

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
Facultad de Ciencias  
Fecha 24-8-95  
ENTRADA NUM. 1758

T  
15  
112

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**



**DETERMINACIÓN DE IONES METÁLICOS -COMO  
HIDROXAMATOS- EN MATRICES DE DIVERSA  
COMPOSICIÓN POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA**

**TESIS DOCTORAL**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA  
GRANADA  
Nº Documento 69681355  
Nº Copia 21230900

**M<sup>a</sup> Gracia Bagur González**  
**Granada, 1995**





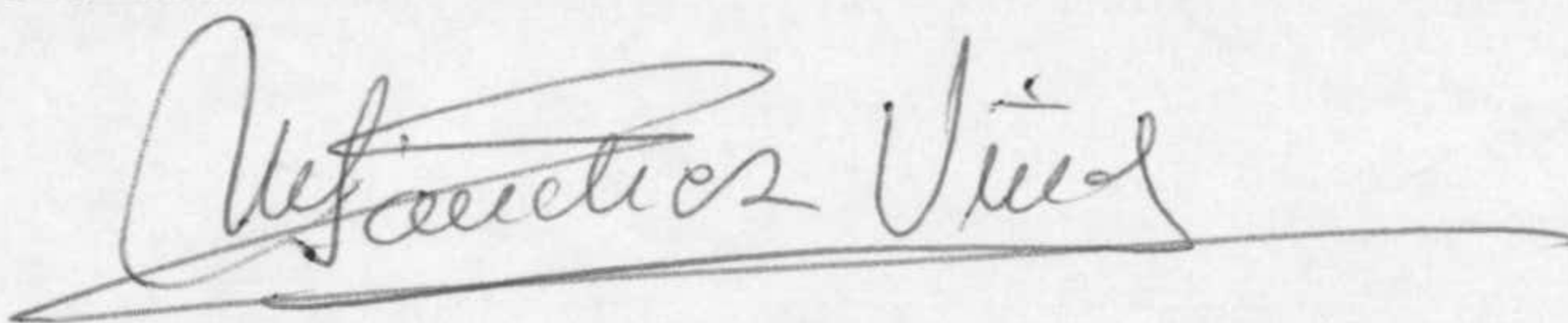
**Determinación de iones metálicos -como  
hidroxamatos- en matrices de diversa composición  
por Cromatografía Líquida**

por

*M<sup>a</sup> Gracia Bagur González*

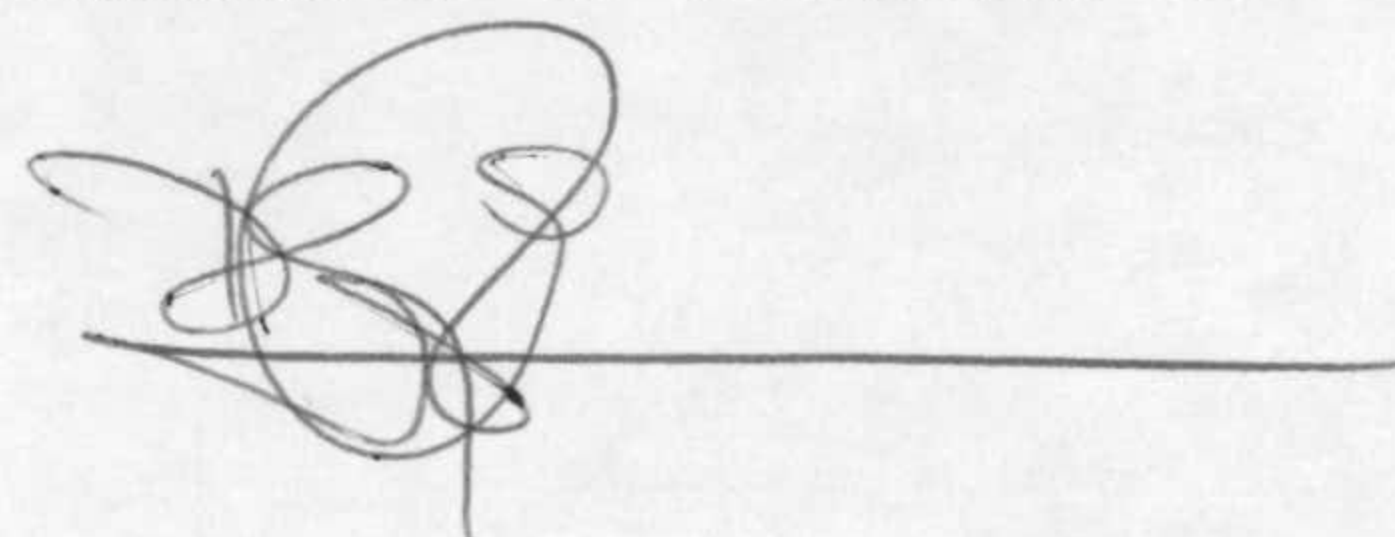
VISADA en Granada, a 28 de Julio de 1995.

Fdo: Dra. D<sup>a</sup>. Mercedes Sánchez-Viñas,  
Profesora Titular del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad de  
Granada.

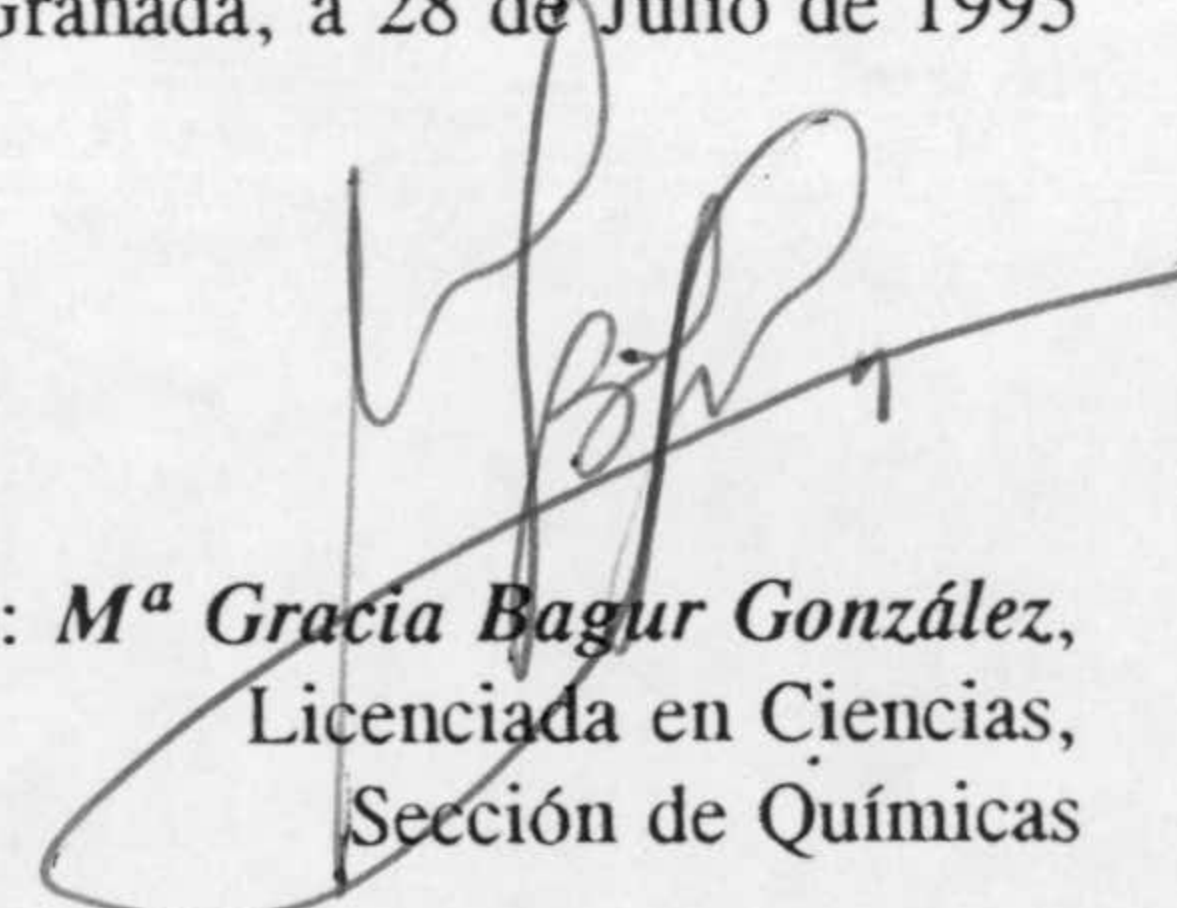


MEMORIA presentada para aspirar al grado de Doctor en Ciencias,  
Sección de Químicas.

Fdo: Dr. D. Domingo Gázquez Evangelista,  
Profesor Titular del Departamento de  
Química Analítica de la Universidad de  
Granada.



Granada, a 28 de Julio de 1995



Fdo: M<sup>a</sup> Gracia Bagur González,  
Licenciada en Ciencias,  
Sección de Químicas



*A mis padres,*

*A Domingo, a Mercedes.*



*Dadme un punto de apoyo y moveré el Universo*  
Arquímedes

Hoy, cuando esta Memoria empieza a ver la luz, no quiero dejar pasar el hecho significativo de dar las gracias a todas aquellas personas, que de alguna u otra forma han tomado parte en ella. El citarlas a todas y cada una de ellas, sería un poco largo, sin embargo no quiero olvidar a aquellas, que en cierto modo quedan reflejadas en cada una de estas páginas.

En primer lugar a mis Maestros y Directores de Tesis, Mercedes Sánchez Viñas y Domingo Gázquez Evangelista, porque sin su *paciencia, ayuda, amistad y comprensión*, no habría podido llegar a ser lo que soy.

A Pedro Espinosa Hidalgo por "tutelar" mi formación.

A Olga Cazalla porque de forma desinteresada, ha realizado la mayor parte de las figuras que ilustran el trabajo experimental.

A Alicia Jimenez Gómez, por ser mi "compañera de fatigas" en el Laboratorio.

Al Departamento de Química Analítica y todos sus miembros, Profesores y doctorandos, porque me han hecho sentir como en mi propia casa.

A mis amigos, Manolo, Pedro, Juan, M<sup>a</sup> Carmen y Sonia por compartir conmigo muchas noches y fines de semana en el Laboratorio.

A "Migue", por tener la paciencia de compaginar sus teoremas e integrales con las "teclas del cromatógrafo".

A Pepe, María, Sese, Quique, Victor, Mounir y Loli por comprender la influencia de la investigación sobre mis "cambios de humor".

A todos, de todo corazón, **GRACIAS**.



## INDICE

<i>OBJETIVOS</i> .....	1
<i>INTRODUCCIÓN</i> .....	7
<b>CAPÍTULO I:</b> <i>DISOLUCIONES, REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA</i> .....	63
I.1.- DISOLUCIONES Y REACTIVOS .....	64
I.2.- INSTRUMENTACIÓN Y MATERIAL .....	67
I.2.1.- INSTRUMENTACIÓN .....	68
I.2.2.- MATERIAL .....	69
I.3.- MUESTRAS ANALIZADAS .....	70
I.4.- METODOLOGÍA .....	71
I.4.1.- METODOLOGÍA DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO .....	71
I.4.2.- METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA .....	72
I.5.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS .....	73
I.5.1.- ASPECTOS METODOLÓGICOS DE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRAZAS METÁLICAS EN MUESTRAS DE MATRIZ FUNDAMENTALMENTE ORGÁNICA .....	73
I.5.2.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTA MEMORIA ..	78
<b>CAPÍTULO II:</b> <i>VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS</i> .....	83
II.1.- PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO .....	85
II.1.1.- EXACTITUD .....	85
II.1.2.- PRECISIÓN .....	86
II.1.3.- SENSIBILIDAD .....	87
II.1.4.- SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD .....	88
II.1.4.- LÍMITE DE DETECCIÓN .....	88
II.1.5.- APLICABILIDAD Y PRACTICABILIDAD .....	90
II.2.- LA CALIBRACIÓN LINEAL UNIVARIANTE .....	91
II.2.1.- EL CONCEPTO DE LINEALIDAD EN LA CALIBRACIÓN ANALÍTICA .....	91
II.2.2.- VALIDACIÓN DEL MODELO LINEAL ESTABLECIDO .....	94
II.2.3.- ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN .....	101
II.2.4.- PARÁMETROS DE CALIDAD .....	102
II.3.- VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA .....	103
II.3.1.- MATERIALES DE REFERENCIA .....	105
II.3.2.- MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN .....	108
II.3.3.- VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE	



ADICIÓN DE PATRÓN, EN AUSENCIA DE UN EFECTO MATRIZ . . . . .	110
II.4.3.1.- Procedimiento estadístico . . . . .	111
II.3.4.- VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD MEDIANTE LA METODOLOGÍA DE ADICIÓN DE PATRÓN EN PRESENCIA DE UN EFECTO MATRIZ . . . . .	115

**CAPÍTULO III:**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE  
VANADIO . . . . . 121**

III.1.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSAS VARIABLES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE V(V) CON BPHA EN CLOROFORMO . . . . .	122
III.1.1.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE HCL . . . . .	122
III.1.2.- INFLUENCIA DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LOS REACTIVOS . . . . .	124
III.1.3.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO EN FASE ORGÁNICA . . . . .	124
III.1.4.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACIÓN . . . . .	127
III.1.5.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO V(V)-BPHA . . . . .	127
III.1.6.- ESTUDIO DEL RANGO DE LINEALIDAD . . . . .	128
III.1.7.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE FASES . . . . .	130
III.1.8.- MÉTODO PROPUESTO . . . . .	131
III.2.- DETERMINACIÓN DE VANADIO (COMO HIDROXAMATO) MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN . . . . .	132
III.2.1.- COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL COMPLEJO V(V)-BPHA . . . . .	132
III.2.2.- INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE CH <sub>3</sub> OH SOBRE EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL COMPLEJO V(V)-BPHA . . . . .	132
III.2.3.- ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y TIEMPO DE DESARROLLO DEL COMPLEJO V(V)-BPHA EN CHCl <sub>3</sub> : CH <sub>3</sub> OH . . . . .	134
III.2.4.- PRUEBAS PRELIMINARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS . . . . .	135
III.2.5.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y VELOCIDAD DE LA FASE MÓVIL	
III.2.5.1.- Influencia de la composición de la fase móvil . . . . .	137
III.2.5.2.- Influencia del flujo de la fase móvil sobre la eficacia . . . . .	142
III.2.6.- MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VANADIO CON BPHA . . . . .	144
III.2.6.1.- Evaluación de la linealidad entre señal instrumental y concentración . . . . .	145
III.2.6.2.- Validación del modelo lineal establecido. Estudio de la zona de linealidad utilizando una relación de fases en la extracción $r = 0.2$ (Org. : Ac.) . . . . .	149
III.2.6.3.- Validación del modelo lineal establecido. Estudio de la zona de linealidad utilizando una relación de fases en la extracción $r = 0.05$ (Org. : Ac.) . . . . .	151
III.2.6.4.- Comprobación de las calibraciones para las relaciones de fases estudiadas . . . . .	154
III.2.6.5.- Evaluación de la precisión . . . . .	155
III.2.6.6.- Sensibilidad . . . . .	159
III.2.6.7.- Límites de detección y de cuantificación . . . . .	159



III.2.7.- MÉTODO PROPUESTO	162
III.2.8.- SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	162
III.3.- APLICACIONES ANALÍTICAS	166
III.3.1.- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN VANADIO EN CONCHA FINA (CITTEREA s.p.)	166

#### **CAPÍTULO IV:**

### **DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE MOLIBDENO** . . . . . 173

IV.1.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSAS VARIABLES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE Mo(VI) CON BPHA EN CLOROFORMO	174
IV.1.1.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE HCl	174
IV.1.2.- INFLUENCIA DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LOS REACTIVOS	176
IV.1.3.- INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO EN FASE ORGÁNICA	177
IV.1.4.- INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACIÓN	180
IV.1.5.- ESTUDIO DEL RANGO DE LINEALIDAD	181
IV.1.6.- ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE FASES	182
IV.1.7.- MÉTODO PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL COMPLEJO Mo(VI)-BPHA	183
IV.2.- DETERMINACIÓN DE MOLIBDENO EN FORMA DE COMPLEJO CON BPHA, MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	185
IV.2.1.- PRUEBAS PRELIMINARES. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS	185
IV.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL	188
IV.2.3.- OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL	191
IV.2.4.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA SOBRE LA RESOLUCIÓN	193
IV.2.5.- MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE MOLIBDENO CON BPHA	195
IV.2.5.1.- Validación del modelo lineal establecido. Estudio de la zona de linealidad	195
IV.2.5.2.- Evaluación de la precisión	198
IV.2.5.3.- Sensibilidad	202
IV.2.5.4.- Límites de detección y cuantificación	202
IV.2.6.- MÉTODO PROPUESTO	204
IV.2.7.- SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	204
IV.3.- APLICACIONES ANALÍTICAS	208
IV.3.1.- TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS	208
IV.3.2.- RESULTADOS	208
IV.3.2.1.- Tratamiento estadístico de los resultados	208
IV.3.3.- ANÁLISIS DE CONTENIDO EN MOLIBDENO EN UNA MUESTRA DE BATIDO DIETÉTICO ELABORADO POR CAMBRIDGE PLAN-NUTRICARE S.A.	209
IV.3.3.1.- Resultados	210



IV.3.4.- ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MOLIBDENO DE UNA MUESTRA DE LENTEJAS (Herbum nonatum) . . . . .	213
IV.3.4.1.- Resultados . . . . .	213
IV.3.5.- ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MOLIBDENO DE UNA MUESTRA DE FERTILIZANTE SÓLIDO SUMINISTRADO POR BASF ESPAÑOLA S.A. . . . .	216
IV.3.5.1.- Resultados . . . . .	216

**CAPÍTULO V:**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE VANADIO Y MOLIBDENO . . . . . 225**

V.1.- CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES . . . . .	226
V.2.- ESTUDIO CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN DE VANADIO Y MOLIBDENO . . . . .	228
V.2.1.- ASIGNACIÓN DE LOS PICOS . . . . .	228
V.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL . . . . .	229
V.2.3.- OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL . . . . .	234
V.2.4.- INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA SOBRE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS COMPLEJOS . . . . .	236
V.2.5.- ESTABLECIMIENTO DE LA LONGITUD DE ONDA MÁS ADECUADA PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA . . . . .	240
V.2.6.- SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VANADIO Y MOLIBDENO CON BPHA . . . . .	240
V.2.6.1.- Validación del modelo establecido. Estudio de la zona de linealidad . . . . .	242
V.2.6.2.- Evaluación de la precisión del método propuesto . . . . .	245
V.2.6.3.- Sensibilidad . . . . .	250
V.2.6.4.- Límites de detección y cuantificación . . . . .	250
V.2.7.- MÉTODO PROPUESTO . . . . .	252
V.2.8.- SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS . . . . .	253
V.3.- APLICACIONES ANALÍTICAS . . . . .	256
V.3.1.- ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN VANADIO Y MOLIBDENO DE UNA MUESTRA SINTÉTICA DE AGUA . . . . .	256
V.3.1.1.- Tratamiento de la muestra . . . . .	256
V.3.1.2.- Resultados . . . . .	257

**CAPÍTULO VI:**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TITANIO . . . . . 267**

VI.1.- ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO PREVIO . . . . .	268
VI.1.1.- ESPECTRO DEL COMPLEJO Ti(IV)-MEDSHA EN MEDIO HIDROALCOHÓLICO . . . . .	268



VI.1.2.- INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE CH <sub>3</sub> OH SOBRE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Ti(IV)-MEDSHA . . . . .	269
VI.2.- ESTUDIO CROMATOGRÁFICO . . . . .	271
VI.2.1.- ASIGNACIÓN DE LOS PICOS . . . . .	271
VI.2.2.- OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL . . . . .	274
VI.2.2.1.- Influencia del porcentaje de disolución 10 <sup>-2</sup> N de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (pH = 2.0) en la fase móvil . . . . .	274
VI.2.2.2.- Influencia de la concentración de MEDSHA en la fase móvil . . . . .	276
VI.2.3.-INFLUENCIA DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL . . . . .	278
VI.2.4.- TIEMPO DE DESARROLLO DEL COMPLEJO. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE MEDSHA . . . . .	279
VI.2.4.1.- influencia de la concentración de MEDSHA en la disolución de medida	281
VI.2.5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE TITANIO DON MEDSHA . . . . .	283
VI.2.5.1.- Validación del método establecido. Estudio de la zona de linealidad	283
VI.2.5.2.- Evaluación de la precisión . . . . .	286
VI.2.5.3.- Sensibilidad . . . . .	290
VI.2.5.4.- Límites de detección y cuantificación . . . . .	290
VI.2.6.- SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS . . . . .	291
VI.3.- APLICACIONES ANALÍTICAS . . . . .	295
VI.3.1.- ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN TITANIO DE UNA MUESTRA COMERCIAL DE GRAGEAS DE CHOCOLATE . . . . .	295
VI.3.3.1.- Resultados . . . . .	295

<i>BIBLIOGRAFÍA</i> . . . . .	299
-------------------------------	-----



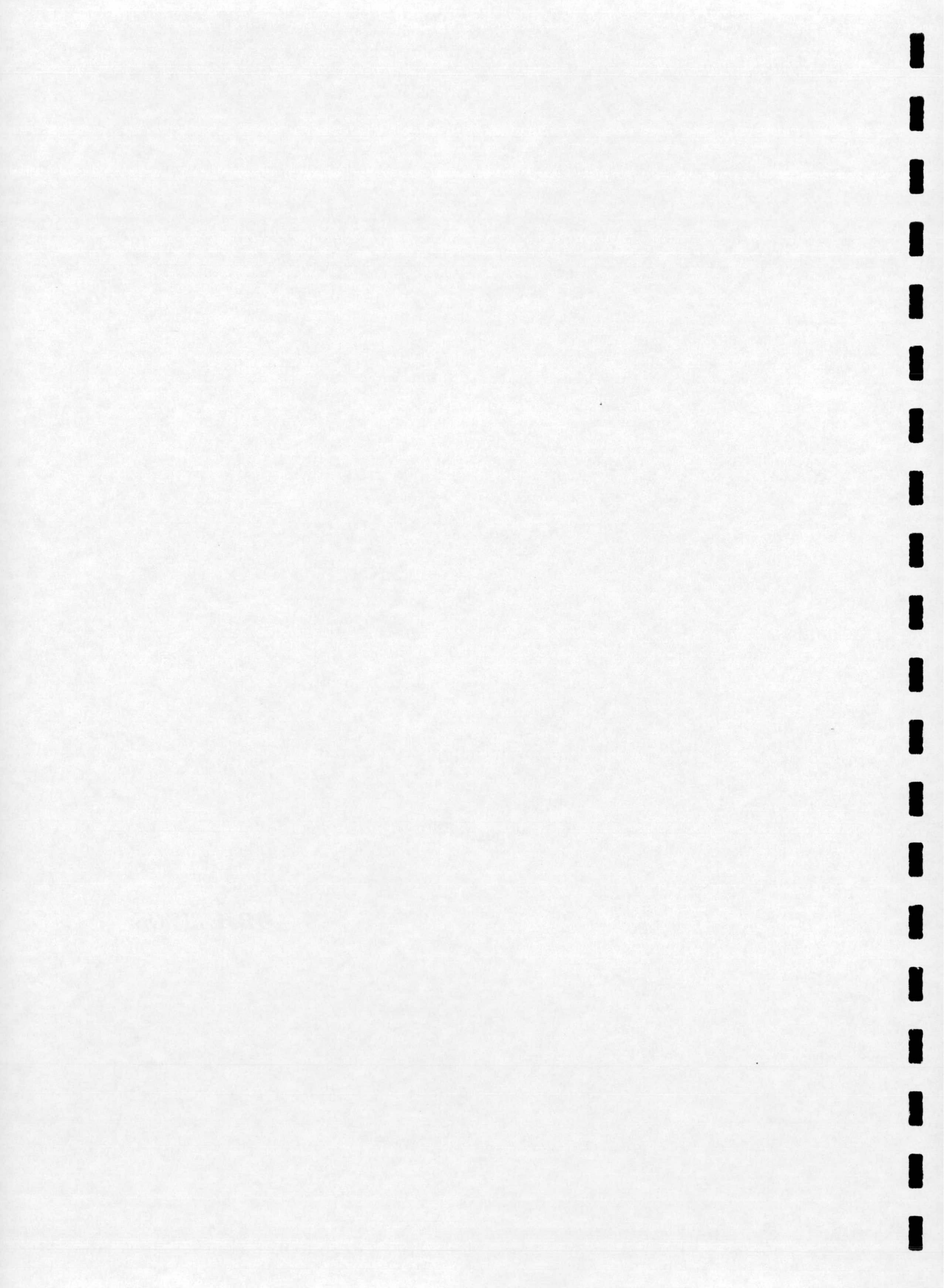
*Para nuestro trabajo son necesarias dos cosas: una de ellas es una persistencia infatigable; la otra, la habilidad para desechar algo en lo que hemos invertido muchos sudores y muchas ideas.*

*Albert EINSTEIN*



*OBJETIVOS*







## OBJETIVOS

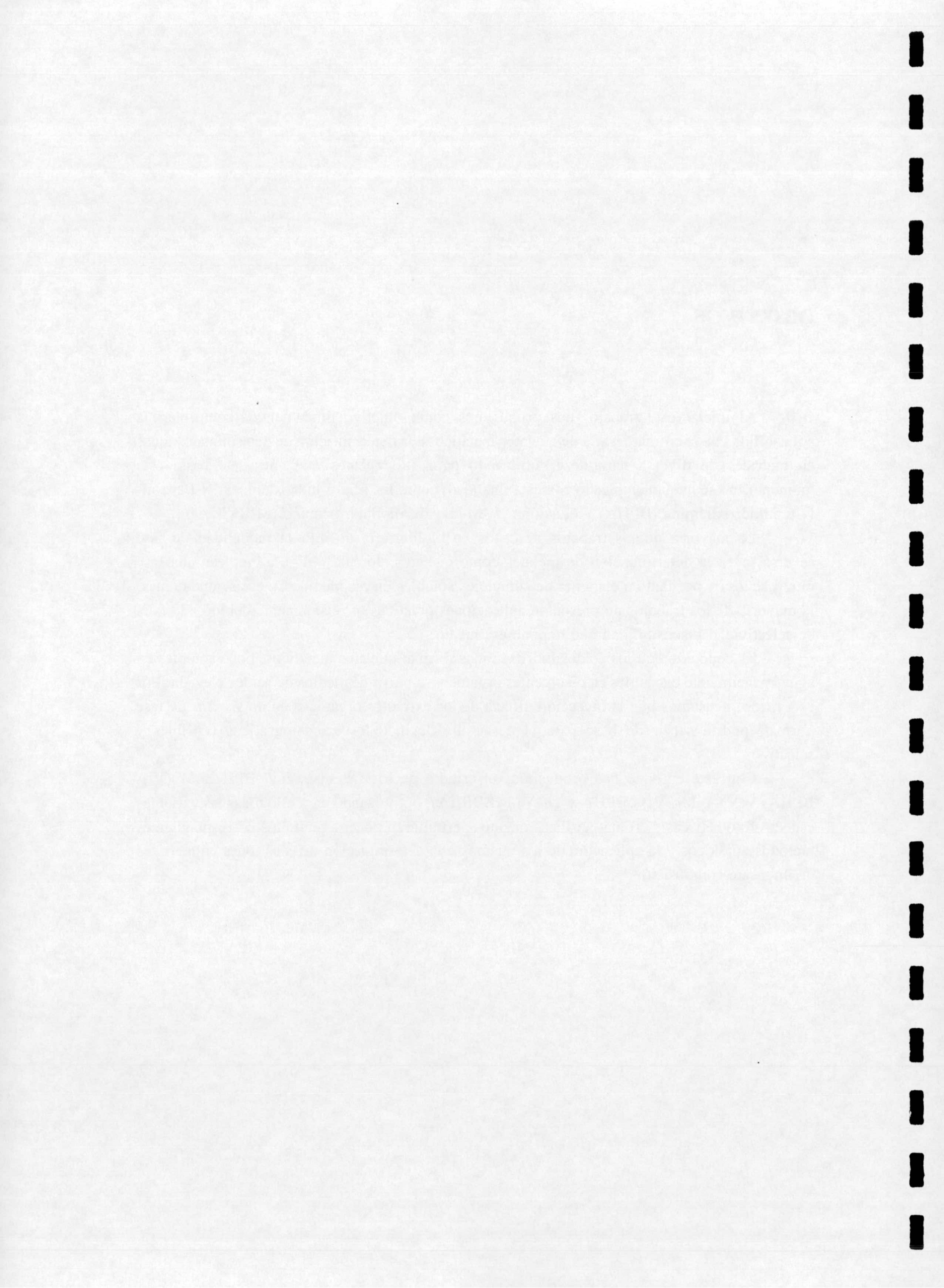
Al iniciar este trabajo, nos propusimos como objetivo fundamental, comprobar la aplicabilidad de la cromatografía de quelatos metálicos a la determinación de determinados iones en matrices de diversa naturaleza, utilizando para ello agentes quelantes que hasta este momento, no se habían empleado con esta finalidad, como los ácidos hidroxámicos: N-Benzoil-N-fenilhidroxilamina (BPHA) y el ácido 5,5'-Metilendisalicilhidroxámico (MEDSHA).

La mayoría de los trabajos descritos en bibliografía utilizan la modalidad de fase reversa, para la determinación de metales como quelatos, lo cual obliga a emplear una fase móvil acuosa y por tanto a disponer de complejos solubles en ese medio. En estas condiciones, la mayoría de los trabajos no presentan aplicaciones prácticas, probablemente debido a la falta de selectividad y sensibilidad que impone ese medio.

Es conocido que los ácidos hidroxámicos forman quelatos metálicos, poco solubles en agua, y fácilmente extraíbles en disolventes orgánicos, a partir de medios de acidez elevada. Por esta razón, pensamos que la inyección directa de los extractos orgánicos en un sistema de fase normal, podría servir de base para el desarrollo de métodos cromatográficos sensibles y selectivos.

Con este enfoque nos propusimos el estudio de los sistemas V(V)-BPHA, Mo(VI)-BPHA, V(V) + Mo(VI) - BPHA y Ti(IV)-MEDSHA), optimizando para ello todas las variables espectrofotométricas y cromatográficas que nos permitieran poner a punto los correspondientes métodos analíticos y la aplicación de los mismos a la determinación de esos iones en matrices de diferente composición.

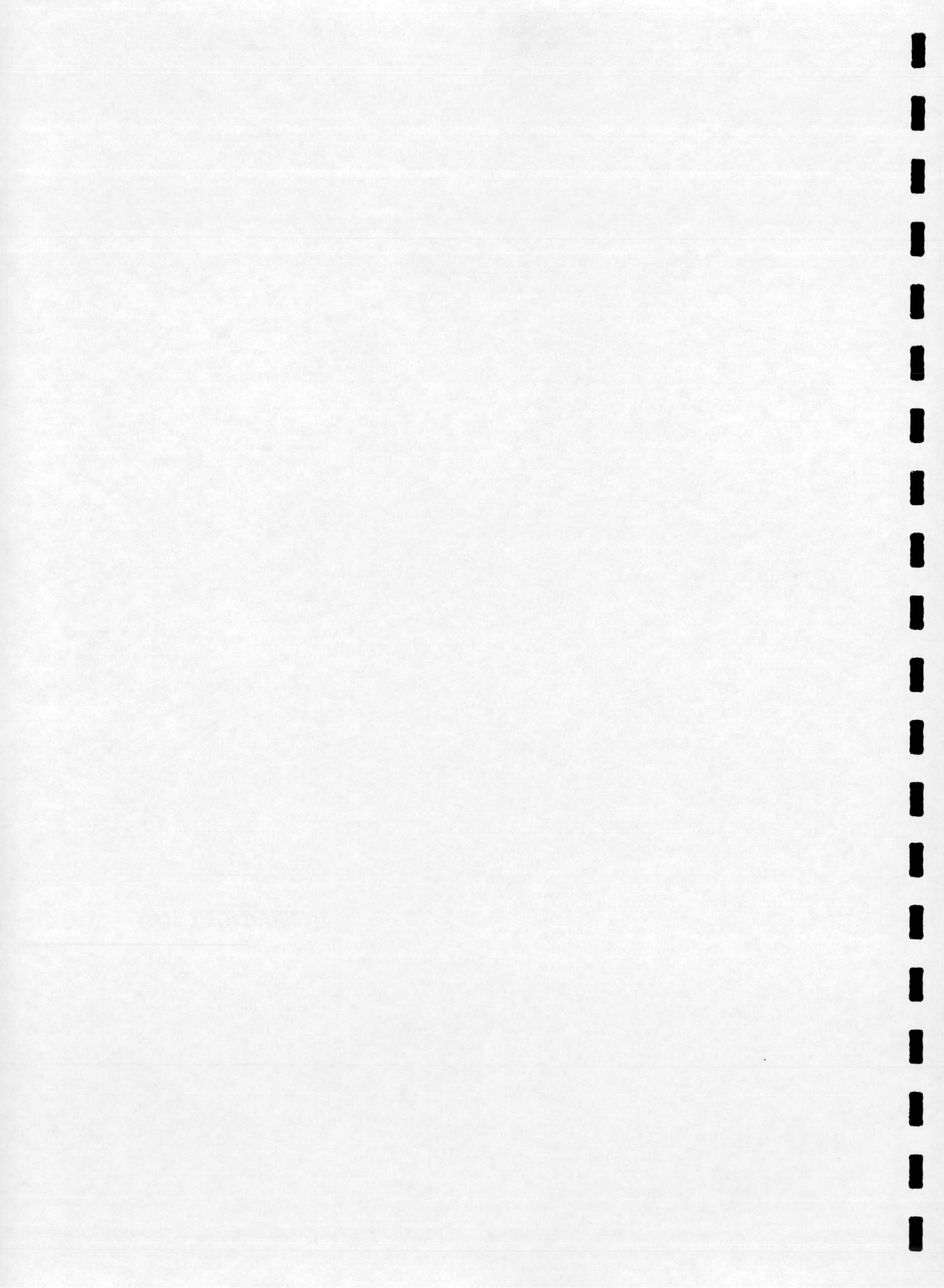






*INTRODUCCIÓN*







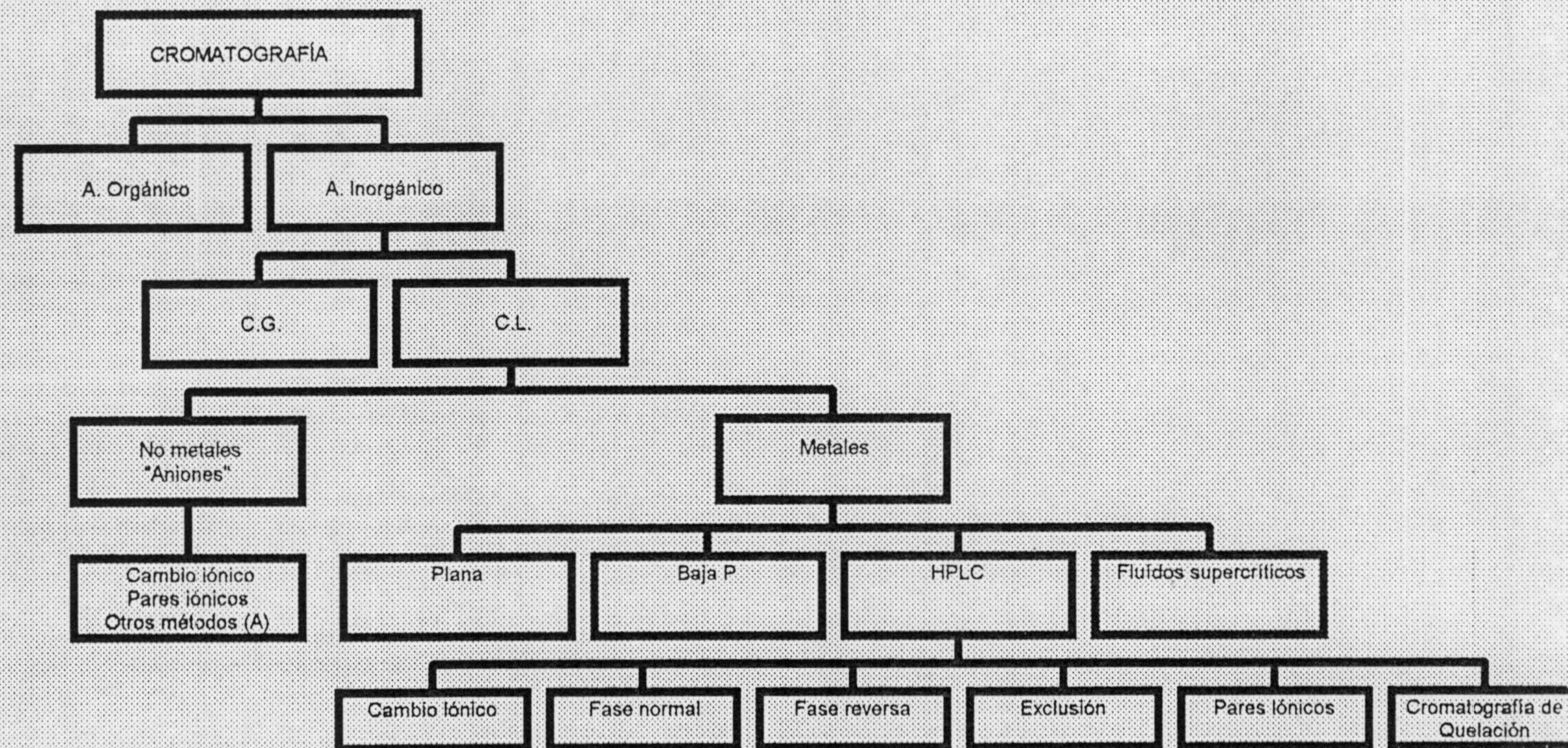
## INTRODUCCIÓN

Sin duda alguna, los sistemas más versátiles para la separación y determinación de las especies presentes en una mezcla de sustancias químicas, implican la utilización de la **cromatografía**. En el caso de los **compuestos orgánicos**, debido a la volatilidad de muchísimos de ellos, la cromatografía de gases ha sido y continúa siendo una opción fuerte, aunque poco a poco, su posición predominante está cambiando en favor de la **cromatografía líquida** [1].

La determinación de **compuestos inorgánicos**, particularmente metales, se ha llevado a cabo en la mayoría de los casos con técnicas espectroscópicas, destructivas y no destructivas. El objetivo en el pasado, consistía en un simple análisis elemental pero, desde la década de los 70, el término *especiación* ha ido ganando en importancia. En general, las técnicas espectroscópicas no pueden por sí mismas dar información acerca de las diferentes especies bajo las que se puede presentar un elemento determinado en una muestra, siendo preciso acudir a procedimientos electroquímicos, como la voltametría de redisolución anódica. Incluso en estos casos, el empleo de un proceso de separación como el cromatográfico es crucial para alcanzar los objetivos del análisis.



# CROMATOGRAFÍA Y ANÁLISIS INORGÁNICO





## INTRODUCCIÓN

---

### CROMATOGRAFÍA DE GASES (CG)

Los compuestos inorgánicos se consideran habitualmente como compuestos no volátiles y térmicamente inestables bajo las condiciones que se utilizan en cromatografía de gases. También se considera que hay una incompatibilidad inherente de dichos compuestos con las fases estacionarias, debido a una reactividad indeseable con las mismas. Algunos químicos analíticos incluso, no son partidarios del empleo de la CG en este campo, pues asumen una incompatibilidad de las muestras con los detectores convencionales. Hay ciertos casos en los que estas limitaciones son ciertas, pero sin embargo, hay muchos ejemplos de separaciones interesantes por CG de compuestos metálicos y metaloides.

La forma iónica de muchos compuestos inorgánicos impide su análisis directo por CG, pero empleando métodos adecuados de derivatización, se puede conseguir una separación satisfactoria. Incluso, se pueden llevar a cabo separaciones cuali y cuantitativas con compuestos metálicos de gran reactividad, ya que las condiciones no-hidrolíticas y no-oxidativas de la CG las permiten.

Para que un compuesto inorgánico sea analizable por CG es deseable que tenga una serie de propiedades:

- \* Adecuada volatilidad.
- \* Estabilidad térmica.
- \* Forma monomérica.
- \* Neutralidad.
- \* Peso molecular relativamente bajo.
- \* Coordinación saturada.



## INTRODUCCIÓN

---

- \* Adecuado apantallamiento del átomo(s) metálico(s) por grupos orgánicos inertes y voluminosos.

Es decir, el complejo inorgánico o el compuesto organometálico, *deben parecerle* a la columna como un simple compuesto orgánico, de forma que el átomo metálico libre nunca debe entrar en contacto con la fase estacionaria.

Los quelatos en los que el átomo metálico central, tiene su carga neutralizada por ligandos aniónicos con átomos donores como oxígeno, nitrógeno, azufre o fósforo, pueden ser analizados por CG si poseen las condiciones adecuadas de volatilidad y estabilidad térmica. El rango de ligandos orgánicos adecuados para este fin es limitado, aunque se conoce un gran número de aplicaciones analíticas [2]. Las familias de ligandos más empleadas son:

- $\beta$ -dicetonatos y  $\beta$ -tiocetonatos
- Dialquilditiocarbamatos
- Dialquilditiofosfinatos
- Metaloporfirinas
- $\beta$ -cetoaminatos

Por otra parte, el desarrollo de nuevos detectores compatibles selectivos o específicos de los compuestos inorgánicos, ha permitido llevar a cabo análisis cuantitativos con elevada sensibilidad [3-6].



## INTRODUCCIÓN

---

### CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA (CL)

La cromatografía líquida es de particular importancia para aquellos compuestos inorgánicos que no reúnen la estabilidad térmica y volatilidad precisas para su análisis por CG. Las técnicas cromatográficas, y en particular los métodos por cambio iónico, se han empleado durante mucho tiempo para el análisis de iones inorgánicos, usando diversas técnicas de detección tales como, Conductometría, Polarografía y Espectrofotometría. En 1975 tuvo lugar un avance importantísimo en este campo, cuando Small y col. [7] desarrollaron un sistema nuevo para la determinación cromatográfica de iones inorgánicos.

El número de trabajos dedicados al análisis de aniones inorgánicos ha sido más numeroso que el de aquellos dedicados al análisis de cationes. La causa podemos encontrarla en la escasez de técnicas alternativas para el análisis de aquellos, mientras que en el caso de los cationes hay excelentes técnicas espectroscópicas, tales como la espectrometría de absorción atómica y la espectrometría de emisión atómica en su modalidad ICP (espectrometría de plasma acoplado inductivamente), además de métodos electroquímicos como polarografía y voltametría de redisolución anódica. Además, muchas de estas técnicas son multielementales, con lo que se compensa uno de los principales atractivos de la cromatografía. A pesar de esto, gran parte de la experiencia acumulada en el desarrollo de métodos cromatográficos de análisis de aniones se ha aplicado con éxito al análisis de cationes.



## INTRODUCCIÓN

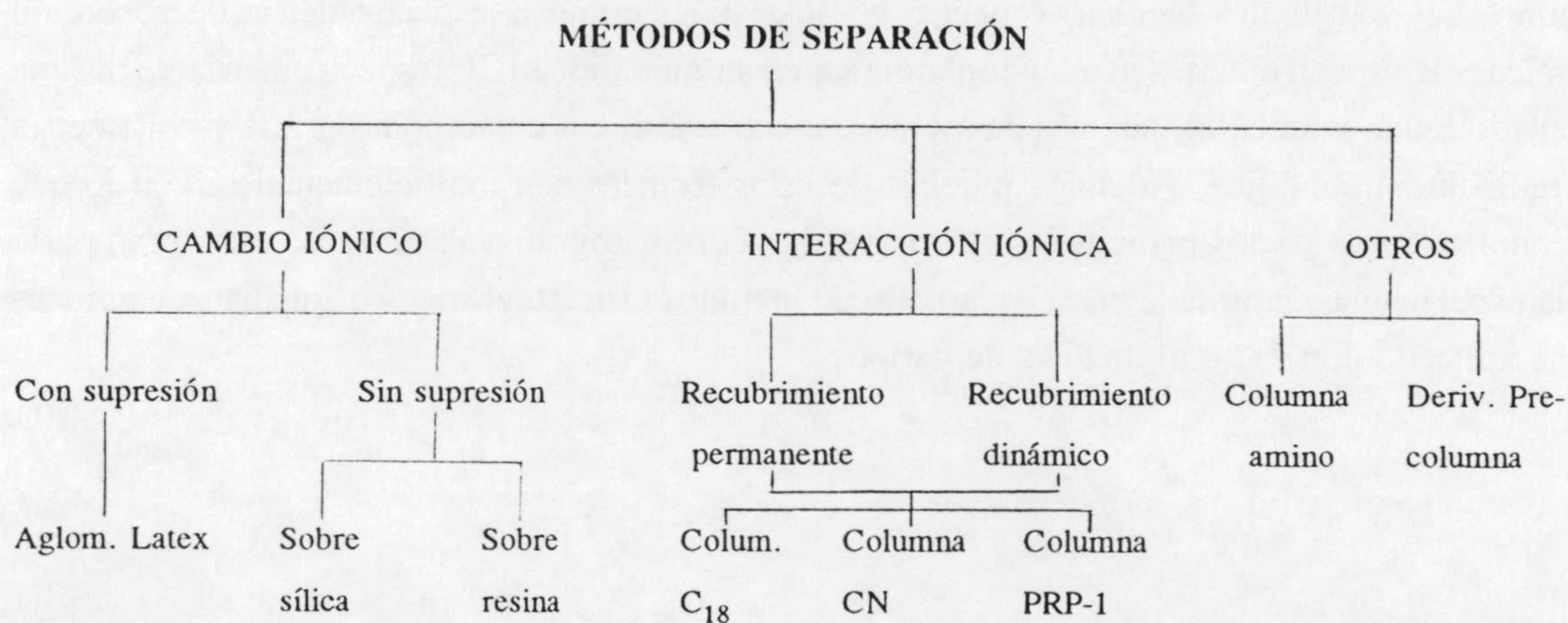
### ANÁLISIS DE ANIONES.

Podemos afirmar que los métodos de análisis de aniones inorgánicos por métodos cromatográficos están entre los más valiosos, como lo prueba la gran variedad de especies analizadas (TABLA I).

**TABLA I. Aniones inorgánicos determinados por CL.**

Azida	Cianuro	Molibdato	Silicato
Bromato	Dicromato	Nitrato	Sulfato
Bromuro	Ferrocianuro	Nitrito	Sulfito
Carbonato	Ferricianuro	Oxalato	Sulfuro
Clorato	Fluoruro	Pentationato	Tetrationato
Cloruro	Fosfato	Perclorato	Tiocianato
Cromato	Germanato	Periodato	Tiosulfato
Cianato	Iodato	Permanganato	Tritionato
	Ioduro	Persulfato	

Dichos métodos, podemos clasificarlos de acuerdo con el esquema siguiente.



(1) Columna polimérica de fase reversa.



## INTRODUCCIÓN

---

Podemos observar dos modalidades principales:

- Métodos de cambio iónico con resinas que poseen grupos cambiadores fijos.
- Métodos de interacción iónica que emplean diversos tipos de fases estacionarias, para retener de forma permanente o dinámica sustancias de naturaleza iónica.

y una tercera modalidad basada fundamentalmente en el empleo de columnas amino.

### Métodos de cambio iónico.

#### *A) Sistemas con supresión.*

Estos sistemas han sido objeto de una serie de revisiones [8-18]. Se basan en el empleo de un nuevo cambiador de iones en la llamada "columna de separación", junto con la novedad de usar una columna supresora con objeto de mejorar la detectabilidad de los iones eluidos.

La columna separadora está empaquetada con un material especial consistente en un aglomerado de látex aminado, sobre un substrato de cambio iónico. Este material contiene un núcleo de perlas del polímero estireno-divinilbenceno (S/DVB, 20-30  $\mu\text{m}$  de diámetro), con grupos ácido sulfónico superficiales. Estos grupos sirven para mantener -mediante atracciones electrostáticas- una monocapa de pequeñas partículas (0.1-0.5  $\mu\text{m}$ ) de látex, que han sido transformadas en un material de cambio aniónico mediante aminación. La partícula aglomerada resultante es estable, resistente a cambios de pH y en comparación con los cambiadores iónicos microporosos convencionales, es más eficaz, ya que la transferencia de masa se ve favorecida por la configuración pelicular del material [19].

La columna supresora está empaquetada, ya sea con un cambiador catiónico fuerte convencional o bien, con una membrana de cambio iónico formada por fibras huecas, a través de las cuales pasa el eluyente [20-22]. Al atravesar la columna supresora, los iones del eluyente son protonados para producir ácidos débiles no ionizados, los cuales tienen una baja conductividad. De esta manera, la conductividad de fondo del eluyente se reduce drásticamente y los analitos aniónicos se detectan con más facilidad.

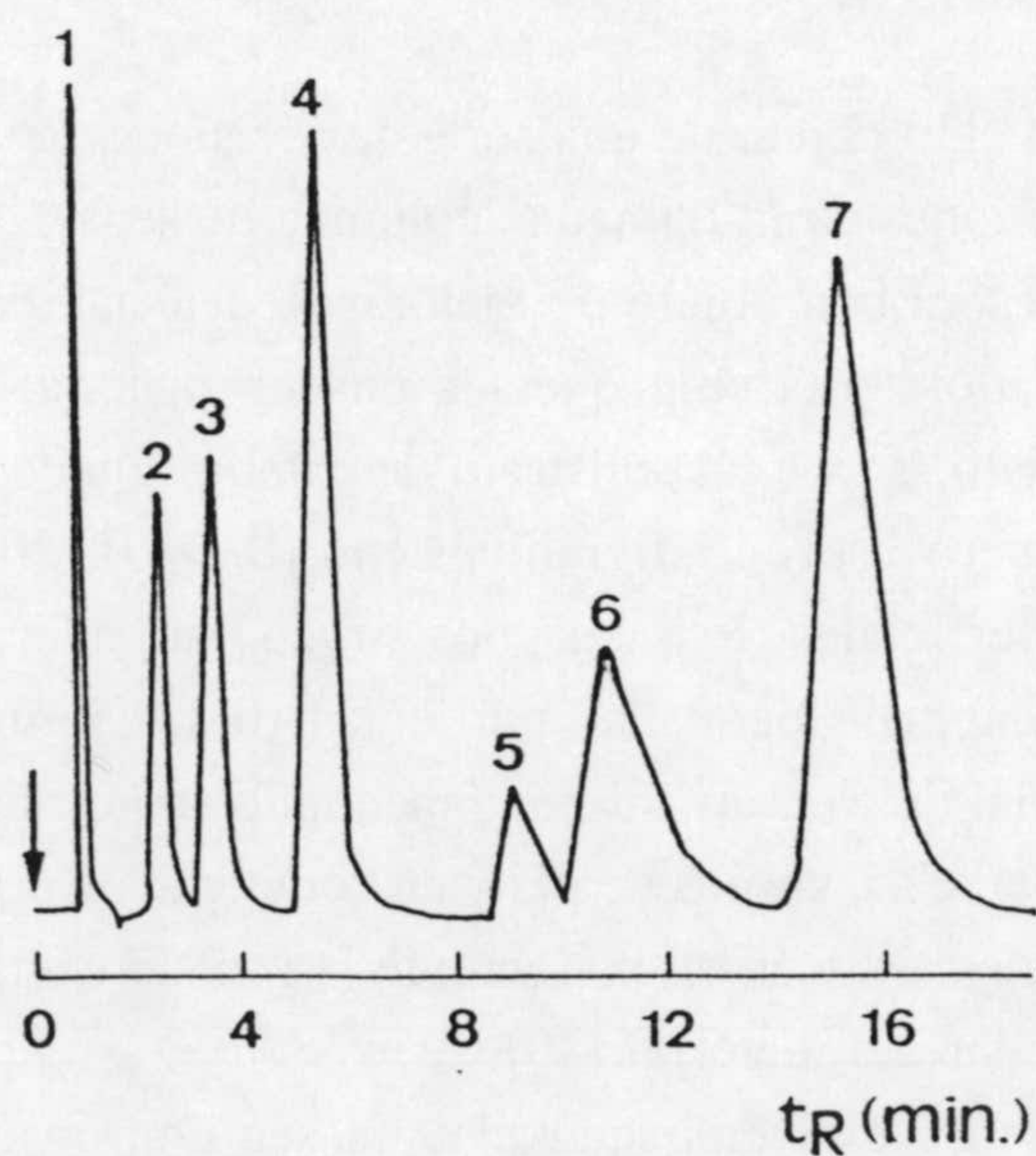
Los sistemas con supresión han dado lugar a interesantes separaciones, como la que se recoge en las figuras 1 y 2, si bien, desde el punto de vista cromatográfico sufren de una serie



## INTRODUCCIÓN

de inconvenientes, la mayoría de los cuales provienen del sistema supresor.

Este último origina un ensanchamiento de banda adicional, menos acusado en los sistemas supresores de membrana hueca. Además, las columnas supresoras convencionales requieren una regeneración periódica para restituir su capacidad de cambio iónico. Asimismo, la elección del eluyente está limitada a aquellos compuestos que sufran una adecuada protonación en la columna supresora. Estas deficiencias han promovido el desarrollo de sistemas cromatográficos que no requieren el uso de un sistema supresor.



**FIGURA 1.** Separación de algunos aniones inorgánicos utilizando una columna da aglomerado de látex unida a una columna supresora. COLUMNA: Material aglomerado, 20-30  $\mu\text{m}$  (250x4.6 mm d.i.). COLUMNA SUPRESORA: Dionex DC-X8 (resina totalmente sulfonada) 20-40  $\mu\text{m}$  (10x4.6 mm D.I.). FASE MÓVIL: 3.0 nM  $\text{HCO}_3^-$  + 2.4 mM  $\text{CO}_3^{2-}$ . FLUJO: 3.5 ml.min<sup>-1</sup>. Volumen inyectado: 100  $\mu\text{l}$ . Detección conductimétrica. ANIONES: (1)  $\text{F}^-$ ; (2)  $\text{Cl}^-$ ; (3)  $\text{NO}_2^-$ ; (4)  $\text{HPO}_4^{2-}$ ; (5)  $\text{Br}^-$ ; (6)  $\text{NO}_3^-$ ; (7)  $\text{SO}_4^{2-}$  en concentraciones entre 3-50 ppm.



## INTRODUCCIÓN

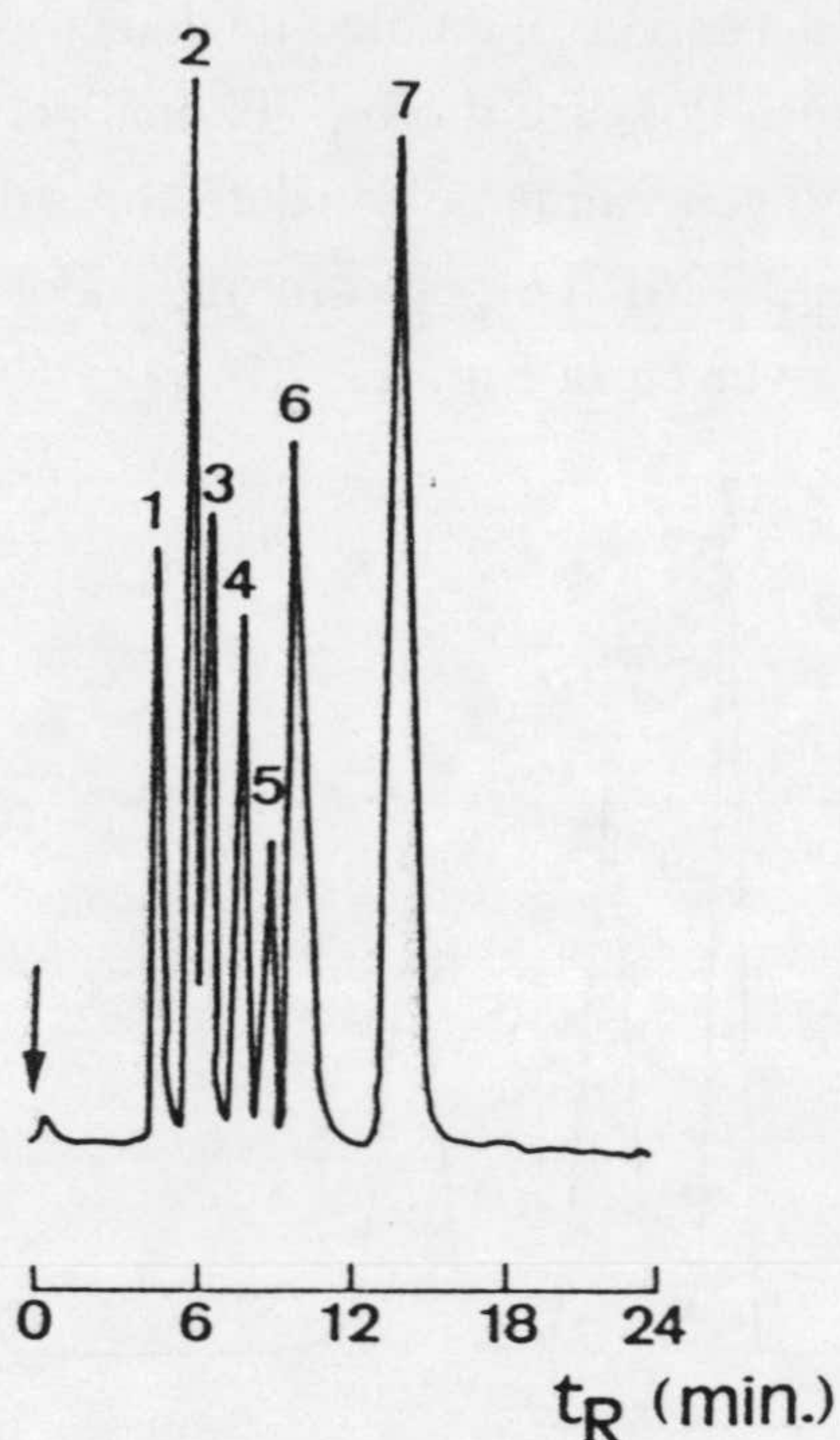


FIGURA 2. Separación mediante cromatografía iónica con un sistema con sistema supresor de membrana hueca. COLUMNA: Resina YEW AX-1, 47 cm x 190  $\mu\text{m}$ . COLUMNA SUPRESORA: Tubos de Nafión rodeados de disolución 0.05 M de ácido dodecilbenceno sulfónico (0.2  $\mu\text{m}$  de D.I.). FASE MÓVIL: 4 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + 4 mM  $\text{NaHCO}_3$  (pH = 10.2). FLUJO: 1.9  $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ . Volumen inyectado: 20  $\mu\text{l}$ ; Temperatura: 40  $^\circ\text{C}$ ; Detección conductimétrica; ANIONES: (1)  $\text{F}^-$ ; (2)  $\text{Cl}^-$ ; (3)  $\text{NO}_2^-$ ; (4)  $\text{PO}_4^{3-}$ ; (5)  $\text{Br}^-$ ; (6)  $\text{NO}_3^-$ ; (7)  $\text{SO}_4^{2-}$  en concentraciones entre 0.07 y 0.56 ppm.

### B) Sistemas sin supresión

B.1.- Materiales de cambio iónico de alta capacidad. La mayoría de los cambiadores iónicos comerciales, tanto los basados en sílice como en resinas, tienen una capacidad de cambio



## INTRODUCCIÓN

iónico relativamente alta, generalmente  $> 1$  meq./g, lo cual obliga al empleo de eluyentes con alta fuerza iónica. Esto impide a su vez el empleo de detectores conductimétricos, a menos que se empleen sistemas supresores. Por este motivo, el análisis de aniones inorgánicos con estos materiales, se ha llevado a cabo generalmente con detectores de otro tipo, como electroquímicos [23], de índice de refracción [24-26] o espectrofotométricos con derivatización post-columna [27-29]. Un ejemplo se puede ver en la Fig. 3.

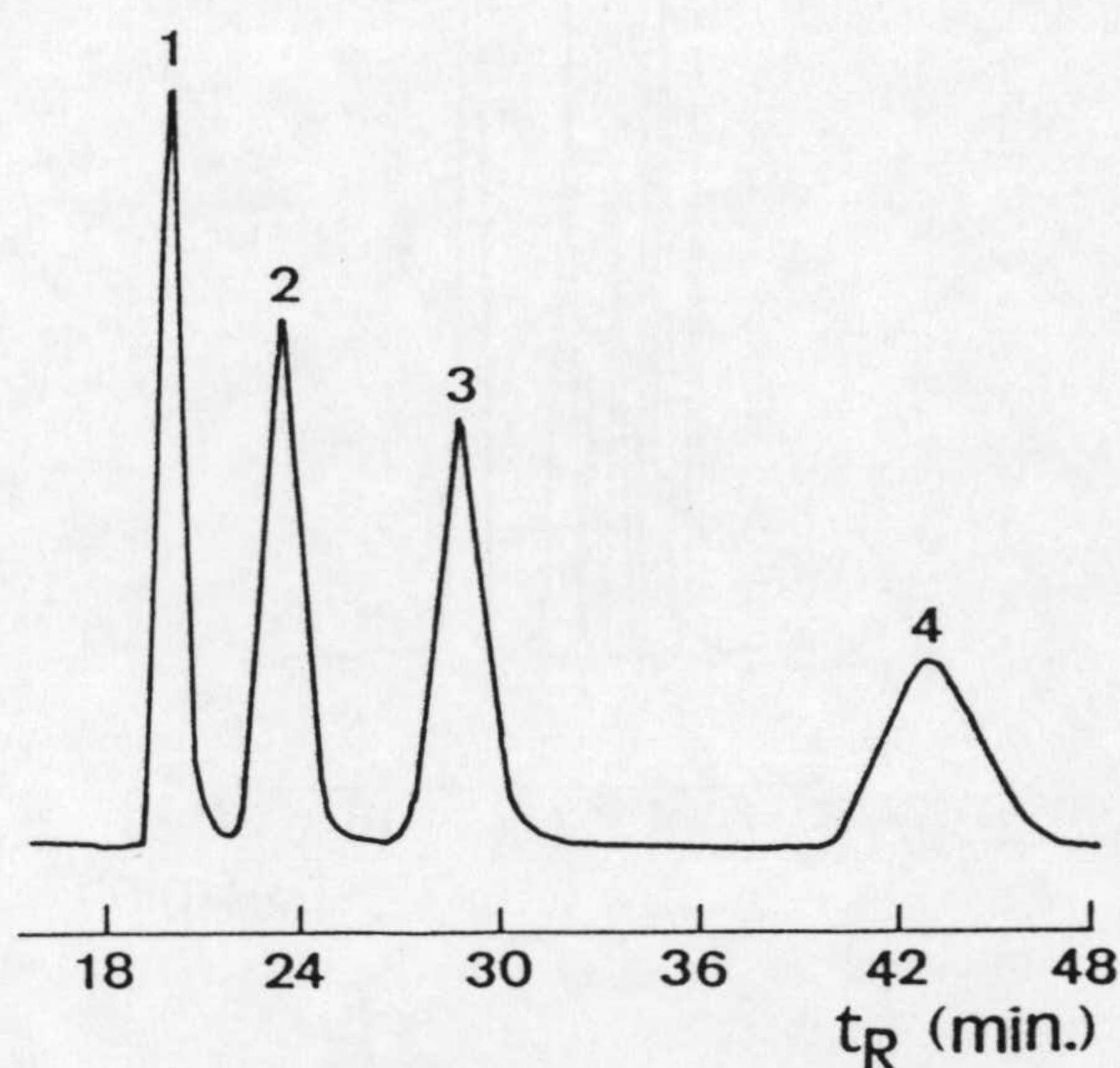


FIGURA 3. Separación de ortofosfato (1), difosfato (2), trifosfato (3) y tetrafosfato (4). CO-LUMNA: Intercambiador aniónico TSK-GEL-IEX-220SA (500x 2.6 mm D.I.; FASE MÓVIL: disolución 0.23 M de KCl (pH = 10); FLUJO: 1 ml/min; Volumen inyectado: 100  $\mu$ l. Detección espectrofotométrica a 830 nm, mediante la formación de heteropolicomplejos azules como reacción de derivatización post-columna. Concentración de solutos ca. 40 nmoles.

### B.2. Materiales de cambio iónico de baja capacidad.

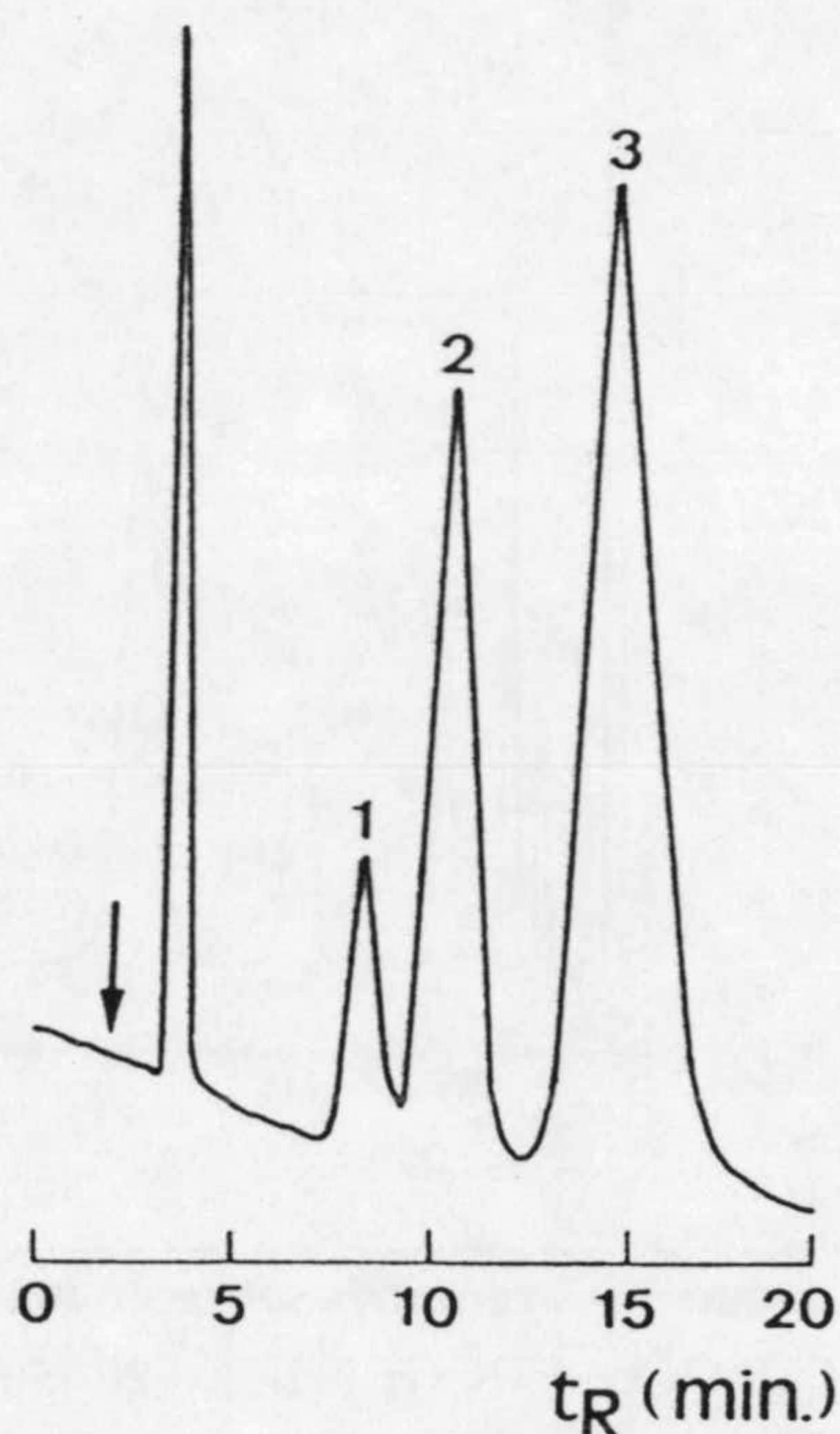
\* Basados en resinas

Fritz y col. [30,31] sintetizaron un tipo de cambiadores iónicos



## INTRODUCCIÓN

macroporosos de baja capacidad de cambio iónico ( $7 \times 10^{-3}$ -  $70 \times 10^{-3}$  meq./g), basados en un polímero de poliestireno al que se somete a un proceso de aminación en su superficie. Este material ha permitido algunas separaciones de aniones interesantes, empleando benzoato, biftalato y sulfobenzoato como eluyentes [30-32], y detección conductimétrica. La Fig. 4 ilustra una de estas separaciones.



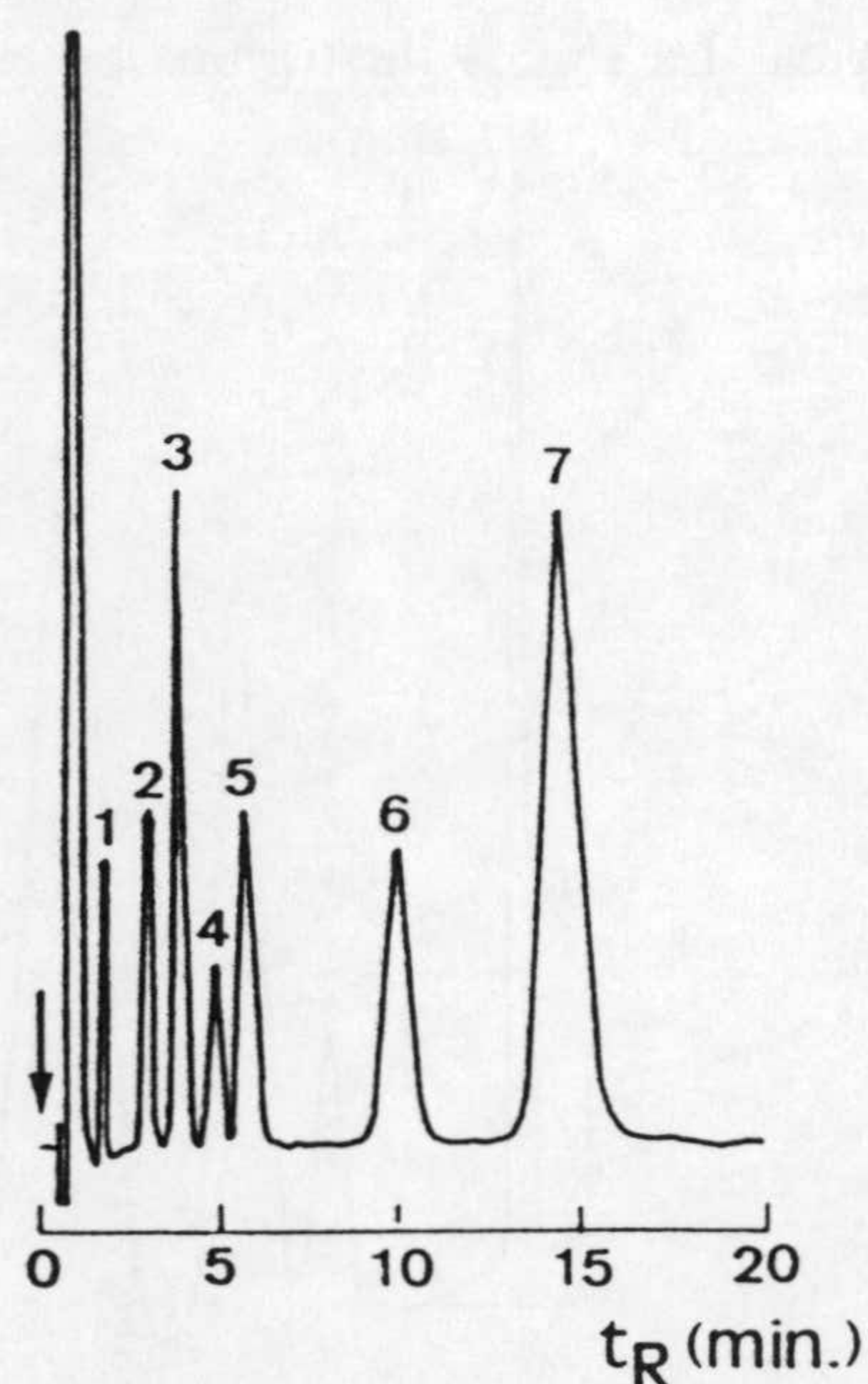
**FIGURA 4.** Separación típica obtenida con un cambiador aniónico de baja capacidad que utiliza una resina como soporte. COLUMNA: Resina XAD-1 tratada para mostrar una capacidad de cambio aniónico de 0.04 mequiv./g. FASE MÓVIL: Disolución 0.65 mM de benzoato potásico (pH = 4.6); FLUJO: 2 ml.min<sup>-1</sup>; Volumen inyectado: 50 µl; Detección conductimétrica; ANIONES: (1) F<sup>-</sup>; (2) Cl<sup>-</sup>; (3) Br<sup>-</sup> en concentraciones entre 4.8 y 26.0 ppm.

Esta resina, no obstante, tiene una baja eficacia (1000-2000 platos/m), no pudiendo separarse más de cinco iones a la vez. Más prometedora resulta la resina TSK Gel 620 de la empresa Toyo Soda de Japón, consistente en un polímero poroso de partículas pequeñas (9



## INTRODUCCIÓN

$\mu\text{m}$ ) y baja capacidad de cambio ( $30 \mu\text{eq./g}$ ). Su eficacia es considerablemente mayor que la resina de Fritz ( $20.000 \text{ platos/m}$ ), permitiendo separaciones como la recogida en la Fig. 5, [31-36].



**FIGURA 5.** Separación de aniones inorgánicos sobre un material de intercambio aniónico TSK GEL 620. **COLUMNA:** TSK GEL IEX-620 (50x4.6 mm D.I.); **FASE MÓVIL:** 1.3 mM  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  + 5.8 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  + 1.4 mM gluconato potásico (pH = 8.5) en una mezcla AcN :  $\text{H}_2\text{O}$ ; **FLUJO:**  $1.2 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . **Volumen inyectado:**  $100 \mu\text{l}$ ; **Detección conductimétrica;** **ANIONES:** (1)  $\text{F}^-$ ; (2)  $\text{Cl}^-$ ; (3)  $\text{NO}_2^-$ ; (4)  $\text{Br}^-$ ; (5)  $\text{NO}_3^-$ ; (6)  $\text{PO}_4^{3-}$ ; (7)  $\text{SO}_4^{2-}$  en concentraciones entre 5 y 40 ppm.

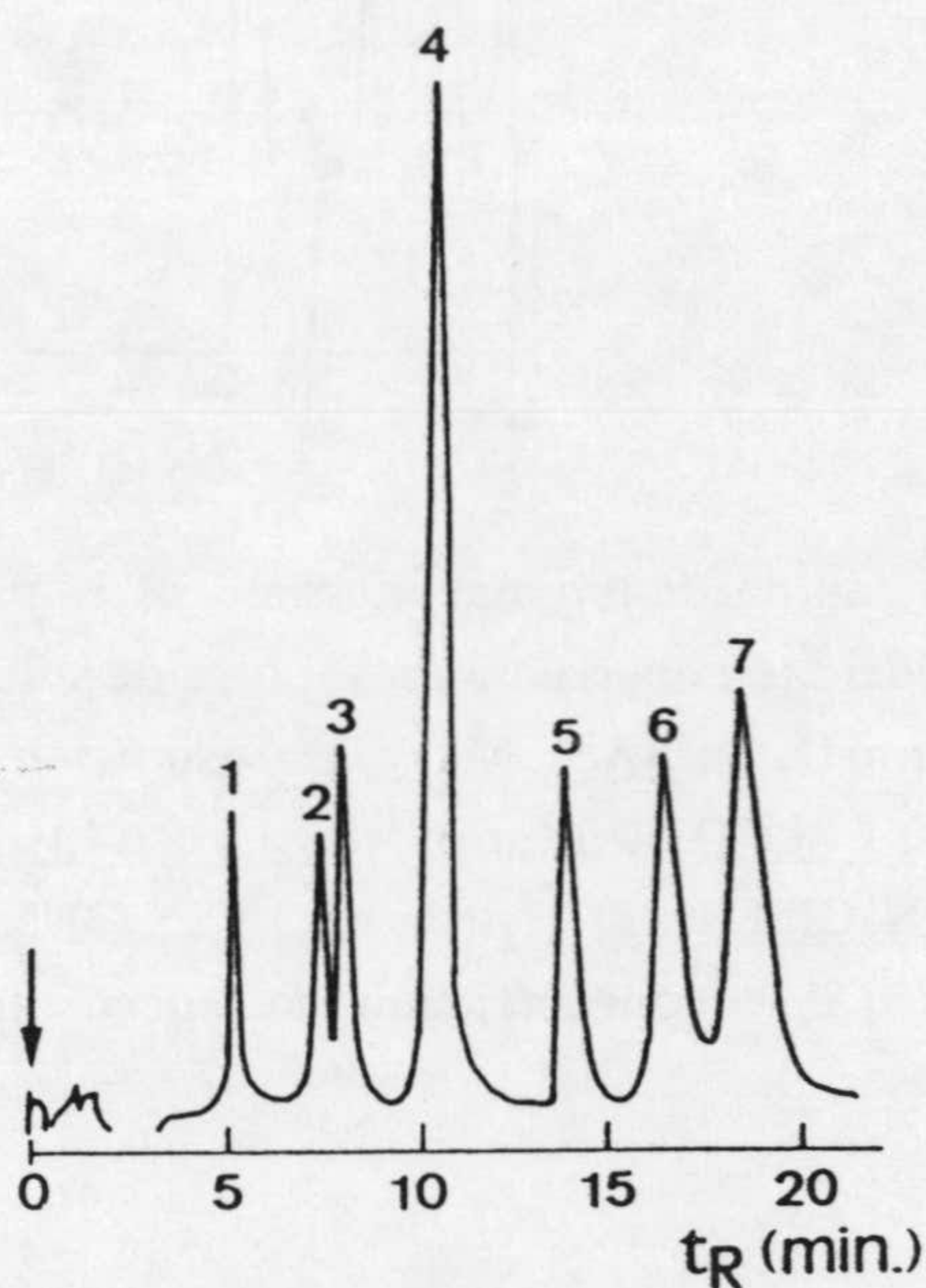
\* Basados en cambiadores iónicos enlazados a gel de sílice.

Simultáneamente a las resinas cambiadoras se desarrollaron los materiales basados en sílice, con el objetivo, de conseguir un cambiador



## INTRODUCCIÓN

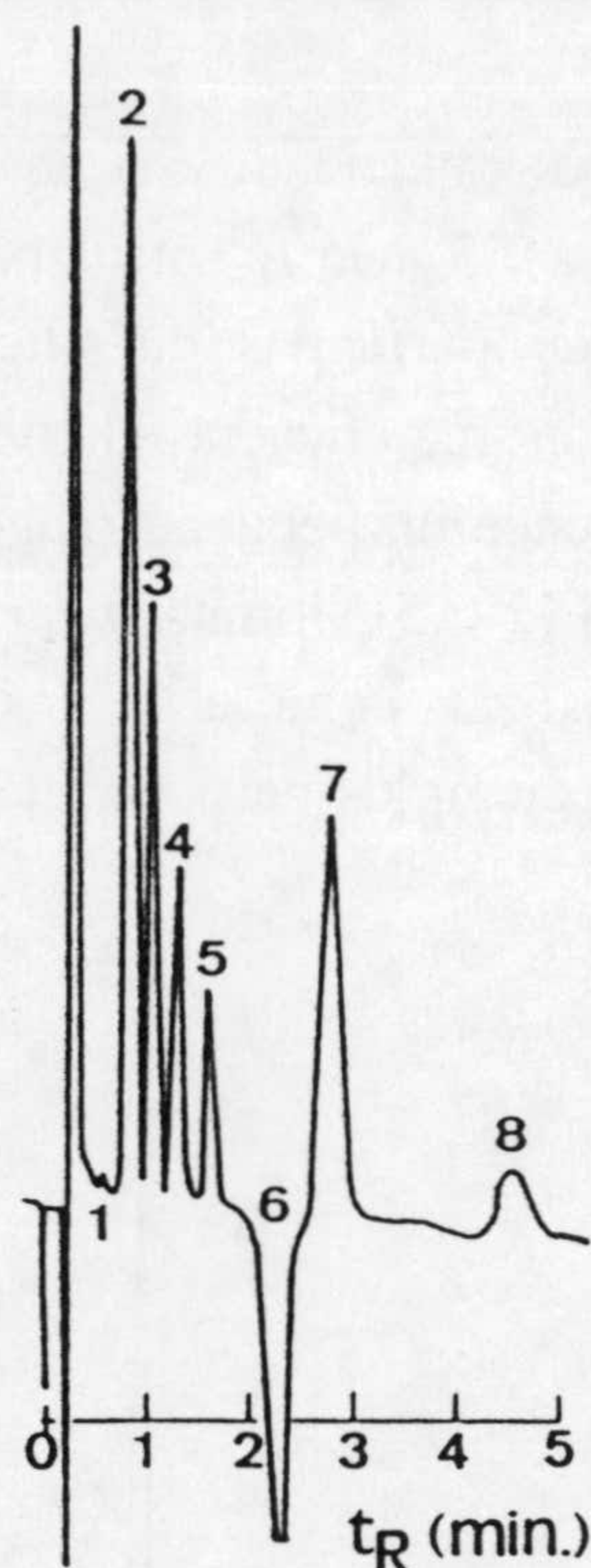
de iones de baja capacidad. Se consiguieron materiales con una capacidad de 0.1 a 0.3 meq./g, mediante la unión de funciones amonio cuaternario a micropartículas de sílice de 6-10  $\mu\text{m}$  [37,38]. Estas columnas muestran una eficacia relativamente elevada (16.000-25.000 platos/m) pero tienen un pequeño rango lineal y un limitado intervalo de pH de trabajo (2-6.5), lo cual restringe tanto el tipo de muestras que se pueden analizar, como el de posibles eluyentes. En las Fig. 6 y 7 se recogen dos ejemplos de utilización de estas columnas.



**FIGURA 6.** Separación típica obtenida con un intercambiador aniónico soportado sobre sílice. **COLUMNA:** Intercambiador aniónico TSK GEL IEX-520 (50 x 4 mm D.I.). **FASE MÓVIL:** Disolución 1 mM de ácido tartárico (pH = 3.9); **FLUJO:** 1.5 ml.min<sup>-1</sup>; **Volumen inyectado:** 100  $\mu\text{l}$ ; **Detección conductimétrica;** **ANIONES:** (1)  $\text{IO}_3^-$ ; (2)  $\text{NO}_2^-$ ; (3)  $\text{BrO}_3^-$ ; (4)  $\text{Cl}^-$ ; (5)  $\text{ClO}_3^-$ ; (6)  $\text{Br}^-$ ; (7)  $\text{NO}_3^-$ . (Concentración: 10 ppm.).



## INTRODUCCIÓN



**FIGURA 7.** Separación rápida de aniones inorgánicos utilizando un intercambiador aniónico de baja capacidad enlazado a un soporte de sílice. **COLUMNA:** Wescan anion HS, (100 x 4.6 mm D.I.); **FASE MÓVIL:** Disolución 4 mM de hidrogenoftalato potásico (pH = 3.9); **FLUJO:** 4 ml.min<sup>-1</sup>; **Volumen inyectado:** 100 µl; **Detección conductimétrica.** **ANIONES:** (1) H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>; (2) Cl<sup>-</sup>; (3) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (4) Br<sup>-</sup>; (5) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (6) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (7) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>; (8) I<sup>-</sup> en concentración no especificada.

### Métodos de interacción iónica

La cromatografía de interacción iónica, también llamada de pares iónicos, en la cual un reactivo iónico hidrófobo es añadido a la fase móvil de un sistema cromatográfico de fase reversa, con objeto de incrementar la retención de un soluto iónico de carga opuesta, se ha consolidado como una técnica con éxito [39]. Se emplea ampliamente en el análisis de

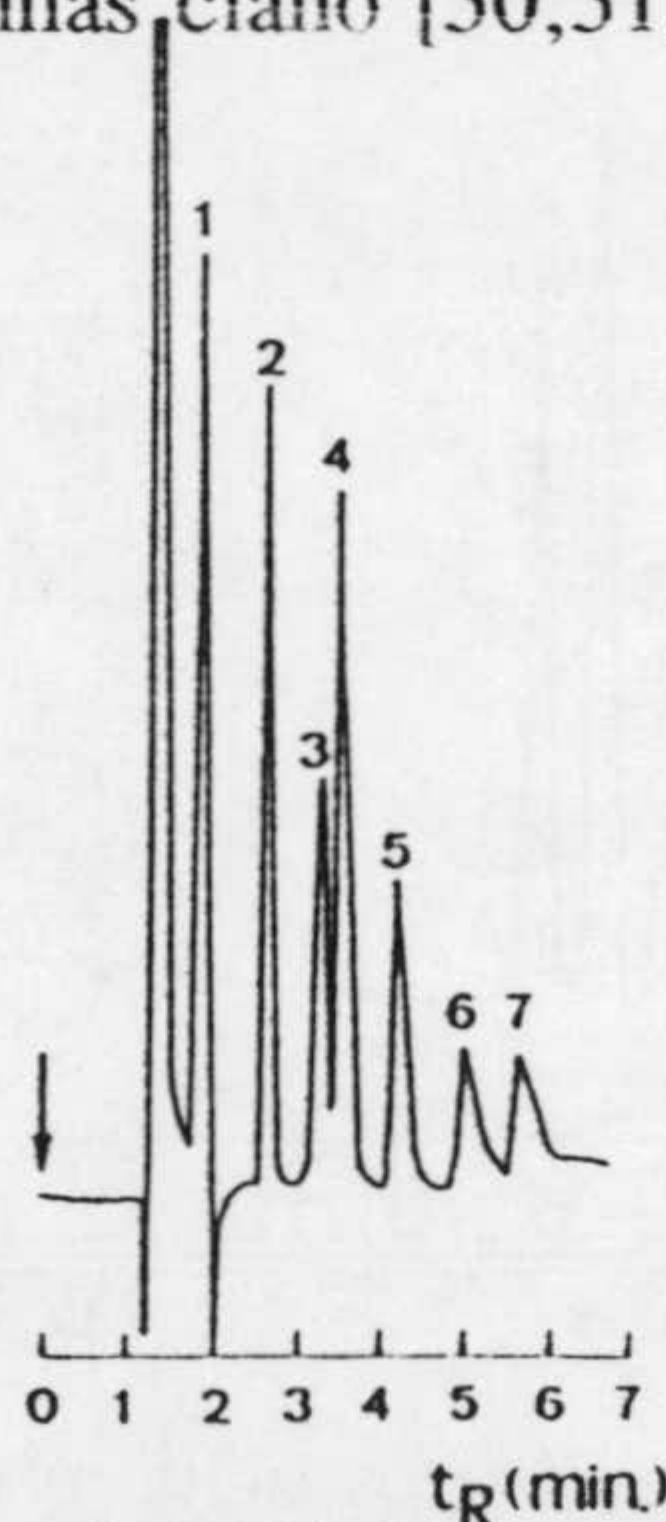


## INTRODUCCIÓN

compuestos orgánicos y tiene la ventaja de que se pueden manipular una serie de parámetros de la fase móvil, con objeto de controlar la retención de los analitos orgánicos iónicos. Estos parámetros se relacionan con la presencia y concentración de un modificador orgánico, de un reactivo de interacción iónica y de especies iónicas competidoras como el sulfato sódico. De esta manera, se puede diseñar una fase móvil cuya composición se adapte a un soluto determinado. Por estas razones, se están incrementando también los análisis de especies inorgánicas mediante esta modalidad cromatográfica.

