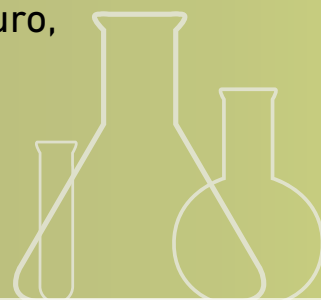


4030UY

Determinación de Aniones Inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales



Método Cromatografía Iónica (HPLC)

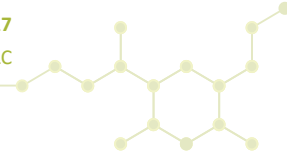
Elaborado - G. Medina

Modificado - V. Muñoz

Revisado - A. Mangarelli, Jefe Sección Instrumental

Aprobado - N. Barboza, Director División Laboratorio Ambiental





1. APLICACIÓN

- 1.1. Esta normativa técnica se utiliza para la determinación de aniones inorgánicos: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato en aguas naturales y efluentes industriales.
- 1.2. Los límites de detección de éste método son fluoruro 0,05 mg/L, nitrato 0,1 mg/L, fosfato 0,6 mg/L, cloruro 0,01 mg/L y sulfato 0,2 mg/L. Los límites de cuantificación son fluoruro 0,2 mg/L, nitrato 0,5 mg/L, fosfato 0,9 mg/L, cloruro 0,06 mg/L y sulfato 1,1 mg/L. Para el caso de efluentes industriales, los límites estarán determinados según la matriz.

2. REFERENCIAS

- 2.1. Manual de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.2. Manual de Gestión de Calidad – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.3. Manual de Control de Calidad Analítico – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.4. Carpeta de mantenimiento y control de equipos – Laboratorio Ambiental DINAMA
- 2.5. Procedimiento: “Determinación de pH en aguas naturales y efluentes líquidos.” (1017UY)
- 2.6. Instructivo de uso del HPLC Shimadzu (INE 45)
- 2.7. Instructivo de uso de balanza de plato abierto Precisa, de resolución 0,001 g (INE 06).
- 2.8. Instructivo de uso de balanza analítica Sartorius, de resolución 0,00001 g (INE 07).
- 2.9. Instructivo de uso de agua Milli Q (INE 28)
- 2.10. Instructivo de uso de baño con ultrasonido Branson Modelo 3510 (INE 69)
- 2.11. Instructivo de uso de pHmetro INE 10, INE 25 e INE 98
- 2.12. Ruta de análisis (RIN 02)
- 2.13. Planilla “Planilla de Datos de Preparación de estándares” (RIN 13)

3. RESUMEN DEL MÉTODO

- 3.1. Los aniones de interés son separados según su afinidad en una columna de intercambio aniónico, en un cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC). La detección se realiza con un detector de conductividad. La identificación de los aniones de interés se realiza comparando los tiempos de retención en el cromatograma, con el de los estándares respectivos inyectados en la misma serie de análisis, y la cuantificación por medio de una curva de calibración de área o altura de pico cromatográfico en función de la concentración.

4. PRECAUCIONES DE SEGURIDAD

- 4.1. Usar túnica, guantes y lentes de seguridad.
- 4.2. El agregado de metanol para la preparación en los reactivos debe realizarse bajo campana de extracción de gases.

5. INTERFERENCIAS

- 5.1. Cualquier sustancia cuyo tiempo de retención coincida con el de algún ión a determinar y produzca señal en el detector será una interferencia. Por ejemplo altas concentraciones de ácidos orgánicos de bajo peso molecular pueden interferir con la determinación de fluoruro y cloruro.
- 5.2. Altas concentraciones de cualquiera de los iones a determinar, puede interferir con la determinación de un ión cuyo tiempo de retención sea cercano.

