÍA IÓNICA SIN COLUMNA SUPRESORA.

Si la capacidad de intercambio iónico de la columna de separación es suficientemente baja y si se usa una fase móvil de baja concentración, el uso de la columna supresora es innecesario.

La cromatografía iónica sin columna supresora tiene numerosas ventajas: tiene una alta selectividad, baja conductividad de la fase móvil, fácil preparación de la muestra y bajo límite de detección y cuantificación. Esta técnica se caracteriza por tener buena exactitud, precisión y linealidad. Proporciona el análisis de varios aniones en un menor tiempo. La columna no requiere regeneración y no necesita equipos especiales. ^{¡Error! Marcador no definido.} En cromatografía aniónica sin columna supresora, se usa una resina de una capacidad de intercambio de alrededor de $5 \mu\text{equiv/g}$, y un eluyente de sales Na^+ o K^+ de ácido benzoico, p-Hidroxibenzoico o ácido ftálico en concentración: 10^{-4} M. Estos eluyentes dan una conductividad de fondo baja, y los analitos se detectan por una pequeña variación de la conductividad cuando salen de la columna. Eligiendo



adecuadamente el pH de trabajo, se puede obtener una carga media de eluyente entre 0 y -2, que permita un control de la fuerza eluyente. ¡Error! Marcador no definido.

V. PARTE EXPERIMENTAL.

V.1 EQUIPO Y MATERIAL.

1. Cromatógrafo de intercambio iónico
 - a) Columna Alltech Anion/R 10 μ m empacada con polimero de poliestireno divinilbenceno.
 - b) Bomba HPLC Waters 510.
 - c) Detector Conductimétrico Waters 431.
 - d) Interfase Agilent 35900E
2. Conductímetro GLP 32 Crison
3. Balanza Analítica Sartorius H-110/Handy
4. pH-metro Corning 430
5. Horno Heraeus Instruments
6. Desionizador LAB-Ion μ s/cm.
7. Agitador magnético, P. Selecta.
8. Bomba al vacío, Cenco
9. Micro pipetas de 500 μ l, Clinipet
10. Micro pipetas 100-1000 μ l Nichiryo
11. Jeringa 100 μ l, Eosge
12. Filtro 13mm, 0.45 μ m Nylon Acrodisc
13. Balones de 1000, 100, 50 ml
14. Bureta 25, 10 ml
15. Beaker 50, 10 ml
16. Viales



V.2 REACTIVOS

1. Ácido 4-Hidroxibenzoico 99.5 %. Acros Organic 26
2. Hidróxido de litio, grado laboratorio, Fisher
3. Fluoruro de potasio anhídrido 99 %. Acros Organic
4. Cloruro de sodio. Certificado A.C.S Fisher
5. Nitrito de sodio 98%. Acros Organic
6. Nitrato de potasio. Certificado A.C.S Fisher
7. Agua desionizada.

V.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES.

Solución Buffer Ácido P-Hidroxibenzoico/LiOH 5mM

Se pesaron 0,6906 g de Ácido y 0,1385 g de LiOH, alcanzando un pH de 8,5 con una solución de 1 M de LiOH y se diluyo exactamente a 1000 ml con agua desionizada.

Solución de Hidróxido de Litio (LiOH) 1 M

Se pesaron 0,2395 g de LiOH y se diluyo exactamente a 100 ml.

Solución estándar de Fluoruro 1000 ppm

Se pesaron 0,3057 g de KF y se diluyo exactamente a 100 ml con agua desionizada.

Solución estándar de Cloruro 1000 ppm

Se pesaron 0,648 g de NaCl y se diluyo exactamente a 100 ml con agua desionizada.

Solución estándar de Nitrito 1000 ppm

Se pesaron 0,1499 g de NaNO_2 y se diluyo exactamente a 100 ml con agua desionizada.



Solución estándar de Nitrato 1000 ppm

Se pesaron 0,1628 g de KNO_3 y se diluyó exactamente a 100 ml con agua desionizada

V.4 OBTENCIÓN DE AGUA DESIONIZADA.

El agua desionizada se obtuvo haciendo pasar agua destilada a través de un desionizador que contiene dos columnas de intercambio aniónico en su forma OH^- , y de una columna de intercambio catiónico en su forma H^+ obteniendo agua con una concentración muy baja de iones proveniente de las columnas, el agua es recolectada en un recipiente limpio y previamente enjuagado con la misma, de esta manera se obtiene el agua desionizada. La conductividad del agua desionizada se mantiene entre 0,2 a 0,4 μS .

V.5 CONDICIONES DE TRABAJO DEL EQUIPO CROMATOGRÁFICO.

- ✦ Columna: Alltech Anion/R, resina de polímero de poliestireno-divinilbenceno, tamaño de partícula 10 μs , Capacidad de intercambio 0.19 ± 0.02 meq/g
- ✦ Rango de sensibilidad : 0.002
- ✦ Rango base: 500 μS
- ✦ Flujo: 2,0 ml/min.
- ✦ Tiempo de análisis: 8,0 min.
- ✦ Fase móvil (ácido p-Hidroxibenzoico/ Hidróxido de Litio 5mM, pH 8.5)
- ✦ Conductividad fase móvil: $375 \approx 390$ μS
- ✦ Volumen de inyección: 1,0 ml
- ✦ Sistema de inyección: manual



V.6 PROCEDIMIENTO.

V.6.1. REPETIBILIDAD EN LA MEDICIÓN.

Se preparó una solución 5 ppm de cloruro, a partir de una solución madre de 1000 ppm aforando con agua desionizada en un balón de 100 ml. Se inyectó un volumen de 1 ml, a distintas horas del día en el cromatógrafo, esto se realizó por cinco días consecutivos.

