

Químicas
389
T.D



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA

***GENERALIZACIÓN DEL MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR
DEL PUNTO H (HPSAM): ELIMINACIÓN DE INTERFERENCIAS
ESPECTRALES CONOCIDAS O DESCONOCIDAS Y
OPTIMIZACIÓN DE LAS SEÑALES ANALÍTICAS.***



Memoria presentada por
JORGE VERDÚ ANDRÉS
para alcanzar el grado de
Doctor

49 de Registro de Facultad

UMI Number: U607179

All rights reserved

INFORMATION TO ALL USERS

The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted.

In the unlikely event that the author did not send a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if material had to be removed, a note will indicate the deletion.



UMI U607179

Published by ProQuest LLC 2014. Copyright in the Dissertation held by the Author.
Microform Edition © ProQuest LLC.

All rights reserved. This work is protected against
unauthorized copying under Title 17, United States Code.



ProQuest LLC
789 East Eisenhower Parkway
P.O. Box 1346
Ann Arbor, MI 48106-1346

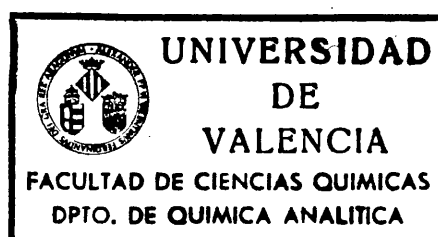


UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
FACULTAT DE QUÍMICA
DEPARTAMENT DE QUÍMICA ANALÍTICA
c/. Dr. Moliner, 50
46100-Burjassot (València)

FRANCISCO BOSCH REIG, Catedrático de Universidad, y PILAR CAMPÍNS
FALCÓ, Profesora Titular, del Departamento de Química Analítica de la Facultad de
Química de la Universitat de València,

CERTIFICAN: que la Tesis Doctoral "*Generalización del método de adición estándar
del punto H (HPSAM): eliminación de interferencias espectrales
conocidas o desconocidas y optimización de las señales analíticas*",
cuya memoria se adjunta, ha sido desarrollada bajo su dirección en el
Departamento de Química Analítica de la Facultad de Química de la
Universitat de València por D. Jorge Verdú Andrés.

Lo que certifican a los efectos oportunos en Burjassot, a 29 de mayo de 1995.



ÍNDICE

1.- Introducción:.....	3
1.1.- Calibración univariada: detección y eliminación de errores sistemáticos.....	9
1.2.- Calibración multivariada:.....	20
1.2.1.- Interferente(s) conocido(s).....	22
1.2.2.- Interferente(s) modelado(s).....	32
1.2.3.- Interferente(s) desconocido(s).....	35
2.- Discusión sobre el estado actual del tema y objetivos.....	41
3.- Reactivos e instrumentos.....	49
3.1- Reactivos.....	51
3.2- Instrumentos.....	52
4.- Método de Adición Estándar del Punto H: Fundamentos teóricos y aplicaciones.....	55
4.1.- Resolución de muestras con interferentes conocidos.....	57
4.1.1.- Mezclas binarias.....	59
4.1.1.1.- Adición simple de analito, utilizando señales analíticas o incrementos de señales analíticas.....	62
4.1.1.1.1.- Fundamentos teóricos.....	62
4.1.1.1.2.- Significado del punto H.....	68
4.1.1.1.3.- Estudio espectrofotométrico de diferentes mezclas binarias con espectros parcial o totalmente solapados.....	73
4.1.1.1.4.- Determinación espectrofotométrica de fenol y <i>o</i> -cresol.....	97
4.1.1.1.5.- Estudio espectrofluorimétrico de mezclas fenol/ <i>o</i> -cresol.....	100
4.1.1.1.6.- Conclusiones.....	105
4.1.1.2.- Doble adición de analito.....	107
4.1.1.2.1.- Fundamentos teóricos.....	109
4.1.1.2.2.- Estudio de diferentes mezclas fenol/ <i>o</i> -cresol.....	111
4.1.1.2.3.- Conclusiones.....	120
4.1.1.3.- Aplicación a sistemas dinámicos: CLAR.....	122
4.1.1.3.1.- Fundamentos teóricos.....	124