6. MUESTREO Y PRESERVACIÓN DE LA MUESTRA

- 6.1. Recolectar la muestra en frasco de polietileno o polipropileno de 0,5 L de capacidad de cierre hermético o en bolsa de muestreo de líquido de plástico descartable. Si se va a determinar nitrato y/o fosfato, el frasco debe ser lavado sin detergente y se debe realizar el análisis tan pronto como sea posible (48 horas) manteniendo la muestra a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Para la determinación de sulfato, fluoruro y cloruro, el tiempo de análisis es de hasta 28 días manteniendo la muestra a $\leq 6\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($> 0\text{ }^{\circ}\text{C}$).

7. INSTRUMENTAL Y MATERIALES

- 7.1. Cromatógrafo líquido de alta performance, marca Shimadzu (INE 45), compuesto por:
 - Bomba pistón (LC-10AT)
 - Horno para Columna (CTO-10A)
 - Inyector con loop de 100 µL
 - Detector de conductividad (CDD-6A)
 - Precolumna (opcional) y columna aniónica tipo Hamilton PRP-X100, tamaño de partícula 10 µm, diámetro interno 4,1 mm, largo 15 cm ó equivalente.
- 7.2. Equipo de ultrasonido para desgasificar el eluente o método de desgasificación equivalente.
- 7.3. Balanza analítica de precisión de al menos 0,1 mg.
- 7.4. Analizador de iones.
- 7.5. Equipo para filtración a vacío: bomba de vacío, trampa de agua, kitasato receptor del filtrado y portafiltro. Alternativamente pueden ser usadas jeringas con filtro de cartucho Sartorius Minisart o similar, con tamaño de poro de 0,45 µm
- 7.6. Filtros de 0,45 µm de tamaño de poro.
- 7.7. Erlenmeyer de 1000 ó 2000 mL.
- 7.8. Agitador magnético y barras agitadoras.
- 7.9. Micropipetas automáticas de volumen variable.
- 7.10. Tubos descartables de plástico con tapa de 10 mL y 50 mL de capacidad.
- 7.11. Jeringa de 250 µL de vidrio, marca SGE o similar.

8. REACTIVOS

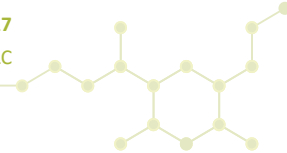
- 8.1. Agua grado 1 (según ISO 3696 en su versión vigente).
- 8.2. Solución stock de eluente concentrado: disolver 2.75 g de ácido p-hidroxibenzoico (C₇H₆O₃ Nro. CAS 99-96-7 PA) en 125 mL de metanol (CH₄O Nro. CAS 67-56-1 calidad HPLC), diluir a 1000 mL con agua HPLC. Almacenar a ≤ 6 °C (> 0 °C) hasta 3 meses.
- 8.3. Soluciones buffer de pH 4, 7 y 10 para la calibración del electrodo.
- 8.4. Soluciones stock de estándares, 1000 mg/L: Secar hasta peso constante a 105 °C las sales indicadas en la tabla adjunta, pesar con precisión de 0,1 mg lo indicado en la siguiente tabla, y diluir por peso con agua HPLC a 50 mL en tubo de plástico de 50 mL. Preservar a ≤ 6 °C (> 0 °C), hasta 6 meses. Alternativamente utilizar soluciones estándares comerciales. Los valores indicados a continuación son como guía para la preparación del estándar, el valor real debe ser registrado en la planilla RIN 13 "Planilla de Datos de Preparación de estándares".

Anión	Sal	Peso (g)
Fluoruro	KF Nro. CAS 7789-23-3	0,1529
Cloruro	NaCl Nro. CAS 7647-14-5	0,0824
Nitrato	NaNO ₃ Nro. CAS 7631-99-4	0,0685
Fosfato	KH ₂ PO ₄ Nro. CAS 7778-77-0	0,0716
Sulfato	K ₂ SO ₄ Nro. CAS 7778-80-5	0,0910

Nota 1: Salvo que se especifique, se debe emplear reactivos para análisis (PA), que son aquellos cuyo contenido en impurezas no rebasa el número mínimo de sustancias determinables por el método que se utilice.