V.6.2. CURVA DE CALIBRACIÓN NORMAL, LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

Se prepararon cinco soluciones estándares a partir de soluciones madres a 1000 ppm de fluoruro, cloruro, nitrito, nitrato, aforando con agua desionizada en balones de 100 ml para obtener un rango de concentraciones: 0 - 5 ppm de los estándares fluoruro, nitrito y un rango de concentraciones: 0 - 20 ppm de los estándares cloruro y nitrato. Se procedió a inyectar en el cromatógrafo un volumen 1 ml para las cinco mezclas de estándares, utilizando una jeringa de 10 ml, durante 5 días consecutivos.

V.6.3. CURVA DE CALIBRACIÓN POR ADICIÓN PATRÓN.

Se prepararon cuatro soluciones conteniendo 25 ml de muestra y enriquecida con estándares de fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato a partir de una solución madre de 1000 ppm aforada con agua desionizada en balones de 100 ml para obtener un rango de concentraciones 0 – 4 ppm de cada anión. Seguidamente se procedió a inyectar en el cromatógrafo uno a uno un volumen de 1 ml, utilizando una jeringa de 10 ml.



VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Se efectuó el estudio de los parámetros para el desarrollo del método analítico (repetibilidad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación y exactitud) en la determinación simultánea de aniones por cromatografía de intercambio iónico, el cual se realizó a partir de soluciones de estándares preparados en el laboratorio y de una muestra de agua de origen natural.

VI.1. REPETIBILIDAD DE LA MEDICIÓN.

Con el estudio de la repetibilidad se trata de comprobar la precisión entre los resultados de mediciones, es decir la homogeneidad de las varianzas y la repetibilidad en las medias en un mismo día y en días diferentes, realizadas bajo las mismas condiciones de medidas (mismo operador, igual volumen de inyección y tiempo de análisis).

Para determinar la repetibilidad de la medición se utilizó el estándar de cloruro a una concentración de 5 ppm, y se realizaron inyecciones por triplicado a diferentes horas del día durante 5 días consecutivos.

Para evaluar la homogeneidad de las varianzas para el cloruro se utilizó el test de Bartlett. Este método consiste en comparar la varianzas entre el M calculado por Bartlett y el estadístico de tabla Chi-cuadrada (χ^2). El valor de M calculado es de 16,732 y el valor de Chi-cuadrada al 95% es de 52,189, como el valor de M calculado es menor que el valor de Chi-cuadrada, se puede concluir que las varianzas son homogéneas.

Es importante comparar las medias del día y entre varios días, puesto que la muestra utilizada en la medición es la misma y no debe haber diferencias significativas entre ellas. Para saber si las medias son iguales fue necesario aplicar el análisis de varianza ANOVA de dos factores.



Tabla 1: Estudio del área del pico en función del día y hora de análisis (Anova de dos factores)

TABLA DE ANÁLISIS DE VARIANZA DE DOS FACTORES					
Fuente de variación	S.C.	G.L.	C.M.	F crítico.	F a 5%
Filas	3999,8	8	499,98	2,2440	0,6130
Entre columnas	21022	4	5255,5	2,6680	6,4460
Error	26088	32	815,26		
Total	51110	44			

Los datos para realizar el Anova de dos factores se muestran en la tabla N_o 17 del anexo.

S.C: suma cuadrática

G.L: grados de libertad.

C.M: cuadrática media

F.C.: factor crítico de la tabla.

F. 5%: factor calculado a un margen de error 5 %

El valor de F crítico de la tabla es de 2,6680 y el valor de F a un nivel de confianza de 95% es de 6,4460, como el valor de F crítico es menor que el F a 95% se deduce que las medias no son homogéneas entre los días, es decir existen diferencias significativas entre columnas. Sin embargo si se compara el valor crítico para F entre filas 2,2440 con el valor encontrado F a un nivel de confianza 95% 0,6130, el valor de F crítico es mayor que el valor de F encontrado, esto indica que no existen diferencias significativas entre las medias en el día, por lo tanto el método es repetible para un mismo día.

A partir de los resultados obtenidos en Bartlett se puede afirmar que las varianzas son homogéneas, a diferencia del análisis de varianza ANOVA en el cual existe diferencia significativa entre las medias de los días, por lo tanto no hay reproducibilidad de los resultados entre días.



La falta de control de la temperatura fue un factor incidente en la reproducibilidad de los análisis. La temperatura es una variable clave para la resolución cromatográfica, el tiempo de retención y la conductividad son los parámetros que más se afectan por la variación de la temperatura, por tal razón, es necesario un mejor control de la temperatura ambiental y de la columna cromatográfica para obtener cromatogramas más reproducibles y con buena resolución, esto permitirá realizar análisis por diferentes días obteniendo buenos resultados. **Entre las posibles causas de la falta de repetibilidad de los resultados por esta técnica podemos citar las siguientes:**

- ✦ Una limitante en la precisión de las medidas, fue la reproducibilidad con que se introdujo la muestra en el sistema de inyección de la columna. Esto tuvo una gran influencia en la variabilidad de las áreas de cada uno de los compuestos.
- ✦ El agua utilizada en la preparación de la fase móvil no fue de calidad ultrapura ya que aun contenía iones en concentraciones muy pequeñas, provocando que la conductividad de la fase móvil no se mantuviera constante. Mantener la conductividad es importante ya que el detector de conductividad detecta la más mínima variación. Estas variaciones no permiten que los tiempos de retención se mantengan constantes.
- ✦ La calidad de los reactivos que se utilizaron en la preparación de la fase móvil y de los estándares no son los recomendados para análisis por cromatografía de intercambio iónico, debido a su naturaleza y grado de pureza, esto aumentó la conductividad de la fase móvil en las señales del detector de conductividad debido a los contaminantes que provenían de los reactivos, los reactivos para este tipo de análisis tienen que ser calidad HPLC.