4.1.1.3.2.- Determinación cromatográfica de fenol y cresoles con detección espectrofotométrica o fluorimétrica.....	128
4.1.1.3.3.- Conclusiones.....	143
4.1.2.- Determinaciones analíticas que utilizan blancos absorbentes.....	145
4.1.2.1.- Fundamentos teóricos.....	148
4.1.2.2.- Estudio de diversas determinaciones que utilizan blancos absorbentes.....	153
4.1.2.3.- Conclusiones.....	176
4.1.3.- Mezclasternarias.....	177
4.1.3.1.- Fundamentos teóricos.....	179
4.1.3.2.- Estudio de diferentes mezclas fenólicas.....	184
4.1.3.3.- Conclusiones.....	191
4.2- Resolución de muestras con interferentes desconocidos.....	193
4.2.1.- Interferente lineal desconocido en el máximo del analito.....	197
4.2.1.1.- Fundamentos teóricos.....	199
4.2.1.2.- Eliminación de la absorbancia irrelevante desconocida.....	209
4.2.1.3.- Determinación de analito en presencia de interferentes lineales desconocidos en el máximo de absorción del analito.....	218
4.2.1.4.- Conclusiones.....	227
4.2.2.- Interferente lineal desconocido en cualquier zona del espectro: método de adición estándar generalizado del punto H, GHPSAM.....	229
4.2.2.1.- Fundamentos teóricos.....	231
4.2.2.2.- Resolución de diferentes muestras.....	238
4.2.2.3.- Conclusiones.....	245
5.- Conclusiones generales.....	247
6.- Referencias.....	255

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN.

La Química Analítica es la Ciencia Metrológica Química cuya misión fundamental es la generación de información cualitativa, cuantitativa y estructural sobre cualquier tipo de materia o sistema (proceso). Sus objetivos genéricos actualmente se pueden resumir en la obtención de más cantidad y calidad de información utilizando cada vez menos material, medios y esfuerzo, con menores costes y riesgo. Así pues, la calidad de la información generada es un objetivo prioritario de la Química Analítica de hoy y mañana [Valcárcel,92].

Para que un resultado experimental sea válido, un requisito que debe cumplir es el haber sido obtenido a partir de un proceso de medida controlado. Los trabajos de Eisenhart [Eisenhart,63] y Wilson [Wilson,70] señalan la necesidad de distinguir entre un "método de medida" y un "proceso de medida". El primero puede variar en especificidad, desde un procedimiento general tal como el análisis por absorción atómica, hasta una serie de instrucciones detalladas para la determinación de un elemento concreto en una muestra particular. El segundo es su límite ideal e implica un control suficiente de las variables asociadas con un método dado de análisis. La palabra "control" significa que las características de la estructura del proceso estén fijadas, es decir, que la imprecisión y el error sistemático se conozcan.

Un diagrama esquemático del proceso de medida químico, *PMQ*, sería el de la figura 1. En él aparecen los pasos de los que consta y los aspectos críticos de cada uno de ellos.

Centrándonos en la medida y evaluación, señalar que toda medida física está sujeta a un grado de incertidumbre que, en el mejor de los casos, sólo puede ser reducido a un nivel aceptable. Toda medición implica un conjunto de tres componentes: el sistema del cual se mide alguna propiedad, el instrumento de medida y una persona que puede denominarse observador u operador. Los errores se originan en los tres componentes del conjunto, con magnitudes variables que dependen del análisis, la composición de la muestra y otros factores.



Figura 1: Pasos de los que consta un proceso de medida químico, PMQ.

Los pasos que preceden a la determinación propiamente dicha (muestreo, preparación de la muestra, separación de sustancias que interfieren) pueden ser muy complejos en el análisis aplicado e introducir errores mayores que los de la medición final. El proceso de calibración es esencial para un resultado analítico, ya que, junto al muestreo, es causa de errores sistemáticos importantes.