La mayor ventaja de la cromatografía de interacción iónica estriba en la flexibilidad que ofrece para ajustar la capacidad de cambio iónico de la columna, mediante la cantidad de reactivo de interacción iónica que es adsorbido sobre la fase estacionaria hidrófoba. Una ventaja adicional es la elevada eficacia que se alcanza en el análisis de aniones inorgánicos, observándose también, con algunos iones, beneficiosos efectos de selectividad, derivados de la existencia de ligeras interacciones hidrofóbicas (además de las interacciones de cambio iónico).

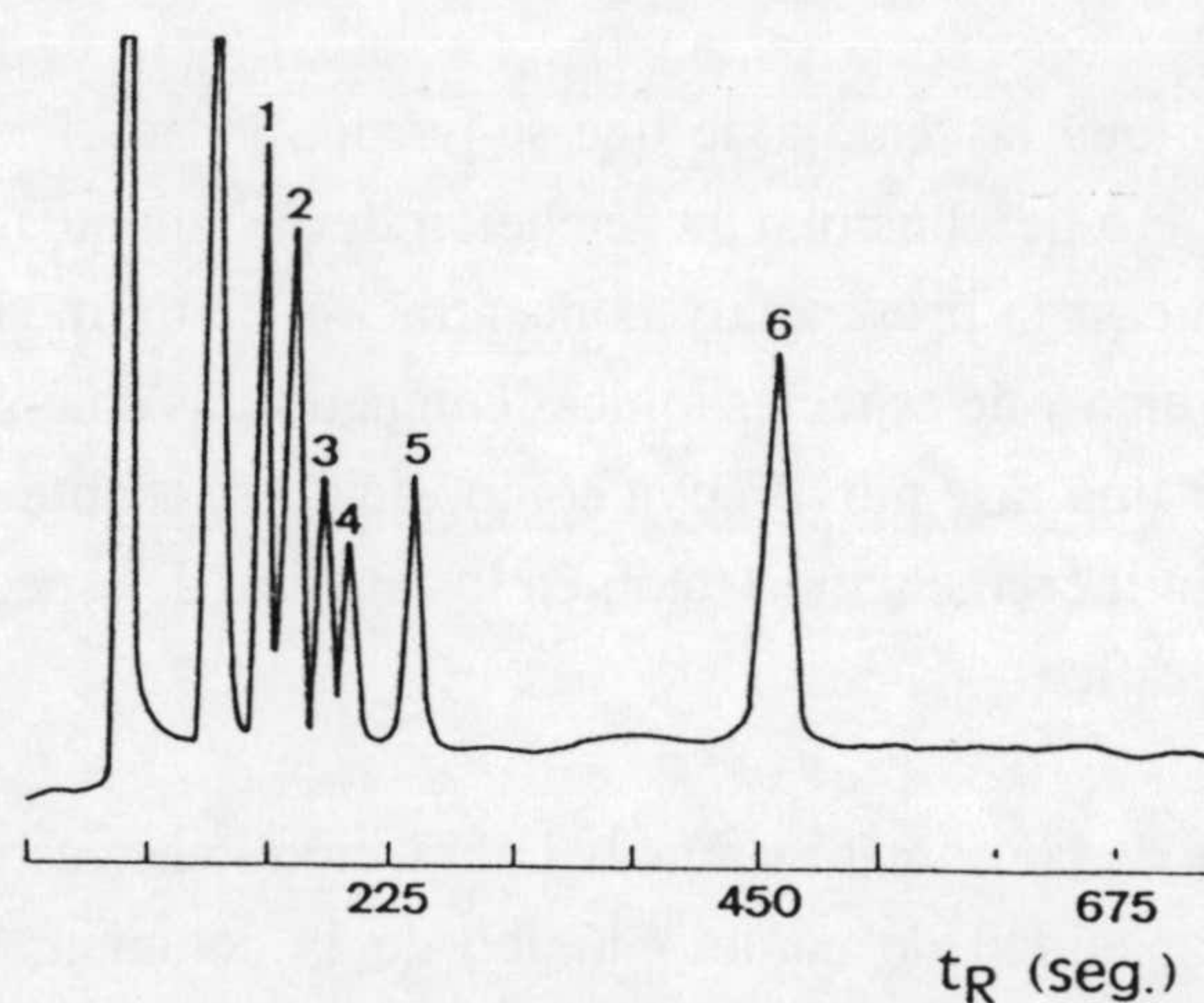
Se han empleado tres tipos de columnas como soportes del reactivo de interacción iónica. Columnas de fase reversa basadas en Sílice [40-46], columnas neutras basadas en el copolímero S/DVB [45-49] y columnas ciano [50,51]. En las Fig. 8 a 10, se ilustran algunos ejemplos típicos.



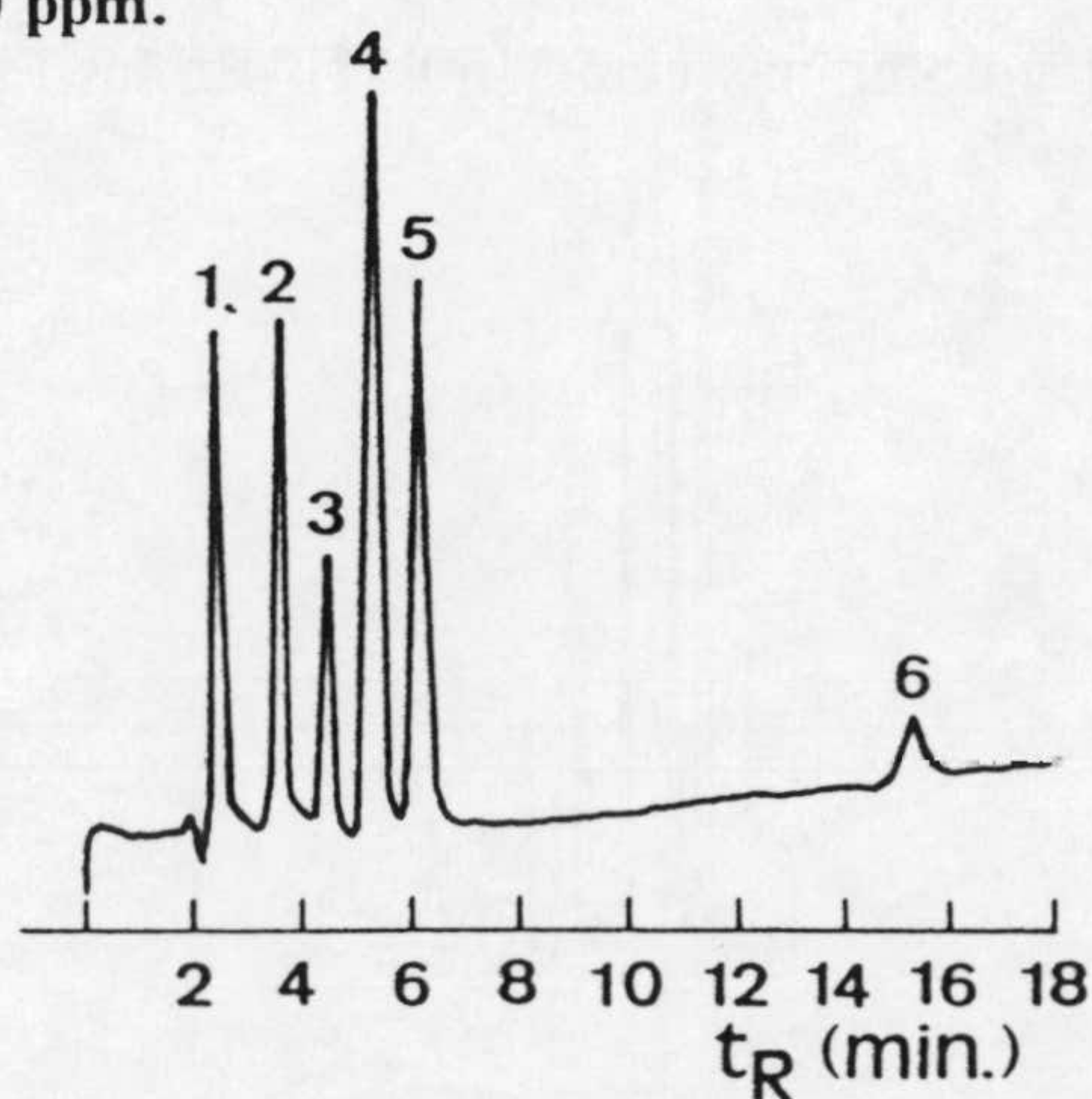
**FIGURA 8.** Separación de aniones inorgánicos mediante cromatografía de interacción iónica utilizando una columna de fase reversa. **COLUMNA:** Lichrosorb RP-18, 5  $\mu\text{m}$  ((250 x 4.6 D.I.); **FASE MÓVIL:** 2 mM hidróxido de tetrabutilamonio y 0.05 M tampón  $\text{PO}_4^{3-}$  (pH = 6.7). **FLUJO:** 2.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; **Volumen inyectado:** 20  $\mu\text{l}$ .; **Detección conductimétrica;** **ANIONES:** (1)  $\text{F}^-$ ; (2)  $\text{Cl}^-$ ; (3)  $\text{SO}_4^{2-}$ ; (4)  $\text{NO}_2^-$ ; (5)  $\text{Br}^-$ ; (6)  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ; (7)  $\text{NO}_3^-$  en concentración 1000 ppm.



## INTRODUCCIÓN



**FIGURA 9.** Separación de aniones inorgánicos mediante cromatografía de interacción iónica usando una columna PRP-1. COLUMNA: PRP-1 (150 x 4.1 mm D.I.); FASE MÓVIL: 0.75 mM de salicilato de tetrabutilamonio en AcN : H<sub>2</sub>O (pH = 6.3); FLUJO: 1 ml.min<sup>-1</sup>. Volumen inyectado: 20 µl; Detección conductimétrica; ANIONES: (1) F<sup>-</sup>; (2) Cl<sup>-</sup>; (3) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (4) Br<sup>-</sup>; (5) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (6) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en concentración entre 0.5 y 1.0 ppm.



**FIGURA 10.** Separación de aniones inorgánicos mediante cromatografía de interacción iónica utilizando una columna CN. COLUMNA: Polyosil 60 D 10 CN, (250 x 4.6 mm D.I.). FASE MÓVIL: AcN + Tampón (0.1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 0.1 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% en cloruro de hexadeciltrimetilamonio); FLUJO: 1.5 ml.min<sup>-1</sup>; Detección espectrofotométrica a 205 nm; ANIONES: (1) IO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (2) BrO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (3) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (4) Br<sup>-</sup>; (5) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (6) I<sup>-</sup> en concentración no especificada.



## INTRODUCCIÓN

---

Hay dos enfoques diferentes a la hora de cubrir la columna con el reactivo de interacción iónica, **recubrimiento dinámico** y **recubrimiento permanente**. En el primero, un reactivo de hidrofobicidad relativamente baja, (como sales de tetrametil- o tetrabutilamonio) se usa inicialmente para acondicionar la columna y se mantiene en la fase móvil para los subsiguientes análisis. En el método de recubrimiento permanente, se emplea un reactivo mucho más hidrófobo (una sal de cetiltrimetilamonio) para el acondicionamiento inicial de la columna, después de lo cual, se elimina de la fase móvil y se reemplaza en el eluyente por un ión menos hidrófobo (normalmente una sal de tetrametilamonio).

Aunque el mecanismo de la cromatografía de interacción iónica de iones orgánicos es objeto aún de alguna controversia [52-54], la mayoría de los autores están de acuerdo, en que cuando se trata de iones inorgánicos, lo que tiene lugar es un mecanismo de cambio iónico dinámico, ya que la mayoría de estos iones carece de efectos hidrófobos. Para aniones inorgánicos, se puede considerar que son dos los equilibrios principales que contribuyen a su retención sobre una columna de fase reversa, en el caso en el que el eluyente contenga una sal de tetraalquilamonio ( $R_4N^+ A^-$ ). El primer equilibrio corresponde a la retención de  $R_4N^+$  sobre la superficie de la columna, lo cual conduce a la formación de una doble capa. Las moléculas de  $R_4N^+$  ocupan la capa primaria, originando una carga positiva sobre la superficie de la fase estacionaria, mientras que el contraión  $A^-$  ocupa una segunda capa difusa [55]. El segundo equilibrio determina la selectividad de un anión sobre otro. La evidencia para demostrar la existencia de esta doble capa, se basa en aquellos resultados que indican que los efectos de cambiar la naturaleza y concentración del contraión  $A^-$ , son esencialmente idénticos a los observados en cromatografía de cambio iónico [41-49].

Se ha investigado un amplio rango de *reactivos de interacción iónica*, incluyendo sales de tetrametil- [43], tetraetil- [47], tetrabutil- [40,42,45,47], tetrapentil- [49,56] y cetiltrimetilamonio [50,51], así como octilamina, para recubrimiento dinámico de las columnas. En los métodos de recubrimiento permanente se emplean reactivos más hidrófobos, tales como sales de trioctilmetil- [47], tetraoctil- [47] y tridodecilmetilamonio [47], y sales de cetilpiridinio [45,48]. Se ha comprobado una excelente reproducibilidad de los métodos de recubrimiento permanente, con coeficientes de variación de los tiempos de retención de  $\pm 2\%$  [45].

El poder de elución de la fase móvil puede modificarse de diferentes formas. Una de ellas, consiste en añadir un componente aniónico (tal como una sal o tampón) a la fase móvil,



## INTRODUCCIÓN

---

el cual compete con los analitos aniónicos por las posiciones catiónicas del reactivo adsorbido. De esta forma se han conseguido separar un grupo importante de aniones inorgánicos (Fig.8) sobre una columna ODS (Octadecilsilano), con una fase móvil conteniendo hidróxido de tetrabutilamonio ( $\text{TBA}^+\text{OH}^-$ ) y un tampón  $\text{PO}_4^{3-}$  como anión competidor [40]. Otra alternativa consiste en emplear como competidor el propio coanión que acompaña al reactivo de interacción iónica. En este último caso el coanión debe elegirse de manera que sea compatible con la detección (salicilato [45,48], ftalato o benzoato [48] para la detección conductimétrica, y  $\text{Br}^-$  para otros tipos de detección [44]). Finalmente, la concentración de modificador orgánico es otro factor importante, pues va a permitir regular la cantidad de reactivo de interacción iónica adsorbida sobre la fase estacionaria, tanto en la variante dinámica como permanente. Varios estudios [45,48], han demostrado que se requieren pequeñas cantidades ( $\approx 5\%$ ) de THF o AcN para una eficacia máxima.

### Otros métodos de separación.

Se han propuesto otros métodos cromatográficos para la separación de aniones inorgánicos, aunque carecen de la amplia aplicabilidad de los métodos de cambio iónico y de interacción iónica.

Algunos aniones inorgánicos pueden determinarse mediante reacciones de derivatización precolumna, seguidas de una separación sobre columnas de fase reversa convencionales. Por ejemplo, los iones  $\text{NO}_2^-$  reaccionan con diaminas (tales como el 2,3-diaminonaftaleno) para formar derivados triazólicos que pueden separarse sobre columnas ODS con mezclas  $\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{OH:H}_2\text{O}$  [57]. Los  $\text{NO}_3^-$  pueden determinarse de forma similar por reducción a  $\text{NO}_2^-$ .

Se han probado con éxito columnas amino (sobre soporte de sílice) para la separación de  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{Br}^-$  en alimentos, usando tampón  $\text{PO}_4^{3-}$  como eluyente [58]. Este método ha sido aplicado a otros iones inorgánicos [59] (Figura 11). También se ha empleado una resina poliamida corona sobre sílice para separación de haluros, con  $\text{H}_2\text{O}$  como eluyente [60], y la cromatografía de exclusión iónica (Donnan) para la separación de oxopolianiones [61].



## INTRODUCCIÓN

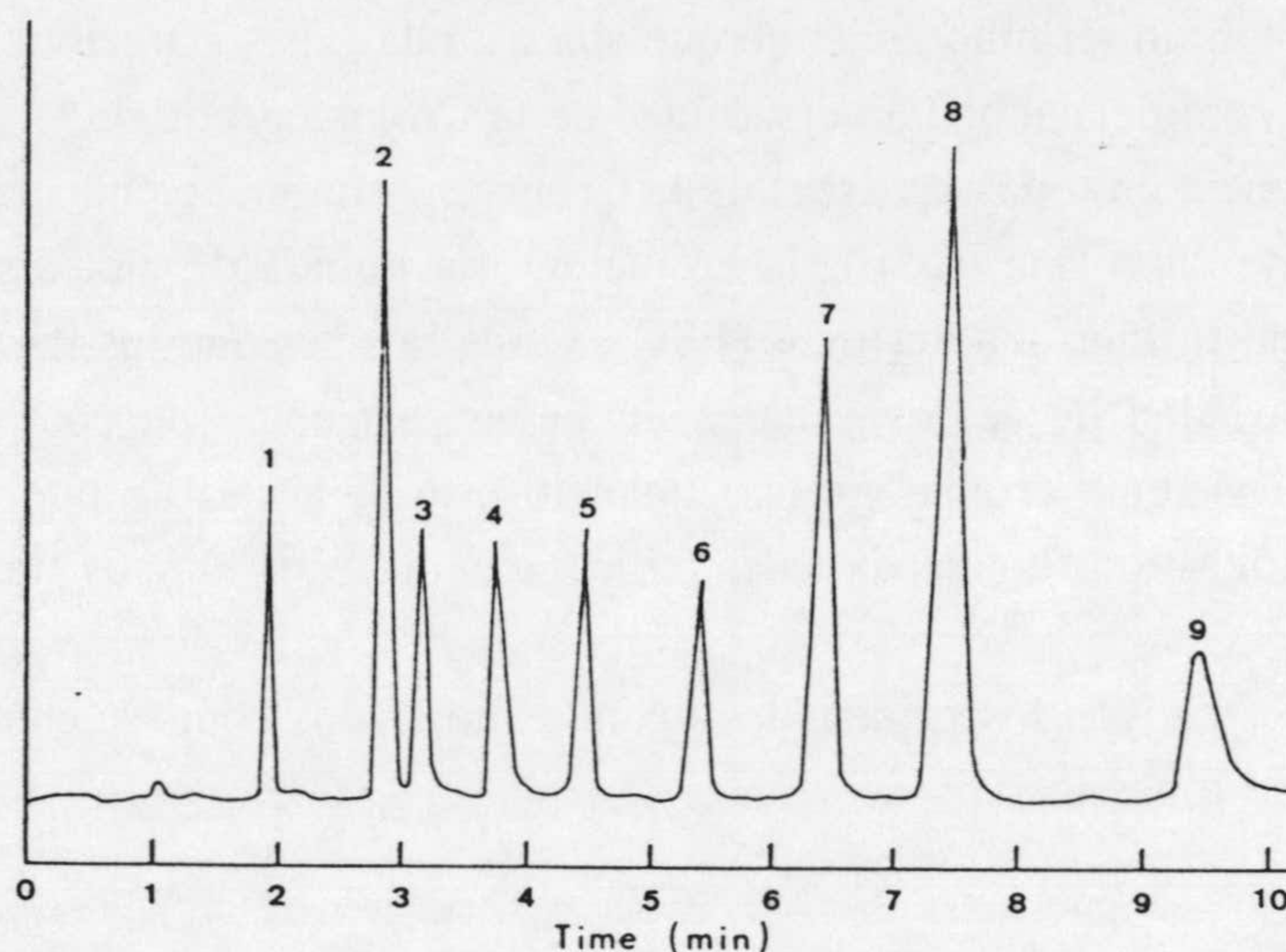
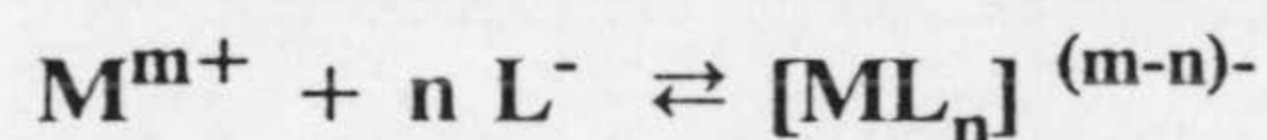


FIGURA 11. Separación de aniones inorgánicos sobre una columna amino. COLUMNA: Zorbax NH<sub>2</sub>, (250 x 4.6 mm D.I.); FASE MÓVIL: 0.03 M en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> ajustado a pH = 3.2 con NaOH. FLUJO: 2.0 ml.min<sup>-1</sup>; Volumen inyectado: 20 μl; Detección espectrofotométrica a 205 nm; (1) Acetato; (2) Acrilato; (3) Glicolato; (4) Formiato; (5) NO<sub>2</sub><sup>-</sup>; (6) Br<sup>-</sup>; (7) NO<sub>3</sub><sup>-</sup>; (8) I<sup>-</sup>; (9) Dicloroacetato en concentraciones entre 25 y 100 ppm.

## DETERMINACIÓN DE IONES METÁLICOS.

Los estudios de especiación y determinación de ultratrazas de numerosos iones metálicos mediante técnicas cromatográficas, implican con frecuencia la complejación de dichos iones de alguna forma [62-68], entendiéndose ésta, en su acepción más general, como la interacción entre un ácido de Lewis y una base de Lewis



Para designar varios aspectos de esta rama de la cromatografía se han empleado diversos nombres como Cromatografía de Complejación, Cromatografía de extracción, Cromatografía de intercambio de ligando, y otros. No obstante la **Cromatografía de Complejación** puede



## INTRODUCCIÓN

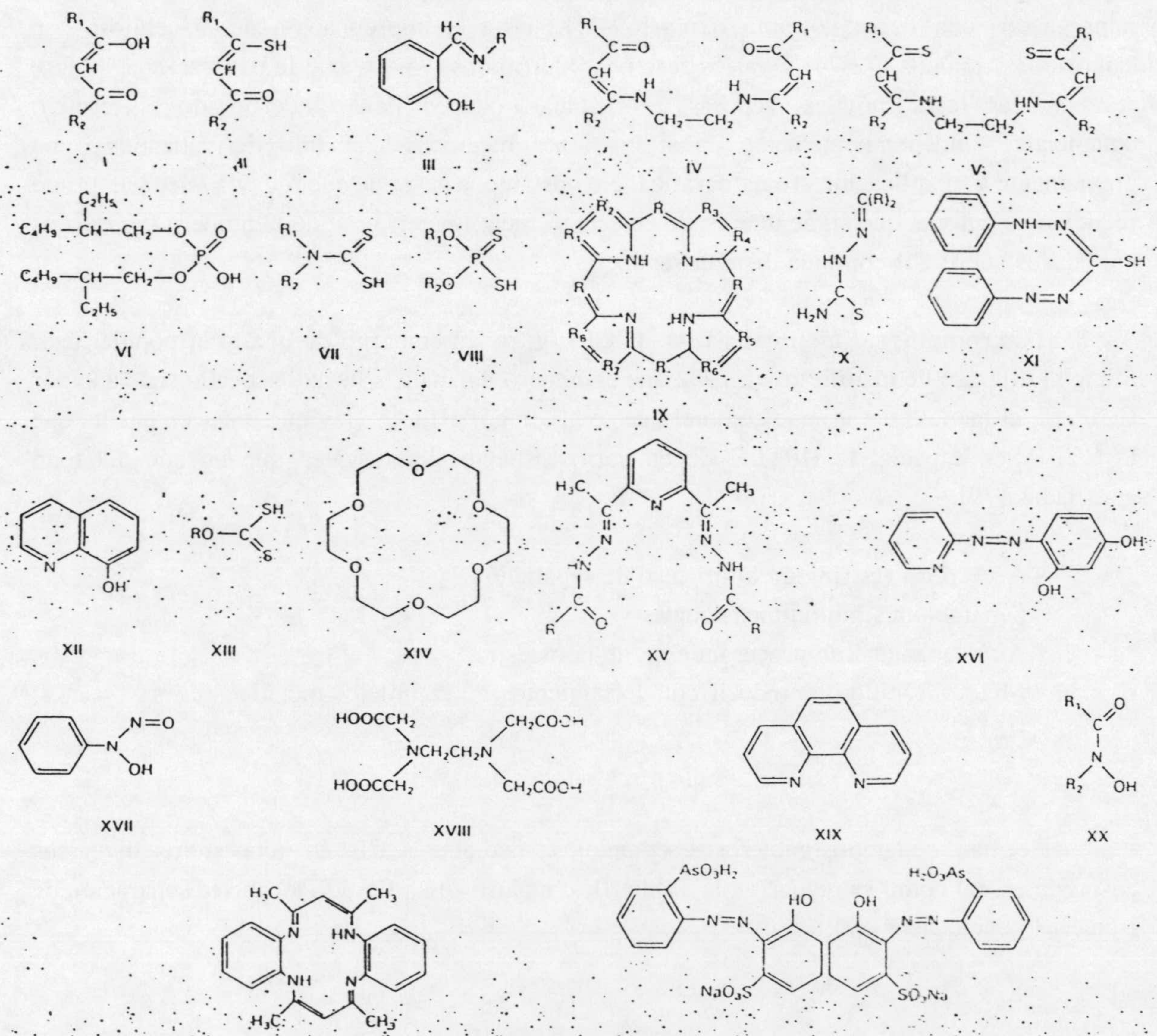
---

considerarse como un término genérico que abarca todas las separaciones cromatográficas que dependen de la complejación. La versatilidad de la Cromatografía de Complejación se debe en parte a su presencia en todas las áreas de la Cromatografía incluyendo la CG (antes citada), la cromatografía de capa fina (CCF), la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de fluidos supercríticos (FSC). Otras razones que justifican su interés analítico son, la gran variedad de ácidos y bases de Lewis, así como de complejos que pueden ser incorporados al sistema cromatográfico uniendo esto al hecho de poder utilizar empaquetamientos cromatográficos convencionales (sílice, cambiadores iónicos, fase reversa, etc.).

En la tabla II se recogen los principales ligandos utilizados como agentes derivatizantes en la cromatografía de iones metálicos.



# INTRODUCCIÓN





## INTRODUCCIÓN

---

### MÉTODOS LAMINARES.

La primera separación cromatográfica de iones metálicos se llevó a cabo en **cromatografía sobre papel (CP)** y data de 1930. Desde entonces, se han propuesto diferentes variantes de esta modalidad. Desde la utilización de papeles sin tratamiento o papeles impregnados con ligandos como oxina [69-71], hasta la impregnación de la celulosa con cambiadores iónicos [72-74] y varios reactivos hidrófobos [75-77] que le dan carácter de fase reversa. Las fases móviles, acuosas u orgánicas, pueden llevar incorporado el reactivo complejante, independientemente de si los iones metálicos han sido derivatizados o no previamente a su aplicación cromatográfica. No obstante, a pesar de que todavía queda un grupo reducido de autores que sigue interesado en esta técnica, lo cierto es que el número de trabajos publicados sobre CP continúa disminuyendo.

La **cromatografía en capa fina, (CCF)**, goza sin embargo de una gran popularidad. Mangh [78] puso de manifiesto en 1982 que el número de análisis llevados a cabo cada año por CCF era, al menos, tan grande como el que se hacen por HPLC. Hay que tener en cuenta que la CCF y en especial la HPTLC tienen varios aspectos interesantes que no son del todo apreciados [79]:

- Acceso no restringido al proceso de separación.
- Separaciones multidimensionales.
- Alta capacidad de procesamiento de la muestra.
- Método rápido de predecir comportamientos de complejos metálicos en HPLC.

Se han separado numerosos complejos mediante CCF en una sobre diversos adsorbentes, tal como se recoge en la Tabla III, e incluso se ha llevado a cabo la separación de isómeros geométricos [80,81]



## INTRODUCCIÓN

**TABLA II. Condiciones usadas para la CCF de adsorción de especies metálicas.**

Ligando	Iones metálicos	Adsorbente	Fase móvil	Referencia
$\beta$ -Dicetonas	Al, Ga, U, Th, Zr, La, Cr, Fe, Co, Cu, V.	Gel de sílice, Alúmina	Benceno:Acetona (40:60) Ciclohexano:Acetona (10:1)	[80,82-84]
$\beta$ -dicetonas análogas de Se	Co, Ni, Pd	Gel de sílice	Cloroformo, benceno, ciclohexano	[85]
Monotio- $\beta$ -dicetonas	Ni, Zn, Co, Pd, Fe	Alúmina, Celulosa o gel de sílice	Disolventes orgánicos	[86,87]
Ditiocarbamatos	12 metales	Gel de sílice	Cloroformo dioxano	[88]
Ditiocarbamatos	Ni, Cu, Zn, Co, Cr, Mn, Fe Tl, Co, Ni, Pd, Mo, Bi, Ru, Rh, Pt, Pd	Gel de sílice  (HPTLC)	Benceno, cloroformo, tolueno	[89-91]
Porfirinas	Mg, Ni, Cu, Zn, Co, Mn, Fe	Gel de sílice, Celulosa (HPTLC)	Ciclohexano, benceno	[92]
Ditiocarbamatos	As, Sb, Bi, Se, Te, Ni	Gel de sílice, Alúmina, Celulosa, Poliamida	Disolventes orgánicos	[93-95]
1-Hidroxipiridina	Varios metales	Gel de sílice, Alúmina, Celulosa, Gel de sílice (RP)	Varios, e.g. tolueno	[82,96,97]
Ditiocarbamatos N,N disustituídos	Cu, Zn, Cd	Gel de sílice	Varios, e.g. benceno	[98]

Cuando se emplea gel de sílice como adsorbente, pueden tener lugar fundamentalmente dos tipos de interacciones:

- (i) Formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos electronegativos del ligando y los grupos silanol superficiales.



## INTRODUCCIÓN

---

(ii) Interacción de los iones metálicos con los grupos silanol. Esta interacción es común en quelatos de coordinación no saturada y en complejos lábiles.

En general, los ligandos bidentados con átomos donores *O,O* y *N,O* son menos adecuados para la cromatografía de adsorción [99,100] que los que tienen átomos donores *S,O*, *S,N* o *S,S*.

Los sistemas de partición son, en general, menos adecuados para la separación cromatográfica de compuestos de coordinación.

Se han empleado diferentes ligandos para *impregnar* los soportes cromatográficos. Los alquilfosfatos y aminas de elevado peso molecular dan lugar, preferentemente, a procesos de cambio iónico. Por otra parte, también se han comercializado materiales alquilsilano de fase reversa.

Un rasgo atractivo de la CCF es la diversidad de sistemas de detección que hay. La detección "in situ" de los complejos separados se basa en:

- El color del propio complejo.
- La disminución de fluorescencia de los materiales fluorescentes contenidos en la placa.
- Absorción UV-VIS.
- Revelado con vapor de  $I_2$ .

Si bien, selectividad y sensibilidad pueden mejorarse pulverizando las placas con disoluciones de reactivo generales como ditizona, arsenazo III, PAR (4-(2-piridilazo)resorcinol), PAN (1-(2-piridilazo)naftol) o, selectivos como dimetilglioxima para Ni y  $H_2O_2/H_2SO_4$  para V.

La cuantificación puede llevarse a cabo mediante diversas técnicas instrumentales, como la densitometría o la determinación espectrofotométrica de los complejos extraídos de la placa. Si se trata de HPTLC, se pueden utilizar técnicas más sofisticadas como la detección fluorimétrica con excitación láser [101], la emisión de rayos X inducida por protones, la espectroscopía de reflectancia UV [96,102] y el análisis mediante espectrometría de masas láser [103].



## INTRODUCCIÓN

---

### CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA A BAJA PRESIÓN.

La cromatografía líquida que utiliza la gravedad como fuerza impulsora de la fase móvil y un tamaño de partícula relativamente grande (100-200  $\mu\text{m}$ ), se desarrolló al mismo tiempo que la cromatografía sobre papel [104,105], siendo muy escasos los métodos que incluyen una cuantificación on-line. Lo normal, es que este tipo de cromatografía se emplee en una etapa de preseparación, preconcentración o proceso preparativo [106]. Algunas fases típicas utilizadas con esta finalidad son, el óxido de trioctilfosfina [107], cambiadores iónicos líquidos [108-111], TBP[107] y resinas quelantes [112-117] (con el agente quelante retenido por adsorción [112] o con grupos funcionales unidos químicamente, como el material Chelex-100).

Se han empleado diversos agentes quelantes como ditiocarbamatos y oxina (8-hidroxiquinoleína), en métodos de preconcentración, inmovilizados por adsorción o enlace químico a soportes sólidos [107, 118,119] como vidrio de tamaño de poro controlado, sílice y octadecilsilano. Otra alternativa, consiste en retener los metales ya complejados sobre una pequeña columna de adsorbente, y recuperarlos por elución con una fase móvil acuosa [106]. Esta es la base de los métodos de extracción líquido-sólido, para los que se comercializan pequeños cartuchos con diferentes adsorbentes [120].

Un grado de complejidad mayor conllevan las técnicas basadas en una preconcentración on-line de los iones metálicos y su separación de la matriz. En estos casos se suele acoplar la columna a un dispositivo de inyección en flujo [121,122] o a un sistema ICP-AES [116, 117, 121, 123].

### CROMATOGRAFÍA DE FLUÍDOS SUPERCRÍTICOS (CFS).

Las ventajas de la CFS para los complejos metálicos son idénticas a las esperadas para los compuestos orgánicos:

- (i) Transferencia de masa más rápida entre la fase estacionaria y la móvil, si se compara con la HPLC.
- (ii) Temperaturas más bajas que en CG.



## INTRODUCCIÓN

---

- (iii) Versatilidad en la densidad y temperatura de la fase móvil para facilitar la separación [124,125].
- (iiii) Eliminación fácil de la fase móvil por evaporación.

Los complejos metálicos fueron los primeros compuestos estudiados por CFS [126,127] aunque el número de trabajos publicados hasta ahora es relativamente escaso [128-130]. En ellos se han empleado columnas de adsorción y fase reversa con CO<sub>2</sub> supercrítico conteniendo CH<sub>3</sub>OH o ligando como aditivo polar.

La CFS tiene un inconveniente respecto a la HPLC en lo referente al manejo de especies iónicas, de forma que su aplicación a sistemas acuosos está limitada por las drásticas condiciones requeridas (400 °C a 2x10<sup>4</sup> Nm<sup>-2</sup>) [131]. El empleo de NH<sub>3</sub> supercrítico y columnas de cambio iónico puede ser interesante para especies iónicas complejas, particularmente complejos con compuestos aminados.

## CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).

### Consideraciones generales

En la década de los sesenta tuvo lugar un avance muy significativo de la cromatografía con el desarrollo de sistemas que incorporaban dispositivos mecánicos de bombeo de la fase móvil, columnas eficaces rellenas de partículas pequeñas (< 10 μm) y detección on-line. Este sistema, conocido como cromatografía líquida de alta resolución - hoy día más comúnmente aceptada como cromatografía líquida- se aplicó, obviamente, con preferencia a la determinación de sustancias orgánicas. La aplicación de la HPLC al análisis inorgánico no atrajo en principio mucha atención. Schwedt [132] señaló en 1981 que hasta entonces se habían publicado menos de cien artículos sobre aplicaciones inorgánicas de ésta técnica, y de estos, menos de la mitad contenían análisis cuantitativo y *sólo unos pocos* aplicaciones prácticas. La limitación estaba relacionada principalmente con la carencia de dispositivos adecuados de detección de iones



## INTRODUCCIÓN

---

inorgánicos. Posteriormente, las principales modalidades de la HPLC se han empleado en la determinación de **especies metálicas a través de la formación de quelatos metálicos**. Se han desarrollado métodos que combinan la separación conjunta de grupos de metales con la consiguiente separación y determinación cromatográfica de los correspondientes complejos. Este enfoque aporta varias ventajas: determinación multielemental, selectividad (a través de la extracción selectiva de los metales y su separación de los componentes de la matriz), posibilidad de determinación de trazas (debido a la preconcentración) y selectividad con respecto a metales que se encuentran en diferentes estados de oxidación (debido a diferencias en la química de la extracción).

La **cromatografía de quelatos metálicos** es una técnica analítica altamente eficaz, que puede completar e incluso, en algunos casos, también reemplazar a otras técnicas bien conocidas de determinación de trazas metálicas. Las razones de esto, según Steinbrech [134] pueden ser varias:

- (A) El tratamiento de la muestra es relativamente simple (formación del complejo al pH adecuado y, si es necesario, en presencia de agentes enmascarantes).
- (B) Los elementos analizados pueden ser preconcentrados antes de la determinación mediante un proceso de extracción de sus correspondientes complejos.
- (C) La matriz inorgánica interferente se separa durante dicho proceso.
- (D) La separación cromatográfica permite identificar y cuantificar en una sola etapa varios elementos (análisis multielemental)
- (E) Es posible una detección sensible de los quelatos metálicos (i.e. mediante espectrofotometría en la zona del ultravioleta).

A pesar del numeroso grupo de agentes complejantes utilizados en miles de métodos



## INTRODUCCIÓN

---

analíticos, no todos ellos forman quelatos que tengan un comportamiento cromatográfico apropiado para la determinación de los correspondientes metales. Según Timerbaev y col. [135], *para que un agente quelante sea útil en HPLC debe reunir una serie de requisitos:*

- (1) *Que formen complejos neutros o cargados con un numeroso grupo de metales, i.e. el reactivo debe tener una estructura geométrica o electrónica suficientemente móvil.*
- (2) *Que los complejos estén bien definidos, con la coordinación saturada y que sean altamente estables en el sistema cromatográfico, además de suficientemente solubles en la fase móvil.*
- (3) *Comparativamente baja hidrofobicidad.*

Además de estos requisitos, también deben de tenerse en cuenta los siguientes aspectos:

- (1) *La cinética de la formación del complejo, especialmente durante el proceso cromatográfico.*
- (2) *La estabilidad del reactivo bajo las condiciones de formación del complejo.*
- (3) *La posibilidad de preconcentración y eliminación del exceso de reactivo.*
- (4) *Adecuada sensibilidad-i.e. alta absortividad molar- del complejo y diferencias en características respecto al reactivo.*
- (5) *Facilidad para la síntesis o adquisición del reactivo.*
- (6) *Especificidad respecto del problema analítico a resolver*

En cuanto a la **preparación del quelato con vistas a su análisis por HPLC**, son posibles diferentes variantes:

- (A) **Formación y extracción del complejo en un disolvente orgánico.**
- (B) **Formación del complejo en medio acuoso, seguido de adsorción sobre una columna rellena de un soporte inerte recubierto con un disolvente orgánico, o paso de la disolución de muestra a través de una columna rellena con un soporte inerte, recubierto con una disolución del agente quelante en un disolvente orgánico.**



## INTRODUCCIÓN

---

- (C) Formación del quelato en medio acuoso y subsiguiente adsorción sobre una columna de un adsorbente hidrófobo, un soporte polimérico o un cambiador aniónico de elevada capacidad.
- (D) Formación de los quelatos pasando la muestra a través de una precolumna C<sub>18</sub> cargada con el reactivo.
- (E) Inyección directa en la columna analítica de la mezcla de quelatos, disueltos en medio acuoso o medio orgánico:acuoso homogéneo.
- (G) Formación precolumna on-line de los quelatos mediante inyección de la muestra en un eluyente que contiene el agente quelante.

Las cuatro primeras variantes son las preferidas, porque permiten la preconcentración simultánea de las trazas metálicas. La extracción líquido-líquido es la modalidad de preconcentración más ampliamente empleada y la que mejor se adapta a la cromatografía en fase normal por la similitud entre los disolventes orgánicos empleados en la extracción y los que componen la fase móvil. Por otra parte, la preconcentración en un adsorbente es la modalidad que se adapta mejor a la cromatografía en fase reversa y a la de pares iónicos.

La elección de la técnica de preconcentración, no sólo va a venir determinada por la modalidad cromatográfica que se vaya a utilizar, sino también, por la naturaleza de la muestra. A este respecto, cuando se analizan muestras minerales con un alto contenido salino, se recomienda un proceso de extracción líquido líquido, mientras que para matrices orgánicas de baja polaridad se recomienda un proceso de adsorción.

### **Modalidades cromatográficas de HPLC empleadas en el análisis de trazas metálicas.**

Prácticamente, todas las modalidades de HPLC se han empleado en el análisis de iones metálicos. Haremos un breve repaso de las características e interés de cada una de ellas:



## INTRODUCCIÓN

---

### *Cromatografía en fase normal:*

a) Cromatografía de partición: En el año 1972 Huber y col. [136] publicaron el primer trabajo de HPLC referido a la separación de compuestos de coordinación. Describieron un sistema compuesto por una fase estacionaria polar constituida por una mezcla H<sub>2</sub>O: 2,2,4-trimetilpentano: etanol, depositada sobre partículas de sílice, frente a una fase móvil apolar rica en hidrocarburos. Con este sistema llevaron a cabo la separación y detección en veinticinco minutos de seis acetilacetatos, empleando un detector UV-VIS on-line y una longitud de onda de detección de 310 nm. En este trabajo pionero ya se puso de manifiesto la *necesidad de incorporar el ligando libre a la fase móvil*.

Tanto la falta de estabilidad de este tipo de fases estacionarias, como el desarrollo posterior de las fases químicamente ligadas han hecho que la modalidad de partición, haya tenido pocos adeptos.

b) Cromatografía de adsorción: La cromatografía de adsorción se ha aplicado fundamentalmente a la separación de complejos neutros y estables. Para ello se ha empleado fundamentalmente la gel de sílice como adsorbente, quizás por la facilidad de extrapolación de los resultados obtenidos en cromatografía en capa fina a los obtenidos en columna. En esta modalidad cromatográfica es esencial que la fase móvil esté exenta de agua, al objeto de evitar cambios en las características de la columna, con la consiguiente pérdida de la repetibilidad. Otro problema asociado a la cromatografía con adsorbentes como la sílice, deriva de la retención irreversible de especies metálicas, lo que obliga al lavado periódico de las columnas con disoluciones diluídas de ácido, de AEDT u otras complexonas.

Es difícil predecir mediante reglas sencillas el orden de elución de los complejos, debido a la diversidad de los ligandos que se emplean y a la dificultad de caracterizar con precisión la fase estacionaria, ya que, debido a su carácter polar, modifica su superficie con los componentes de la fase móvil, especialmente con el agente complejante. No obstante, se han podido establecer algunas correlaciones para determinar las familias de compuestos como los



## INTRODUCCIÓN

---

ditiocarbamatos [137-139].

La cromatografía de adsorción es adecuada para la separación de complejos isoméricos. Por ejemplo, Uden y col. [140] resuelven una serie de isómeros geométricos de Co(III) y Cr(III) como  $\beta$ -dicetonatos sobre una columna de sílice.

En la tabla IV, se recogen algunos de los sistemas estudiados dentro de esta modalidad.

c) Cromatografía con fases ligadas polares: Muchos de los problemas antes señalados en la Cromatografía de adsorción y de partición se han superado con el empleo de fases químicamente enlazadas, fundamentalmente fases ciano, diol y en menor medida amino [151]. A pesar de ello, hasta ahora se han descrito relativamente muy pocos métodos de separación de trazas metálicas con dichas fases. A título de ejemplo, podemos señalar la separación llevada a cabo por Gasparrini y col. [152], de varios hidrazonato complejos de Pd(II), sobre una columna Lichrosorb Diol, empleando fases móviles no polares. Asimismo, y tal como se recoge en esta memoria, el Mo(VI) puede ser separado sobre una columna ciano en forma de complejo con la BPHA (N-benzoíl-N-fenilhidroxilamina), [153].



TABLA IV. Condiciones usadas en la separación y determinación de complejos metálicos mediante Cromatografía en Fase Normal (Adsorción).

LIGANDO	IONES METÁLICOS	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	REF.
Base de Shiff	Cu, Ni	Partisil, 10 $\mu\text{m}$	Diclorometano + acetoni-trilo	Espectrofotométrica; 254 nm	141
Carbamatos	Co, Ni, Cu	Spherisorb SGP, 8 $\mu\text{m}$	Acetonitrilo + dietileter + Skelly B	Espectrofotométrica; 254nm. Mediante Espectroscopía de plasma de argón	142
$\beta$ -dicetonas	Co, Cr	Partisil, 10 $\mu\text{m}$ Hypersil, 5 $\mu\text{m}$	Varias mezclas con elucio-nes isocráticas y en gra-diente	Espectrofotométrica, 254 nm. Mediante Espec-troscopía de plasma de argón	140
Ditizona	Pb, Zn, Cd	Corasil, 50 $\mu\text{m}$ Partisil, 10 $\mu\text{m}$	Mezclas de disolventes orgánicos	Espectrofotométrica; 525 nm	143
1-Hidroxi-2-piridina-tiona	Rh, Pd, Ir, Pt	Lichrosorb	Cloroformo + tetrahidro-furano + diclorometano	Espectrofotométrica	144
Cetoenaminas	Cu, Ni, Pd	Partisil, 10 $\mu\text{m}$ Lichrosorb Si 100, 5 $\mu\text{m}$	Diclorometano. Dicloro-metano + acetonitrilo	Espectrofotométrica; 254 nm, 298 nm	145
Oxina	Al, Co	Lichrosorb, 10 $\mu\text{m}$	Metanol + cloroformo	Espectrofotométrica; 254 nm, 298 nm	146
PAR	Pd, Cu, Co, Ni	Silasorb 600, 10 $\mu\text{m}$	Acetona o cloroformo	Espectrofotométrica; 620 nm	147
Oxina	Pd, Pt, Rh, Ir, Ru, Os	Silasorb 600, 5 $\mu\text{m}$	Diclorometano + alcohol isopropílico	Espectrofotométrica; 254 nm	148
Dibutilditiofosfato potásico	Cu, Hg, Pb	Silasorb 600, 10 $\mu\text{m}$	Tolueno + hexano	Espectrofotométrica; 300 nm	149
BPHA	V	Superspher Si 60, 5 $\mu\text{m}$	D <sup>on</sup> de BPHA en cloroformo + metanol	Espectrofotométrica; 430 nm	150



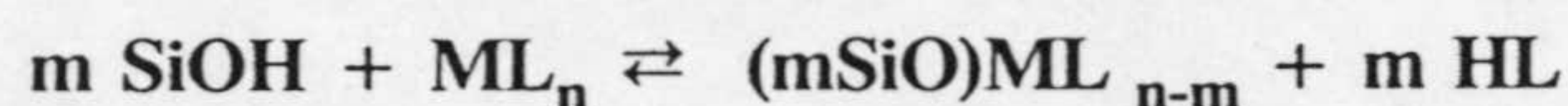
## INTRODUCCIÓN

---

### *Cromatografía en fase reversa:*

La cromatografía en fase reversa (CFR), con fases estacionarias ligadas y fases móviles acuosas, ha sido la modalidad preferida para la separación de complejos metálicos por HPLC. Para llevar a cabo una separación con éxito se requiere en este caso, que dichos complejos sean suficientemente estables y solubles en fases móviles polares, generalmente acuosas [154,155]. En la tabla V se recogen algunos sistemas estudiados por CFR. Como agentes quelantes más utilizados destacan claramente los ditiocarbamatos. Cabe señalar como inconveniente de esta familia de reactivos, su baja solubilidad en disolventes acuosos, aunque la adición a la fase móvil de disolventes orgánicos tales como el  $\text{CHCl}_3$  [164], puede resolver el problema.

También esta modalidad puede mostrar algunos inconvenientes. Uno de ellos, presente en columnas que emplean la sílice como material de soporte de la fase ligada [165, 166], deriva de las fuertes interacciones de los complejos con los grupos silanoles residuales y con las impurezas metálicas. La primera de estas interacciones puede representarse mediante la reacción:



En efecto, se observa una mejora en el comportamiento cromatográfico de estas especies cuando se emplea una columna de poliestireno o una columna con soporte de sílice, en la que los grupos silanol estén encapsulados [167]. Otra alternativa cuando se emplea una columna con este tipo de soporte, consiste en bloquear los grupos silanol residuales mediante la adición al eluyente de AEDT [168], de una amina [169] o de acetato de trietilamonio [170]. Dicho bloqueo se produce a través de las siguientes reacciones:

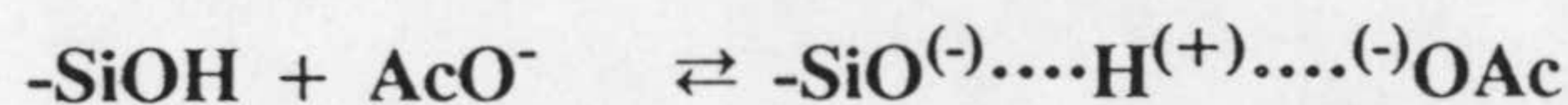
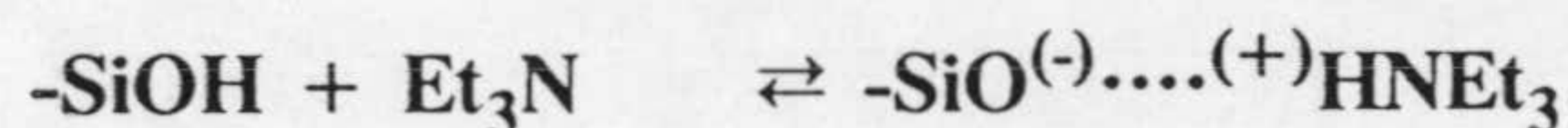
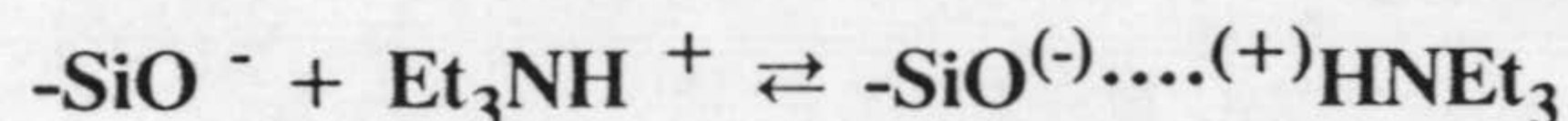




TABLA V. Condiciones usadas en la separación y determinación de metales mediante Cromatografía en Fase Reversa

LIGANDO	IONES METÁLICOS	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	REF.
Ditiocarbamatos	Cd, Pb, Ni, Co, Zn, Cu, Hg	Lichrosorb RP8, 8 $\mu\text{m}$	Metanol + H <sub>2</sub> O	Espectrofotométrica; 254 nm	156
Oxina	Cu, Fe	Supelchem C <sub>18</sub>	Acetonitrilo + Tampón + KNO <sub>3</sub> + Ligando	Espectrofotométrica; 400 nm	120
$\beta$ -Cetoenaminas	Co, Ni, Cu, Pd	Micropak CH, 10 $\mu\text{m}$	Metanol + Tampón fosfato (pH = 7.8)	Espectrofotométrica; 254 nm	151
Éteres corona	Haluros de Hg	Micropak CH, 10 $\mu\text{m}$	Metanol + Tampón fosfato o borato	Espectrofotométrica; 254 nm	157
$\beta$ -Dicetonas	Mn, Be, Co, Cr, Rh, Ru, Ir, Pd, Pt	Ultrasphere ODS	H <sub>2</sub> O + metanol o acetonitrilo	Espectrofotométrica	158
Bis-(acetilpicolilmetano)etilendiimina	Cu, Ni	Hypersil ODS Novapak RP-18	Metanol + H <sub>2</sub> O Metanol + acetonitrilo + H <sub>2</sub> O	Espectrofotométrica; 260 nm	159
PATP <sup>(1)</sup>	Bi, Cd, Co, Cu, Ni, Fe	Lichrospher RP-18	Acetonitrilo + H <sub>2</sub> O + metanol + piridina + acetato + PATP	Espectrofotométrica; 390 nm	160
STTA <sub>s</sub> <sup>(2)</sup>	Co(III), Ni, Cu	Shimpak CLC-ODS(M)	Metanol + H <sub>2</sub> O + acetonitrilo	Espectrofotométrica; 370 nm	161
TTA <sub>s</sub>	Co(II), Ni, Cu		Varios aditivos	Espectrofotométrica; 340 nm	
Ác. 2-Piridincarboxílico	Mn, Cu, Ni, Co, Cd, Zn	Spherisorb ODS	Acetonitrilo + H <sub>2</sub> O + Ác. Picolínico (pH = 7.0)	Espectrofotométrica; 235 nm	162
Ditizona	Cd, Co(III), Zn, Ni	Wakopak 5C <sub>18</sub> Wakosil	Metanol + H <sub>2</sub> O + Ligando + Aditivos	Espectrofotométrica; 520 nm	163

(1) PAPT: Picolinaldehido-4-fenil-3-tiosemicarbazona

(2) STTA<sub>s</sub>: 4-(2-trienil)-4-tioxo-1,1,1-trifluoro-2-butanona

TTA<sub>s</sub>: 4,4,4-Trifluoro-1-(2-tienil)-1,3-butanodiona



TABLA VI. Condiciones usadas en la Cromatografía Iónica y en la de Quelación de especies metálicas.

LIGANDO	IONES METÁLICOS	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	REF.
AEDT	Cu, Zn, Ca, Mg	Aminex A14	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0.05 M)	Mediante Espectroscopía de Absorción Atómica, espectroscopía de plasma acoplado inductivamente	175
Citrato, Tartrato	Mg, Ca	Dionex CS2 (Columna catiónica)	Etilendiamina (2 mM) + Citrato (2 mM) o Tartrato (4 mM)	Conductimétrica	176
Oxalato	Cu, Zn, Fe, Ni, Mn	Nucleosil SA10	Etilendiamina (2.5 mM) + Oxalato (1 mM)	Espectrofotométrica; 490 nm	177
Sulfosalicilato	Fe, Al	Dionex CS2	Etilendiamina ((2mM) + Sulfosalicilato (20 mM)	Espectrofotométrica con derivatización post columna; 610 nm	178
Aminas	Varios	Cambiador catiónico PS-DVB	Varios	Conductimétrica	179
Ácido 8-hidroxiquinoleín-5-sulfónico	Zn, Cd, Mg, Ca	Cambiador catiónico	Elución en gradiente	Fluorimétrica	180
Tartrato	12 metales	Varios (ej. Intercambiador iónico sobre soporte de gel de sílice)	Tartrato 0.16 mM)	Espectrofotométrica con derivatización post-columna; 520 nm	181
Resina quelante	Mn, Fe, Zn, Co, Pb, Cu	Resina quelante (Grupo funcional:hidracina)	Tampón acuoso + 0.1% en clorhidrato de hidroxilamina	Espectrofotométrica con derivatización post-columna; 550 nm	182
Resina quelante	Metales de transición	Iminodiacetato sobre soporte de gel de sílice	Carboxilato	Conductimétrica	183



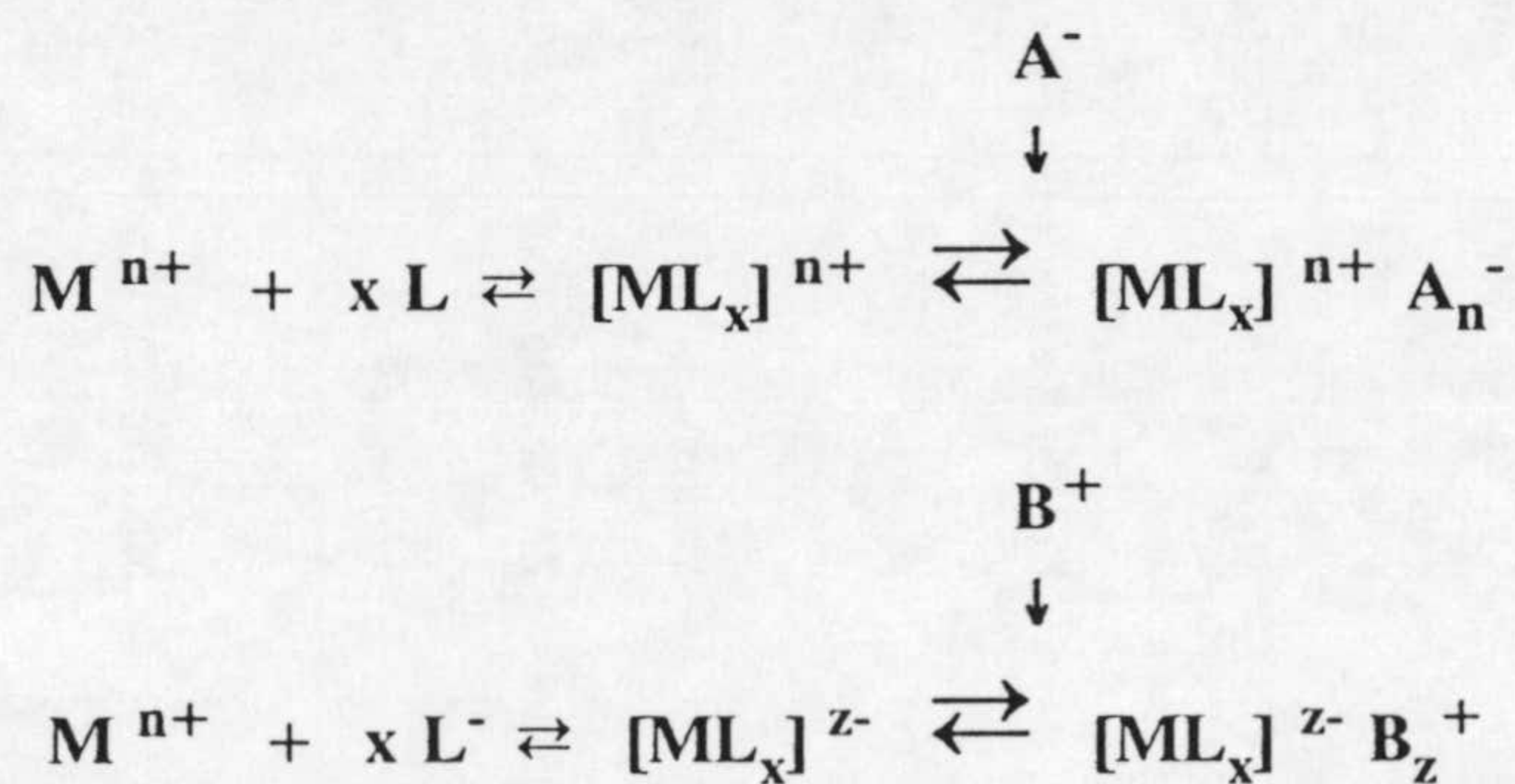
## INTRODUCCIÓN

### *Cromatografía de Interacción Iónica (Pares Iónicos)*

En páginas anteriores hemos indicado que son varios los procedimientos empleados en esta modalidad cromatográfica. En la separación de cationes, el más utilizado consiste en el recubrimiento dinámico de la fase estacionaria con el agente formador de pares iónicos. Este enfoque implica la adición a la fase móvil de una disolución diluída del agente formador de pares iónicos (los más empleados suelen ser hexanosulfonato y octanosulfonato sódicos).

Como es sabido, este tipo de cromatografía emplea, en la mayoría de los casos, las mismas fases estacionarias que las utilizadas en fase reversa. La elección del tipo de fase es muy importante, ya que si el material elegido tiene grupos silanol residuales, estos pueden provocar interacciones irreversibles con los cationes trivalentes [186, 187]. Por este motivo, en algunas ocasiones, se ha empleado materiales poliméricos, tipo resina [187]. Aparte del agente formador de pares iónicos, la fase móvil frecuentemente incluye un modificador orgánico, un tampón y un agente complejante. Considerando que la retención del analito viene determinada por su grado de complejación, es importante regular tanto el pH de la fase móvil como la concentración de ligando [187, 188]. Algunos de los agentes complejantes más utilizados son bipyridilo, 1,10-fenantrolina, tartrato y AEDT.

La cromatografía de pares iónicos de metales puede llevarse a cabo tanto para especies catiónicas [189] (incluyendo iones no complejados) como aniónicas (incluyendo oxoaniones), y transcurre a través de equilibrios como los siguientes:



$\text{A}^-$  y  $\text{B}^+$  son los agentes formadores de pares iónicos.



## INTRODUCCIÓN

---

La formación de la especie cargada  $ML_x$  se puede llevar a cabo antes de la inyección o en la propia columna. Inoue y col. [190] discuten ambas posibilidades en un trabajo sobre la separación de Bi(III), Fe(II) y Cu(II) como complejos con ACDT (ácido ciclohexdiaminotetraacético) y bromuro de tetrabutilamonio como contraión.

La cromatografía de pares iónicos es especialmente útil para la separación de complejos catiónicos y aniónicos estables [191]. En la TABLA VII se recogen los datos más destacados de algunos de estos sistemas.

### *Cromatografía de exclusión por tamaños:*

Se conocen pocos trabajos en los que la separación de iones metálicos como complejos se haga con un gel de exclusión, y la mayoría de ellos, salvo excepciones [198,199], sólo tienen interés teórico. No obstante, la cromatografía de exclusión por tamaños ha adquirido considerable importancia en el estudio de iones metálicos asociados con fracciones separadas de los ácidos húmico y fúlvico, polielectrolitos, proteínas y otras especies macromoleculares.



**TABLA VII. Condiciones usadas en la separación y determinación de especies metálicas mediante Cromatografía de Interacción Iónica**

LIGANDO	IONES METÁLICOS	FASE ESTACIONARIA	FASE MÓVIL	DETECCIÓN	REF.
Bipiridilo	Ni, Fe	$\mu$ Bondapak CN	SCN <sup>-</sup> en medio hidroalcohólico (Metanol : H <sub>2</sub> O)	Espectrofotométrica; 295 nm	189
AEDT	Bi, Fe, Cu	ERC-ODS	Tetrabutilamonio (0.01 M) en metanol + H <sub>2</sub> O	Espectrofotométrica; 254 nm	190
Canuro	Cu, Co, Ni, Fe, Au, Ag	Novapak C <sub>18</sub>	Tetrabutilamonio (2.5 mM) en metanol	Espectrofotométrica	192
Ác. Hidroxámicos	Sb, Fe(III), Zr, Hf, Fe(II), Cu, Al	PS-DVB	Ligando (2.5 mM) y HClO <sub>4</sub> (0.1 M) en acetonitrilo + H <sub>2</sub> O	Espectrofotométrica; 304 nm	187
Hidracina	Varios	PS-DVB	ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup> en acetonitrilo + H <sub>2</sub> O	Espectrofotométrica	193
4,4'-Diantipirilmetano (DAM)	Ti	YMC R-ODS	Acetonitrilo + H <sub>2</sub> O + DAM; NH <sub>4</sub> I (pH = 2.25)	Espectrofotométrica; 390 nm	194
Ác. 4,5-dihidroxibenzeno-1,3-disulfónico (TIRÓN)	Zr, Mo	Waters $\mu$ Bondapak C <sub>18</sub>	Metanol + H <sub>2</sub> O + TIRÓN + bromuro de tetrabutilamonio (pH = 4.0)	Espectrofotométrica; 315 nm	195
5-Br-PADAP <sup>(1)</sup>	Co	Capcell SG-120 ODS	Metanol + H <sub>2</sub> O + bromuro de tetrabutilamonio, AEDT (pH = 5.0)	Espectrofotométrica; 588 nm	196
MBTAE <sup>(2)</sup>	Pt, Rh, Pd, Os, Ni, Co	Spherisorb C <sub>18</sub>	Metanol + n-butanol + H <sub>2</sub> O + bromuro de tetrabutilamonio + EDDD <sup>(3)</sup> (pH = 4.5)	Espectrofotométrica; 575 nm	197

(1) 5-Br-PADAP: 2-(5,Br-2-piridilazo)-5-dietilaminofenona

(2) MBTAE: 2-(6-metil-2-benzotiazolilazo)-5-dietilaminofenol

(3) EDDD: Etilendiaminodiacetato de dietilo



## INTRODUCCIÓN

---

### Sistemas de detección.

Todos los detectores habitualmente utilizados en la instrumentación de HPLC, como el detector de índice de refracción, el espectrofotométrico (UV-VIS), el fluorimétrico, el amperométrico y el conductimétrico, son adecuados para el estudio de especies metálicas. También se han empleado, aunque a menor escala, otros sistemas de detección como la absorción atómica [200,201], la espectroscopía atómica de emisión de plasma [202] en sus dos variantes de corriente de argón [203-205] e ICP [206-208], la espectroscopía de resonancia de spin [209] y la espectroscopía de masas. Los problemas que se presentan en el acoplamiento de la HPLC con las técnicas espectrométricas atómicas [210] se deben, por una parte, a la incompatibilidad de las fases móviles con los nebulizadores y procesos de atomización, y por otra, al difícil emparejamiento del flujo cromatográfico con la velocidad de aspiración del espectrómetro [211,212]. El acoplamiento directo ICP-MS con HPLC ha aportado una nueva herramienta a los estudios de especiación [213].

El sistema más popular de detección de complejos metálicos es la espectrofotometría, llevándose a cabo la detección en la zona UV-VIS, a una longitud de onda característica del complejo o del ligando. Para el análisis de ultratrazas metálicas, los complejos correspondientes deben presentar absorptividades molares de al menos  $10^4$ , con lo que los límites de detección se encuentran al nivel de unos pocos nanogramos de metal. Muchos complejos derivados de los ligandos recogidos en la TABLA II cumplen este requisito [151, 141, 142, 166] en la región del UV y/o visible. La optimización de la medida de varios complejos requiere el empleo de un detector de longitud de onda variable o de uno de diodos en fila [214,215].

Aunque los detectores espectrofotométricos se presentan como los más versátiles, en algunos casos se pueden obtener límites de detección menores y mayores sensibilidades [216] con detectores electroquímicos. Para ello, los complejos correspondientes deben presentar procesos redox bien definidos, ya sea basados en el ión metálico [217], o en el ligando [218].

Tanto la detección espectrofotométrica como la electroquímica están, con frecuencia, seriamente afectadas por un exceso de ligando en la muestra y/o en la fase móvil. Esto produce inestabilidad en la línea base e impide en algunos casos la detección adecuada de complejos que eluyen pronto. El exceso de ligando en la fase móvil, que es necesario en la mayoría de los sistemas, incrementa la señal de fondo [120,217] y puede afectar de forma negativa a la relación señal/ruido, en especial con los detectores electroquímicos, donde la máxima concentración tolerable de ligando en el eluyente es de tan sólo  $10^{-4}$  M. Con detección espectrofotométrica son



## INTRODUCCIÓN

---

admisibles concentraciones tan elevadas como un 2% sin que afecte seriamente a la detección, especialmente en la zona visible del espectro. Incluso, si fuera preciso y el o los complejos no son excesivamente débiles, se puede eliminar el exceso de ligando mediante una columna supresora de cambio iónico, colocada después de la columna analítica de separación.

Aparte de los detectores amperométricos también se utilizan, aunque a menor escala, otros detectores electroquímicos como el potenciométrico [219] y el conductimétrico [220].

Finalmente, hay una serie de complejos, como los formados por la 8-hidroxiquinoleína que poseen fluorescencia intrínseca y que pueden ser analizados empleando un detector fluorimétrico.

### *Derivatización post-columna.*

Consiste en la utilización de una disolución diluída y tamponada de un reactivo cromogénico o fluorogénico [221], la cual se mezcla con el eluyente que sale de la columna en un reactor. Posteriormente los derivados coloreados o fluorescentes formados, se detectan a las longitudes de onda adecuadas.

La detección con reactores post-columna puede combinarse con cualquier tipo de detector, pero el "más popular" es, de nuevo, el espectrofotométrico. Para ello se emplean reactivos cromogénicos que formen complejos con elevada absortividad molar [222,223]. Reactivos como el PAR, el ácido 2,7-bis(2-arsenofenilazo)-1,8-dihidroxi-naftaleno-3,6-disulfónico (Arsenazo III), Tirón, Naranja de Xilenol, Negro de Eriocromo T, Violeta de Catecol y el ácido 8-hidroxiquinoleín-5-sulfónico, son los más empleados para la detección de metales de transición y lantánidos. El último de los reactivos citados se ha empleado también como reactivo fluorogénico de derivatización post-columna [180].

En un procedimiento típico de derivatización post-columna hay que tener en cuenta una serie de aspectos:

- Considerando que la base conjugada ( $R^-$ ) del reactivo derivatizante (HR) y los complejos metálicos MR frecuentemente exhiben valores muy similares de longitud de onda de máxima absorción y absortividades molares máximas, es conveniente que la formación del complejo tenga lugar a un pH tal, que sea despreciable la concentración de  $R^-$ . Asimismo:
  - a) la diferencia entre las longitudes de onda de máxima absorción entre



## INTRODUCCIÓN

---

HR y MR debe ser al menos de 100 nm, y

b) la diferencia de absorptividades molares máximas entre complejo y ligando, a la longitud de onda de máxima absorción debe ser mayor de  $10^4$ .

- También es preciso que HR sea estable y soluble en la fase móvil empleada.
- La reacción post-columna debe ser rápida, debiendo permanecer la señal de fondo constante y baja. En muchos casos, el eluyente contendrá un agente complejante que puede interferir en la reacción post-columna [173]. Por este motivo, el reactivo derivatizante debe formar complejos muy estables y de fuerte coloración. En cualquier caso, el agente eluyente debe ser compatible con el agente cromogénico.
- El diseño del reactor post-columna es crucial si se quiere mantener una buena resolución y una sensibilidad elevada. A este respecto, es esencial que los volúmenes muertos de las conexiones y dispositivos de mezcla se mantengan en el mínimo, para evitar ensanchamientos de banda innecesarios [224]. Es conveniente, por otra parte, emplear células de flujo de tamaño netamente inferior a los 10  $\mu\text{l}$  (p.e. 3  $\mu\text{l}$ ).

También se ha empleado la detección basada en la atenuación de fluorescencia de un reactivo fluorescente, provocada por el ión metálico. En tal caso, la presencia de trazas metálicas provenientes del sistema instrumental y de la columna, constituyen una seria interferencia, obligando al empleo de un sistema de HPLC totalmente exento de partes metálicas.

Finalmente, la catálisis de la reacción quimioluminiscente entre el luminol y el peróxido de hidrógeno por iones metálicos de transición, ofrece otras posibilidades de derivatización post-columna [225,226].



## INTRODUCCIÓN

### Aplicaciones analíticas

La cromatografía líquida es indispensable dentro del actual análisis inorgánico, pues en sus diferentes modalidades, es quizás la técnica analítica que permite determinar la más amplia variedad de especies inorgánicas. Esto incluye simples aniones y cationes, especies organometálicas, compuestos de coordinación, especies complejas asociadas con proteínas, ácido húmico y otros materiales biológicos [227-229].

La cromatografía líquida está ocupando también un importante lugar como técnica off-line de preseparación y/o preconcentración para otras técnicas analíticas tales como la espectrofotometría UV-VIS [230], la Espectroscopía de absorción atómica [231], la ICP-AES [232] y las técnicas radioanalíticas. A este respecto es particularmente útil el empleo de columnas cortas a baja presión, en las modalidades de cromatografía de extracción, quelación y de cambio iónico.

En la figura 12 hemos reunido las principales ventajas e inconvenientes (en relación fundamentalmente a las técnicas espectroscópicas como AAS e ICP-AES) de la cromatografía líquida, dentro del análisis inorgánico. Respecto al principal inconveniente que se le puede adjudicar a la CL, su *lentitud*, se puede observar que un objetivo primordial en la actualidad consiste en el diseño de sistemas cromatográficos de alta velocidad que permitan la cuantificación de varias especies metálicas en unos pocos minutos ( $< 5$ ).

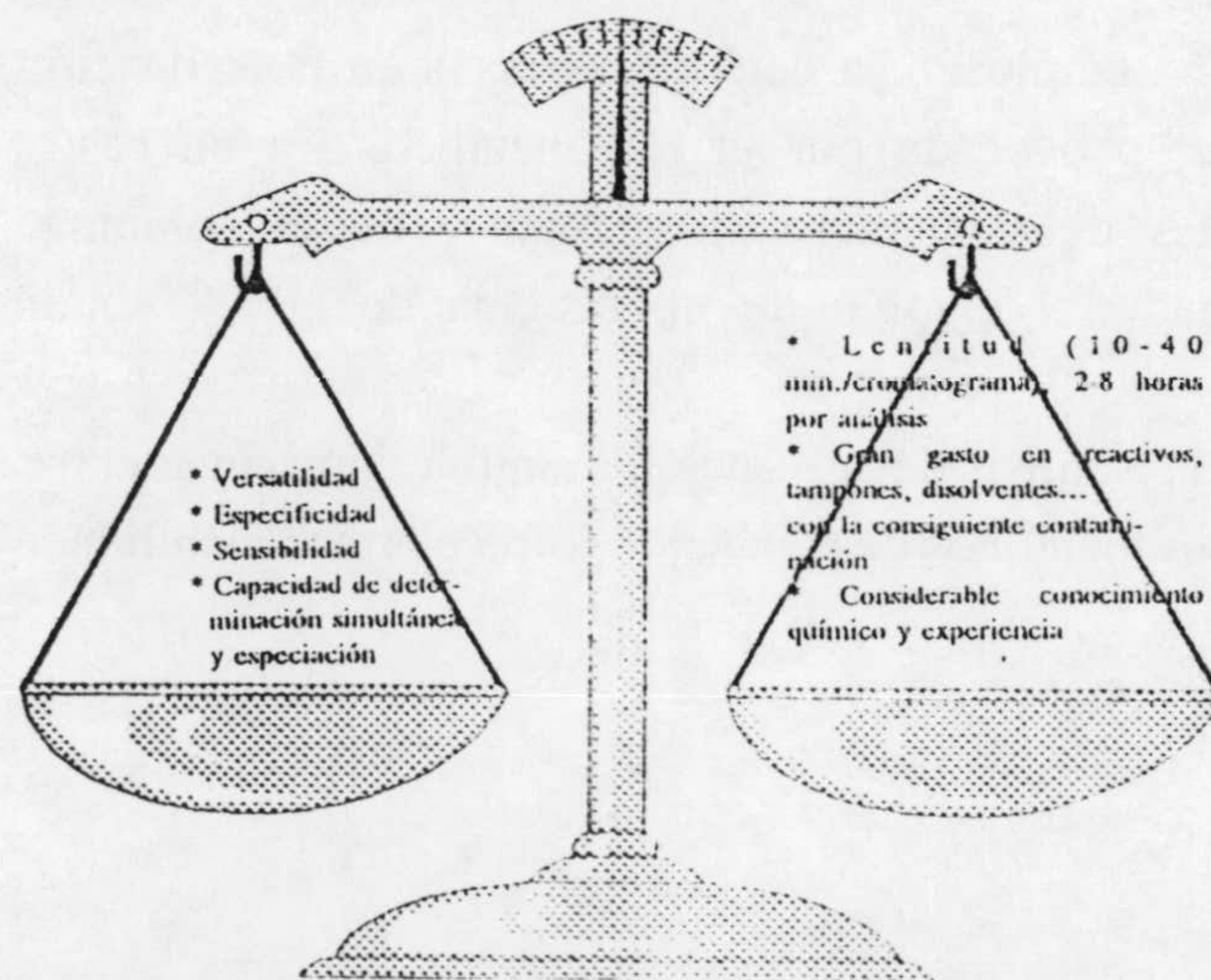


FIGURA 12. Ventajas e inconvenientes asociados a la determinación de metales mediante cromatografía líquida.



## INTRODUCCIÓN

---

A la hora de seleccionar el método analítico más adecuado para una determinada aplicación debemos acudir a la bibliografía, o de forma general, seguir un esquema como el de la Figura 13.

En la Tabla VII hemos recogido los datos referentes a una serie de métodos analíticos que se han aplicado a muestras concretas.

Podemos observar que los ditiocarbamatos son los agentes derivatizantes más utilizados, ya que sus características complejantes son más apropiadas para la resolución de problemas prácticos. Actuando como agentes extractantes se pueden obtener factores de preconcentración del orden de 100 [233,234], lo que permite determinar trazas del analito en una matriz que contenga grandes cantidades de otros elementos. En las figuras 14 y 15 se recogen las separaciones de hasta siete especies metálicas en forma de dietilditiocarbamatos, una en fase reversa [110] y otra en fase normal [233].

Entre los métodos recogidos por la bibliografía uno que destaca es el propuesto por Schwedt en 1977 [106] correspondiente a la determinación de trazas de selenio en varios tipos de aguas. Este procedimiento permite determinar hasta 400 pg de dicho elemento en forma de complejo con el dietilditiocarbamato y tiene una sensibilidad no inferior a la espectroscopía de absorción atómica sin llama o a la fluorimetría.

Otro problema analítico, felizmente resuelto por la cromatografía es la determinación simultánea de cromo en varios estados de valencia [102, 107, 114]. La Figura 16 recoge una de estas determinaciones en aguas residuales. También se ha podido determinar de forma simultánea mercurio en forma inorgánica, como Hg(II) y formas orgánicas, como  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$  y  $\text{C}_6\text{H}_5\text{Hg}^+$ , después de su transformación en los correspondientes dietilditiocarbamato-complejos [119,120]. Timerbaev et al. [133] han determinado Cu, Ni, Pb y Zn en tejidos vegetales en presencia de Bi, Co, Cd y Hg (Figura 17).





## INTRODUCCIÓN

### TRATAMIENTO DE LA MUESTRA O DESCOMPOSICIÓN

- \* Extracción
- \* Incineración
- \* Digestión ácida

### PRESEPARACIÓN / PRECONCENTRACIÓN

- \* Extracción
- \* Coprecipitación
- \* Electrodeposición
- \* Cromatografía

### SEPARACIÓN ANALÍTICA

C. IÓNICA	C. PARES IÓNICOS	FASE NORMAL / REVERSA	C. EXCLUSIÓN	C. AFINIDAD
<ul style="list-style-type: none"> <li>* Grupos I-IIA.</li> <li>* Cationes.</li> <li>* Metaloaniones.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Especies cargadas:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cationes hidratados o complejados.</li> <li>- Metaloaniones.</li> <li>- Especies organometálicas</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Especies neutras:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>- Complejos.</li> <li>- Organometálicos</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Iones metálicos asociados con especies macromoleculares.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Metaloproteínas</li> </ul>

### DETECCIÓN

Conductimetría	Espectrofotometría	Fluorimetría	Amperometría
<ul style="list-style-type: none"> <li>* En asociación fundamentalmente con C.I.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* En todas las modalidades.</li> <li>* Derivatización post-columna.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Complejos fluorescentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>* Especies oxidables o reducibles fácilmente.</li> </ul>

FIGURA 13. Consideraciones a tener en cuenta a la hora de desarrollar un método de determinación de metales por CL.



TABLA VIII. Ejemplos de aplicación de la complejación a la determinación cuantitativa de metales mediante CL.

MUESTRA	IONES METÁLICOS	LIGANDO	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	MODALIDAD	DETECCIÓN	REF.
Aleaciones	Co, Cu, Fe, Mn, Ni	Tartrato	Disolución con ácido y dilución	CI	Espectrofotométrica con derivatización post-columna; 610 nm	[235]
Antitranspirante	Zr	Ác. hidroxámico	Reflujo con ácido, evaporación a casi sequedad y dilución con una disolución acuosa de ligando	CII	Espectrofotométrica; 304 nm	[236]
Patrones "Citrus leaves y Harina de arroz"	Ni, Pb, Zn, Cu	Ditiocarbamatos	Digestión ácida y extracción con ligando	CFR	Espectrofotométrica; 260 nm	[154]
Efluentes	Cu, Ni, Pb	Ditizona	Ajuste del pH y extracción con ligando	CFN	Espectrofotométrica; 280 nm	[237]
Pescado	Cu, Ni, Mn	Ditiocarbamatos	Digestión ácida y extracción con ligando	CFN	Espectrofotométrica; 280 nm	[237]
Cenizas y aguas naturales	V	2-(8-quinolilazo)-5-(dimetilamino)-fenol	=====	CII	=====	[238]
Plasma (ultrafiltrado) y orina	Pt	Ditiocarbamatos	Extracción con CHCl <sub>3</sub>	CFR	Espectrofotométrica; 254 nm	[239,240]
Tejido humano	Cu, Pb, Co, Ni, Hg	Ditiocarbamatos	Digestión ácida y extracción con CHCl <sub>3</sub>	CFR	Espectrofotométrica; 254 nm	[241]



TABLA VIII. (Continuación) Ejemplos de aplicación de la complejación a la determinación cuantitativa de metales mediante CL.

MUESTRA	IONES METÁLICOS	LIGANDO	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	MODALIDAD	DETECCIÓN	REF.
Rocas	Lantánidos	Arsenazo III	=====	CII	Espectrofotométrica con derivatización post-columna; 658 nm	[242]
Suelos	Cu, Ni, Pb, Hg, Co, Mn, Bi	Ditiocarbamatos	Digestión ácida, extracción con HCl y extracción con ligando	CFN	Espectrofotométrica; 280 nm	[243]
Aceros	Varios	Tartrato	Disolución y precipitación de hierro	CII	Espectrofotométrica con derivatización post-columna; 535 nm	[244]
Extracto vitamínico	Na, Zn, Fe, Aniones	Citrato	Disolución y filtración	CI	Conductimétrica	[245]
Vino y zumos de frutas	Cu, Zn, Fe, Mn, Mg, Ca, Ni	AEDT	=====	CI	Espectrofotométrica; 490 nm	[177]
Agua de mar	Mo, V, Cu, Fe, Ga, In	Oxina	Ajuste del pH, extracción con ligando, evaporación del extracto y disolución en la fase móvil	CFR	Espectrofotométrica; 370 nm	[246]
Catalizador	V(V) y V(IV)	PAR	Digestión con HNO <sub>3</sub> al 1%	CFR	Espectrofotométrica; 540 nm	[247]
Almeja "Citterea s.p."	V	BPHA	Digestión ácida, extracción con MIBK y extracción con ligando	CFN	Espectrofotométrica; 430 nm	[150]



**TABLA VIII. (Continuación) Ejemplos de aplicación de la complejación a la determinación cuantitativa de metales mediante CL.**

MUESTRA	IONES METÁLICOS	LIGANDO	PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	MODALIDAD	DETECCIÓN	REF.
Complejo vitamínico, Fertilizante, Lentejas y Batido dietético.	Mo	BPHA	Digestión ácida y extracción con ligando	CFN	Espectrofotométrica; 360 nm	[153]

CI: Cromatografía de cambio iónico.  
 CII: Cromatografía de interacción iónica o cromatografía de pares iónicos.  
 CFR: Cromatografía de fase reversa.  
 CFN: Cromatografía de fase normal (adsorción).



## INTRODUCCIÓN

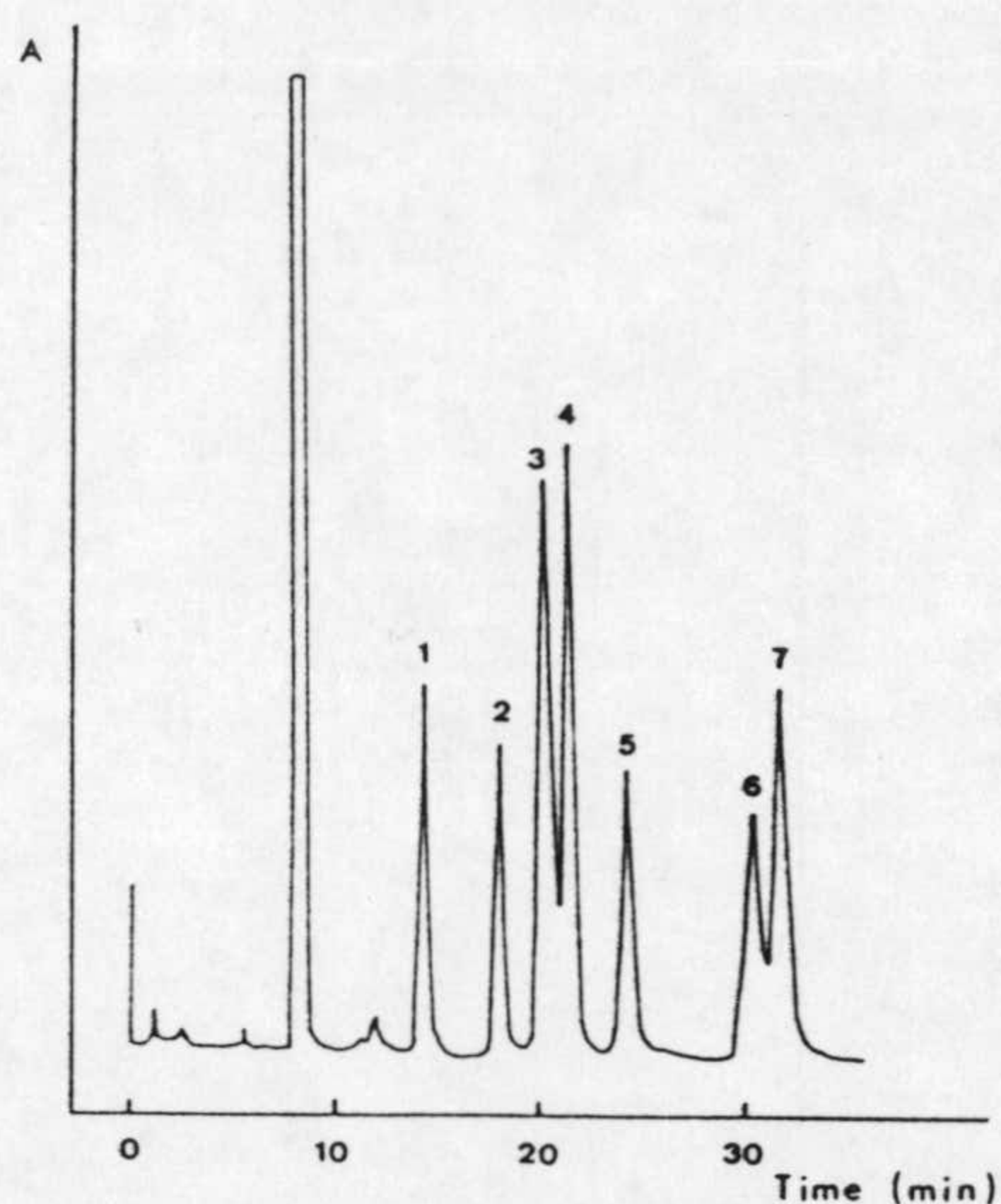


FIGURA 14. Separación mediante cromatografía líquida en fase reversa de dietilditiocarbamatos de (1) Ni; (2) Co; (3) Cr; (4) Se; (5) Cu; (6) Hg; (7) Te; en una columna equilibrada con AEDT ( $5 \times 10^{-3}$  M). COLUMNA: Radial Pak  $C_{18}$  ( $5 \mu\text{m}$ ); FASE MÓVIL:  $\text{CH}_3\text{OH} + \text{CH}_3\text{CN} + \text{H}_2\text{O}$  conteniendo AEDT  $1.25 \times 10^{-5}$  M. FLUJO:  $2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Detección espectrofotométrica a 254 nm.