**VI.2. LINEALIDAD.**

Para comprobar la linealidad del método analítico, se realizó una curva de calibración normal para cada anión, en un intervalo de concentración entre 0 – 5 ppm para el fluoruro, nitrito y de 0 – 20 ppm para el cloruro y nitrato, la diferencia de rango en las concentraciones se debe a que los límites permisibles para cada anión son diferentes a como se puede observar en la tabla de niveles máximos permisibles en aguas según normas de calidad internacionales (tabla N₀1).

En las siguientes tablas se presentan datos promedios de los resultados experimentales obtenidos en una semana, así como sus respectivas varianzas en cada nivel.

Tabla 2: Datos de la curva de calibración normal para el anión fluoruro.

C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0,0	0,0000	0,0000
1,0	89,010	70,658
2,0	132,83	139,39
3,0	195,84	87,852
4,0	233,97	321,03
5,0	272,07	327,33

Tabla 4: Datos de la curva de calibración normal para el anión cloruro

C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0,0	0,0000	0,0000
1,0	98,078	279,20
5,0	400,99	261,05
10,0	770,91	572,43
15,0	1172,3	376,36
20,0	1569,4	1597,0

Tabla 3: Datos de la curva de calibración normal para el anión nitrito.

C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0,0	0,0000	0,0000
1,0	50,577	26,815
2,0	95,813	56,537
3,0	145,91	59,902
4,0	189,15	124,25
5,0	242,98	152,36

Tabla 5: Datos de la curva de calibración normal para el anión nitrato.

C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0,0	0,0000	0,0000
1,0	48,777	20,988
5,0	199,98	61,930
10,0	386,72	127,14
15,0	612,22	227,05
20,0	798,86	351,20



A los resultados obtenidos experimentalmente, se les realizó un análisis de regresión lineal ponderado (ARLP).

El análisis de regresión lineal ponderada consiste: en calcular la recta de regresión dando más peso a aquellos puntos donde existe menos error, es más importante que la recta calculada pase cerca de tales puntos que de aquellos puntos con errores más grandes. Este resultado se logra cuando se da a cada punto una ponderación inversamente proporcional a la varianza correspondiente.¹

Los valores obtenidos por ponderación se detallan en la tabla N^o 20 de anexo.

El valor del coeficiente de determinación (r^2) fue obtenido por análisis de regresión lineal ponderado para cada anión, los resultados se muestran a continuación:

Tabla 6: Resultados del coeficiente de determinación.

Anión	Coficiente de determinación (r^2)
F ⁻	0,9886
Cl ⁻	0,9999
NO ₂ ⁻	0,9997
NO ₃ ⁻	0,9996

Un valor de coeficiente de determinación igual $r^2 = 1$ indica que existe una buena correlación que se ajusta al modelo lineal de primer orden entre la concentración y el área

para cada anión en el rango de trabajo, como el valor de r^2 obtenido experimentalmente para cloruro, nitrito y nitrato es cercano a la unidad se puede decir que existe una buena linealidad. Excepto para el fluoruro no hay una buena linealidad, este método no está recomendado para la determinación de fluoruro según *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 20th, 1998, pues los estudios han indicado sesgos positivos o negativos, poca precisión en algunas muestras y es difícil de cuantificar a concentraciones bajas.

En las siguientes figuras se muestran las rectas de análisis de regresión ponderada.

Figura. 1: Curva de calibración normal anión fluoruro

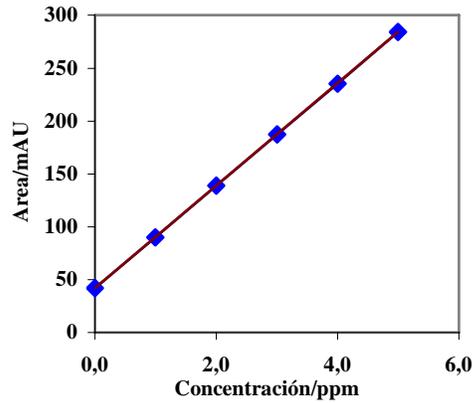


Figura. 2: Curva de calibración normal anión cloruro.

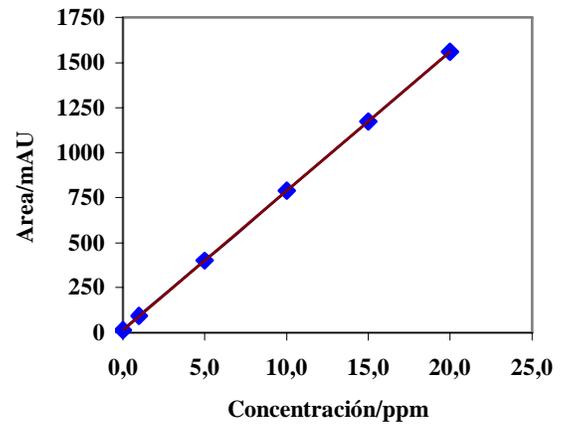
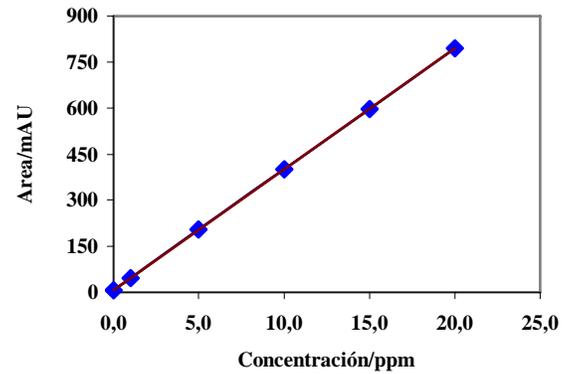
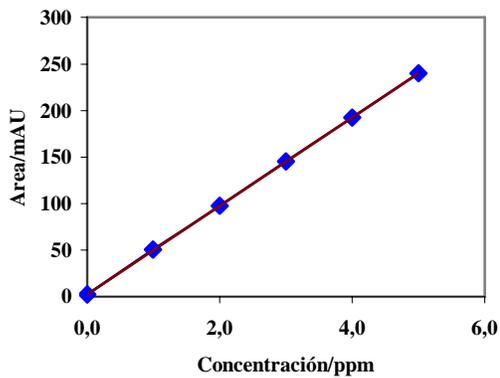


Figura. 3: Curva de calibración normal anión nitrito.