Por tanto, la inexactitud va a depender de todos estos errores, y aunque el error total e_t , diferencia entre el valor verdadero x_v y su estimación x , es desconocido, deberá ser posible dar límites útiles para tal error, suma de dos componentes: error sistemático, e_s , y error aleatorio, e_a .

Toda vez que un método de análisis cumpla los requisitos de un proceso de medida químico, es útil considerar algunas características del método, tales como sensibilidad, selectividad, límite de detección, precisión y exactitud.

La sensibilidad en el contexto del análisis instrumental viene caracterizada por la pendiente de la recta de calibrado.

La selectividad es la fracción de la señal debida exclusivamente al analito y es un valor adimensional comprendido entre 0 y 1. Cuando el valor es nulo, el análisis es imposible. Cuando el valor es la unidad, no existen interferencias directas de ningún tipo.

El límite de detección es el menor valor de concentración dentro del método de análisis que permite afirmar que dicha concentración no es nula.

La precisión se puede definir como la concordancia de los distintos valores obtenidos al realizar una serie de medidas repetitivas e independientes unas de otras bajo condiciones específicas. La "International Organization for Standardization", *ISO*, en su definición de repetitibilidad (repeatability) establece que se obtengan resultados de ensayos mutuamente independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar en el mismo laboratorio, con el mismo equipamiento y por el mismo operador en un intervalo corto de tiempo. La repetitibilidad se acepta como una medida de varianza interna, y refleja la precisión máxima que se puede obtener con un cierto método. Las condiciones establecidas para la reproducibilidad indican que se obtengan resultados de ensayos independientes mediante el mismo método aplicado a la muestra a analizar en diferentes condiciones tales como diferentes laboratorios, diferentes equipamientos o distintos operadores. En el *vocabulario internacional de metrología* se exponen hasta seis tipos distintos de factores que pueden cambiarse, acompañados de las especificaciones que se deben de cumplir para que la dispersión de los datos obtenidos sea una medida cuantitativa de reproducibilidad. Entre estas características se especifican, p. ej., la reproducibilidad entre días, entre laboratorios o entre analistas.

La exactitud es definida por la *ISO* como el grado de concordancia entre el resultado de una medida y el valor verdadero de la cantidad que se ha medido. Se expresa en términos de error absoluto o relativo, definiendo el error sistemático. El problema está, evidentemente, en conocer con fiabilidad el valor verdadero. De acuerdo con [Griepink, 90], existen tres caminos para conseguir la exactitud de un método analítico:

1.-INTRODUCCIÓN

- Por comparación con otro método que se considera como de referencia.
- Por comparación con otros laboratorios (ejercicios de intercomparación).
- Empleando materiales de referencia certificados.

Para un laboratorio, de estas tres posibilidades, la primera es relativamente arriesgada y costosa, porque exige un personal preparado, trabajando con los medios apropiados y siguiendo estrictamente los programas de calidad, sin que ello asegure la eliminación de fuentes de errores sistemáticos ya existentes. La segunda posibilidad también es costosa y lenta, necesiéndose la participación de otros muchos laboratorios que hayan demostrado trabajar bajo normas de calidad. El empleo de materiales de referencia certificados, siempre que existan comercialmente, constituye la opción más simple para estimar la exactitud de un método analítico y detectar fácilmente fuentes de errores sistemáticos. Si bien estas tres posibilidades están consensuadas, existen planteadas otras que también pueden servir para caracterizar la exactitud de un resultado.

Según Cardone [Cardone,83A,83B], las fuentes de errores sistemáticos se pueden clasificar en cuatro grupos:

- Errores constantes.
- Errores proporcionales.
- Errores en el proceso de calibración y en la calibración del sistema.
- Presencia de interferentes directos.

Los dos primeros tipos de error son detectables por técnicas estadísticas, y se les pueden aplicar técnicas de cálculo correctivas. Son lo que denomina *errores corregibles*.