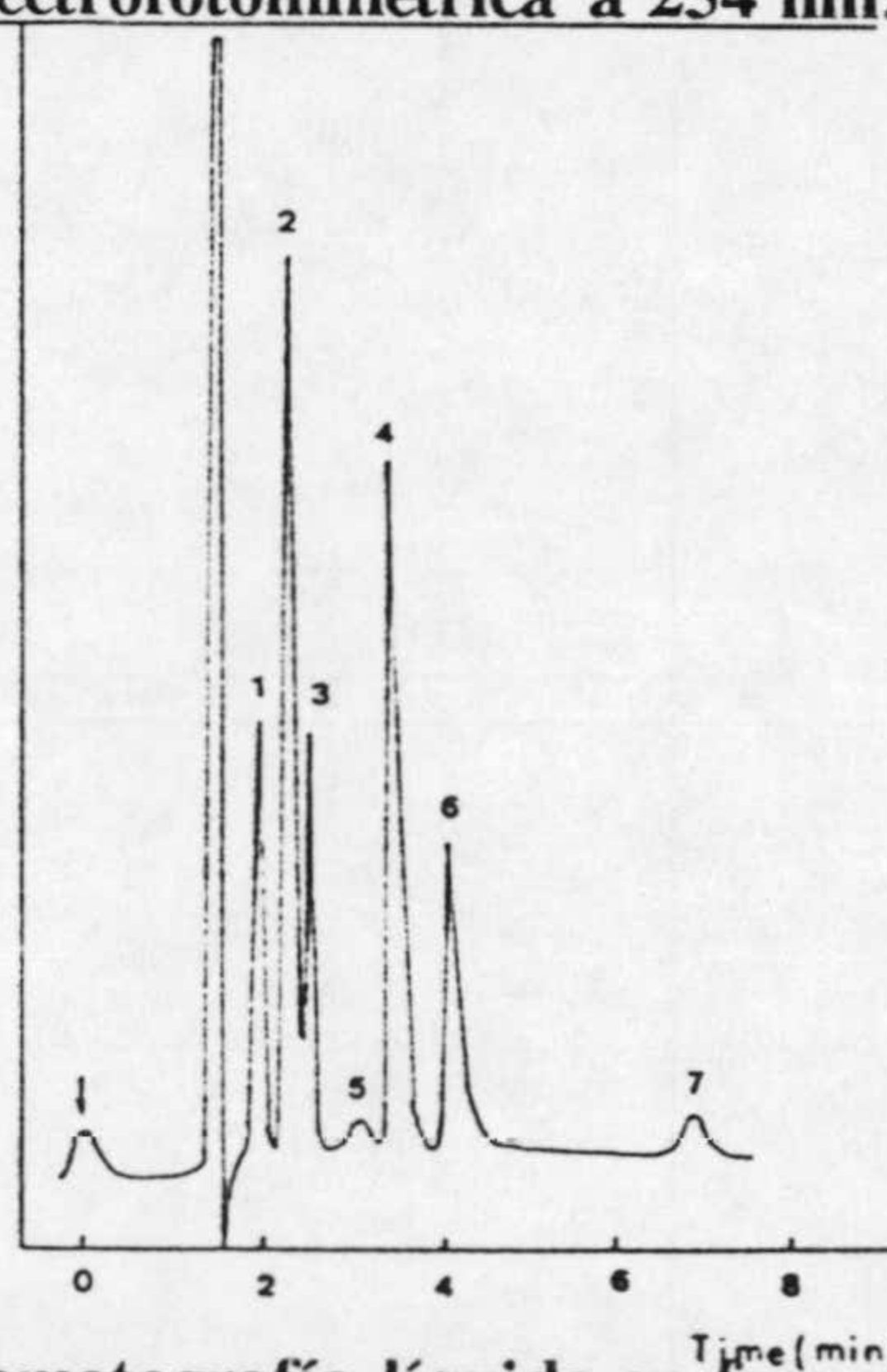


FIGURA 15. Separación mediante cromatografía líquida en fase normal de dietilditiocarbamatos de: (1) Cu; (2) Ni; (3) Hg; (4) Pb; (5) Co; (6) Mn; (7) Bi. COLUMNA: Hypersil,  $5 \mu\text{m}$ , ( $150 \times 4.6 \text{ mm}$ ); FASE MÓVIL: Benceno; FLUJO:  $1.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ . Detección espectrofotométrica a 280 nm.



## INTRODUCCIÓN

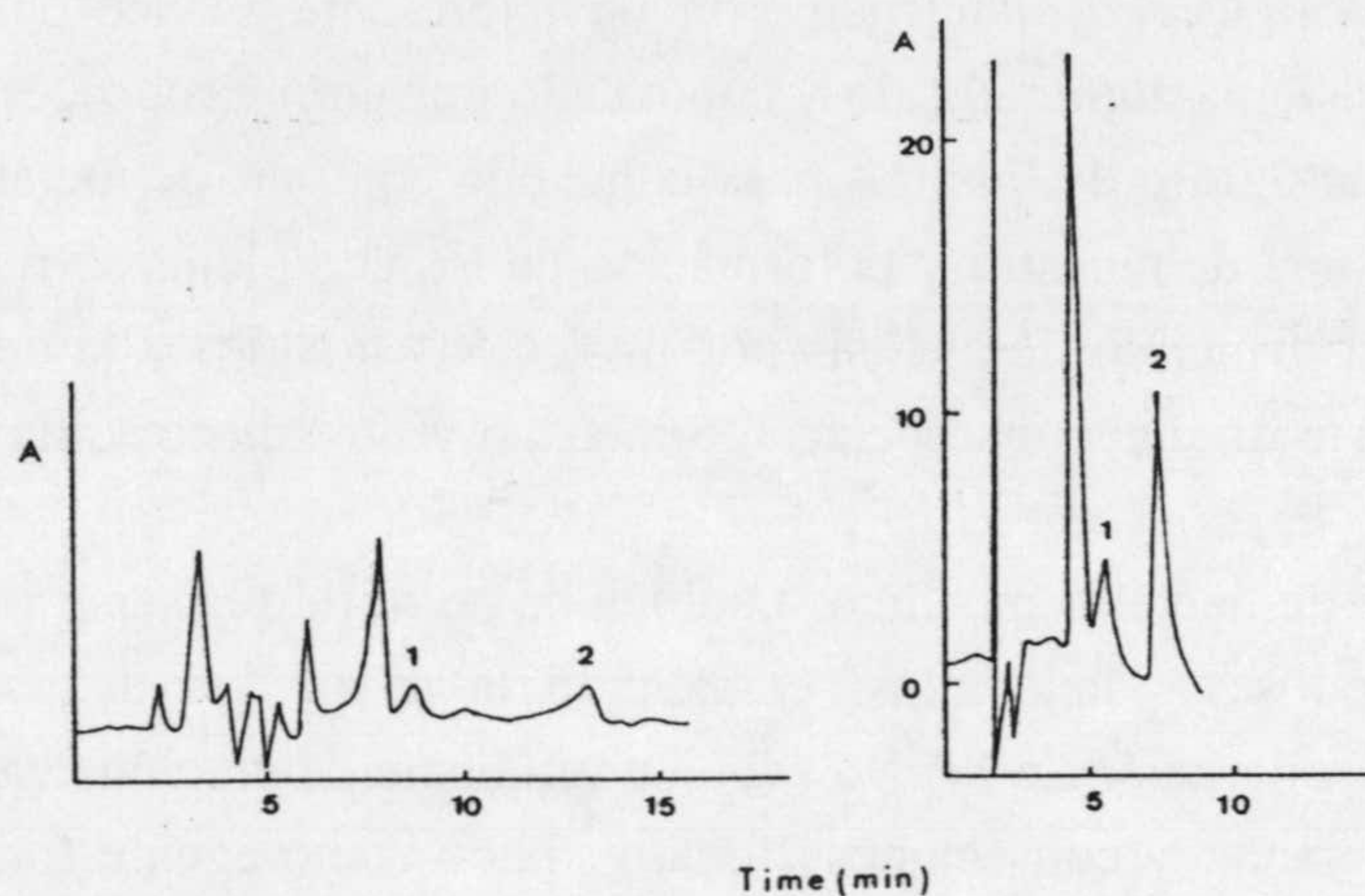


FIGURA 16. Determinación simultánea de Cr(III) y Cr(VI) en aguas residuales como ditiocarbamatos. CROMATOGRAMA A → COLUMNA: Lichrosorb RP-8, 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4.6 mm D.I.); FASE MÓVIL:  $\text{CH}_3\text{CN} + \text{H}_2\text{O}$ ; FLUJO: 1  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detección espectrofotométrica a 254 nm. ([Cr(III)] = 0.04 ppm, [Cr(VI)] = 0.07 ppm). CROMATOGRAMA B → COLUMNA:  $\mu\text{Bondapak C-18}$ , (300 x 3.9 mm D.I.); FASE MÓVIL:  $\text{CH}_3\text{CN} + \text{Tampón acetato } 0.02 \text{ M (pH = 5.5), } 5 \times 10^{-3} \text{ NaNO}_3$ ; FLUJO: 2  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detección electroquímica. ([Cr(III)] = 1.00 ppm, [Cr(VI)] = 0.05 ppm).

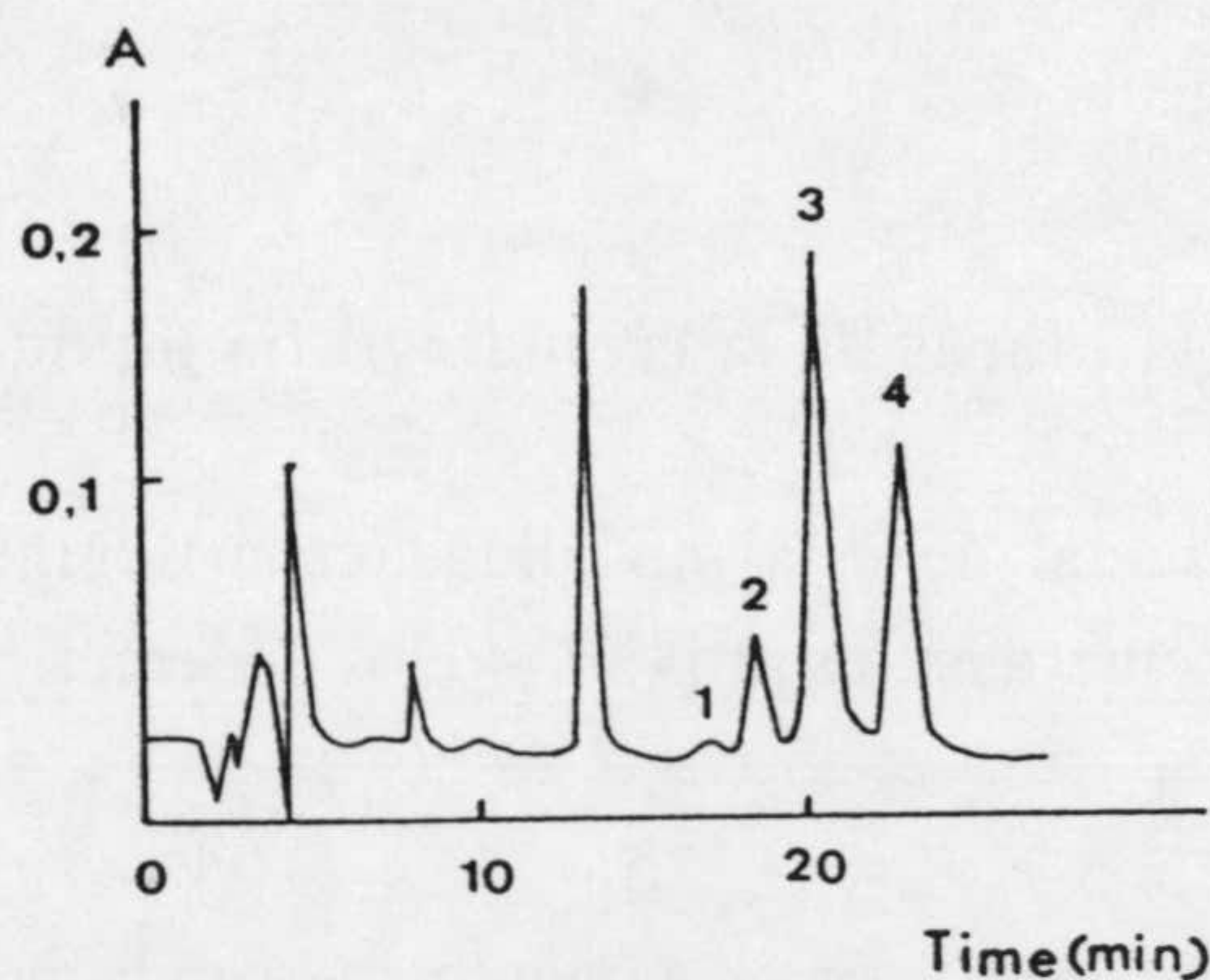


FIGURA 17. Cromatograma de una muestra de patrón "*Citrus leaves*". COLUMNA: Cosmosil  $\text{C}_{18}$ , 5  $\mu\text{m}$  (250 x 4.6 mm D.I.); FASE MÓVIL:  $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{CHCl}_3 + \text{disolución } 0.01 \text{ M de hexametileditiocarbamato de hexametilamonio}$ ; FLUJO: 0.8  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Detección espectrofotométrica a 260 nm. CATIONES: (1) Ni; (2) Pb; (3) Zn; (4) Cu.



## INTRODUCCIÓN

---

Bond y Wallace [248] introdujeron un interesante avance en la metodología con la propuesta de un sistema automatizado y controlado por un microprocesador, el cual se basa en el uso de un cromatógrafo de líquidos para la medida continua de metales pesados en muestras industriales. La toma de muestra y la formación de los complejos se realiza de forma continua de acuerdo con el principio de análisis por inyección en flujo, y la detección se lleva a cabo conectando en serie un detector espectrofotométrico y otro electroquímico.

La HPLC de quelatos metálicos también ha permitido la separación rápida (15-20 min.) y completa de todos los lantánidos, empleando la modalidad de pares iónicos, sobre una columna C<sub>18</sub>. La separación se lleva a cabo en gradiente de elución, variando la concentración del agente complejante, y con octanosulfonato sódico como agente formador de pares iónicos [249,250].

También se han determinado compuestos orgánicos a través de la formación de quelatos metálicos [251, 252-257], como la determinación de aminas en productos farmacéuticos. Entre los restantes campos de aplicación de esta modalidad cromatográfica, podemos citar el estudio de los mecanismos y cinéticas de las reacciones de formación de complejos, la investigación de sus propiedades físico-químicas en disolución y la separación e identificación de complejos de metaloproteínas [258].

### **Perspectivas actuales y futuras de la cromatografía líquida de complejos metálicos.**

La situación actual de esta modalidad cromatográfica, así como el desarrollo que probablemente experimentará en los próximos años podemos resumirlo en los siguientes puntos:

- Por una parte, es de esperar un aumento en la eficacia de las separaciones cromatográficas como consecuencia de las mejoras en el diseño de nuevas fases estacionarias, conteniendo partículas más pequeñas y más uniformemente empaquetadas, y del empleo de microcolumnas.



## INTRODUCCIÓN

---

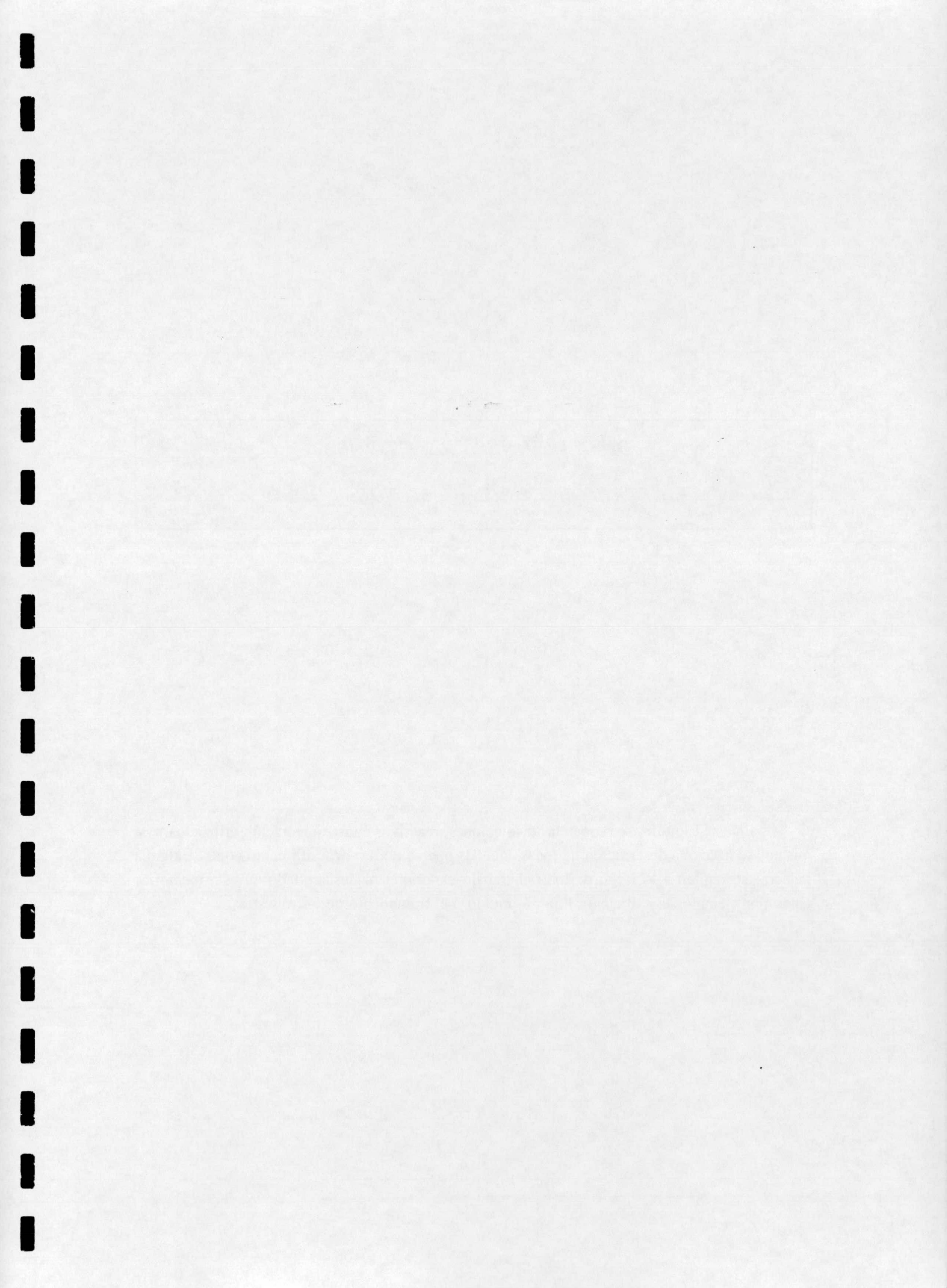
- La síntesis de adsorbentes conteniendo nuevos grupos funcionales incrementará la selectividad de la separación de quelatos. Asimismo el empleo de fases estacionarias polifuncionales incrementa los mecanismos de retención y con ello las posibilidades de separación.
- Si atendemos a los sistemas químicos objeto de estudio, está por determinar aún la potencialidad analítica de muchos agentes complejantes, entre ellos y por su relación con esta memoria, los ácidos hidroxámicos. Tampoco se ha explorado extensamente la utilización de la formación de aductos y complejos de ligando mixto [259].
- El desarrollo de equipos robotizados en los que se combina el análisis por inyección en flujo con la HPLC puede ser la base de sistemas de análisis en continuo.
- Finalmente, es previsible un aumento substancial de los trabajos en los que se analizan muestras reales, sin olvidar que los mecanismos de separación cromatográfica de quelatos metálicos están muy poco estudiados y que para ello se requerirá un esfuerzo conjunto de los químicos analíticos junto con especialistas en el campo de la adsorción y en la Química de superficies.



*CAPÍTULO I:*

*DISOLUCIONES, REACTIVOS,  
INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA*







*DISOLUCIONES, REACTIVOS,  
INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA*

En este capítulo, se reúnen las disoluciones, reactivos e instrumentación utilizados. Así mismo, se hace una descripción de todas aquellas operaciones o procedimientos que de alguna manera, se repiten a lo largo de todo el trabajo experimental desarrollado en esta memoria, como por ejemplo, la extracción líquido-líquido o el tratamiento de las muestras.



### I.1. DISOLUCIONES Y REACTIVOS.

- ★ **Disolución de V(V)** ▶ Se preparó una disolución madre de 1000 mg.l<sup>-1</sup> disolviendo 0.22966 g de NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub> (Merck, R.A. Darmstadt) en agua caliente y una vez enfriada se enrasó a 100 ml, previa adición de 1 ml de HNO<sub>3</sub> concentrado.

Otras disoluciones se obtuvieron por dilución de la anterior, añadiendo en cada caso, 1 ml de HCl concentrado por cada 100 ml de disolución.

- ★ **Disolución de Mo(VI)** ▶ Se preparó una disolución madre de 1000 mg.l<sup>-1</sup> disolviendo 0.9199 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> (Merck, R.A.) en 500 ml de agua bidestilada a la que previamente se había adicionado 1 ml de NH<sub>3</sub> concentrado.

Disoluciones de diversas concentraciones se obtuvieron por dilución de la anterior.

- ★ **Disolución de Ti(IV)** ▶ Se preparó una disolución de Ti(IV) de 400 mg.l<sup>-1</sup> por calentamiento de 0.2 g de óxido de titanio puro (Merck, R.A.) en un matraz Kjeldahl con 8.0 g de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 25 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Después de enfriada, la disolución resultante se enrasó a 250 ml previa adición de las porciones de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 5% (p/v), utilizadas en el lavado del matraz Kjeldahl.

Otras disoluciones se prepararon por dilución de la anterior.

- ★ **Disoluciones de N-Benzoil-N-fenilhidroxilamina (BPHA)** ▶ Las disoluciones de BPHA utilizadas se prepararon disolviendo las cantidades adecuadas del reactivo (Merck, R.A.) en cloroformo.

- ★ **Disoluciones de Acido 5,5'-metilendisalicilhidroxámico (MEDSHA)** ▶ La síntesis de este reactivo ya ha sido publicada previamente [I.1]; las disoluciones de MEDSHA utilizadas se prepararon de la siguiente manera:

Disoluciones en medio acuoso → Disolviendo las cantidades adecuadas del reactivo en NH<sub>3</sub> 0.1 M.

Disoluciones en Metanol → Disolviendo las cantidades adecuadas del reactivo en metanol calidad HPLC (PANREAC, Barcelona).



## CAPÍTULO I

---

- ★ HCl conc. (37%) R.A. (Merck).
- ★ HNO<sub>3</sub> conc. (65%) R.A. (PANREAC).
- ★ HClO<sub>4</sub> conc. (70%) R.A. (PANREAC).
- ★ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc. (98%) R.A. (PANREAC).
- ★ NH<sub>3</sub> conc. (30%) R.A. (Carlo Erba, Milán).
- ★ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, P.A. (PANREAC).
- ★ Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, P.A. (Merck).
- ★ Cloroformo R.A. (PANREAC).
- ★ Metilisobutilcetona (MIBK) R.A. (PANREAC).
- ★ H<sub>2</sub>O bidestilada.
  
- ★ Disolventes "calidad HPLC":
  - \* Cloroformo (estabilizado con etanol) (PANREAC).
  - \* Cloroformo (estabilizado con amileno) (MERCK).
  - \* Metanol (PANREAC).
  - \* 1,4 Dioxano (PANREAC).



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

- \* Diclorometano (PANREAC).
- \* Tolueno (PANREAC).
- \* n-Hexano (Carlo Erba).
- \* Ácido acético (PANREAC).
- \* H<sub>2</sub>O desionizada, mediante un sistema Milli-Q Plus 185 (Millipore, Irlanda).

★ **Disoluciones para el estudio de interferencias.**

Se prepararon a partir de sales de calidad Merck, R.A. con una concentración de 1 g/l referida al ión correspondiente.

En la siguiente tabla se reúnen las sales utilizadas para la preparación de las disoluciones de dichos iones:



## CAPÍTULO I

TABLA I.1. Sales utilizadas para la preparación de las disoluciones de iones interferentes.

Ión	Sal empleada	Ión	Sal empleada
AcO <sup>-</sup>	NaAcO.3H <sub>2</sub> O	Mg(II)	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
Al(III)	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	Mn(II)	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O
As(III)	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	KMnO <sub>4</sub>
As(V)	Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	Mo(VI)	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>
Ba(II)	Ba(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Na(I)	NaCl
Be(II)	BeSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	Ni(II)	Ni(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
Bi(III)	Bi(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O	Pb(II)	Pb(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
BO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> .10H <sub>2</sub> O	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O
Br <sup>-</sup>	NaBr	Rb(I)	RbNO <sub>3</sub>
C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Sb(III)	SbCl <sub>3</sub>
Ca(II)	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	Se(IV)	Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>
Citrato	Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sn(IV)	SnCl <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	KClO <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O
Co(II)	Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Tartrato	NaKC <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub> .4H <sub>2</sub> O
Cr(III)	Cr(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	Ti(IV)	TiO <sub>2</sub>
Cs(I)	CsCl	Tl(I)	TlNO <sub>3</sub>
Cu(II)	Cu(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	Tl(III)	TlCl <sub>3</sub>
F <sup>-</sup>	NaF	U(VI)	UO <sub>2</sub> (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
Fe(III)	Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	V(V)	NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>
Hg(II)	Hg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	W(VI)	Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
I <sup>-</sup>	KI	Zn(II)	Zn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O
K(I)	KCl	Zr(IV)	Zr(NO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O
Li(I)	LiNO <sub>3</sub>		

### I.2. INSTRUMENTACION Y MATERIAL.

Para la realización de las experiencias descritas en esta memoria se utilizaron la instrumentación y material señalados a continuación:



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

### I.2.1. INSTRUMENTACIÓN.

- ☐ Estufa HERAEUS.
- ☐ Molinillo eléctrico MOULINEX modelo 505.
- ☐ Horno de mufla HERÓN.
- ☐ Baño de arena SELECTA.
- ☐ Placa calefactora/agitadora SELECTA modelo AGIMATIC-N.
- ☐ Agitador vibratorio de matraces VIBROMATIC modelo 384.
- ☐ Centrífuga BHG, Mod. FIXETTE II.
- ☐ Termostato-criostato Braun-Melsungen FRIGOMIX U.
- ☐ Espectrofotómetro UV-VIS BECKMAN HIGH PERFORMANCE DU-8B equipado con células de cuarzo de 1 cm de paso de luz.
- ☐ Espectrofotómetro UV-VIS SPECTRONIC 2000 equipado con células de cuarzo de 1 cm de paso de luz.
- ☐ Espectrofotómetro de Absorción Atómica PERKIN ELMER modelo 2380, equipado con:
  - Lámpara de cátodo hueco de vanadio y con un quemador para óxido nitroso acetileno de 5-6 cm de rendija. Las condiciones operatorias utilizadas -ajustadas para obtener la máxima absorban-  
cia- fueron: *Flujo de gases* → 12 l.min<sup>-1</sup> para N<sub>2</sub>O y 3.9 l/min para C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; *I<sub>Lámpara</sub>* → 35 mA; *λ<sub>trabajo</sub>* → 318.4 nm y *Rendija* → 0.7 nm.
  - Lámpara de cátodo hueco de molibdeno y con un quemador para óxido nitroso acetileno de 5-6 cm de rendija. Las condiciones



## CAPÍTULO I

---

operatorias utilizadas -ajustadas para obtener la máxima absorban-  
cia- fueron: *Flujo de gases*  $\rightarrow$  12 l.min<sup>-1</sup> para N<sub>2</sub>O y 3.9 l.min<sup>-1</sup> para  
C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>; *I<sub>Lámpara</sub>*  $\rightarrow$  25 mA;  *$\lambda$ <sub>trabajo</sub>*  $\rightarrow$  313.3 nm y *Rendija*  $\rightarrow$  0.7 nm.

- ☐ **Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HEWLETT-PACKARD serie 1050,**  
equipado con:

**Detector UV-VIS de longitud de onda variable.**

**Inyector manual RHEODYNE 7125 con un bucle de 20  $\mu$ l.**

**Integrador HEWLETT-PACKARD modelo 3396-A.**

**Microjeringa HAMILTON para HPLC, modelo 1810 RNE, con 100  $\mu$ l de  
capacidad.**

**Columnas:**

- Kit Merck dotado de cartucho Superspher Si 60, 250-4 (244x4 mm d.i.) de 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, acoplado a una precolumna (10x4 mm) empaquetada con la misma fase estacionaria y de 10  $\mu$ m de tamaño de partícula.

- Kit Alltech dotado de cartucho S5-CN, 250-4 (250x4.6 mm D.I.) de 5  $\mu$ m de tamaño de partícula, acoplado a un portaprecolumnas ALLTECH equipado con una precolumna (10x4.6 mm) empaquetada con la misma fase estacionaria.

- Columna Polyspher<sup>R</sup> RP<sup>18</sup> empaquetada con material polimérico covalentemente derivatizado con grupos funcionales C<sub>18</sub>, de dimensiones 150-4,6 (150x4.6 mm D.I.) acoplada a un portaprecolumnas Merck equipado con una precolumna (20x4.6 mm) empaquetada con la misma fase estacionaria.

### I.2.2. MATERIAL.

- ☐ **Kit de filtración de disolventes MILLIPORE de 47 mm de diámetro.**



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

- ☐ Filtros de membrana MILLIPORE FG FGLP04700 hidrofóbicos con trama, de 0.20  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtración de disolventes orgánicos.
- ☐ Filtros de membrana MILLIPORE FH FHUP04700 sin trama, de 0.5  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtración de metanol.
- ☐ Filtros de membrana MILLIPORE HA HAWP04700 sin trama, de 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, para filtración de agua y disoluciones acuosas.
- ☐ Filtros desechables ANOTOP, (Merck) de 0.2  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro para filtración de muestras.
- ☐ Jeringa HAMILTON modelo 1010 TLL luer tip para filtración de muestras, con 10 ml de capacidad.
- ☐ Cromatoplasmas TLC 20x20 cm de Silicagel 60 (Merck).
- ☐ Aplicador para Cromatografía en Capa Fina modelo 10226 (Merck).
- ☐ Papel ALBET para análisis gravimétrico.
- ☐ Papel WHATMAN n° 40 para filtración.
- ☐ Camisas de vidrio, refrigeradas con  $\text{H}_2\text{O}$  y conectadas a un termostato, para el control de la temperatura de las columnas.

### I.3. MUESTRAS ANALIZADAS.

Para comprobar la validez de los métodos desarrollados en la presente Memoria se han analizado las siguientes muestras:



## CAPÍTULO I

---

- ⊗ Tejido de "Concha fina" o "almeja malagueña" (*Citterea s.p.*) en la determinación cromatográfica de Vanadio.
  
- ⊗ Lentejas (*Herbum nonatum*),
- ⊗ Batido dietético,
- ⊗ Complejo vitamínico, y
- ⊗ Fertilizante sólido en la determinación cromatográfica de Molibdeno.
  
- ⊗ Agua sintética, en la determinación cromatográfica conjunta de Vanadio y Molibdeno.
  
- ⊗ Pastillas de chocolate, y
- ⊗ Cápsulas de gelatina dura, en la determinación cromatográfica de Titanio.

### I.4. METODOLOGÍA

#### I.4.1. METODOLOGÍA DE LA EXTRACCIÓN LÍQUIDO-LÍQUIDO.

Todos los procesos de extracción líquido-líquido realizados en este trabajo experimental, se han desarrollado de la siguiente manera:

En matraces aforados de 100 o 250 ml, según el caso, se introducen:



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

### *Fase acuosa*

- Un volumen preciso de disolución de analito, procedente de una disolución patrón o de una muestra a analizar.
- El agua bidestilada necesaria para alcanzar el volumen final correspondiente de fase acuosa (25 ó 100 ml, según el caso).
- El volumen necesario de ácido clorhídrico para obtener la concentración adecuada del mismo.

### *Fase orgánica*

- El volumen adecuado de disolución clorofórmica de BPHA.

En todos los casos, los matraces se agitan durante el tiempo recomendado, decantándose y separándose las fases. La fase orgánica se agita con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se centrifuga y, una vez filtrada, está lista para ser inyectada en el cromatógrafo, o en su caso, para medirla espectrofotométricamente.

### I.4.2. METODOLOGÍA CROMATOGRÁFICA.

\* Previamente a cada sesión de trabajo, se preparaban las disoluciones que se iban a utilizar en la composición de la fase móvil, las cuales eran filtradas y desgasificadas.

\* Asimismo, antes de cada sesión de trabajo o experiencia, se sometía la columna a un *proceso de equilibración con la fase móvil correspondiente* hasta obtener una **línea base**



suficientemente estable

\* Periódicamente, la columna se sometía a un proceso de lavado, de acuerdo con su naturaleza y siguiendo los protocolos descritos en bibliografía para tal fin [2-4].

## **I.5. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.**

### **I.5.1. ASPECTOS METODOLOGICOS DE LA DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE TRAZAS METÁLICAS EN MUESTRAS CON MATRIZ FUNDAMENTALMENTE ORGANICA**

Los problemas metodológicos y experimentales que plantea la determinación de elementos metálicos en este tipo de muestras, radican primordialmente en el hecho de que los niveles en los que éstos se encuentran son bajos.

El mayor obstáculo consiste en la eliminación de los errores sistemáticos que se pueden presentar durante la etapa de preparación de la muestra.

#### **Preparación de las muestras**

La preparación de las muestras para análisis implica dos etapas:

1. Tratamiento físico.
2. Tratamiento químico.



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

### 1. Tratamiento físico de la muestra.

#### \* Alimentos

En general, la composición de los alimentos se presenta, desde el punto de vista nutricional y dietético, en relación con el "alimento fresco". Sin embargo, desde el punto de vista analítico y considerando que en la mayoría de los casos la muestra original presenta altos niveles de agua, se recomienda para su análisis el secado de la misma, el cual se realiza en una estufa u horno a una temperatura entre 70-110 °C hasta pesada constante. De esa forma se pueden presentar los resultados del análisis, bien en relación al peso de muestra húmeda (Base húmeda o alimento fresco), o bien, como es habitual por ser mucho más preciso, en relación al peso de muestra "seca" (Base seca).

El tratamiento físico de los alimentos estudiados en esta memoria se llevó a cabo tomando un peso adecuado del alimento a analizar, desecándolo en una estufa a 110 °C hasta pesada constante y procediéndose a su homogeneización mediante trituración hasta obtención de un polvo fino.

#### \* Otras muestras.

Las restantes muestras se trataron de forma similar a los alimentos (trituración para muestras sólidas de tamaño de partícula grande y/o desecación a 110 °C), salvo en los casos de las muestras de: Complejo vitamínico, Agua sintética y Cápsulas de gelatina dura, las cuales, por su naturaleza se utilizaron sin someterlas a ningún tratamiento físico.

### 2. Tratamiento químico de la muestra.

#### \* Alimentos.

Generalmente, el contenido metálico de los alimentos no puede determinarse, salvo contadas excepciones, sin la eliminación previa de la materia orgánica, que suele realizarse mediante un procedimiento que implique su oxidación.



## CAPÍTULO I

---

La revisión bibliográfica realizada sobre la determinación de metales en alimentos y bebidas [5,6], indica que los métodos más utilizados para la destrucción de la materia orgánica, pueden agruparse en dos tipos:

- 1) Métodos que implican la destrucción de la materia orgánica mediante incineración o "*vía seca*".
- 2) Métodos que implican la destrucción de la materia orgánica del alimento por "*vía húmeda*" o *digestión*.

La elección del método debe realizarse, en función del metal a determinar y de la naturaleza del alimento a analizar.

### 1) Incineración.

Excepto para la determinación de elementos volátiles como Hg y As, este tipo de tratamiento se recomienda por la A.O.A.C. Official Methods [7], para la oxidación de la materia orgánica en el análisis de la mayoría de los metales, ya que permite la utilización de porciones de muestra mayores que los métodos por vía húmeda y evita el peligro de contaminación de las muestras que pudiera conllevar la adición de reactivos.

Se realiza a temperaturas elevadas que oscilan entre 400 y 600 °C, aunque la temperatura y duración de la combustión deben programarse en función del elemento metálico a analizar, evitando, en cualquiera de los casos, las posibles pérdidas por volatilización o combinación con el material constituyente del crisol soporte del ataque. Hay que tener en cuenta además que un calentamiento excesivo puede dar lugar en algunos casos, a la necesidad de un tratamiento posterior por vía húmeda debido a la formación de especies insolubles.



### 2) Digestión de la materia orgánica por vía húmeda.

Este tipo de tratamiento es considerado por la mayoría de los autores, como un procedimiento "Más adecuado" que el comentado en el apartado anterior, ya que la oxidación por vía húmeda es aplicable a una gran variedad de materiales, y da lugar a pérdidas menores por volatilización, aunque frente al procedimiento de incineración presenta las desventajas de tener que utilizar volúmenes de reactivos relativamente elevados y necesitar una vigilancia continua durante el proceso de ataque.

Los agentes oxidantes más utilizados para este fin, son los ácidos concentrados como nítrico y sulfúrico solos, o bien las mezclas de estos:

- a) Nítrico : Sulfúrico.
- b) Nítrico : Sulfúrico : Perclórico.
- c) Nítrico : Perclórico.
- d) Sulfúrico : Perclórico.

En aquellos casos en los que la digestión implica la utilización del ácido nítrico, se recomienda el empleo de una mezcla de éste con otro ácido, ya que la utilización de ácido nítrico sólo, no suele ser suficiente para la destrucción completa de la matriz orgánica. Por este motivo es más frecuente utilizar las mezclas ácidas citadas anteriormente, con objeto de asegurar la finalización del proceso oxidativo. La mezcla nítrico : perclórico permite, a pesar del peligro que supone la utilización de este último, la reducción del volumen de ácido a utilizar y la obtención de disoluciones totalmente transparentes al final del tratamiento.

*Middlenton y Stuckey* [8], proponen un método en el que la digestión se realiza en baño de arena o placa calefactora con mezclas de ácidos, llevando a sequedad y repitiendo nuevamente el proceso por adición de ácido nítrico, hasta la obtención de un residuo salino, generalmente de color blanco. Este método, es



## CAPÍTULO I

---

particularmente aplicable a muestras de origen animal o que presenten un contenido graso elevado, aportando la ventaja de no requerir una supervisión constante.

Una vez realizada la incineración, o la digestión por vía húmeda, suele obtenerse un residuo salino que en la mayoría de los casos se disuelve en HCl 1:1 (v/v) o HCl 0.1 N. Si este proceso de solubilización origina residuos insolubles, puede ser además necesaria una filtración, acompañada de una disgregación de dichos residuos.

En este punto, cabría comentar los siguientes aspectos relacionados con los elementos que se han determinado:

*La revisión bibliográfica realizada sobre los tratamientos químicos seguidos por diferentes autores [9-10], para la determinación de vanadio en muestras de alimentos o muestras biológicas en general, i.e. sangre, hígado, riñones etc. sólo aporta un hecho significativo en relación a los métodos generales antes comentados, consistente en la adición a la disolución de las muestras, de pequeñas cantidades de un agente oxidante para asegurar que el elemento se encuentre en el estado de oxidación adecuado para su determinación. En nuestro caso, se añaden unas gotas de  $\text{KMnO}_4$  0.1 N para transformar todo el vanadio en V(V), puesto que dicho estado de oxidación es el único que reacciona con los agentes quelantes utilizados (BPHA y MEDSHA).*

*En el caso del titanio, el ataque de las muestras lleva a la obtención de un residuo blanco, formado básicamente por  $\text{TiO}_2$ , el cual requiere un tratamiento posterior para su total disolución. Se ha adaptado el procedimiento propuesto por Menon y col. [11] y descrito en el siguiente apartado.*



## INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

---

### I.5.2. TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS ANALIZADAS EN ESTA MEMORIA.

#### \* Alimentos.

Dada la naturaleza compleja de las matrices que presentaban las muestras analizadas, en casi todos los casos fué necesaria la utilización de un tratamiento químico para la eliminación de la matriz orgánica.

El procedimiento operatorio seguido de forma general en todos los casos, con las modificaciones particulares según el tipo de ión, se describe a continuación.

Se pesa la cantidad adecuada previamente desecada a 110 °C hasta pesada constante y triturada hasta tamaño de partícula muy fino para asegurar su total homogeneización.

A continuación, se coloca en un vaso de precipitado con suficiente capacidad para evitar las posibles pérdidas que se puedan ocasionar durante el tratamiento, por ejemplo, por la formación de espuma. Se le añade un volumen de HNO<sub>3</sub> conc. (65%) suficiente para cubrirla completamente y se coloca en un baño de arena a temperatura elevada. Se repone el nítrico consumido, por sucesivas adiciones de pequeños volúmenes de éste, hasta que se observe el cese de la formación de espuma. Se lleva a sequedad y entonces se agrega un volumen -dependiendo del tipo de muestra- de HClO<sub>4</sub> concentrado (70%), repitiendo la operación dos veces y llevando en cada caso a sequedad. Se obtiene un **residuo blanco**, sobre el que se opera convenientemente dependiendo del elemento metálico a determinar:

- En el caso de la determinación de vanadio (en la almeja malagueña, *Citterea s.p.*), dicho residuo se disuelve en 11.8 ml de ácido clorhídrico 0.5 M y se calienta. Una vez disuelto, se añaden 13.2 ml de ácido clorhídrico concentrado para hacer el medio 6 M en dicho ácido y se extrae el hierro contenido en la disolución con dos porciones de 5 ml cada una, de metil isobutil cetona [13] A continuación, la fase acuosa se lleva a sequedad y el residuo se disuelve en 16.2 ml de ácido clorhídrico 0.5 M calentando. Una vez frío, se le añaden unas gotas de KMnO<sub>4</sub> 0.01 N hasta permanencia del color rosa, y a partir de este punto, se utiliza el procedimiento operatorio propuesto.



## CAPÍTULO I

---

- En el caso de la determinación de molibdeno, el residuo blanco una vez frío, se disuelve en 5 ml de clorhídrico 0.5 M. La disolución obtenida se calienta a ebullición y si queda algún resto insoluble se filtra a través de un papel Whatman nº 40, lavando el filtro con clorhídrico 0.5 M y recogiendo las aguas de lavado junto con el primer filtrado. Finalmente se enrasa a un volumen de 100 ml con dicho ácido y se procede a la determinación del contenido en el analito según el método propuesto.

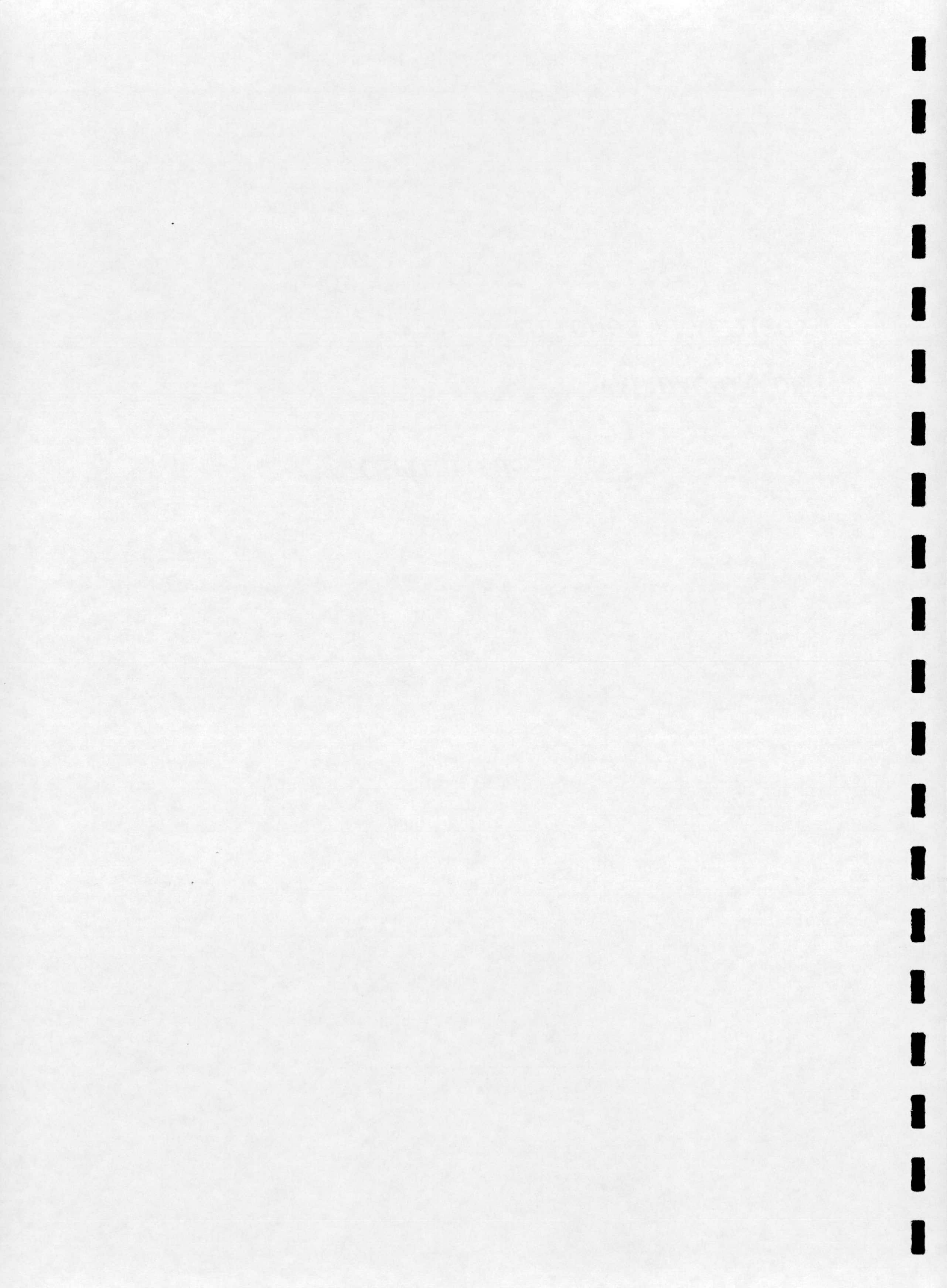
- En el caso de la determinación de titanio, al residuo blanco, una vez frío, se le adicionan 25 a 30 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 100 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. colocándose en una placa calefactora a temperatura elevada hasta completa disolución. Se concentra hasta un volumen aproximado de 25 ml y se lleva a un volumen final de 250 ml con agua bidestilada.

\* Otras muestras.

El resto de las muestras analizadas fueron sometidas a diferentes tratamientos de acuerdo con su naturaleza, así para las muestras no alimentarias de naturaleza fundamentalmente orgánica, se siguió el procedimiento descrito en el apartado anterior, teniendo en cuenta los comentarios realizados para la determinación de cada elemento.

En el caso de las muestras de matriz inorgánica (agua sintética) no se sometieron a tratamiento.



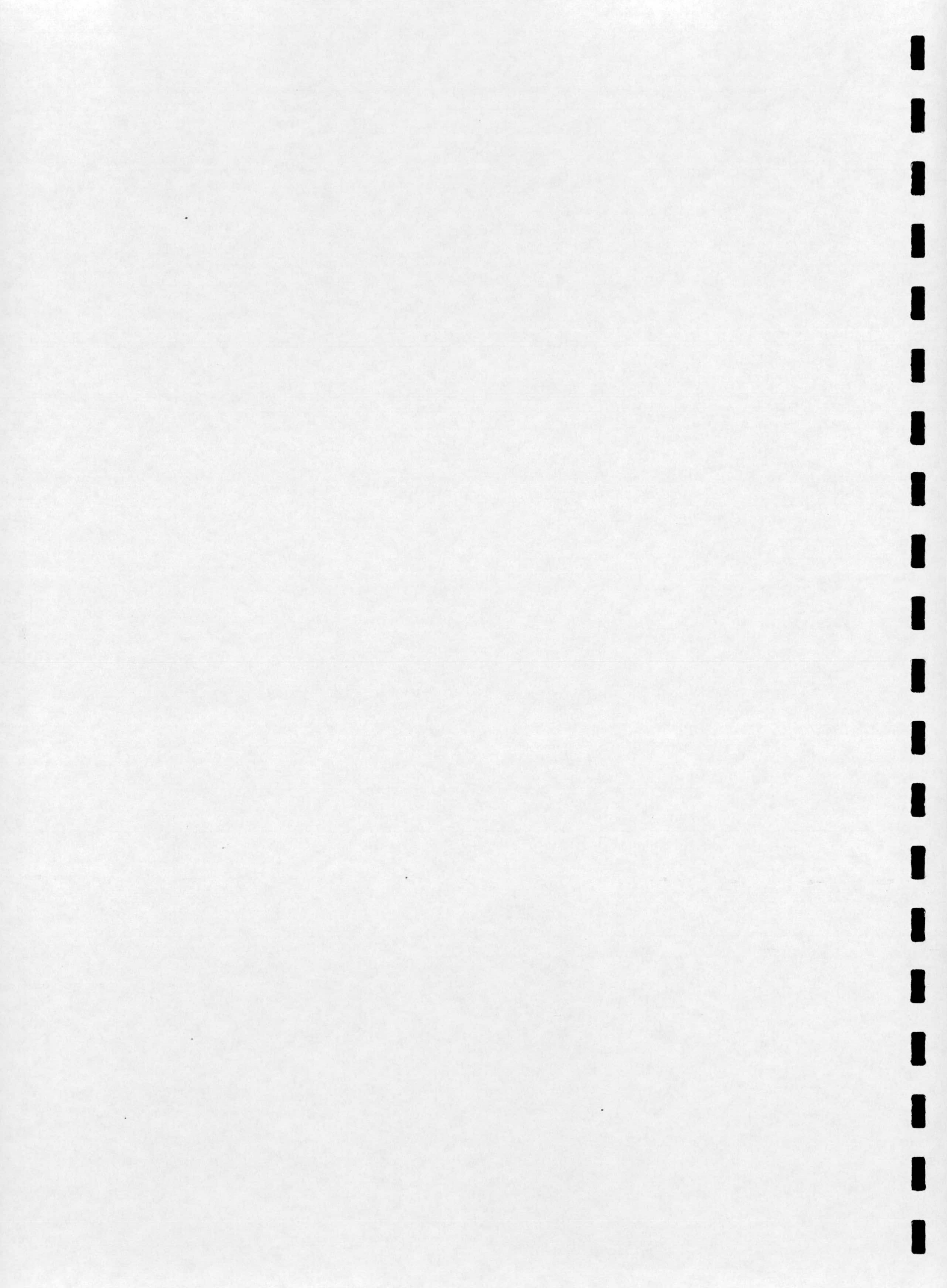




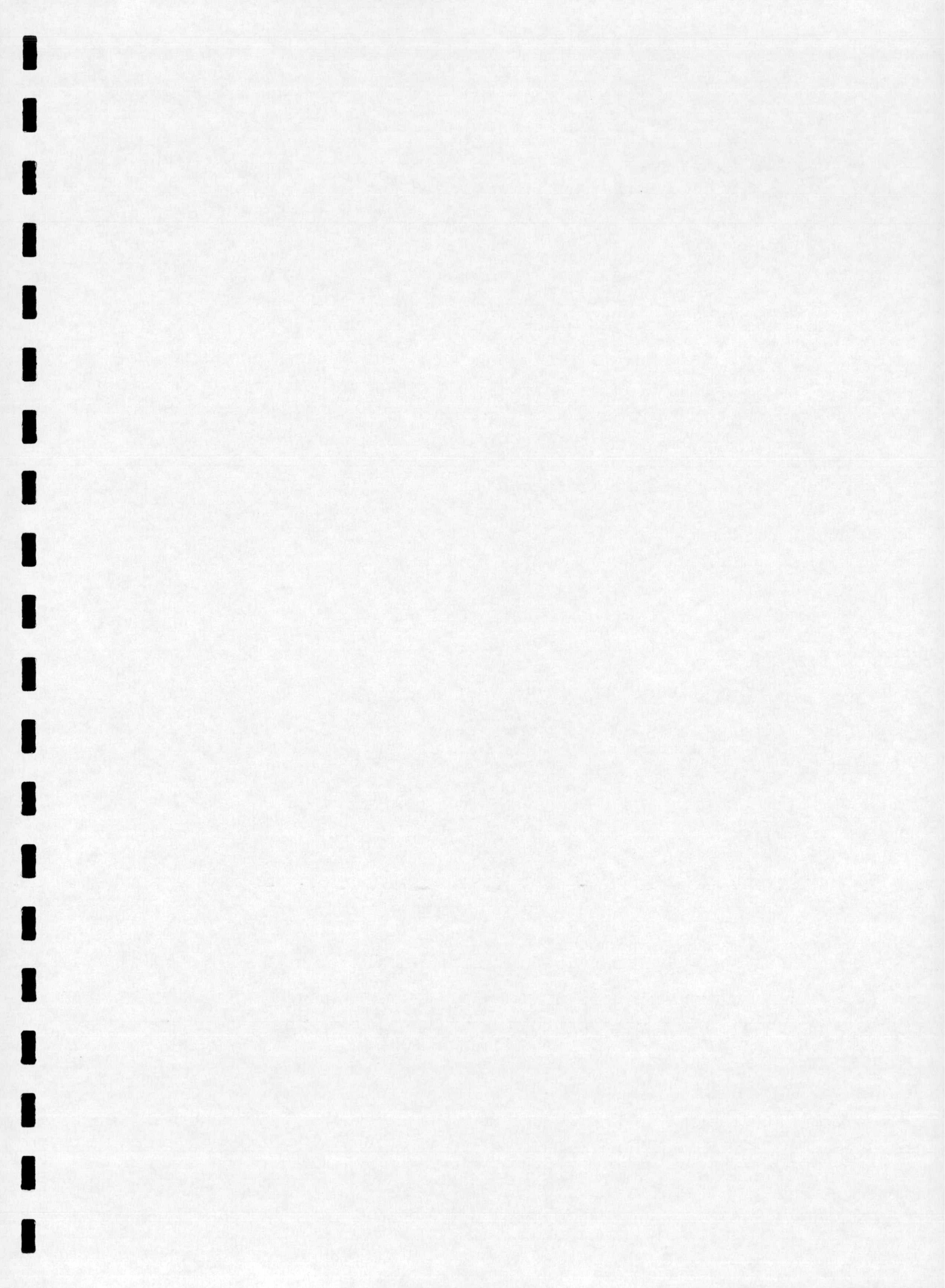
*CAPÍTULO II:*

*VALIDACIÓN DE  
MÉTODOS ANALÍTICOS*











## *VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS*

Según Dols y Armbrecht [1], dado el actual desarrollo de la literatura analítica, ha aumentado la dificultad para comparar, sin ambigüedad, los méritos y deficiencias de los métodos publicados, y para realizar convenientemente la elección de un método analítico concreto que permita resolver un problema determinado. Establecen dos posibles causas para esta situación:

- 1.- La utilización de diferentes criterios para definir, determinar y expresar las características cuantitativas de un método.
- 2.- Fuerte variación en la naturaleza y profundidad de la investigación de un trabajo a otro.



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

Para resolver estos problemas, hay varios atributos fundamentales que son comunes a todos los métodos analíticos, y que definiéndose de forma universal, se pueden utilizar experimentalmente para obtener resultados útiles y poco ambiguos en su interpretación.

Según Rius [2], **validar** un método de análisis, consiste en verificar y documentar su adecuación a unos determinados requisitos establecidos por el usuario. Estos requisitos, reciben el nombre de *parámetros de calidad* ("figures of merit" o "performance characteristics") y pueden ser de tipo estadístico/quimiométrico o de tipo operativo/económico. Dentro del primer grupo, entre los primeros (estadísticos), figuran los parámetros fundamentales de **exactitud y precisión** y entre los segundos (quimiométricos) **selectividad, sensibilidad, límites del método o robustez**. No cabe duda que para verificar la calidad de un método, el usuario debe definir previamente los parámetros de calidad en los que está interesado. Dado que es prácticamente imposible lograr valores elevados para todos ellos simultáneamente, debe llegarse a un compromiso entre los mismos [3-5].

Los métodos analíticos quedan descritos completamente, según Garcés y col. [6], por los siguientes parámetros de calidad:

**-Criterios de fiabilidad (estadístico/quimiométricos)**

- Exactitud
- Precisión
- Sensibilidad
- Selectividad/especificidad
- Límite de detección

**- Criterios de practicabilidad (operativo/económicos)**

- Velocidad
- Coste
- Habilidad del operador
- Fiabilidad mecánica
- Seguridad del laboratorio

Horwitz [7], considera "científicas" las características de fiabilidad, ya que son de gran importancia para propósitos de investigación, teniendo en cuenta que las características de



## CAPITULO II

---

practicabilidad, determinarían la buena realización de un método y aunque son importantes para operaciones legales de conformidad y vigilancia, serían de importancia secundaria para propósitos de investigación. Este mismo autor,[8] añade otra característica a las dos anteriores, ya que desde su punto de vista, los métodos analíticos deben tener **aplicabilidad** para una amplia gama de muestras. Nosotros, sólo nos vamos a referir a los parámetros de calidad fundamentales (desde el punto de vista de la investigación), para validar un método analítico.

### II.1. PARÁMETROS DE CALIDAD DE UN MÉTODO ANALÍTICO

#### II.1.1. EXACTITUD

El concepto de **exactitud**, se refiere a la similitud entre el valor estimado y el valor verdadero de la concentración de analito de una muestra. Evaluar la exactitud consiste pues, en estimar la concentración de analito en una muestra y compararla con el valor realmente existente, mediante el procedimiento estadístico adecuado. Sin embargo, aquí se plantea un problema y es conocer el valor verdadero. Dado que éste no es real, nunca podremos saber si un resultado es *exacto* o no, en el sentido estricto del término. En la realidad, lo que se evalúa es la similitud entre el valor obtenido y el valor considerado como verdadero, dada la imposibilidad de conocer el valor real. Para ello, se recurre al uso de materiales de referencia, participación en ejercicios interlaboratorios, utilización de métodos de referencia o práctica de otras técnicas de diverso valor, dentro de la escala de calidad [9]. En la práctica, evaluamos el hecho de que nuestro procedimiento conduce a resultados exactos para ciertas muestras. Si la comprobación resulta positiva, trasladamos la exactitud del procedimiento a las muestras problema. Para soslayar los problemas de tipo filosófico que plantean los términos exacto y verdadero, aparece el concepto de *trazabilidad*, concepto que se relaciona con la propiedad de establecer los vínculos adecuados entre nuestros resultados y la referencia o patrón adecuados, ya que un resultado por si solo no tiene mucho valor, si no se acredita su conexión (i.e. se establece la traza) con una referencia acreditada. En análisis químico, la trazabilidad se realiza mediante el uso de materiales de referencia certificados y el empleo de todas aquellas otras técnicas diseñadas al efecto [10]. Es evidente por tanto, que determinar la trazabilidad a un valor verdadero convencionalmente establecido, es la misma operación que evaluar la exactitud



de nuestro procedimiento. La ventaja de utilizar este lenguaje más ajustado a la norma, radica en eliminar palabras comprometidas tales como exacto y exactitud, pues su empleo puede sugerir que se admite una verdad absoluta.

### II.1.2. PRECISION

Al efectuar determinaciones repetidas sobre un mismo material, los resultados obtenidos se distribuyen alrededor de un valor medio, de manera que la dispersión de los resultados da una idea de la precisión, que es uno de los criterios más utilizados para medir la calidad de un método analítico. Según Horwitz, [7] **precisión es la estimación de la variabilidad de las medidas**. La precisión es un término que debe manejarse con cuidado, debido a que hay diferentes precisiones. Siempre que hay una fuente de variabilidad, hay una precisión asociada con ella.

Cuanto menor es la variabilidad, mayor es la precisión. Las dos medidas extremas que definen la variabilidad son: la repetibilidad (mínima variabilidad) y la reproducibilidad (máxima variabilidad). Existen numerosas definiciones de la palabra **precisión**. [6]

Nosotros vamos a utilizar la que nos parece más adecuada: *La precisión como parámetro de calidad en análisis, puede describirse cualitativamente como la cantidad medida por la dispersión de resultados cuando un procedimiento analítico, se repite en una muestra. Esta dispersión de resultados puede deberse a varias causas, aunque normalmente sólo se tienen en cuenta las fluctuaciones debidas al azar, suponiendo la distribución normal de los valores respecto a la media [4]. Su evaluación se establece como la concordancia general entre los resultados del análisis de la misma muestra entre laboratorios (**Reproducibilidad**) o dentro de un sólo laboratorio (**Repetibilidad**).*

**Repetibilidad** o precisión intralaboratorio es la expresión de la precisión, cuando el mismo operador aplica el método sobre la misma muestra, en el mismo laboratorio, con los mismos aparatos y reactivos y en el curso de la misma serie de análisis. [11]

En esta memoria, se ha evaluado la precisión en relación con :

- a) Repetibilidad de la inyección
- b) Repetibilidad del método propuesto:
  - b.1. A partir de los datos de calibrado
  - b.2. A partir de la inyección de **n** extracciones sucesivas.



## CAPITULO II

---

c) Repetibilidad del método propuesto aplicado a una muestra.

a) Para estudiar la repetibilidad de la inyección, se analizó la variabilidad de la respuesta de un único extracto orgánico en "n" inyecciones sucesivas.

b) Para evaluar la repetibilidad del método propuesto se procedió de dos formas diferentes:

b.1. A partir de los datos de calibrado, y de acuerdo con el protocolo establecido por Cuadros y col. [12] para obtener los parámetros de calidad del método propuesto, la evaluación de la precisión se realizó a partir de los datos obtenidos representando C.V.(c) vs c para las concentraciones ensayadas.

b.2. Evaluando la precisión del método propuesto desde la preparación de una disolución patrón hasta la obtención de la señal instrumental, es decir, analizando la variabilidad de respuesta obtenida en "n" extracciones de una disolución patrón.

c) Según el tipo de muestra:

c.1. Si no hay efecto matriz, mediante "n" inyecciones de la muestra sometida al método propuesto.

c.2. Si existe efecto matriz, se puede operar de dos formas:

# Utilizando la metodología de la adición de patrón, con la propia adición de patrón.

# Mediante la realización de "n" determinaciones por adición de patrón.

### **II.1.3. SENSIBILIDAD**

Se suelen tener en cuenta, los siguientes tipos de sensibilidad:

a) Sensibilidad de calibrado

La sensibilidad de calibrado según Ingle [13] o simplemente sensibilidad según la IUPAC [14], Kaiser [15], Linden [11], Liteanu y Rica [16] y Kateman y Buydens [4], se define como el cociente entre la señal medida y el valor de la propiedad a medir. Es decir, la sensibilidad es simplemente la pendiente de la curva de calibrado a la



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

concentración que interese. Cuanto más alta sea la pendiente, mayor es la sensibilidad del método analítico. La sensibilidad será constante para una función de calibrado lineal, en caso contrario, dependerá de la cantidad de analito.

### b) La sensibilidad analítica

Es la pendiente de la curva analítica de calibrado dividida por la desviación tipo de la señal analítica de medida. Es inversamente proporcional a la capacidad para distinguir pequeñas diferencias en la concentración analítica.

### **II.1.4. SELECTIVIDAD Y ESPECIFICIDAD**

Según Wilson [17], los términos selectividad y especificidad se han usado por diferentes autores, aunque con frecuencia con diferentes interpretaciones y con definiciones cuantitativas no muy precisas. Un método selectivo, según Wilson [16], responde en primer lugar al analito y está poco afectado por otras sustancias. Según Kateman [4], un método de análisis es completamente selectivo, cuando produce resultados analíticos correctos para varios componentes de una mezcla, sin interacción de otros componentes de la misma. Según Wilson [16], un método específico responde sólo al analito y no se ve afectado por otras sustancias.

### **II.1.5. LÍMITE DE DETECCIÓN**

El límite de detección ha sido y aún hoy día lo es, uno de los parámetros más discutidos, del que se tienen más definiciones y métodos de cálculo diferentes y que ha dado lugar a más confusiones y malos entendidos. Se da, como la mínima concentración de un analito que el proceso analítico puede detectar con seguridad [18]. Es la mínima cantidad o concentración de una sustancia que puede detectarse con un nivel de probabilidad elegido [19]. También se establece como la mínima señal expresada en cantidad o concentración que puede distinguirse con una probabilidad conocida de un blanco realizado en las mismas condiciones [11]. Ingle y Wilson [13,20], lo definen como la mínima concentración que el analista puede esperar detectar con un nivel dado de confianza. Según la IUPAC y Long y Winefordner [21,22], es un número expresado como una concentración  $C_L$  (o cantidad  $Q_L$ ) que deriva de la menor medida  $X_L$  de un elemento que un analista puede detectar con razonable certeza, por un procedimiento analítico dado. Por otro lado, en HPLC con detector UV-visible, según Snyder



## CAPITULO II

---

y col. [23], se entiende como mínima masa detectable, la mínima cantidad de un compuesto que puede ser expresado en  $\mu\text{g}$ , que puede dar una absorbancia máxima de pico y que puede ser estimada a partir de la ley de Beer y de varias condiciones experimentales.

También hay que tener en cuenta, que dado que se pretende la determinación de un analito a muy bajas concentraciones, se puede considerar que en el mejor de los casos, su detección es planteable como un problema de probabilidad. Ello obliga a evaluar la calidad del procedimiento analítico determinando:

- a) Probabilidad de falso positivo: probabilidad de afirmar que está presente el analito cuando no es cierto.
- b) Probabilidad de falso negativo: probabilidad de afirmar que no hay analito cuando si lo había.

En general, la probabilidad de falso negativo ha de considerarse como un parámetro de calidad para seleccionar un procedimiento analítico u otro. Hay que insistir en esto, porque persiste la idea del límite de detección como un parámetro ligado a un método analítico, que ha de ser descubierto por el investigador. Esto conduce a críticas que desvian la atención respecto de sus potencialidades prácticas ya mostradas.

Retomando la definición establecida por la IUPAC [21], se establece que la discusión ha de llevarse a cabo en dos etapas:

- 1.- Establecer una señal de detección
- 2.- Convertir esa señal mediante la curva de calibrado en una concentración o cantidad.

En términos estadísticos, la definición de la IUPAC y otras similares, conducen al siguiente planteamiento:

- Aplicar el procedimiento químico repetidas veces al blanco analítico, comprobar mediante el test de hipótesis adecuado que las señales siguen una distribución normal y obtener una estimación de la señal media  $\bar{S}$ , y de la desviación típica  $s_B$ . En estas condiciones se obtiene el intervalo de señales que cumple la condición siguiente:

$$\text{pr} \{ \text{señal} > \bar{S} + k_d s_B \} = \alpha$$



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

Está claro, que la señal de detección  $S_d$  de que se habla en la IUPAC, es precisamente  $\bar{S} + k_d s_B$ . Dada una muestra problema, la posibilidad de tener una señal por encima de  $S_d$  y por tanto de afirmar que en ella hay analito es  $\alpha$ ; es decir, la regla de la IUPAC sólo evalúa la probabilidad de un falso positivo en el análisis de la muestra problema, pero no evalúa explícitamente la posibilidad de falso negativo. Esto da lugar a que el analista concluya que no hay analito si la señal no es superior a  $S_d$ , con lo que resultaría que la probabilidad de falso negativo es de 0.5.

A pesar de todo lo anterior, persiste la costumbre de ignorar la probabilidad de falso negativo en la mayoría de los trabajos analíticos, en los que se pone a punto un nuevo procedimiento.

Una estrategia para evitar la situación anterior, ha consistido en renombrar los conceptos [24,25] y llamar *límite de decisión* al valor  $S_d$  antes determinado y reservar el nombre de *límite de detección* para el valor de la concentración que se corresponde con la señal  $S + k_d s_B$  para  $k_d = 6$ . De este modo, las probabilidades de falso positivo y falso negativo son iguales. En todo caso, una vez establecida la señal de detección (o decisión, o cualquier otra) es preciso convertirla en concentración o contenido de analito. Por último, se han realizado algunos intentos para definir otro límite, el *límite de cuantificación* o *límite de determinación*, que es considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativamente precisas, en oposición a la detección cualitativa. Se ha sugerido un valor de  $k_d = 10$  para ese límite [26], aunque en la práctica, no es un parámetro que se utiliza ampliamente.

### II.1.6. APLICABILIDAD Y PRACTICABILIDAD

Según Horwitz [8], un método tiene que ser evaluado también en cuanto a su aplicabilidad y practicabilidad. La aplicabilidad se refiere a su validez para ser usado en un amplio rango de tipos de muestras y la practicabilidad se refiere al costo, tiempo y habilidad del operador. Estas dos características, asumen mayor importancia cuando se habla de diferentes métodos competitivos.

Desde el punto de vista de la puesta a punto de nuevos métodos analíticos, con fines de investigación, hay que resaltar que en los últimos años se ha observado un incremento en la literatura científica, de métodos aplicados a matrices o muestras determinadas, hecho que puede justificarse desde nuestro punto de vista con dos razones fundamentales:



## CAPITULO II

---

A. Necesidad de ofrecer un método que reúna los requisitos establecidos como premisas, para demostrar su validez, como método y en cuanto a su aplicabilidad a cierto tipo de muestras.

B. Resolver la gran cantidad de problemas que se plantean hoy día en la sociedad, y que conciernen a aspectos tales como, medidas legales relacionadas con los aspectos químicos del medioambiente, higiene y toxicología de los alimentos, abuso de drogas y otros campos de interés como medicina, biología, etc.

### II.2. LA CALIBRACIÓN LINEAL UNIVARIANTE

La **calibración lineal univariante**, basada en la utilización de un modelo de línea recta, es una operación frecuentemente usada en Química Analítica, justificada básicamente por dos hechos fundamentales:

a) Existencia de un soporte teórico en forma de ley, i.e. ecuación de Lambert-Beer, que de por sí, pone de manifiesto la relación lineal entre señal instrumental y concentración de analito.  
b) La no linealidad (términos de orden superior o igual a dos en el modelo utilizado) introduce "*curvaturas*" que podrían traducirse en:

b.1) Pérdida de sensibilidad del análisis, puesto que al disminuir el valor de la pendiente aparece un incremento en la imprecisión asociada a la estimación de la concentración de analito.

b.2) Modificación sustancial de la respuesta del problema al interpolar en la "zona curva".

#### II.2.1. EL CONCEPTO DE LINEALIDAD EN LA CALIBRACIÓN ANALÍTICA.

De acuerdo con el Comité de Métodos Analíticos de la División Analítica de la Real Sociedad de Química Inglesa [27], para poder entrar en la discusión de la linealidad de una calibración, es importante aclarar que se entiende por **función de calibración lineal**. En una "calibración analítica", se utiliza un número de materiales (patrones) o "matrices efectivamente idénticas", en las cuales el analito a determinar se encuentra presente en concentración diferente



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

pero "perfectamente conocida". Para cada concentración "c", un instrumento originará una señal instrumental S, la cual está sometida a un error, de manera que al realizar medidas repetidas para una misma concentración (réplicas), las señales instrumentales obtenidas no serán idénticas, pero sí variarán de acuerdo con una distribución de frecuencias. De este modo, puede asumirse que la obtención de una medida puntual se corresponde con un valor independiente y aleatorio de los resultados referentes a una población infinita.

Una descripción técnica de la calibración lineal, es aquella en la que se establece una relación funcional de tipo lineal  $\mu_R = \alpha + \beta c$  entre las medias de estas poblaciones de señales y las concentraciones correspondientes, idea que (de un modo exagerado) quedaría recogida en la Figura II.1. En la situación representada por A, se asume que para cada concentración la dispersión de las medidas es la misma y que resulta por tanto, independiente de la concentración de analito, pudiendo caracterizarse por una única desviación estándar  $\sigma$ , situación que se denomina **HOMOSCEDASTICIDAD**. En el caso B, la desviación estándar de las medidas aumenta suavemente con la concentración de analito (caso que resulta ser muy frecuente en el análisis químico), en esta situación, la desviación estándar tiene que ser especificada y evaluada para cada valor de concentración, o ser expresada como una función de ésta originándose lo que se considera situación de **HETEROSCEDASTICIDAD**.

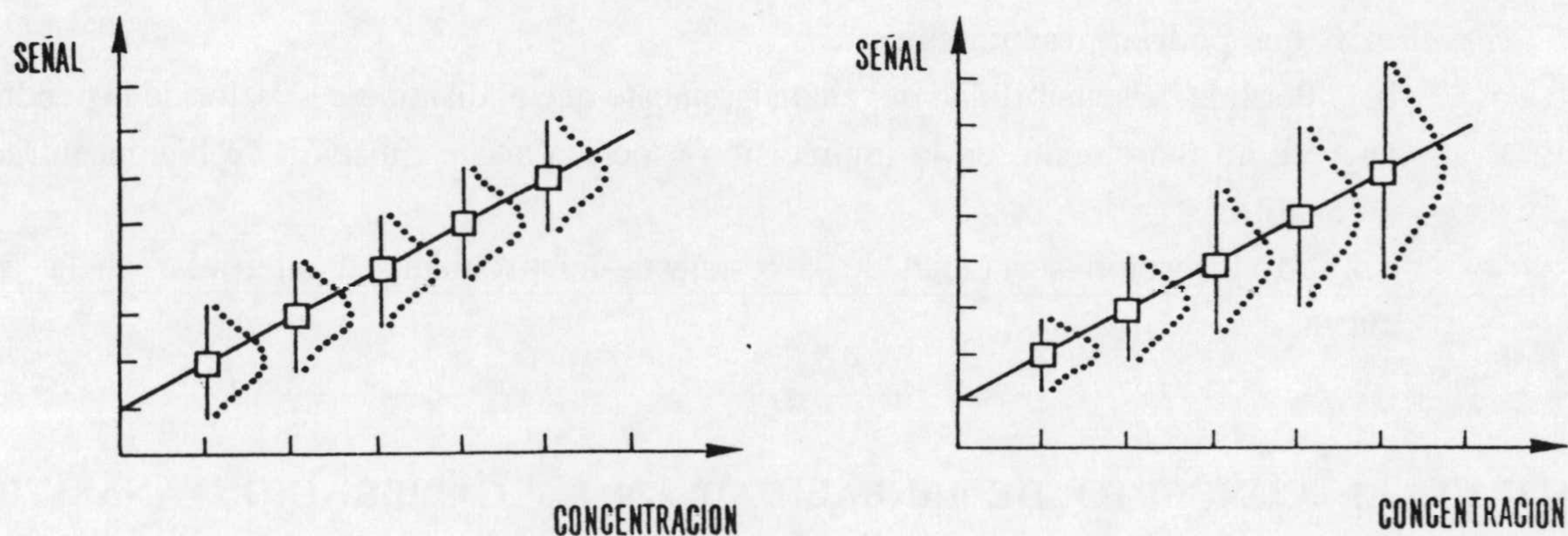


FIGURA II.1. Modelo de regresión lineal: (A) Distribución de las observaciones alrededor de la función de calibración real para el cumplimiento de la condición de HOMOSCEDASTICIDAD; (B) Distribución de las observaciones alrededor de la función de calibración real para el cumplimiento de la condición de HETEROSCEDASTICIDAD



## CAPITULO II

---

Prácticamente en el laboratorio, la respuesta de la media de la población se desconoce y el analista tiene que trabajar con estimaciones de un pequeño número de medidas individuales realizadas para cada concentración. Así, si hay  $n$  patrones y  $p$  medidas realizadas sobre cada uno de ellos, se obtiene un conjunto de resultados que quedarían representados por

$$\begin{array}{cccc} c_1 & \rightarrow & S_{11} & \dots & S_{1j} & \dots & S_{1p} \\ & & \dots & & \dots & & \dots \\ & & \dots & & \dots & & \dots \\ c_n & \rightarrow & S_{n1} & \dots & S_{nj} & \dots & S_{np} \end{array}$$

La calibración lineal se estima por regresión lineal de este conjunto de datos. Como las medidas de la respuesta instrumental son variables aleatorias, la función estimada,  $S = a + bc$  difiere de la función verdadera. Los valores de  $a$  y  $b$  se obtienen:

a) Para el caso de que se cumpla la situación de homoscedasticidad minimizando la ecuación

$$\sum_{ij} (S_{ij} - \hat{S}_i)^2 \quad [1]$$

donde

$$\hat{S}_i = a + bc_i \quad [2]$$

b) En el caso de que se de la condición de heteroscedasticidad, se estiman mejor los parámetros si se realiza una "regresión ponderada", la cual se basa en minimizar la expresión dada por

$$\sum_{ij} w_i (S_{ij} - \hat{S}_i)^2 \quad [3]$$

donde, como se puede observar, "la ponderación" se introduce en el término  $w_i$  denominado por ello "factor de ponderación", que representa la inversa de la varianza (cuadrado de la desviación estándar  $\sigma_i$ ) de las respuestas para la concentración  $c_i$ . En ambos casos, los valores  $s_{ij}$  recogidos en la siguiente ecuación, se denominan "residuales" y representan las distancias verticales entre los puntos experimentales y la línea o recta ajustada,



$$s_{ij} = (S_{ij} - \hat{S}_i) \quad [4]$$

### II.2.2. VALIDACIÓN DEL MODELO LINEAL ESTABLECIDO

Según Boqué y Rius [28], el *proceso de validación* consiste en, la *verificación experimental de que el modelo matemático constituye una simplificación correcta de la serie de puntos experimentales que se poseen*. En definitiva, que el modelo es válido:

- a) en su establecimiento,
- b) para predecir valores futuros de concentración desconocidos

*Por tanto, la validación implicaría la evaluación de aspectos como:*

- 1) Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*
- 2) Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales y que los valores de pendiente y ordenada en el origen son aceptables.*
- 3) Establecimiento del límite de concentración inferior (límite de detección) en el que el modelo es válido.*

- 1) *Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*

La etapa previa para poder utilizar la regresión lineal univariante por mínimos cuadrados, requiere la comprobación preliminar de las hipótesis que afectan a las variables concentración, señal instrumental y residuales, la cual puede realizarse de dos formas:

- a) Mediante la aplicación de test de hipótesis [3], aunque su realización es larga y tediosa si no se dispone de un paquete estadístico,
- b) Como sugieren Boqué y Rius [28], mediante un **análisis gráfico de los residuales**, que aunque no sea un camino del todo riguroso, puede servir para indicar el posible incumplimiento de las hipótesis matemáticas.

El análisis gráfico de los residuales se lleva a cabo mediante *representaciones gráficas*



## CAPITULO II

---

de éstos, frente a los valores experimentales de señales o concentraciones. Si consideramos la representación de los **residuales** frente a los **valores de concentración** ( $c_i$ ), un buen cumplimiento de las hipótesis establecidas debería observarse por:

- 1) Igualdad entre el número de residuales negativos y positivos obtenidos.
- 2) Aleatoriedad en su distribución.
- 3) Obtención de valores numéricos de residuales similares.

Si el gráfico sugiriera la presencia de una varianza no uniforme, se tendría que aplicar un test estadístico para comprobar rigurosamente la existencia de heteroscedasticidad y reanalizar los datos mediante una regresión lineal ponderada.

Finalmente, sobre la gráfica de residuales podría evaluarse, con las debidas precauciones, la presencia de puntos discrepantes o "outliers".

### 2) *Comprobación del grado de acoplamiento del modelo a los puntos experimentales.*

Dado que en la práctica, el valor de la desviación estándar poblacional de la calibración lineal no se conoce por evaluarse a partir de la utilización de réplicas, (se conoce la  $s_{n-1}$  de la distribución normal que sigue cada concentración) la evaluación del grado de acoplamiento del modelo lineal establecido respecto a los puntos experimentales utilizados, o lo que es lo mismo, *la estimación del fallo de ajuste*, puede realizarse mediante un *test del Análisis de la Varianza (ANOVA)*, ya que la utilización del coeficiente de correlación,  $r$ , no constituye un test estadístico y que su significación como parámetro estimador de la linealidad puede considerarse muy reducido [29].

#### 2.1) Evaluación del "fallo de ajuste" cuando existe "homoscedasticidad".

El test se realiza sobre una serie de  $n_i$  réplicas para cada valor de  $c_i$  comparando el valor del estadístico  $F$ , calculado como el cociente de las varianzas debidas al fallo de ajuste y al error puro, tal como se indica en la siguiente ecuación:



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

$$F_{Cal} = \frac{MS_{LOF}}{MS_{PE}} \quad [5]$$

con los valores tabulados, para un determinado nivel de significación  $\alpha$ , con  $k-2$  y  $n-k$  grados de libertad (donde "k" representa el número de patrones de calibración diferentes y "n" el número total de observaciones).

La varianza asociada con el grado de acoplamiento  $MS_{LOF}$  (del inglés "lack of fit" o fallo de ajuste) viene dada por,

$$MS_{LOF} = (\sum n_i (\bar{S}_i - \hat{S}_i)^2) / (k-2) \quad [6]$$

donde  $\bar{S}_i$  es el valor medio de las  $n_i$  repeticiones  $S_{ij}$  para  $c_i$  y  $\hat{S}_i$  es el valor de S estimado por el modelo lineal para un cierto  $c_i$ .

La varianza asociada al "puro error",  $MS_{PE}$ , viene dada por:

$$MS_{PE} = \sum \sum (S_{ij} - \bar{S}_i)^2 / (n-k) \quad [7]$$

### 2.2) Evaluación del "fallo de ajuste" cuando existe "heteroscedasticidad".

El test del análisis de la varianza usado es análogo al utilizado en el caso homoscedástico, sólo que aquí, la calibración y las varianzas debidas al fallo de ajuste y al error puro, se corrigen con el factor de ponderación  $w_i$  comentado anteriormente.

### 2.3) Evaluación de la linealidad cuando no se utilizan réplicas en la calibración.

Dado que la evaluación del "fallo de ajuste" de la calibración requiere el empleo de réplicas en el calibrado, cuando no se dispone de tales datos hay que recurrir a otras formas



## CAPITULO II

---

para evaluar la linealidad. Algunos de estos procedimientos descritos en bibliografía [30] pueden ser:

### 2.3.1) Coeficiente de variación de los factores de respuesta:

El **factor de respuesta** se define como, *la relación entre la lectura y la concentración*, de manera que en una calibración lineal, los factores de respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Por esta razón se puede tomar el coeficiente de variación de dichos factores como una expresión de la linealidad, considerándose que coeficientes de variación superiores al 5% indican falta de linealidad.

### 2.3.2) Análisis de la varianza de la pendiente del calibrado:

La varianza de la pendiente  $s_b^2$  puede tomarse como un parámetro indicador de la linealidad, puesto que a menor varianza mayor linealidad. Otras veces puede expresarse la linealidad a través del error estándar de la pendiente ( $s_b$ ) o del coeficiente de variación C.V.(%).

### 2.4) Comprobación de que los valores de la pendiente y la ordenada en el origen son aceptables.

De entre todos los tests estadísticos diseñados para tal comprobación, nosotros hemos utilizado el que nos suministra el paquete estadístico de que disponemos. El estadístico empleado fue la  $t$  de Student, que nos permite comprobar si la pendiente y la ordenada en el origen son o no distintas de cero, para un nivel de significación determinado (95%). Los valores obtenidos para el estadístico  $t_{\text{student}}$ , nos deben llevar a concluir por las hipótesis alternativas (término independiente significativamente igual a cero y pendiente significativamente distinta de cero).

### 3) *Establecimiento del límite de concentración inferior (Límite de detección) en el que el modelo es válido.*

Para el establecimiento del límite de detección de los métodos propuestos en la presente memoria y dada la gran variedad de métodos existentes en bibliografía, así como la arbitrariedad de la propia definición del término se han utilizado los siguientes criterios:



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

### 3.1) Establecimiento de la mínima masa detectable

De acuerdo con los autores que proponen este término [23], su estimación puede realizarse a partir de la ley de Lambert-Beer y de las condiciones experimentales del método de acuerdo con la siguiente expresión:

$$w_m = \frac{1000 M(k' + 1)(S/N)N_0\sqrt{L}}{\epsilon L_c(d_c)^2 \sqrt{N}} \quad [8]$$

donde:

$w_m$  = Mínima masa detectable (en  $\mu\text{g}$ ).

$M$  = Peso molecular del compuesto.

$k'$  = Factor de capacidad del pico.

$S/N$  = Relación señal/ruido (normalmente  $\geq 2$ ).

$N_0$  = Ruido de la línea base del detector en unidades de absorbancia.

$L$  = Longitud de la columna (en cm).

$\epsilon$  = Absortividad molar del compuesto.

$L_c$  = Longitud de la célula de flujo del detector (en cm).

$d_c$  = Diámetro interno de la columna (en cm).

$N$  = Número de platos teóricos de la columna.

### 3.2) Estimación a partir de los datos de calibrado

#### 3.2.1.) Según Miller y Miller [31]:

La definición que estos autores hacen del límite de detección viene dada por la expresión :

$$L.D. = y_a \pm 3S_{Sc} \quad [9]$$

la cual surge del hecho ya comentado, de que cada punto obtenido de la curva de calibración (incluido el que representa al blanco), tiene una variación sobre



## CAPITULO II

---

la dirección del eje y, distribuída normalmente con una desviación estándar estimada por  $s_{sc}$ , de aquí, que según estos autores sea apropiado utilizar dicha desviación en lugar de la desviación estándar del blanco para estimar el límite de detección. A su vez, el valor de la ordenada en el origen (a) daría lugar a una estimación más exacta del blanco, que el propio valor de éste.

El límite de determinación propuesto por Currie [26], se obtendría sustituyendo en la expresión anterior el 3 por 10.

### 3.2.2) Según Cuadros y col. [12]:

Estos autores, proponen para técnicas donde no es posible hacer correcciones del blanco, como ocurre en cromatografía, realizar una estimación estadística aproximada utilizando la expresión:

$$L.D. = \frac{S_{sc}}{b} \sqrt{\frac{n-2}{n-1}} \quad [10]$$

donde n representa el número de pares de datos obtenidos en la recta de calibrado.

### 3.2.3.) Según Boqué y Rius [28]:

Utilizando un paquete estadístico (QUIMIO) estos autores proponen la estimación del límite de detección de acuerdo con la ecuación:

$$C_L = \frac{k\sqrt{s_{bl}^2 + s_a^2 + (a/b)^2 s_b^2}}{b} \quad [11]$$

donde  $s_{bl}$  es la desviación estándar del conjunto de repeticiones correspondientes al blanco [22]. Esta expresión, tiene en cuenta la estadística implicada entre la diferencia de una respuesta dada y la señal del blanco por medio del parámetro k, así como la incertidumbre introducida por la presencia de errores en la



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

estimación de la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de calibrado. Podríamos considerar que el cálculo del límite de detección de acuerdo con este procedimiento equivaldría al propuesto por Long y Winefordner [22].

### 3.2.4) A partir de la estimación de las probabilidades de falsos positivo y negativo.

Según proponen los profesores Ortiz y Sarabia [32], la definición de límite de detección aceptada por la I.U.P.A.C. sólo contempla la probabilidad de un falso positivo en el análisis de una muestra problema, no evaluando explícitamente la probabilidad de un falso negativo (en el mejor de los casos evaluaría sólo un 50% de esta probabilidad).

En el sentido de poder establecer la probabilidad de falso negativo para un procedimiento concreto, Liteanu [16] propone la *curva característica de detección*, la cual aportaría la información necesaria para establecer el significado real de los resultados experimentales en las proximidades del límite de detección. Así, es posible plantear el límite de detección, como un test de hipótesis (recogido en el programa DETARCHI) teniendo en cuenta la *relación señal / concentración* y sin necesidad de disponer de señal en el blanco [25].

El procedimiento consta de dos etapas:

- 1.- Determinación de la relación lineal entre concentración y señal garantizándose cuidadosamente el cumplimiento del modelo de mínimos cuadrados.
- 2.- Considerar el establecimiento del límite de detección como un test de hipótesis en relación a la presencia de analito en la muestra problema.

*De acuerdo con esto, el límite de detección dependerá de las probabilidades de falso positivo y negativo, del diseño experimental del calibrado, de la sensibilidad que éste presente, así como de la calidad de la regresión.*

**Por tanto el límite de detección dependerá (para un  $\alpha = 0.05$ ) de la probabilidad de falso negativo que se esté dispuesto a asumir.**



### II.2.3. ESTIMACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN

Una vez determinados los valores de la pendiente y la ordenada en el origen de la ecuación de calibrado, es fácil calcular por interpolación, un valor de concentración de analito a partir de un valor de la señal instrumental. Sin embargo, la estimación de la imprecisión asociada a cada determinación, es bastante compleja puesto que dependerá de a) el error asociado a la medida de la señal (error instrumental) b) los errores asociados a la pendiente y a la ordenada en el origen. Martín Andrés y Luna del Castillo [33], proponen la siguiente expresión para calcular la desviación estándar asociada a una concentración, a partir de los resultados obtenidos en una serie de análisis repetidos

$$s_c = \frac{S_{s,c}}{b(1-g)} \sqrt{(1-g) \left( \frac{1}{m} + \frac{1}{n} \right) + \frac{(S - \bar{S})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad [12]$$

donde:

b : Pendiente de la ecuación de regresión.

$S_{s,c}$  : Desviación estándar de regresión de la señal S sobre la concentración.

m : Número de réplicas.

n: Número total de pares de valores utilizados para calcular la ecuación de regresión.