Figura. 4: Curva de calibración normal anión nitrato



Las rectas fueron graficadas en base a las áreas promedios de las réplicas en función de las concentraciones para los aniones fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato, se puede observar que las curvas presentan buena linealidad





VI.2.1. EVALUACIÓN DEL MODO DE INTEGRACIÓN DE LAS AREAS AUTOMÁTICO Y MANUAL DEL SOFTWARE

El software utilizado por el equipo de cromatografía corresponde a la nueva versión A.09.03 de *Agilent ChemStation* para cromatografía líquida. Este programa realiza integraciones de las áreas de forma automática por eventos de integraciones establecidos por el analista, el software proporciona gran cantidad de datos útiles para el análisis cualitativo como cuantitativo en un reporte, el cual representa entre otros: tablas de los tiempos de retención, áreas, alturas, concentraciones, etc. de cada uno de los componentes de una muestra.

Las integraciones de las áreas anteriormente presentadas para las curvas de calibración fueron realizadas por integración automática (por el software del cromatógrafo), para evaluar el modo de integración automático se procedió a integrar de forma manual para cada estándar y de esta manera comparar los resultados de las integraciones manuales y automáticas, debido a las dispersiones que existen entre los resultados obtenidos de las lecturas para cada nivel de concentración, se aplicó el análisis de regresión lineal ponderado (ARLP).

En la siguiente tabla se muestra la comparación de los parámetros de regresión lineal ponderado manual y automático.

Tabla 1: Comparación del análisis de regresión lineal ponderado para los modos de integración de las áreas: automático y manual. (F⁻, NO₂⁻ 0,0–5,0 mg/l y Cl⁻, NO₃⁻ 0,0– 20,0 mg/l)

Anión	Integraciones automáticas			Integraciones manuales.		
	Intercepto (b ₀)	Pendiente (b ₁)	Coefficiente de determinación (r ²)	Intercepto (b ₀)	Pendiente (b ₁)	Coefficiente de determinación (r ²)
F ⁻	41,84	48,40	0,9886	44,55	46,18	0,9882
Cl ⁻	15,77	77,18	0,9999	11,76	77,64	0,9999
NO ₂ ⁻	2,516	47,49	0,9997	0,827	46,61	0,9998
NO ₃ ⁻	7,575	39,29	0,9996	3,892	38,55	0,9994

En la tabla se observan que los parámetros de regresión obtenidos por integraciones automáticas y manuales no varían mucho uno con respecto al otro, por tanto se procedió a trabajar con las integraciones automáticas realizando un análisis de regresión lineal ponderado (ARLP). El trabajar con integraciones automáticas permite reducir el tiempo en el tratamiento de los resultados el cual es fundamental a la hora de desarrollar un método para un análisis de rutina.

VI.3 CONTROL DE CALIDAD DE LA CURVA DE CALIBRACIÓN NORMAL.

Las rectas de calibración pueden ser usada como guía para realizar varios análisis, por este motivo es necesario realizar un control a la curva de calibración para cada anión. Mediante el uso de las cartas de control se evalúa el comportamiento de los resultados de las curvas obtenidos durante varios días.

Para observar la repetibilidad en las curvas de calibración normal se utilizaron cartas de control, para cada anión donde se presentan los límites de tolerancia de los parámetros de regresión (intercepto y pendiente) de dichas curvas las cuales se elaboraron por 5 días consecutivos, se realizó el promedio de las áreas obtenidas durante los cinco días para cada uno de los cuatro aniones. Estos datos se muestran en la tabla N₀ 9.

Tabla 2: Parámetros de regresión de las curvas de calibración normal realizadas por cinco días consecutivos.

Anión	Parámetros de regresión	Días				
		1	2	3	4	5
F ⁻	b ₁	55,02	41,34	46,35	45,67	40,87
	b ₀	21,73	41,71	51,98	57,32	70,91
Cl ⁻	b ₁	40,03	39,01	37,94	40,00	38,90
	b ₀	12,58	-6,861	5,679	-0,118	6,968
NO ₂ ⁻	b ₁	51,24	43,95	48,72	48,85	46,01
	b ₀	2,274	12,16	3,056	-6,552	-4,854
NO ₃ ⁻	b ₁	40,03	39,01	37,94	40,00	38,90
	b ₀	12,58	-6,861	5,679	-0,118	6,968

Para que exista un buen control en las diferentes curvas tiene que haber una correlación entre los parámetros b_0 y b_1 obtenidos de los días en que se realice el análisis, por lo tanto los valores b_0 y b_1 de las diferentes curvas de calibración deben caer dentro de la elipse. De caso contrario al no existir correlación no puede haber buen control de las curvas.

Las siguientes figuras muestran la forma de las cartas de control utilizando los valores de b_0 y b_1 de los cinco días en que se elaboraron las curvas de calibración

Figura. 1: Control de calidad de la curva de calibración para el anión fluoruro

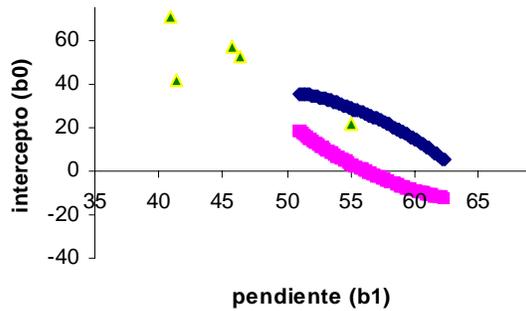


Figura. 2: Control de calidad de la curva de calibración para el anión nitrito.