Los errores en el proceso de calibración, en la calibración del sistema y los debidos a la presencia de interferentes directos no son detectables y cuantificables por métodos estadísticos. A estos errores los denomina *errores incorregibles*.

1.1.- CALIBRACIÓN UNIVARIADA: DETECCIÓN Y ELIMINACIÓN DE ERRORES SISTEMÁTICOS.

El error sistemático constante es debido a una respuesta relativa significativa, positiva o negativa, y no atribuible al analito, que puede ser medida directamente, o ser relacionada matemáticamente con una concentración nula de muestra, debida a la matriz de la muestra. También puede ser debida a una propiedad físico-química del sistema de medida, y que es independiente de la cantidad de muestra tomada.

El error proporcional es debido a un cambio relativo significativo en la respuesta del analito por unidad de concentración ($\frac{\Delta R}{\Delta C}$), positivo o negativo, atribuible a parámetros

del sistema de medida, procedimiento o método. El cambio de magnitud se mantiene constante a todos los niveles de concentración de interés de analito.

Ejemplos de error constante son el error negativo debido a la pérdida por solubilidad en una gravimetría, y el error positivo debido a absorciones extrañas en espectrofotometría. Un ejemplo de error proporcional es la recuperación incompleta en un proceso de extracción ineficaz.

En la figura 2 se muestran gráficamente la detección de estos tipos de errores corregibles, en relación con la ordenada en el origen y la pendiente de la recta obtenida representando valores añadidos frente a valores encontrados [Miller,93].

La medida directa del error constante en una muestra es conocida normalmente como medida del blanco. El blanco está considerado como parte integrante de una técnica de medida, su respuesta se cancela físicamente o se sustrae algebraicamente de las señales de patrones y muestras. El blanco, denominado blanco reactivo, blanco químico o blanco analítico, es la respuesta de una disolución que contiene todos los constituyentes de la muestra, excepto el analito, y que ha sufrido el proceso entero de análisis de la muestra.

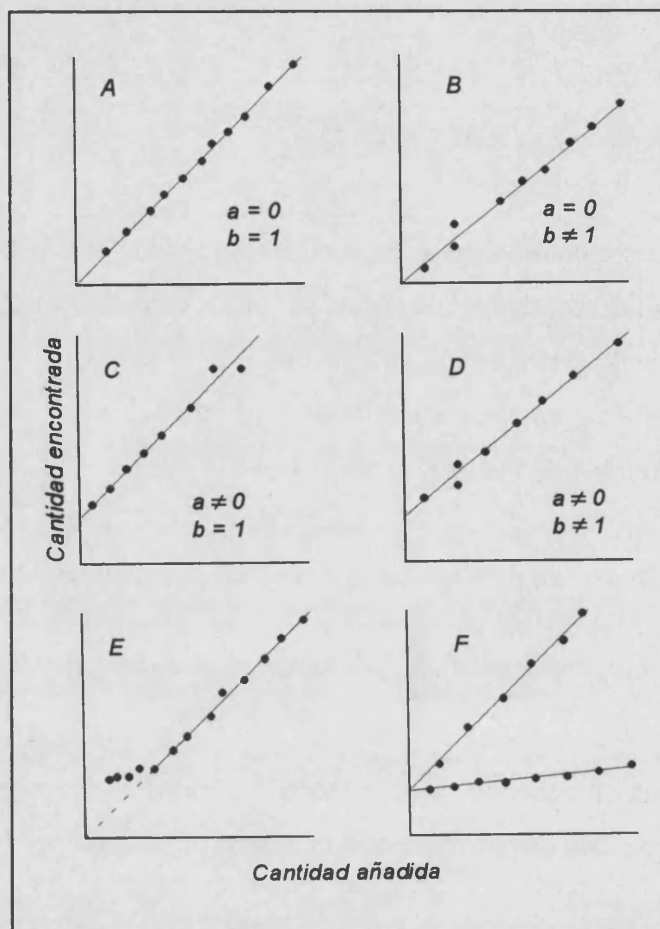


Figura 2: Caracterización de errores corregibles: A) sin errores; B) error sistemático constante; C) error proporcional; D) errores sistemáticos constante y proporcional; E) y F) otros tipos de error, F) debido a problemas de especiación.