S: Media aritmética de los valores de las señales obtenidos en los m análisis.

$\bar{S}$ : Media aritmética de todos los valores de las señales obtenidas en el cálculo de la ecuación de regresión.

$c_i$ : Valores de las concentraciones determinadas en el análisis.

$\bar{c}$ : Media aritmética de todos los valores de concentración utilizados para la calibración.

g: Función dada por

$$g = t^2 \frac{S_{s,c}^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2} \quad [13]$$

utilizándose un valor de la  $t_{\text{Student}}$  para un nivel de confianza de  $1 - \alpha$  ( $\alpha = 0.05$ ) con n-2 grados de libertad.

Cuando la función g toma un valor menor de la unidad, la ecuación [12] se reduce a la siguiente:



$$s_c = \frac{S_{S,c}}{b} \sqrt{\left(\frac{1}{m} + \frac{1}{n}\right) + \frac{(S - \bar{S})}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad [14]$$

este valor de  $s_c$  dependerá del número de puntos utilizados en la calibración (n) así como del número de réplicas (m); de manera que puede minimizarse haciendo  $m = n$ .

#### II.2.4. PARÁMETROS DE CALIDAD

##### *Linealidad*

De acuerdo con lo propuesto por Cuadros y col. [12] se ha utilizado como parámetro estimador de la linealidad el valor obtenido por la ecuación

$$Lin(\%) = (1 - C.V.(b))100 \quad [15]$$

donde C.V.(b) representa el coeficiente de variación de la pendiente expresado en tanto por uno.

##### *Sensibilidad*

Siguiendo con lo propuesto por los autores anteriormente citados, creimos conveniente utilizar como medida de la sensibilidad de los métodos desarrollados en esta memoria una expresión derivada del análisis de regresión dada por la expresión

$$Sens. anal. = \frac{S_{S,c}}{b} \quad [16]$$

la cual, siendo característica de la calibración del método instrumental, resulta independiente del instrumento utilizado.



## CAPITULO II

---

### *Precisión*

Matemáticamente, la precisión suele expresarse, como ya hemos comentado con anterioridad, a partir del coeficiente de variación expresado en porcentaje. Partiendo de este supuesto, los mismos autores consideran que las ecuaciones [12] y [14] (correspondientes al apartado de cálculo de concentraciones), pueden redefinirse para poder calcular el coeficiente de variación de la concentración a partir de los valores de las señales instrumentales obtenidos en la experiencia de calibrado. Para ello, el término "m" debe utilizarse aquí como el número de réplicas de calibración utilizadas para cada concentración ensayada.

Estos autores indican que el uso de una u otra ecuación, viene condicionado por el número de puntos utilizados en la experiencia para evaluar la linealidad, así como del valor de ésta. Para ello, por combinación de las expresiones de  $s_b$  y de la función  $g$ , los valores de ésta última pueden expresarse como

$$g = t^2 \cdot C.V.^2(b) \quad [17]$$

si  $g \leq 0.01$ , se puede utilizar la ecuación [14]. Para valores superiores debe aplicarse la ecuación [12] o aumentar el  $n^\circ$  de puntos en la experiencia de calibrado. Desde este punto de vista, el coeficiente de variación de la concentración quedaría expresado como

$$C.V.(c) = \frac{s_c}{c} 100 \quad [18]$$

la cual, sólo puede aplicarse a las concentraciones contenidas en el rango de calibrado. Sin embargo, el modelo asumido permite estimar todo el rango de linealidad estudiado por interpolación en la representación de las precisiones obtenidas.

## II.4. VALIDACIÓN DE UNA METODOLOGÍA ANALÍTICA

Como ya hemos citado anteriormente, X. Rius [2] indica que de todos los parámetros o requisitos establecidos por el usuario, hay dos que son fundamentales para la validación de



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

un método analítico: Exactitud y precisión. Ahora bien, en la práctica, desde el punto de vista de la investigación, se suele evaluar el hecho de que el nuevo procedimiento establecido conduzca a resultados exactos para cierto tipo de muestras. Para ello, es necesario el uso de materiales de referencia certificados, métodos de referencia, o la práctica de otras muchas técnicas de diverso valor dentro de la escala de calidad.

La elección de las sustancias de referencia o patrones, sobre las que se establece la relación entre la señal y cantidad de analito, es la parte más importante del proceso de calibración cuando el sistema de análisis es complejo, la matriz de la muestra debe reproducirse en los patrones para poder asegurar un comportamiento idéntico de todo el sistema. Hay que tener en cuenta, que las sustancias de referencia, pueden perder la garantía o la certificación por una mala manipulación o un almacenamiento no adecuado. En la mayor parte de los casos y con objeto de asegurar la trazabilidad, es necesario someter los patrones al procedimiento analítico completo, es decir, desde el principio de la preparación de la muestra e incluso es conveniente recurrir al método de adición de patrón.

En el caso de no disponer de alguno de los dos primeros estadios de la validación, hay que recurrir a otros "artificios" que podríamos definir como *protocolos alternativos de validación*;

1) Utilización de lo que posteriormente definiremos como "materiales de referencia terciarios" o "caseros" entre los que podemos encontrar muestras sintéticas preparadas con una composición perfectamente conocida, o muestras con una cierta cantidad de analito añadida (Spiked samples).

2) Protocolos estadísticos propuestos por diferentes autores, cuya finalidad básica, es la estimación estadística fiable de la exactitud del método y que podemos enumerar como:

2.1) Verificación de la exactitud mediante la "metodología de la adición de patrón" en ausencia de un efecto matriz.

2.2) Verificación de la exactitud mediante lo que podríamos definir como "metodología de la adición de patrón" en presencia de un efecto matriz saturado.



## CAPITULO II

---

### II.4.1. MATERIALES DE REFERENCIA

Según las definiciones de la Organización Internacional para la Estandarización, en su Norma ISO 30 [34], un **Material de Referencia (RM)** es un material o sustancia que tiene una o varias de sus propiedades suficientemente bien establecidas para permitir su uso en:

- a) Calibración de un aparato o instrumento,
- b) Validación de un método analítico, o
- c) La asignación de valores a un material o sistema.

Desde este punto de vista, Venkatesh y Wayne [35] utilizan la siguiente terminología para identificar diferentes clases de éstos:

- (1) Patrones Primarios (PS),
- (2) Materiales de Referencia Primarios (Primary RMs),
- (3) Materiales de Referencia Secundarios (Secondary RMs),
- (4) Materiales de Referencia Terciarios (Tertiary RMs).

(1) y (2) se recogen según la ISO, bajo la denominación global de **materiales de referencia certificados (CRMs)** y generalmente se producen o fabrican por instituciones de experiencia y prestigio analíticos reconocidos i.e. NIST → National Institute of Standard and Technology; BCR → Community Bureau of Reference; LGC → Laboratory of the Government Chemist; LNE → Laboratoire National d'Essais.

- Los "patrones primarios" son sustancias químicas puras de uso para calibración de un instrumento.
- Los Materiales de Referencia Primarios, representan matrices (naturales o con "sustancias añadidas") diseñadas básicamente para: evaluar procedimientos analíticos nuevos, "evaluar el control de calidad en el desarrollo de métodos de validación de los materiales de referencia secundarios".

(3) representan un amplio grupo de materiales para el control de calidad analítico, en general de naturaleza muy variada y por su coste, de uso relativamente frecuente sobretodo para ejercicios interlaboratorio de ámbito regional o para evaluar problemas prácticos.

- (4) representan varios tipos de artificios caseros para el control de calidad de matrices



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

seleccionadas para uso dentro de un laboratorio o entre un grupo de investigadores. En algunos casos, se utilizan para suministrar matrices específicas no disponibles a partir de materiales de referencia secundarios.

### **Materiales de Referencia en el Análisis de Alimentos**

Los materiales de referencia comunmente usados para el análisis de alimentos, son aquellos caracterizados para evaluar:

- \* componentes nutricionales (Vitaminas o elementos traza, por ej.),
- \* sustancias químicas en el medioambiente,
- \* contaminantes microbiológicos,
- \* la contaminación radiactiva.

Centrándonos específicamente en el análisis de elementos traza en alimentos, se observa una necesidad crítica de disponer de materiales de referencia certificados para la determinación de concentraciones de elementos, que pueden estar incluidos en una amplia variedad de matrices de alimentos (materia prima o alimentos procesados) cuidadosamente elegidos para representar un amplio rango de composiciones. Idealmente, cada matriz debería quedar representada por un conjunto de materiales de referencia certificados que contuvieran niveles de concentración - bajos, intermedios, altos o incluso con datos para evaluar posibles casos de especiación representativos de los niveles "nutricionales", "umbrales entre nutricionales y tóxicos" y "tóxicos".

### *Características de matrices y analitos*

- \* Componentes mayoritarios.

Las matrices de los alimentos son de extremada variedad en cuanto a la composición de sus componentes mayoritarios, de manera que, dependiendo de la naturaleza de éstos, podemos encontrarnos con:

- a) Matrices, de naturaleza líquida, donde es fácil la determinación de elementos traza.



## CAPITULO II

---

- b) Alimentos grasos, donde la determinación presenta dificultades, o
- c) Matrices, como las utilizadas para el control dietético, donde la determinación puede resultar impredecible o variable.

De los componentes mayoritarios, los que presentan diferencias estructurales, resultan ser los menos homogéneos. De manera aproximada, Anderson y col. [36], consideran que los componentes mayoritarios de las matrices pueden citarse por orden creciente de "dificultad analítica" de acuerdo con:

- Mezclas o sustancias volátiles,
- Cenizas,
- Hidratos de carbono,
- Fibras,
- Proteínas y
- Grasas.

siendo estos tres últimos los más problemáticos, sobretodo en métodos que requieren digestión.

\* Elementos traza o analitos.

Basándonos en la **necesidad del conocimiento de concentraciones exactas** de elementos inorgánicos: nutricionalmente importantes i.e. Ca, Cl, Cr, Mn, Mo, Se; elementos potencialmente tóxicos (Al, As, Cd, etc.), elementos que puedan tener consecuencias nutricionales y toxicológicas (Cu, Fe, I y Zn) y elementos con papel nutricional y/o toxicológico no definido (V, B, Li, F, Si, Sn, etc.) **debería disponerse de materiales de referencia certificados de este tipo de elementos en matrices muy diversas, que representaran las concentraciones y la biodisponibilidad de elementos nutricionales y tóxicos.**

Sin embargo, el hecho observado en los materiales de referencia existentes, es precisamente el contrario, se da un fallo de caracterización de algunos elementos traza. Este hecho podría atribuirse, no sólo a la falta de matrices adecuadas, sino también a la circunstancia de que los métodos utilizados sean los mismos que los empleados en el análisis de rutina, surgiendo



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

de ellos algunos problemas como digestiones incompletas, volatilizaciones, o rangos de aplicación con límites de detección superiores al contenido del elemento.

### II.4.2. MÉTODO DE ADICIÓN DE PATRÓN.

Con objeto de garantizar la correcta similitud en el comportamiento de patrones y muestras, es conveniente utilizar el método de adición de patrón. Los problemas se pueden plantear en sistemas analíticos complejos o cuando las muestras tienen matrices difícilmente reproducibles en los patrones (alimentos, muestras biológicas, medio ambiente, etc.). En bibliografía, se pueden detectar dos formas de preparar la adición de patrón:

- 1.- La más común es tomar varios volúmenes iguales de la disolución a analizar y añadirle a todos menos a uno, cantidades perfectamente conocidas del analito, llevando al mismo volumen.
- 2.- Se puede realizar la adición de patrón justo antes de proceder al tratamiento de la muestra y someterlo todo al mismo proceso.

La determinación analítica sobre estas preparaciones proporciona una nueva recta de calibrado, entre las señales y las cantidades adicionadas. Si no existe interferencia, la recta de calibrado y la de adición de patrón deben tener la misma pendiente. En caso contrario, dejan de ser paralelas cruzándose o no.

Hay que tener en cuenta que el método de adición de patrón se basa en dos premisas que no siempre son válidas:

- a) Se supone que en el sistema analítico, los patrones adicionados se comportan de la misma forma que el analito.
- b) Se supone que la relación S/c mantiene la misma función lineal (misma pendiente) fuera del margen de calibrado, pues la concentración se deduce por extrapolación.

Desde un punto de vista práctico, el método de adición de patrón se aplica con tres



## CAPITULO II

---

objetivos fundamentales:

- 1.- Determinación de analitos en muestras en las que hay interacciones analito/matriz que producen resultados inexactos, si se utiliza un calibrado con patrones de trabajo.
- 2.- Detección de analitos, que se encuentran en la muestra en un nivel inferior al del límite de cuantificación del método, pero superior a su sensibilidad analítica.
- 3.- Comprobación de la exactitud de un resultado analítico cuando no se dispone de una muestra de referencia o patrón certificado.

La distinción entre método analítico y procedimiento analítico [37], se puede resumir diciendo que en el desarrollo del último, el primero se aplica a un experimento diseñado para obtener resultados libres de error sistemático en una matriz determinada.

El error sistemático en análisis químico se puede dividir en dos componentes [38]: a) una componente de error constante que no depende de la concentración de analito en la muestra, b) una componente de error proporcional que muestra una dependencia de 1<sup>er</sup> orden en la concentración.

Una forma de obtener un resultado libre de error sistemático puede ser utilizando el método de adición de patrón. Aunque hay otras fuentes de error sistemático además de los efectos de la matriz, estos últimos son los que vamos a considerar aquí. Podríamos distinguir:

- a) Efecto matriz de orden cero (constante).
- b) Efecto matriz de primer orden, independiente de la cantidad de analito, dentro del rango dinámico lineal.
- c) Efecto matriz de primer orden respecto a la cantidad de analito, independiente de la relación analito/matriz.

En bibliografía, hay acuerdo, respecto de que un error constante es independiente del tamaño de muestra tomado para el análisis [39]. También hay acuerdo en que se debe de usar un blanco para corregir este error [40]. Según Winefordner [41], el blanco es una disolución que contiene



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

todo lo que hay en la muestra excepto el analito. Cuando se analiza una muestra real, con una determinada concentración de analito, es necesario conocer el blanco real. Como este blanco debe evaluarse en la muestra que contiene el analito, Youden [42-44] propone estimarlo representando la curva de respuesta de la muestra que corresponde a la representación de las señales de la muestra frente a las respectivas masas o concentraciones de la misma. El análisis por regresión lineal del conjunto de datos daría lugar a que la ordenada en el origen obtenida, representara la componente de error constante del método, extrapolada a un nivel cero de muestra. Esa ordenada en el origen es el **blanco total de Youden (BTY)**. La respuesta del BTY se comprende de, la señal debida a no analitos en la muestra y el disolvente, la contribución del error sistemático y la señal correspondiente a cualquier interacción constante analito/matriz. Por otra parte, el blanco de la muestra solo puede contener las señales que proceden de los analitos en los disolventes y la contribución del error sistemático. Ambos (SB y BTY) pueden contener algún error sistemático constante, proveniente de la técnica. Es bastante frecuente encontrar una diferencia significativa entre los valores de SB y BTY que es asignada al BY, de forma que  $SB + BY = BTY$ . Este BY es un parámetro estándar de los errores sistemáticos relacionados con la muestra.

Retomando los tipos de error sistemático que podrían aparecer, la adición de patrón sólo elimina el primero *a*), en el caso *b*) en el que existe efecto matriz, y por tanto hay dependencia entre la relación matriz/analito, el método de adición de patrón se valida para determinar la exactitud y cuando se mantenga constante esta proporción. En el caso *c*) la aplicación del método de adición de patrón, puede que no llegue a ser nunca adecuado por que no se encuentre una situación equivalente a la del caso *b*), es decir, de acuerdo a lo que propone Tyson [45], no se alcance un porcentaje de variación de la pendiente constante, De todo esto, puede deducirse que la aplicación del método de adición de patrón, depende de un adecuado estudio de la zona de aplicabilidad del mismo.

### II.4.3. VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD MEDIANTE LA "METODOLOGÍA DE ADICIÓN DE PATRÓN" EN AUSENCIA DE UN EFECTO MATRIZ.

Cuadros y col. [46], describen un protocolo estadístico, adecuado para llevar a cabo la validación de un método analítico por aplicación del método de adición de patrón. Los datos



## CAPITULO II

---

necesarios se obtienen a partir de tres experiencias de calibrado: a) Con patrones de calibrado, con adición de patrón y con porciones de muestra. Aplicando el análisis de la regresión lineal, se calcula para cada recta su pendiente, altura en el origen y desviación estándar de regresión. La exactitud del resultado analítico, se comprueba mediante la comparación de los contenidos de analito a partir de los distintos calibrados.

### II.4.3.1. Procedimiento estadístico.

#### A) Desviación estándar de regresión.

Su cálculo presupone la aceptación de la homogeneidad de varianzas en los distintos calibrados, como resaltan estos autores y de acuerdo con lo establecido por Pszonicki [47], raramente la dispersión de los resultados se ve afectada por la presencia de sustancias extrañas y el valor de la desviación estándar depende solamente de la magnitud de la señal analítica -no hay que olvidar que partimos del supuesto de la "ausencia del efecto matriz"-, a su vez, estos mismos autores, utilizan como desviación estándar representativa de todos los calibrados la desviación estándar del calibrado con patrones, por argumentar que su valor ha sido obtenido a partir de un número mucho mayor de medidas.

En nuestro caso, el protocolo seguido, empezó con la comprobación inicial de la hipótesis de homogeneidad de varianzas. Para ello se utilizó un ANOVA de una vía en el que el estadístico  $F_{\text{Snedecor}}$  calculado, se comparó con el tabulado en la distribución de Snedecor para un valor de  $\alpha = 0.05$  y un número de grados de libertad dado por  $n_{\text{patrones}} - 2$ ,  $n_{\text{adición}} - 2$ . A su vez, se tomó como desviación estándar promedio la dada por la ecuación

$$S_{\text{promedio}} = \sqrt{\frac{(n_p - 2)s_p^2 + (n_A - 2)s_A^2}{n_p + n_A - 4}} \quad [19]$$

en la que puede apreciarse, que se utilizaron las desviaciones estándar de regresión de cada calibrado, ya que experimentalmente, el número de medidas en las distintas calibraciones no difería significativamente.



*B) Comprobación de la igualdad de pendientes.*

De acuerdo con lo recogido por Thompson [48] las rectas de dos calibrados distintos pueden presentar cuatro disposiciones espaciales.

- 1) Una superpuesta sobre la otra (Identidad de calibrados).
- 2) Una desplazada paralelamente respecto a la otra (Existencia de un error sistemático constante o traslacional).
- 3) Ambas rectas, partiendo del mismo punto, presentan distinta pendiente (Existencia de un error sistemático proporcional o rotacional).
- 4) Ambas rectas se cortan en un punto distinto del origen (Combinación de ambos tipos de errores).

La aplicación del protocolo de validación aquí comentado, se basa en el hecho significativo de que, para su aplicación, la adición de patrón debe provocar un error sistemático constante. El no cumplimiento de esta premisa invalidaría el protocolo de validación por conducir a una estimación "errónea" de la exactitud.

Para ensayar la igualdad de pendientes se utiliza un test de la t de Student. El estadístico a utilizar, con  $(n_p + n_A - 4)$  grados de libertad, viene dado por la expresión:

$$t(b) = \frac{|b_p - b_A|}{S_{promedio} \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,p} - \bar{c}_p)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}} \quad [20]$$

Se acepta la hipótesis nula (homogeneidad de pendientes) para un nivel de significación menor del 1% (no se utiliza el valor usual del 5% ya que es un test excesivamente robusto para el número de grados de libertad utilizados).

*C) Pendientes de la recta de calibrado con patrones y por adición de patrón.*

Una vez comprobada la igualdad de pendientes, se procede a calcular la pendiente promedio representativa de dichos calibrados a partir de la ecuación



$$b_{promedio} = \frac{\sum (c_i - \bar{c})_p (S_i - \bar{S})_p + \sum (c_i - \bar{c})_A (S_i - \bar{S})_A}{\sum (c_i - \bar{c})_p^2 + \sum (c_i - \bar{c})_A^2} \quad [21]$$

D) Cálculo de las alturas en el origen. Blanco de Youden.

A partir del valor obtenido de la pendiente promedio, se calcula el nuevo valor de altura en el origen para las rectas de calibrado con patrones y por adición de patrón utilizando las ecuaciones

$$a'_p = \bar{S}_p - b_{promedio} \bar{c}_p \quad [22]$$

$$a'_A = \bar{S}_A - b_{promedio} \bar{c}_A \quad [23]$$

Una diferencia entre los valores de las alturas en el origen de las rectas correspondientes a los calibrados con patrones y con porciones de muestra (Calibrado de Youden),  $a_p$  y  $a_Y$ , indica la existencia de un componente de error sistemático debido al efecto matriz de la muestra que hay que tener en cuenta. Dado que dichas alturas se obtienen a partir de distintas variables independientes, no es posible establecer un test de comparación. Sin embargo, se puede evaluar una diferencia entre ambos controlando, si el valor de  $a_Y$  queda incluido en el intervalo de confianza del valor de  $a_p$ .

El intervalo de confianza se calcula a partir de la ecuación [24], utilizando una  $t$  de Student con  $(n_p - 2)$  grados de libertad y 1% de significación,

$$a_Y \in a'_p \pm t_{\alpha} s_{promedio} \quad [24]$$

si  $a_Y$  no está incluido en el intervalo, se calcula el "verdadero blanco de la muestra" (Blanco de Youden) aplicando la ecuación:



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

---

$$YB = a_Y - a'_p \quad [25]$$

### E) Comprobación de la exactitud del resultado analítico.

Se realiza comparando los contenidos de analito en la disolución a medir, obtenidos a partir de los calibrados con patrones y con adición de patrón de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Patrones:} \quad c_{x,p} = \frac{(S_x - a_Y)}{b_{\text{promedio}}} \quad [26]$$

$$\text{Adición de patrón:} \quad c_{x,A} = \frac{(a'_A - a_Y)}{b_{\text{promedio}}} \quad [27]$$

ambos valores pueden compararse con un test de la t de Student de comparación de dos medias. El estadístico a calcular, con  $(n_p + n_A - 3)$  grados de libertad -tiene un grado de libertad más por utilizar una pendiente común a ambos calibrados-, viene dado por la expresión

$$t(c) = \frac{|c_{x,p} - c_{x,A}|}{\frac{s_{\text{promedio}}}{b_{\text{promedio}}} \sqrt{\frac{1}{n_p} + \frac{1}{n_A}}} \quad [28]$$

se acepta la hipótesis nula (los resultados son iguales y en consecuencia el método es exacto) con un nivel de significación del 5%.

*Estos autores, señalan el hecho, de que el valor para el estadístico es aproximado, sin embargo, constatan que teniendo en cuenta que el valor aproximado*



*es siempre mayor que el que se obtendría utilizando la expresión más general [46, Anexo], si se concluye que el método es "exacto", siempre se obtendrá la misma conclusión al utilizar el valor sin aproximar.*

### II.4.4. VERIFICACIÓN DE LA EXACTITUD MEDIANTE LA "METODOLOGÍA DE ADICIÓN DE PATRÓN" EN PRESENCIA DE UN EFECTO MATRIZ.

Si la aplicación de la metodología de adición de patrón desarrollada en el apartado anterior no origina un error sistemático constante, sino que las rectas de adición de patrón y la de calibrado con patrones se cortan en un punto distinto del origen, nos encontramos en la situación anteriormente comentada de la existencia de una combinación de componentes de error sistemático traslacionales y rotacionales. Como esta situación invalida el protocolo desarrollado por Cuadros y col. [46], queda por tanto estimar dicho parámetro de calidad de acuerdo con un nuevo protocolo basado en la aplicación de la metodología de adición de patrón para validar dicha adición de patrón.

La validación propuesta, establecida la comprobación preliminar de la existencia de un efecto matriz, implica la utilización de los datos obtenidos en tres experiencias de calibrado: a) con porciones de muestra (calibrado de Youden), b) adición de patrón a un volumen de muestra  $V_1$  o **adición de patrón a nivel 1** y c) adición de patrón a un volumen de muestra  $V_2$  o **adición de patrón a nivel 2**.

Este nuevo protocolo utilizado requiere el *cumplimiento y verificación de una serie de premisas* que podríamos enumerar como:

a) *Cumplimiento del requerimiento establecido por Tyson [45]:*

De acuerdo con dicho autor, la aplicación adecuada del método de adición de patrón para la determinación del contenido de un analito en una determinada muestra, implica que *el efecto provocado por la presencia de la matriz* sobre la determinación del analito, sea un efecto constante, es decir, que *provoque un aumento/descenso constante de la señal instrumental con respecto al obtenido en el calibrado con patrones*, concluyendo que en la denominada *"situación interactiva de los resultados obtenidos mediante la utilización de la adición de*



## VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

*patrón, estos resultan libres de error sistemático, sólo si el efecto interactivo matriz/analito, no cambia con la relación matriz/analito, lo cual puede ocurrir cuando:*

- a.1) La cantidad de analito añadida sobre la muestra en el método de adición de patrón abarque un amplio rango de concentración.
- a.2) Para dos porciones de muestra ensayadas y manteniendo constante el rango de analito patrón añadido, se obtengan calibrados que tengan pendientes significativamente iguales.

De acuerdo con esto, *el protocolo utilizado debe conducir, para su posible utilización, a la obtención de la zona de cumplimiento del requisito de Tyson, mediante ensayos de adición de patrón a diferentes niveles de muestra, hasta encontrar la zona de saturación del efecto interactivo.*

*b) Cumplimiento de la condición de homoscedasticidad, para la aceptación de la homogeneidad de varianzas en los calibrados por adición de patrón utilizados.*

En nuestro caso, y dada la existencia de un efecto matriz, consideramos necesaria la verificación de dicha condición como requisito previo a la evaluación de la exactitud. Para ello, y siguiendo con la secuencia establecida en el apartado anterior, se utilizó un ANOVA de una vía en el que el estadístico  $F_{\text{Snedecor}}$  calculado, se comparó con el tabulado en la distribución de Snedecor para un valor de  $\alpha = 0.05$  y un número de grados de libertad dado por  $n_{\text{adición de patrón nivel 1}} - 2$ ,  $n_{\text{adición de patrón nivel 2}} - 2$ . A su vez, se tomó como desviación estándar promedio la dada por la ecuación

$$S_{\text{promedio}} = \sqrt{\frac{(n_{AP1} - 2)S_{AP1}^2 + (n_{AP2} - 2)S_{AP2}^2}{n_{AP1} + n_{AP2} - 4}} \quad [29]$$

en la que puede apreciarse, que se utilizaron las desviaciones estándar de regresión de cada calibrado, ya que experimentalmente, el número de medidas utilizado en las distintas adiciones de patrón era el mismo. Como desviación estándar relativa representativa de los calibrados se utiliza la desviación estándar promedio de estos dada por:



## CAPITULO II

---

$$s_{promedio} = \sqrt{\frac{(n_{AP1} - 2)S_{AP1}^2 + (n_{AP2} - 2)S_{AP2}^2}{n_{AP1} + n_{AP2} - 4}} \quad [30]$$

c) *Evaluación de la igualdad de pendientes para las adiciones de patrón obtenidas en las porciones de muestra seleccionadas.*

Dichas pendientes deben ser significativamente iguales. La evaluación de la igualdad de pendientes debe hacerse aplicando un test de la t de Student - descrito en el apartado anterior-, en este caso el estadístico calculado se compara con el tabulado para  $(n_{adición\ a\ nivel\ 1} + n_{adición\ a\ nivel\ 2} - 4)$  grados de libertad, aceptándose la hipótesis nula (igualdad de pendientes) para un nivel de significación menor del 1% (no se utiliza el nivel tradicional del 5% por ser un test demasiado robusto para el número de grados de libertad considerado).

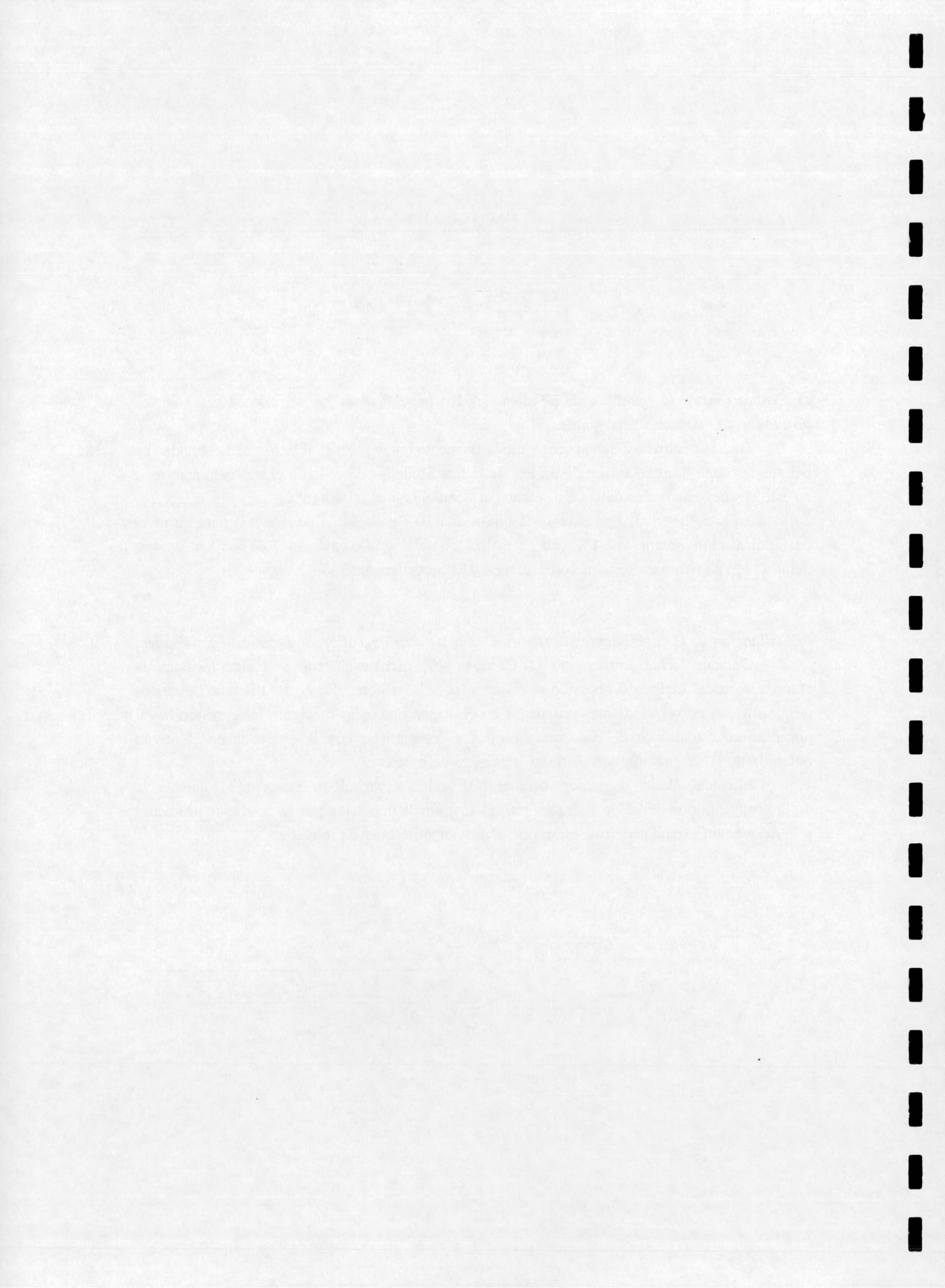
d) *Evaluación de la componente de error constante a partir del calibrado propuesto por Youden*

De acuerdo con lo recogido por Cardone [49], dicha evaluación se realiza mediante la comparación del calibrado obtenido al restar a las señales obtenidas en las distintas adiciones de patrón, las correspondientes ordenadas en el origen obtenidas mediante la regresión lineal por mínimos cuadrados de cada una de ellas y compararlas con la ordenada en el origen obtenida de la calibración con distintas porciones de muestra.

El cálculo de los contenidos de analito se realiza a partir de la ecuación [31] que deriva de la propuesta por Ferrús y Torrades [50] al sustituir la pendiente por la pendiente promedio y la desviación estandar de regresión por la desviación estándar promedio.

$$c_0 = \frac{\bar{S} b_{promedio}}{b_{promedio}^2 - (t^2 s_{promedio}^2 / \sum (c_i - \bar{c})^2)} - (1/n) \sum c_i \pm \frac{t s_{promedio}}{b_{promedio}^2 - (t^2 s_{promedio}^2 / \sum (c_i - \bar{c})^2)} \sqrt{\frac{\bar{S}^2}{\sum (c_i - \bar{c})^2} + \frac{b_{promedio}^2 - (t^2 s_{promedio}^2 / \sum (c_i - \bar{c})^2)}{n}}$$





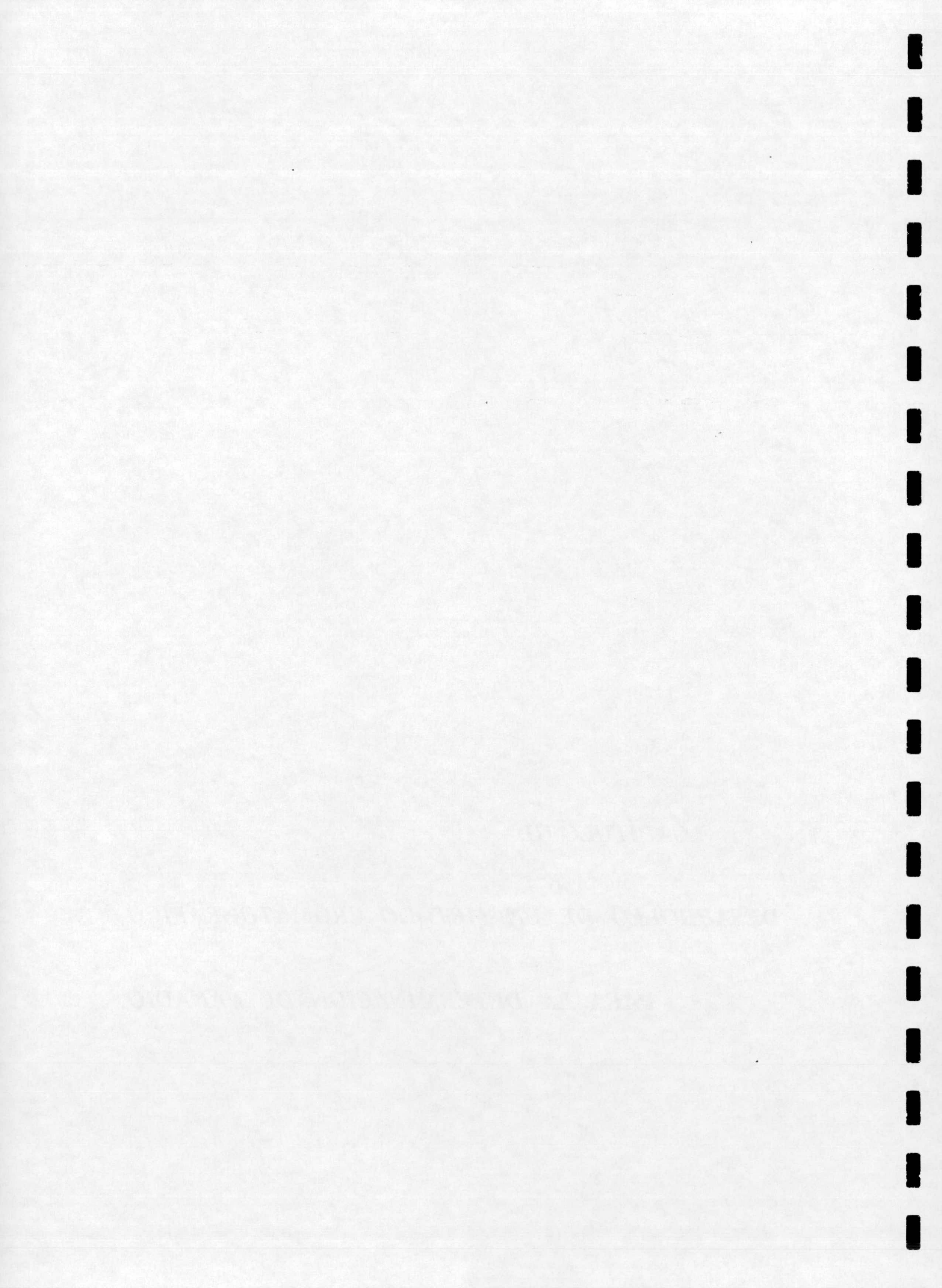


*CAPÍTULO III:*

*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO*

*PARA LA DETERMINACIÓN DE VANADIO*







## *DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA LA DETERMINACIÓN DE VANADIO*

En este estudio nos propusimos como objetivo el desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de vanadio basado en el complejo que la especie V(V) forma con uno de los reactivos analíticos más conocidos como es la N-Benzoil-N-fenilhidroxilamina (BPHA).

Se han descrito en bibliografía, dos métodos extracto-espectrofotométricos para la determinación de vanadio con BPHA, basados en la extracción en cloroformo del complejo violeta, formado a partir de un medio fuertemente ácido (HCl).

Sin embargo, algunos de los parámetros analíticos de dichos métodos no coinciden. Por ejemplo, Ryan en 1960 [1], propone para llevar a cabo la extracción HCl 5-9 M y una concentración de BPHA en  $\text{CHCl}_3$  del 0.4% (p/v), mientras que no establece un tiempo de agitación óptimo. Por otro lado, en 1961 Priyadarshini [2], aconseja un medio HCl 2.8-4.3 M, una concentración de reactivo del 0.1 % (p/v) y un tiempo de agitación de un minuto.

Dada la discrepancia en los datos, decidimos estudiar las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el procedimiento extractivo, como paso previo al estudio cromatográfico.



### III.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSAS VARIABLES SOBRE LA EXTRACCION DE V(V) CON BPHA EN CLOROFORMO.

#### III.1.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE HCl.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de ácido clorhídrico sobre la formación y extracción del complejo V(V)-BPHA, se verificó para 4 ppm de V(V) en fase acuosa (25 ml) y empleando 10 ml de una disolución al 0.1% (p/v) de BPHA en  $\text{CHCl}_3$  como extractante, utilizando un tiempo de agitación de 1.5 min.. Se registraron los espectros de absorción de los extractos -preparados de acuerdo con el procedimiento descrito en la metodología- en un rango de longitudes de onda comprendido entre 450 y 600 nm, frente a una disolución de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ .

Los valores de absorbancia obtenidos para la  $\lambda_{\text{máx}}$  se recogen en la siguiente tabla y se representan en la figura nº III.1.

TABLA III.1. Influencia de la acidez clorhídrica sobre la extracción de V(V)-BPHA en  $\text{CHCl}_3$ .

[HCl] (M)	A <sub>f.o.*</sub>	$\lambda_{\text{max}}$
1	0.533	499
2	0.852	521
3	0.961	527
4	0.988	527
5	0.851	528
6	0.613	526

\* f.o. = fase orgánica



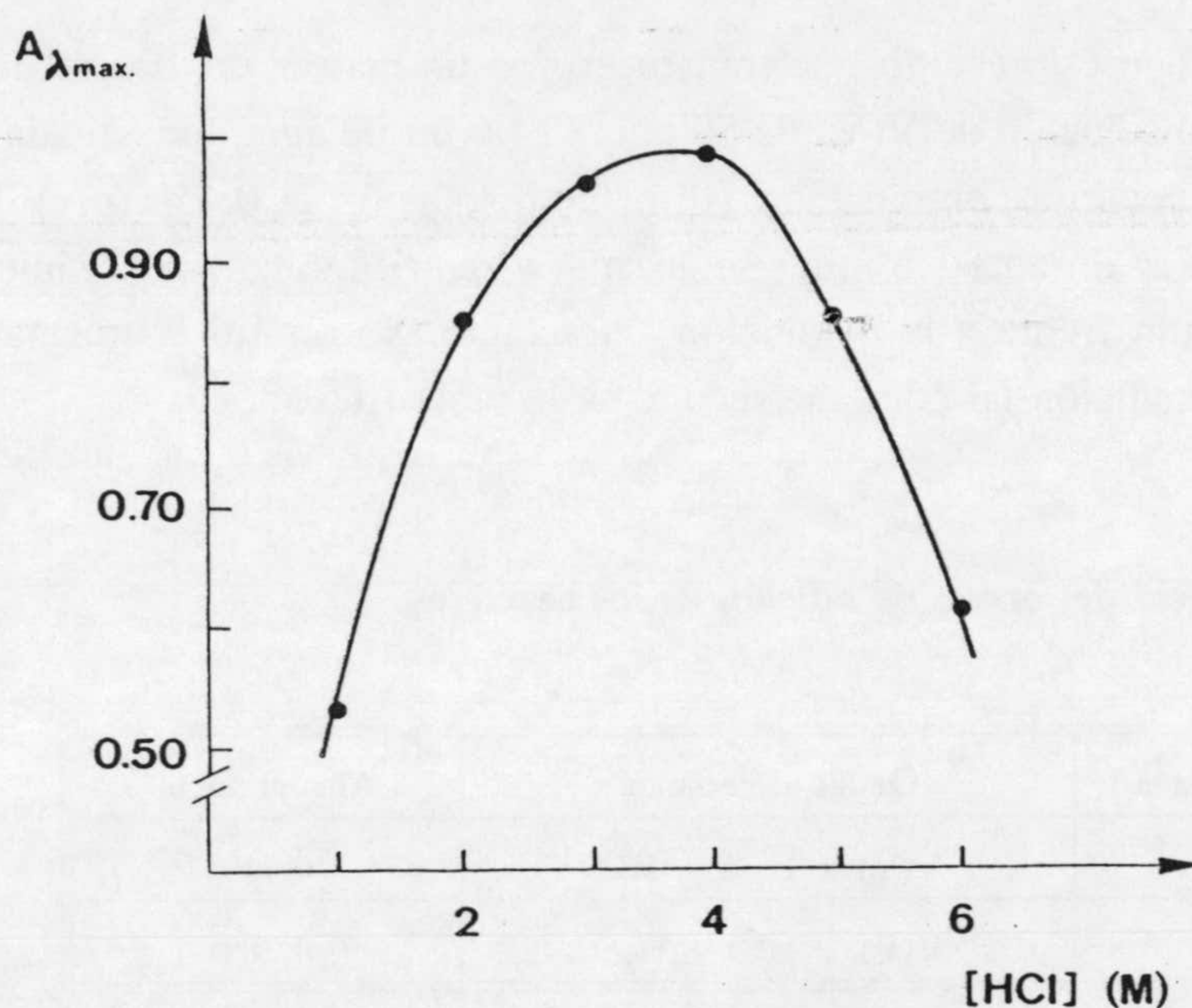


FIGURA. III.1. Influencia de la concentración de HCl sobre la absorbancia del complejo V(V)-BPHA.

De los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1.- En el rango de acidez estudiado se observa que para concentraciones de HCl entre 3 y 6 N la longitud de onda de máxima absorción permanece prácticamente constante e igual a 527 nm, mientras que para concentraciones iguales o inferiores a 2 N se desplaza hacia valores menores. Este hecho se atribuye [3] a la formación de dos complejos de V(V) con la BPHA, uno violeta para concentraciones de HCl superiores a 2 N y otro pardo rojizo para [HCl] inferiores a 0.01 N, coexistiendo ambos complejos en la zona comprendida entre 2 y 0.01 N.
- 2.- Cuando la extracción se realiza partiendo de una concentración de HCl 3-4 N, se obtiene la máxima absorbancia.

A partir de esta experiencia, se toma como [HCl] óptima para realizar la extracción del complejo, la dada por un valor de 4 M.



## VANADIO

### III.1.2. INFLUENCIA DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LOS REACTIVOS.

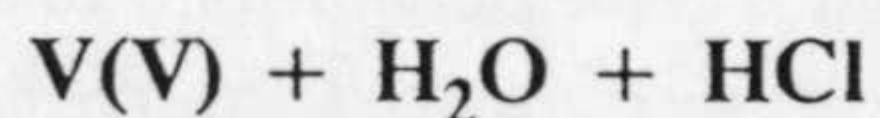
Para llevar a cabo este estudio, se transfirieron a un matraz de 100 ml las siguientes cantidades: 1.6 ml de disolución de V(V) de 50 ppm, 14.6 ml de agua bidestilada y 8.8 ml de HCl concentrado, añadiendo a continuación 10 ml de disolución al 0.1% (p/v) de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ . Se agitó el matraz durante 1.5 min., se decantó y centrifugó la fase orgánica y se midió su absorbancia a 527 nm frente a la disolución extractante. Se repitió la misma experiencia cambiando el orden de adición tal como se recoge en la tabla III.2.

TABLA III.2. Influencia del orden de adición de los reactivos.

Muestra	Orden de adición	Absorbancia
1	V(V) + H <sub>2</sub> O + HCl	0.410
2	V(V) + HCl + H <sub>2</sub> O	0.383

De los datos recogidos en dicha tabla, se deduce que *la adición directa del ácido clorhídrico sobre la disolución de V(V), provoca una disminución sensible de la absorbancia respecto a la experiencia en la que se añade el agua antes que el ácido. Este efecto puede ser debido a una posible polimerización del V(V) por la elevada concentración de ácido (?)*.

A partir de aquí, y para experiencias sucesivas se toma como orden de adición el dado por



### III.1.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO EN FASE ORGÁNICA.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de BPHA en fase orgánica sobre



### CAPÍTULO III

---

la extracción del complejo V(V)-BPHA se realizó para una fase acuosa (25 ml) que contenía 1 ppm de V(V) y era 4 M en HCl. El volumen de fase orgánica utilizado fue de 10 ml, con una concentración de BPHA variable.

Se midió la absorbancia de los extractos frente al blanco correspondiente y los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.3 y se representan en la figura III.2.

TABLA III.3. Influencia de la concentración de reactivo en la fase orgánica.

$C_{\text{Reactivo}}$ (% p/v)	Absorbancia ( $\lambda = 527$ nm)
0.005	0.150
0.010	0.184
0.025	0.230
0.050	0.243
0.075	0.245
0.100	0.254
0.200	0.250



## VANADIO

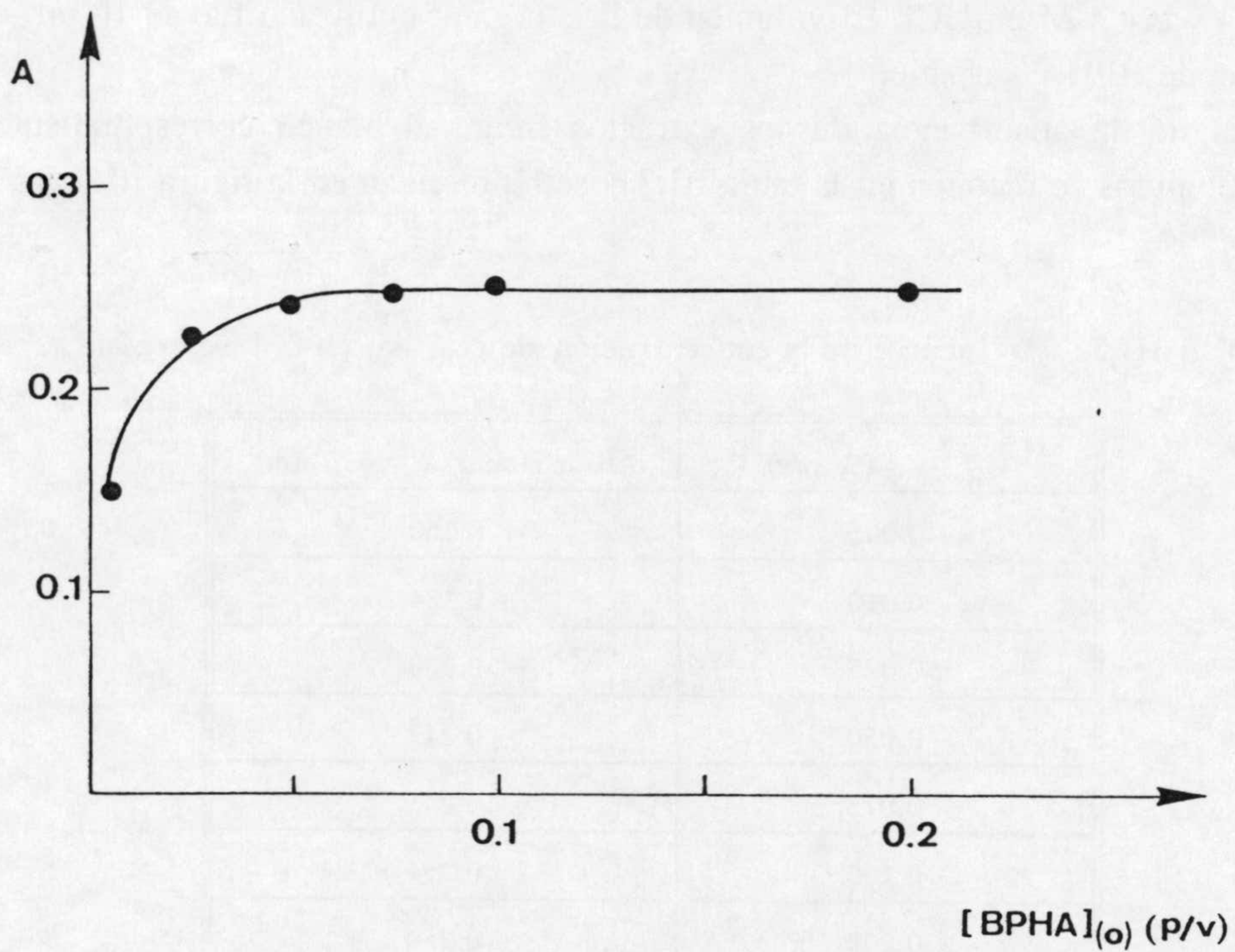


FIGURA III.2. Influencia de la concentración de reactivo en la fase orgánica sobre la extracción del complejo V(V)-BPHA.

Se puede observar que a partir de una concentración de reactivo en fase orgánica de un 0.05 %, la absorbancia permanece prácticamente constante.

Para posteriores experiencias, se eligió una concentración de BPHA del 0.1 %.



## CAPÍTULO III

### III.1.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACIÓN.

Con objeto de comprobar la influencia que el tiempo de agitación ejerce sobre la extracción del sistema V(V)-BPHA, se midieron las absorbancias de extractos obtenidos para una fase acuosa que contenía 0.4 ppm de V(V) y era 4 M en HCl, agitada con 10 ml de disolución al 0.1 % de BPHA en CHCl<sub>3</sub>. Los tiempos de agitación fueron variables y los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.4.

TABLA III.4. Influencia del tiempo de agitación.

Tiempo de agitación	Absorbancia ( $\lambda = 527 \text{ nm}$ )
15 s	0.104
30 s	0.105
1.0 min	0.105
1.5 min	0.104
2.0 min	0.105
3.0 min	0.106
5.0 min	0.104

Se puede observar que *la absorbancia se mantiene constante en el rango de tiempos de agitación estudiado, resultando la extracción del complejo prácticamente instantánea*, por lo que para posteriores experiencias se consideró suficiente un tiempo de agitación de 30 s.

### III.1.5. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DEL COMPLEJO V(V)-BPHA.

El estudio de la estabilidad del complejo de V(V)-BPHA extraído en CHCl<sub>3</sub>, se realizó manteniendo constantes las condiciones operatorias establecidas en apartados anteriores; disolución acuosa 4 M en HCl, concentración de BPHA en CHCl<sub>3</sub> 0.1 % (p/v), y relación de fases 2.5:1 para 0.4 ppm de V(V) en fase acuosa. Se agitó el matraz durante 30 s y se midió su absorbancia frente a la disolución extractante utilizada, la cual se repitió para diferentes



## VANADIO

---

tiempos obteniéndose los resultados recogidos en la siguiente tabla.

**TABLA III.5. Estudio de la estabilidad del complejo V(V)-BPFA en función del tiempo.**

Tiempo (min.)	A <sub>f.o.</sub> ( $\lambda = 527$ nm)
0	0.105
5	0.104
10	0.106
15	0.104
20	0.106
35	0.105
50	0.106
140	0.099
230	0.100
530	0.107

A la vista de los resultados podemos decir que *el complejo es estable durante al menos ocho horas.*

### III.1.6. ESTUDIO DEL RANGO DE LINEALIDAD.

Con objeto de verificar el cumplimiento de la ley de Beer se llevó a cabo una experiencia para un rango de concentraciones de V(V) en fase acuosa comprendido entre 0.2 y 10 ppm.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla III.6.



### CAPÍTULO III

TABLA III.6. Cumplimiento de la ley de Beer entre 0.2 y 6.0 ppm de V(V) en fase acuosa y  $r = 0.4$  ( $V_{org.}:V_{ac.}$ ).

$[V(V)]_{f.a.}$ (ppm)	$A_{f.o.}$ ( $\lambda = 527$ nm)
0.2	0.072
0.6	0.136
1.0	0.272
1.4	0.345
1.8	0.441
2.2	0.540
3.0	0.730
4.0	0.941
5.0	1.205
6.0	1.452

Ajustando por mínimos cuadrados los puntos comprendidos en este rango, se obtiene la ecuación teórica de la recta.

$$A = 0.01503 + 0.23645 C \quad (C = \text{ppm})$$
$$r = 0.999 \quad r^2 = 0.998$$

En este caso, puesto que lo que se pretendía era evaluar el rango de concentraciones en el se daba correlación entre absorbancia y concentración -estimada por el coeficiente de correlación-, no se realizó un calibrado formal con réplicas de concentración. Estadísticamente se puede concluir que, en el rango de concentraciones estudiado puede asumirse el cumplimiento de la ley de Beer.



## VANADIO

### III.1.7. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE FASES.

Con objeto de verificar el límite de aplicabilidad del método utilizado en cuanto a la relación de fases, se planificó una experiencia en la que se trabajó con una cantidad fija de V(V) en fase acuosa de 25  $\mu\text{g}$ . Dicha cantidad se extrajo modificando la relación de fases entre 1 y 0.05 ( $V_{\text{org.}}:V_{\text{ac.}}$ ), mediante la variación del volumen correspondiente de fase acuosa y extrayendo siempre con 10 ml de una disolución al 0.1 % de BPHA en  $\text{Cl}_3\text{CH}$ . Tras la agitación (30 s.) y posterior decantación y centrifugación de las fases orgánicas, se procedió a medir la absorbancia de las mismas a 527 nm frente a una disolución de BPHA al 0.1% en  $\text{CHCl}_3$ .

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla III.7.

TABLA III.7. Estudio de la influencia de la relación de fases.

$V_{\text{f.a.}}$ (ml)	Rel. Fases (r)	A
10	1.000	0.216
25	0.400	0.215
50	0.200	0.220
100	0.100	0.221
150	0.070	0.225
200	0.050	0.210

A la vista de estos resultados podemos señalar, que *el método estudiado permite trabajar en un margen de relación de fases comprendido entre 1:1 y 1:20 ( $V_{\text{org.}}:V_{\text{ac.}}$ ) sin que se observen variaciones importantes en la absorbancia.* A partir de aquí y para experiencias posteriores, se establecieron como adecuadas las relaciones de fases 1:2.5 y 1:5 sin que a priori haya inconveniente en emplear relaciones de fase menores.



## CAPÍTULO III

---

### III.1.8. MÉTODO PROPUESTO.

A partir de los datos bibliográficos y de las experiencias previamente descritas, consideramos que las condiciones óptimas para la extracción de vanadio en  $\text{CHCl}_3$  con BPHA son las que se resumen a continuación.

En matraces de 100 ml se introducen por este orden:

#### *Fase acuosa*

- Una cantidad medida de muestra que no contenga más de  $60 \mu\text{g}$  de V(V).
- La cantidad de agua bidestilada necesaria para obtener un volumen final de fase acuosa de 25 ml.
- 8.8 ml de HCl conc.

#### *Fase orgánica*

- 5 ml de una disolución de BPHA al 0.1 % (p/v) en  $\text{CHCl}_3$ .

Se agitan los matraces durante treinta segundos y se centrifugan las fases orgánicas una vez decantadas.



### III.2. DETERMINACION DE VANADIO (COMO HIDROXAMATO) MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

#### III.2.1. COMPORTAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL COMPLEJO V(V)-BPHA.

Antes de proceder al estudio del comportamiento cromatográfico del extracto clorofórmico del complejo V(V)-BPHA mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución consideramos conveniente realizar unas pruebas orientativas en la modalidad de Capa Fina. Se llevaron a cabo una serie de experiencias empleando gel de sílice como fase estacionaria sobre la que se depositaron entre 10 y 20  $\mu$ l del extracto clorofórmico del complejo. Se probaron diferentes fases móviles con los resultados que se indican a continuación:

- *Disolventes como 1,4 dioxano, diclorometano, tolueno, o mezclas de estos con  $\text{CHCl}_3$ , no son adecuados, bien porque no eluyen el complejo ( $R_F \approx 0$ ) o bien porque lo destruyen (desaparición de la coloración violeta).*
- *Cuando se utiliza  $\text{CHCl}_3$  solo también se destruye el complejo.*
- *La elución con una disolución de BPHA al 0.1 % (p/v) en  $\text{CHCl}_3$  no destruye el complejo, pero la retención es muy grande.*
- *Los mejores resultados se obtuvieron empleando fases móviles compuestas de mezclas  $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH}$  conteniendo BPHA. Se observó que cuanto mayor era el porcentaje de  $\text{CH}_3\text{OH}$  mayor valor se obtenía para el  $R_F$ . Por otra parte, la presencia de dicho alcohol en la fase móvil provoca un cambio en la coloración del complejo, de violeta a pardo-anaranjado.*

#### III.2.2. INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE $\text{CH}_3\text{OH}$ SOBRE EL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL COMPLEJO V(V)-BPHA.

Considerando que la adición de  $\text{CH}_3\text{OH}$  al extracto clorofórmico del complejo V(V)-



### CAPÍTULO III

BPHA provoca una variación del color de dicha especie, como se ha indicado en el apartado anterior, creimos conveniente estudiar la influencia que el  $\text{CH}_3\text{OH}$  ejerce sobre el espectro de absorción del complejo, al objeto de determinar la longitud de onda más adecuada para la detección espectrofotométrica del mismo. Para realizar este estudio se llevaron a cabo varias extracciones de vanadio siguiendo el procedimiento propuesto, partiendo siempre de una concentración del mismo en fase acuosa de 4 ppm y trabajando con una relación de fases 5:1 (Ac.:Org.). En cada caso se mezcló 1 ml del extracto clorofórmico con los volúmenes adecuados de  $\text{CH}_3\text{OH}$  y  $\text{CHCl}_3$  con objeto de obtener porcentajes del primero comprendidos entre un 5 y un 30% (v/v) en un volumen final de 5 ml. Los espectros de las disoluciones así obtenidas, registrados frente a los blancos correspondientes ( $\text{CH}_3\text{OH} : \text{CHCl}_3$  en igual proporción que en la muestra) se representan en la figura III.3, donde se observa que la presencia de  $\text{CH}_3\text{OH}$  provoca un desplazamiento de la  $\lambda_{\text{máx}}$  a 430 nm, y que la posición del mismo es prácticamente independiente del porcentaje de alcohol. También se puede observar que el espectro del reactivo no presenta absorbancia a dicha longitud de onda.

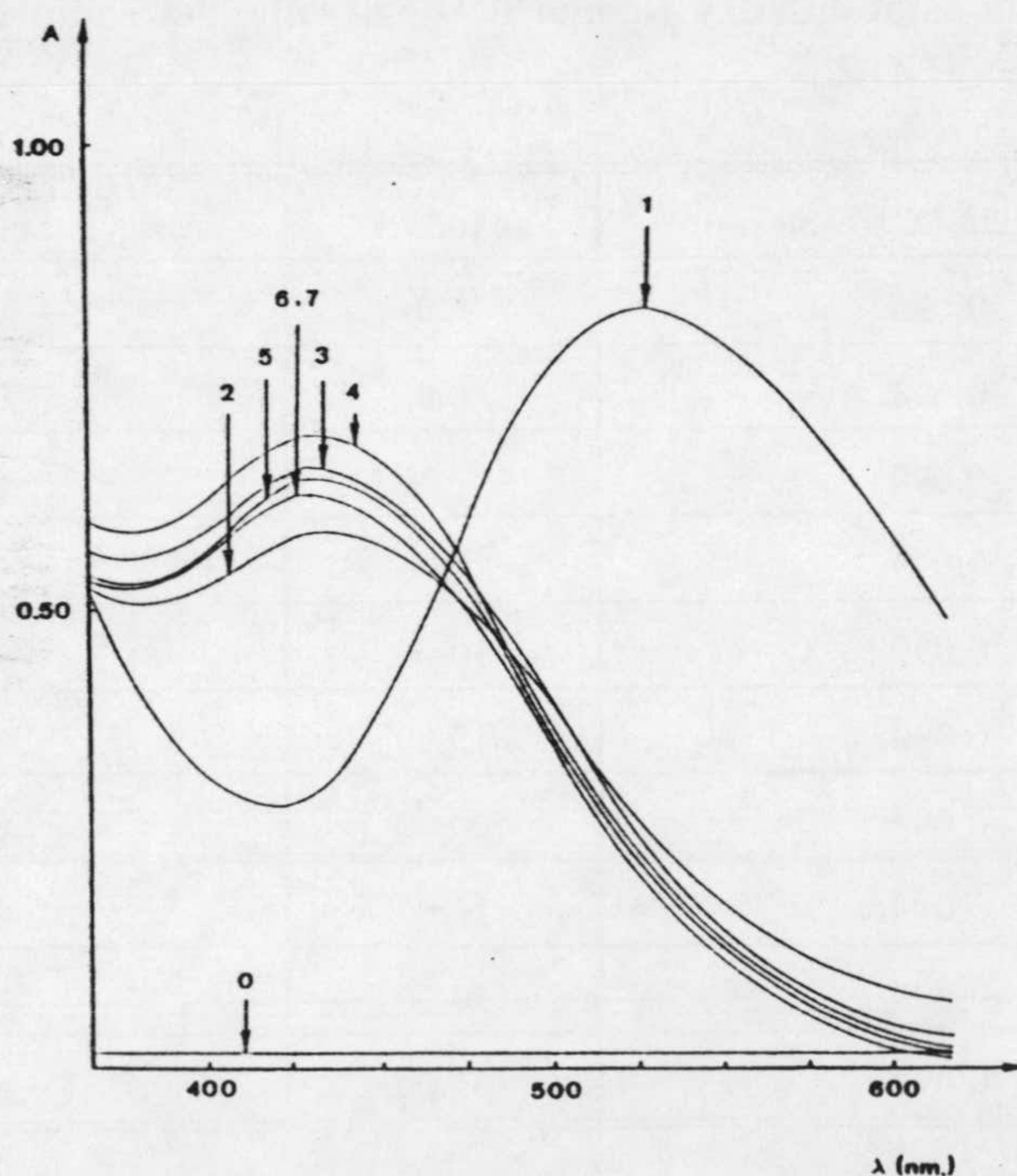


FIGURA III.3 Espectros de absorción del complejo V(V)-BPHA en  $\text{CHCl}_3$  (1) y en varias mezclas  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{CHCl}_3$ : (2), 5%  $\text{CH}_3\text{OH}$  (v/v); (3), 10%; (4), 15%, (5), 20%; (6), 25%; (7), 30%. Espectro de absorción de BPHA (0).



## VANADIO

### III.2.3. ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD Y DEL TIEMPO DE DESARROLLO DEL COMPLEJO V(V)-BPHA EN $\text{CHCl}_3$ : $\text{CH}_3\text{OH}$ .

Con objeto de estudiar la evolución que sufre la coloración del complejo V(V)-BPHA extraído en  $\text{CHCl}_3$  tras la adición de un 3% (v/v) de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , se planificó la siguiente experiencia, en la que se trabajó con una concentración de 0.200 ppm de V(V) en fase acuosa y se utilizó una relación de fases 5:1 (Ac.:Org.).

De la fase orgánica resultante, se transfirieron a un tubo de ensayo 9.7 ml sobre los que se agregaron 0.3 ml de  $\text{CH}_3\text{OH}$  con objeto de obtener un porcentaje del 3% en dicho alcohol; tras su homogeneización se procedió a la medida de la absorbancia en función del tiempo a 430 nm.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.8.

TABLA III.8. Estudio de la estabilidad y tiempo de desarrollo del complejo V(V)-BPHA en presencia de  $\text{CH}_3\text{OH}$ .

t (min.)	Absorbancia ( $\lambda = 430$ nm)	t (min.)	Absorbancia ( $\lambda = 430$ nm)
0.00	0.095	5.0	0.099
0.50	0.098	6.0	0.099
1.00	0.099	7.00	0.099
1.50	0.099	8.00	0.100
2.00	0.099	10.00	0.100
2.50	0.099	15.00	0.100
3.00	0.099	20.00	0.100
3.50	0.099	25.00	0.100
4.00	0.099	30.00	0.100
4.50	0.099	35.00	0.100

A la vista de los resultados podemos comentar que el desarrollo del complejo es



### CAPÍTULO III

---

prácticamente instantáneo, resultando ser estable durante al menos treinta minutos después de su preparación.

#### III.2.4. PRUEBAS PRELIMINARES MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en las experiencias llevadas a cabo sobre placas de gel de sílice y considerando que el complejo se encuentra en un medio clorofórmico (disolvente poco polar), más adecuado a priori para trabajar en fase normal, nos pareció conveniente seleccionar un sistema cromatográfico de las siguientes características:

**Columna:** Cartucho HPLC Lichrocart 250-4 (Merck), relleno de partículas de fase estacionaria Superspher Si60 ( $5\ \mu\text{m}$ ) de longitud 244 mm y de 4 mm de diámetro interno.

**Precolumna:** Lichrocart 4-4 (Merck) empaquetada con la misma fase estacionaria y tipo de partícula Lichrospher ( $5\ \mu\text{m}$ ).

Los cromatogramas iniciales se registraron en las siguientes condiciones:

**Fase móvil:**

- 5%  $\text{CH}_3\text{OH}$ .
- 95%  $\text{CHCl}_3$ .
- $4.69 \times 10^{-4}$  M en BPHA.

**Detección:** Espectrofotométrica a 430 nm.

**Volumen de inyección:** 20  $\mu\text{l}$ .

**Flujo de fase móvil:** 1.0  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ .



## VANADIO

Se inyectaron diferentes extractos orgánicos del complejo V(V)-BPHA obtenidos a partir de disoluciones de 0.4, 1.0 y 1.6 ppm de V(V) en fase acuosa, obteniéndose los cromatogramas reunidos en la Fig. III.4.

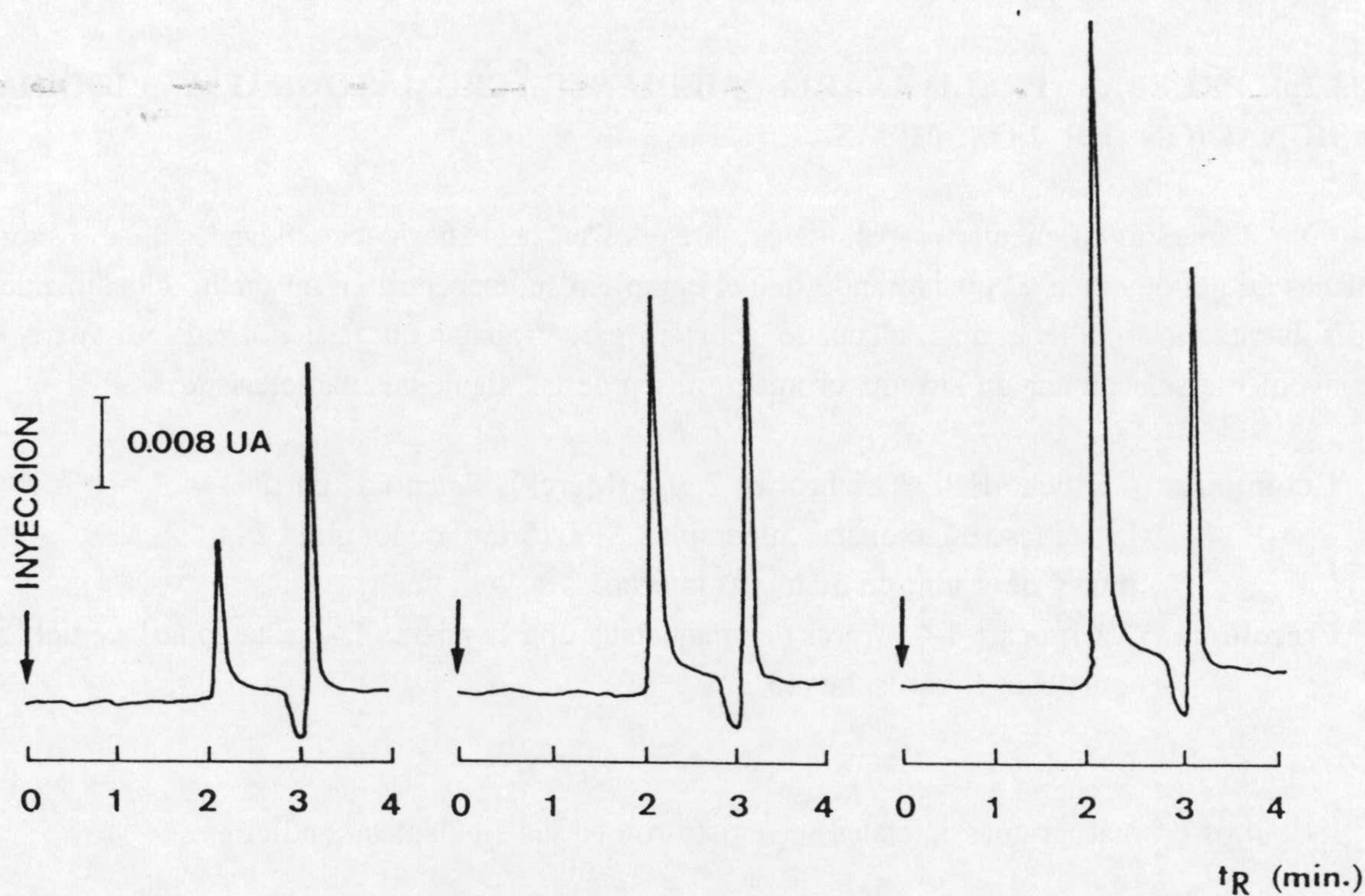


FIGURA III.4. Asignación de los distintos picos que aparecen en el cromatograma.

En dicha figura, se puede observar que:

- 1.- El pico cuyo tiempo de retención es de 2.13 min., debe corresponder al complejo V(V)-BPHA, puesto que su tamaño se modifica proporcionalmente a la cantidad de vanadio extraído.
- 2.- Aparece un segundo pico, precedido de una penetración de la línea base, que puede atribuirse según Stranachan y Deming [4], a la BPHA. Este hecho, sería debido, desde



### CAPÍTULO III

---

*nuestro punto de vista y de acuerdo con estos autores, a una alteración de la fase estacionaria provocada por una modificación local y transitoria de la misma, debido a la diferencia de concentración de BPHA entre la fase móvil y el extracto inyectado.*

Se llegó a esta conclusión, dado que la inyección de cloroformo solo y BPHA en cloroformo, y diferentes mezclas de ambos con etanol (estabilizante del cloroformo) conducía a la obtención del pico mencionado salvo en el caso, de que la muestra inyectada tuviese la misma composición que la fase móvil, donde no se obtenía dicho pico.

#### III.2.5. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN Y VELOCIDAD DE LA FASE MÓVIL.

##### III.2.5.1. Influencia de la composición de la fase móvil.

Se estudió en primer lugar, la influencia que la composición de la fase móvil ejercía sobre el comportamiento cromatográfico del complejo, partiendo siempre de disoluciones de 0.2 ppm de V(V) en fase acuosa extraídas según el método descrito.

##### III.2.5.1.1. *Influencia del porcentaje de CH<sub>3</sub>OH.*

Se llevaron a cabo diferentes pruebas inyectando en cada caso 20  $\mu$ l del extracto y modificando la proporción de CH<sub>3</sub>OH desde cero a un 30 %.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.9 y en la gráfica III.5.



VANADIO

TABLA III.9. Influencia del porcentaje de CH<sub>3</sub>OH de la fase móvil, sobre la retención cromatográfica del complejo V(V)-BPHA.

* % CH <sub>3</sub> OH	t <sub>R</sub> (complejo)	t <sub>R</sub> ( pico cercano)
0	No detectable	No detectable
1	"	"
2	2.415	4.232
3	2.216	3.755
5	2.144	3.261
7	2.101	2.927
9	2.072	2.755
10	2.056	2.704
12.5	2.051	2.591
15	2.045	2.516
20	2.046	2.434
30	2.074	2.074

\* Fase móvil: CH<sub>3</sub>OH : CHCl<sub>3</sub>, 4.69x10<sup>-4</sup> M en BPHA.  
Flujo: 1 ml.min<sup>-1</sup> ; λ = 430 nm.



### CAPÍTULO III

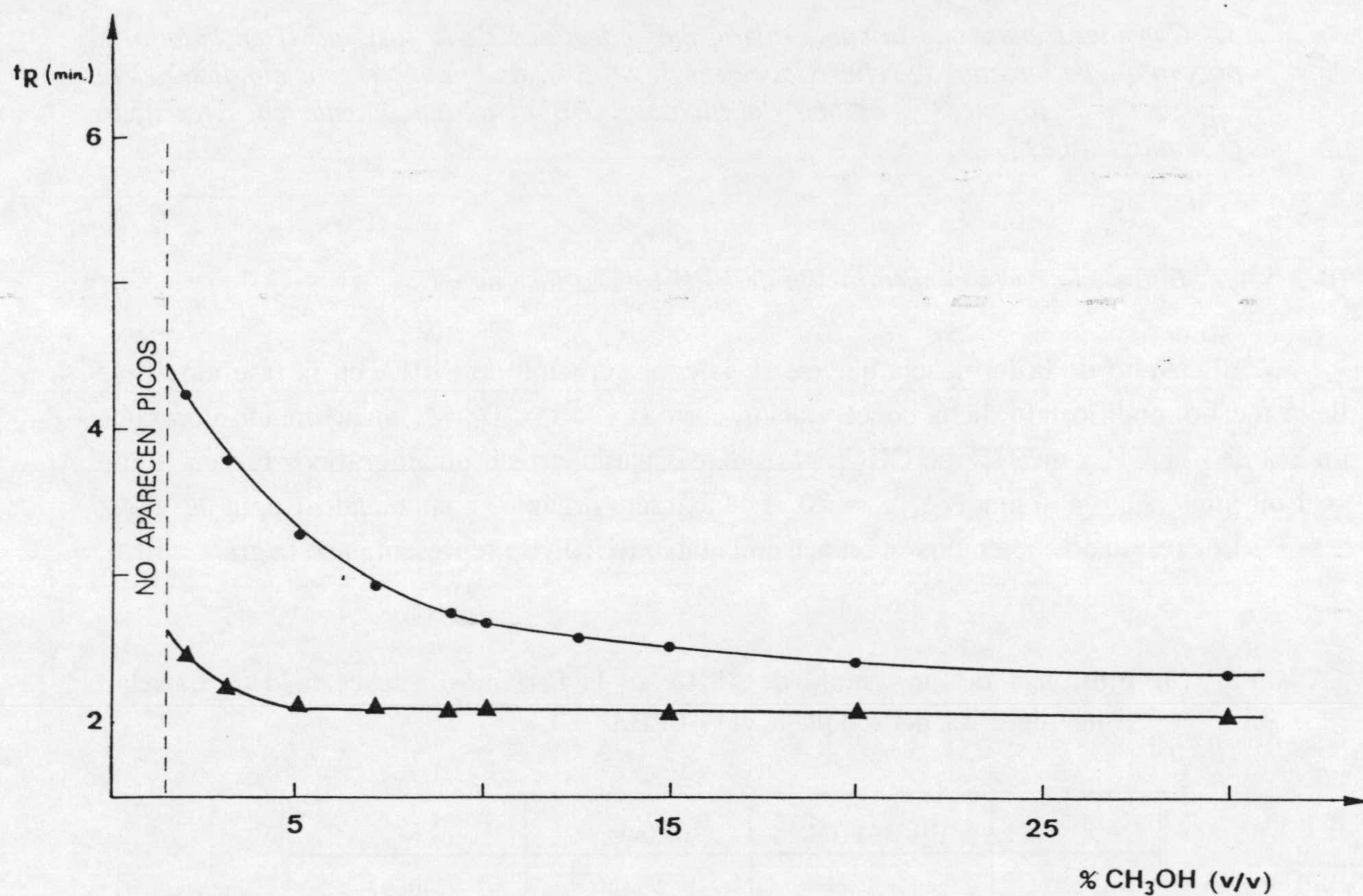


FIGURA III.5. Influencia del porcentaje de CH<sub>3</sub>OH sobre la retención del complejo V(V)-BPHA.

De los resultados obtenidos se puede deducir :

1.- Para porcentajes de CH<sub>3</sub>OH inferiores a un 2% no se obtiene ningún pico, debido a una gran retención.

2.- A partir de un 2% de CH<sub>3</sub>OH, el t<sub>R</sub> del complejo disminuye, y se estabiliza para porcentajes del mismo superiores al 9%.

Así mismo, al aumentar el porcentaje de metanol, la resolución entre los picos del cromatograma va disminuyendo gradualmente.



## VANADIO

3.- Consideraremos que la composición más adecuada de la fase móvil en cuanto al porcentaje de metanol se refiere, debe ser de un 3%, dado que en esas condiciones la separación de los picos es óptima y el pico que se obtiene tiene buenas características cromatográficas.

### III.2.5.1.2. Influencia de la concentración de BPHA en la fase móvil.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de BPHA en la fase móvil, se llevó a cabo modificando dicha concentración entre 0 y  $2.34 \times 10^{-3}$  M, manteniendo constante un 3% de  $\text{CH}_3\text{OH}$  y un 97% de  $\text{CHCl}_3$ . Los demás parámetros cromatográficos fueron: Flujo =  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\lambda = 430 \text{ nm}$ ;  $V_{\text{inyec.}} = 20 \mu\text{l}$  de extracto orgánico conteniendo 1 ppm de V(V).

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.10 y se representan en la gráfica III.6,

**TABLA III.10. Influencia del porcentaje de BPHA en la fase móvil, sobre la determinación cromatográfica del complejo V(V)-BPHA.**

% BPHA	[BPHA] (M)	$t_R$ (min.)	Area <sub>pico</sub>
0.000	=====	2.213	140697
0.001	$0.47 \times 10^{-4}$	2.196	194933
0.004	$1.87 \times 10^{-4}$	2.209	275173
0.007	$3.28 \times 10^{-4}$	2.176	295936
0.010	$4.68 \times 10^{-4}$	2.216	305363
0.015	$7.03 \times 10^{-4}$	2.217	309615
0.020	$9.40 \times 10^{-4}$	2.210	295314
0.025	$11.7 \times 10^{-4}$	2.199	287353
0.030	$14.0 \times 10^{-4}$	2.209	283439
0.035	$16.4 \times 10^{-4}$	2.211	290289
0.040	$18.7 \times 10^{-4}$	2.208	300290
0.050	$23.4 \times 10^{-4}$	2.213	294405



CAPÍTULO III

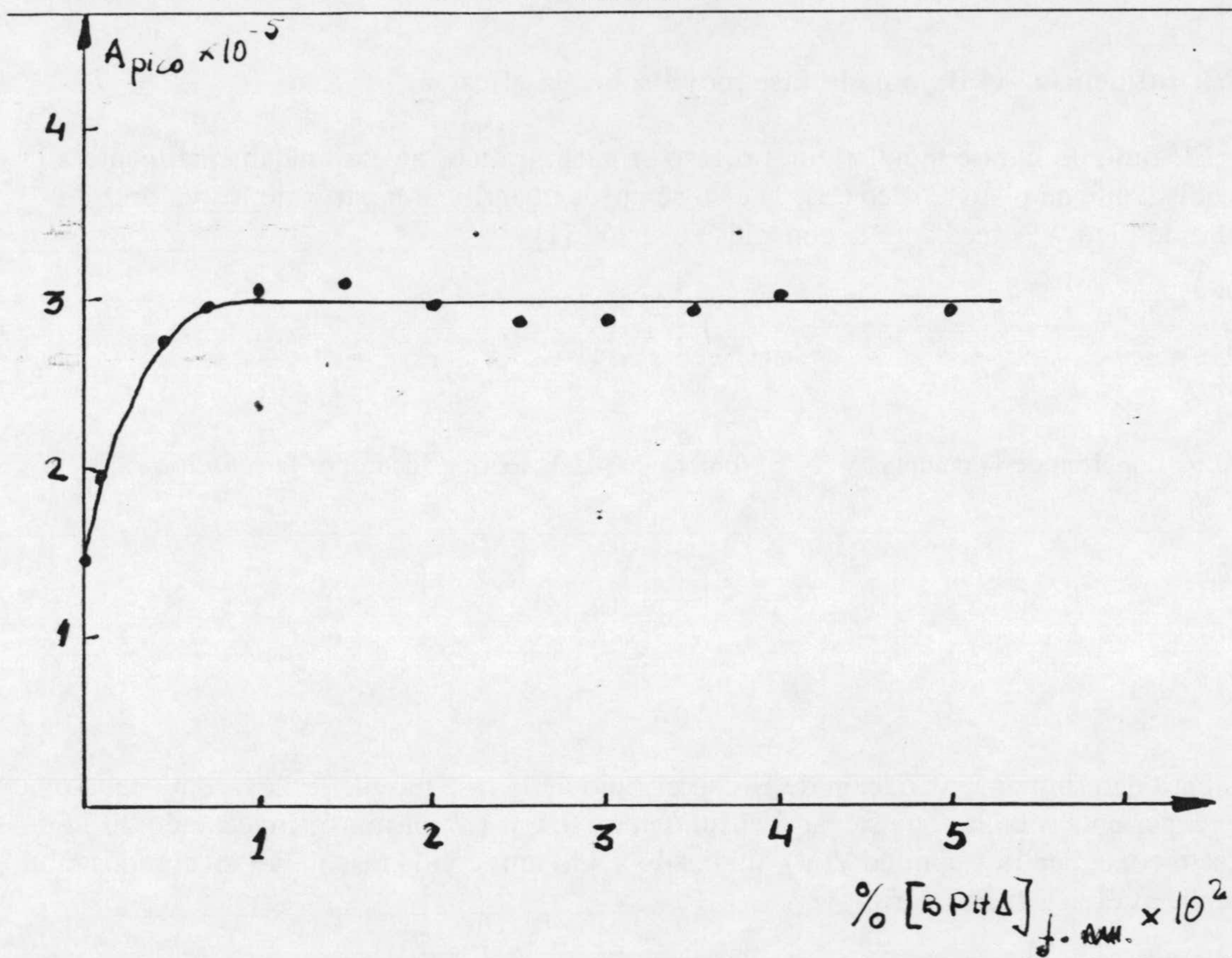


FIGURA III.6. Influencia del porcentaje de BPHA en la fase móvil sobre la determinación cromatográfica de 20 ng de V(V) como complejo V(V)-BPHA.

donde se puede observar que:

- 1.- El  $t_R$  del complejo no se modifica al variar la concentración de reactivo en la fase móvil.
- 2.- Al aumentar la concentración de BPHA en la fase móvil, aumenta el área de pico, la cual no se modifica sustancialmente para una concentración de reactivo de  $4.7 \times 10^{-4}$  M.

Para posteriores experiencias la composición de la fase móvil se estableció en:

3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  ; 97%  $\text{CHCl}_3$ ;  $9.40 \times 10^{-4}$  M en BPHA.



## VANADIO

### III.2.5.2. Influencia del flujo de la fase móvil sobre la eficacia.

EL flujo de la fase móvil en un proceso cromatográfico, afecta fundamentalmente a la altura equivalente de plato teórico (H), la cual se puede cuantificar a partir de los valores de  $t_R$  y anchura de pico  $w^{1/2}$  mediante la conocida ecuación [1].

$$H = \frac{L}{N} \quad [1]$$

siendo: L= Longitud de la columna y N= Número de platos teóricos dado por la ecuación [2].

$$N = 5.54 \left( \frac{t_R}{w^{1/2}} \right)^2 \quad [2]$$

Para determinar la variación de H con el flujo de la fase móvil, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se varió el flujo entre 0.1 y 1.2 ml.min<sup>-1</sup>, inyectando 20 µl de un extracto conteniendo 1 ppm de V(V), midiendo a 430 nm, con la fase móvil de composición establecida en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.11 y se representan en la figura III.7.

**TABLA III.11** Influencia del flujo de fase móvil sobre la altura equivalente de plato teórico.

Flujo (ml.min <sup>-1</sup> )	$t_R$ (min.)	$W^{1/2}$	N	H (cm)
0.1	21.898	2.008	658	37.00x10 <sup>-3</sup>
0.2	10.994	0.709	1331	18.00x10 <sup>-3</sup>
0.3	7.250	0.317	2896	8.40x10 <sup>-3</sup>
0.5	4.346	0.196	2722	8.97x10 <sup>-3</sup>
0.7	3.114	0.144	2589	9.40x10 <sup>-3</sup>
1.0	2.220	0.106	2464	9.90x10 <sup>-3</sup>
1.2	1.827	0.092	2183	11.00x10 <sup>-3</sup>



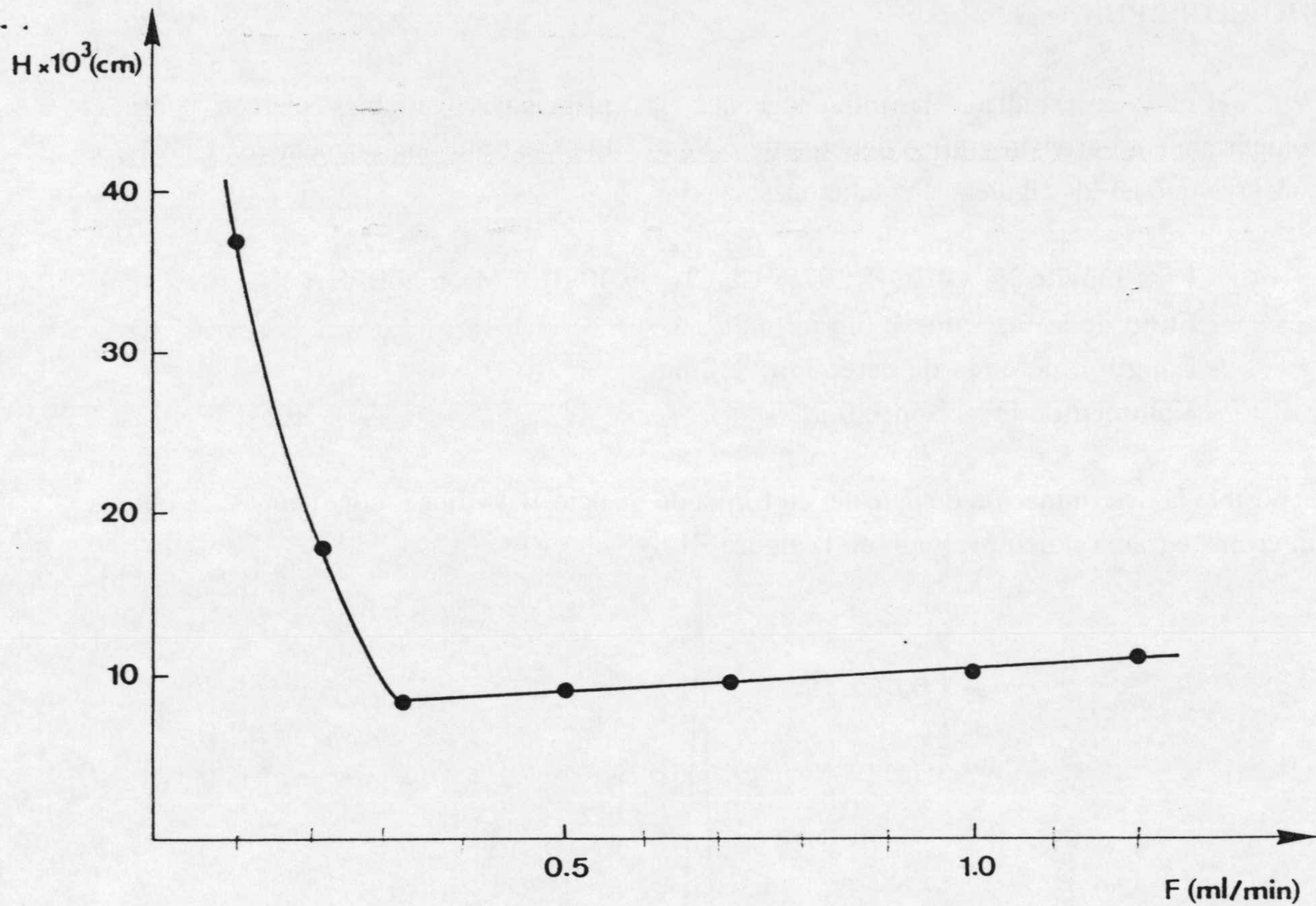


FIGURA III.7. Variación de H en función del flujo de la fase móvil

Los resultados obtenidos, muestran un comportamiento típico del sistema de acuerdo con la ecuación de Van Deemter, deduciéndose que la máxima eficacia se obtendría para un flujo de  $0.3 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . No obstante, consideramos conveniente utilizar como valor más adecuado, un flujo de  $0.5 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , ya que no representa una pérdida apreciable de eficacia respecto al flujo óptimo y se encuentra en la zona en la que H se ve menos afectada por  $v$  proporcionando a su vez un tiempo de análisis menor.