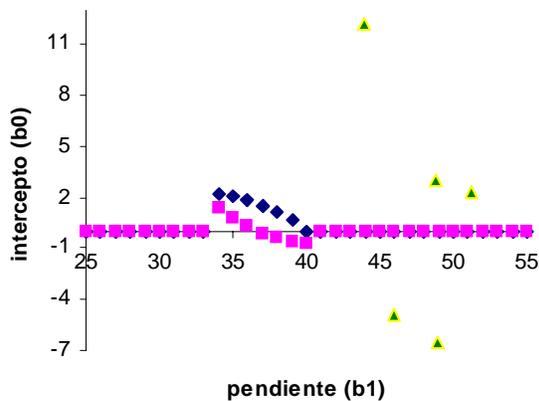


Figura. 3: Control de calidad de la curva de calibración para el anion cloruro

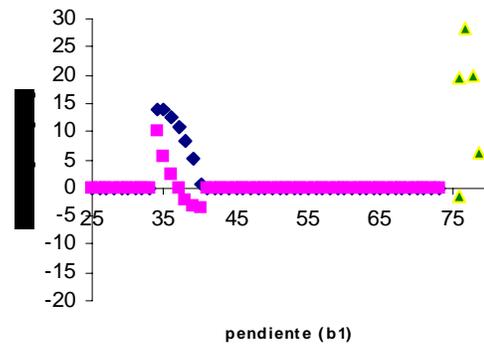
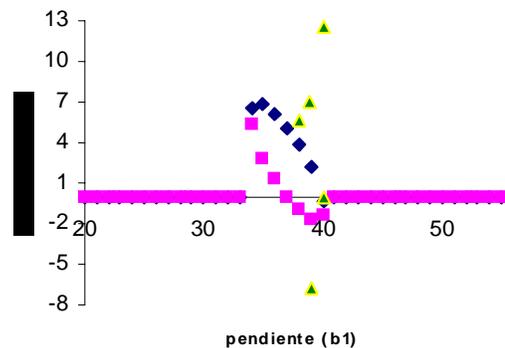


Figura. 4: Control de calidad para el anion nitrito.



Los valores experimentales (b_0 y b_1) obtenidos durante cinco días consecutivos para los aniones fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato no caen dentro de la elipse, no existe un control en las curvas de calibración por lo tanto se puede afirmar que la linealidad no es repetible en diferentes días y no es posible trabajar con la misma curva para toda la semana para estos aniones. Sin embargo, la curva puede ser utilizada para análisis en un solo día.

Los factores que afectan más la falta de repetibilidad de las curvas de calibración normal es la variación de los interceptos, esto se debe a la falta de condiciones de trabajo citadas anteriormente tales como: la temperatura de la columna y del ambiente, reproducibilidad con que se introduce la muestra en el sistema de inyección de la columna, calidad del agua desionizada etc.

VI.4. LÍMITE DE DETECCIÓN Y LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN.

De acuerdo a las normas ISO (International Standardization Organization) 9000: 2000¹ y IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry.)²: la señal de detecciones se define como $S.D=3,29 \times Sb_0$. Utilizando la pendiente del modelo de regresión se obtiene el límite de detección

$$LD = \frac{(3,29 \times Sb_0)}{b_1} \quad \text{Ec. 1}$$

Y para el límite de cuantificación.

$$LC = \frac{(10 \times Sb_0)}{b_1} \quad \text{Ec. 2}$$

Sustituyendo los valores de Sb_0 y b_1 en las ecuaciones anteriores se obtuvo el límite de detección y de cuantificación para cada anión.

El límite de detección y de cuantificación se determinó a partir de la curva de calibración normal (Cl^- , NO_3^- 0 - 20 ppm y F^- , NO_2^- 0 - 5 ppm), los datos se muestran en la tabla N_o. 19 de anexo. Se realizó un análisis de regresión lineal ponderado obteniéndose la pendiente y el valor de la desviación estándar del intercepto.

Tabla 1: Resultados de la pendiente y desviación estándar del intercepto.

Aniones	Pendiente (b_1)	Desviación estándar (Sb_0)
F^-	48,406	5,6426
Cl^-	77,184	5,7696
NO_2^-	47,490	1,4316
NO_3^-	39,292	4,7743

Tabla 2: Límite de detección y límite de cuantificación para los aniones estudiados.

Aniones	Límite de Detección (mg/l)	Límite de Cuantificación (mg/l)
F⁻	0,383	1,166
Cl⁻	0,245	0,747
NO₂⁻	0,100	0,301
NO₃⁻	0,399	1,215

El método presenta un buen límite de detección y de cuantificación, por debajo de los niveles máximos permisibles (tabla N₀₁) en aguas naturales para fluoruro, cloruro, nitrito y nitrato.

El método es aplicable solamente para el análisis de cloruro y nitrato en dicha muestra, pero no es recomendado para la determinación de fluoruro y nitrito en aguas naturales, debido a que el rango de trabajo de los métodos espectrofotométricos aplicados en los Métodos Estándar, son: 0.3 - 1.4 ppm y 0.005 - 0.50 ppm. Este método podría ser aplicado para el análisis en otras matrices.

VI.5. EXACTITUD DE MÉDICON: PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN.

Para evaluar la exactitud de la medición, se calcula el porcentaje de recuperación, se puede decir que una medición es confiable cuando los resultados obtenidos se encuentran entre un rango de valores de 80 a 120 % recomendado para las metodologías analíticas. El modelo de la curva de adición patrón (AP) es $Y_1 = b_0 + b_1 X$, y el modelo para la curva de calibración con estándares puros (CCN) $Y_2 = b_0 + b_1 X$, (tabla N₀20 anexo). El porcentaje de recuperación se obtiene calculando la pendiente de la curva de adición patrón entre la curva de calibración normal por 100.

$$\% R = \frac{b_1 AP}{b_1 CCN} \times 100 \quad \text{Ec. 3}$$

Donde:

b_1 AP: pendiente del modelo de regresión de la curva de calibración por adición patrón.

b_1 CCN: pendiente del modelo de regresión de la curva de calibración con estándares puros (calibración normal).