9. PRECAUCIONES PARA LA OPERACIÓN

- 9.1. Las determinaciones en aguas de lluvia son a niveles de trazas, por lo que hay que extremar cuidados para evitar la contaminación.
- 9.2. Todo el material de plástico debe ser en lo posible descartable.
- 9.3. El resto del material debe ser lavado por enjuague con agua HPLC sin utilizar ácidos ni detergentes. En caso



de contener material sólido adherido usar solventes orgánicos para removerlos y luego enjuagar tres veces con agua HPLC.

- 9.4. Las muestras deben filtrarse en el sector destinado para aniones. Tener en cuenta la posibilidad de contaminación cruzada en caso de trabajar en zonas de tratamiento de muestras, donde se utilizan ácidos fuertes.
- 9.5. La fase móvil debe filtrarse con filtro membrana de 0,45 μm de tamaño de poro y desairearse previo a su introducción en el HPLC.
- 9.6. Las muestras deben filtrarse con filtro membrana de 0,45 μm de tamaño de poro, previo a su introducción en el HPLC.
- 9.7. Mantener especial cuidado con la contaminación de muestras, reactivos, o material dentro del laboratorio, especialmente con muestras digeridas para metales.
- 9.8. Es recomendable identificar las columnas según la matriz analizada.

10. CALIBRACIÓN DEL MÉTODO

- 10.1. Preparar por lo menos 3 soluciones estándares conteniendo mezcla de los aniones que se quieren determinar por dilución de la solución stock de estándares con agua HPLC. Por ejemplo para aguas de lluvia realizar una curva entre 0,1 y 2 mg/L, y para efluentes industriales entre 0,5 y 10 mg/L. Realizar un estándar con la menor concentración de interés para cada anión.

Nota 2: La preparación de los estándares y de la dilución de las muestras debe hacerse en la balanza analítica de precisión 0,1 mg. Se considera la densidad de las soluciones 1 g/mL debiendo corregir en los cálculos correspondientes en caso que no se cumpla.

- 10.2. Inyectar los estándares en el loop de 100 μL con la jeringa de 250 μL completamente cargada, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Identificar el pico correspondiente a cada anión y realizar la gráfica de área o altura del pico en función de la concentración en mg/L para cada anión.
- 10.3. El orden de elución de los aniones, es el siguiente: fluoruro, cloruro, nitrato, fosfato y sulfato.
En caso de dudas en la identificación de los picos preparar estándares para cada anión por separado para establecer los tiempos de retención correspondientes.
- 10.4. Por cada serie de aproximadamente 10 muestras inyectar un estándar para detectar posibles cambios de sensibilidad o corrimientos en los tiempos de retención.

11. ANÁLISIS DE LA MUESTRA

11.1. Operaciones previas

- 11.1.1. Preparación del eluente o fase móvil: diluir 5 veces la solución stock concentrada con agua HPLC, ajustar el pH entre 8,55 y 8,61 con hidróxido de sodio (NaOH) 1 N (aproximadamente 5 mL por litro de fase móvil). Filtrar por vacío con filtro de 0,45 μm . Con el vacío conectado desgasificar por lo menos durante 15 min en ultrasonido, hasta no detectar visualmente burbujas de aire en la solución.

11.1.2. Encendido y estabilización del equipo:

Seguir las instrucciones de operación indicadas en el equipo para encendido y manejo del mismo. Ajustar a las siguientes condiciones operativas:

T horno de columna = 40 °C

T detector = 43 °C

Ganancia del Detector = 1,0 (el equipo podrá ser utilizado con ganancia 0,1 siempre y cuando la matriz de la muestra lo permita)

Flujo = 2,0 mL/min

P máx. = a la presión máxima que admite la columna según los datos del fabricante, 1500 psi para la columna utilizada según este procedimiento.

Polaridad: +

- 11.1.3. Estabilizar el equipo circulando fase móvil por el sistema hasta que la línea de base no derive más de 1000 mV/min. Este parámetro se chequea desde el software con el test del "slope". El tiempo de estabilización es de aproximadamente 45 min y depende de la ganancia del detector seleccionada.