III.2.6. METODO PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE VANADIO CON BPHA.

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre el comportamiento cromatográfico del complejo V(V)-BPHA extraído previamente en  $\text{CHCl}_3$ , se concluye que en las siguientes condiciones:

- Fase móvil: 3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 97%  $\text{CHCl}_3$  ( $9.40 \times 10^{-4}$  M en N-BPHA ).
- Flujo de la fase móvil:  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .
- Longitud de onda de detección: 430 nm.
- Volumen de inyección:  $20 \mu\text{l}$ .

es posible la determinación de vanadio en forma de quelato. Bajo dichas condiciones, se obtiene un cromatograma típico recogido en la figura III.8.

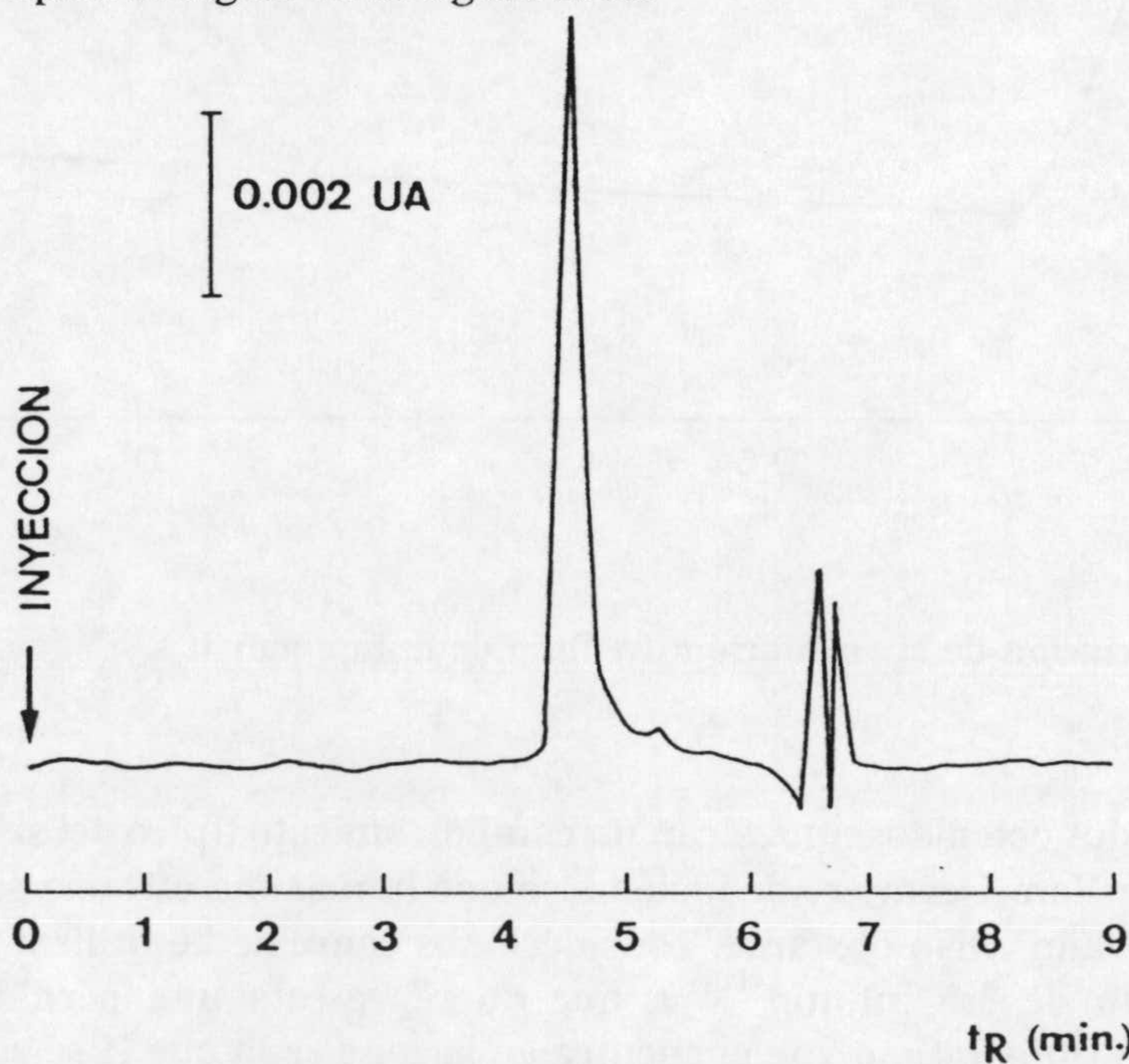


FIGURA III.8. Cromatograma típico de la determinación de 0.1 ppm de V(V) en fase acuosa. CONDICIONES: *Extracción*:  $r = 0.2$  (Org./Ac.); [BPHA] = 0.1 % (p/v) en  $\text{CHCl}_3$ ; *Cromatográficas*: Fase móvil = 3%  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 97%  $\text{CHCl}_3$  ( $9.40 \times 10^{-4}$  M en N-BPHA); Flujo =  $0.5 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{det.}}$  = 430 nm.



Queda por tanto, establecer los límites de aplicabilidad del método, respecto a concentración de analito, límite de detección (y asociado a éste la mínima masa detectable) y tolerancia a posibles iones interferentes, así como determinar sus parámetros estadísticos.

#### III.2.6.1. Evaluación de la linealidad entre señal instrumental y concentración.

Si se considera que desde un punto de vista meramente cromatográfico, al igual que en el análisis de trazas, se establecen como objetivos primarios de una determinación la exactitud y la precisión de la medida, Snyder y col. [5] sugieren la idea de que ésta debe basarse en medidas de alturas de pico, dado que este procedimiento de cuantificación permite mayor exactitud (confiere mayor libertad en relación a posibles interferencias, ocasionadas por constituyentes de la muestra que presenten picos próximos al del analito) comparado con la cuantificación por áreas de pico. Desde este punto de vista, nos pareció oportuno iniciar el estudio del rango dinámico lineal del método propuesto, comprobando este supuesto de partida.

Para ello, se planificó una experiencia cuyo objetivo era establecer que señal instrumental -área o altura de pico- verificaba mejor la linealidad. El estudio se realizó utilizando una relación de fases 1:5 y un rango de concentraciones de V(V) en el extracto orgánico, comprendido entre 0.2 y 1.0 ppm.

En dicho estudio, se consideró más conveniente, no realizar réplicas de cada concentración, sino realizar un estudio más detallado, introduciendo incrementos menores en la variación del contenido del analito.

Los resultados obtenidos en el análisis de los cromatogramas para las señales instrumentales evaluadas (Áreas y alturas) se recogen en la siguiente tabla.



VANADIO

TABLA III.12. Datos obtenidos para la cuantificación de V(V) en función de las señales instrumentales: Área o altura de pico.

V(V) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa <sub>inyectada</sub> (ng)	A <sub>pico</sub>	h <sub>pico</sub>
0.000	0.00	=====	=====
0.020	2.00	62301	5937
0.040	4.00	122583	10150
0.060	6.00	186918	16263
0.080	8.00	272113	23737
0.100	10.00	335927	27673
0.120	12.00	426483	35346
0.140	14.00	504742	40583
0.160	16.00	570854	46564
0.180	18.00	617054	50859
0.200	20.00	707520	58396

El análisis estadístico de dichos resultados se realizó a partir del modelo de mínimos cuadrados. La evaluación de que tipo de señal explicaría mejor la linealidad se llevó a cabo a partir de los siguientes criterios:

- a) Estimación del coeficiente de variación de los factores de respuesta.
- b) Estimación de la varianza de la pendiente.
- c) Estimación de la desviación estándar relativa de la pendiente.

*a) Estimación del coeficiente de variación de los factores de respuesta.*

Los factores de respuesta obtenidos a partir de los datos experimentales, se recogen en la tabla III.13.



### CAPÍTULO III

**TABLA III.13. Factores de respuesta y coeficientes de variación de las calibraciones en áreas y en alturas.**

$[V(V)]_{f.a.}$ (ppm)	$h_{pico}$	F. de resp. f (H/c)	$A_{pico}$	F. de resp. f(A/c)
0.020	5937	296850	62301	3115050
0.040	10150	253750	122583	3064575
0.060	16263	271050	186918	3115300
0.080	23737	296712	272113	3401412
0.100	27673	276730	335927	3359270
0.120	35546	296216	426483	3554025
0.140	40583	289878	504742	3605300
0.160	46564	291025	570854	3567837
0.180	50859	282550	617054	3428077
0.200	58396	291980	707520	3537600
		%C.V. = 4.91		%C.V. = 6.12

*El valor de los coeficientes de variación de dichos factores, indica, de acuerdo con los criterios establecidos (Coeficientes de variación superiores al 5% para la falta de linealidad), la pérdida de linealidad en el caso de la utilización de la calibración en áreas de pico, hecho que nosotros atribuimos al solapamiento producido entre el pico del complejo y un pico adyacente, cuando se incrementa la cantidad de complejo inyectada. La suposición de la linealidad bajo estas condiciones de cuantificación implicaría por otro lado la obtención de una pendiente de la recta de calibrado mayor de la verdadera, cosa que posteriormente se traduciría en estimación de sensibilidad errónea.*

*b) Estimación de la varianza de la pendiente.*

Los valores obtenidos para las varianzas de las pendientes en los dos modelos de calibración estudiados son respectivamente



## VANADIO

---

- Varianza de b para la calibración en áreas . . . . .	9127.89
- Varianza de b para la calibración en alturas . . . . .	16.56

*La comparación de ambos valores, considerando lo que cada uno de ellos representa en su calibración correspondiente, se traduce en que por análisis de este parámetro, la calibración por alturas explicaría mejor la linealidad.*

### *c) Estimación de la desviación estándar relativa de la pendiente.*

Finalmente, como último criterio de verificación de la linealidad, se estiman los coeficientes de variación de las pendientes obtenidas en cada calibración. Los valores de éstos son:

- C.V.(b) % AREAS = 2.58	<b>Linealidad : 97.4 %</b>
- C.V.(b) % ALTURAS = 1.39	<b>Linealidad : 98.6 %</b>

**De todos los test realizados para evaluar la linealidad podemos concluir que en todos ellos, la calibración realizada utilizando alturas de pico como respuesta instrumental a la concentración o cantidad inyectada, muestra mayor fiabilidad (está sometida a menor influencia del error sistemático).**



### CAPÍTULO III

#### III.2.6.2. Validación del modelo lineal establecido. Estudio de la zona de linealidad utilizando una relación de fases en la extracción $r = 0.2$ (Org.:Ac.).

De acuerdo con lo establecido en el Capítulo II, se procedió a la validación del método propuesto, empezando por el estudio del rango de linealidad.

Con este objetivo, se planificó dicho estudio en un rango de concentraciones de V(V) en fase acuosa entre 0.000 y 0.200 ppm extraídas según el método descrito y mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, utilizando el modelo de mínimos cuadrados. Con objeto de poder realizar las comprobaciones anteriormente citadas, se procedió a la utilización de dos réplicas de cada concentración (dos extractos de la misma concentración), inyectando los patrones utilizados en un orden aleatorio.

Los resultados experimentales obtenidos a partir de los cromatogramas registrados, se representan en la tabla III.14.

TABLA III.14. Estudio de la zona de linealidad.

V(V) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa <sub>inyectada</sub> (ng)	h <sub>pico</sub>
0.000	0.00	=====
0.000	0.00	=====
0.040	4.00	10150
0.040	4.00	10786
0.080	8.00	23737
0.080	8.00	23950
0.120	12.00	35346
0.120	12.00	34054
0.160	16.00	46564
0.160	16.00	45632
0.200	20.00	58396
0.200	20.00	57776



## VANADIO

### III.2.6.2.1. Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Para tal fin, se procedió al análisis de los residuales mediante la representación gráfica de éstos frente a los valores experimentales de  $c_i$ . En dicha representación se observó que:

- 1) El número de residuales positivos era aproximadamente igual al de residuales negativos.
- 2) Los residuales se distribuían aleatoriamente.

**De dichas observaciones se concluyó que se cumplía la hipótesis de "homoscedasticidad" necesaria para el cumplimiento del modelo.**

### III.2.6.2.2. Comprobación del acoplamiento del modelo lineal a los puntos experimentales y que los valores de pendiente y ordenada en el origen son aceptables.

Con objeto de comprobar si el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales se aplicó el test del Análisis de la Varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.15.

**TABLA III.15. Comprobación del acoplamiento del modelo lineal a los puntos experimentales.**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gdl <sup>(1)</sup>	Media cuadrada	F	Niv. de Prob <sup>(2)</sup>
Modelo	4.7602.10 <sup>9</sup>	1	4.7602.10 <sup>9</sup>	9.63.10 <sup>3</sup>	0.0000
Residual	4943221.7	10	494322.2		
<i>Fallo de ajuste</i>	3257145.2	4	814286.3	3	0.11812
<i>Puro error</i>	1686076.5	6	281012.8		

(1) Gdl = Grados de libertad.

(2) Niv. Prob. = Nivel de Probabilidad

*A la vista de dichos datos, podemos observar que el valor del estadístico  $F_{Snedecor}$  calculado entre el factor debido al fallo de ajuste y el debido al puro error, concluye con la existencia de una buena linealidad en la zona de concentraciones de V(V) estudiada, la cual,*



### CAPÍTULO III

---

*estimaría la aleatoriedad de los resultados debida al error puro.*

A continuación, se procedió a evaluar si los valores de la ordenada en el origen y la pendiente eran adecuados, mediante la realización de un test para cada uno de ellos (comprobación de que el término independiente y la pendiente son o no significativamente diferentes de cero).

*Los valores obtenidos para el estadístico  $t_{Student}$  nos hicieron concluir por las hipótesis alternativas (término independiente significativamente igual a cero y pendiente significativamente distinta de cero).*

**Finalmente todas las conclusiones obtenidas nos llevaron a establecer como ecuación de la recta de calibrado la dada por:**

$$h = (-299.55 \pm 801.66) + (291555 \pm 6619.52)C; \quad C = \text{ppm (f. ac.)}$$

Otros estadísticos evaluados fueron:

- Desviación estándar de regresión de h sobre C	703.08
- Coeficiente de correlación	0.999481
- Coeficiente de determinación	99.90%
- Coeficiente de variación de la pendiente	1.02%
- LINEALIDAD	98.98%

**III.2.6.3. Validación del modelo lineal establecido. Estudio de la zona de linealidad utilizando una relación de fases en la extracción  $r = 0.05$  (Org.:Ac.).**

Puesto que previamente se había estudiado la posibilidad de utilizar relaciones de fase menores en la etapa de la extracción, se procedió a su vez a la validación del método propuesto para la relación de fases más baja.

Con este objeto, se planificó dicho estudio en un rango de concentraciones de V(V) en



## VANADIO

fase acuosa entre 0.000 y 0.050 ppm extraídas según el método descrito y mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, aplicando la metodología de mínimos cuadrados. Análogamente a lo realizado en el apartado anterior, se utilizaron inyecciones aleatorias de dos réplicas.

Los resultados experimentales obtenidos a partir de los cromatogramas registrados, se representan en la tabla III.16.

**TABLA III.16. Estudio de la zona de linealidad utilizando una relación de fases en la extracción  $r = 0.05$ .**

$V(V)_{f.a.}$ (ppm)	Masa <sub>inyectada</sub> (ng)	$h_{pico}$
0.000	0.00	=====
0.000	0.00	=====
0.010	4.00	11593
0.010	4.00	11093
0.020	8.00	22896
0.020	8.00	23737
0.030	12.00	36694
0.030	12.00	34054
0.040	16.00	46564
0.040	16.00	49366
0.050	20.00	58392
0.050	20.00	62332

### III.2.6.3.1. Comprobación de las hipótesis matemáticas establecidas.

Para tal fin, se procedió al análisis de los residuales mediante la representación gráfica de éstos frente a los valores experimentales de  $c_i$ . En dicha representación se observó que:



### CAPÍTULO III

- 1) El número de residuales positivos era aproximadamente igual al de residuales negativos.
- 2) Los residuales se distribuían aleatoriamente.

De dichas observaciones se concluyó que se cumplía la hipótesis de "homoscedasticidad" necesaria para el cumplimiento del modelo.

III.2.6.3.2. *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales y que los valores de pendiente y ordenada en el origen son aceptables.*

Con objeto de comprobar si el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales se aplicó el test del Análisis de la Varianza (ANOVA). Los resultados obtenidos se recogen en la tabla III.17.

TABLA III.17. *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales.*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gdl <sup>(1)</sup>	Media cuadrada	F	Niv. de Prob <sup>(2)</sup>
Modelo	5.1300x10 <sup>9</sup>	1	5.1300x10 <sup>9</sup>	2.982x10 <sup>3</sup>	0.0000
Residual	17202530	10	17202530		
<i>Fallo de ajuste</i>	1551688.0	4	387922.0	0	0.95686
<i>Puro error</i>	15650843	6	2608474		

(1) Gdl = Grados de libertad.

(2) Niv. Prob. = Nivel de Probabilidad

*A la vista de dichos datos podemos observar que el valor del estadístico  $F$  Snedecor calculado entre el factor debido al error puro y el debido al fallo de ajuste, concluye con la existencia de una buena linealidad en la zona de concentraciones de V(V) estudiada, la cual estimaría la aleatoriedad de los resultados debida al error puro.*



## VANADIO

---

A continuación, se procedió a evaluar si los valores de la ordenada en el origen y la pendiente eran adecuados, mediante la realización de un test para cada uno de ellos (comprobación de que el término independiente y la pendiente son o no significativamente diferentes de cero).

*Los valores obtenidos para el estadístico  $t_{Student}$  nos hicieron concluir por las hipótesis alternativas (término independiente significativamente igual a cero y pendiente significativamente distinta de cero).*

**Finalmente todas las conclusiones obtenidas nos llevaron a establecer como ecuación de la recta de calibrado la dada por:**

$$h = (-539.929 \pm 14095.49) + (1.21067 \times 10^6 \pm 49394.31)C; \quad C = \text{ppm (f. ac.)}$$

Otros estadísticos evaluados fueron:

- Desviación estándar de regresión de h sobre C	1311.58
- Coeficiente de correlación	0.998328
- Coeficiente de determinación	99.67%
- Coeficiente de variación de la pendiente	1.83%
- LINEALIDAD	98.16%

### III.2.6.4. Comparación de las calibraciones para las relaciones de fase estudiadas.

Como último requisito para el estudio de la linealidad del método propuesto en lo referente a las relaciones de fase estudiadas, creímos conveniente demostrar que estadísticamente las ecuaciones de las rectas de calibrado obtenidas para cada relación, eran idénticas.

Teniendo en cuenta que *el rango de concentraciones ensayado en la fase orgánica es el mismo independientemente del factor de preconcentración utilizado*, aplicamos como criterio de igualdad un test de comparación de dos pendientes empíricas [6]. Los resultados obtenidos se recogen en la siguiente tabla.



### CAPÍTULO III

TABLA III.18. Comparación de la calibración para  $r = 0.2$  y  $r = 0.05$ .

Par. estadísticos	$r = 1:5 = 0.2$	$r = 1:20 = 0.05$
O. Origen (a)	-289.17	-539.93
$s_a$	359.704	671.225
Pendiente (b)	58309.5	60533.4
$s_b$	594.032	1108.49
$t_{\text{tabulado}} (\alpha = 0.05; 10, 10 \text{ gdl}): 2.228$ ; $t_{\text{calculado}}: 1.768$		
LAS PENDIENTES SON SIGNIFICATIVAMENTE IGUALES		

#### III.2.6.5. Evaluación de la precisión.

Con objeto de evaluar la precisión del método propuesto, se procedió a un estudio de repetibilidades enfocado desde dos puntos de vista:

- Evaluando la **precisión del sistema instrumental**, es decir, analizando la variabilidad de respuesta de un único extracto orgánico en "n" inyecciones sucesivas.
- Evaluando la **precisión del método propuesto** desde la preparación de una disolución patrón hasta la obtención de la señal instrumental, es decir, analizando la variabilidad de respuesta obtenidas en "n" extracciones de una disolución patrón.

##### III.2.6.5.1. Evaluación de la precisión instrumental.

Para determinar la repetibilidad del sistema instrumental, se realizaron siete inyecciones de una misma disolución de vanadio extraída según el método descrito y en idénticas condiciones cromatográficas, ensayándose con distintas relaciones de fase.



VANADIO

a) Relación de fases  $r = 0.2$ .

Para determinar el parámetro citado utilizando esta relación de fases se ensayaron dos concentraciones de V(V) de 0.080 y 0.150 ppm extraídas de acuerdo con el método descrito. Los resultados obtenidos para siete inyecciones sucesivas en las mismas condiciones cromatográficas se recogen en la tabla III.19.

**TABLA III.19. Repetibilidad instrumental para  $r = 0.2$ .**

$h_{\text{pico}}$	[V(V)]f.a(ppb)*	$h_{\text{pico}}$	[V(V)]f.a. (ppb)*
22030	77.2	43816	151.9
23816	83.3	42878	148.7
22337	78.2	42559	147.6
22627	79.2	43652	151.4
22847	80.0	42749	148.3
23519	82.3	43046	149.3
22775	79.7	42458	147.3

\* Valores determinados a partir de las correspondientes rectas de calibrado.

El estudio estadístico realizado sobre estos resultados arroja los siguientes datos:

- Valores medios de alturas de pico ..... 22850 y 43023
- Desviaciones estándar s ..... 628.7 y 525.3

Los errores instrumentales expresados como coeficientes de variación (%C.V.) de la señal instrumental ( altura de pico) son en cada caso de 2.75 y 1.22%, respectivamente.



### CAPÍTULO III

---

- Valores medios de concentraciones	79.986 y 149.200
- Desviaciones estandar s	2.160 y 1.800

Los errores instrumentales, expresados como coeficientes de variación (%C.V.) de la concentración de analito son en cada caso del 2.70 y 1.20%, respectivamente.

b) Relación de fases  $r = 0.05$ .

En este caso, sólo se procedió al estudio de la repetibilidad instrumental para una concentración de V(V) en fase acuosa de 0.010 ppm extraída de acuerdo con el método descrito. Los resultados obtenidos al realizar siete inyecciones sucesivas de la fase orgánica se recogen en la tabla III.20.

TABLA III.20. Repetibilidad instrumental para  $r = 0.05$ .

$h_{\text{pico}}$	[V(V)]f.a.(ppb)*
11754	10.1
10954	9.4
11619	10.0
11164	9.6
11648	10.0
10960	9.4
10780	9.3

\* Valores determinados a partir de la correspondiente recta de calibrado.



## VANADIO

El estudio estadístico realizado sobre estos resultados arroja los siguientes datos:

- Valor medio de altura de pico . . . . .	11268
- Desviación estándar s . . . . .	397.1
- Valor medio de concentración . . . . .	9.686
- Desviación estándar s . . . . .	0.338

**El error instrumental, expresado como coeficiente de variación (%C.V.) viene dado por 3.52 y 3.50 % para alturas y concentraciones respectivamente.**

### III.2.6.5.2. Evaluación de la precisión del método propuesto.

Para evaluar la precisión del método propuesto se realizaron dos series de experiencias en idénticas condiciones operatorias partiendo en cada serie de disoluciones de V(V) de 0.040 o 0.200 ppm en fase acuosa. En cada caso se realizaron siete extracciones de acuerdo con el método descrito anteriormente y se utilizó una relación de fases 0.2.

Los valores de altura de pico y de concentraciones de vanadio obtenidas a partir de una recta de calibrado se recogen en la tabla III.21.

**TABLA III.21. Repetibilidad del método propuesto para  $r = 0.2$ .**

h PICO	[V(V)]f.a. (ppb)	h PICO	[V(V)]f.a. (ppb)
11920	42.5	57846	200.1
12385	44.1	59611	204.6
10410	37.3	58975	204.0
12734	45.3	56580	195.7
10529	37.7	56155	194.9
12109	43.1	59690	206.4
12618	44.9	57831	200.3



### CAPÍTULO III

---

El estudio estadístico de dichos resultados dió lugar a los siguientes datos:

- Valores medios de concentraciones (ppb) . . . . .	42.1 y 200.9
- Desviaciones estándar s . . . . .	3.3 y 4.4

Los errores del método expresados como coeficientes de variación (%C.V.) son en cada caso 7.8 y 2.2% respectivamente.

#### III.2.6.6. Sensibilidad

A partir de las observaciones realizadas en el Capítulo II de esta memoria, el cálculo de la sensibilidad, se realiza a partir de las desviaciones estándar de regresión y de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas mediante el tratamiento estadístico de regresión lineal, haciendo desde el punto de vista allí comentado, una estimación de la sensibilidad analítica del método propuesto. Los resultados obtenidos son:

- Sensibilidad analítica para $r = 0.2$ . . . . .	2.41 ppb.
- Sensibilidad analítica para $r = 0.05$ . . . . .	1.10 ppb.

Donde podemos indicar que en cada caso, las sensibilidades encontradas aportarían información acerca del mínimo intervalo de confianza discernible en todo el rango de concentraciones estudiado.

#### III.2.6.7. Límites de detección y cuantificación.

##### III.2.6.7.1. Estimación de la mínima masa detectable.

La determinación de este parámetro se realizó a partir de la ecuación [8] del Capítulo II, en la cual se sustituyeron como datos:



## VANADIO

---

- $M = 50.94 \text{ g.mol}^{-1}$ .
- $k' = 0.084$ .
- $S/N = 2$ .
- $N_0 = 5.3 \times 10^{-5} \text{ UA}$ .
- $L = 24.4 \text{ cm}$ .
- $L_c = 1 \text{ cm}$ .
- $d_c = 0.4 \text{ cm}$ .
- $\epsilon = 4075$ .
- $N = 2722$ .

El resultado obtenido fue de  $0.00085 \mu\text{g}$ , que si se considera contenido en el volumen de inyección ( $20 \mu\text{l}$ ) supone una concentración de V(V) en fase orgánica de  $0.0425 \text{ ppm}$ , es decir  $42.5 \text{ ppb}$ .

Por tanto, a partir de la concentración mínima detectable en fase orgánica y teniendo en cuenta el factor de preconcentración según la relación de fases utilizada en el procedimiento extractivo, se obtienen como límites de detección, los valores de  $8.5 \text{ ppb}$  para  $r = 0.2$  y  $2.12 \text{ ppb}$  para  $r = 0.05$ .

III.2.6.7.2. *Estimación de los límites inferiores del rango dinámico lineal, según lo establecido en el capítulo II.*

a) A partir de los datos de calibrado:

De acuerdo con la ecuación [10] del capítulo II propuesta por Cuadros y col. se obtienen los siguientes resultados:

- Relación de fases  $r = 0.2$ :

Límite de detección (aprox.) . . . . .  $\triangleright 2.29 \text{ ppb}$ .



### CAPÍTULO III

---

- Relación de fases  $r = 0.05$ :

Límite de detección (aprox.) . . . . . ▶ 1.05 ppb.

b) A partir de las consideraciones de Long & Winefordner (según la normativa de la IUPAC).

- Relación de fases  $r = 0.2$ :

Límite de decisión . . . . . ▶ 3.70 ppb.

Límite de detección . . . . . ▶ 7.40 ppb.

Límite de determinación . . . . . ▶ 12.30 ppb.

- Relación de fases  $r = 0.05$ :

Límite de decisión . . . . . ▶ 1.66 ppb.

Límite de detección . . . . . ▶ 3.33 ppb.

Límite de determinación . . . . . ▶ 5.00 ppb.

c) A partir de la evaluación de las probabilidades de falso positivo y falso negativo:

Según la recogido en el capítulo II, el análisis de las curvas características de detección del analito para dos determinaciones sobre el blanco y para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% ( $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$ ), se obtuvieron los siguientes resultados:

- Relación de fases  $r = 0.2$ :

Límite de detección . . . . . ▶ 7.5 ppb.

Altura de pico asociada . . . . . ▶ 813.

- Relación de fases  $r = 0.05$ :

Límite de detección . . . . . ▶ 3.35 ppb.

Límite de detección . . . . . ▶ 1535.

Altura de pico asociada . . . . . ▶ 5.00 ppb.



## VANADIO

---

### III.2.7. MÉTODO PROPUESTO.

Transferir a un matraz de 100 ml, una cantidad medida de muestra que no contenga más de 5  $\mu\text{g}$  de vanadio. Añadir 10 ml de agua bidestilada y 8.8 ml de ácido clorhídrico concentrado, completando finalmente hasta 25 ml con agua bidestilada. Agitar durante treinta segundos con 5 ml de una disolución al 0.1% (p/v) de BPHA en cloroformo. Separar la fase orgánica, centrifugarla y filtrarla a través de un filtro Anotop de 0.2  $\mu\text{m}$ . Inyectar 20  $\mu\text{l}$  del extracto clorofórmico en el cromatógrafo eluyendo con una disolución  $9.40 \times 10^{-4}$  M de BPHA en una mezcla  $\text{CHCl}_3$  :  $\text{CH}_3\text{OH}$  (97 : 3) a un flujo de 0.5  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### III.2.8. SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Se estudió la influencia que ejercían 46 iones extraños en la determinación de vanadio siguiendo el procedimiento recomendado y operando sobre disoluciones que contenían 2  $\mu\text{g}$  de dicho elemento en fase acuosa.

La concentración máxima ensayada para todos los iones fue de 80 ppm.

De la medida de la altura de pico de los cromatogramas registrados a partir de la inyección de 20  $\mu\text{l}$  de cada fase orgánica y con la ayuda de una recta de calibrado se determinó en cada caso, el error relativo de aquella.

Los iones eran considerados no interferentes cuando producían una desviación en la altura de pico no superior a un 5%.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.22.



CAPÍTULO III

TABLA III.22. Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 80 ppb de V(V) en fase acuosa ( $r = 0.2$ ).

Ión extraño	Concentración (ppm)	[Ión extraño]/[V]	$E_r$ %
Acetato	80	1000	1.2
$B_4O_7^{2-}$	80	1000	-1.8
$Br^-$	80	1000	3.8
$ClO_4^-$	80	1000	4.9
Citrato	80	1000	1.2
$PO_4^{3-}$	80	1000	-1.7
$I^-$	80	1000	-100.0
	0.08	1	1.3
$I^-$ (a)	80	1000	0.0
$F^-$	80	1000	3.0
$SO_4^{2-}$	80	1000	1.8
Tartrato	80	1000	-3.6
$NO_3^-$	80	1000	-2.2
$MnO_4^-$	80	1000	-100.0
	8	100	0.9
Oxalato	80	1000	3.5
Na(I)	80	1000	0.0
Li(I)	80	1000	-0.4
K(I)	80	1000	-1.2
Rb(I)	80	1000	4.2
Cs(I)	80	1000	2.2
Cu(II)	80	1000	0.9
Co(II)	80	1000	-0.5
Cd(II)	80	1000	-3.5
Zn(II)	80	1000	-10.5
	60	750	-3.7



VANADIO

TABLA III.22. (Continuación) Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 80 ppb de V(V) en fase acuosa ( $r = 0.2$ ).

Ión extraño	Concentración (ppm)	[Ión extraño]/[V]	$E_r$ %
Hg(II)	80	1000	-36.0
	2	25	-1.9
Hg(II) <sup>(b)</sup>	80	1000	-2.4
Bi(III)	80	1000	17.4
	40	500	4.3
Be(II)	80	1000	-10.3
	8	100	-1.3
Sr(II)	80	1000	9.5
	40	500	4.2
Ca(II)	80	1000	18.3
	40	500	3.2
Ba(II)	80	1000	-2.4
Al(III)	80	1000	-0.8
Sn(IV)	80	1000	0.8
Cr(III)	80	1000	0.4
As(V)	80	1000	-1.1
As(III)	80	1000	-12.7
	40	500	-2.1
Fe(III)	80	1000	-45.9
	2	25	-3.2
Fe(III) <sup>(c)</sup>	80	1000	0.0
Ni(II)	80	1000	-1.6
Mn(II)	80	1000	-4.3
Mg(II)	80	1000	16.1
	40	500	4.9
Se(IV)	80	1000	-17.6
	40	500	-2.1



CAPÍTULO III

TABLA III.22.

(Contin.) Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 80 ppb de V(V) en fase acuosa ( $r = 0.2$ ).

Ión extraño	Concentración (ppm)	[Ión extraño]/[V]	$E_r$ %
Zr(IV)	80	1000	3.4
Mo(VI)	80	1000	-100.0
	8	100	-3.9
Ti(IV)	80	1000	-45.0
	40	500	-4.9
Pb(II)	80	1000	-4.9
Tl(III)	80	1000	-41.8
	0.8	100	-3.7
Tl(I)	80	1000	-33.2
	20	250	-3.8
U(VI)	80	1000	-4.9
W(VI)	80	1000	-100.0
	0.2	2.5	0.4

(a) y (b) Adicionando HNO<sub>3</sub> conc. y llevando a sequedad.

(c) Mediante una doble extracción con MIBK (Metilisobutilcetona), a partir de un medio HCl 6 M y utilizando una relación de fases 1:5 (Org.: Ac.); [6].

A partir de los resultados obtenidos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- Los iones que a continuación se relacionan son tolerados en proporción 1000/1 en peso, con respecto al vanadio:

Acetato	$B_4O_7^{2-}$	$Br^-$	$ClO_4^-$	Citrato	$PO_4^{3-}$
$F^-$	Mg(II)	Tartrato	$SO_4^{2-}$	$NO_3^-$	Oxalato
Na(I)	Li(I)	K(I)	Rb(I)	Cs(I)	Cu(II)
Co(II)	Cd(II)	Ba(II)	Al(III)	Sn(IV)	Cr(III)
As(V)	Ni(II)	Mn(II)	Zr(IV)	Pb(II)	U(VI)



## VANADIO

---

- Del resto de los iones sólo interfieren seriamente  $I^-$ , Hg(II), Fe(III) y W(VI). Estas interferencias pueden eliminarse en todos los casos - mediante los procedimientos descritos al pie de la tabla - salvo para el W(VI), que puede minimizarse hasta una relación 2.5:1.

### III.3. APLICACIONES ANALÍTICAS

Para comprobar la utilidad del método desarrollado, se aplicó a la determinación del contenido en vanadio en una variedad de almeja conocida como "Concha fina" (*Citterea s.p.*), para la cual, ya teníamos datos previos del contenido en este elemento [7].

#### III.3.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN VANADIO EN CONCHA FINA (*CITTEREA s.p.*)

El vanadio es un elemento tóxico en concentraciones altas [8]. Una de las fuentes más importantes de polución marina proviene de los vertidos -accidentales o deliberados- de crudos de petróleo y derivados, hecho que resulta particularmente acentuado en los estuarios, costas y puertos. Dado que, algunas especies marinas como los moluscos, tienen su habitat en estos lugares, puede resultar interesante para controlar los niveles de polución en dichas áreas, el determinar el contenido de este elemento en el tejido de dichas especies, dado que, conjuntamente con el níquel, está siempre presente en el petróleo y sus derivados [9].

En nuestro caso, y para demostrar la validez del método propuesto, lo aplicamos a la determinación de vanadio en una muestra de almeja procedente de la bahía de Algeciras (Cádiz). Experimentalmente, siguiendo la metodología desarrollada en el capítulo I y aplicando el método propuesto, se comprobó que la recta de calibrado y la recta obtenida al aplicar el método de la adición de patrón a la muestra, tenían diferentes pendientes. lo cual indica la presencia de un efecto matriz y por tanto, la necesidad de utilizar en la determinación



### CAPÍTULO III

---

el método de adición de patrón.

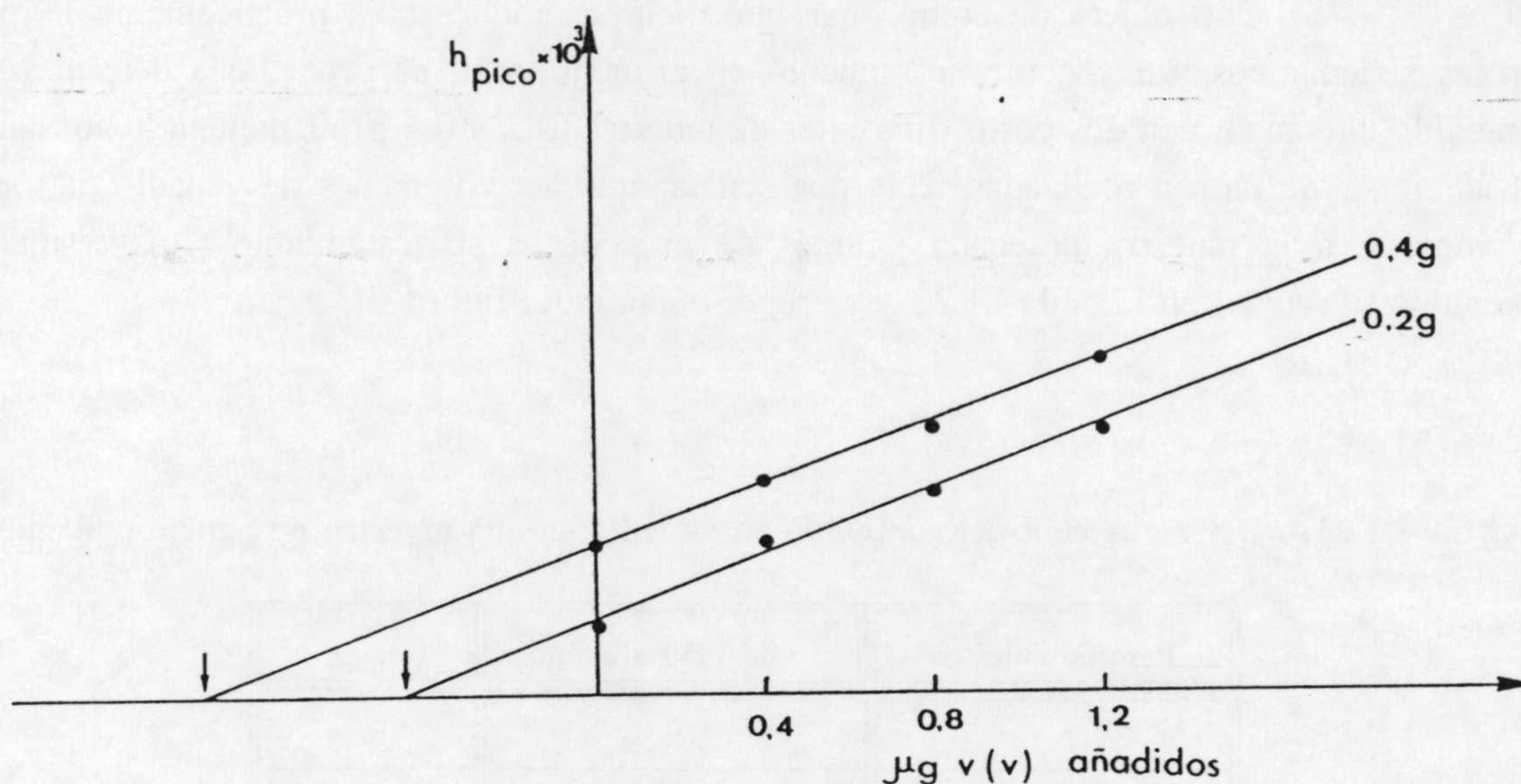
Con objeto de comprobar que dicho método estaba prácticamente libre de errores sistemáticos, tal y como se comentó en el capítulo II, se procedió a determinar el contenido en vanadio en dos pesos diferentes de muestra (0.2 y 0.4 g) manteniendo constantes las adiciones de patrón realizadas. Hay que señalar que los volúmenes de vanadio patrón se adicionaron a la muestra desecada y antes de proceder a su tratamiento. Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.23 y se representan en la figura III. 9.

TABLA III.23. Determinación del contenido en vanadio de una muestra de almeja malagueña.

Peso de muestra	$\mu\text{g}$ de V(V) añadidos	$h_{\text{pico}}$
0.2	---	3945
0.2	0.4	8093
0.2	0.8	11796
0.2	1.2	15777
0.4	---	8750
0.4	0.4	12625
0.4	0.8	16058
0.4	1.2	20000



## VANADIO



**Figura III.9.** Método de adición de patrón para la determinación de la concentración de V(V) en una muestra de almeja malagueña (Concha fina).

Mediante la aplicación de un test de comparación de pendientes a las rectas obtenidas, se comprobó que no había diferencia significativa entre las mismas, lo cual conduce a establecer que la determinación se realiza en unas condiciones en las cuales, el efecto interactivo matriz/analito es prácticamente nulo. A partir de la figura anterior, se deduce que el contenido en vanadio de la muestra es de  $2.07 \mu\text{g/g}$  de muestra seca para la experiencia realizada con 0.2 g de la misma y de  $2.38 \mu\text{g/g}$  de muestra seca para la de 0,4 g.

Con objeto de establecer el contenido de vanadio en la muestra se llevaron a cabo siete determinaciones en las mismas condiciones anteriores, partiendo en todos los casos de un peso de muestra de 0.2 g. Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla III.24.



### CAPÍTULO III

---

TABLA III.24. Resultados obtenidos en la determinación de vanadio.

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ de muestra seca)
1	2.07
2	2.25
3	2.14
4	2.36
5	2.33
6	2.14
7	2.38

$$C_{\text{media}} = 2.24 \mu\text{g/g muestra seca}$$

$$s_{n-1} = 0.123$$

$$\text{C.V. (\%)} = 5.5$$

Hay que señalar, que el resultado concuerda con el recogido en bibliografía (2,26  $\mu\text{g/g}$ ) para esta misma muestra.





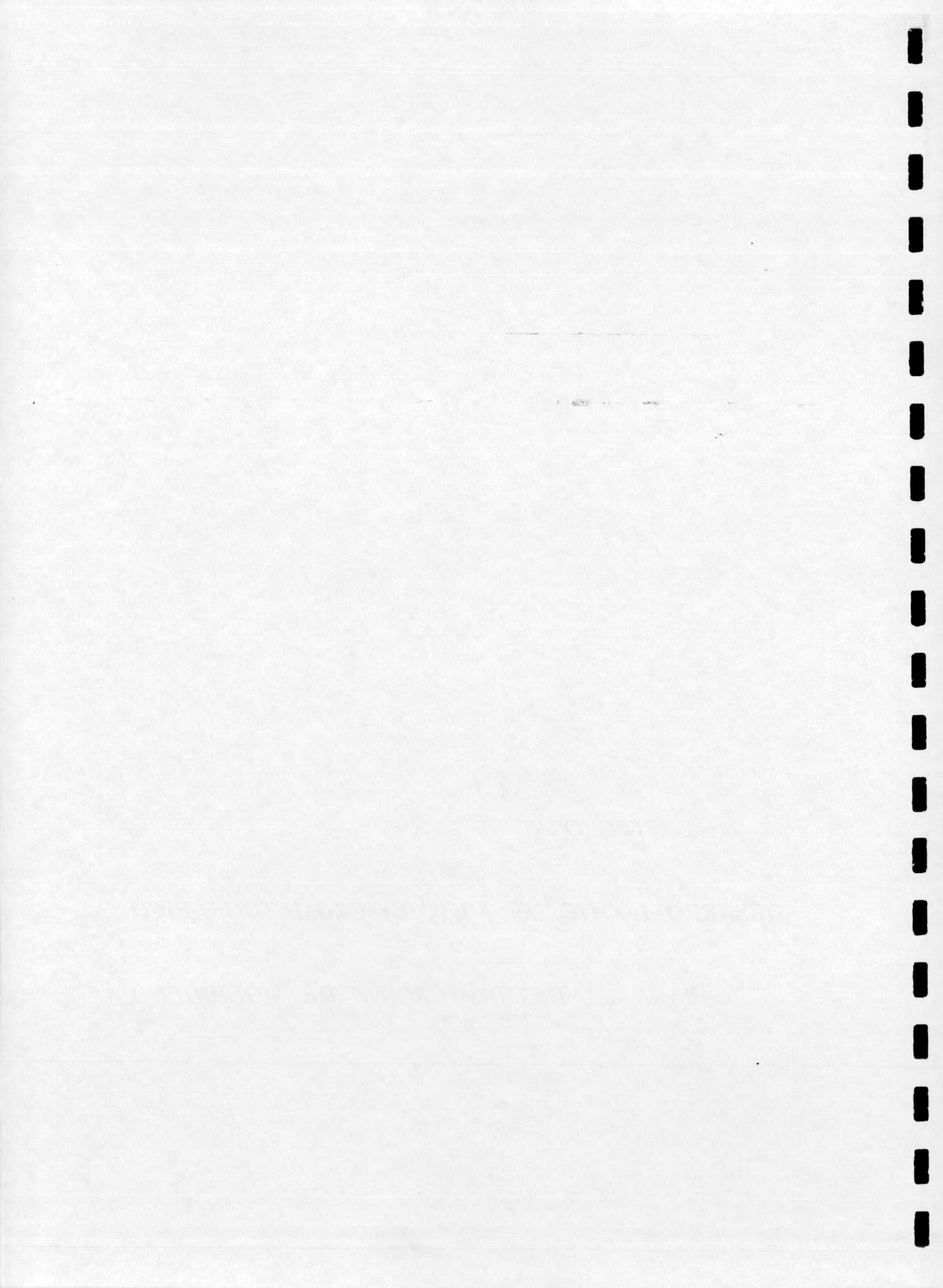


*CAPÍTULO IV:*

*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO*

*PARA LA DETERMINACIÓN DE MOLIBDENO*







**DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
PARA LA DETERMINACIÓN  
DE MOLIBDENO**

En este estudio nos propusimos como objetivo el desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de molibdeno, basado en la extracción previa del complejo que dicho elemento forma con la N-benzoíl-N-fenilhidroxilamina (BPHA), la cual, por su naturaleza poco polar, resulta ser altamente soluble en disolventes poco polares como el cloroformo.

La primera referencia bibliográfica relacionada con el tema data de 1967, en la que Vita y col. [1] realizan un estudio preliminar de la extracción de los elementos de los grupos I al VIII de la Tabla Periódica con el sistema **BPHA : CHCl<sub>3</sub> : HCl**. Dado que en dicho trabajo, no se propone un método específico para la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA, decidimos estudiar, en primer lugar, las condiciones más adecuadas para llevar a cabo el procedimiento extractivo, como paso previo al estudio cromatográfico.





#### IV.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE DIVERSAS VARIABLES SOBRE LA EXTRACCIÓN DE Mo(VI) CON BPHA EN CLOROFORMO.

##### IV.1.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE HCl.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de ácido clorhídrico sobre la formación y extracción del complejo Mo(VI)-BPHA, se verificó para 1 ppm de Mo(VI) en fase acuosa y empleando una disolución al 0.05% (p/v) de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ . Se varió el rango de acidez clorhídrica entre 1 y 7 N. Se registraron los espectros de absorción de los extractos obtenidos, de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo I, en un rango de longitudes de onda comprendido entre 300 y 500 nm, frente a sus blancos correspondientes.

Los valores de absorbancia obtenidos para la longitud de onda de máxima absorción se recogen en la siguiente tabla y se representan en la figura IV.1.

TABLA IV.1. Influencia de la acidez clorhídrica sobre la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA en  $\text{CHCl}_3$ .

[HCl] (N)	A <sub>f. o.</sub>	$\lambda_{\text{max}}$
1	0.181	338
2	0.178	338
3	0.187	339.5
4	0.173	338.7
5	0.167	338.5
6	0.131	340
7	0.066	339.5



## CAPÍTULO IV

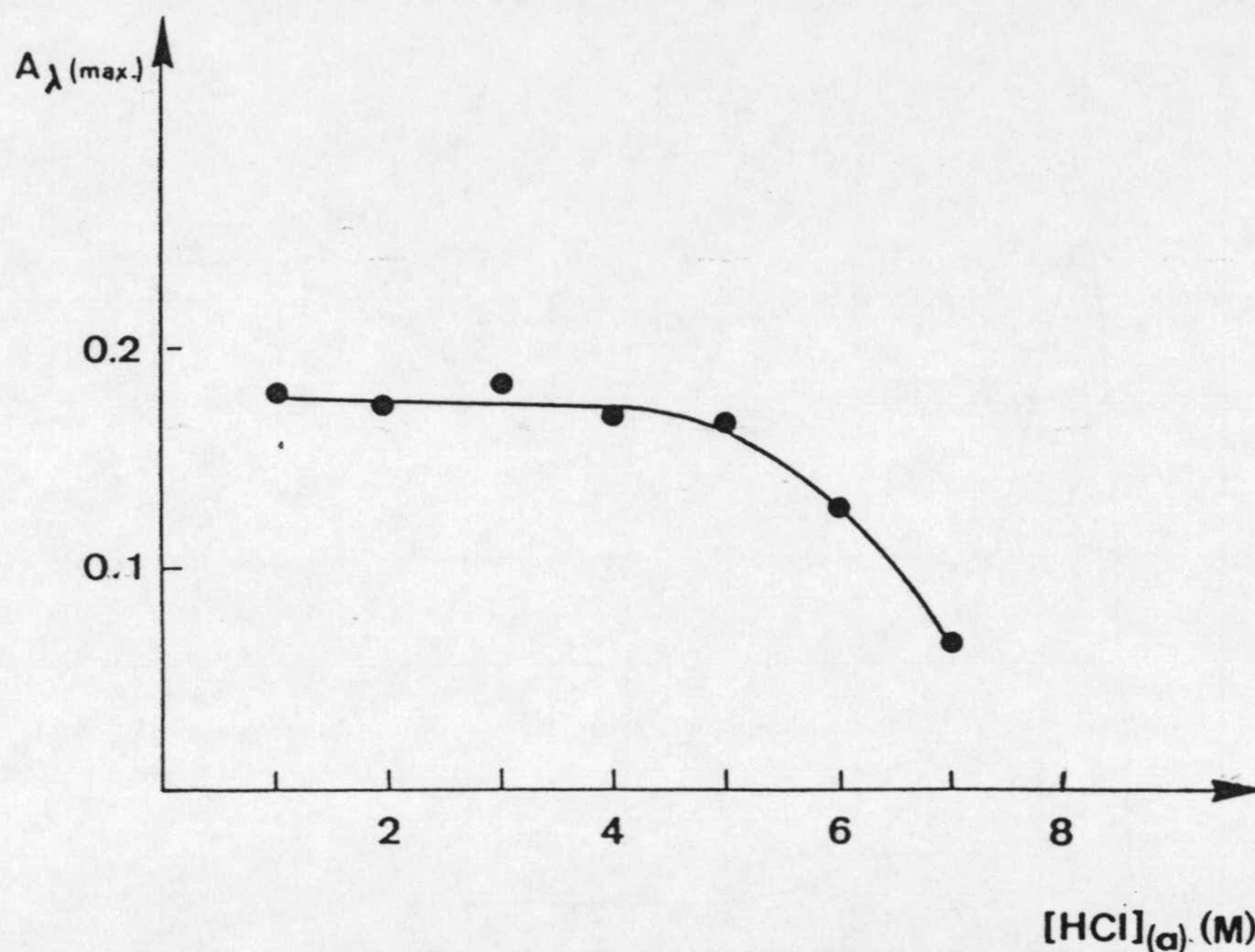


FIGURA IV.1. Influencia de la concentración de HCl sobre la absorbancia del complejo Mo(VI)-BPHA. ( $C_{Mo}$  (f.ac.) =  $1 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ;  $r = 0.2$  (Org./Ac.)

De los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1.- En el rango de acidez clorhídrica estudiado, se observa que la longitud de onda de máxima absorción del complejo permanece prácticamente constante e igual a 340 nm.
- 2.- La especie formada presenta una absorbancia constante para concentraciones de HCl comprendidas entre 1 y 5 N. A concentraciones superiores a 5 N, se observa una disminución gradual de la absorbancia, conforme se aumenta la acidez del medio.

A partir de estas conclusiones se considera que una  $[HCl] = 3 \text{ N}$  es adecuada para llevar a cabo la extracción de Mo(VI).

El espectro correspondiente a dicha concentración se recoge en la figura IV.2.



## MOLIBDENO

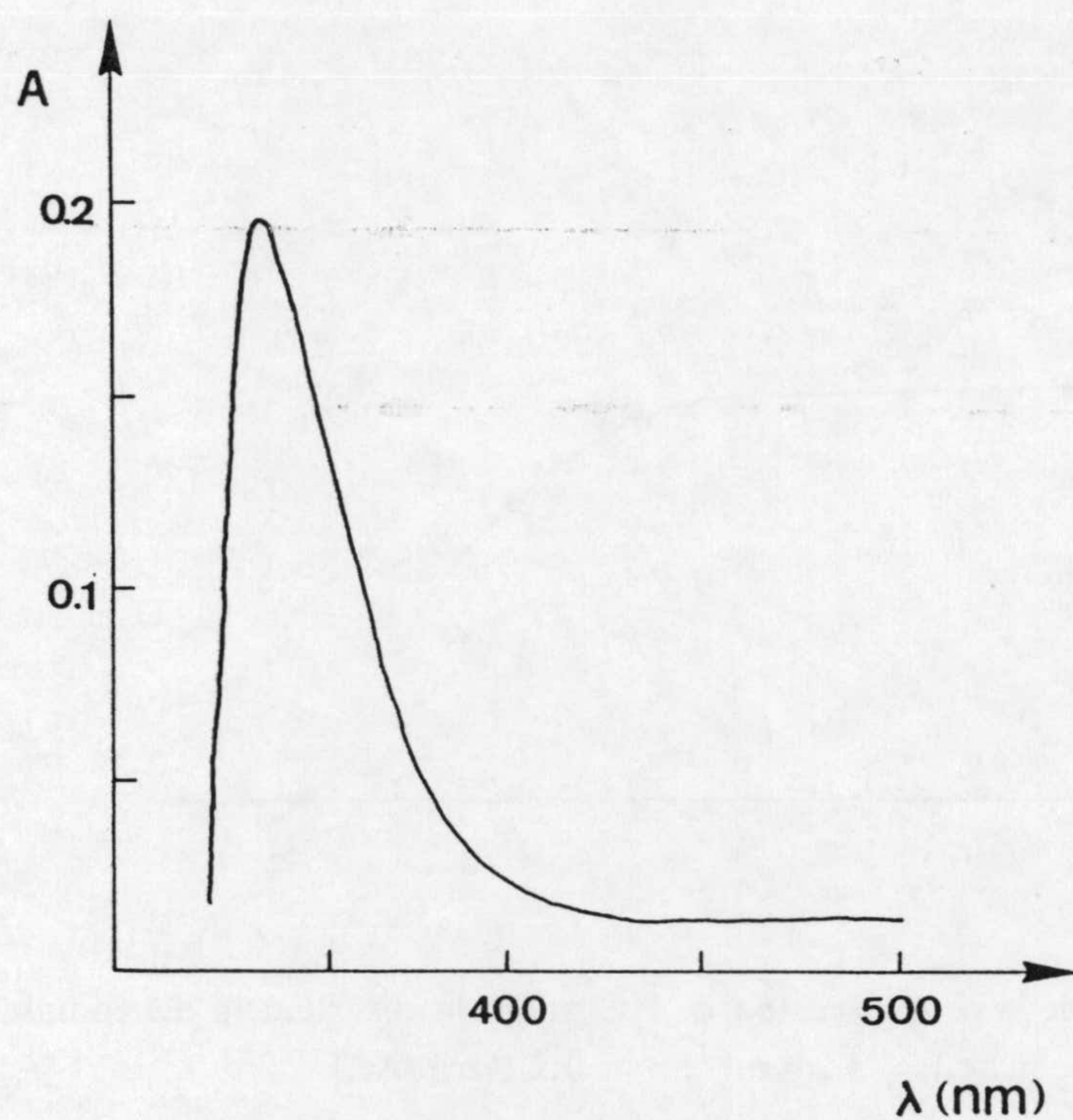


FIGURA IV.2. Espectro de absorción del complejo Mo(VI)-BPHA.

### IV.2. INFLUENCIA DEL ORDEN DE ADICIÓN DE LOS REACTIVOS.

Este estudio, se llevó a cabo modificando el orden de adición tal y como se refleja en la tabla IV.2, para concentraciones de Mo(VI) en fase acuosa de 1 ppm y disoluciones 3 N en HCl, agitadas con  $\text{CHCl}_3$  de acuerdo con el procedimiento descrito. La absorbancia se midió a 340 nm frente a un blanco preparado de la misma forma.

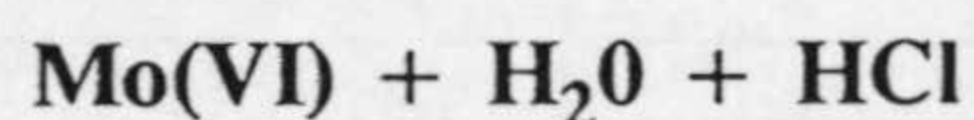


## CAPÍTULO IV

TABLA IV.2. Influencia del orden de adición de los reactivos.

Muestra	Orden de adición	Absorbancia
1	Mo(VI) + H <sub>2</sub> O + HCl	0.193
2	Mo(VI) + HCl + H <sub>2</sub> O	0.167

A la vista de los resultados, se puede deducir que *la adición directa del ácido clorhídrico sobre la disolución de Mo(VI) provoca una disminución de la absorbancia respecto a la experiencia en la que se añade el agua antes que el ácido*. A partir de ahora se utilizó como orden de adición el dado por:



### IV.1.3. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE REACTIVO EN FASE ORGÁNICA.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de BPHA en fase orgánica, sobre la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA se realizó midiendo a 340 nm la absorbancia de los extractos obtenidos a partir de disoluciones acuosas de 1 ppm de Mo(VI) y 3 N en HCl. Se emplearon disoluciones de BPHA en CHCl<sub>3</sub> de diferentes concentraciones tal como se refleja en la tabla IV.3, y se midieron las absorbancias a diversas longitudes de onda (340,350 y 360 nm), frente a los blancos correspondientes.

Los resultados obtenidos se recogen en dicha tabla y se representan en la figura IV.3.



MOLIBDENO

TABLA IV.3. Influencia de la concentración de reactivo en fase orgánica.

$C_{\text{Reactivo}}$ (% p/v)	Absorbancia ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ )	Absorbancia ( $\lambda = 350 \text{ nm}$ )	Absorbancia ( $\lambda = 360 \text{ nm}$ )
0.005	0.040	0.034	0.027
0.010	0.074	0.060	0.044
0.025	0.147	0.112	0.080
0.050	0.175	0.134	0.099
0.075	0.174	0.141	0.104
0.100	0.160	0.138	0.106
0.150	0.113	0.135	0.106
0.200	0.028	0.116	0.093



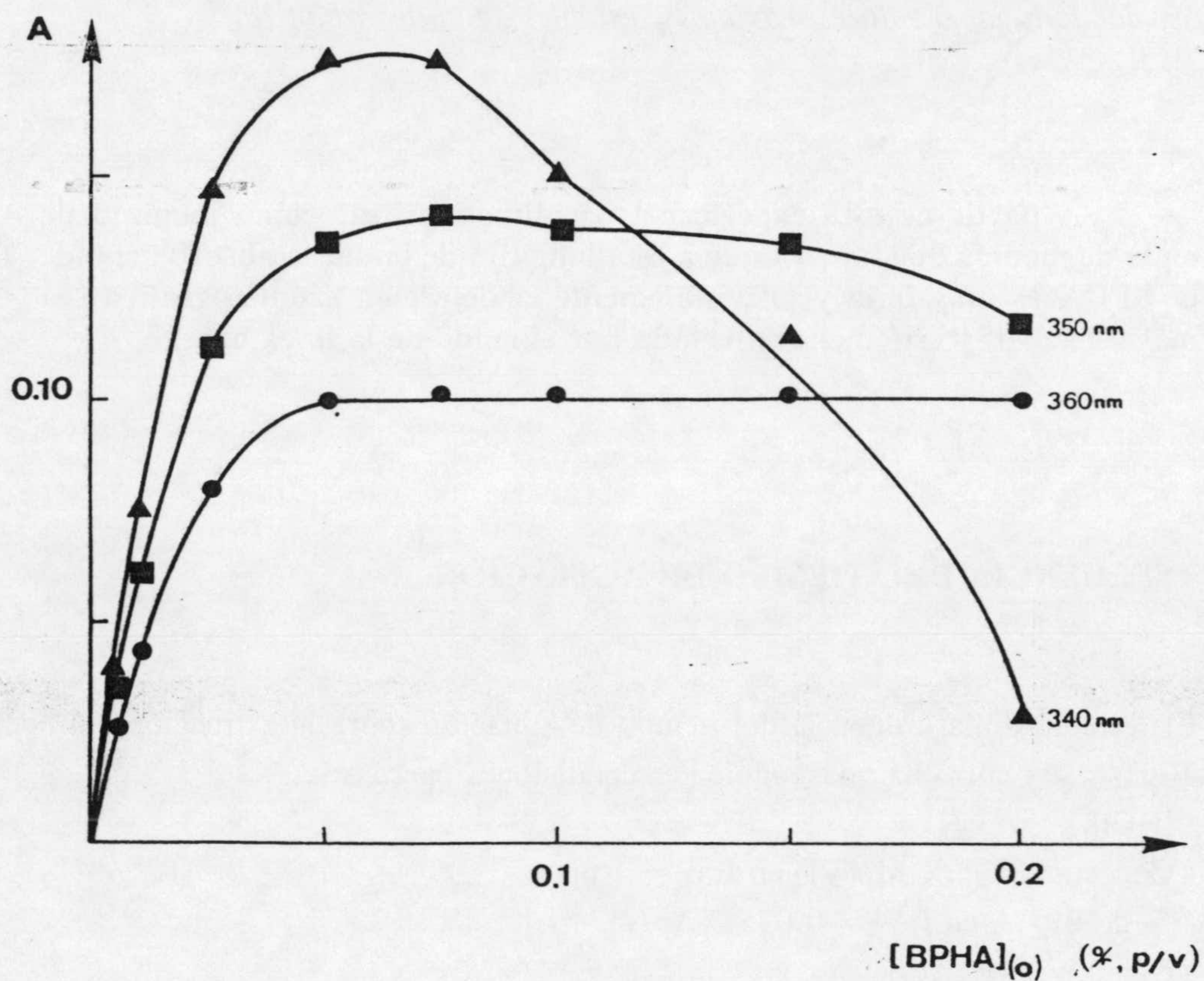


FIGURA IV.3. Influencia de la concentración de reactivo en la fase orgánica sobre la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA.

De los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1.- La absorción aumenta drásticamente al aumentar la  $C_{BPHA}$  en fase orgánica, hasta un valor de 0.05% (p/v).
- 2.- Aunque los mayores valores de absorción se obtienen midiendo a 340 y 350 nm,



## MOLIBDENO

---

únicamente es a 360 nm donde aquella permanece prácticamente constante a partir de una  $C_{BPHA}$  de 0.05%.

3.- Asimismo, se deduce que un valor de  $C_{BPHA}$  de 0.075% es adecuado para llevar a cabo la extracción, dando lugar a valores máximos y estables de la absorbancia.

A partir de esta experiencia decidimos utilizar como longitud de onda de medida 360 nm, ya que a esta longitud de onda, la absorbancia de la BPHA es muy baja y previsiblemente la detección cromatográfica sea más selectiva, y esté menos afectada por el ruido de la línea base.

### IV.1.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE AGITACIÓN.

El estudio de la influencia del tiempo de agitación sobre la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA, se realizó bajo las siguientes condiciones operatorias:

- $[HCl]_{f.a.} = 3 \text{ N.}$
- Concentración de Mo(VI) en f.a. = 1 ppm.
- % de BPHA en f.o. = 0.075 % (p/v).
- $r = 0.2$  (Org.:Ac.).
- $\lambda_{medida} = 360 \text{ nm.}$

Se agitaron los matraces durante períodos de tiempo variables y se obtuvieron las absorbancias recogidas tabla IV.4.



## CAPÍTULO IV

---

TABLA IV.4. Influencia del tiempo de agitación sobre la extracción del complejo Mo(VI)-BPHA.

$t_{\text{agitación}}$ (min.)	A ( $\lambda = 360$ nm)
0.5	0.078
1.0	0.093
2.0	0.100
3.0	0.103
5.0	0.103

Se puede observar que es suficiente un tiempo de agitación de dos minutos para que la absorbancia se estabilice. Para posteriores experiencias, se empleó un tiempo de agitación de 3 min.

### IV.1.5. ESTUDIO DEL RANGO DE LINEALIDAD.

Con objeto de verificar el cumplimiento de la ley de Beer, se llevó a cabo una experiencia para un rango de concentraciones de Mo(VI) en fase acuosa comprendido entre 0.2 y 1.2 ppm, extraídos según el procedimiento habitual y en las condiciones operatorias antes seleccionadas.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla IV.5.



## MOLIBDENO

TABLA IV.5. Cumplimiento de la ley de Beer entre 0.2 y 1.2 ppm de Mo(VI) en fase acuosa y  $r = 0.2$ .

[Mo(VI)] <sub>f.a.</sub> (ppm)	A <sub>f.o.</sub> (360 nm)
0.2	0.018
0.4	0.039
0.6	0.065
0.8	0.079
1.0	0.098
1.2	0.124

Se puede observar un perfecto cumplimiento de la ley de Beer, en el rango de concentraciones estudiado. Ajustando por mínimos cuadrados los puntos comprendidos en este rango, se obtiene la ecuación teórica de la recta.

$$A = -0.0016 + 0.103 C \quad (C = \text{ppm})$$
$$r = 0.997 \quad r^2 = 0.994$$

### IV.1.6. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE FASES.

Con objeto de verificar el límite de aplicabilidad del método utilizado en cuanto a la relación de fases, se planificó una experiencia en la que se trabajó, con una cantidad fija de Mo(VI) en fase acuosa de 50  $\mu\text{g}$ . Dicha cantidad se extrajo variando la relación de fases entre 1 y 0,05 (Org./Ac.), mediante la modificación del volumen correspondiente de fase acuosa y extrayendo siempre con 10 ml de una disolución al 0,075% de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ . Tras la



## CAPÍTULO IV

agitación (3 min.) y posterior decantación, deshidratación y centrifugación de las fases orgánicas, se procedió a medir la absorbancia de las mismas a 360 nm frente a un blanco preparado de la misma manera.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Estudio de la influencia de la relación de fases.

V <sub>f.a.</sub> (ml)	Rel. de fases (r)	A <sub>f.o.</sub>
10	1.000	0.103
25	0.400	0.108
50	0.200	0.108
100	0.100	0.109
150	0.070	0.106
200	0.050	0.101

A la vista de estos resultados podemos señalar, que el método estudiado permite trabajar en un margen de relación de fases comprendido entre 1 y 0.05 ( $V_{org.}/V_{ac.}$ ), sin que se observen variaciones importantes en la absorbancia.

### IV.1.7. MÉTODO PROPUESTO PARA LA EXTRACCIÓN DEL COMPLEJO Mo(VI)-BPHA.

A partir de las experiencias previamente descritas, consideramos que las condiciones óptimas para la extracción de Mo(VI) en  $CHCl_3$  con BPHA, son las que se resumen a continuación.



## MOLIBDENO

---

En matraces de 100 ml se introducen por este orden:

### *Fase acuosa*

- Una cantidad medida de muestra que no contenga más de 1.2  $\mu\text{g}$  de Mo(VI)/ml de muestra.
- La cantidad de agua bidestilada necesaria para obtener un volumen final de 25 ml.
- 6.6 ml de ácido clorhídrico concentrado.

### *Fase orgánica*

- 5 ml de una disolución de BPHA al 0,075 % (p/v) en  $\text{CHCl}_3$ .

Se agitan los matraces durante 3 min. y se decantan, deshidratan y centrifugan las fases orgánicas para su posterior medida.



## IV.2. DETERMINACION DE MOLIBDENO EN FORMA DE COMPLEJO CON BPHA MEDIANTE CROMATOLOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION.

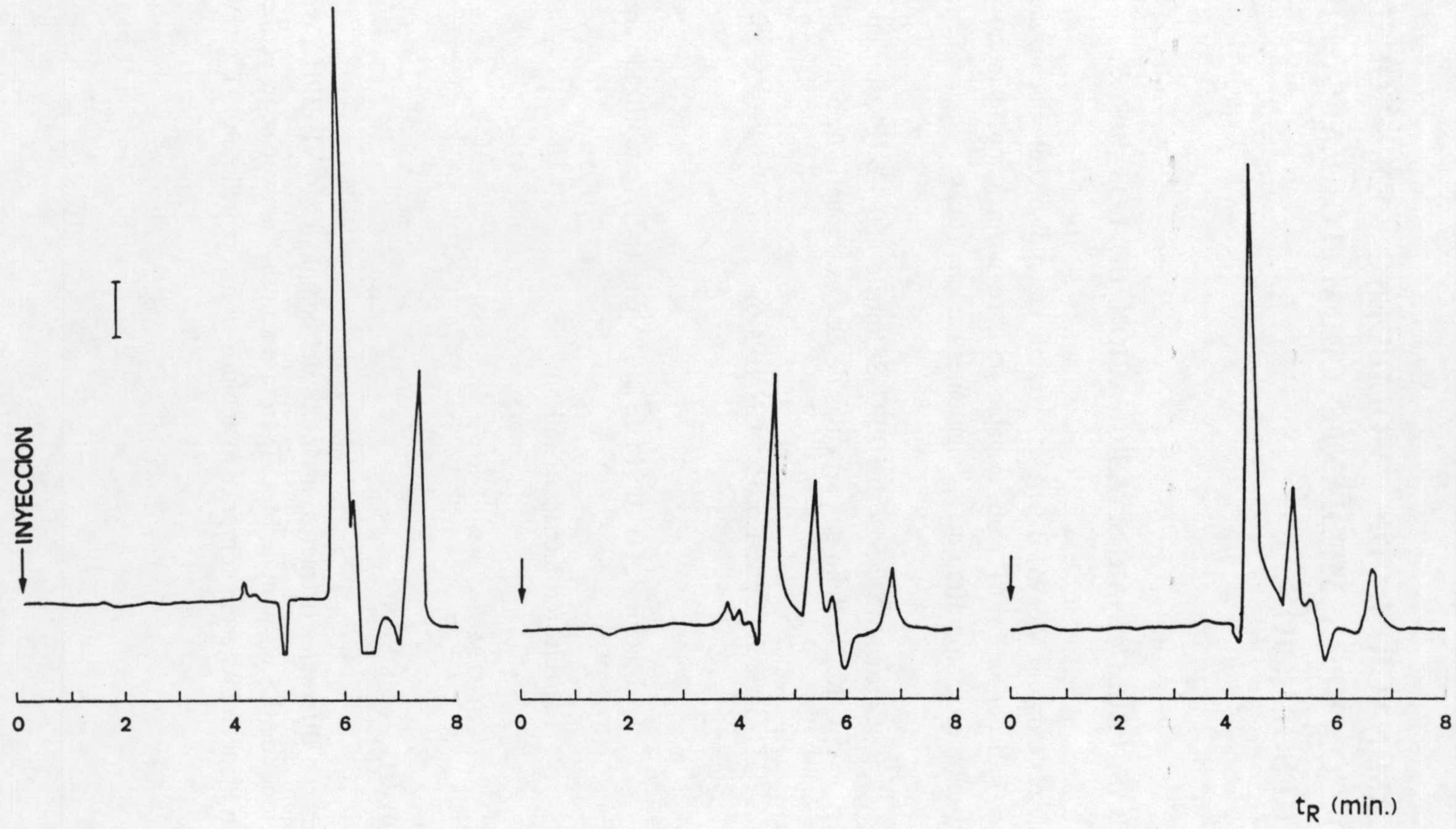
### IV.2.1. PRUEBAS PRELIMINARES. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS.

Dado que el complejo Mo(VI)-BPHA es extraible en un disolvente poco polar como el cloroformo, más indicado a priori para trabajar en fase normal, nos pareció adecuado seleccionar un sistema cromatográfico de las siguientes características:

<b>Columna:</b>	Cartucho Spherisorb HPLC S5 nitrilo 250-4.6 (Phase Sep, Deeside; U.K.), relleno de partículas de fase estacionaria de 5 $\mu\text{m}$ de tamaño.
<b>Precolumna:</b>	Cartucho Spherisorb S5 CN 10-4.6.
<b>Fase móvil:</b>	Disolución $1.41 \times 10^{-3}$ M de BPHA en $\text{CHCl}_3$ (estabilizado con etanol).
<b>Detección:</b>	Espectrofotométrica a 360 nm.
<b>Vol. inyección:</b>	20 $\mu\text{l}$
<b>Flujo fase móvil:</b>	0.8 ml.min <sup>-1</sup> .

Se inyectaron diferentes extractos orgánicos del complejo Mo(VI)-BPHA obtenidos a partir de disoluciones de 0.5 y 1 ppm de Mo(VI) en fase acuosa. También se inyectó el extracto procedente de un blanco. Los cromatogramas obtenidos se han reunido en la Fig. IV.4.





MOLIBDENO



## CAPÍTULO IV

---

Se puede observar que:

1.- El pico, cuyo tiempo de retención es de 4,7 min., debe corresponder al complejo Mo(VI)-BPHA puesto que, su tamaño se modifica proporcionalmente a la cantidad de molibdeno extraída. Por otra parte, la inyección de una disolución de BPHA al 0.075% en cloroformo agitada con HCl 3 N, conduce a la obtención de un cromatograma en el no está presente dicho pico.

2.- Aparecen picos adicionales que, comparando los cromatogramas correspondientes al blanco y al complejo, y de acuerdo con las hipótesis establecidas por Strachan y Deming [2], pueden atribuirse a los siguientes hechos:

- El pico que sale a continuación del asignado al Mo(VI)-BPHA, se puede corresponder con el pico de la BPHA, ya que, en el cromatograma del blanco sale considerablemente más alto que en los cromatogramas donde hay complejo y a su vez, al aumentar la concentración de molibdeno disminuye su altura.

- Los picos que salen a continuación, pueden atribuirse a "picos fantasma" ("induced ghost peak"), causados por una alteración de la adsorción/desorción -picos por encima/debajo de la línea base- de la BPHA sobre la fase estacionaria provocada por la diferencia de concentración de BPHA entre la fase móvil y el extracto inyectado. Este razonamiento está apoyado por el hecho de que dichas alteraciones mayor en el cromatograma correspondiente al blanco, que en los correspondientes al complejo de Mo(VI)).

Se realizaron otras experiencias con fases móviles consistentes en disoluciones de BPHA en:

- a)  $\text{CHCl}_3$  estabilizado con etanol,
- b)  $\text{CHCl}_3$  estabilizado con 2 metil-buteno,
- c)  $\text{CHCl}_3$  estabilizado con amileno,
- d) Diferentes mezclas de a), b) y c) con hexano y ácido acético.

Se pudo comprobar que los mejores cromatogramas se obtenían con



## MOLIBDENO

una fase móvil formada por BPHA disuelta en  $\text{CHCl}_3$  estabilizado con amileno. El cromatograma obtenido utilizando esta fase móvil es el que se recoge en la figura siguiente, donde se puede observar que el tiempo de retención del complejo ha aumentado sensiblemente, respecto a cuando se emplea cloroformo estabilizado con etanol.

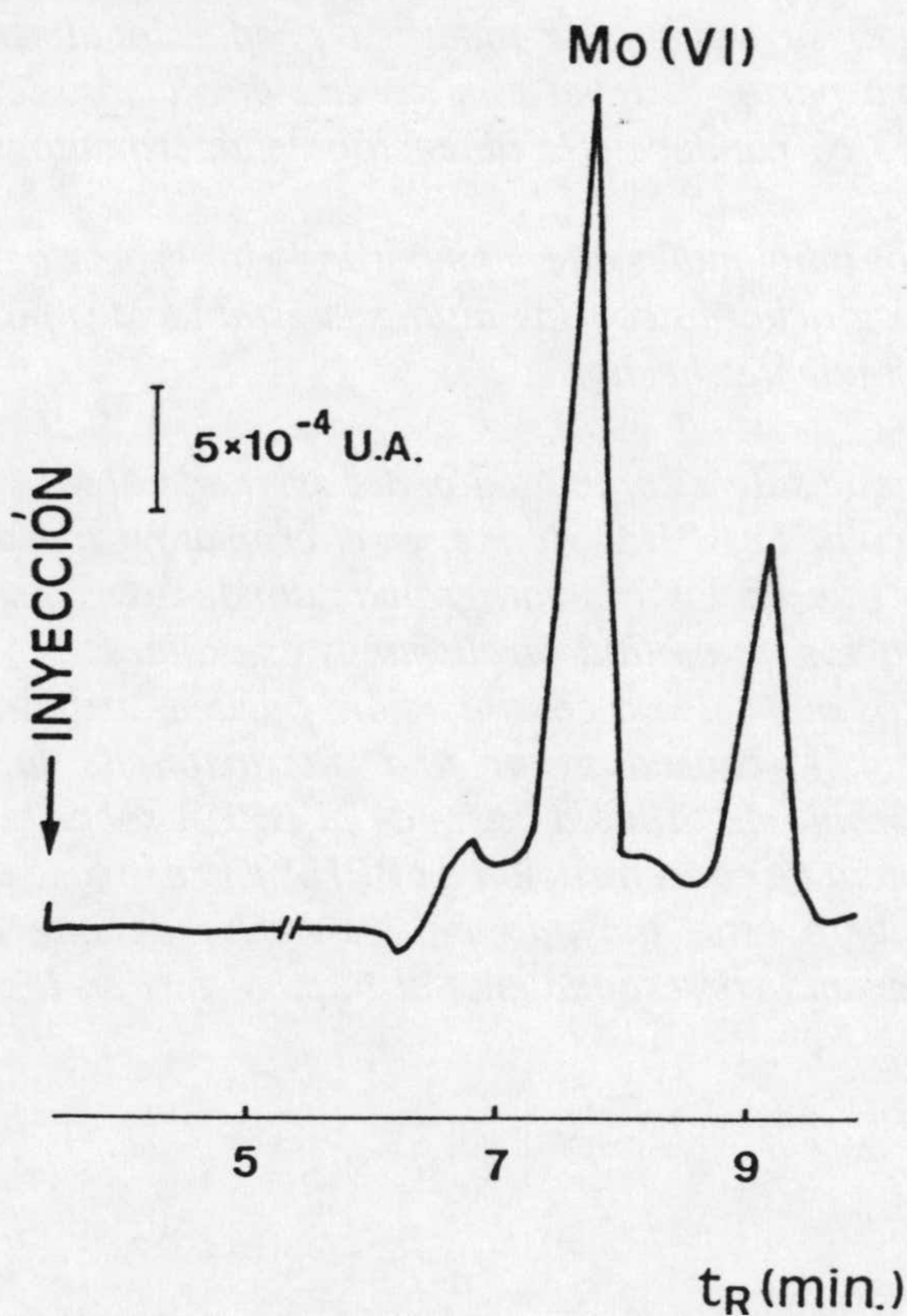


FIGURA IV.5. Cromatograma típico del complejo Mo(VI)-BPHA utilizando una columna Spherisorb S5-CN y una fase móvil constituida por una disolución de BPHA en  $\text{CHCl}_3$  (estabilizado con amileno).

### IV.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de BPHA en la fase móvil, se llevó a cabo modificando dicha concentración entre  $1.40 \times 10^{-3}$  y  $3.52 \cdot 10^{-3}$  M, manteniendo



## CAPÍTULO IV

constantes el resto de los parámetros cromatográficos.

Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla IV.7 y se representan en la figura IV.6.

**TABLA IV.7.** Influencia de la concentración de BPHA en la fase móvil sobre el  $t_R$  y la altura del pico del complejo Mo(VI)-BPHA.  $C_{\text{Mo(f. ac.)}} = 0.080$  ppm;  $r = 0.05$ .

% BPHA	[BPHA] M	$t_R$ , min.	$h_{\text{pico}}$ (u.i.)*
0.03000	$1.40 \times 10^{-3}$	7.654	4893
0.03750	$1.76 \times 10^{-3}$	7.721	8798
0.04500	$2.11 \times 10^{-3}$	7.698	10145
0.06000	$2.81 \times 10^{-3}$	7.756	12345
0.06750	$3.16 \times 10^{-3}$	7.892	13014
0.06940	$3.25 \times 10^{-3}$	7.828	13001
0.07125	$3.34 \times 10^{-3}$	7.805	12876
0.07500	$3.52 \times 10^{-3}$	7.798	13100

\* (u.i.): unidades del integrador.



MOLIBDENO

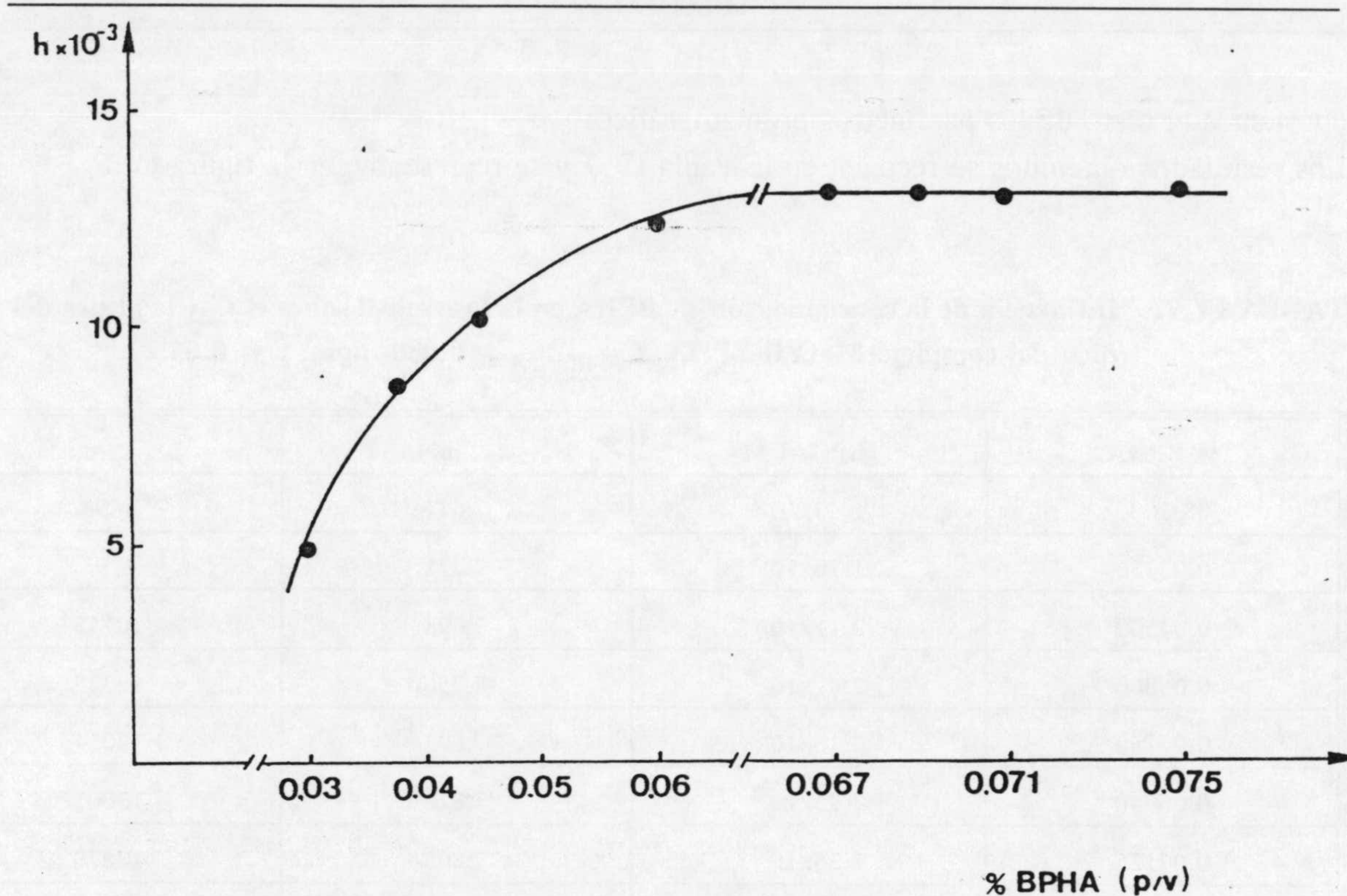


FIGURA IV.6 Influencia de concentración de BPHA en la fase móvil sobre la altura del pico del complejo Mo(VI)-BPHA.

A la vista de los resultados podemos observar que, la presencia del ligando en la fase móvil, no modifica substancialmente el tiempo de retención del pico, pero si modifica su altura, de manera que para concentraciones superiores a  $3 \times 10^{-3}$  M, se obtiene una altura de pico constante. De acuerdo con dichos resultados, se consideró como fase móvil adecuada para la determinación cromatográfica de Mo(VI), la constituida por una disolución  $3.25 \times 10^{-3}$  M de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ .



## CAPÍTULO IV

### IV.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL.

Para determinar la variación de H con el flujo de la fase móvil, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se varió el mismo entre 0.1 y 1.0 ml.min<sup>-1</sup>, inyectando 20 µl de un extracto conteniendo 1.6 ppm de Mo(VI). La detección se hizo a 360 nm, y se empleó una fase móvil de composición establecida en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla IV.8 y se representan en la figura IV.7.

Tabla IV.8. Influencia del flujo de fase móvil sobre la altura equivalente de plato teórico.