Tabla 3: Resultados del porcentaje de recuperación.

Porcentaje de recuperación	
Cloruro	Nitrato
89,65 %	117,5 %

El método para análisis de cloruro y nitrato presenta una buena recuperación de los aniones por cuanto la muestra con adición presenta un porcentaje de recuperación de 89,65 para cloruro y de 117,5 para nitrato, valores que están dentro del rango de porcentaje de recuperación recomendado para las metodologías analíticas. Para los aniones fluoruro y nitrito no se muestran porcentajes de recuperación debido a que estos aniones pueden ser detectados pero no cuantificados en la muestra de agua analizada.

VI.6. ESTUDIO DEL EFECTO DE MATRIZ.

Con el propósito de estudiar el efecto de matriz (aumento o disminución de la cantidad real de analitos presentes en la muestra) en la determinación de cloruro y nitrato en muestras de agua natural, se hizo una comparación entre la pendiente e intervalos de confianza de la curva de

calibración normal y la pendiente e intervalos de la curva de calibración por adición patrón. En las siguientes tablas se observan los valores de las pendientes con los intervalos de confianza de ambas curvas de los aniones cloruro y nitrato.

Tabla 4: Comparación de los parámetros de regresión de la curva de adición patrón y de la curva de calibración normal para el anión cloruro.

Curvas de calibración.	Valores de las pendientes (b_1)	Intervalos de confianza	
		Valor inferior	Valor superior
Calibración normal	77,18	75,750	78,617
Adición patrón	69,00	51,426	86,593

Tabla 5: Comparación de los parámetros de regresión de la curva de adición patrón y de la curva de calibración normal para el anión nitrato.

Curvas de calibración.	Valores de las pendientes (b_1)	Intervalos de confianza	
		Valor inferior	Valor superior
Calibración normal	39,29	38,105	40,478
Adición patrón	46,01	33,094	58,928

Los resultados obtenidos, gráficamente tanto de las figuras 13 y 14, y estadísticamente como de las tablas 13 y 14, demuestran que para los aniones cloruro y nitrato, existen diferencias significativas entre las pendientes y los intervalos de confianza de las curvas de calibración normal con las pendientes de las curvas de adición patrón, demostrando que si existe efecto de matriz en la muestra.

En las siguientes figuras se muestra una comparación entre las curvas de calibración normal y las curvas de adición patrón.

Figura. 1: Comparación del modelo lineal de la curva de calibración normal y la curva de adición patrón para el anión cloruro.

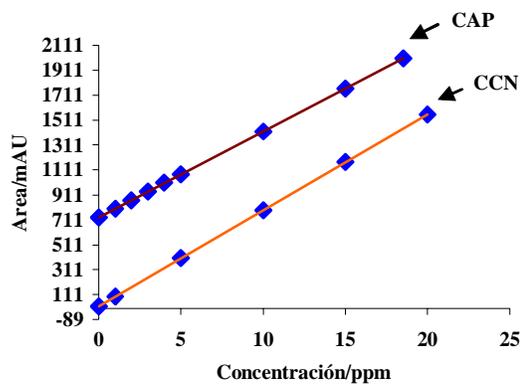
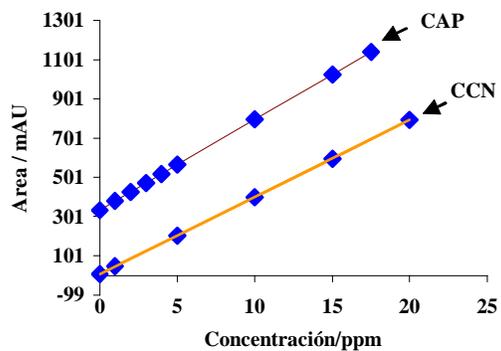


Figura. 2: Comparación del modelo lineal de la curva de calibración normal y la curva de adición patrón para el anión nitrato.



Gráficamente al comparar las dos curvas: CCN y CAP se puede apreciar un leve efecto de matriz en la determinación de la concentración de cloruro y nitrato por este método, tanto en el rango de concentraciones de trabajo (entre 0 - 4 ppm) como extrapolando hasta un rango de concentraciones comparables con el método CCN.

Del valor de la pendiente en la curva por adición patrón se observa que la matriz de la muestra disminuiría la sensibilidad en la determinación de cloruro (efecto depresor) y aumentaría la sensibilidad en la determinación de nitrato (efecto intensificador).

¹ Norma ISO (International Standardization Organization) 9000: 2000.

² IUPAC (International Union for Pure and Applied Chemistry.), Limit of Detection, Spectrochim. Acta 33 B, 242, **1978**.

VI.7. COMPARACIÓN DEL MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON UN MÉTODO DE REFERENCIA.

Para efectos de comparación, los resultados de cloruro y nitrato por cromatografía iónica se contrastaron con los obtenidos por los métodos de referencia o recomendado internacionalmente para el análisis de parámetros físico-químicos de aguas según *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 20^{ed}, 1998*, usando el método de nitrato mercúrico para la determinación de cloruro y método UV-V para la determinación de nitrato.

Los resultados del contraste se reflejan en las siguientes tablas para los dos aniones en consideración:

Tabla 1: Comparación de la concentración de cloruro obtenida por cromatografía iónica y por un método de referencia (Nitrato mercúrico)

Cloruro.			
	Método cromatografía iónica.	Método referencia (Nitrato mercúrico)	% Error
Concentración	36,87	34,50	6,8

Tabla 2: Comparación de la concentración de nitrato obtenida por cromatografía iónica y por un método de referencia (UV-V)

Nitrato.			
	Método cromatografía iónica.	Método referencia (UV-V)	% Error
Concentración	33,46	32,40	3,2

$$\%error = \frac{C_{mci} - C_{mr}}{C_{mr}} * 100 \quad \text{Ec. 1}$$

Cmci: concentración por método de cromatografía de intercambio iónica.