- 11.2. Filtrar las muestras para eliminar partículas por filtro con 0,45 µm de tamaño de poro.
- 11.3. Inyectar las muestras en el loop de 100 µL con el inyector en posición "LOAD", con una jeringa de 250 µL, para asegurar el loop lleno y el enjuague del mismo. Una vez cargado el loop, correr el inyector hasta la posición INYECT.
- 11.4. Si el área de cada anión de interés está en el rango de la curva de calibración correspondiente pasar al punto 12.4. Si el área de algún anión es mayor al mayor punto de la curva de calibración para ese anión proceder a diluir la muestra con agua HPLC o alternatively realizar estándares de mayor concentración, teniendo en cuenta el rango lineal.
- 11.5. Si la línea de base de la muestra es muy inestable, por ejemplo por la presencia de altas concentraciones de aniones orgánicos que hacen dudar de la cuantificación de algún anión (especialmente cloruro y fluoruro) verificar su concentración por dilución o por adición de una cantidad conocida del anión de interés.
- 11.6. Luego de finalizado el análisis: apagar el horno y el detector; enjuagar el sistema dejando circular la fase móvil hasta que alcance temperatura ambiente y luego apagar la bomba, según INE 45.

12. ANÁLISIS DE DATOS

- 12.1. Calcular la concentración de cada solución utilizada en la curva de calibración teniendo en cuenta la toma, el volumen final y la concentración de la solución stock de estándares.
- 12.2. Graficar el área o altura de cada ión en particular, en función de la concentración calculada en 13.1. La curva de mejor ajuste corresponde a una recta.
- 12.3. Calcular la concentración de cada anión en mg/L interpolando en la curva de calibración correspondiente (área o altura en función de la concentración).

$$X, \text{ mg/L} = \frac{(A - O) \times FD}{P}$$

donde:

X: corresponde a la concentración del anión de interés

A: corresponde al área o altura del pico del anión de interés en la muestra

P: corresponde a la pendiente de la curva de calibración

O: corresponde a la ordenada en el origen de la curva de calibración

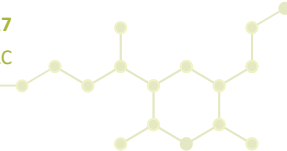
FD: corresponde al factor de dilución de la muestra

- 12.4. Si el área o altura del pico cromatográfico para cada anión de interés en la muestra está en el rango de la curva de calibración y cumple con los requisitos de calidad establecidos, informar el valor obtenido.
- 12.5. Si el área o altura del pico cromatográfico del anión de interés de la muestra no diluida, es menor al menor punto de estándares de la curva de calibración, informar como menor que el límite de cuantificación del anión (referencia: "Manual de Control de Calidad Analítico", Determinación del Límite de Detección y Cuantificación).

Nota 3: Cuando, por las características de la muestra se presentan dudas sobre la identidad de algún pico se fortifica la muestra problema con un estándar del analito en cuestión, aproximadamente en el rango medio de la escala de medida para identificar posibles interferencias.

13. CONTROL DE CALIDAD ANALÍTICO

- 13.1. **Control de la exactitud:** analizar un material de referencia certificado externo simultáneamente con el set de muestras. Se compara el resultado con su valor de referencia y límites de aceptación según el gráfico de control correspondiente. Cuando el resultado no se encuentre dentro del rango de los límites, se debe revisar el procedimiento y evaluar la repetición del análisis.
- 13.2. **Control de la precisión:** se debe realizar el análisis por duplicado como mínimo una cada cinco muestras. Verificar que la dispersión de los duplicados sea menor a un RSD de 10 %, de lo contrario se debe revisar el procedimiento y evaluar repetir el análisis.



14. BIBLIOGRAFÍA

- 14.1. American Public Health Association (APHA) (2012). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd edition APHA, AWWA, WEF, Washington, DC. Método 4110 A Determination of anions by ion chromatography y 4110 C Single Column ion chromatography with direct conductivity detection pp.4-5 y 4-8 a 4-9.
- 14.2. Manual de Columna PRP x 100 Hamilton.