Flujo (ml.min <sup>-1</sup> )	t <sub>R</sub> (min.)	W <sub>1/2</sub>	N	H (cm)
0.1	62.576	1.507	9600	26.0x10 <sup>-3</sup>
0.2	31.199	0.796	8504	29.4x10 <sup>-3</sup>
0.4	15.704	0.493	5617	44.5x10 <sup>-3</sup>
0.6	10.273	0.325	5531	45.2x10 <sup>-3</sup>
0.8	7.728	0.256	5044	49.5x10 <sup>-3</sup>
1.0	6.198	0.200	4450	47.0x10 <sup>-3</sup>



## MOLIBDENO

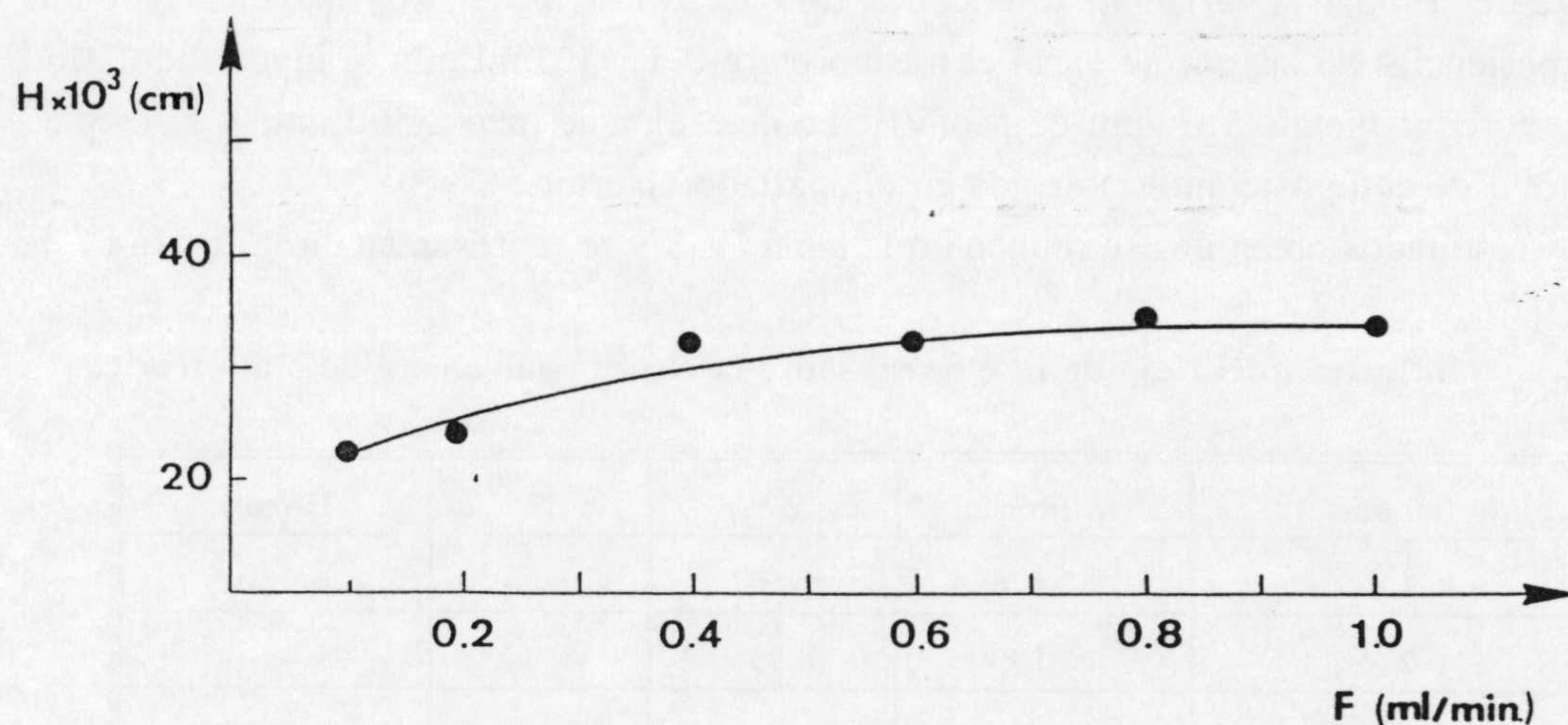


FIGURA IV.7. Variación de H en función del flujo de la fase móvil.

Los resultados obtenidos, muestran un comportamiento típico de un sistema formado por una fase estacionaria químicamente ligada [3]. De acuerdo con esto podemos afirmar que:

a) La máxima eficacia se obtendría para flujos de la fase móvil muy pequeños, es decir, tiempos de análisis muy elevados, lo que conllevaría a condiciones operatorias poco prácticas.

b) A partir de flujos superiores o iguales a  $0.4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , se observa una estabilidad en la AEPT, de manera que, podríamos obtener una eficacia prácticamente constante en la separación cuantitativa del complejo Mo(VI)-BPHA, sólo afectada por el tiempo de análisis.

De todo lo dicho anteriormente se consideró apropiado utilizar como valor más adecuado, un flujo de  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , para el cual se obtienen tiempo de análisis y eficacia adecuados.



## CAPÍTULO IV

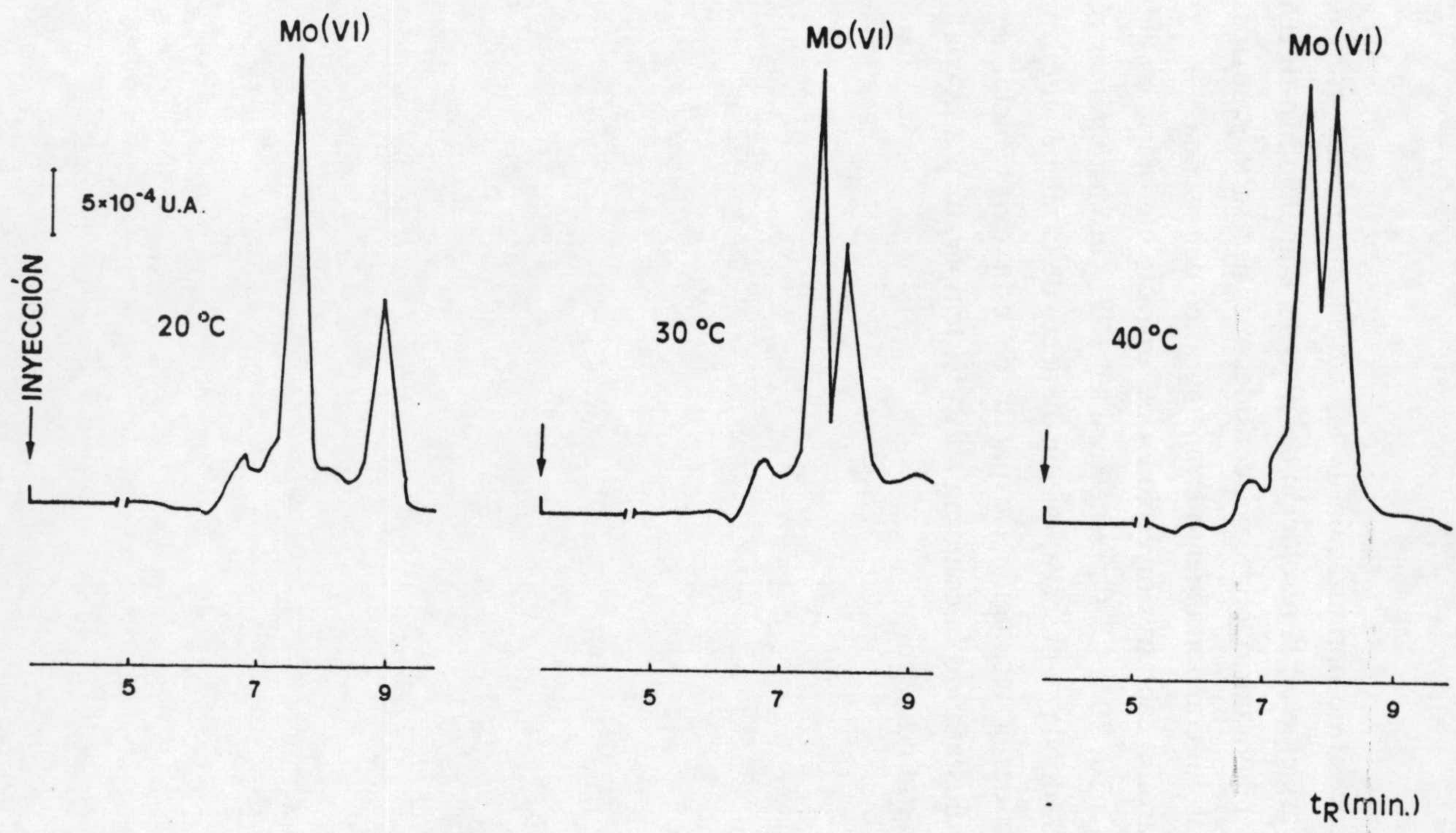
---

### IV.2.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA SOBRE LA RESOLUCIÓN.

A lo largo del proceso de optimización de los parámetros cromatográficos, se pudo observar una apreciable variación en la resolución del pico del complejo Mo-BPHA, al variar la temperatura ambiente del laboratorio, por lo que consideramos necesario estudiar la influencia que este factor ejercía sobre el comportamiento cromatográfico del sistema.

Para ello, se llevaron a cabo tres inyecciones del extracto clorofórmico del complejo, termostatando la columna a 20, 30 y 40 °C, respectivamente. Los cromatogramas obtenidos se recogen en la Figura IV.8. donde se observa, que un aumento de la temperatura, provoca una disminución considerable de la resolución. **A partir de esta experiencia, se consideró conveniente trabajar termostatando la columna a 20° C, temperatura a la cual, el pico de interés queda perfectamente resuelto.**





MOLIBDENO



## CAPÍTULO IV

---

### IV.2.5. METODO PARA LA DETERMINACION CROMATOGRAFICA DE MOLIBDENO CON BPHA.

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre el comportamiento cromatográfico del complejo Mo(VI)-BPHA, extraído previamente en  $\text{CHCl}_3$ , se concluye que en las siguientes condiciones:

- Fase móvil: Disolución  $3.25 \times 10^{-3}$  M de BPHA en  $\text{CHCl}_3$  (estabilizado con amileno).
- Flujo de la fase móvil:  $0.8 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .
- Longitud de onda de detección: 360 nm.
- Volumen de inyección:  $20 \mu\text{l}$ .
- Temperatura de la columna:  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

es posible la determinación de molibdeno en forma de hidroxamato. Queda por tanto determinar la validación y parámetros de calidad del método propuesto, estableciendo los límites de aplicabilidad de éste, respecto al rango de concentraciones de analito, límite de detección (y asociado a dicho parámetro, la mínima masa detectable) y tolerancia a posibles iones interferentes.

#### IV.2.5.1. Validación del modelo establecido. Estudio de la zona de linealidad.

Se planificó un estudio del cumplimiento de la linealidad de la relación Señal :  $f([\text{Mo}])$ , en un rango de concentraciones de Mo(VI) en fase acuosa comprendido entre 0.000 y 0.200 ppm, extraídas según el método descrito. Para ello, se utilizaron dos réplicas de cada concentración, inyectando los extractos en un orden aleatorio. Mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, empleando el método de mínimos cuadrados.

Los resultados experimentales, obtenidos a partir de los cromatogramas registrados, se recogen en la Tabla IV.9.



**MOLIBDENO**

**TABLA IV.9.- Estudio de la zona de linealidad para  $r = 0.05$ .**

Mo(VI) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa inyectada (ng)	h <sub>pico</sub>
0.000	0.000	0000
0.000	0.000	0000
0.040	16.000	6613
0.040	16.000	6720
0.080	32.000	13227
0.080	32.000	13014
0.120	48.000	19921
0.120	48.000	19414
0.160	64.000	26027
0.160	64.000	27241
0.200	80.000	33279
0.200	80.000	33579

*IV.2.5.1.1. Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*

Dado que el modelo aplicado es el de la regresión lineal de mínimos cuadrados, su aplicación exige que se cumplan una serie de requisitos como son la homogeneidad de las varianzas de los residuos y aleatoriedad e independencia de estos.

Para tal fin se procedió al análisis gráfico de los residuos mediante la representación gráfica de estos frente a los valores experimentales de  $c_i$ . En dicha representación se observó que:

- 1) El número de residuos positivos era aproximadamente igual al de los negativos.
- 2) Los residuos se distribuían aleatoriamente.

**De dichas observaciones se concluyó que se cumplía la hipótesis de "homoscedasticidad" necesaria para el cumplimiento del modelo.**



## CAPÍTULO IV

IV.2.5.1.2. *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales y que los valores de pendiente y ordenada en el origen son aceptables.*

Con objeto de comprobar si el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales se aplicó el test del Análisis de la Varianza (ANOVA) con dos finalidades:

- Para comprobar la correlación entre altura de pico cromatográfico y concentración de Mo(VI) en fase acuosa, y
- Para evaluar el fallo de ajuste (falta de linealidad)

Los resultados obtenidos en dichos test se recogen en la tabla IV.10.

TABLA IV.10. *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales.*

Fuente	Suma de cuadrados	Gdl <sup>(1)</sup>	Varianza	F	Niv. Prob. <sup>(2)</sup>
Modelo	1.559x10 <sup>6</sup>	1	1.559x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>4</sup>	<b>0.0000</b>
Residual	1191427.7	10	1191427.7		
<i>Fallo de ajuste</i>	252596.17	4	63149.04	0.4	<b>0.80048</b>
<i>Puro error</i>	938831.50	6	156471.92		

(1) Gdl = Grados de libertad de la determinación.

(2) Niv. Prob. = Nivel de Probabilidad estimada.

*A la vista de dichos datos podemos observar que el valor del estadístico  $F_{Snedecor}$  estimado entre la varianza de la regresión lineal y la de los residuales, indica la existencia de correlación entre la señal instrumental y la concentración. Además, el valor obtenido para dicho estadístico, calculado entre el factor debido al puro error y el debido al fallo de ajuste, indica con la existencia de una buena linealidad en la zona de concentraciones de Mo(VI) estudiada. Por tanto, la aleatoriedad de los resultados es debida al error puro.*



## MOLIBDENO

---

Finalmente se procedió a evaluar si los valores de la ordenada en el origen y la pendiente eran adecuados, mediante la realización de un test para cada uno de ellos (comprobación de que el termino independiente y la pendiente son o no significativamente diferentes de cero).

*Los valores obtenidos para el estadístico  $t_{Student}$  nos permitieron aceptar las hipótesis alternativas (término independiente significativamente igual a cero y pendiente significativamente distinta de cero).*

**Las conclusiones obtenidas nos llevaron a proponer la siguiente ecuación para la recta de calibrado:**

$$h = (-99.1 \pm 393.6) + (166853 \pm 3250) C; \quad C = \text{ppm (f.ac.)}$$

Otros estadísticos evaluados fueron :

- Desviación estandar de regresión de h sobre C . . . . .	45.171
- Coeficiente de correlación . . . . .	0.999618
- Coeficiente de determinación . . . . .	99.92%
- Desviación estandar relativa de la pendiente ( $s_b$ ) . . . . .	0.87%
- LINEALIDAD . . . . .	99.13%

### IV.2.5.2. Evaluación de la precisión.

Con objeto de evaluar la precisión del método propuesto, se procedió a un estudio de repetibilidades enfocado desde dos puntos de vista:

a) Evaluando la **precisión de la inyección**, es decir, analizando la variabilidad de respuesta de un único extracto orgánico en "n" inyecciones sucesivas.

b) Evaluando la **precisión del método propuesto**, desde la preparación de una disolución patrón hasta la obtención de la señal instrumental, es decir, analizando la variabilidad de las respuestas obtenidas en "n" extracciones de una disolución patrón.



## CAPÍTULO IV

### IV.2.5.2.1. Evaluación de la precisión de la inyección.

Para determinar dicho parámetro, se ensayó con el extracto obtenido a partir de una disolución 0.080 ppm de Mo(VI) extraída de acuerdo con el método descrito. Los resultados obtenidos para seis inyecciones sucesivas, en las mismas condiciones cromatográficas, se recogen en la tabla IV.11.

**TABLA IV. 11. Repetibilidad de la inyección.**

h <sub>pico</sub>	[Mo(VI)] <sub>f.a.</sub> * (ppb)
13867	83.67
13658	82.50
13867	83.67
13227	79.90
13120	79.20
13654	82.40

\* Valores obtenidos a partir de la recta de calibrado.

El estudio estadístico realizado sobre estos resultados arroja los siguientes datos:

**\* Señal instrumental (Altura de pico):**

- Valores medios de alturas de pico ..... 13564.8  
 - Desviación estándar "s" ..... 319.54

El error instrumental expresado como coeficiente de variación ( %  
 C.V.) es de 2.36%.



CAPÍTULO IV

b) Realizando dos experiencias en idénticas condiciones operatorias, partiendo en cada serie de disoluciones de Mo(VI) de 0.087 y 0.168 ppm en fase acuosa. En cada caso se realizaron series de extracciones de acuerdo con el método descrito anteriormente.

Los valores de altura de pico y de concentración de molibdeno obtenidos a partir de una recta de calibrado se recogen en la tabla IV.12.

**TABLA IV.12. Repetibilidad del método propuesto.**

h pico	[Mo(VI)] <sub>f.a.</sub> (ppb)	h pico	[Mo(VI)] <sub>f.a.</sub> (ppb)
14294	86.3	27947	168.1
14507	87.5	28161	169.4
14614	88.2	28801	173.2
14507	87.5	27734	166.8
14294	86.3	28161	169.4
14507	87.5	27947	168.1
14507	87.5	27947	168.1
14080	85.0	27947	168.1
14187	85.6	27094	163.0
		27094	163.0

El estudio estadístico de dichos resultados dió lugar a los siguientes datos:

- Valores medios de concentraciones (ppb) ..... 86.8 y 167.7
- Desviaciones estándar "s" ..... 1.1 y 3.0

A partir de los valores de s y tomando los valores de la t (Student) de 2.306 y 2.262, para ngl = 8 y 9, respectivamente (95% de nivel de confianza), se encuentran los siguientes intervalos de confianza, 86.8 ± 0.8 ppb y 167.7 ± 2.1 ppb). Es decir, ninguno de los valores encontrados son rechazables.



## MOLIBDENO

### \* Concentración determinada (ppb):

- Valor medio de la concentración . . . . .	81.89
- Desviación estándar . . . . .	$1.907 \times 10^{-3}$

A partir del valor de  $s$  y para el valor de la  $t_{\text{Student}}$  considerado se encuentra que el intervalo de concentraciones está comprendido entre 79.65 y 84.13 ppb; es decir, ninguno de los valores de concentración encontrados son rechazables.

El error instrumental, expresado como  $\% \text{ C.V.} = 2.32 \%$ .

### IV.2.5.2.2. Evaluación de la precisión del método propuesto.

Para evaluar la precisión del método propuesto se procedió de dos formas diferentes:

#### a) Evaluándolo a partir de los datos de calibrado.

Se evaluó la precisión del método propuesto a partir de los datos de calibrado, de acuerdo con lo establecido en el apartado correspondiente del capítulo II, y representando el  $\% \text{ C.V.}(c)$  vs  $C_{\text{Mo}}$ . Los resultados se recogen en la figura IV.9.

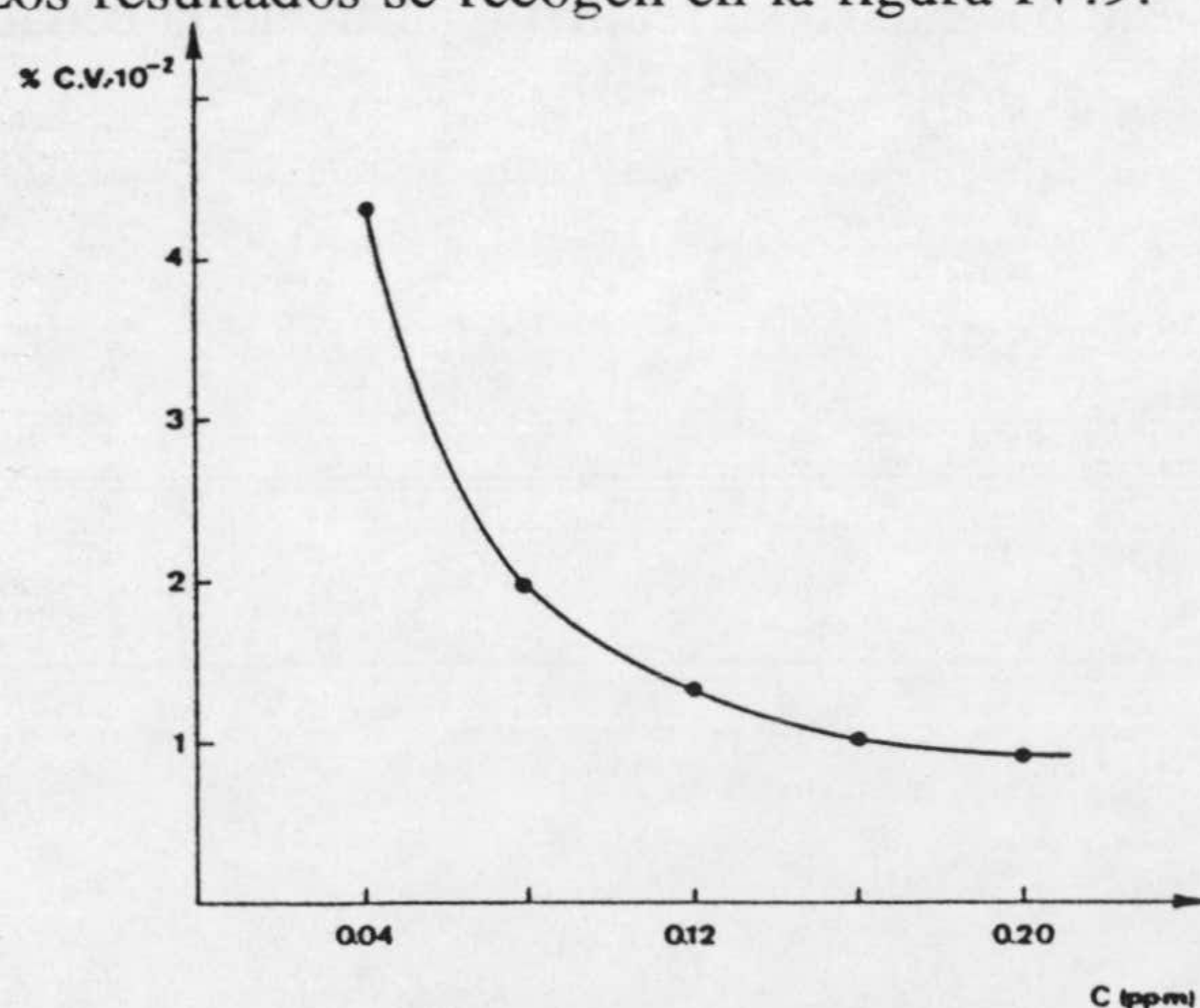


Figura IV.9. Variación del  $\% \text{ C.V.}(c)$  con la concentración de Mo(VI) en fase acuosa.



## MOLIBDENO

---

Los errores del método expresados como coeficientes de variación (% C.V.) son en cada caso de 1.25 y 1.79 % respectivamente.

### IV. 2.5.3. Sensibilidad.

El cálculo de la sensibilidad se realizó a partir de la desviación estándar de regresión y de la pendiente de la recta de calibrado.

El resultado obtenido es de 2.1 ppb. Este valor aportaría información acerca del mínimo intervalo de confianza discernible entre dos concentraciones en todo el rango de concentraciones estudiado.

### IV.2.5.4. Límites de detección y cuantificación.

#### IV.2.5.4.1. Estimación de la mínima masa detectable.

La determinación de este parámetro se realizó a partir de la ecuación [8] del capítulo II, en la cual se sustituyeron como datos:

- $M = 90.94 \text{ g.mol}^{-1}$ .
- $k' = 1.06$
- $S/N = 2$ .
- $N_0 = 5.3 \times 10^{-5} \text{ UA}$ .
- $L = 25 \text{ cm}$ .
- $L_c = 1 \text{ cm}$ .
- $d_c = 0.4 \text{ cm}$ .
- $\epsilon = 9882$ .
- $N = 2947$ .



## CAPÍTULO IV

---

El resultado obtenido fue de  $8.8 \times 10^{-4} \mu\text{g}$ , el cual se correspondería con una concentración de molibdeno en fase orgánica de 0.044 ppm, es decir, para la relación de fases utilizada en la extracción ( $r = 0.05$ ), con una concentración de 2.2 ppb de Mo(VI) en fase acuosa.

IV:2.5.4.2. *Estimación de los límites inferiores del rango dinámico lineal, según lo establecido en el capítulo II.*

a) A partir de los datos de calibrado:

De acuerdo con la ecuación [10] del capítulo II propuesta por Cuadros y col. se obtiene como **límite de detección (aprox.) = 2.00 ppb en fase acuosa.**

b) A partir de las consideraciones de Long & Winefordner (según la normativa de la IUPAC).

- Límite de decisión . . . . .	3.2 ppb.
- Límite de detección . . . . .	6.4 ppb.
- Límite de determinación . . . . .	10.6 ppb.

c) A partir de la evaluación de las probabilidades de falso positivo y falso negativo:

Según lo recogido en el mismo capítulo, el análisis de las curvas características de detección del analito para dos determinaciones sobre el blanco y para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% ( $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$ ), se obtuvieron los siguientes resultados:

- Límite de detección . . . . .	6.4 ppb.
- Altura de pico asociada . . . . .	447.



#### IV.2.6. MÉTODO PROPUESTO.

Las anteriores experiencias nos permiten proponer el siguiente método para la determinación de Mo(VI):

Transferir a un matraz de 250 ml, una cantidad medida de muestra que no contenga más de 20  $\mu\text{g}$  de Mo(VI). Añadir 50 ml de agua bidestilada y 26.4 ml de ácido clorhídrico concentrado, completando hasta 100 ml con agua bidestilada. Agitar durante tres minutos con 5 ml de una disolución al 0.075% (p/v) de BPHA en cloroformo (estabilizado con amileno). Separar la fase orgánica agitarla con sulfato sódico anhidro, centrifugarla y filtrarla a través de un filtro Anotop de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Para el análisis cromatográfico, se equilibra a 20 °C una columna S5-Nitrilo (250x4.6 mm) con una fase móvil constituida por una disolución  $3.25 \times 10^{-3}$  M de BPHA en cloroformo, empleando un flujo de 0.8 ml.min<sup>-1</sup>. Se inyectan 20  $\mu\text{l}$  del extracto orgánico y se registra el cromatograma utilizando una longitud de onda de detección de 360 nm.

#### IV.2.7. SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Se estudió la influencia que ejercían 43 iones extraños en la determinación de molibdeno siguiendo el procedimiento recomendado y operando sobre disoluciones que contenían 8  $\mu\text{g}$  de dicho elemento en fase acuosa.

La concentración máxima ensayada para todos los iones fue de 80 ppm.

La determinación del error relativo provocado por cada uno de los iones ensayado se llevó a cabo a partir de la medida de la altura del pico debido al analito y con ayuda de una recta de calibrado.

Los iones eran considerados no interferentes cuando producían una desviación en la altura de pico no superior a un 5%.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla IV.13.



CAPÍTULO IV

TABLA IV.13. Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 80 ppb de Mo(VI) en fase acuosa ( $r = 0.05$ ).

IÓN extraño	Concentración (ppm)	IÓN extraño/Mo (m/m)	$E_r$ %
Acetato	80	1000	3.3
B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	80	1000	0.0
Br <sup>-</sup>	80	1000	0.0
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	80	1000	4.9
Citrato	80	1000	1.6
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	80	1000	1.6
I <sup>-</sup>	80	1000	0.0
F <sup>-</sup>	80	1000	3.3
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	80	1000	0.0
Tartrato	80	1000	-2.5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	80	1000	0.0
Oxalato	80	1000	1.6
Na(I)	80	1000	0.0
Li(I)	80	1000	-1.6
K(I)	80	1000	0.0
Rb(I)	80	1000	-1.6
Cs(I)	80	1000	0.0
Cu(II)	80	1000	0.0
Co(II)	80	1000	-3.0
Cd(II)	80	1000	0.0
Zn(II)	80	1000	3.3
Hg(II)	80	1000	1.5
Bi(III)	80	1000	4.1
Be(II)	80	1000	0.0
Sr(II)	80	1000	0.0
Ca(II)	80	1000	0.0



MOLIBDENO

TABLA IV.13. (Continuación) Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 80 ppb de Mo(VI) en fase acuosa ( $r = 0.05$ ).

Ión extraño	Concentración (ppm)	Ión extraño/Mo (m/m)	$E_r$ %
Ba(II)	80	1000	1.5
Al(III)	80	1000	4.9
Sn(IV)	80	1000	3.2
Cr(III)	80	1000	3.5
As(V)	80	1000	-1.6
Fe(III)	80	1000	0.0
Ni(II)	80	1000	-1.6
Mn(II)	80	1000	3.2
Mg(II)	80	1000	-1.6
Se(IV)	80	1000	1.6
Zr(IV)	80	1000	-65.0
	20	250	-23.5
	8	100	0.0
V(V)	80	1000	-100.0
V(V) <sup>(a)</sup>	1	25	-6.1
W(VI)	80	1000	-100
	8	100	-1.6
Ti(IV)	80	1000	1.6
Pb(II)	80	1000	-6.0
Tl(III)	80	1000	-100.0
	40	500	-1.5
Tl(I)	80	1000	11.3
	60	750	-3.1

<sup>(a)</sup> En presencia de 1000 ppm de  $I^-$ .



## CAPÍTULO IV

---

A partir de los resultados obtenidos, se pueden sacar las siguientes conclusiones:

1.- *La mayoría de los iones ensayados son tolerados directamente en proporciones de 1000/1 en peso con respecto al molibdeno.*

2.- *Los únicos iones que interfieren son el Zr(IV), W(VI) y V(V):*

*- Los iones Zr(IV) y W(VI) interfieren negativamente debido a la formación de precipitados en la interfase que adsorben gran parte del complejo Mo(VI)-BPHA. Estas interferencias pueden eliminarse disminuyendo la relación en peso hasta 100/1 en ambos iones.*

*- El V(V) interfiere seriamente debido a la extracción del complejo V(V)-BPHA, el cual en las condiciones de la determinación, eluye a un tiempo de retención próximo al del complejo de molibdeno, de forma que ambos picos se solapan. No obstante, esta interferencia puede minimizarse si la extracción se realiza utilizando  $I^-$  como enmascarante, debido a que dicho anión reduce en medio fuertemente ácido el V(V) a V(IV), el cual no reacciona con la BPHA. Bajo estas condiciones, el vanadio es tolerado en proporción 25:1.*



### IV.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de molibdeno en diferentes tipos de muestras en las que tiene interés conocer su contenido y en las que dicho elemento se encuentra generalmente en concentraciones inferiores al 1% en peso.

Las muestras seleccionadas para este estudio fueron las siguientes:

- Batido dietético elaborado por Cambridge Plan-Nutricare S.A..
- Lentejas "calidad extra" (*Herbun nonatum*).
- Fertilizante sólido de la casa BASF Española S.A.
- Complejo vitamínico elaborado por los laboratorios Abbott S.A.

#### IV.3.1 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS.

Ver metodología (Capítulo I).

#### IV.3.2. RESULTADOS.

##### IV.3.2.1. Tratamiento estadístico de los resultados.

Dicho tratamiento, realizado siguiendo el protocolo recogido en el capítulo II (apartado II.4.3) se basa en la comprobación de la exactitud del método analítico (validación de dicho



## CAPÍTULO IV

---

método para una determinada muestra real) mediante la utilización de los datos obtenidos en tres experiencias de calibrado: con patrones, con adición de patrón y con porciones de muestra (calibrado de Youden).

Utilizando esta estrategia de cálculo, la **exactitud del resultado analítico** se comprueba mediante la comparación de los contenidos de analito encontrados en los distintos calibrados.

### a) *Procedimiento experimental.*

El procedimiento experimental, requiere la realización de tres experiencias paralelas para obtener los datos necesarios, con el fin de poder aplicar el protocolo estadístico propuesto. **En cada una de ellas se aplica siempre el procedimiento del método analítico.**

Utilizando el análisis de regresión lineal, se calcula para cada recta, su pendiente, altura en el origen y desviación estandar de regresión.

### IV.3.3. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MOLIBDENO DE UNA MUESTRA DE BATIDO DIETETICO ELABORADO POR CAMBRIDGE PLAN-NUTRICARE S.A.

La muestra, recomendada para ser utilizada como complemento nutricional ( vitamínico y mineral) en la dieta, contiene la siguiente composición media por 100 g de producto:

PROTEINAS	33 g
GRASA	3 g
HIDRATOS DE CARBONO	44 g
FIBRA	3 g
HUMEDAD	< 5 g

La composición mineral suministrada por la empresa fabricante para esta muestra, es la siguiente:



## MOLIBDENO

Elemento	Contenido por 100 g de producto
Ca(II) (mg)	1000
P (mg)	1000
Mg(II) (mg)	400
Na(I) (mg)	1500
K(I) (mg)	2010
Cl <sup>-</sup> (mg)	1800
Fe(III) (mg)	18
Zn(II) (mg)	15
Cu(II) (mg)	2
Mn(II) (mg)	4
Mo(VI) (mg)	0.15 *
Se(IV) (μg)	60
Cr(III) (μg)	60
I <sup>-</sup> (mg)	0.15

\* Corresponde a una concentración de 1.5 mg.kg<sup>-1</sup>.

La determinación del contenido en Mo, se realizó a partir de una disolución obtenida tratando 100.78 g de muestra homogénea, de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo I y llevando a un volumen final de 100 ml.

### IV.3.3.1. Resultados.

En la tabla IV.14 se recogen las alturas de pico del complejo Mo(VI)-BPHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación, i.e. calibrado con patrones, calibrado por adición de patrón y calibrado de Youden.



CAPÍTULO IV

TABLA IV.14. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de Mo en una muestra de batido dietético.

CALIBRADO	Vol. <sub>muestra</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub> añadida	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	---	0.000	---	0	0
	---	0.040	---	6613	6827
	---	0.080	---	12800	13227
	---	0.120	---	19414	19627
	---	0.160	---	25921	26241
	---	0.200	---	33279	33279
ADICIÓN DE PATRÓN	3 ml	---	0.000	6187	6187
	3 ml	---	0.040	12374	12587
	3 ml	---	0.080	20054	20054
	3 ml	---	0.120	25601	25596
YUDEN	1 ml	---	---	2133	
	2 ml	---	---	4267	
	3 ml	---	---	6720	
	4 ml	---	---	8640	
	5 ml	---	---	10667	
	6 ml	---	---	12800	
DETERMIN.	3 ml	---	---	6187	
	3 ml	---	---	6187	
	3 ml	---	---	6720	
	3 ml	---	---	6613	
	3 ml	---	---	6827	
	3 ml	---	---	6400	

\* ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )



## MOLIBDENO

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se reúnen a continuación:

**TABLA IV.15. Resultados estadísticos obtenidos en el análisis de Mo de una muestra de batido dietético.**

	CALIBRADO		
	A. Patrón	Patrones	Youden
Pendiente	164520	164989	212729
n	8	12	6
s	428.726	274.242	143.831
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No hay diferencia significativa		
Test de exactitud	$t_{cal} = 0 < t_{tab} = 2.110$ ( $\alpha = 0.05$ , gdl = 17)		
Contenido de analito	$1.30 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (n = 6); C.V. % = 4.21		

De los datos obtenidos, se puede deducir que *para este tipo de muestra, el método es exacto. tiene una precisión adecuada y el resultado obtenido concuerda con el suministrado por el fabricante que es de  $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .*



## CAPÍTULO IV

---

### IV.3.4. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MOLIBDENO DE UNA MUESTRA DE LENTEJAS (*HERBUM NONATUM*).

Para este estudio se utilizó una muestra de lenteja de categoría comercial "extra", procedente de Aragón. La determinación del contenido en Mo, se realizó a partir de una disolución obtenida tratando 100.76 g de muestra homogénea, de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo I y llevando a un volumen final de 100 ml. Se preparó una disolución de trabajo, llevando 10 ml de la disolución anterior a un volumen final de 100 ml.

#### IV.3.4.1 Resultados.

En la tabla IV.16 se recogen las alturas de pico del complejo Mo(VI)-BPHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación, i.e. calibrado con patrones, calibrado por adición de patrón y calibrado de Youden.



MOLIBDENO

TABLA IV.16. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de Mo en una muestra de lentes.

CALIBRADO	Vol. <sub>muestra</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub> añadida	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	---	0.000	---	0	0
	---	0.040	---	6613	6827
	---	0.080	---	12800	13227
	---	0.120	---	19414	19627
	---	0.160	---	25921	26241
	---	0.200	---	33279	33279
ADICIÓN DE PATRÓN	1 ml	---	0.000	5760	6613
	1 ml	---	0.040	12800	12800
	1 ml	---	0.080	19307	19627
	1 ml	---	0.120	26241	26241
YOUDEN	1 ml	---	---	5760	
	2 ml	---	---	12587	
	3 ml	---	---	19201	
	4 ml	---	---	24961	
DETERM.	1 ml	---	---	7040	
	1 ml	---	---	6613	
	1 ml	---	---	6827	
	1 ml	---	---	6827	

\* ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en



## CAPÍTULO IV

la tabla anterior se reúnen a continuación:

**TABLA IV.17. Resultados obtenidos en el análisis de Mo de una muestra de lentejas.**

	CALIBRADO		
	A. Patrón	Patrones	Youden
	Pendiente	167076	164989
n	8	12	4
s	267.136	274.242	390.619
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No hay diferencia significativa		
Test de exactitud	$t_{\text{cal}} = 0.497 < t_{\text{tab}} = 2.110$ ( $\alpha = 0.05$ , gdl = 17)		
<i>Contenido de analito</i>	<b>41.09 <math>\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}</math> (n = 4); C.V. % = 2.56</b>		

De los datos obtenidos en la tabla IV.17., se puede deducir que *para este tipo de muestra, el método es exacto. presentando una precisión adecuada.*

También hay que decir que el resultado obtenido concuerda con el determinado para esta misma muestra por espectroscopía de absorción atómica [3].



## MOLIBDENO

### IV.3.5. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MOLIBDENO DE UNA MUESTRA DE FERTILIZANTE SÓLIDO SUMINISTRADO POR BASF ESPAÑOLA S.A.

La composición suministrada por la empresa fabricante del fertilizante, es la siguiente:

Componente	Contenido por 100 g de producto (g)
N total	12
N amoniacal	2.8
N amídico	0.7
Crotonilidendiurea (CDU)	8.5
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> soluble en H <sub>2</sub> O y Citrate amónico	6
K <sub>2</sub> O soluble en H <sub>2</sub> O	9
Mg(II)	1.8
Mn(II)	0.075
B	0.015
Fe(III)	0.0105
Cu(II)	0.03
Mo(VI)	0.105 *

\* Corresponde a una concentración de 105 mg.kg<sup>-1</sup>.

La determinación del contenido Mo, se realizó a partir de una disolución obtenida tratando 4.863 g de muestra (suministrada en forma de varitas, de las cuales se pesaron cinco) de acuerdo con el procedimiento anteriormente descrito y llevando finalmente a un volumen de 100 ml.

#### IV.3.5.1. Resultados.

En la tabla IV.18 se recogen las alturas de pico del complejo Mo(VI)-BPHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la



CAPÍTULO IV

determinación, i.e. calibrado con patrones, calibrado por adición de patrón y calibrado de Youden.

**TABLA IV.18. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de Mo en una muestra de fertilizante.**

CALIBRADO	Vol. muestra	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	[Mo (VI)]* <sub>f.a.</sub>	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	---	0.000	---	0	0
	---	0.040	---	6613	6827
	---	0.080	---	12800	13227
	---	0.120	---	19414	19627
	---	0.160	---	25921	26241
	---	0.200	---	33279	33279
ADICIÓN DE PATRÓN	0.8 ml	---	0.000	6400	5760
	0.8 ml	---	0.040	12800	12587
	0.8 ml	---	0.080	18987	18667
	0.8 ml	---	0.120	26027	26027
YOU DEN	0.8 ml	---	---	6187	
	1.6 ml	---	---	12374	
	2.4 ml	---	---	18347	
	3.2 ml	---	---	23681	
DETERM.	0.8 ml	---	---	6400	
	0.8 ml	---	---	5760	
	0.8 ml	---	---	6187	
	0.8 ml	---	---	6973	
	0.8 ml	---	---	6400	
	0.8 ml	---	---	6187	

\* ( $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ )



## MOLIBDENO

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se reúnen a continuación:

**TABLA IV.19. Resultados obtenidos en el análisis de Mo de una muestra de fertilizante sólido.**

	CALIBRADO		
	A. Patrón	Patrones	Youden
	Pendiente	164936	164989
n	8	12	4
s	339.078	274.242	308.977
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No hay diferencia significativa		
Test de exactitud	$t_{cal} = 0 < t_{tab} = 2.110$ ( $\alpha = 0.05$ , gdl = 17)		
Contenido de analito	95.86 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (n = 6); C.V. % = 4.06		

*Los resultados obtenidos concuerdan aceptablemente con el dato suministrado por el fabricante que es de 105  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , teniendo en cuenta que el producto se presenta en forma de varitas de composición no muy homogénea. Por esta razón, se comprobó el contenido de Mo en la muestra mediante un análisis por E.A.A., obteniéndose un resultado de 95.3  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ .*



MOLIBDENO

TABLA IV.20. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de Mo en una muestra de complejo vitamínico.

CALIBRADO	Vol. muestra	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	---	0.000	---	0	0
	---	0.040	---	6613	6827
	---	0.080	---	12833	13227
	---	0.120	---	19414	19627
	---	0.160	---	25219	26241
	---	1.200	---	33279	33279
ADICIÓN DE PATRÓN	0.8	---	0.000	6400	7253
	0.8	---	0.040	13440	13440
	0.8	---	0.080	19841	19414
	0.8	---	0.120	26889	26241
YUDEN	0.8	---	---	6187	
	1.6	---	---	12800	
	2.4	---	---	20054	
	3.2	---	---	25281	
DETERMIN.	0.8	---	---	6187	
	0.8	---	---	6187	
	0.8	---	---	6187	
	0.8	---	---	6187	
	0.8	---	---	6400	
	0.8	---	---	6187	
	0.8	---	---	7253	
	0.8	---	---	6400	

\* ( $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ )



## CAPÍTULO IV

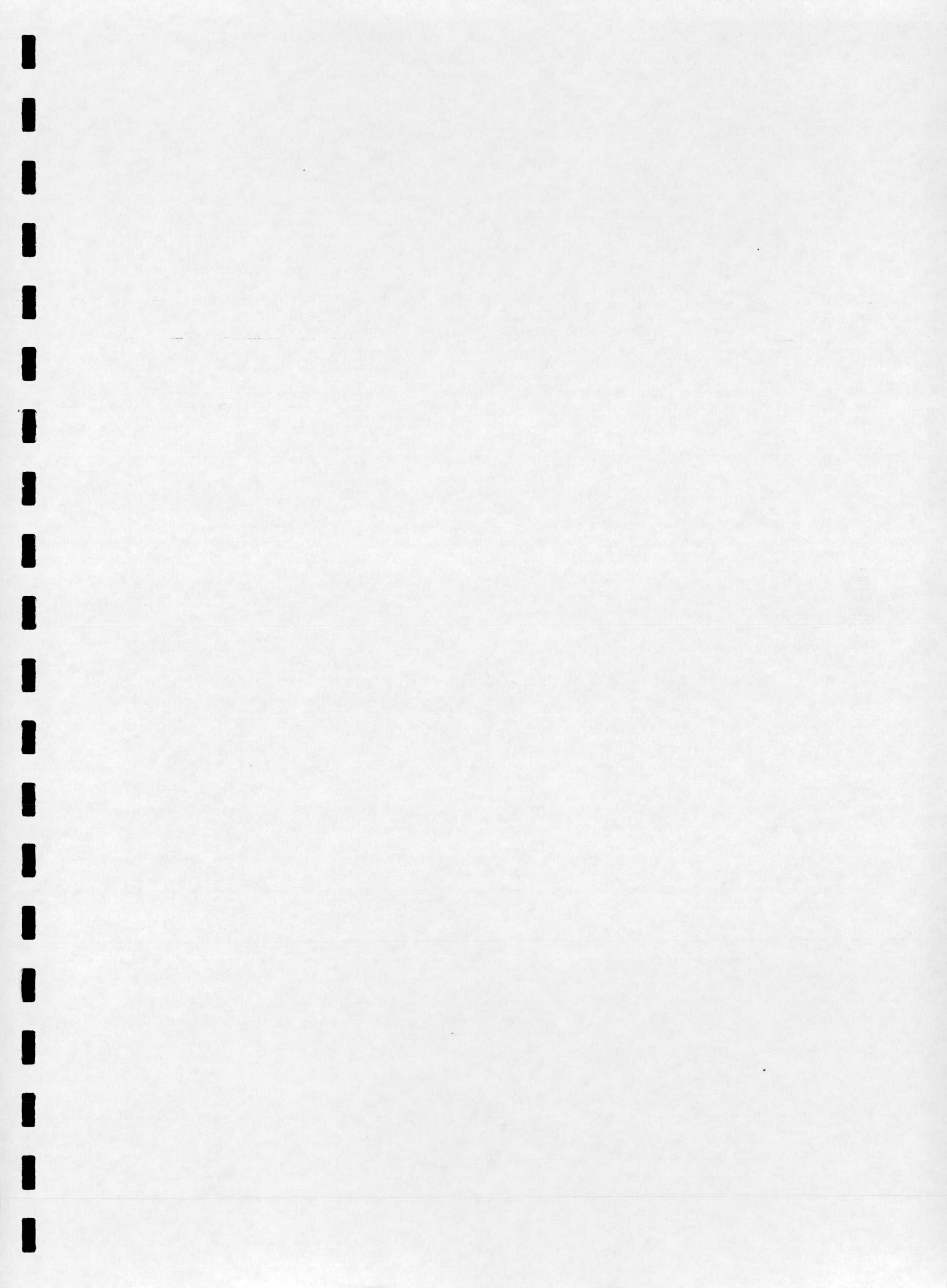
Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se reúnen a continuación:

**TABLA IV.21. Resultados obtenidos en el análisis de Mo de una muestra de complejo vitamínico.**

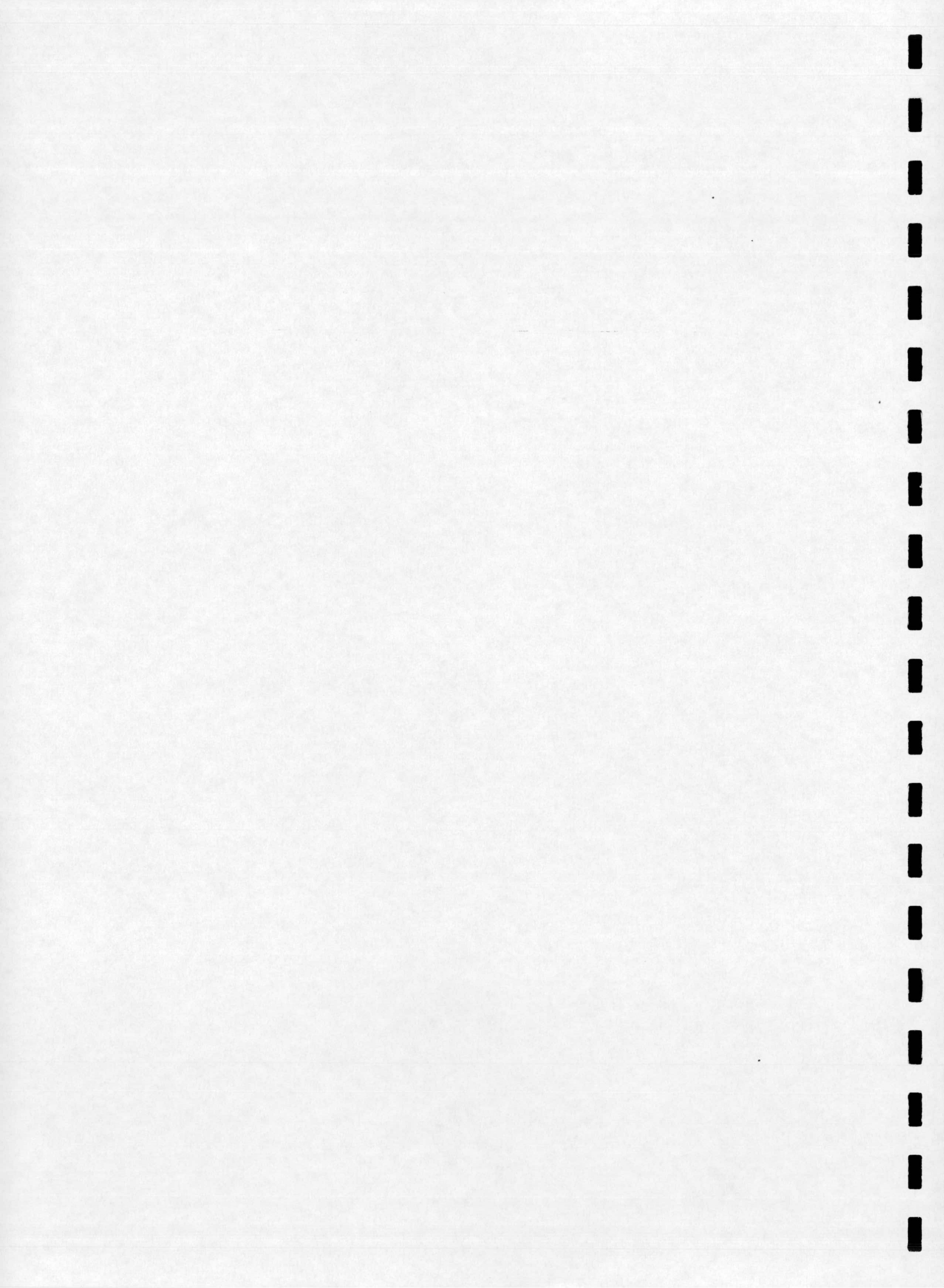
	CALIBRADO		
	A. Patrón	Patrones	Youden
Pendiente	163507	164989	$4.03 \times 10^7$
n	8	12	4
s	377.648	274.242	646.591
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No hay diferencia significativa		
Test de exactitud	$t_{\text{cal}} = 0.23 < t_{\text{tab}} = 2.110$ ( $\alpha = 0.05$ , gdl = 17)		
Contenido de analito	$243.9 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (n = 8); C.V. % = 5.66		

Hay que señalar que los resultados obtenidos concuerdan con el recogido en bibliografía para esta misma muestra [4].

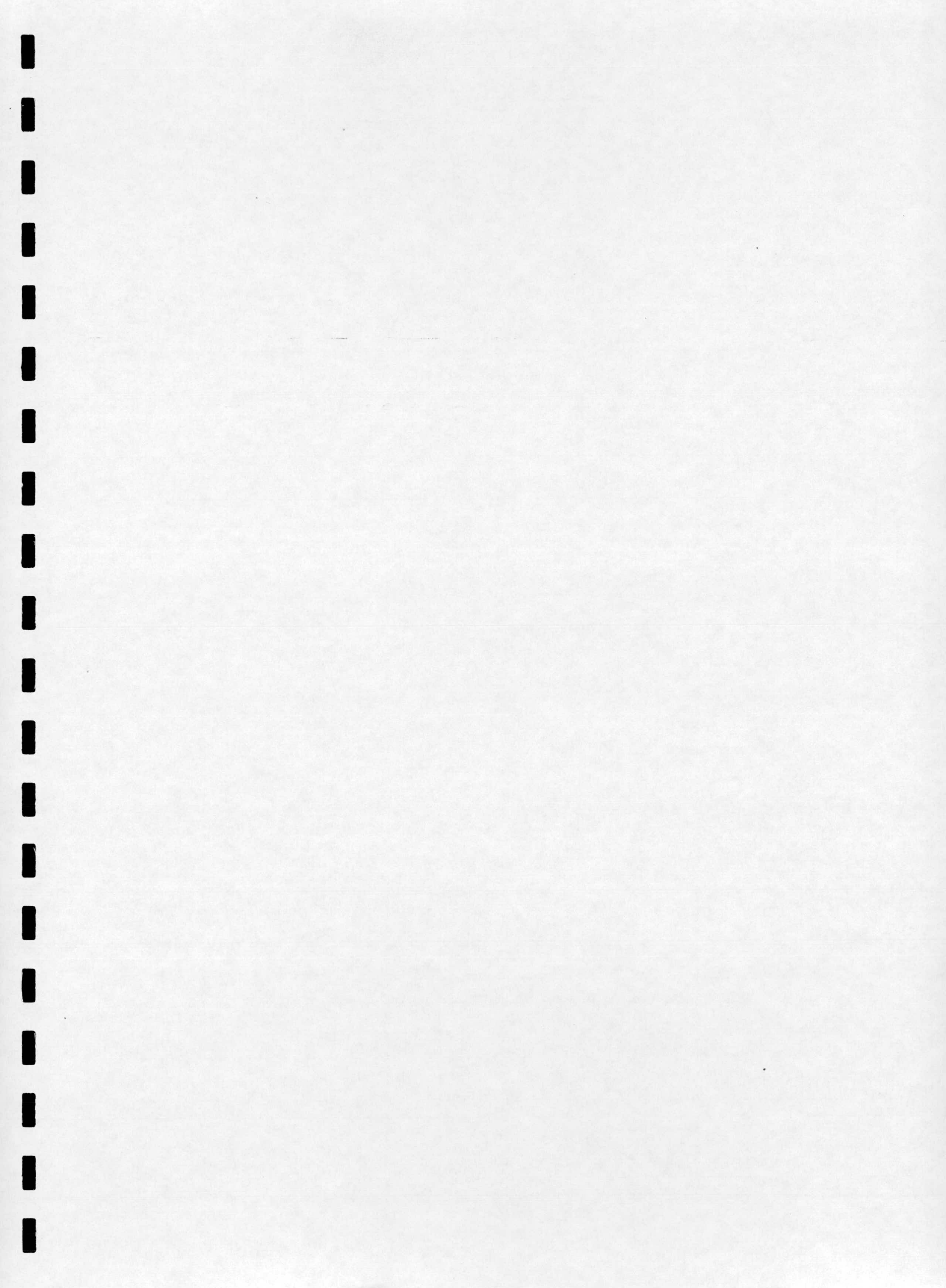




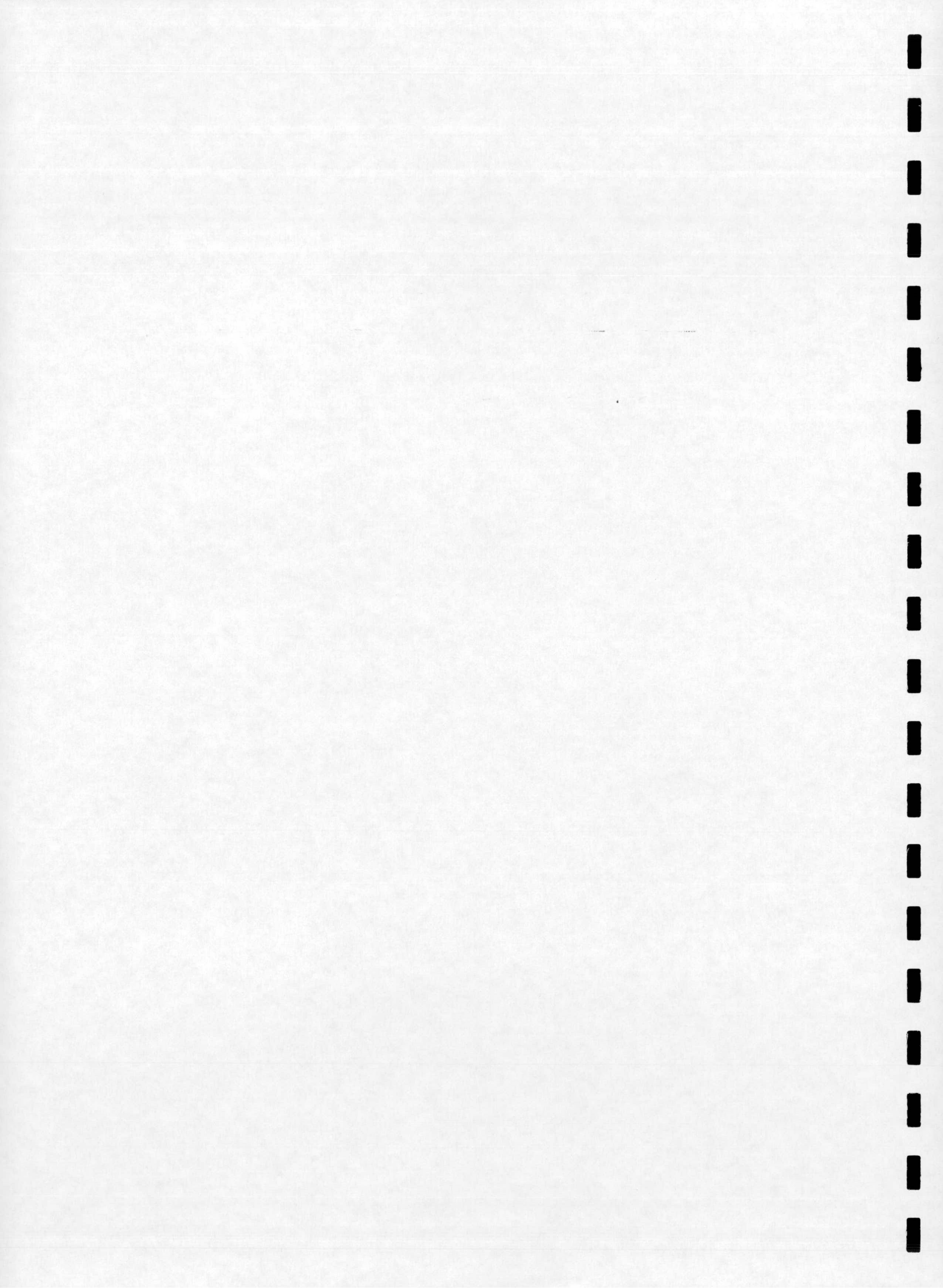














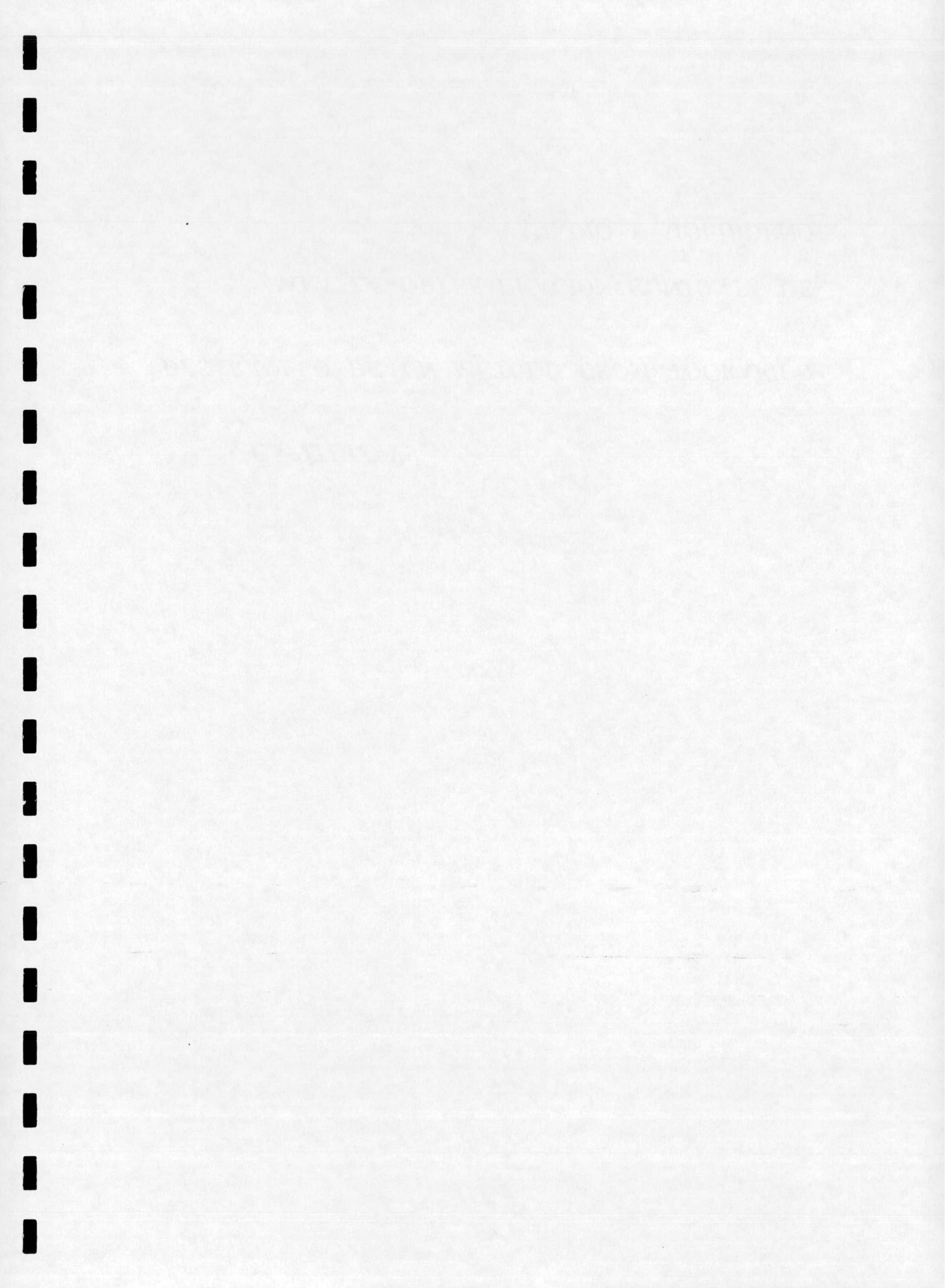
*CAPÍTULO V:*

*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO*

*PARA LA DETERMINACIÓN CONJUNTA DE*

*VANADIO Y MOLIBDENO*







*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO PARA  
LA DETERMINACIÓN CONJUNTA  
DE VANADIO Y MOLIBDENO*

La puesta a punto de sendos métodos cromatográficos, para la determinación de vanadio y molibdeno (Capítulos III y IV), partiendo de procesos de extracción líquido-líquido muy similares (Véase tabla V.1), nos sugirieron la posibilidad de desarrollar un método de determinación conjunta de ambos elementos. Dicho método, tendría interés para el análisis de muestras que contuvieran ambos analitos en un rango similar de concentraciones.



VANADIO Y MOLIBDENO

**V.1 CONDICIONES EXPERIMENTALES INICIALES.**

En la tabla V.1 se recogen las condiciones utilizadas en la extracción individual de vanadio y molibdeno.

**TABLA V.1. Condiciones para la extracción individual de V(V) y Mo(VI) con BPHA.**

Parámetros de la extracción	V(V)	Mo(VI)
[HCl] fase acuosa	3-4 N	Entre 1 y 5 N
Orden de adición	V(V) + H <sub>2</sub> O + HCl	Mo(VI) + H <sub>2</sub> O + HCl
[BPHA] fase orgánica	D <sup>ón</sup> al 0.1 % (p/v) en CHCl <sub>3</sub>	D <sup>ón</sup> al 0.075 % (p/v) en CHCl <sub>3</sub>
Tiempo de agitación	30 s.	3 min.
Relación de fases (Org.:Ac.)	Entre 1:1 y 1:20	Entre 1:1 y 1:20

A la vista de esta tabla, podemos pensar que es posible la extracción conjunta de V(V) y Mo(VI), a partir de una disolución 4 N en HCl, con una disolución al 0.1 % (p/v) de BPHA en CHCl<sub>3</sub> y empleando un tiempo de agitación de 3 minutos.

Tomando como base estas condiciones experimentales se planificaron las experiencias que se recogen a continuación, utilizando en todos los casos el siguiente procedimiento de extracción:

En matraces de 250 ml se introducen por este orden:

*Fase acuosa*

- Una cantidad medida de muestra que no contenga más de 7.5 µg de V(V) y 20 µg de Mo(VI).
- La cantidad de agua bidestilada necesaria para obtener un volumen final de 100 ml.
- 35.4 ml de HCl conc.



## CAPÍTULO V

---

### *Fase orgánica*

- 5 ml de una disolución al 0.1% (p/v) de BPHA en  $\text{CHCl}_3$  (estabilizado con amileno).

Después de agitar cada matraz durante 3 min., se separa la fase orgánica, la cual se deshidrata con una pequeña cantidad de sulfato sódico anhidro y finalmente se centrifuga.



## V.2. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO PARA LA SEPARACIÓN DE VANADIO Y MOLIBDENO.

### V.2.1. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS.

A partir de los datos obtenidos en el capítulo anterior, se seleccionó un sistema cromatográfico de las siguientes características:

<b>Columna:</b>	Cartucho Spherisorb HPLC S5 nitrilo 250-4 mm, relleno de partículas de fase estacionaria de 5 $\mu\text{m}$ de tamaño.
<b>Precolumna:</b>	Cartucho Spherisorb S5 CN 10-4.6 mm.
<b>Temperatura de la columna:</b>	20 °C.
<b>Fase móvil:</b>	Disolución $3.25 \times 10^{-3}$ M de BPHA estabilizado con amileno.
<b>Detección:</b>	Espectrofotométrica a 360 nm.
<b>Volumen inyección:</b>	20 $\mu\text{l}$ .
<b>Flujo de fase móvil:</b>	0.8 $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

Se inyectó un extracto orgánico de los complejos obtenidos a partir de una disolución de 0.080 ppm de V(V) y Mo(VI) en fase acuosa obteniéndose el cromatograma recogido en la figura V.1, en la que se pueden observar:

- 1.- La aparición de un pico a 7.305 min. correspondiente al complejo V(V)-BPHA (se sabía por estudio de interferencias de Mo(VI)).
- 2.- La aparición de un pico a 7.630 min. atribuido al complejo Mo(VI)-BPHA.
- 3.- Aparición de un pico a 8.975 min. atribuido como en casos anteriores al exceso de N-BPHA que lleva el extracto orgánico.



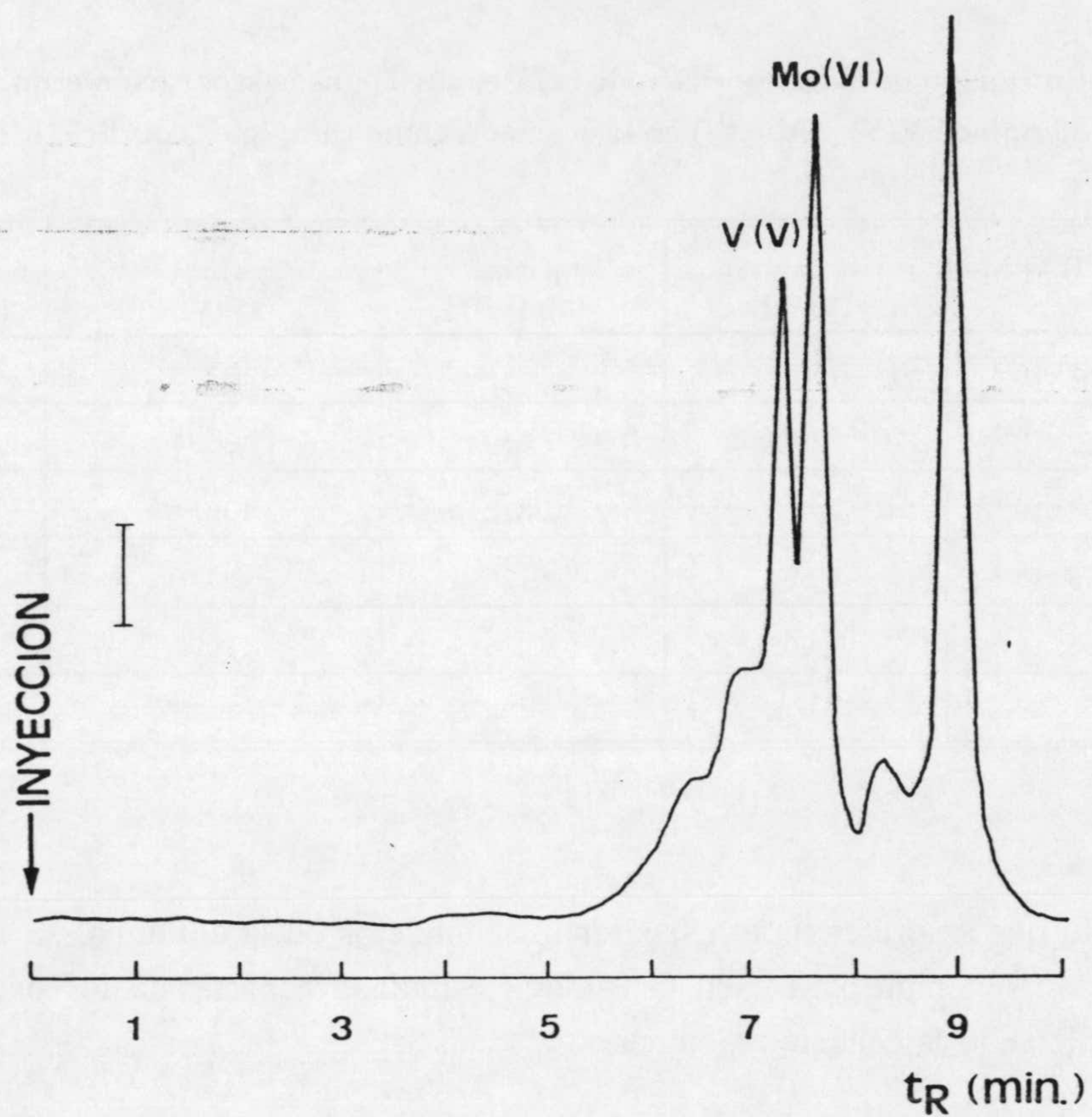


FIGURA V.1. Asignación de los picos que aparecen en el cromatograma.

#### V.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL.

El estudio de la influencia que ejerce la concentración de N-BPHA la fase móvil, se llevó a cabo modificando dicha concentración entre  $4.68 \times 10^{-3}$  M y 0, manteniendo constante el resto de los parámetros cromatográficos.



VANADIO Y MOLIBDENO

**TABLA V.2.** Optimización de la composición de la fase móvil para la separación cromatográfica de 80 ppb de V(V) y Mo(VI) en fase acuosa como complejos con BPHA ( $r = 0.05$ ).

% BPHA	[BPHA] M	$t_R$ min. (V(V))	$t_R$ min. (Mo(VI))	$h_{pico}$ (V(V))	$h_{pico}$ (Mo(VI))
0.1000	$4.68 \times 10^{-3}$	7.107	7.385	13223	18347
0.0750	$3.52 \times 10^{-3}$	7.305	7.630	13654	16854
0.0500	$2.34 \times 10^{-3}$	7.453	7.812	13654	15147
0.0250	$1.17 \times 10^{-3}$	7.694	8.126	13440	12267
0.0125	$5.85 \times 10^{-4}$	7.902	8.385	11094	12160
0.0000	=====	7.938	8.478	4480	7253

Dado que lo que se pretendía era separar los complejos en la columna, se procedió a calcular la resolución obtenida para cada fase móvil estudiada a partir de los datos de los cromatogramas, utilizando la ecuación siguiente:

$$R_s = 1.176 \frac{t_R(2) - t_R(1)}{w^{1/2}(2) + w^{1/2}(1)}$$

Los valores obtenidos se recogen en la tabla V.3 y se representan en la figura V.2.



CAPÍTULO V

Tabla V.3. Resolución de los picos de los complejos en función de la composición de la fase móvil.

[BPHA] M	W <sup>1/2</sup> (V(V))	W <sup>1/2</sup> (Mo(VI))	R <sub>s</sub>
4.68x10 <sup>-3</sup>	0.184	0.221	0.807
3.52x10 <sup>-3</sup>	0.278	0.278	0.687
2.34x10 <sup>-3</sup>	0.293	0.294	0.719
1.17x10 <sup>-3</sup>	0.286	0.296	0.873
5.85x10 <sup>-4</sup>	0.283	0.947	
0.0000	0.277	0.300	1.101

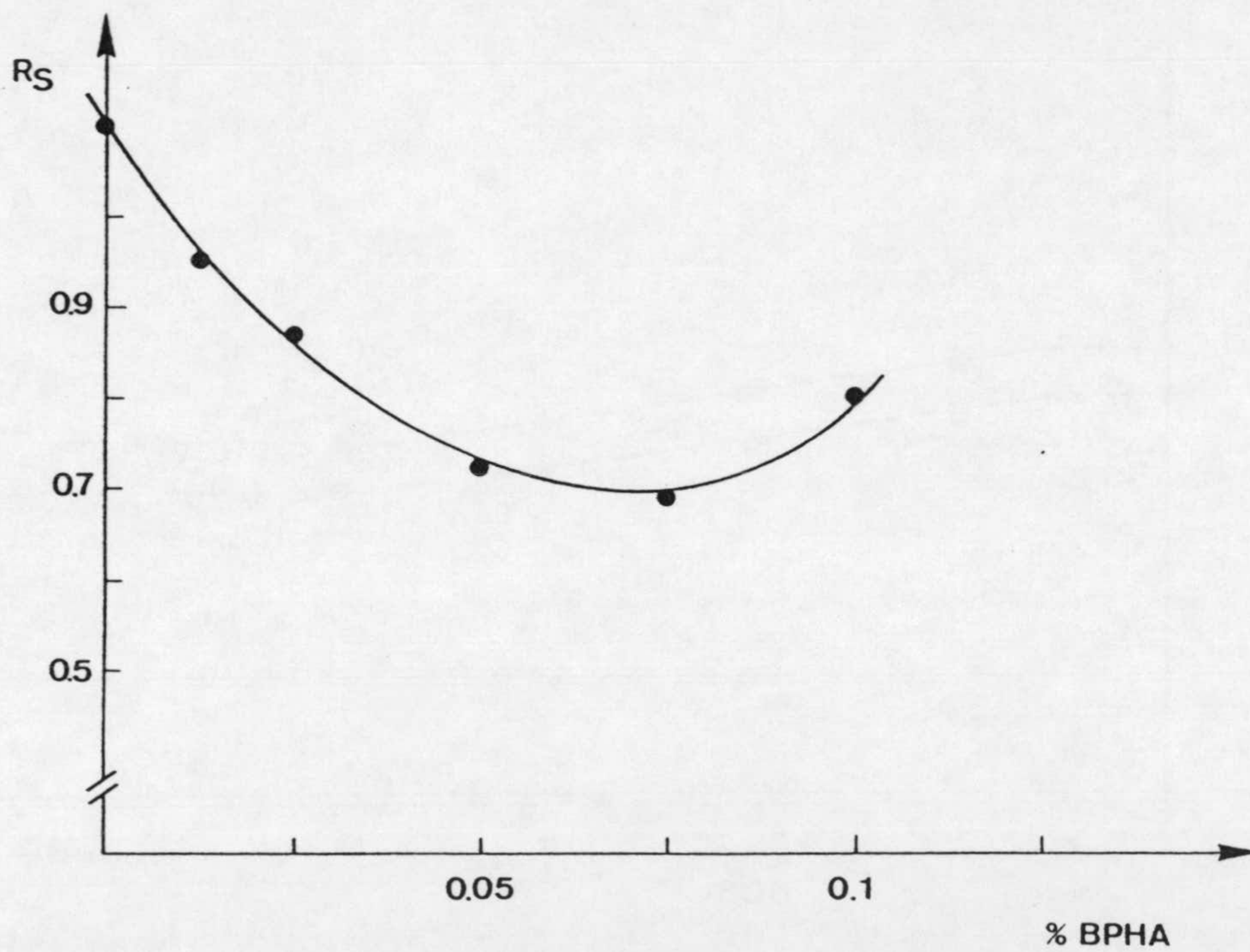


FIGURA V.2. Resolución de los complejos V(V)-N-BPHA y Mo(VI)-N-BPHA en función de la composición de la fase móvil.



## VANADIO Y MOLIBDENO

A la vista de los resultados podemos concluir que, la **disminución de la concentración de BPHA en la fase móvil** da lugar a los siguientes hechos:

- 1.- Se produce una **disminución en las alturas de pico de ambos complejos**, siendo esta **disminución más acusada, cuando la fase móvil está constituida sólo por cloroformo** (lo cual podría indicar que la presencia de BPHA en la fase móvil estabiliza los complejos. Individualmente se puede observar a su vez, que el efecto sobre la altura de pico es más acusado para el pico correspondiente al complejo de Mo(VI).
- 2.- Se produce un **aumento en la resolución entre los picos de los complejos**, siendo máxima para una fase móvil constituida solamente por cloroformo.
- 3.- La **retención de los complejos, y en consecuencia los valores de sus  $k'$  respectivos, aumenta al disminuir el contenido en BPHA de la fase móvil**, tal como se refleja en la figuras V.3 y V.4 donde se visualiza la variación de los  $k'$  de las especies y la variación de sus tiempos de retención con la composición de la fase móvil.

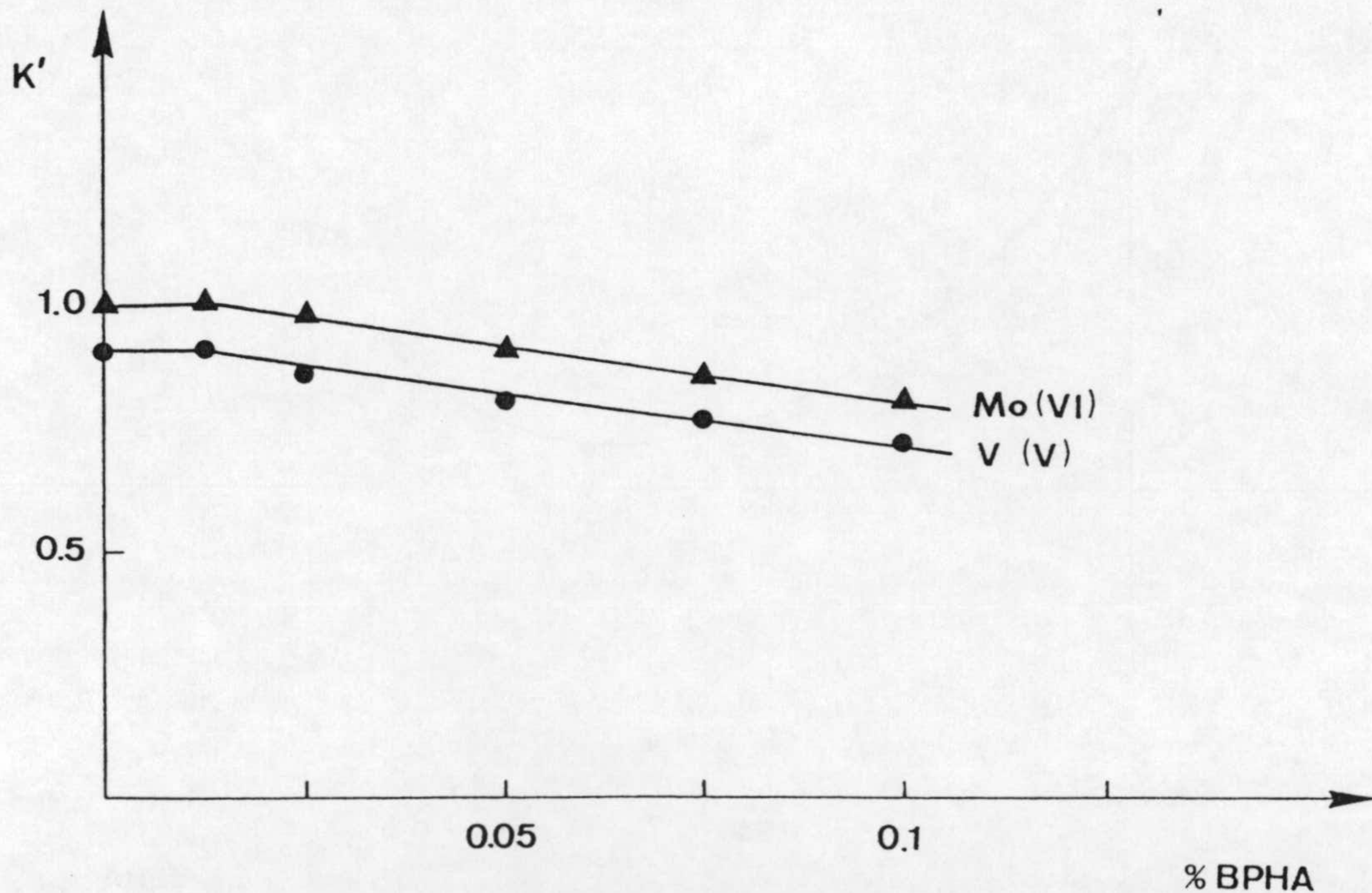


FIGURA V.3. Influencia de la composición de la fase móvil sobre los valores de  $k'$  de los complejos de V(V) y Mo(VI) con la N-BPHA.



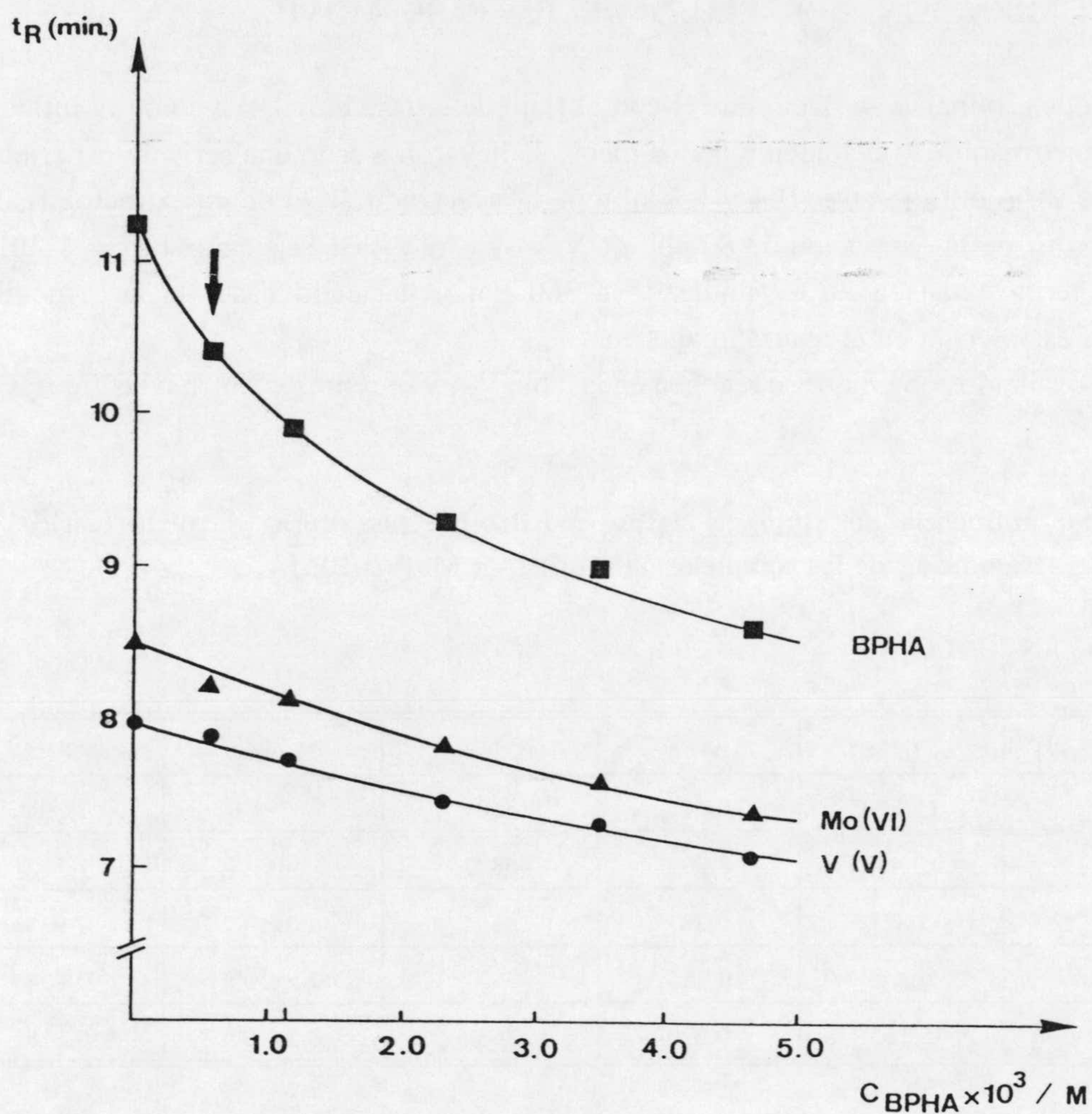


FIGURA V.4. Influencia de la composición de la fase móvil sobre los tiempos de retención de los complejos de V(V) y Mo(VI) con la N-BPHA.

A partir de estas observaciones y dado que se pretende poner a punto un método cromatográfico para la determinación conjunta de ambas especies, se selecciona como fase móvil más apropiada, la constituida por una disolución  $5.85 \times 10^{-4} M$  de N-BPHA en cloroformo, por ser para esta composición, para la que se obtienen unas alturas de pico y una resolución entre los mismos satisfactorias.



## VANADIO Y MOLIBDENO

### V.2.3. OPTIMIZACIÓN DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL.

Para determinar la variación de H con el flujo de la fase móvil, así como la influencia de este parámetro sobre la resolución de los picos, se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que se varió el flujo entre 0.4 y 1.2 ml.min<sup>-1</sup>, inyectando 20 µl de un extracto orgánico obtenido a partir de la extracción de 80 ppb de V(V) y Mo(VI) en fase acuosa (r = 1:20), en la columna termostataada a 20°C, midiendo a 360 nm y haciendo pasar la fase móvil de composición establecida en el apartado anterior.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla V.4 y se representan en las figuras V.5 y V.6.

**Tabla V.4. Influencia del flujo de la fase móvil sobre las alturas de plato teórico y la resolución de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA.**

#### Complejo V(V)-N-BPHA

Flujo (ml.min <sup>-1</sup> )	t <sub>R</sub> (min.)	W <sub>1/2</sub>	N	H (cm)	R <sub>S</sub>
0.4	15.699	0.513	5184	4.82x10 <sup>-3</sup>	1.004
0.6	10.497	0.299	6823	3.66x10 <sup>-3</sup>	1.153
0.8	7.871	0.287	4164	6.0x10 <sup>-3</sup>	0.931
1.0	6.255	0.255	3331	7.5x10 <sup>-3</sup>	0.835
1.2	5.155	0.220	3039	8.2x10 <sup>-3</sup>	0.818

#### Complejo Mo(VI)-N-BPHA

Flujo (ml.min <sup>-1</sup> )	t <sub>R</sub> (min.)	W <sub>1/2</sub>	N	H (cm)	R <sub>S</sub>
0.4	16.655	0.607	4168	6.0x10 <sup>-3</sup>	1.004
0.6	11.150	0.367	5110	4.9x10 <sup>-3</sup>	1.153
0.8	8.350	0.318	3817	6.5x10 <sup>-3</sup>	0.931
1.0	6.632	0.276	3196	7.8x10 <sup>-3</sup>	0.835
1.2	5.463	0.223	3322	7.5x10 <sup>-3</sup>	0.818



CAPÍTULO V

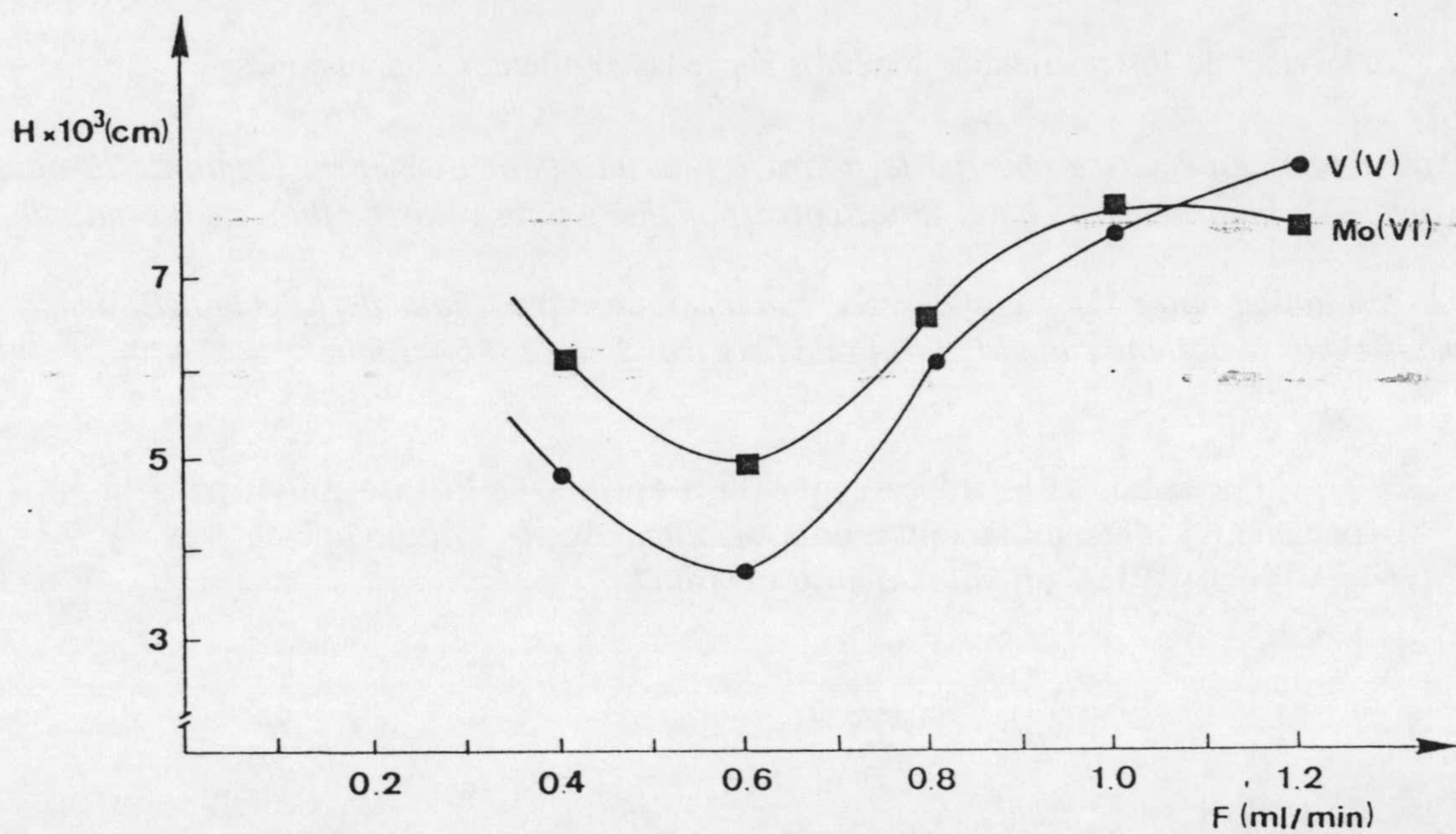


FIGURA V.5. Influencia del flujo de la fase móvil sobre las alturas de plato teórico de los picos de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA.