Cmr: concentración por método de referencia



Se puede observar que el porcentaje de error en las concentraciones para los aniones cloruro y nitrato son menores del 10%, por lo que se puede afirmar que los resultados en la determinación de aniones por el método de cromatografía iónica son aceptables.

Para efectos de comparación, se procedió a comprobar la presencia de nitritos en la muestra real utilizando el método Zambelli recomendado por *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater 20^{ed}*, cuyo rango de aplicación es: 0,005-0,5 ppm, con un L.D= 0,0059 ppm, y se determinó una concentración de nitritos de: 0,126 mg/l. Por lo que, la muestra contiene efectivamente nitritos, mostrando así la poca aplicabilidad en la realidad de la cromatografía iónica en condiciones en las cuales la concentración de nitrito esta por debajo de los niveles máximos recomendados por la OMS (3 mg/l) y normas CAPRE (1 mg/l).



VII. CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio preliminar de los parámetros analíticos que influyen para el desarrollo de un método analítico en la determinación simultánea de fluoruro, cloruro, nitrito, nitrato en una muestra de agua por cromatografía iónica en modo directo, en este estudio se identificaron algunos de los factores: analíticos y experimentales, que afectan el desarrollo del método de cromatografía iónica tales como: la falta de control de la temperatura de la columna, la reproducibilidad con que se introduce la muestra en el sistema de inyección de la columna, la calidad del agua desionizada y de los reactivos, encontrando una variabilidad significativa de: la conductividad y de los tiempos de retención los cuales deben de permanecer constantes para obtener buenos resultados.

Se evaluaron los parámetros de validación: estudio de la repetibilidad de la medición, linealidad, límite de detección (LD), límite de cuantificación (LC) porcentaje de recuperación.

El estudio de repetibilidad de la medición para el anión cloruro y control de las curvas de calibración normal de los cuatros aniones reflejan que no existe repetibilidad en diferentes días, sin embargo se obtuvo una buena linealidad para los aniones cloruro, nitrito y nitrato, excepto fluoruro que obtuvo un valor de (r^2) 0.988, los límites de detección y de cuantificación del método están por debajo de los niveles máximos permisibles para cada anión en aguas naturales, El método no es aplicable para la determinación de fluoruro y nitrito en aguas naturales, debido a que el rango de trabajo de los métodos espectrofotométricos aplicados en los Métodos Estándar, son: 0.3-1.4 ppm y 0.005-0.50 ppm. Este método podría ser aplicado para el análisis en otras matrices.

El porcentaje de recuperación para el anión cloruro fue de 89,65 y para nitrato fue de 117,5 valores que indican que se obtiene muy buena recuperación bajo las condiciones de trabajo para estos aniones.

**VIII.****RECO****MENDACIONES.**

Los factores experimentales afectan más a la repetibilidad de la medición analítica por lo que se recomienda:

- ✦ Mejor control de la temperatura en la columna, es necesario tener adaptado un sistema de termostatación (horno o baño de circulación de agua) a la misma para obtener cromatogramas más reproducibles.
- ✦ Evaluar una muestra de agua certificada que permita comparar los resultados de los análisis por el método de cromatografía iónica y permitir una evaluación más objetiva de la exactitud del método.
- ✦ Realizar un estudio de validación completa para el método, determinación de aniones en agua por cromatografía iónica.
- ✦ Realizar la evaluación de la incertidumbre en las mediciones analíticas.
- ✦ Evaluar parámetros fisicoquímicos sobre la conductividad de la fase móvil: fuerza iónica, concentración etc.
- ✦ Aplicar este método al estudio de otro tipo de aguas, potables, purificadas, etc. para evaluar las concentraciones en que se encuentran estos aniones y extender el rango de aplicación analítica del método.



ANEXOS

**IX. ANEXOS.***Tabla 3: Análisis de repetibilidad de la medición del anión cloruro (5 ppm)*

Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Área(mAU)	Área(mAU)	Área(mAU)	Área(mAU)	Área(mAU)
386,77	393,71	389,38	385,21	444,24
385,94	583,31	371,70	379,07	416,07
377,67	453,55	382,64	370,80	423,09
382,58	417,51	389,33	387,37	425,78
371,44	407,78	381,64	387,40	425,86
389,74	403,25	372,62	382,30	415,82
396,64	400,24	398,07	391,40	407,69
387,76	415,68	379,05	390,67	422,42
386,81	419,97	386,78	390,69	431,75

Tabla 4: Análisis de varianzas por test de BARTLETT

HOMOGENEIDAD DE VARIANZAS POR TEST DE BARTLETT		
Parámetro de Bartlett	M =	16,732
Chi-Cuadrada a 95%	C ² =	52,189
CONCLUSION	Varianzas son homogéneas	



Tablas 5: Datos experimentales para curva de calibración normal, límite de detección y límite de cuantificación.

Fluoruro			Cloruro		
C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)	C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0	0	0	0	0	0
1,0	91,575	70,658	1,0	114,54	279,20
	76,747			74,353	
	86,337			111,33	
	90,614			88,401	
	99,778			101,76	
2,0	119,72	139,39	5,0	419,37	261,05
	122,42			396,04	
	140,94			411,70	
	147,34			400,64	
	133,73			377,18	
3,0	196,98	87,852	10,0	770,65	572,43
	180,03			738,66	
	199,56			799,51	
	204,95			787,42	
	197,68			758,31	
4,0	244,18	321,03	15,0	1199,2	376,36
	203,60			1148,4	
	237,95			1180,1	
	249,50			1173,4	
	234,60			1160,2	
5,0	292,37	327,33	20,0	1594,3	1597,0
	243,58			1528,9	
	272,00			1573,4	
	281,28			1580,9	
	271,11			1570,5	



Nitrito		
C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S²)
0	0	0
1,0	55,777	26,815
	55,192	
	51,467	
	44,581	



	45,867	
2,0	104,35	56,537
	97,458	
	100,22	
	92,053	
	84,992	
3,0	154,17	59,903
	149,48	
	150,52	
	138,74	
	136,64	
4,0	207,79	124,25
	183,37	
	189,98	
	185,63	
	178,99	
5,0	258,85	152,36
	231,49	
	251,72	
	242,03	
	230,81	

Nitrato		
C(mg/l)	Área(mAU)	Varianza (S ²)
0	0	0
1,0	55,486	20,988
	51,642	
	45,613	
	45,276	
	45,867	
5,0	211,53	61,930
	194,40	
	195,38	
	193,76	
	204,82	
10,0	401,38	127,14
	375,11	
	375,65	
	392,18	
	389,28	
15,0	635,61	227,05
	607,56	
	606,59	
	616,18	
	595,13	
20,0	828,04	351,20
	781,55	
	795,32	
	804,86	
	784,54	





Tabla 6: valores obtenidos por análisis de regresión lineal ponderado (curvas de calibración normal).

Fluoruro		Cloruro		Nitrito		Nitrato	
$y = 41.84 + 48.40 * x$		$y = 15.77 + 77.18 * x$		$y = 2.516 + 47.48 * x$		$y = 7.575 + 39.29 * x$	
x_i	\hat{y}	x_i	\hat{y}	x_i	\hat{y}	x_i	\hat{y}
0,0	41,84	0,0	15,77	0,0	2,516	0,0	7,575
1,0	90,25	1,0	92,95	1,0	50,01	1,0	46,87
2,0	138,7	5,0	401,7	2,0	97,50	5,0	204,0
3,0	187,1	10,0	787,6	3,0	145,0	10,0	400,5
4,0	235,5	15,0	1174	4,0	192,5	15,0	596,9
5,0	283,9	20,0	1559	5,0	240,0	20,00	793,4

x_i : concentración experimental

\hat{y} : área ajustada

Tabla 7: Datos promedio de la curva de calibración por adición patrón y para el cálculo de porcentaje de recuperación del anión cloruro y nitrato.

Fluoruro		Cloruro		Nitrito		Nitrato	
C(mg/l)	A(mAU)	C(mg/l)	A(mAU)	C(mg/l)	A(mAU)	C(mg/l)	A(mAU)
0,0	0,000	0,0	727,2	0,0	0,000	0,0	336,2
1,0	66,39	1,0	797,1	1,0	16,48	1,0	373,5
2,0	106,1	2,0	861,5	2,0	51,94	2,0	420,6
3,0	169,7	3,0	921,4	3,0	92,46	3,0	460,2
4,0	220,2	4,0	1065	4,0	117,9	4,0	534,5

C: Concentración

A: Área



Figura. 1: El cromatograma corresponde a una mezcla de estándar de 4 aniones inorgánicos a una Concentración para F^- y NO_2^- 5 ppm, Cl^- y NO_3^- 20 ppm, a un flujo de 2.0 ml/ min. En un Tiempo de análisis de 8 minutos, mediante cromatografía de intercambio iónico.

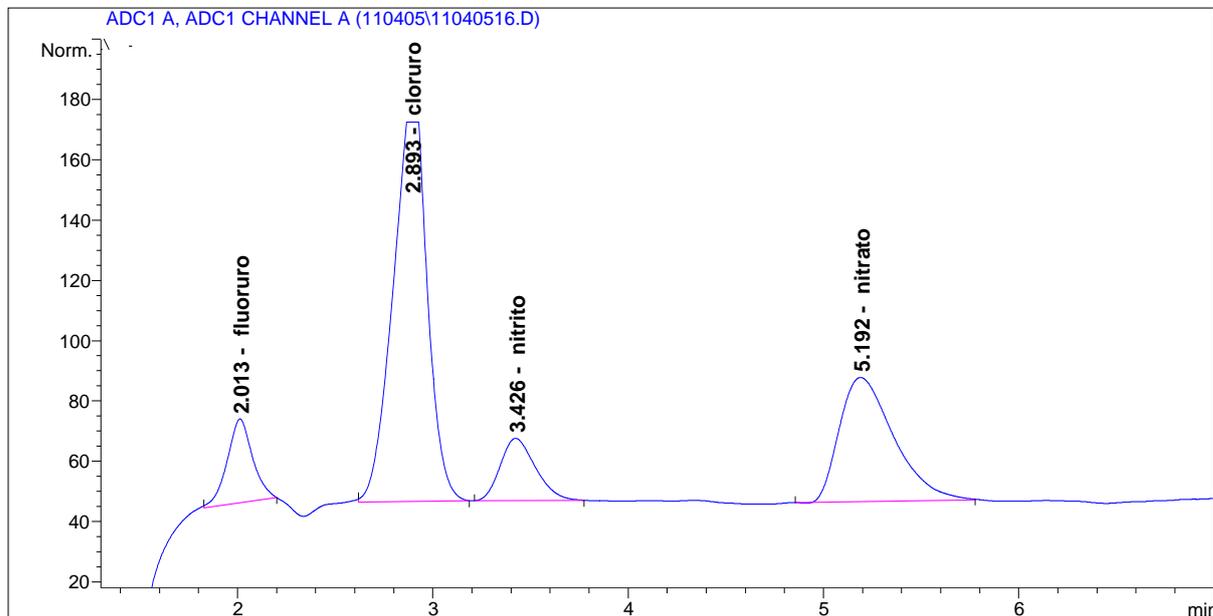


Tabla 8: tiempos de retención de los 4 aniones en estudio (flujo de 2 ml/min. Tiempo de análisis de 8 minutos).

Compuesto	Tiempo de retención	Compuesto	Tiempo de retención
F^-	2.013	NO_2^-	3.426
Cl^-	2.893	NO_3^-	5.192