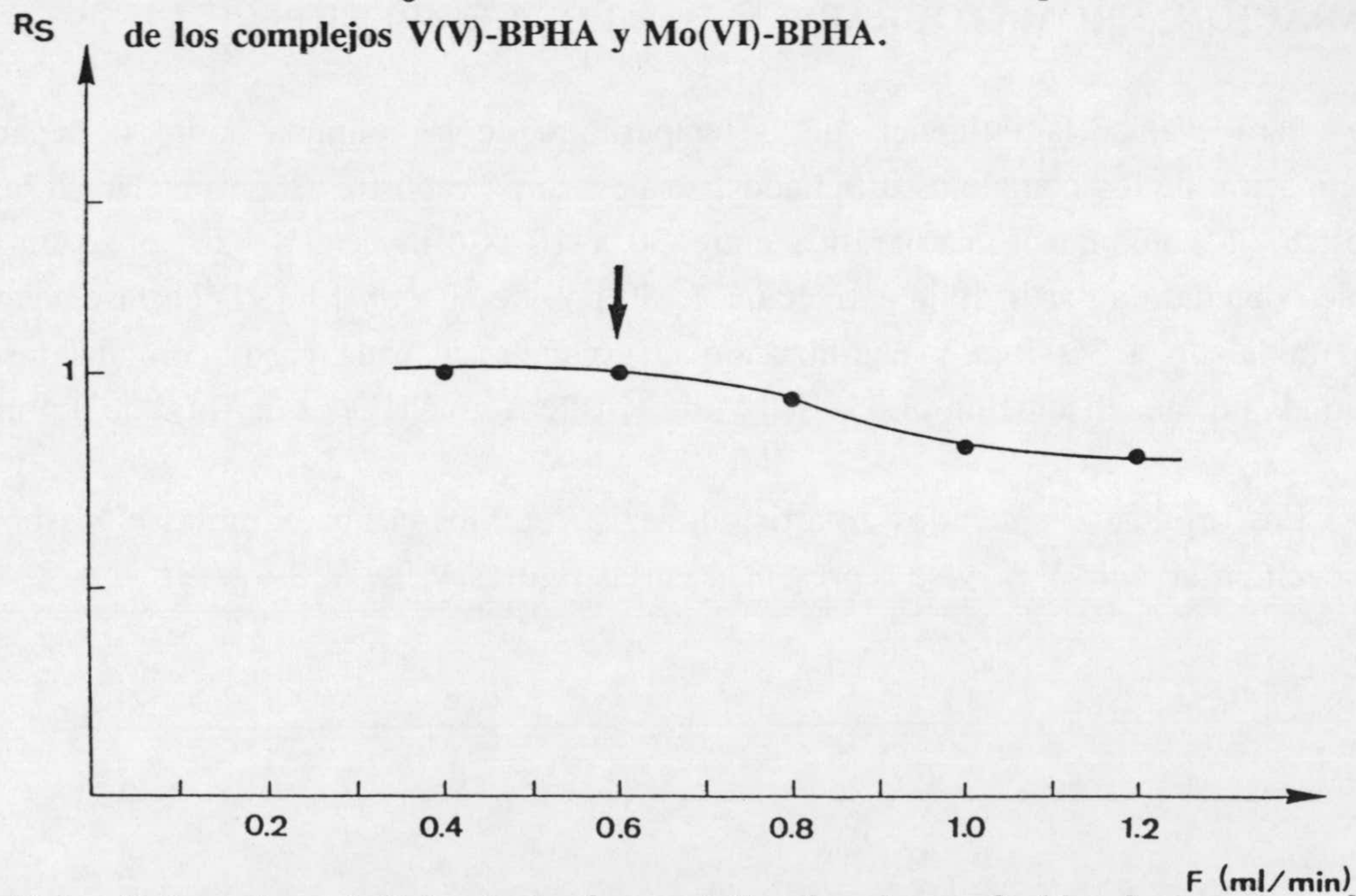


FIGURA V.6. Influencia del flujo de la fase móvil sobre la resolución de los picos de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA.



## VANADIO Y MOLIBDENO

---

A la vista de los resultados podemos sacar las siguientes conclusiones:

- 1.- *Para ambas especies se observa la aparición de un mínimo en la variación de la altura equivalente de plato teórico con el flujo, correspondiente a un valor de flujo de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>.*
- 2.- *La resolución entre los picos decrece cuando aumenta el flujo de fase móvil, siendo la óptima, la que se obtiene cuando el flujo de fase móvil es de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>.*

Por tanto, se establece como **flujo óptimo de la fase móvil para la separación y determinación cromatográfica de los complejos de V(V) y Mo(VI) con BPHA un valor de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>.**

### V.2.4. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE LA COLUMNA SOBRE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LOS COMPLEJOS.

Para evaluar la influencia de la temperatura de la columna sobre la separación y determinación de los complejos estudiados, se llevaron a cabo tres experiencias en las que se termostató la columna cromatográfica entre 30 y 10 °C, inyectando 20 µl de un extracto orgánico obtenido a partir de la extracción de 80 ppb de V(V) y Mo(VI) en fase acuosa ( $r = 0.05$ ), midiendo a 360 nm y equilibrando la columna en cada caso, con una fase móvil constituida por una disolución  $5.85 \times 10^{-4}$  M de N-BPHA en CHCl<sub>3</sub> a un flujo de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>.

Los resultados obtenidos a partir del registro de los cromatogramas correspondientes se recogen en la tabla V.5 y se representan en las figuras V.7 , V.8 y V.9.



## CAPÍTULO V

Tabla V.5. Influencia de la temperatura de la columna sobre algunos parámetros cromatográficos de la separación de los complejos de V(V) y Mo(VI) con BPHA.

### V(V)-BPHA

Temperatura <sup>(1)</sup>	$t_R$ (min.)	$R_S$ <sup>(2)</sup>	$h_{\text{pico}}$
30	10.652	1.130	7680
20	10.886	1.024	16854
10	10.905	1.273	23894

### Mo(VI)-BPHA

Temperatura <sup>(1)</sup>	$t_R$ (min.)	$R_S$ <sup>(2)</sup>	$h_{\text{pico}}$
30	11.327	1.130	6613
20	11.616	1.024	8860
10	11.669	1.273	11520

### Otros picos (BPHA)

Temperatura <sup>(1)</sup>	$t_{R1}$ (min.) <sup>(3)</sup>	$t_{R2}$ (min.) <sup>(4)</sup>
30	11.327	12.952
20	13.172	14.577
10	14.690	16.275

=====

- (1) En grados centígrados.
- (2) Resolución de los picos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA.
- (3) Tiempo de retención del primer pico atribuido a la BPHA.
- (4) Tiempo de retención del segundo pico atribuido a la BPHA.



VANADIO Y MOLIBDENO

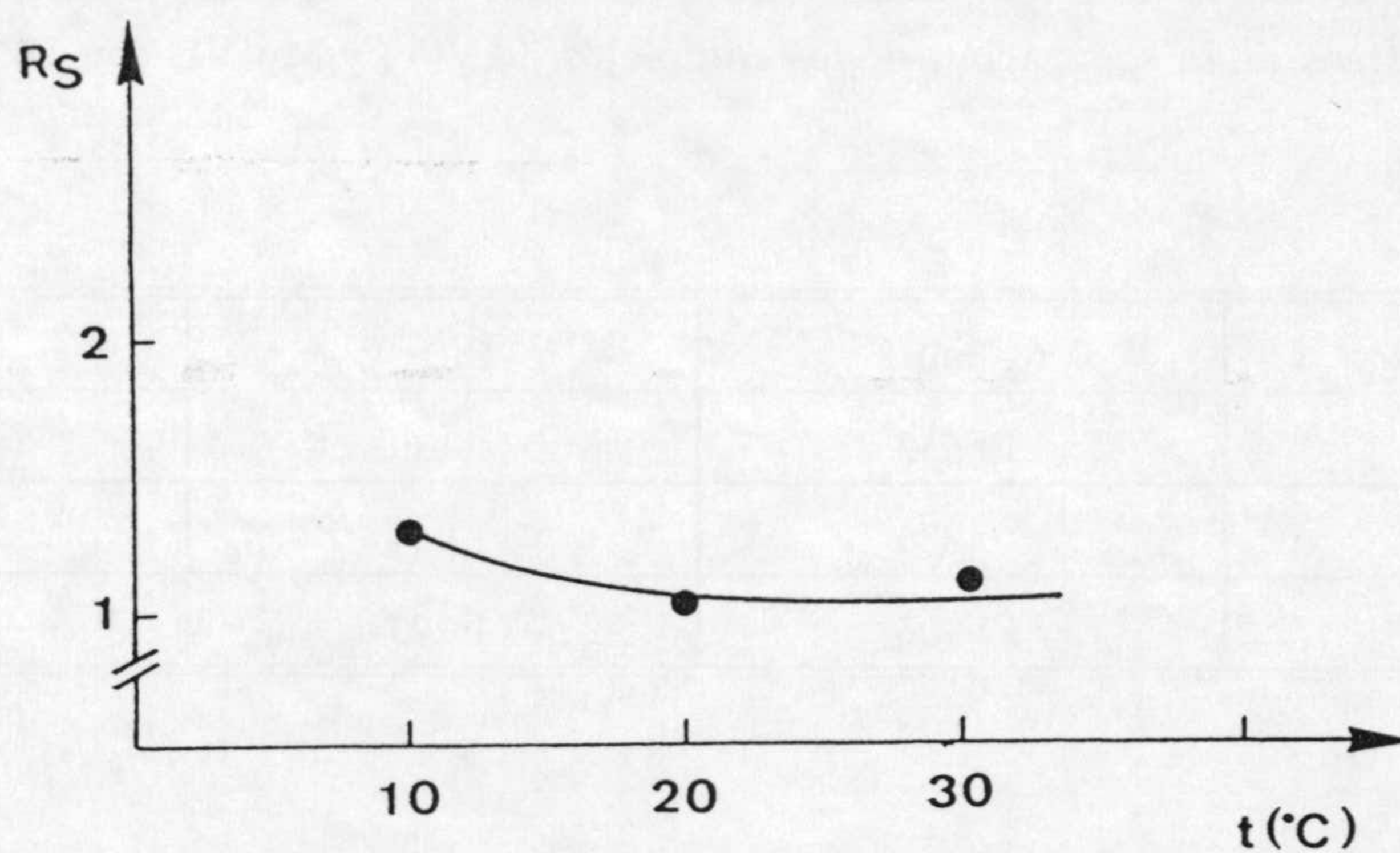


FIGURA V.7. Influencia de la temperatura de la columna sobre la resolución de los complejos.

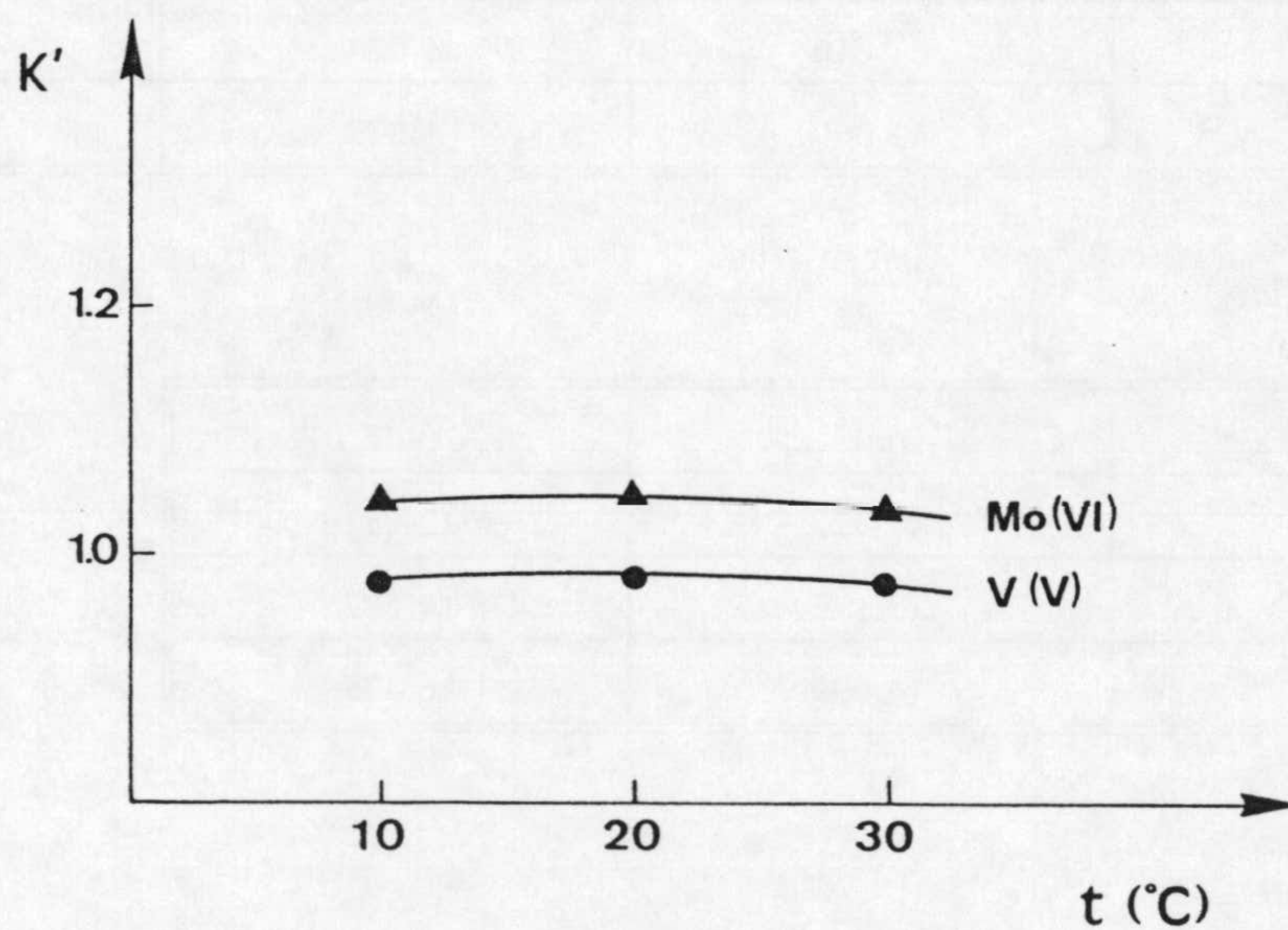


FIGURA V.8. Influencia de la temperatura de la columna sobre los factores de capacidad de los complejos.



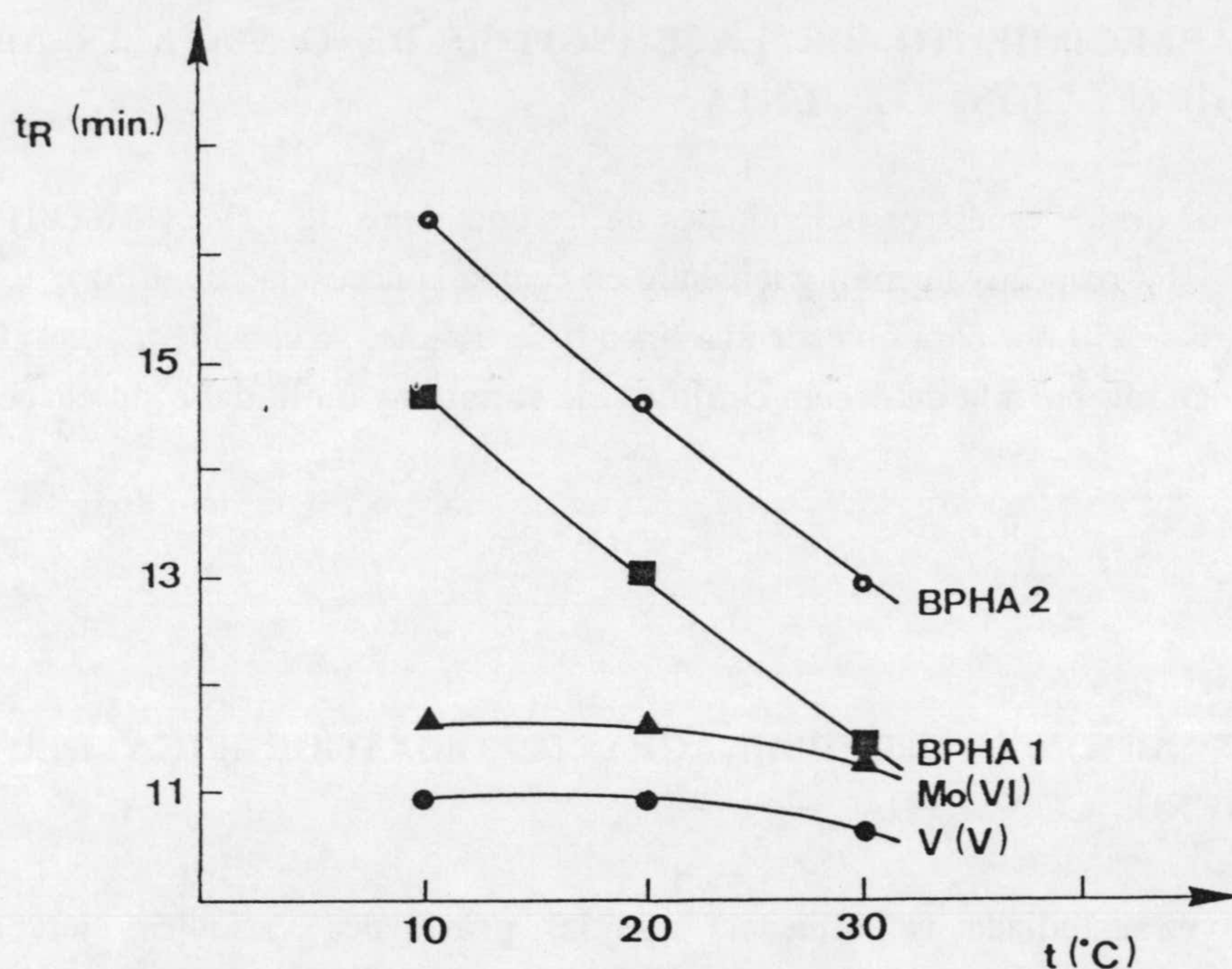


FIGURA V.9. Influencia de la temperatura de la columna sobre los tiempos de retención de los picos del cromatograma.

De los resultados obtenidos podemos sacar las siguientes conclusiones:

1.- La disminución de la temperatura a la que se equilibra la columna, origina por un lado, un ligero aumento de la resolución de los picos de los complejos, mientras que por otro, provoca un aumento en la altura respectiva de los mismos, siendo este aumento de altura, mucho mayor en el caso del pico correspondiente al complejo de V(V).

2.- La variación de la temperatura, afecta fundamentalmente a los picos atribuidos a la BPHA, de manera que, conforme dicho parámetro disminuye se produce un aumento de la retención de estos. Pasándose de una situación en la que el primer pico, aparece solapado con el del complejo de Mo(VI) (30 °C) afectando a su cuantificación, a otra (10 °C) en la que la resolución es mayor de 2.5.

Por tanto para posteriores experiencias se elige como temperatura de trabajo en la columna 10°C.



## VANADIO Y MOLIBDENO

---

### V.2.5. ESTABLECIMIENTO DE LA LONGITUD DE ONDA MÁS ADECUADA PARA LA DETECCIÓN CONJUNTA.

A partir de los espectros individuales de los complejos de V(V) y Mo(VI) con BPHA (Capítulos III y IV respectivamente) y teniendo en cuenta la necesidad de utilizar longitudes de onda superiores a 350 nm para obtener una línea base estable, se considera como **longitud de onda más adecuada para la detección conjunta de vanadio y molibdeno, la correspondiente a 360 nm.**

### V.2.6. SEPARACION Y DETERMINACION CROMATOGRAFICA DE VANADIO Y MOLIBDENO CON BPHA.

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre el comportamiento cromatográfico de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA extraídos previamente en  $\text{CHCl}_3$ , se concluye que en las siguientes condiciones:

- Fase móvil: Disolución  $5.85 \times 10^{-4}$  M de BPHA en  $\text{CHCl}_3$ . (estabilizado con amileno).
- Flujo de fase móvil:  $0.6 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .
- Longitud de onda de detección: 360 nm.
- Volumen de inyección:  $20 \mu\text{l}$ .
- Temperatura de la columna:  $10 \text{ }^\circ\text{C}$ .

es posible la separación y determinación de los complejos citados. En la figura V.10 se muestra un cromatograma típico.



## CAPÍTULO V

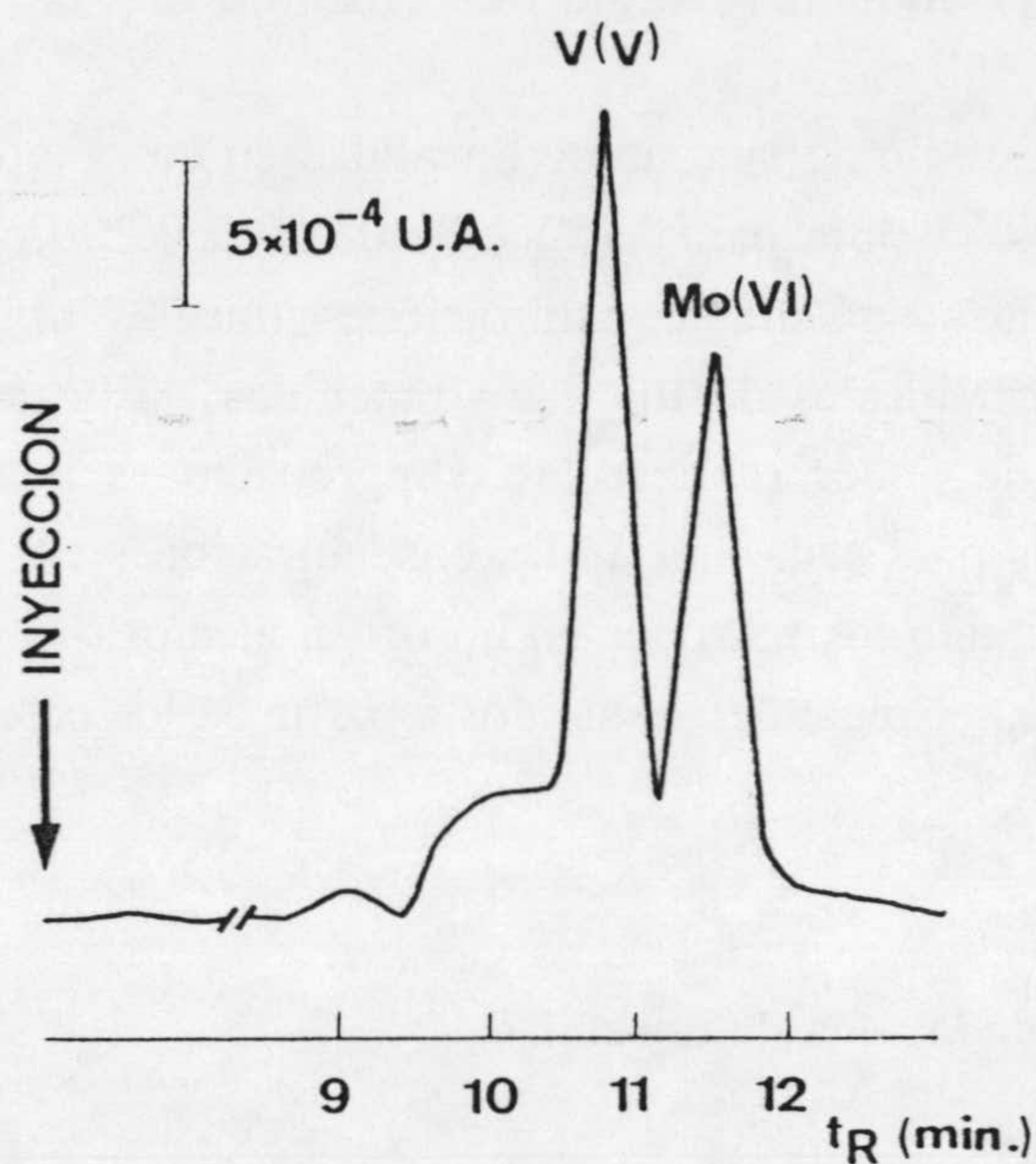


FIGURA V.10. Cromatograma típico correspondiente a la inyección de 0.050 ppm de V(V) y 0.100 ppm de Mo(V) en fase acuosa. CONDICIONES: *Extracción*:  $r = 0.05$ (org./Ac.);  $[HCl] = 4$  N;  $[BPHA] = 0.1$  %(p/v) en  $CHCl_3$ ; *Cromatográficas*: Fase móvil: Disolución  $5.85 \times 10^{-4}$  M de BPHA en  $CHCl_3$ ; Flujo:  $0.6$  ml.min<sup>-1</sup>;  $\lambda_{detec.} = 360$  nm.

Queda por tanto establecer la validación y parámetros de calidad del método propuesto, estableciendo los límites de aplicabilidad de éste, respecto a los rangos de concentraciones de analitos, límites de detección de los mismos y tolerancia a posibles iones interferentes.



**VANADIO Y MOLIBDENO**

**V.2.6.1. Validación del modelo establecido. Estudio de la zona de linealidad.**

Se planificó un estudio de la zona de linealidad en un rango de concentraciones de los analitos entre 0.000 y 0.075 ppm para V(V) y de 0.000 a 0.200 ppm para Mo(VI) extraídas según el método descrito y mediante calibraciones lineales univariantes individuales, se realizaron las regresiones lineales de los datos obtenidos, utilizando el método de mínimos cuadrados. Con objeto de poder realizar las comprobaciones pertinentes, se procedió a la inyección de dos réplicas para cada una de las concentraciones ensayadas (correspondientes a dos extracciones), inyectando los patrones en un orden aleatorio.

Los resultados experimentales obtenidos a partir de los cromatogramas registrados, se recogen en la Tabla V.6.

**TABLA V.6. Estudio de la zona de linealidad.**

V(V) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa inyectada (ng)	h pico	Mo(VI) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa inyectada (ng)	h pico
0.000	0.000	0000	0.000	0.000	0000
0.000	0.000	0000	0.000	0.000	0000
0.025	5.000	8977	0.050	20.000	8296
0.025	5.000	9225	0.050	20.000	7990
0.050	10.000	18481	0.100	40.000	16247
0.050	10.000	17774	0.100	40.000	15960
0.075	15.000	27667	0.150	60.000	24107
0.075	15.000	27241	0.150	60.000	23794
			0.200	80.000	32100
			0.200	80.000	31829



## CAPÍTULO V

---

### V.2.6.1.1. *Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.*

Para la comprobación del cumplimiento de las hipótesis establecidas se procedió a un análisis gráfico de los residuos mediante las representaciones correspondientes de los valores obtenidos para cada analito.

**De la observación de las representaciones gráficas de estos se dedujo que, en ambos casos se verificaba la hipótesis de "homoscedasticidad" necesaria para el cumplimiento del modelo.**

### V.2.6.1.2. *Comprobación de que los modelos lineales respectivos, se acoplan a los puntos experimentales y que los valores de pendientes y ordenadas en el origen son aceptables.*

La comprobación del acoplamiento del modelo lineal, supuesto para cada analito, a los resultados experimentales, (verificación de las correlaciones entre alturas de pico y concentraciones, así como de la falta de linealidad), se realizó mediante la aplicación de un test del Análisis de la Varianza (ANOVA), cuyos resultados se recogen en la tabla V.7.



VANADIO Y MOLIBDENO

TABLA V.7. Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales.

V(V)-N-BPHA					
Fuente	Suma de Cuadrados	Gdl <sup>(1)</sup>	Media cuadrada	F	Niv. Prob. <sup>(2)</sup>
Modelo	8.3519.10 <sup>8</sup>	1	8.3519.10 <sup>8</sup>	1.220.10 <sup>8</sup>	0.0000
Residual	410864.65	6	68477.44		
Fallo de ajuste	39450.150	2	19725.075	0.21	0.81718
Puro error	371414.50	4	92853.63		
Mo(VI)-N-BPHA					
Fuente	Suma de cuadrados	Gdl	Media cuadrada	F	Niv. Prob.
Modelo	1.2716.10 <sup>9</sup>	1	1.2716.10 <sup>9</sup>	4.64.10 <sup>4</sup>	0.0000
Residual	219131.65	8	27391.46		
Fallo de ajuste	45424.150	3	15141.383	0.44	0.73706
Puro error	173707.50	5	34741.50		

(1) Gdl = Grados de libertad de la determinación.

(2) Niv. Prob. = Nivel de Probabilidad estimada.

A la vista de dichos datos podemos observar que los valores del estadístico  $F_{Snedecor}$  estimados entre las varianzas de las regresiones lineales y las de los residuales, indican la existencia de correlación entre las señales instrumentales y las concentraciones de V(V) y Mo(VI). Además los valores obtenidos para dicho estadístico calculados entre los factores debidos al error puro y los debidos al fallo de ajuste, concluyen con la existencia de una buena linealidad en las zonas de concentración de V(V) y Mo(VI) estudiadas, la cual estimaría para cada analito la aleatoriedad de los resultados debida al error puro.

Finalmente, se procedió a evaluar si los valores de las ordenadas en el origen y las pendientes eran adecuados, mediante la realización de un test para cada uno de ellos (comprobación de que los términos independientes y las pendientes son o no significativamente diferentes de cero). A partir de los valores obtenidos para el estadístico  $t_{Student}$  se puede concluir que la hipótesis válida es la alternativa (términos independientes significativamente iguales a cero y pendientes significativamente distintas de cero).



## CAPÍTULO V

Todas las conclusiones obtenidas nos llevaron a establecer como ecuaciones de las rectas de calibrado las dadas por:

$$V(V)\text{-BPHA} \rightarrow h = (-38 \pm 379) + (365554 \pm 8100) C^*$$

$$Mo(VI)\text{-BPHA} \rightarrow h = (85 \pm 209) + (159473 \pm 1707) C^*$$

\* expresada en ppm (f. ac.)

El resto de estadísticos evaluados se recogen a continuación:

Estadísticos	V(V)-BPHA	Mo(VI)-BPHA
Desviación estándar de regresión de h sobre C	261.682	165.504
Coefficiente de correlación	0.999754	0.999914
Coefficiente de determinación	99.95%	99.98%
Desviación estándar relativa de la pendiente	0.9%	0.46%
LINEALIDAD	99.09%	99.54%

### V.2.6.2. Evaluación de la precisión del método propuesto.

Con objeto de evaluar la precisión del método propuesto, se procedió a un estudio de repetibilidades enfocado desde dos puntos de vista:

a) Evaluando la **precisión de la inyección**, es decir, analizando la variabilidad de respuestas de un único extracto orgánico en "n" inyecciones sucesivas.

b) Evaluando la **precisión en relación con el procedimiento operatorio** desde la preparación de una disolución patrón hasta la obtención de la señal instrumental, es decir, analizando la



VANADIO Y MOLIBDENO

variabilidad de respuestas obtenidas en "n" extracciones de una disolución patrón.

V.2.6.2.1. *Evaluación de la precisión de la inyección.*

Para determinar dicho parámetro, se ensayó con una disolución acuosa que contenía 0.021 y 0.047 ppm de V(V) y Mo(VI) respectivamente extraída de acuerdo con el método descrito. Los resultados obtenidos para ocho inyecciones sucesivas en las mismas condiciones cromatográficas se recogen en la tabla V.8.

Tabla V.8. Repetibilidad de la inyección.

$h_{\text{pico V(V)}}$	$[V(V)]_{f.a.}^*$ (ppm)	$h_{\text{pico Mo(VI)}}$	$[Mo(VI)]_{f.a.}^*$ (ppm)
8320	0.023	7467	0.046
7254	0.020	7254	0.045
7680	0.021	7254	0.045
7893	0.021	7467	0.046
8107	0.022	7680	0.045
7893	0.021	7893	0.048
7893	0.021	7893	0.050
8320	0.023	7254	0.050

\* Valores determinados a partir de la recta de calibrado.

El estudio estadístico realizado sobre estos resultados arroja los siguientes datos:



## CAPÍTULO V

---

### # Señal instrumental (Altura de pico):

#### V(V)-BPHA

- Valor medio de altura de pico . . . . .	7920
- Desviación estándar "s" . . . . .	350

#### Mo (VI)-BPHA

- Valor medio de altura de pico . . . . .	7521
- Desviación estándar "s" . . . . .	274

A partir de los valores de  $s$  y tomando un valor de  $t_{\text{Student}}$  de 2.365 para un número de grados de libertad de 7 y para un nivel de confianza del 95%, se obtienen como intervalos de confianza los dados por  $(7920 \pm 293)$  y  $(7521 \pm 229)$  para V(V) y Mo(VI) respectivamente.

El error instrumental expresado como desviación estándar relativa (% C.V) es de 4.42% para la determinación de V(V) y de 3.64% para la de Mo(VI).

### # Concentración determinada (ppm):

#### V(V)-BPHA

- Valor medio de la concentración . . . . .	0.00215
- Desviación estándar "s" . . . . .	0.001

#### Mo(VI)-BPHA

- Valor medio de la concentración . . . . .	0.0470
- Desviación estándar "s" . . . . .	0.002



## VANADIO Y MOLIBDENO

A partir de los valores de  $s$ , tomando un valor de  $t_{\text{Student}}$  de 2.365 para un número de grados de libertad de 7 y para un nivel de confianza del 95%, se obtienen como intervalos de confianza los dados por  $(0.0021 \pm 0.001)$  y  $(0.047 \pm 0.002)$  para V(V) y Mo(VI) respectivamente.

El error instrumental expresado como desviación estándar relativa (% C.V.) es de 4.97% para la determinación de V(V) y de 4.62 para la de Mo(VI).

### V.2.6.2.2. Evaluación de la precisión del método propuesto.

Para evaluar la precisión del método propuesto, se realizó una experiencia en idénticas condiciones operatorias partiendo de una serie de disoluciones que contenían 0.0027 y 0.047 ppm de V(V) y Mo(VI) extraídas con el método descrito anteriormente.

Los valores de altura de pico y de concentraciones de analito obtenidos a partir de una recta de calibrado se recogen en la tabla V.8.

Tabla V.8. Repetibilidad del método propuesto.

$h_{\text{pico V(V)}}$	$[\text{V(V)}]_{\text{f.a.}}^*$ (ppm)	$h_{\text{pico Mo(VI)}}$	$[\text{Mo(VI)}]_{\text{f.a.}}^*$ (ppm)
9600	0.026	7467	0.049
10454	0.028	7254	0.048
9387	0.025	7254	0.046
10454	0.028	7467	0.048
10240	0.029	7680	0.045
10240	0.029	7893	0.045
9173	0.025	7893	0.046

El estudio de dichos resultados da lugar a los siguientes datos:



## CAPÍTULO V

---

### # Señal instrumental (Altura de pico):

#### V(V)-BPHA

- Valor medio de altura de pico .....	9935
- Desviación estándar "s" .....	535

#### Mo(VI)-BPHA

- Valor medio de altura de pico .....	7528
- Desviación estándar "s" .....	237

A partir de los valores de  $s$  y tomando un valor de  $t_{\text{Student}}$  de 2.447 para un número de grados de libertad de 6 y para un nivel de confianza del 95%, se obtienen como intervalos de confianza los dados por  $(9935 \pm 495)$  y  $(7528 \pm 219)$  para V(V) y Mo(VI) respectivamente.

El error instrumental expresado como desviación estándar relativa (%C.V.) es de 5.38 para la determinación de V(V) y de 3.14 para la de Mo(VI).

### # Concentración determinada (ppm):

#### V(V)-BPHA

- Valor medio de la concentración .....	0.0027
- Desviación estándar "s" .....	0.002

#### Mo(VI)-BPHA

- Valor medio de la concentración .....	0.047
- Desviación estándar "s" .....	0.002



## VANADIO Y MOLIBDENO

---

A partir de los valores de  $s$  y tomando un valor de  $t_{\text{Student}}$  de 2.447 para un número de grados de libertad de 6 y para un nivel de confianza del 95%, se obtienen como intervalos de confianza los dados por  $(0.027 \pm 0.002)$  y  $(0.047 \pm 0.02)$  para V(V) y Mo(VI) respectivamente.

El error enstrumental expresado como desviación estándar relativa (%C.V) es de 6.53% para la determinación de V(V) y de 3.43% para la de Mo(VI).

### V.2.6.3. Sensibilidad.

La estimación de la sensibilidad analítica, se evalúa a partir de las desviaciones estandar de regresión y de las pendientes de las rectas de calibrado calculadas a partir del tratamiento estadístico. El resultado obtenido es:

V(V)-BPHA .....	0.7 ppb.
Mo(VI)-BPHA .....	1.0 ppb.

Estos valores dan información del mínimo intervalo de confianza discernible, entre dos concentraciones de los analitos en la zona de linealidad estudiada.

### V.2.6.4. Límites de detección y cuantificación.

#### V.2.6.4.1. Estimación de la mínima masa detectable.

La determinación de este parámetro se realizó a partir de la ecuación [8] del capítulo III en la cual se sustituyeron como datos:



CAPÍTULO V

	V(V)-N-BPHA	Mo(VI)-N-BPHA
M	50.94	90.94
k'	0.902	1.02
S/N	2	2
N <sub>0</sub>	5.33x10 <sup>-5</sup>	5.33x10 <sup>-5</sup>
L	25	25
L <sub>C</sub>	1	1
d <sub>C</sub>	0.4	0.4
N	6823	5110
ε	7106	9882

Los resultados obtenidos fueron de  $5.5 \times 10^{-4} \mu\text{g}$  de V(V) y  $8.7 \times 10^{-4} \mu\text{g}$  de Mo(VI), los cuales se corresponderán respectivamente con concentraciones de 0.027 y 0.043 ppm de V(V) y Mo(VI) en fase orgánica, y teniendo en cuenta la relación de fases utilizada en la extracción, con concentraciones de 1.4 y 2.2 ppb de V(V) y Mo(VI) en fase acuosa.

V.2.6.4.2. *Estimación de los límites inferiores del rango dinámico lineal.*

a) A partir de los datos de calibrado:

**V(V)-BPHA:**

- Límite de detección (aprox.) . . . . . ▶ 1.99 ppb.
- Límite de determinación (aprox.) . . . . . ▶ 6.63 ppb.

**Mo(VI)-BPHA:**

- Límite de detección (aprox.) . . . . . ▶ 2.94 ppb.
- Límite de determinación (aprox.) . . . . . ▶ 9.78 ppb.



## VANADIO Y MOLIBDENO

---

b) A partir de las consideraciones de Long y Winefordner (según la normativa de la IUPAC):

Se obtuvieron los siguientes datos:

### V(V)-BPHA:

- Límite de decisión . . . . . ▶ 1.27 ppb.
- Límite de detección . . . . . ▶ 2.54 ppb.
- Límite de determinación . . . . . ▶ 4.23 ppb.

### Mo(VI)-BPHA:

- Límite de decisión . . . . . ▶ 1.70 ppb.
- Límite de detección . . . . . ▶ 3.41 ppb.
- Límite de determinación . . . . . ▶ 5.68 ppb.

V.2.6.4.3. A partir de las probabilidades de falso positivo y falso negativo:

Del análisis de las curvas características de detección de ambos analitos para un número de determinaciones sobre el blanco igual a 3 y para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% ( $\alpha=0.05$   $\beta=0.05$ ), se obtuvieron los siguientes resultados:

### V(V)-BPHA:

- Límite de detección: . . . . . ▶ 1.97 ppb.
- Altura de pico asociada: . . . . . ▶ 335.

### Mo (VI)-BPHA:

- Límite de detección . . . . . ▶ 2.65 ppb.
- Altura de pico asociada . . . . . ▶ 302.

## V.2.7. MÉTODO PROPUESTO.

Transferir a un matraz de 250 ml una cantidad medida de muestra que no contenga más de 7.5  $\mu\text{g}$  de vanadio y 20  $\mu\text{g}$  de molibdeno. Añadir 20 ml de agua bidestilada y 36.4 ml de ácido clorhídrico concentrado, completando finalmente con agua bidestilada hasta 100 ml. Agitar durante 3 minutos con una disolución al 0.1% (p/v) de BPHA en cloroformo. Separar la fase orgánica, agitándola con sulfato sódico anhidro, centrifugarla y filtrarla a través de un



## CAPÍTULO V

---

filtro Anotop de 0.2  $\mu\text{m}$ . Para el análisis cromatográfico se equilibra a 10 °C una columna S5-nitrilo (250x4.6 mm) con una fase móvil constituida por una disolución 5.85x10<sup>-4</sup>M de BPHA en cloroformo (estabilizado con amileno), empleando un flujo de 0.6 ml.min<sup>-1</sup>. Se inyectan 20  $\mu\text{l}$  del extracto orgánico y se registra el cromatograma utilizando una  $\lambda$  de detección de 360 nm.

### V.2.8. SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Dado que el método propuesto para la determinación conjunta de V(V) y Mo(VI) se basa en las condiciones operatorias previamente establecidas para la extracción y determinación individual de ambos iones, se consideró que las interferencias de iones extraños se mantendrían al mismo nivel, para realizar tal comprobación se procedió al estudio de la influencia que ejercían 43 iones extraños en la determinación conjunta siguiendo el procedimiento recomendado y operando sobre disoluciones que contenían 4  $\mu\text{g}$  de V y 8  $\mu\text{g}$  de Mo en fase acuosa.

La concentración máxima ensayada para todos los iones fue de 80 ppm.

De la medida de la altura de los picos de los cromatogramas registrados a partir de la inyección de 20  $\mu\text{l}$  de cada fase orgánica y con la ayuda de las rectas de calibrado respectivas se determinó en cada caso, el error relativo de aquella. Análogamente se utilizó como criterio de "interferencia" la desviación en la altura de pico superior al 5%.

A partir de los resultados obtenidos se pueden sacar las siguientes conclusiones:

- 1.- *Los iones acetato, citrato, oxalato,  $\text{ClO}_4^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ , tartrato,  $\text{F}^-$ ,  $\text{Br}^-$ ,  $\text{B}_4\text{O}_7^{2-}$ , As(V), Al(III), K(I), Li(I), Rb(I), Cs(I), Na(I), Cr(III), Mn(II), Ba(II), Cu(II), Ni(II), Sn(IV), Co(II), Cd(II), Pb(II) y U(VI) no interfieren en la determinación cuantitativa de ambos iones.*
- 2.- *Los iones Ca(II), Zn(II), Sr(II), Mg(II), Bi(III), Se(IV), Ti(IV), As(III), Be(II), Hg(II), Fe(III) y  $\Gamma$  no interfieren en la determinación de Mo, mientras que el Zr(IV) no interfiere en la determinación de V.*
- 3.- *Para la determinación de vanadio se admiten las siguientes tolerancias:  
- Ca(II), Zn(II), Sr(II), Mg(II), Bi(III), Se(IV) Ti(IV) y As(III) en relación 500/1;*



## VANADIO Y MOLIBDENO

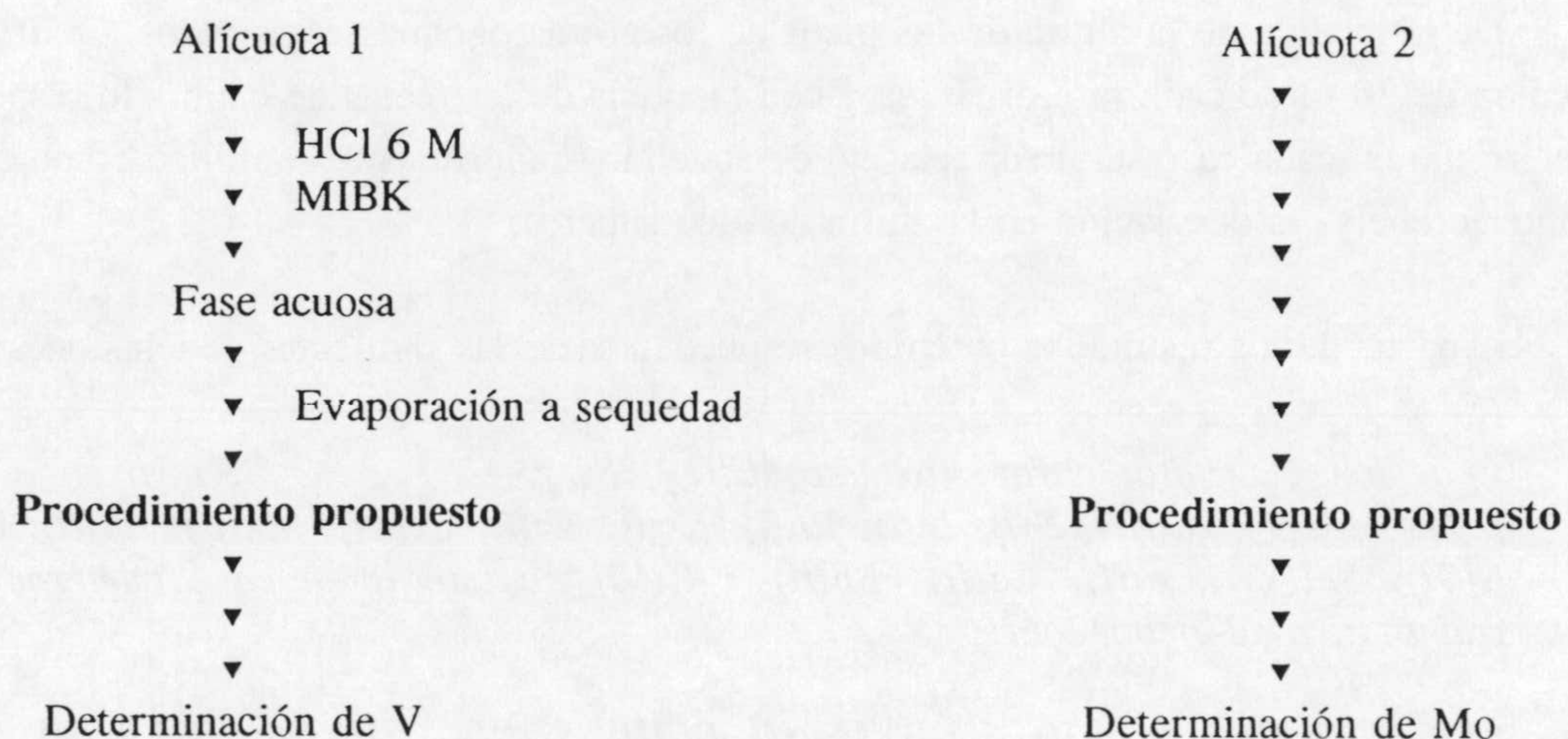
- Tl(I) en relación 250/1;
- Be(II), Tl(III) y  $MnO_4^-$  en relación 100/1;
- Hg(II) y Fe(III) en relación 25/1
- W(VI) en relación 2.5/1 y
- $I^-$  en relación 1/1.

En relación con estos iones hay que señalar:

a) Las interferencias provocadas por los iones  $I^-$  y Hg(II) en la determinación de V pueden ser eliminadas si se procede a la evaporación de la fase acuosa mediante un tratamiento con  $HNO_3$  antes de aplicar el procedimiento propuesto.

b) En este caso, la eliminación del Fe(III) por extracción con MIBK no puede realizarse debido a que en estas condiciones el Mo(VI) resulta ser parcialmente extraído; no obstante podría procederse a la determinación cuantitativa de molibdeno y vanadio de acuerdo con el esquema de trabajo propuesto a continuación:

### MUESTRA TRATADA



- 4.- Para la determinación de Mo se admiten las siguientes tolerancias:
- Tl(I) en relación 750/1;



## CAPÍTULO V

---

- *Tl(III) en relación 500/1;*
- *MnO<sub>4</sub><sup>-</sup>, Zr(IV) y W(VI) en relación 100/1.*

En este punto, se consideró oportuno establecer cual es la mínima cantidad de cada uno de estos iones que se puede determinar en presencia de una cantidad fija del otro, teniendo en cuenta las características propias de cada uno de los picos y la sensibilidad de la determinación.

En primer lugar, se procedió a establecer dos rectas de calibrado para la determinación de Mo(VI) en presencia de V(V), fijando la concentración de V(V) en 0.075 ppm y 50 ppb y variando la de Mo(VI) entre 0 y 0.150 ppm para cada caso. Realizados los oportunos cálculos estadísticos, se comprueba que:

**Hay un empobrecimiento de la linealidad y un aumento de la pendiente de la recta en relación con lo obtenido en el método propuesto, lo cual demostraría que la presencia del pico de V(V) afecta la calibración de Mo(V) cuando la relación de concentraciones V(V)/Mo(VI) es superior a 0.5 (dar datos o no).**

Se realizó una experiencia similar para la determinación de V(V) en presencia de Mo(VI), fijando la cantidad de Mo(VI) 0.100 ppb y variando la de V(V) entre 0 y 0.080 ppb. Realizando un tratamiento similar al caso anterior se llegó a la siguiente conclusión:

**En este caso, la linealidad y la pendiente de la recta obtenida son muy similares a las de la recta del método propuesto. Por tanto, podríamos decir que la presencia de Mo(VI) prácticamente no afecta la cuantificación del V(V).**



### V.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de ambos analitos en una muestra de agua preparada en el laboratorio, cuya composición es exactamente igual a la del patrón SRM-1643b.

#### V.3.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN V Y Mo DE UNA MUESTRA SINTÉTICA DE AGUA.

La muestra preparada en el laboratorio, de acuerdo con la composición del patrón SRM-1643b, tiene la siguiente composición:

**TABLA V.9. Composición de la muestra sintética analizada (expresada en ppb).**

<u>Ión</u>	<u>Contenido</u>	<u>Ión</u>	<u>Contenido</u>
As (VI)	49.0	Pb (II)	23.7
Ba (II)	44.0	Mn (II)	28.0
Be (II)	19.0	<b>Mo (VI)</b>	<b>85.0</b>
Bi (III)	11.0	Ni (II)	49.0
Br <sup>-</sup>	94.0	Se (IV)	9.7
Cd (II)	20.0	Ag (I)	9.8
Cr (III)	18.6	Sr (II)	227.0
Co (II)	26.0	Te (III)	8.0
Cu (II)	21.9	<b>V (V)</b>	<b>45.2</b>
Fe (III)	99.0	Zn (II)	66.0

#### V.3.1.1. Tratamiento de la muestra.

Dado que se trata de una muestra líquida que no lleva materia orgánica, no era necesario ningún tratamiento previo. Por otro lado, dado que el vanadio funciona con varias valencias fácilmente modificables, se consideró oportuno agregar a la muestra antes del procedimiento operatorio, unas gotas (2 ó 3) de  $\text{KMnO}_4$  0.01 N con objeto de asegurarnos que el V estaba como V (V).



## CAPÍTULO V

---

### V.3.1.2. Resultados.

En este caso particular, se necesitaron dos series de experiencias ya que a la muestra analizada no se le pudo aplicar el protocolo de validación propuesto por Cuadros y col. [1] por detectarse en el análisis una combinación de componentes de error sistemático traslacionales y rotacionales (La adición de patrón a un volumen de muestra, presentó un valor de pendiente diferente al presentado por la calibración con patrones de calibrado).

- a) **Evaluación de la presencia de un error sistemático constante en la adición de patrón: Estudio de la igualdad de pendientes de los calibrados por adición de patrón y con patrones de calibrado.**

En la tabla V.10 se recogen las alturas de pico de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen el estudio: a) con patrones de calibrado y b) adición de patrón a una porción de muestra.



VANADIO Y MOLIBDENO

TABLA V.10. Resultados experimentales obtenidos en el análisis de V y Mo en una muestra sintética de agua.

Determinación de Vanadio					
CALIBRADO	Vol. muestra	[V(V)]* <sub>f.a.</sub>	[V(V)]* <sub>f.a.</sub> añadida	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	----	0.000	----	0000	0000
	----	0.025	----	8977	9225
	----	0.050	----	18481	17774
	----	0.075	----	27667	27241
ADICIÓN DE PATRÓN	30 ml	----	0.000	7253	6400
	30 ml	----	0.015	13867	15787
	30 ml	----	0.030	21694	22463
	30 ml	----	0.045	30146	30507
Determinación de Molibdeno					
CALIBRADO	Vol. muestra	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub>	[Mo(VI)]* <sub>f.a.</sub> añadida	h <sub>pico</sub>	
PATRONES	----	0.000	----	0000	0000
	----	0.050	----	8296	7990
	----	0.100	----	16247	15960
	----	0.150	----	24107	23794
	----	0.200	----	32100	31829
ADICIÓN DE PATRÓN	30 ml	----	0.000	4267	4483
	30 ml	----	0.050	12643	12406
	30 ml	----	0.100	20894	21867
	30 ml	----	0.150	29071	29667



## CAPÍTULO V

Los valores de pendientes y desviaciones estándar de regresión obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior, se reúnen a continuación.

**TABLA V.11. Estimación de la existencia de un efecto matriz: Comparación de las pendientes de calibrado.**

Determinación de Vanadio		
	CALIBRADO	
	Patrones	A. Patrón
Pendiente	365554	518343
n	8	8
s	261.682	695.599
<i>Comparación de pendientes</i>	Si hay diferencia significativa	
Determinación de Molibdeno		
	CALIBRADO	
	Patrones	A. Patrón
Pendiente	159473	167685
n	10	8
s	165.504	400.9
<i>Comparación de pendientes</i>	Si hay diferencia significativa	

Se puede observar dada la diferencia de pendientes entre la recta de calibrado con patrones y la de adición de patrón, que existe un efecto matriz mucho más acusado para la determinación de vanadio que para la de molibdeno.

**b) Determinación del contenido en V y Mo en la muestra analizada.**

Con objeto de evaluar la exactitud del método propuesto y dada la comprobación



## VANADIO Y MOLIBDENO

---

preliminar de la existencia de un efecto matriz, se procedió a utilizar un nuevo protocolo de validación a partir de los datos obtenidos en tres nuevas experiencias de calibrado: a) con porciones de muestra (calibrado de Youden), b) adición de patrón a un volumen de muestra  $V_1$  o **adición de patrón a nivel 1** y c) adición de patrón a un volumen de muestra  $V_2$  o **adición de patrón a nivel 2**.

Este nuevo protocolo utilizado requiere el cumplimiento y verificación de las premisas enumeradas en el capítulo II (apartado II.4.4):

De acuerdo con estas, el protocolo utilizado debe conducir para su posible aplicación, a la obtención de la zona de cumplimiento del requisito de Tyson mediante ensayos de adición de patrón a diferentes niveles de muestra, hasta encontrar la zona de saturación del efecto interactivo.

El cálculo de los contenidos de analito se realiza a partir de la ecuación [31] del capítulo 3 que deriva de la propuesta por Ferrús y Torrades al sustituir la pendiente por la pendiente promedio y la desviación estandar de regresión por la desviación estándar promedio.

En la tabla V.11 se recogen las alturas de pico de los complejos V(V)-BPHA y Mo(VI)-BPHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación.



CAPÍTULO V

TABLA V.11. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de V y Mo en una muestra sintética de composición igual al patrón SRM 1643b.

Determinación de Vanadio				
CALIBRADO	Vol. muestra	[V(V)] f.a. añadida	h <sub>pico</sub>	
ADICIÓN DE PATRÓN NIVEL 1	30 ml	0.000	7253	6400
	30 ml	0.015	13867	15787
	30 ml	0.030	21694	22463
	30 ml	0.045	30146	30507
ADICIÓN DE PATRÓN NIVEL 2	60 ml	0.000	14507	12654
	60 ml	0.015	21187	22110
	60 ml	0.030	29441	28148
	60 ml	0.045	37106	37009
BLANCO DE YOUTDEN	15 ml	----	2987	
	30 ml	----	6400	
	45 ml	----	9600	
	60 ml	----	12800	
Determinación de Molibdeno				
CALIBRADO	Vol. muestra	[Mo(VI)] f.a. añadida	h <sub>pico</sub>	
ADICIÓN DE PATRÓN NIVEL 1	30 ml	0.000	4267	4483
	30 ml	0.050	12634	12406
	30 ml	0.100	20894	21867
	30 ml	0.150	29667	29071
ADICIÓN DE PATRÓN NIVEL 2	60 ml	0.000	8532	8534
	60 ml	0.050	17067	16823
	60 ml	0.100	24821	25667
	60 ml	0.150	33279	34034
BLANCO DE YOUTDEN	15 ml	----	2347	
	30 ml	----	4267	
	45 ml	----	6400	
	60 ml	----	8534	



**VANADIO Y MOLIBDENO**

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se reúnen a continuación:

**TABLA V.12. Resultados obtenidos en el análisis de V y Mo en una muestra de agua sintética.**

Análisis del contenido en vanadio			
	CALIBRADO		
	A. Patrón Nivel 1	A. Patrón Nivel 2	Youden
Pendiente	518343	517180	21759
n	8	8	4
s	695.6	754.8	===
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No existe diferencia significativa		
Comparación de medias	No existe diferencia significativa		
Contenido de analito	$44.5 \pm 7.1 \mu\text{g/l}$		
Análisis del contenido en molibdeno			
	CALIBRADO		
	A. Patrón Nivel 1	A. Patrón Nivel 2	Youden
Pendiente	167685	167339	13796
n	8	8	4
s	400.9	336.1	===
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No existe diferencia significativa		
Comparación de medias	No existe diferencia significativa		
Contenido del analito	$85.9 \pm 10.5 \mu\text{g/l}$		



## CAPÍTULO V

En la figura V.11. se reúnen los cromatogramas correspondientes a la determinación de vanadio y molibdeno para los dos niveles de muestra utilizados.

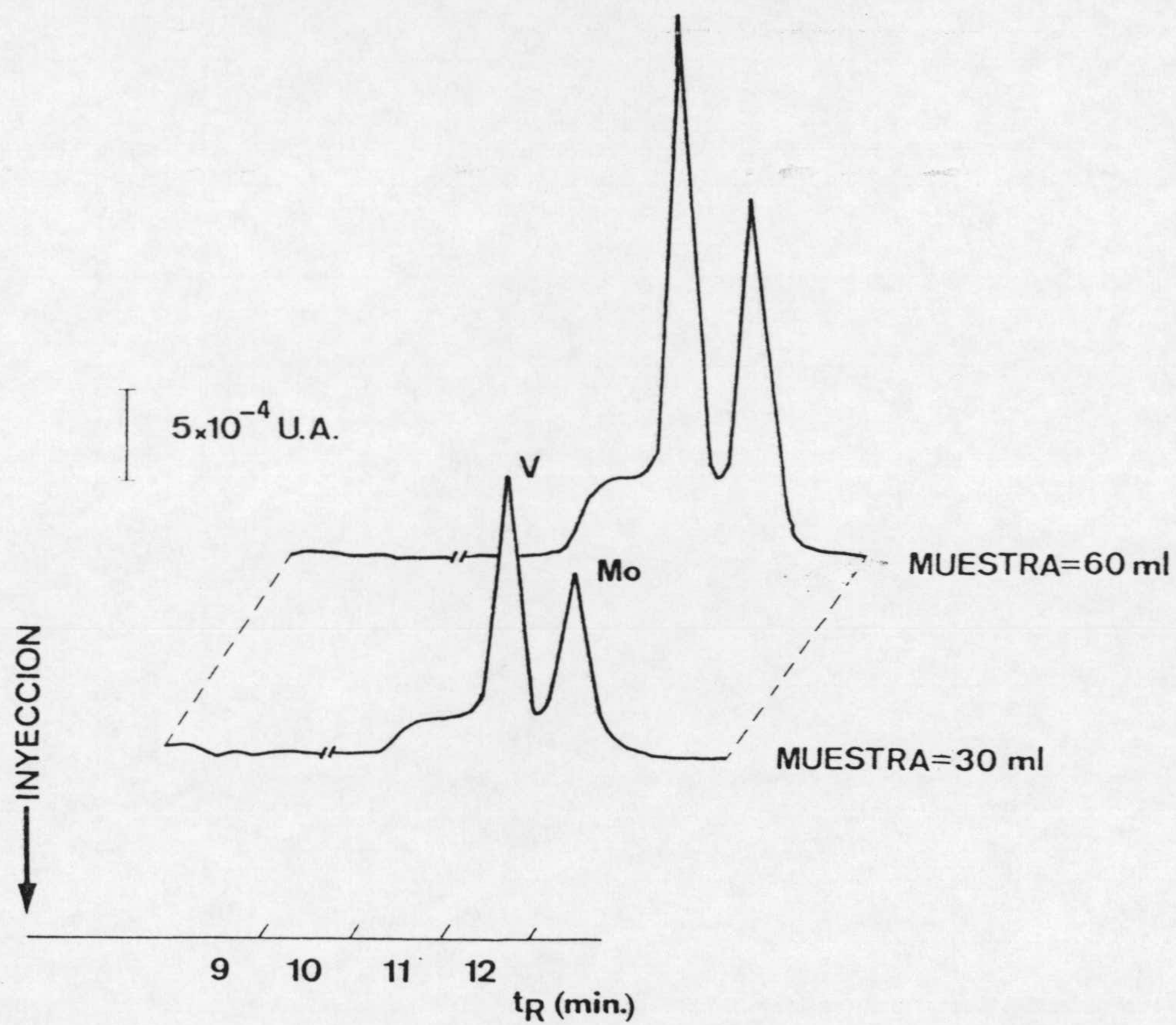
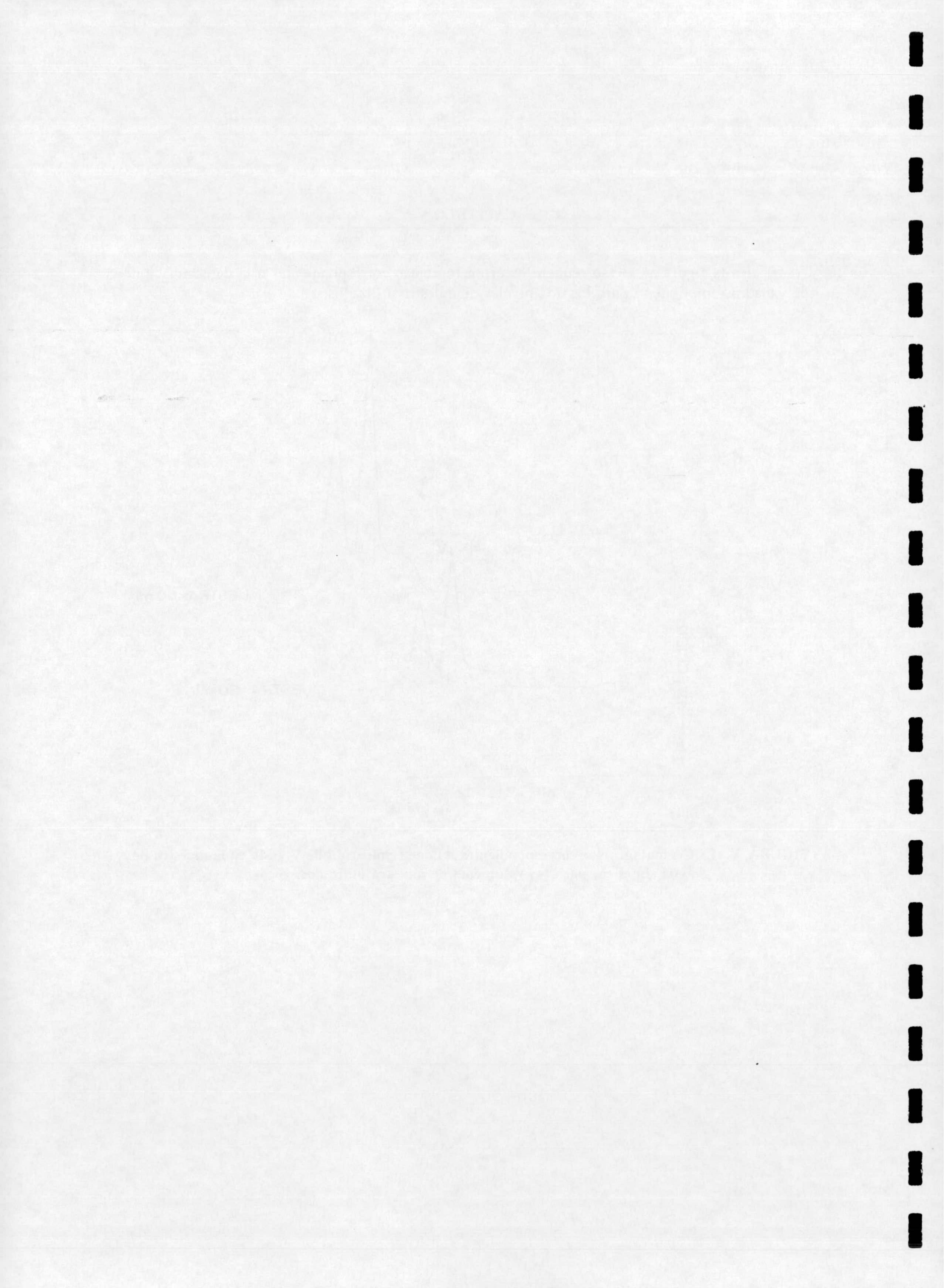


FIGURA V.11. Cromatogramas correspondientes a la determinación de V y Mo en la muestra de agua sintética, para los volúmenes de muestra utilizados.





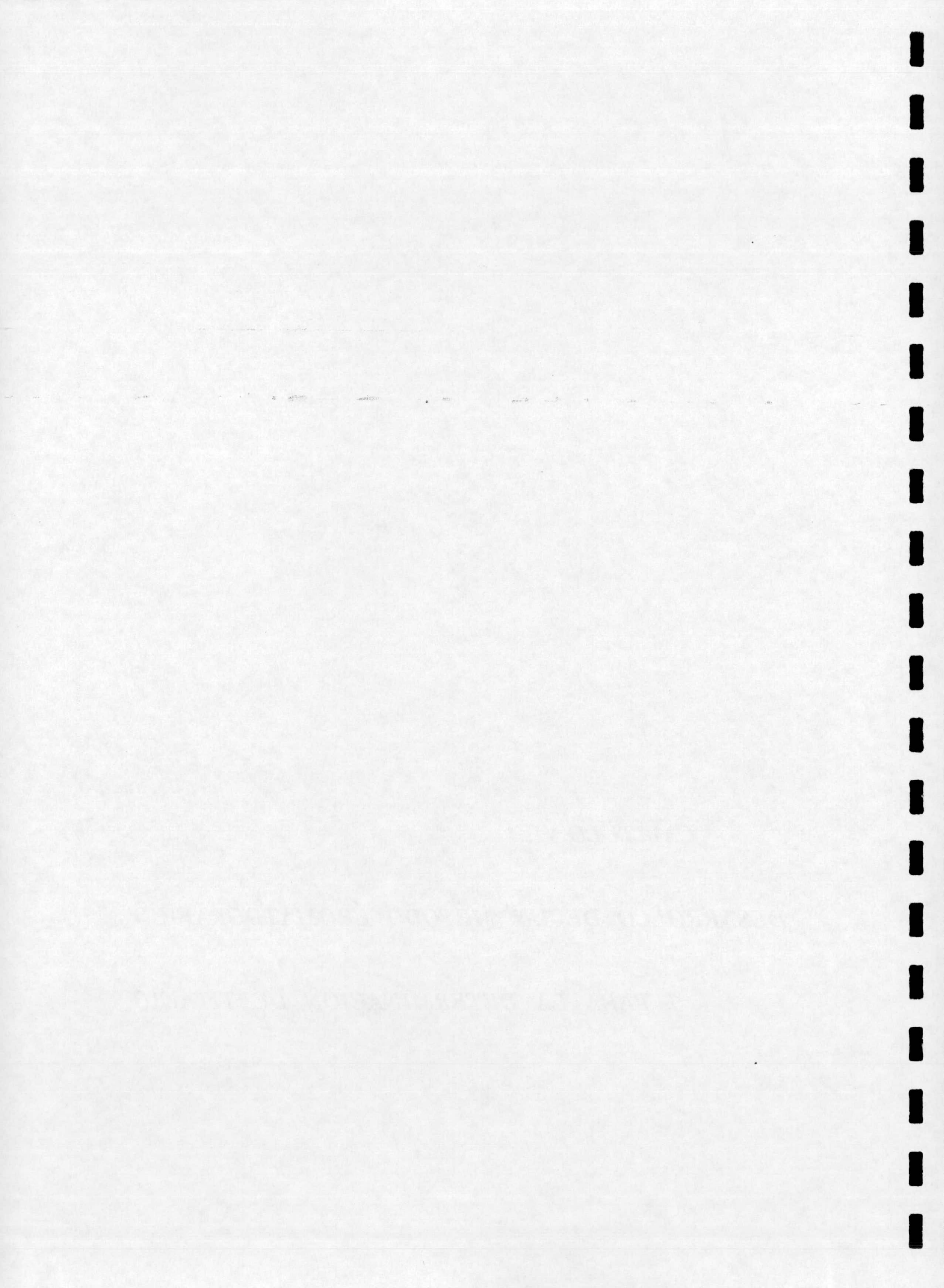


*CAPÍTULO VI:*

*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO*

*PARA LA DETERMINACIÓN DE TITANIO*







*DESARROLLO DE UN MÉTODO CROMATOGRÁFICO  
PARA LA DETERMINACIÓN DE TITANIO*

El ión Ti(IV) reacciona con el ácido 5,5'-Metilendisalicilhidroxámico (MEDSHA) en medio acuoso e hidroalcohólico formando diversos complejos de color amarillo con diferentes estequiometrías [1]. El compuesto que se obtiene en medio HCl 5 N, y en exceso de reactivo, ha servido de base para el establecimiento de un método espectrofotométrico selectivo de la determinación de dicho elemento. Tomando como base estos datos, nos propusimos como objetivo, el estudio de la viabilidad de proponer un método cromatográfico de determinación de titanio a través de su reacción con el MEDSHA. Para ello se llevaron a cabo las experiencias que se describen a continuación.



## VI.1. ESTUDIO ESPECTROFOTOMÉTRICO PREVIO

Como ya se ha dicho, el complejo Ti(IV)-MEDSHA se forma en medio fuertemente clorhídrico, y además no es extraíble en los disolventes empleados habitualmente en cromatografía en fase normal (hexano, cloroformo, diclorometano, etc.), [2]. Ello nos obligó a utilizar un enfoque distinto al que habíamos adoptado hasta el momento al emplear la BPHA como agente complejante, descartando la posibilidad de utilizar la modalidad cromatográfica de fase normal.

Por otra parte, tampoco fué posible utilizar la reacción del Ti(IV) con el MEDSHA, en medio fuertemente clorhídrico dada su incompatibilidad con el sistema cromatográfico.

Teniendo en cuenta que existen columnas poliméricas de fase reversa, las cuales admiten un amplio intervalo de pH de trabajo (entre pH = 1-13), estudiamos la posibilidad de complejar al Ti en un medio H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> de pH = 2.0.

### VI.1.1. ESPECTRO DEL COMPLEJO Ti(IV)-MEDSHA EN MEDIO HIDROALCOHÓLICO.

En la figura VI.1 se recoge el espectro, frente al blanco correspondiente, del complejo Ti(IV)-MEDSHA formado a partir de la mezcla de: 0.2 ml de disolución de Ti(IV) de 50 ppm, 2 ml de disolución de MEDSHA 1.2x10<sup>-3</sup> M en CH<sub>3</sub>OH, 6 ml de CH<sub>3</sub>OH, llevados a 10 ml con H<sub>2</sub>O.

*En dicho espectro se observa que hay un máximo de absorbancia a la longitud de onda de 340 nm.*



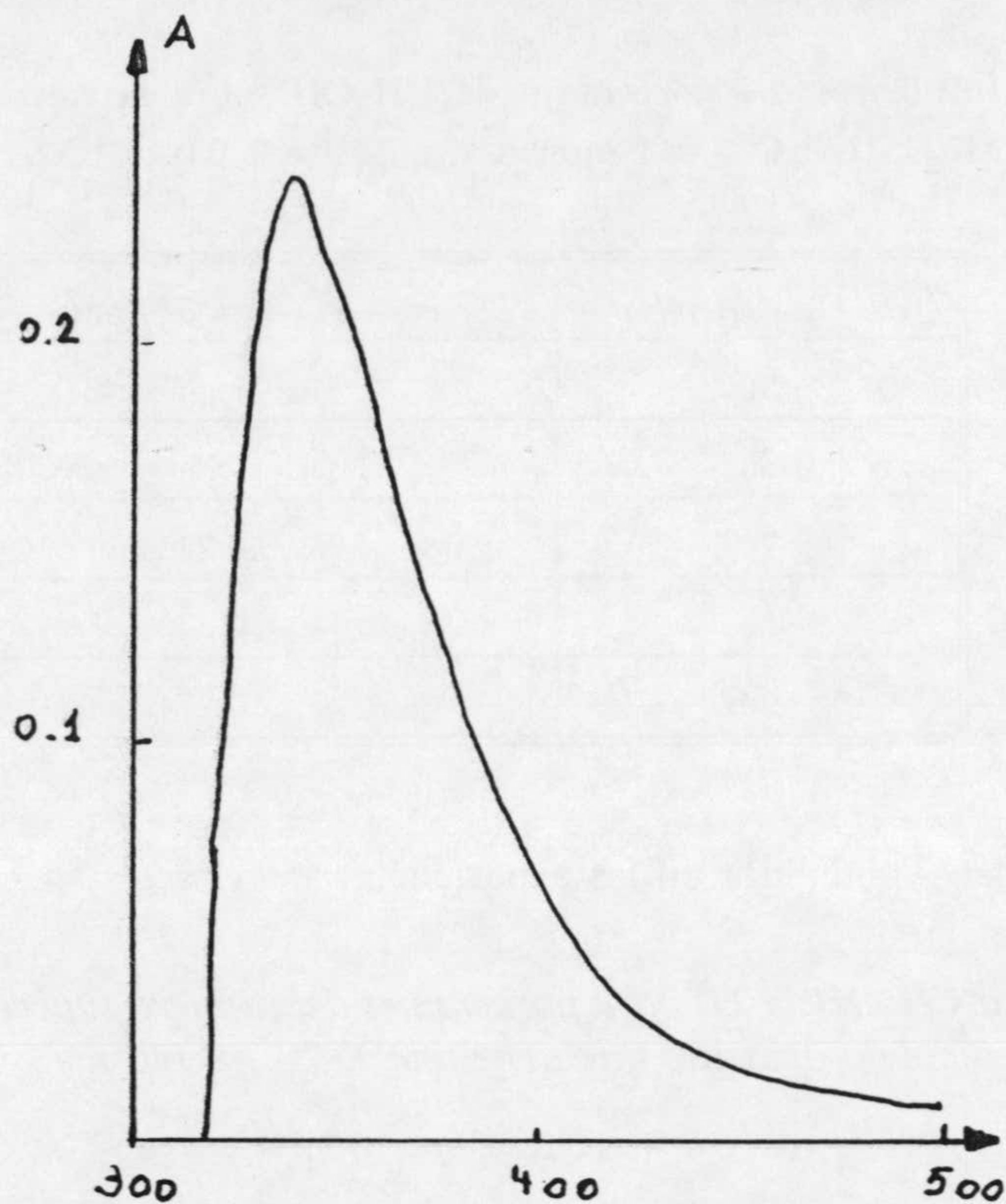


FIGURA VI.1. Espectro de absorción del complejo Ti(IV)-MEDSHA en medio  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , 80:20 (v/v).  $C_{\text{Ti}} = 1 \text{ ppm}$ .  $C_{\text{MEDSHA}} = 1.04 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

#### VI.1.2. INFLUENCIA DEL PORCENTAJE DE $\text{CH}_3\text{OH}$ SOBRE LA FORMACIÓN DEL COMPLEJO Ti(IV)-MEDSHA.

Comprobamos como se observa en la tabla, que la presencia de  $\text{CH}_3\text{OH}^*$  era esencial para evitar la precipitación del complejo, siendo preciso un porcentaje del mismo superior al 70%.

\* Se empleó este alcohol por ser más apropiado, en principio, para los fines cromatográficos.



## TITANIO

TABLA VI.1. Influencia del porcentaje de  $\text{CH}_3\text{OH}$  sobre la formación del complejo Ti(IV)-MEDSHA.  $C_{\text{Ti}} = 1 \text{ ppm}$ .  $C_{\text{MEDSHA}} = 1.04 \times 10^{-4} \text{ M}$ .

% $\text{CH}_3\text{OH}$ (v/v)	A ( $\lambda = 340 \text{ nm}$ )
50	Disolución turbia
60	Disolución turbia
70	0.240
80	0.270
90	0.274

De los datos obtenidos en las experiencias anteriores se puede decucir que:

*En medio  $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ , para porcentajes del primero superiores al 70%, y a un  $\text{pH} \approx 2$ , se forma un complejo amarillo que tiene una  $\lambda_{\text{máx}} = 340 \text{ nm}$ .*



## VI.2. ESTUDIO CROMATOGRÁFICO.

Se llevó a cabo un estudio con objeto de conseguir la separación cromatográfica de Ti en forma de hidroxamato, con MEDSHA y que sirviera como base para proponer un método cromatográfico de determinación del mismo. Dicho estudio se realizó utilizando una columna Polyspher RP-18 que permite trabajar con valores de pH comprendidos entre 1 y 13, acoplada a su correspondiente precolumna.

### VI.2.1. ASIGNACIÓN DE LOS PICOS.

Para tal fin nos pareció adecuado seleccionar un sistema cromatográfico de las siguientes características:

**Columna:** Columna Polysphere RP-18 (150-4,6 mm), empaquetada con material polimérico covalentemente derivatizado con grupos funcionales C<sub>18</sub>.

**Precolumna:** Precolumna empaquetada con la misma fase estacionaria (20-4.6 mm).

**Fase móvil:** Disolución 10<sup>-3</sup> M de MEDSHA en CH<sub>3</sub>OH.

**Flujo:** 0.5 ml.min<sup>-1</sup>.

**Detección:** Espectrofotométrica a 340 nm.

Se inyectaron 20 µl de una disolución que contenía 4 ppm de Ti(IV), 2.16 ml de una disolución 1.2x10<sup>-3</sup>M de MEDSHA en CH<sub>3</sub>OH y 0.215 ml de H<sub>2</sub>O, así como 20 µl de una disolución del blanco correspondiente.

Como se puede observar en la figura VI.2.:

- 1.- *En el cromatograma correspondiente a la muestra que lleva Ti aparecen dos picos a 3.51 y 3.56 min. muy solapados que no se encuentran en el cromatograma correspondiente al blanco, por lo que podemos suponer que se debe a la presencia del complejo Ti(IV)-MEDSHA.*



## TITANIO

---

- 2.- *En los dos cromatogramas aparecen picos adicionales que como ya se ha manifestado en capítulos anteriores pueden atribuirse al MEDSHA, ahora bien, en este caso, dado que la disolución inyectada siempre contiene menor concentración de ligando que la suministrada por la propia fase móvil, sólo tendrían justificación como "picos inducidos" debidos a:*
- *La diferencia de concentración de ligando entre la disolución inyectada y la fase móvil.*
  - *La diferencia de composición entre ambas (la inyectada es una mezcla hidroalcohólica y la fase móvil es CH<sub>3</sub>OH), de aquí que aparezcan precedidos de sendas penetraciones de la línea base.*
- 3.- *Las diferencias de [MEDSHA] y de composición entre disolución inyectada y fase móvil, podrían justificar también, en el cromatograma de la muestra que lleva Ti, la aparición del doble pico atribuido al complejo. Ya sea, por formarse dos complejos con estequiometrías diferentes, que eluirían a tiempos de retención muy próximos, o provocados por la diferencia de composición entre la muestra y la fase móvil.*





FIGURA VI.2. Asignación de los distintos picos que aparecen en el cromatograma.



## TITANIO

### VI.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DE LA FASE MÓVIL.

#### VI.2.2.1. Influencia del porcentaje de disolución $10^{-2}$ N de $H_2SO_4$ (pH = 2.0) en la fase móvil.

Para realizar el estudio, se inyectaron en cada caso disoluciones que contenían 4 ppm de Ti(IV) en presencia de una concentración de MEDSHA  $5.8 \times 10^{-4}$  M y ajustando cada punto a la proporción  $CH_3OH : H_2O$  que llevaba la fase móvil.

Se registraron una serie de cromatogramas variando el porcentaje de disolución de  $H_2SO_4$  en la fase móvil, manteniendo constante e igual a  $5.5 \times 10^{-5}$  M la concentración de MEDSHA en ésta.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.2 y se representan en la figura VI.3.

TABLA VI.2. Influencia del porcentaje de disolución  $10^{-2}$ N de  $H_2SO_4$  en la fase móvil sobre la altura de pico y tiempo de retención del complejo Ti(IV)-MEDSHA.

% $H_2SO_4$ ( $10^{-2}$ N)	$h_{\text{pico}}$	$t_R$ (min.)
10	34135	3.805
8	40534	3.753
6	45655	3.725
4	51202	3.669
2	46935	3.493

Otras condiciones cromatográficas: Flujo:  $0.4 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ;  $\lambda_{\text{det.}} = 340 \text{ nm}$ .



## CAPÍTULO VI

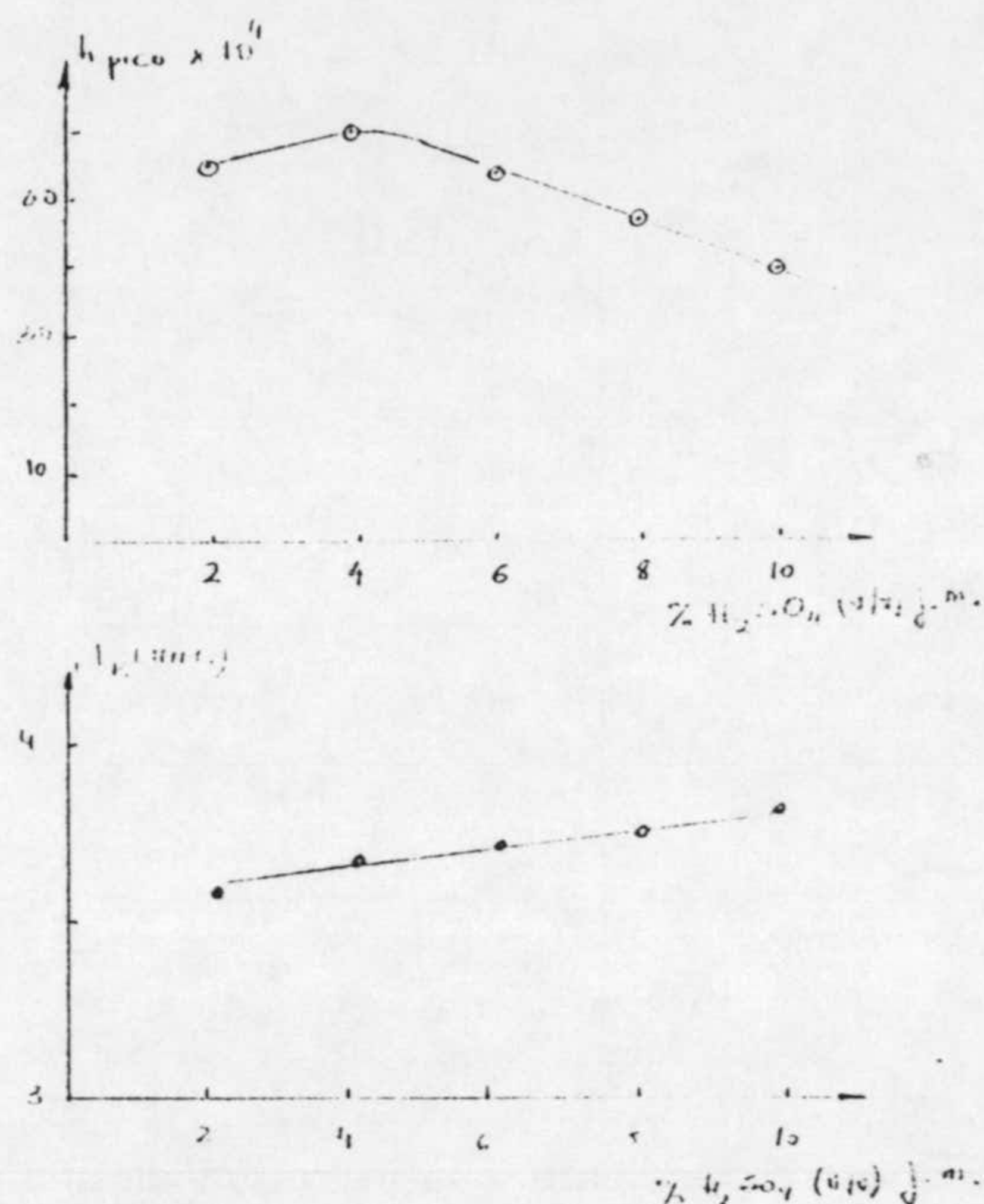


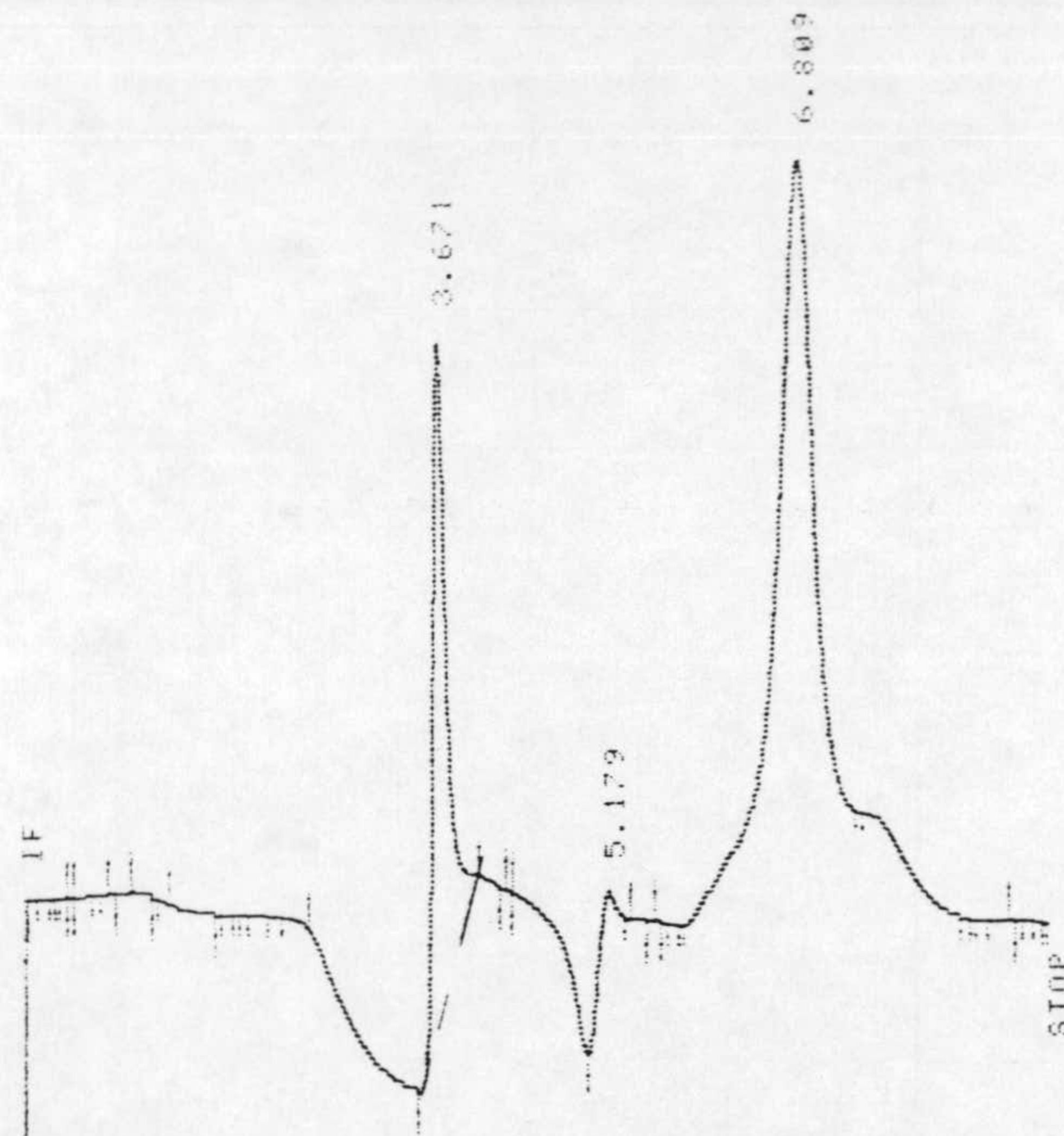
FIGURA VI.3. Influencia del porcentaje de  $H_2SO_4$   $10^{-2}$  N en la fase móvil sobre la altura de pico y el tiempo de retención del complejo Ti(IV)-MEDSHA.

A la vista de los datos se puede observar que:

- 1.- Para porcentajes de  $H_2SO_4$  en la fase móvil superiores al 6%, aumenta el tiempo de retención.
- 2.- La máxima altura de pico se obtiene para una fase móvil constituida por un 4% de disolución  $10^{-2}$  N de  $H_2SO_4$ .
- 3.- Bajo las condiciones estudiadas (composición de la disolución a inyectar y de la fase móvil similares, y  $[MEDSHA]_{f.m.} < [MEDSHA]_{iny.}$ ) aparece un único pico como se puede observar en el cromatograma de la figura VI.4 correspondiente a una fase móvil constituida por 4% de  $H_2SO_4$   $10^{-2}$  N : 96%  $CH_3OH$  y con una  $[MEDSHA]_{f.m.} = 5.5 \times 10^{-5}$  M.



## TITANIO



**FIGURA VI.4.** Cromatograma correspondiente a la inyección de una disolución de Ti(IV) de 4 ppm, utilizando como eluyente una fase móvil constituida por: 4% de  $H_2SO_4$   $10^{-2}$  N : 96%  $CH_3OH$  y con una  $[MEDSHA]_{f.m.} = 5.5 \times 10^{-5}$  M;  $\lambda_{det.} = 340$  nm.; Flujo =  $0.4$  ml.min $^{-1}$ .

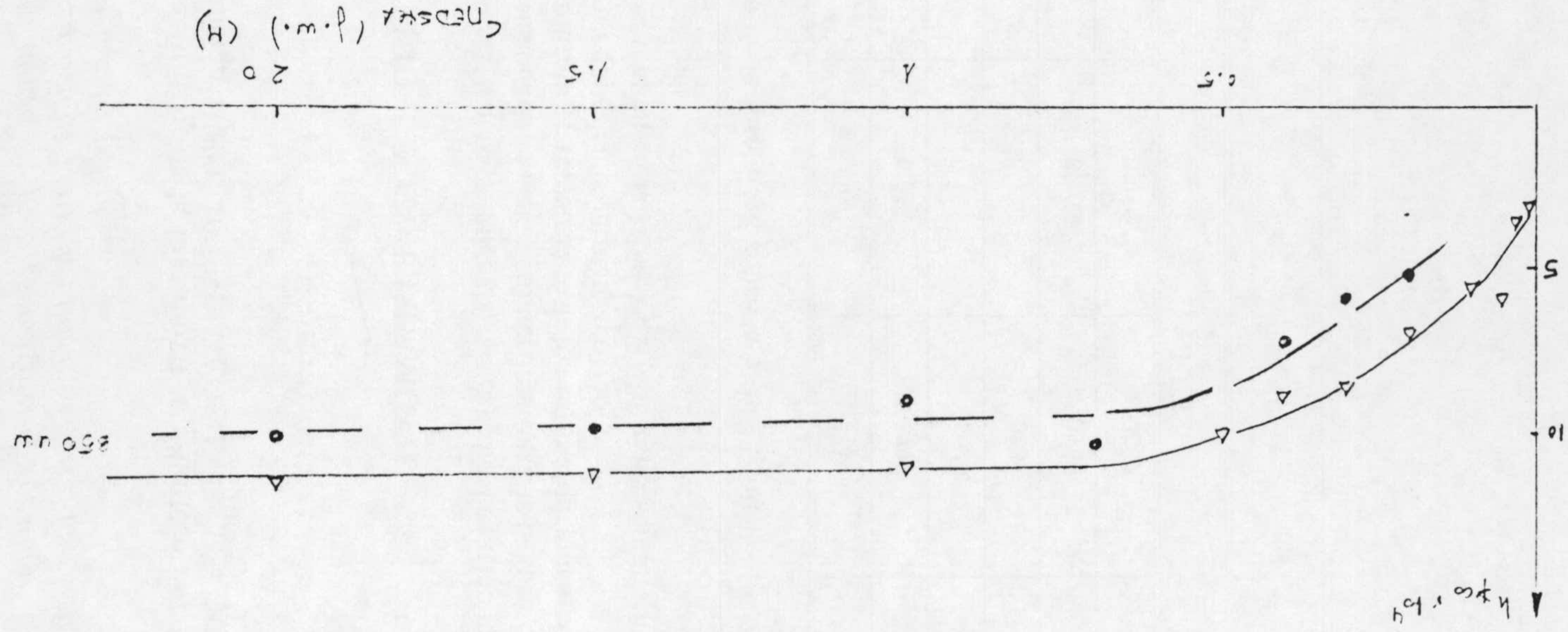
A partir de esta experiencia se consideró que la fase móvil debía llevar un 4% de disolución  $10^{-2}$  N de  $H_2SO_4$ .

### VI.2.2.2. Influencia de la concentración de MEDSHA en la fase móvil.

El estudio de este parámetro se realizó inyectando disoluciones formadas por 4 ppm de Ti(IV), con una concentración de MEDSHA de  $5.8 \times 10^{-4}$  M y manteniendo una proporción  $CH_3OH:H_2SO_4$   $10^{-2}$  N de 96:4 en la fase móvil. La concentración de MEDSHA, en dicha fase se varió entre  $5 \times 10^{-5}$  M y  $2 \times 10^{-3}$  M; se mantuvo un flujo de  $0.4$  ml.min $^{-1}$  y se registraron los cromatogramas a dos longitudes de onda de 340 y 350 nm. Los resultados obtenidos se representan en la figura VI.4.



CAPÍTULO VI





## TITANIO

Se puede observar que la altura de pico es máxima y constante a partir de una concentración de MEDSHA en fase móvil de  $1 \times 10^{-3}$  M. Por otra parte, no se observó variación apreciable en los tiempos de retención del complejo.

La composición definitiva de la fase móvil se establece por tanto en:  
96%  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 4% de disolución  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $10^{-2}$  N;  $[\text{MEDSHA}]_{\text{f.m.}} = 1.5 \times 10^{-3}$  M.

### VI.2.3. INFLUENCIA DEL FLUJO DE LA FASE MÓVIL.

En las condiciones operatorias antes establecidas se estudió la influencia ejercida por el flujo de la fase móvil sobre la eficacia de la separación cromatográfica. Para ello se modificó dicho parámetro entre 0.2 y 0.7  $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , registrándose los cromatogramas correspondientes y calculando en cada caso la altura equivalente de plato teórico.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla VI.3 y se representan en la figura VI.6.

TABLA VI.3 Influencia del flujo de la fase móvil sobre la altura equivalente de plato teórico.

Flujo ( $\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ )	$t_R$	$w^{1/2}$	N	H (cm)
0.2	7.595	0.258	4797	$3.1 \times 10^{-3}$
0.3	5.130	0.161	5620	$2.7 \times 10^{-3}$
0.4	3.840	0.146	3830	$3.9 \times 10^{-3}$
0.5	3.070	0.106	3969	$3.8 \times 10^{-3}$
0.7	2.187	0.086	3622	$4.1 \times 10^{-3}$



## CAPÍTULO VI

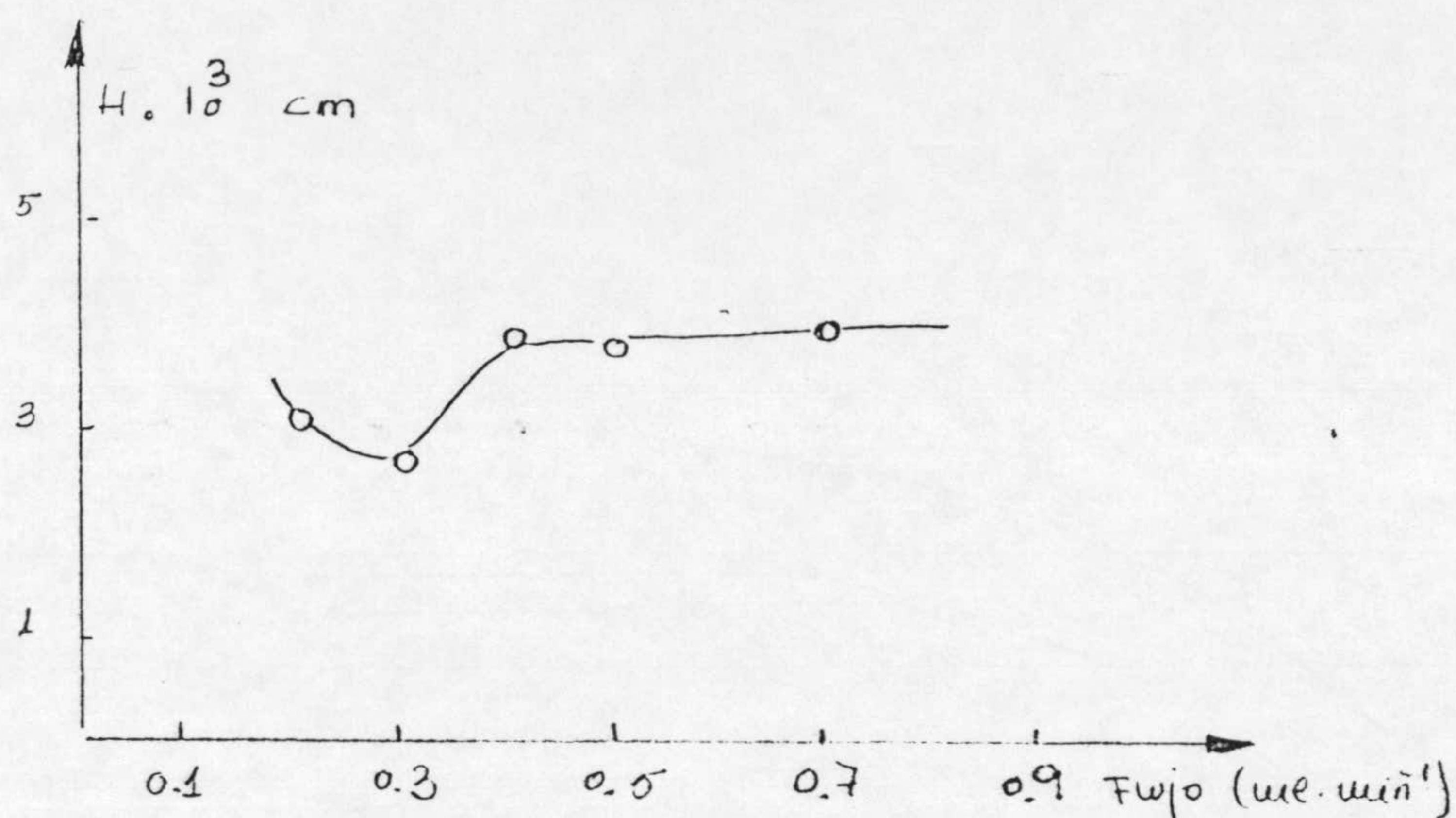


FIGURA VI.6. Influencia del flujo de la fase móvil sobre la altura equivalente de plato teórico.

Podemos observar que *la máxima eficacia se obtiene para un flujo de  $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , valor que coincide con el recomendado por el fabricante para este tipo de fases estacionarias cuando se emplean fases móviles tipo  $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O}$ .*

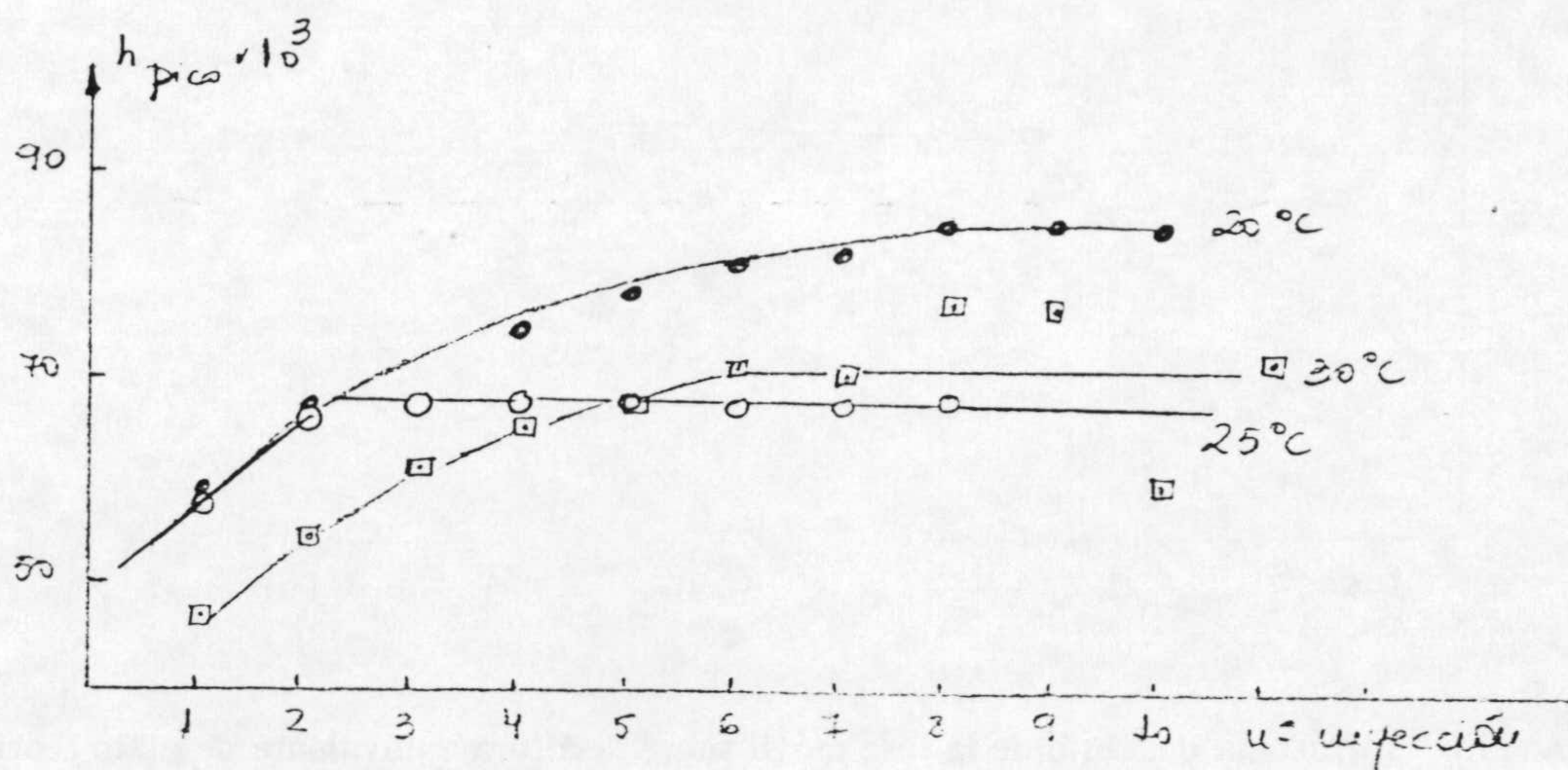
Para posteriores experiencias se consideró oportuno seleccionar como valor óptimo para la separación cromatográfica de Ti como hidroxamato un flujo de  $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ .

### VI.2.4. TIEMPO DE DESARROLLO DEL COMPLEJO. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA Y LA CONCENTRACIÓN DE MEDSHA.

Como en los casos anteriores, se pudo comprobar que la temperatura de la columna afectaba a los cromatogramas. Se realizó una experiencia (Figura VI.7), modificando la temperatura de la columna entre  $20$  y  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Se observó, que al hacer varias inyecciones sucesivas de la misma muestra, la altura de pico aumentaba.



## TITANIO



**FIGURA VI.7.** Variación de la altura de pico con el número de inyecciones para distintas temperaturas de termostatación de columna.

Se pensó que dado que el complejo estudiado espectrofotométricamente en medio HCl, necesitaba un tiempo de calentamiento previo para su desarrollo [2], en este caso podría ocurrir algo similar. Con objeto de comprobarlo se realizó una experiencia midiendo disoluciones de complejo preparadas en las mismas condiciones anteriores ( $T^a$  de la columna 25 y 30 °C) y sometidas a calefacción antes de su inyección. Los resultados obtenidos indican:

- a) El calentamiento previo no mejora la estabilización de la altura de pico del complejo.
- b) La temperatura más adecuada y en la que se produce una estabilización a partir de un cierto tiempo es de 25 °C.

Dado que no se había llegado a resultados satisfactorios se pensó en que la falta de estabilidad podría provenir de que para la concentración de Ti ensayada, la de reactivo era insuficiente, por lo que optamos por disminuir la concentración del primero.



## CAPÍTULO VI

Por otro lado, se procedió a registrar los cromatogramas a 360 nm, por obtener a esta longitud de onda una línea base mucho más estable.

Los resultados obtenidos se recogen en la tabla VI.4.

**TABLA VI.4. Influencia de la relación [MEDSHA]/[Ti] sobre la estabilización de la altura de pico del complejo. ( $T^a$  COLUMNA = 25 °C)**

[MEDSHA]/[Ti(IV)]	[Ti(IV)] (ppm)	Observaciones
72	4	No hay estabilización de la altura de pico
144	2	Se da cierta estabilización de la altura de pico
288	1	Si hay estabilización de la altura de pico
575	0.5	Si hay estabilización de la altura de pico
1575	0.2	Si hay estabilización de la altura de pico

A la vista de esta tabla se observa que *las medidas son estables por debajo de 1 ppm de analito.*

### VI.2.4.1. Influencia de la concentración de MEDSHA en la disolución de medida.

Operando con una concentración final de Ti(IV) de 0.4 ppm se estudió la influencia ejercida por la concentración de reactivo en la disolución de medida, manteniendo los demás parámetros constantes.

Los datos obtenidos se recogen en la tabla VI.5.





TITANIO

TABLA VI.5. Influencia de la [MEDSHA] en la disolución de medida sobre la altura del pico del complejo Ti(IV)-MEDSHA.

[MEDSHA] Disolución de medida (M)	$t_R$ (min.)	$h_{pico}$
$1.5 \times 10^{-3}$	4.105	28990
$3 \times 10^{-3}$	4.074	45860
$5 \times 10^{-3}$	4.166	55689
$6.5 \times 10^{-3}$	4.183	65544
$7 \times 10^{-3}$	4.148	64445
$9 \times 10^{-3}$	4.166	62148
$10 \times 10^{-3}$	4.189	63609
$12 \times 10^{-3}$	4.165	64609
$15 \times 10^{-3}$	4.180	66529
$20 \times 10^{-3}$	4.174	65453

A partir de los cuales se observa que *a partir de una concentración de reactivo en la disolución de medida de  $6.5 \times 10^{-3}$  M la altura es máxima y permanece constante. Por otra parte, el tiempo de retención del complejo Ti(IV)-MEDSHA no depende de la concentración de reactivo, lo que nos permite suponer que en estas condiciones se forma una única especie.*

A partir de ahora, se consideró oportuno utilizar una [MEDSHA] Disolución de medida de  $10^{-2}$  M.



## CAPÍTULO VI

---

### VI.2.5. MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE TITANIO CON MEDSHA.

Una vez estudiada la influencia que las principales variables ejercen sobre el comportamiento cromatográfico del complejo Ti(IV)-MEDSHA, formado en medio hidroalcohólico, se concluyó que inyectando una disolución formada por:

Un 4% (v/v) de disolución de Ti(IV) ( $[ < 2 \mu\text{g} / 5 \text{ ml}]$ ) en medio  $\text{H}_2\text{SO}_4 10^{-2}$  N, un 96% de  $\text{CH}_3\text{OH}$ , y  $10^{-2}$  M en MEDSHA,

en un sistema cromatográfico de las siguientes características

Fase estacionaria:	Polyspher RP-18
Fase móvil:	4% (v/v) $\text{H}_2\text{SO}_4 10^{-2}$ N : 96% $\text{CH}_3\text{OH} : 1.5 \times 10^{-3}$ M en MEDSHA.
Flujo:	$0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$
T <sup>a</sup> COLUMNA:	25 °C.
$\lambda$ detección:	360 nm.

era posible la separación de Ti(IV) en forma de hidroxamato. Con objeto de determinar si dicha separación podía servir de base para el establecimiento de un método analítico de determinación de este elemento, se llevaron a cabo las experiencias descritas a continuación.

#### VI.2.5.1. Validación del modelo establecido. Estudio de la zona de linealidad.

Se planificó un estudio del cumplimiento de la linealidad de la relación Señal :  $f([\text{Ti}])$ , en un rango de concentraciones de Ti(IV) en disolución comprendido entre 0.000 y 0.300 ppm, preparadas según el método descrito. Para ello, se utilizaron dos réplicas de cada concentración,



## TITANIO

inyectando las disoluciones en un orden aleatorio. Mediante una calibración lineal univariante se realizó la regresión lineal de los datos obtenidos, empleando el método de mínimos cuadrados.

Los resultados experimentales, obtenidos a partir de los cromatogramas registrados, se recogen en la Tabla VI.6.

TABLA VI.6. Estudio de la zona de linealidad.

Mo(VI) <sub>f.a.</sub> (ppm)	Masa inyectada (ng)	h <sub>pico</sub>
0.000	0.000	0000
0.000	0.000	0000
0.000	0.000	0000
0.100	2.000	15320
0.100	2.000	14462
0.100	2.000	15236
0.200	4.000	27738
0.200	4.000	28956
0.200	4.000	29613
0.300	6.000	42080
0.300	6.000	41606
0.300	6.000	45880

### VI.2.5.1.1. Comprobación del cumplimiento de las hipótesis matemáticas establecidas.

Dado que el modelo aplicado es el de la regresión lineal de mínimos cuadrados, su aplicación exige que se cumplan una serie de requisitos como son la homogeneidad de las varianzas de los residuos y aleatoriedad e independencia de estos.



## CAPÍTULO VI

Para tal fin se procedió al análisis gráfico de los residuos mediante la representación gráfica de estos frente a los valores experimentales de  $c_i$ . En dicha representación se observó que:

- 1) El número de residuos positivos era aproximadamente igual al de los negativos.
- 2) Los residuos se distribuían aleatoriamente.

De dichas observaciones se concluyó que se cumplía la hipótesis de "homoscedasticidad" necesaria para el cumplimiento del modelo.

VI.2.5.1.2. *Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales y que los valores de pendiente y ordenada en el origen son aceptables.*

Con objeto de comprobar si el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales se aplicó el test del Análisis de la Varianza (ANOVA) con dos finalidades:

- Para comprobar la correlación entre altura de pico cromatográfico y concentración de Ti(IV) en la disolución de medida, y
- Para evaluar el fallo de ajuste (falta de linealidad)

Los resultados obtenidos en dichos test se recogen en la tabla VI.7.

TABLA VI.7. Comprobación de que el modelo lineal se acopla a los puntos experimentales.

Fuente	Suma de cuadrados	Gdl <sup>(1)</sup>	Varianza	F	Niv. Prob. <sup>(2)</sup>
Modelo	$3.081 \times 10^7$	1	$3.081 \times 10^7$	$2.2 \times 10^3$	0.0000
Residual	14034099	10	1403410		
<i>Fallo de ajuste</i>	799150.10	2	399575.05	0.2	0.79095
<i>Puro error</i>	13234949	8	1654369		

(1) Gdl = Grados de libertad de la determinación.

(2) Niv. Prob. = Nivel de Probabilidad estimada.



## TITANIO

---

A la vista de dichos datos podemos observar que el valor del estadístico  $F_{Snedecor}$  estimado entre la varianza de la regresión lineal y la de los residuales, indica la existencia de correlación entre la señal instrumental y la concentración. Además, el valor obtenido para dicho estadístico, calculado entre el factor debido al puro error y el debido al fallo de ajuste, indica con la existencia de una buena linealidad en la zona de concentraciones de Mo(VI) estudiada. Por tanto, la aleatoriedad de los resultados es debida al error puro.

Finalmente se procedió a evaluar si los valores de la ordenada en el origen y la pendiente eran adecuados, mediante la realización de un test para cada uno de ellos (comprobación de que el termino independiente y la pendiente son o no significativamente diferentes de cero).

Los valores obtenidos para el estadístico  $t_{Student}$  nos permitieron aceptar las hipótesis alternativas (término independiente significativamente igual a cero y pendiente significativamente distinta de cero).

Las conclusiones obtenidas nos llevaron a proponer la siguiente ecuación para la recta de calibrado:

$$h = (241.6 \pm 752.6) + (143329 \pm 3958) C; \quad C = \text{ppm (f.ac.)}$$

Otros estadísticos evaluados fueron :

- Desviación estandar de regresión de h sobre C . . . . .	1184.66
- Coeficiente de correlación . . . . .	0.997731
- Coeficiente de determinación . . . . .	99.55%
- Desviación estandar relativa de la pendiente ( $s_b$ ) . . . . .	2.10%
- LINEALIDAD . . . . .	97.90%

### VI.2.5.2. Evaluación de la precisión.

Con objeto de evaluar la precisión del método propuesto, se procedió a un estudio de repetibilidades enfocado desde dos puntos de vista:

a) Evaluando la **precisión de la inyección**, es decir, analizando la variabilidad de respuesta de



## CAPÍTULO VI

---

una única disolución de medida en "n" inyecciones sucesivas.

b) Evaluando la **precisión del método propuesto**, desde la preparación de una disolución patrón hasta la obtención de la señal instrumental, es decir, analizando la variabilidad de las respuestas obtenidas en "n" preparaciones de la disolución patrón de medida.

### VI.2.5.2.1. *Evaluación de la precisión de la inyección.*

Para determinar dicho parámetro, se ensayó con una disolución de medida que contenía 0.200 ppm de Ti(IV). Los resultados obtenidos para diez inyecciones sucesivas, en las mismas condiciones cromatográficas, se recogen en la tabla VI.8.

**TABLA VI.8. Repetibilidad de la inyección.**

Nº de inyección	$h_{\text{pico}}$
1	30578
2	30228
3	29261
4	29807
5	28645
6	28278
7	30987
8	28401
9	29294
10	29358



## TITANIO

---

El estudio estadístico realizado sobre estos resultados arroja los siguientes datos:

**\* Señal instrumental (Altura de pico):**

- Valores medios de alturas de pico . . . . .	29506
- Desviación estándar "s" . . . . .	896

El error instrumental expresado como coeficiente de variación ( % C.V.) es de 3.03%.

### VI.2.5.2.2. Evaluación de la precisión del método propuesto.

Para evaluar la precisión del método propuesto se procedió de dos formas diferentes:

a) Evaluándolo a partir de los datos de calibrado.

Se evaluó la precisión del método propuesto a partir de los datos de calibrado, de acuerdo con lo establecido en el apartado correspondiente del capítulo II, y representando el % C.V.(c) vs  $C_{Ti}$ . Los resultados se recogen en la figura VI.8.

**Figura VI.8.** Variación del % C.V.(c) con la concentración de Ti(IV) en fase acuosa.



## CAPÍTULO VI

b) Realizando una experiencia en idénticas condiciones operatorias, partiendo de disoluciones de Ti(IV) de 0.200 ppm en la disolución de medida preparadas de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Los valores de altura de pico y de concentración de titanio obtenidos a partir de una recta de calibrado se recogen en la tabla VI.9.

TABLA VI.9. Repetibilidad del método propuesto.

h pico	[Ti(IV)] <sub>f.a.</sub> (ppb)
29690	206
28438	197
28338	196
28175	195
28142	195
29632	205

El estudio estadístico de dichos resultados dió lugar a los siguientes datos:

- Valor medio de concentración (ppb) .....	199
- Desviaciones estándar "s" .....	5.1

A partir de los valores de s y tomando los valores de la t (Student) de 2.441, para  $n-1 = 6$ , respectivamente (95% de nivel de confianza), se encuentra el siguiente intervalo de confianza,  $199 \pm 12$  ppb . Es decir, ninguno de los valores encontrados son rechazables.

El error del método expresado como coeficiente de variación (% C.V.) es de 2.56%.



## TITANIO

---

### VI. 2.5.3. Sensibilidad.

El cálculo de la sensibilidad se realizó a partir de la desviación estándar de regresión y de la pendiente de la recta de calibrado.

**El resultado obtenido es de 8.3 ppb. Este valor aportaría información acerca del mínimo intervalo de confianza discernible entre dos concentraciones en todo el rango de concentraciones estudiado.**

### VI.2.5.4. Límites de detección y cuantificación.

#### VI.2.5.4.1. Estimación de la mínima masa detectable.

La determinación de este parámetro se realizó a partir de la ecuación [8] del capítulo II, en la cual se sustituyeron como datos:

- $M = 47.90 \text{ g.mol}^{-1}$ .
- $k' = 0.901$
- $S/N = 2$ .
- $N_0 = 5.3 \times 10^{-5} \text{ UA}$ .
- $L = 15 \text{ cm}$ .
- $L_c = 1 \text{ cm}$ .
- $d_c = 0.4 \text{ cm}$ .
- $\epsilon = 11943$ .
- $N = 5620$ .

**El resultado obtenido fue de  $2.5 \times 10^{-3} \mu\text{g}$ , el cual se correspondería con una concentración de titanio de 0.010 ppm.**



## CAPÍTULO VI

---

VI.2.5.4.2. *Estimación de los límites inferiores del rango dinámico lineal, según lo establecido en el capítulo II.*

a) A partir de los datos de calibrado:

De acuerdo con la ecuación [10] del capítulo II propuesta por Cuadros y col. se obtiene como **límite de detección (aprox.) = 25.0 ppb en fase acuosa.**

b) A partir de las consideraciones de Long & Winefordner (según la normativa de la IUPAC).

- Límite de decisión .....	8.2 ppb.
- Límite de detección .....	18.4 ppb.
- Límite de determinación .....	25.6 ppb.

c) A partir de la evaluación de las probabilidades de falso positivo y falso negativo:

Según lo recogido en el mismo capítulo, el análisis de las curvas características de detección del analito para tres determinaciones sobre el blanco y para probabilidades de falsos positivo y negativo del 95% ( $\alpha = 0.05$ ,  $\beta = 0.05$ ), se obtuvieron los siguientes resultados:

- Límite de detección .....	16.4 ppb.
- Altura de pico asociada .....	462.

### VI.2.6. SELECTIVIDAD: ESTUDIO DE INTERFERENCIAS.

Dada la naturaleza del tipo de muestras (alimentos manufacturados, en los que el Ti se



## TITANIO

---

adiciona como "aditivo", normalmente en forma de  $\text{TiO}_2$ ), a las que se pensaba aplicar el método propuesto, el estudio de interferencias se realizó ensayando:

- a) Con los iones inorgánicos, que bien acompañan normalmente a los alimentos manufacturados, o bien se utilizan en el ataque de la muestra.
- b) Con iones que reaccionan fácilmente con el reactivo.

Por las razones comentadas los iones del grupo a) se ensayaron en proporción 1000:1 (Interferente/Ti), mientras que los iones del grupo b) se ensayaron en proporción 1:1 (Interferente/ti). en todos los casos el estudio de interferencias se realizó preparando las correspondientes disoluciones analizadas en matraces de 50 ml, y tomando de éstos, la alícuota correspondiente para obtener un porcentaje del 4% (v/v) en la disolución de medida, preparada de acuerdo con el procedimiento descrito. De la medida de la altura de pico de los cromatogramas registrados a partir de la inyección de 20  $\mu\text{l}$  de cada disolución de medida y con la ayuda de una recta de calibrado se determinó en cada caso, el error relativo de aquella.

Los iones eran considerados no interferentes cuando producían una desviación en la altura de pico no superior a un 5%.

Los resultados obtenidos se reúnen en la tabla VI.10.



CAPÍTULO VI

TABLA VI.10. Efecto de iones extraños sobre la determinación cromatográfica de 100 ppb de Ti(IV).

Ión extraño	Concentración (ppm)	Ión extraño/Ti (m/m)	E <sub>r</sub> %
Cl <sup>-</sup>	100	1000	6.5
	75	750	2.5
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	100	1000	0.7
ClO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	100	1000	1.5
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	100	1000	3.5
Li(I)	100	1000	-1.2
K(I)	100	1000	1.2
Na(I)	100	1000	0.0
Ca(II)	100	1000	-7.1
	75	750	2.1
Mg(II)	100	1000	3.1
Cu(II)	100	1000	10.1
	30	300	2.3
Fe(III)	0.3	3	0.8
Mo(VI)	0.2	2	0.0
V(V)	0.2	2	1.5

A la vista de los datos obtenidos podemos indicar que:

- 1.- *El método está prácticamente libre de interferencias provocadas por los iones inorgánicos presentes en matrices fundamentalmente de naturaleza orgánica, ya que todos los iones ensayados presentan tolerancias superiores a 750:1.*
- 2.- *Hay que considerar que la tolerancia al Fe(III) aunque es pequeña, no presenta interferencia, debido a que según la legislación vigente la adición de Ti a los alimentos manufacturados, viene limitada por la buena práctica de fabricación (B.P.F.) de esta manera, en este tipo de muestras el contenido en Ti será normalmente superior al*



## TITANIO

---

*contenido en Fe.*

- 3.- *Como era de esperar las tolerancias menores se presentan con aquellos cationes que tienen especial afinidad por el reactivo; en cualquier caso, esto no plantearía problemas a la hora de su aplicación, dado que son iones que normalmente, o no forman parte de los alimentos, o se encuentran en proporciones muy similares a las del Ti.*



### VI.3. APLICACIONES ANALÍTICAS.

Para comprobar la utilidad del método propuesto, se aplicó a la determinación de titanio en una muestra que tiene interés conocer su contenido, ya que se adiciona como agente endurecedor durante la etapa de elaboración. La muestra seleccionada para este estudio fué una muestra comercial de grageas de chocolate.

#### VI.3.1. ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN TITANIO DE UNA MUESTRA COMERCIAL DE GRAGEAS DE CHOCOLATE.

La muestra, adquirida en un establecimiento comercial, está constituida por los siguientes ingredientes:

*Azúcar, Manteca de cacao, Pasta de cacao, Leche en polvo descremada, Leche en polvo entera, Glucosa, Emulgente (Lecitina), Colorantes: E-171 (Dióxido de titanio), E-110 (), E-124(Amarillo anaranjado S), E-132(Indigo carmín), E-102(Tartracina), E-153 (Carbón medicinal vegetal), Aroma (Vainillina), Cacao mínimo 37% en el chocolate.*

La determinación del contenido en Ti, se realizó a partir de una disolución obtenida tratando 10.010 g de muestra homogénea, de acuerdo con el procedimiento descrito en el capítulo I y llevando a un volumen final de 250 ml.

##### VI.3.3.1. Resultados.

En la tabla VI.11. se recogen las alturas de pico del complejo Ti(IV)-MEDSHA para cada uno de los cromatogramas obtenidos en las diferentes series de medidas que componen la determinación, i.e. calibrado con patrones, calibrado por adición de patrón y calibrado de Youden.



TITANIO

**TABLA VI.11. Resultados experimentales obtenidos en la determinación de Ti en una muestra de grageas de chocolate**

CALIBRADO	Vol. <sub>muestra</sub>	[Ti(IV)]	[Ti(IV)] añadida	h <sub>pico</sub>		
PATRONES	---	0.000	---	0000	0000	0000
	---	0.100	---	15320	14462	15236
	---	0.200	---	27738	28956	29613
	---	0.300	---	42080	41606	45880
ADICIÓN DE PATRÓN	50 µl	---	0.000	12800		13654
	50 µl	---	0.050	19627		18774
	50 µl	---	0.100	27734		27307
	50 µl	---	0.150	35284		35841
YOU DEN	50 µl	---	---		13545	
	100 µl	---	---		23292	
	150 µl	---	---		36987	
DETERMIN.	50 µl	---	---		11947	
	50 µl	---	---		13654	
	50 µl	---	---		13654	
	50 µl	---	---		11094	

\* ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

Los resultados obtenidos en el tratamiento estadístico de los datos recogidos en la tabla anterior se reúnen a continuación:



CAPÍTULO VI

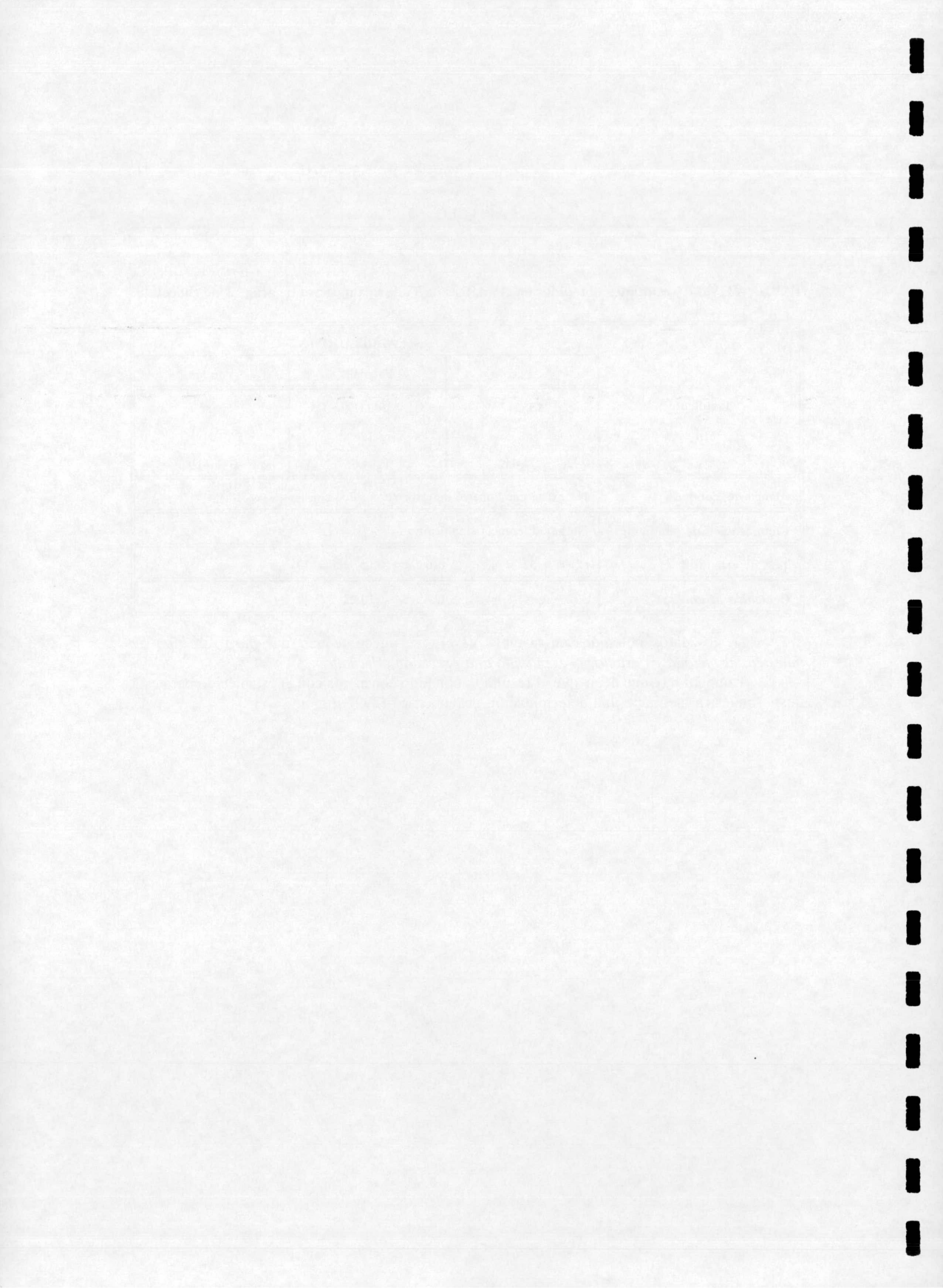
TABLA VIIV.17. Resultados obtenidos en el análisis de Ti de una muestra de grageas de chocolate.

	CALIBRADO		
	A. Patrón	Patrones	Youden
	Pendiente	153212	143329
n	8	12	3
s	806.042	1184.66	390.619
Blanco de Youden	No existe componente de error sistemático constante		
Comparación de pendientes	No hay diferencia significativa		
Test de exactitud	$t_{cal} = 1.52 < t_{tab} = 2.110$ ( $\alpha = 0.05$ , gdl = 17)		
Contenido de analito	3020 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (n = 4); C.V. % = 10.22		

De los datos obtenidos en la tabla VI.11., se puede deducir que *para este tipo de muestra, el método es exacto. presentando una precisión adecuada.*

También hay que decir que el resultado obtenido concuerda con el establecido para esta misma muestra mediante una determinación gravimétrica (2997  $\mu\cdot\text{g}^{-1}$ )

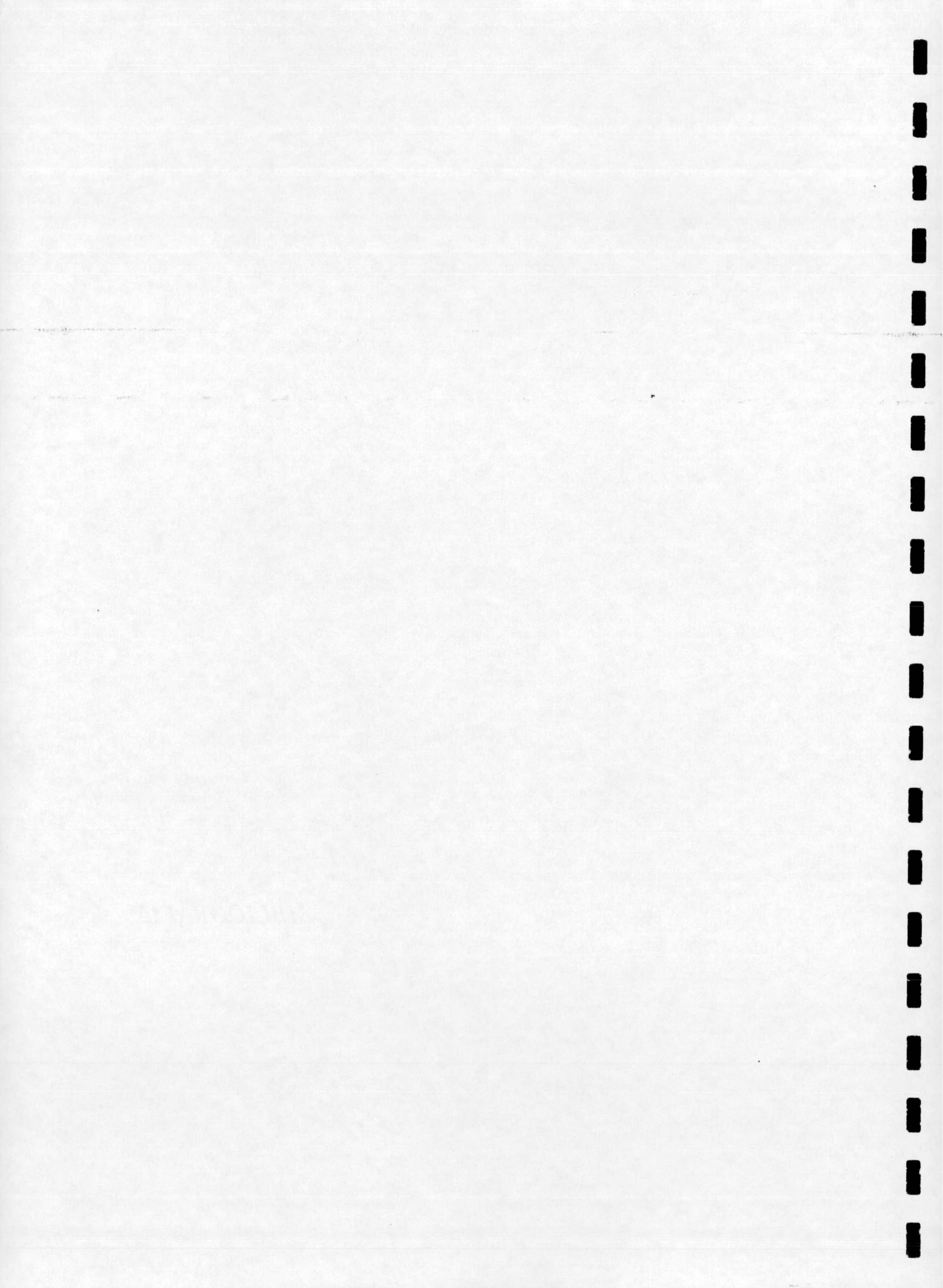






*BIBLIOGRAFÍA*







## BIBLIOGRAFÍA

### INTRODUCCIÓN

- [1] L.R. Snyder and J.J. Kirkland, "Introduction to Modern Liquid Chromatography", Wiley, New York, 2nd ed. 1980.
- [2] P.C. Uden, *J. Chromatogr.*, **313**, 3-31, 1984.
- [3] D.A. Segar, *Anal. Lett.*, **7**, 89, 1974.
- [4] W.R. Wolf, *J. Chromatogr.*, **134**, 159, 1977.
- [5] H.H. Hill Jr. and W.A. Aue, *J. Chromatogr.*, **74**, 311, 1972.
- [6] W.A. Aue and C.G. Flinn, *J. Chromatogr.*, **142**, 145, 1977.
- [7] H. Small, T.S. Stevens and W.C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**, 1801, 1975.
- [8] C.A. Pohl and E.L. Johnson, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 442, 1980.
- [9] F.C. Smith and R.C. Chang, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **9**, 197, 1980.
- [10] H. Small, *Anal. Chem.*, **55**, 235A, 1983.
- [11] J.D. Mulik and A. Sawicki, *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 804, 1979.
- [12] J.S. Fritz, D.T. Gjerde and C. Pohlandt, *Ion Chromatography*, Hüthig, New York, 1982.
- [13] R. Wetzel, *Environ. Sci. Technol.*, **13**, 1214, 1979.
- [14] R. Wetzel, *Ind. Res. De.*, April, 92, 1982.
- [15] J.C. MacDonald, *Amer. Lab.* **11**, 45, 1979.
- [16] H. Small, in E. Sawicki, J.D. mulik and E. Wittgenstein (Editors), "Ion Chromatographic Analysis of Environmental Pollutants", Vol. 1, Ann Arbor Sci. Publi., Ann Arbor, MI, 1978, p.11.
- [17] A.J. Muir, *Sci. Technol.*, **16**, 19, 1978.
- [18] R. G. Warren, *Food Technol. Aust.*, **33**, 300, 1981.
- [19] T.S. Stevens and M.A. Langhorst, *Anal. Chem.*, **54**, 950, 1982.
- [20] T.S. Stevens, J.C. Davis and H. Small, *Anal. Chem.*, **53**, 1488, 1981.
- [21] T.S. Stevens, G.L. Jewett and R.A. Bredeweg, *Anal. Chem.*, **54**, 1206, 1982.
- [22] Y. Hanaoka, T. Murayama, S. Muramoto, T. Matsuura and A. Nanba. *J. Chromatogr.*, **239**, 537, 1982.
- [23] Y. Takata and G. Muto, *Bunseki Kagaku (Jap. Anal.)*, **28**, 15, 1979.
- [24] F.A. Buytenhuys, *J. Chromatogr.*, **218**, 57, 1981.
- [25] P.R. Haddad and A.L. Heckenberg, *J. Chromatogr.*, **252**, 177, 1982.
- [26] F.A. Buytenhuys, personal communication.
- [27] N. Yoza, K. Ito, Y. Hirai and S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **196**, 471, 1980.
- [28] H. Yamaguchi, T. Nakamura, Y. Hirai and S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **172**, 131, 1979.
- [29] T. Nakamura, T. Yano, A. Fujita and S. Ohashi, *J. Chromatogr.*, **130**, 384,



## BIBLIOGRAFÍA

- 1977.
- [30] D.T. Gjerde, J.S. Fritz and G. Schmuckler, *J. Chromatogr.*, **186**, 509, 1979.
- [31] D.T. Gjerde, G. Schmuckler and J.S. Fritz, *J. Chromatogr.*, **187**, 35, 1980.
- [32] D.T. Gjerde and J.S. Fritz, *Anal. Chem.*, **53**, 2324, 1981.
- [33] N. Baba, K. Koaiya, S. Watsushita and W. Unino, Pittsburgh Conference, 1983, Abstract 68.
- [34] R.W. Siergiej and N.D. Danielson, *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 362, 1983.
- [35] *Manual for TSK HLC-601 Ion Chromatograph*, Toyo Soda, Tokyo, 1983, p.3.
- [36] T. Okada and T. Kuwamoto, *Anal. Chem.*, **55**, 1001, 1983.
- [37] J.E. Girard and J.A. Glatz, *Amer. Lab.* **13**, 26, 1981.
- [38] R.L. Stevenson and K. Harrison, *Amer. La.*, **13**, 76, 1981.
- [39] B.A. Bidlingmeyer, *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 525, 1980.
- [40] I. Molnár, H. Knauer and D. Wilk, *J. Chromatogr.*, **201**, 225, 1980.
- [41] N.E. Skelly, *anal. chem.*, **54**, 712, 1982.
- [42] D. Bushee, I.S. Krull, R.N. Savage and B. Smith, Jr., *J. Liq. Chromatogr.*, **5**, 463, 1982.
- [43] S.H. Kok, K.A. Buckle and M. Wootton, *J. Chromatogr.*, **260**, 189, 1983.
- [44] B.B. Wheals, *J. chromatogr.*, **262**, 61, 1983.
- [45] R.M. Cassidy and S. Elchuk, *J. chromatogr. Sci.*, **21**, 454, 1983.
- [46] D.E. Burge, D.W. Togami and T.J. Jupille, Pittsburgh Conference, 1983, Abstract 65.
- [47] R.M. Cassidy and S. Elchuk, *Anal. Chem.*, **54**, 1558, 1982.
- [48] R.M. Cassidy and S. Elchuk, *J. Chromatogr.*, **262**, 311, 1983.
- [49] Z. Iskandarani and D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **54**, 2427, 1982.
- [50] R.N. Reeve, *J. Chromatogr.*, **177**, 393, 1979.
- [51] J.P. de Kleijn, *Analyst. (london)*, **107**, 223, 1982.
- [52] C. Horvath, W. Melander, I. Molnar and P. Molnar, *Anal. Chem.*, **49**, 2295, 1977.
- [53] J.L.M. van de Venne, J.L.H.M. Hendrikx and R.S. Deelder, *J. Chromatogr.*, **167**, 1, 1978.
- [54] B.A. Bidlingmeyer, S.N. Deming, W.P. Price, Jr., B. Sachok and M. Petrussek, *J. Chromatogr.*, **186**, 419, 1979.
- [55] Z. Iskandarani and D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **54**, 1065, 1982.
- [56] Z. Iskandarani and D.J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **54**, 2601, 1982.
- [57] G.L. Wheeler and P.F. Lott, *Microchem. J.*, **19**, 390, 1974.
- [58] U. Leuenberger, R. Gauch, K. Rieder and E. Baumgartner, *J. Chromatogr.*, **202**, 461, 1980.
- [59] H.J. Cortes, *J. Chromatogr.*, **234**, 517, 1982.
- [60] M. Igawa, K. Saito, J. Tsukamoto and M. Tanaka, *Anal. Chem.*, **53**, 1942, 1981.



## BIBLIOGRAFÍA

- [61] Y. Tokunaga, H. Waki and s. Ohashi, *J- Liq. Chromatogr.*, **5**, 1855, 1982.
- [62] I. Stronski, *Isotopenpraxis*, **9**, 273, 1973.
- [63] W. Szczpaniak, J. Nawrocki and T. Wasiak, *Chromatographia*, **12**, 539, 1979.
- [64] W. Szczpaniak, J. Nawrocki and W. Wasiak, *Chromatographia*, **12**, 484, 1979.
- [65] D.N. Sokolov, "*Gas Chromatography of Volatile Metal Complexes*", Nauka, Moscow, 1981.
- [66] J.F. Alexander, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **18**, 1, 1987.
- [67] J. Vialle, M. Bertrand, M. Kolosky, O. Paisse and G. Raft, *Analisis*, **17**, 376, 1989.
- [68] "*Complexation Chromatography*" eds. G.G. Wallace and J.M. Riviello, Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1980.
- [69] Q. Fernando and J. Phillips, *Anal. Chem.*, **25**, 819, 1953.
- [70] D. Laskowski and W. McCrone, *Anal. Chem.*, **23**, 157, 1951.
- [71] K. Varshney and S. Varshney, *Chromatographia*, **10**, 542, 1977.
- [72] B. Deshmukh, *Indian J. Chem., Sect. A*, **23**, 52, 1984.
- [73] C.G. Yeole and V.M. Shinde, *Analyst*, **109**, 993, 1984.
- [74] R.P. Rajput, N. Seth, S. Agrawal and A. Misra, *Acta Ciencia Indica, Chem.*, **14**, 79, 1988.
- [75] L. Li, Y. An and P. Di, *Fenxi Huaxue*, **15**, 787, 1987.
- [76] L.Li and P. Di, *Huaxue Shiji*, **10**, 8, 1988.
- [77] X. Xu, L. Li, Y. Hao and Z. Xiao, *Huaxue Shiji*, **10**, 139, 1988.
- [78] T.H. Mough, *Science*, **216**, 161, 1982.
- [79] R. Kaiser, *HRC. CC. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. commun.* **7**, 117, 1984.
- [80] M. Yamazaki, R. Igarashi and S. Ichinoki, *Bunseki Kagaku*, **31**, 702, 1982.
- [81] M. Yamazaki, R. Igarashi and T. Suzuki, *Bunseki Kagaku*, **32**, 234, 1983.
- [82] H. Schneeweis and B. Steinbrech, *Fresenius Z. anal. Chem.*, **316**, 13, 1983.
- [83] B. Yin and W. Wang, *Huaxue Shiji*, **5**, 145, 1983.
- [84] S. Dilli and K. Robards, *J. Chromatogr.* **270**, 313, 1983.
- [85] T. Honjo, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **327**, 798, 1987.
- [86] A.R. Timerbaev, O.M. Petrukhin and Yu.A. Zolotov, *Zh. Anal. Khim.*, **37**, 581, 1982.
- [87] D.T. Haworth, J. Lunkenheimer and M. Das, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 1327, 1987.
- [88] N. Singh, K. Rastogi, R. Kumar and T.N. Srivastava, *Analyst*, **106**, 599, 1981.
- [89] A.R. Timerbaev, O.M. Petrukhin and Yu.A. Zolotov, *Zh. Anal. Khim.*, **37**, 1360, 1982.
- [90] G. Soundararajan and M. Subbaiyan,



## BIBLIOGRAFÍA

- Indian J. Chem. Sect. A., **22**, 399, 1983.
- [91] A.L.J. Rao and S. Chopra, J. Inst. Chem. India, **57**, 197, 1985.
- [92] K. Saitoh, M. Kobayashi and N. Suzuki, Anal. Chem., **53**, 2309, 1981.
- [93] H. Eggers and H. Ruessel, Chromatographia, **17**, 486, 1983.
- [94] H. Eggers and H. Ruessel, Fresenius Z. Anal. Chem., **318**, 278, 1984.
- [95] M.F. Hussain, R.K. Bansal, B.K. Puri and M. Satake, Analyst, **110**, 779, 1985.
- [96] R.P. Garten, G. Schneeweis, B. Steinbrech, K.H. Koenig and G. Groeneveld, Fresenius Z. Anal. Chem., **313**, 304, 1986.
- [97] B. Steinbrech and K.H. Koenig, Fresenius Z. Anal. Chem. **316**, 685, 1983.
- [98] B. Martinez, J.C. Orte, G. Crovetto y J. Thomas, "23 Reunión Internacional del Grupo de Cromatografía y Técnicas Afines", Peñiscola 1994. p. 118.
- [99] A.R. Timerbaev and O.M. Petrukhin, Anal. Chim. Acta, **159**, 229, 1984.
- [100] G. Schneeweis and K. Koenig, Fresenius Z. Anal. Chem., **316**, 16, 1983.
- [101] C.W. Huie and W.R. Williams, Anal. Chem. **61**, 2288, 1989.
- [102] R.P. Garten, G. Schneeweis, B. Steinbrech, K.H. Koenig and G. Groeneveld, Fresenius Z. Anal. Chem. **313**, 193, 1982.
- [103] A.J. Kubis, K.V. Somayajula, A.G. Sharkey and D.M. Hercules, Anal. Chem., **61**, 2516, 1989.
- [104] G.M. Schwab and K. Jockers, Naturwissenschaften, **25**, 44, 1937.
- [105] G.M. Schwab and K. Jockers, Angew. Chem., **50**, 546, 1937.
- [106] J.N. King and J.S. Fritz, Anal. Chem. **57**, 1016, 1985.
- [107] A. Fliegler and S. Przeszlakowski, Talanta, **32**, 1141, 1985.
- [108] M. Green, Talanta, **20**, 139, 1973.
- [109] S. Przeszlakowski and A. Flieger, Talanta, **26**, 1125, 1979.
- [110] S. Przeszlakowski and A. Flieger, Talanta, **28**, 557, 1981.
- [111] A. Flieger and S. Przeszlakowski, Talanta, **29**, 946, 1982.
- [112] K.S. Lee, W. Lee and D.W. Lee, Anal. Chem. **50**, 255, 1978.
- [113] A. Shah and S. Devi, Talanta, **34**, 547, 1987.
- [114] G. Knapp, K. Müller, M. Strunz and W. Wegscheider, J. Anal. At. Spectro., **2**, 611, 1987.
- [115] S. Majee and J. Das, Chem. Anal. (Varsaw), **32**, 985, 1987.
- [116] Y. Lui and J. Ingle, Anal. Chem. **61**, 520, 1989.
- [117] X. Wang and R.M. Barnes, J. Anal. At. Spectrom., **4**, 509, 1989.
- [118] R. Kvitev, J. Evans and P. Carr, Anal. Chim. Acta, **144**, 93, 1982.
- [119] O. Abollino, E. Mentasti, V. Porta and C. Sarzanini, Anal. Chem., **62**, 21, 1990.
- [120] J.P. Mooney, M. Meaney, M.R. Smyth R.G. Leonard and G.G. Wallace, Analyst, **112**, 1555, 1987.
- [121] Z. Fang, J. Ruzicka and E.H. Han-



## BIBLIOGRAFÍA

- sen, Anal. Chim. Acta, **164**, 23, 1984.
- [122] Z. Fang, S. Xu and S. Zhang, Anal. Chim. Acta, **164**, 41, 1984.
- [123] F. Malamas, M. Bengtsson and G. Johansson, Anal. Chim. Acta, **160**, 1, 1984.
- [124] R.D. Smith, B.W. Wright and C.R. Yonker, Anal. Chem., **60**, 1323A, 1988.
- [125] T.L. Chester and J.D. Pinkston, Anal. Chem., **62**, 394R, 1990.
- [126] N.M. Karayannis, A.H. Corwin, E.W. Baker, E. Klesper and J.A. Walter, Anal. Chem., **40**, 1736, 1968.
- [127] N.M. Karayannis and A.H. Corwin, J. chromatogr. Sci., **8**, 251, 1970.
- [128] F. Bickman and B. Wenclawiak, Fresenius Z. Anal. Chem., **320**, 261, 1985.
- [129] M. Ashraf-Khorassani, J. Hellgeth and L. Taylor, Anal. Chem., **59**, 2077, 1987.
- [130] K.R. Jahn and B.W. Wenclawiak, Fresenius Z. Anal. Chem., **330**, 243, 1988.
- [131] Anon. Anal. Chem., **54**, 1249A, 1982.
- [132] G. Schwedt, "Chromatographic Methods in Inorganic Analysis". Verlag, Heidelberg, 1981.
- [133] A.R. Timerbaev, O.M. Petrukhin and Yu.A. Zolotov, Fresenius Z. Anal. Chem., **327**, 87, 1987.
- [134] B. Steinbrech, J. Liq. Chromatogr., **10(1)**, 1, 1987.
- [135] A.R. Timerbaev, O.M. Petrukhin, I.P. Alimarin and T.A. Bol'shova, Talanta, **38**, 467, 1991.
- [136] J. Huber, J. Kraak and H. Veening, Anal. Chem., **44**, 1554, 1972.
- [137] O. Liska, J. Lehotay, E. Brandsteterova and G. Guiochon, J. Chromatogr. **171**, 153, 1979.
- [138] O. Liska, G. Guiochon and H. Colin, J. Chromatogr., **171**, 145, 1979.
- [139] S. Liodakis, A. Pappa and G. Parissakis, J. Chromatogr. Sci., **27**, 149, 1989.
- [140] P.C. Uden, I. Bigley and F. Walters, Anal. Chim. Acta, **100**, 555, 1978.
- [141] P. Uden and F. Walters, Anal. Chim. Acta, **79**, 175, 1975.
- [142] P. Uden and I. Bigley, Anal. Chim. Acta, **94**, 29, 1977.
- [143] M. Lohmuller, P. Heizmann and K. Ballschmiter, J. Chromatogr. **137**, 165, 1977.
- [144] B. Steinbrech, G. Schneeweis and K. Koenig, Fresenius Z. Anal. Chem., **311**, 499, 1982.
- [145] M.Y. Khuhawar and A.K. Talpur, J. Chem. Soc. Pak., **12**, 236, 1990.
- [146] C.S. Hambali and P. Haddad, Chromatographia, **13**, 633, 1980.
- [147] Yu.S. Nikitin, N.B. Morozowa, S.N. Lanin, T.A. Bol'shova, V.M. Ivanov and E.M. Basova, Talanta, **34**, 223, 1987.
- [148] I.P. Alimarin, E.M. Basova, A.Yu. Malykhin and T.A. Bol'shova, Talanta, **37**, 485, 1990.
- [149] A.R. Timerbaev, E.N. Shapovalova, T.A. Bol'shova, O.M. Petrukhin, I.G.



## BIBLIOGRAFÍA

- Tsoi and V.V. Tsoi, *J. of Anal. Chem. USSR*, **45**, 291, 1990.
- [150] G. Bagur, M. Sánchez and D. Gázquez, *Analyst*, **119**, 1157, 1994.
- [151] E. Gaetani, C. Laureri, A. Mangia and G. Parolari, *Anal. Chem.*, **48**, 1725, 1976.
- [152] F. Gasparrini, D. Misti, G. Natile and B. Galli, *J. Chromatogr.*, **161**, 356, 1978.
- [153] G. Bagur, M. Sánchez-Viñas and D. Gázquez, *Anal. Chim. Acta*, en prensa.
- [154] S. Ichinoki and M. Yamazaki, *Anal. Chem.* **57**, 2219, 1985.
- [155] A. Bond and G. Wallace, *Anal. Chim. Acta*, **164**, 223, 1984.
- [156] G. Schwedt, *Chromatographia*, **12**, 289, 1979.
- [157] A. Mangia, G. Parolari, E. Gaetani and C. Laureri, *Anal. Chim. Acta*, **92**, 111, 1977.
- [158] R.C. Gurira and P.W. Carr, *J. Chromatogr. Sci.*, **2**, 461, 1982.
- [159] M.Y. Khuhawar and A.I. Soomro, *Talanta*, **6**, 609, 1992.
- [160] N. Uehara, K. Morimoto and Y. Shijo, *Analyst*, **117**, 977, 1992.
- [161] T. Suzuki, K. Tsunoda, H. Kawamoto and H. Akaiwa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **66**, 766, 1993.
- [162] P.N. Nesterenko, G.Zh. Amirova and T.A. Bol'shova, *Anal. Chim. Acta*, **285**, 161, 1994.
- [163] T. Suzuki, K. Tsunoda and H. Akaiwa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **67**, 1336, 1994.
- [164] R.M. Smith, A.M. Butt and A. Thakur, *Analyst*, **11**, 35, 1985.
- [165] S. Inoue, S. Hoshi and M. Matsubara, *Talanta*, **32**, 42, 1985.
- [166] Y. Shih and P. Carr, *Anal. Chim. Acta*, **142**, 55, 1982.
- [167] J. Koyama, J. Nomura, Y. Ohtsu, O. Nakata and M. Takahashi, *Chem. Lett.* 687, 1990.
- [168] S. Hutchins, P. Haddad and S. Dilli, *J. Chromatogr.*, **252**, 185, 1985.
- [169] G. Baiocchi, A. Marchetto, G. Saini, P. Bertolo and G. Petti, *Talanta*, **35**, 685, 1988.
- [170] J. King and J. Fritz, *Anal. Chem.*, **59**, 703, 1987.
- [171] M. Palmieri and J. Fritz, *Anal. Chem.*, **60**, 2244, 1988.
- [172] B. Maiti and S.R. Desai, *Analyst*, **111**, 809, 1986.
- [173] I.R. Willett, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **53**, 1385, 1989.
- [174] O. Shpigun and Yu. A. Zolotov, "*Ion Chromatography in Water Analysis*". Ellis Horwood, Cichester, 1988.
- [175] D.M. Fraley, D. Yates, S. Manahan, D. Stalling and J. Petty, *J. Appl. Spectrosc.* **35**, 525, 1981.
- [176] Y. Da-Ren and G. Schwedt, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **30**, 121, 1985.
- [177] Y. Da-Ren, E. Stumpp and G. Schwedt, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **322**, 474, 1985.
- [178] Y. Da-Ren and G. Schwedt, *Fresenius Z. Anal. Chem.*, **320**, 252, 1985.
- [179] N. Fortier and J. Fritz, *Talanta*, **34**,



## BIBLIOGRAFÍA

- 415, 1987.
- [180] K. Soroka, R. Vithanage, D. Phillips, B. Walker and P. Dasgupta, *Anal. Chem.* **59**, 629, 1987.
- [181] H. Bauer, D. Ottenlinger and D. Yan, *Chromatographia*, **28**, 315, 1989.
- [182] N. Simonzadeh and A.A. Schilt, *Talanta*, **35**, 187, 1988.
- [183] G. Bonn, S. Reiffenstuhl and P. Jandik, *J. Chromatogr.*, **499**, 669, 1990.
- [184] P. Jones and G. Schwedt, *J. Chromatogr.*, **482**, 325, 1989.
- [185] D. Chambaz and W. Haerdi, *J. Chromatogr.*, **482**, 335, 1989.
- [186] E. Edward-Inatimi and J.A. Dalziel, *Anal. Proc.* **17**, 40, 1980.
- [187] M.D. Palmieri and J.S. Fritz, *Anal. Chem.*, **59**, 2226, 1987.
- [188] A. Kirk and A. Hewavitharana, *Anal. Chem.*, **60**, 797, 1988.
- [189] A. Mangia and M.T. Lugari, *J. Liq. Chromatogr.*, **6**, 1073, 1983.
- [190] S. Inoue, N. Hashimoto, S. Hoshi and M. Matsubara, *Talanta*, **32**, 1093, 1985.
- [191] J.C. Thompsen and A.B. Carel, *Analyst*, **114**, 1197, 1989.
- [192] B. Grigorova, S. Wright and M. Josephson, *J. Chromatogr.*, **410**, 419, 1987.
- [193] M. Main and J. Fritz, *Anal. Chim. Acta*, **229**, 101, 1990.
- [194] N. Uehara, K. Morimoto and Y. Shijo, *Analyst*, **116**, 27, 1991.
- [195] S.J. Tsai and H. Yan, *Analyst*, **118**, 521, 1993.
- [196] N. Uehara, A. Katamine and Y. Shijo, *Analyst*, **119**, 1333, 1994.
- [197] Q. Liu, J. Liu, Y. Tong and J. Cheng, *Anal. Chim. Acta*, **269**, 223, 1992.
- [198] R.H. Fish and J.J. Komlenic, *Anal. Chem.*, **56**, 510, 1984.
- [199] R.K. Fish, J.J. Komlenic and B.K. Wines, *Anal. Chem.*, **56**, 2452, 1984.
- [200] D.R. Jones and S.E. Manahan, *Anal. Lett.*, **8**, 569, 1975.
- [201] A. Berthod, M. Kolosky, J.L. Rocca and O. Vittori, *Analisis*, **7**, 395, 1979.
- [202] I.S. Krull, *Trends Anal. Chem.*, **3**, 76, 1984.
- [203] P.C. Uden, *Anal. Chim. Acta*, **94**, 29, 1977.
- [204] P.C. Ude, B.D. Quimby, R.M. Barnes and W.G. Elliot, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 99, 1978.
- [205] P.C. Uden, I.E. Bigley and F.M. Walters, *Anal. Chim. Acta*, **100**, 555, 1978.
- [206] K. Jinno and H. Tsuchida, *Anal. Lett.*, **15**, 427, 1982.
- [207] K. Jinno, H. Tsuchida, S. Nakanishi, Y. Hirata and C. Fujimoto, *Appl. Spectrosc.*, **37**, 258, 1983.
- [208] C.H. Gast, J. C. Kraak, H. Poppe and F.J.M.J. Maessen, *J. Chromatogr.* **185**, 549, 1979.
- [209] J.C. Evans, A.H. Jackson, K.R.N. Rao and C.C. Rowlands, *J. High Res. Chromatogr., Chromatogr. Commun.*, **8**, 269, 1985.
- [210] E.D. Katz and R.P.W. Scott, *Analyst*, **110**, 253, 1985.



## BIBLIOGRAFÍA

- [211] L. Ebdon, S. Hill and R.W. Ward, *Analyst*, **112**, 1, 1987.
- [212] P.C. Uden, *TrAC, Trends Anal. Chem. (Pers. Ed.)*, **6**, 238, 1987.
- [213] J. Thompson and R. Houk, *Anal. Chem.* **58**, 2541, 1986.
- [214] R.M. Smith and L.E. Yankey, *Analyst*, **107**, 744, 1982.
- [215] B. Mueller and R. Lovett, *Anal. Chem.*, **57**, 2693, 1985.
- [216] A. Bond and G. Wallace, *Anal. Chem.* **55**, 718, 1983.
- [217] A. Bond and G. Wallace, *Anal. Chem.* **56**, 2085, 1984.
- [218] A.M. Bond and R.L. Martin, *Coord. Chem. Rev.*, **54**, 23, 1984.
- [219] P.W. Alexander, P.R. Haddad and M. Trojanowicz, *Chromatographia*, **20**, 179, 1985.
- [220] M. Nonomura, *Anal. Chem.*, **59**, 2073, 1987.
- [221] P.K. Dasgupta, K. Soroka and R.S. Vithanage, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 3287, 1987.
- [222] G. Schwarzenbach and H. Flaschka, *"Complexometric Titrations"*, 2nd English edn. Methuen, London, Ch. 2 y 3. 1969.
- [223] A. Babko and A. Pilipenko, *"Photometric Analysis, General Principles and Working Tools"* (Eng. edn.), MIR Publishers, Moscow, Table 13, 1971.
- [224] G.J. Schmidt and R.P.W. Scott, *Analyst*, **109**, 997, 1984.
- [225] B. Yan and P. Worsfold, *Anal. Chim. Acta*, **236**, 287, 1990.
- [226] B. Yan, P.J. Worsfold and K. Roberts, *Analyst*, **116**, 1227, 1991.
- [227] P.R. Haddad and P.E. Jackson, *"Ion Chromatography, Principles and Applications"*, Elsevier, Amsterdam, 1990.
- [228] P. Haddad and E. Patsalides, *"Chromatography: Fundamentals and Applications"*, ed. E. Heftmann, Elsevier, Amsterdam, ch. 12, 1991.
- [229] A.J. Fatiadi, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **18**, 1, 1987.
- [230] Y.Yu. Vin and S.M. Khopkar, *Anal. Lett.*, **23**, 635, 1990.
- [231] W. Song and Z. Yin, *Lihua Jianyan, Huaxue Fenxi*, **25**, 91, 1989.
- [232] H. Liu, B. Feng and Y. Pang, *Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi*, **8**, 47, 1988.
- [233] B. Evtimova and V. Mikhailova, *Anal. Chim. Acta*, **232**, 393, 1990.
- [234] J. Smits, J. Nielsen and R. Van Grieken, *Anal. Chim. Acta*, **111**, 215, 1979.
- [235] P. Jones, P.J. Hobbs and L. Ebdon, *Analyst*, **109**, 703, 1984.
- [236] Y. Zhao and C. Fu, *Anal. Chim. Acta*, **230**, 23, 1990.
- [237] E. Edward-Inatimi, *J. Chromatogr.*, **256**, 253, 1983.
- [238] J. Miura, *Anal. Chem.*, **62**, 1424, 1990.
- [239] P.A. Reece, J.T. McCall, G. Powis and R.L. Richardson, *J. Chromatogr.*, **306**, 417, 1984.
- [240] O.H. Drummer, A. Proudfoot, L. Howes and W. Louis, *Clin. Chim. Acta*, **136**, 65, 1984.



## BIBLIOGRAFÍA

- [241] S. Yang, J. Xu, Q. Shen, X. Zhang, L. Yang, Y. Ma and Y. Lin, *Zhonghua Yixue Jianyan Zazhi*, **13**, 71, 1990.
- [242] R.M. Cassidy, *Chem: Geol.*, **67**, 185, 1988.
- [243] B.E. Edward-Inatimi, *Symp. Biol. Hung.*, **37**, 175, 1988.
- [244] R. Saraswati, N.R. Desikan, S.V. Athavale and T.H. Rao, *Anal. Chim. Acta*, **237**, 325, 1990.
- [245] V.K. Jones and J.G. Tarter, *Analyst*, **113**, 183, 1988.
- [246] H. Ohashi, N. Uehara and Y. Shijo, *J. Chromatogr.*, **539**, 225, 1991.
- [247] S. Tsai and S Hsu, *Analyst*, **119**, 403, 1994.
- [248] A.M. Bond and G.G. Wallace, *Anal. Chem.*, **55**, 718, 1983.
- [249] S. Elchuk and R.M. Cassidy, *Anal. Chem.* **51**, 1434, 1979.
- [250] D.J. Barkley, M. Blanchette, R.M. Cassidy and S. Elchuk, *Anal. Chem.*, **58**, 2222, 1986.
- [251] P. Leroy and A. Nicolas, *J. Chromatogr.*, **317**, 513, 1984.
- [252] R.M. Smith, R.L. Morarji and W.G. Salt, *Analyst*, **105**, 184, 1980.
- [253] R.M. Smith, R.L. Morarji and W.G. Salt, *Analyst*, **106**, 129, 1981.
- [254] M. Moriyasu, Y. Hashimoto and M. Endo, *Chem. Lett.*, **6**, 761, 1980.
- [255] M. Moriyasu, M. Endo, R. Kanazawa, Y. Hashimoto, A. Kato and M. Mazuno, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 744, 1984.
- [256] G.K.C. Low, P.R. Haddad and A.M. Duffield, *J. Chromatogr.*, **254**, 123, 1983.
- [257] G.K.C. Low, P.R. Haddad and A.M. Duffield, *Chromatographia*, **17**, 16, 1983.
- [258] C.P. Desilets and T. Pinkerton, *Appl. Radiat. Isot.*, **38**, 107, 1987.
- [259] G. Heneghan and G.G. Wallace, *Anal. Proc.*, **23**, 29, 1986.

## CAPÍTULO I:

- [1] L.F. Capitán-Vallvey, F. Salinas and D. Gázquez, *Proc. Indian Acad. Sci., Chem. Sci.*, **91**, 399, 1982.
- [2] L.I.R. Snyder, J.L. Glajch and J.J. Kirkland. "Practical HPLC Method Development". John Wiley & Sons. New York, 1988, p. 228.
- [3] Apuntes del curso "Cromatografía Líquida de Alta Eficacia". Hewlett Packard Española, Sevilla 1990.
- [4] J.W. Dolan and L.I. R. Snyder "Troubleshooting LC Systems". Humana Press. Clifton. New Jersey, 1989.
- [5] C.A. Bicking, *Principles and Methods*



## BIBLIOGRAFÍA

- of Sampling, in "Treatise on Analytical Chemistry", 2<sup>nd</sup> ed. I.M. Kolthoff and P.J. Elving (eds.). Part I, vol.1. Wiley & Sons, New York, 1978.
- [6] M.T. Crosby, *Analyst*, **102**, 225, 1977.
- [7] F.F. Fricke, W.B. Robbins and J. Caruso, Trace elements analysis of food and beverages by atomic absorption spectrometry. *Prog. Analyt. Atom. Spectrosc.* **2**, 185, 1979.
- [8] AOAC Official Methods of Analysis, 12<sup>th</sup> edn. 461, 1975.
- [9] G. Middleton and R.E. Stuckey, *Analyst*, **79**, 138, 1955.
- [10] R.D. Roshania and Y.K. Agrawal, *Chemia Analityczna*, **26**, 191, 1981.
- [11] S.A. Abbasy, *Anal. Lett.* **20**(9), 134, 1987.
- [12] K.S. Menon and Y.K. Agrawal, *Analyst*, **109**, 27, 1984.
- [13] Z. Marczenko, "Separation and spectrophotometric determination of elements". Eds. R.A. Chalmers and M. Masson, Ellis Horwood Series in Analytical Chemistry, Wiley & Sons, Chichester, 1986.

## CAPITULO II:

- [1] T.J. Dols and B.A. Armbricht, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **60**(4), 940-945, 1977.
- [2] F.X. Rius, "Validación de métodos analíticos. Trazabilidad e incertidumbre". Apuntes Curso Programa COMETT II. Granada 1994.
- [3] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman. "Chemometrics: A textbook". Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [4] G. Kateman, L. Buydens: "Quality control in Analytical Chemistry", 2<sup>nd</sup> edn. John Wiley and sons. New York 1993.
- [5] M. Valcárcel y A. Ríos *Anal. Chem.* **65**, 718A, 1993.
- [6] J. Garcés, A. Mariné y R. Codony, *C.I.F.* **7**, 182-189, 1988.
- [7] W. Horwitz, ACS Symposium Series n° 160, Chap. 24. American Chemical Society, Washington D.C. 1981.
- [8] W. Horwitz, *Anal. Chem.* **54**(1), 67A, 1982.
- [9] M. Valcárcel y A. Ríos (Eds.), "La calidad en los laboratorios analíticos", Reverté, Barcelona, 1992.
- [10] J.K. Taylor, "Quality Assurance of Chemical Measurements", Lewis



## BIBLIOGRAFÍA

- Publ. Michigan 1987.
- [11] G. Linden, Ind. Aliment. Agric., 1242-1253, 1978.
- [12] L. Cuadros Rodriguez, A. García Campaña, C. Jimenez linaresand M. Román Ceba, Anal. Lett. **26**, 1243, 1993.
- [13] J.D. Ingle, J. Chem. Educ. **51(29)**, 100-105, 1974.
- [14] H. Egan, J. Assoc. Off. Anal. Chem. **57(2)**, 243-245, 1974.
- [15] H. Kaiser, Anal. Chem. **42(4)**, 26A-58A, 1970.
- [16] C. Liteanu, C. Rica, "Statistical Theory and Methodology of Trace Analysis", Ellis Horwood Ltd. Chichester, England 1980.
- [17] A.L. Wilson, Talanta, **21**, 1109-1121, 1974.
- [18] ACS Comitte on Environmental Improvement, "Guidelines for Data Acquisition and Quality Evaluation in Environmental Chemistry", Anal. Chem. **52(14)**, 2242-2249, 1980.
- [19] R. Gabriels, Anasl. Chem., **42(12)** 1439-1449, 1970.
- [20] A.L. Wilson, Talanta, **20**, 725-732, 1973.
- [21] "Recommendations for the Definition, Estimation and Use of Detection Limit", Analytical Methods Comitte, Analyst, **112**, 199, 1987.
- [22] G.L. Long and D.D. Winefordner, Anal. Chem. **55(7)**, 718A, 1983.
- [23] Ll.R. Snyder, J.L. Glajch and J.J. Kirkland, "Practical HPLC Method Development", John Willey and Sons, New York, 1988, p. 87.
- [24] J.N. Miller, Analyst, **116**, 3-14, 1991.
- [25] C.A. Clayton, J.W. Hines and P.D. Elkins. Anal. Chem. **59**, 2506-2514, 1987.
- [26] L.A. Currie, Anal. Chem. **40(3)**, 587, 1968.
- [27] Analytical Methods Committe, Analyst, **119(11)**, 2363-2366, 1994.
- [28] R. Boqué y F.X. Rius, en "Avances en Quimiometría Práctica". Cap. 4. Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Public. e intercambio científico, 1994.
- [29] D.L: Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming L. Kaufman and Y. Michotte , "Chemometrics: A textbook", Elsevier, Amsterdam, 1989.
- [30] Analytical Methods Committe, Analyst, **113**, 1469, 1988.
- [31] Monografía A.E.F.I., "Validación de métodos analíticos", Hewlett-Packard Eds.
- [32] J.C. Miller and J.N. Miller, "Estadística para Química Analítica", 2ª Ed. Addison-Wesley Iberoameroamericana, S.A. Wilmington, Delaware, 1993.
- [33] M.C. Ortiz y L. Sarabia en "Avances en Quimiometría Práctica", Cap. 5, Universidad de Santiago de Compostela. Servicio de Publ. e intercambio científico, 1994.
- [34] A. Martín Andrés, J.D. Luna del Castillo, "Estadística para las Ciencias de la Salud", Ed. Norma, Madrid



## BIBLIOGRAFÍA

- 1990.
- [35] ISO Guide 30 (1981), ISO Geneva, Switzerland.
- [36] G. Venkatesh Iyengar and R. Wayne Wolf, *Fresenius J. Anal. Chem.* **352**, 35-39, 1995.
- [37] D.L. Anderson, R.G. DOWNING and G.V. IYENGAR *Fresenius J. Anal. Chem.* **352**, 107-110, 1995.
- [38] J.K. TAYLOR, *Anal. Chem.* **55**, 600A, 602A, 604A, 608A, 1983.
- [39] I. KOLTHOFF, U.A. STENGER. "Volumetric Analysis" 2<sup>nd</sup> revised ed., Interscience: New York, vol 1, pag. 143, 1942.
- [40] D.A. SKOOG, D.M. WEST, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 3<sup>rd</sup> ed., Holt Rinehart and Winston, pag. 48, New York, 1976.
- [41] D.A. SKOOG, D.M. WEST, *Fundamentals of Analytical Chemistry* 3<sup>rd</sup> ed., Holt Rinehart and Winston. pag. 59. Fig. 3.1. New York, 1976.
- [42] J.D. WINEFORDNER, *Trace Analysis: Spectroscopic methods for elements*, pag. 33, Wiley Interscience, New York, 1976.
- [43] W.J. YOUNG, *Anal. Chem.* **19**, 946-950, 1947.
- [44] W.J. YOUNG, *Biometrics* **B**, 61, 1947.
- [45] W.J. YOUNG, *Matter. Res. Stand.*, 268-271, 1961.
- [46] J.F. TYSON, *Analyst*, **109**, 313-317, 1984.
- [47] L. Cuadros, A. Garcia Campaña, F.Ales Barrero, C. Jimenez and M.Román Ceba. *J. of AOAC.* en prensa.
- [48] L. Pszowicki and A. Lukszo Bienkowska, *Talanta*, **24**, 617, 1977.
- [49] M. Cardone, *Anal. Chem.*, **58**, 438, 1986.
- [50] R.Ferrús and F. Torrades, *Anal. Chem.* **60**, 1282, 1988.



## BIBLIOGRAFÍA

### CAPÍTULO III

- [1] D.E. Ryan, *Analyst*, **85**, 569, 1960
- [2] U. Priyadarshini and S.G. Tandon, *Anal. Chem.* **33**, 435, 1961
- [3] R.M. Smith and A.E. Martell, "*Critical Stability Constants*" vol. A: *Inorganic Complexes*, Plenum Press, New York 1976
- [4] L.I.R. Snyder, J.L. Glajch and J.J. Kirkland, "*Practical HPLC Method Development*", John Wiley and Sons, New York, 1988
- [5] X. Rius, "*Avances en Quimiometría Práctica*", Cap. 4. Universidad de Santiago de Compostela, Secretariado de publicaciones, 1994
- [6] G. Bagur, D. Gázquez and M. Sánchez, *Anal. Lett.*, **26**, 125, 1993
- [7] E. Berman in "*Toxic Metals and Their Analysis*", ed. L. Thomas, Heyden, London, 1980, ch. 30
- [8] C.A. Wilson, E.P. Ferrero and H.J. Coleman, "*Crude Oil-spill Research, An Investigation and Evaluation of Analytical Techniques*", Bureau of Mines, Washington, Dc, Report 8024, 1975.

### CAPÍTULO IV

- [1] O.A. Vita, W.A. Levier and E. Litterae, *Anal. Chim. Acta*, **42**, 87, 1968.
- [2] J.J. Stracham and S.N. Deming, *Anal. Chem.*, **54**, 1540, 1982.
- [3] L.I.R. Snyder, J.L. Glajch and J.J. Kirkland, "*Practical HPLC Method Development*", John Wiley and Sons, New York, 1988
- [4] M. Sánchez, D. Gázquez and P. Garcia, *Talanta*, **38**, 747, 1991.



## BIBLIOGRAFÍA

---

### CAPITULO V

- [1] L. Cuadros, A. Garcia Campaña, F.Ales Barrero, C. Jimenez and M.Román Ceba. J. of AOAC. en prensa.

### CAPITULO VI

- [1] F. Capitán, D. Gázquez, M. Sánchez and L.F. Capitán-Vallvey, Analyst, 109, 947, 1984.

- [2] F. Capitán, M. Sánchez, D. Gázquez and L.F. Capitán-Vallvey, Ann. Chim. (Rome), 75, 433, 1985.