Este blanco químico recoge todas las señales debidas a aspectos externos al analito, como reactivos, aparatos, medio ambiente y matriz. A este blanco se le denomina *blanco del método (MB)* [Cardone, 85, 86A, 86B, 87; Ferrús, 87, 88]. La gran dificultad de usar este blanco estriba en encontrar una composición lo más parecida posible a la de la matriz del problema.

Se define como *blanco del sistema (SB)* a la ordenada en el origen de la curva de calibrado con patrones, donde no hay matriz presente. Su obtención se representa en la figura 3. La recta de calibrado que se obtiene se ajusta a la ecuación:

$$R_x = SB + m_p \times C_x \quad (1)$$

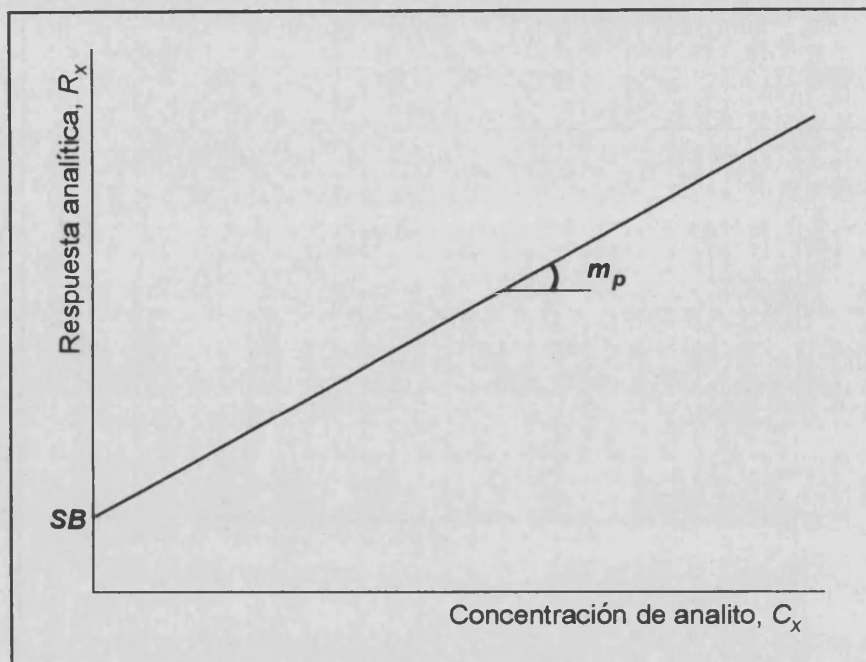


Figura 3: Recta de calibrado obtenida con patrones, y blanco del sistema, SB.

Siendo R_x la respuesta analítica, m_p la pendiente de la recta de calibrado y C_x la concentración de analito.

El verdadero blanco, sin embargo, debe ser determinado cuando tanto la matriz como el analito están presentes. El primero en abordar la solución de este problema fue Youden en 1947 [Youden,47], siendo Cardone [Cardone,85,86A,86B,87; Ferrús,87,88] quien ha generalizado su uso en la actualidad. El método consiste en aplicar la técnica de regresión lineal a los datos obtenidos para distintas porciones de ensayo de la muestra de laboratorio, según se observa en la figura 4. La ordenada en el origen corresponde a lo que se denomina *blanco total de Youden* o *TYB* (total Youden blank). Este es el verdadero blanco de la muestra. La recta de calibrado obtenida es:

$$R_x = TYB + m_s \times C_s \quad (2)$$

Donde m_s es la pendiente de la recta de calibrado señal analítica frente a la concentración de muestra (C_s).

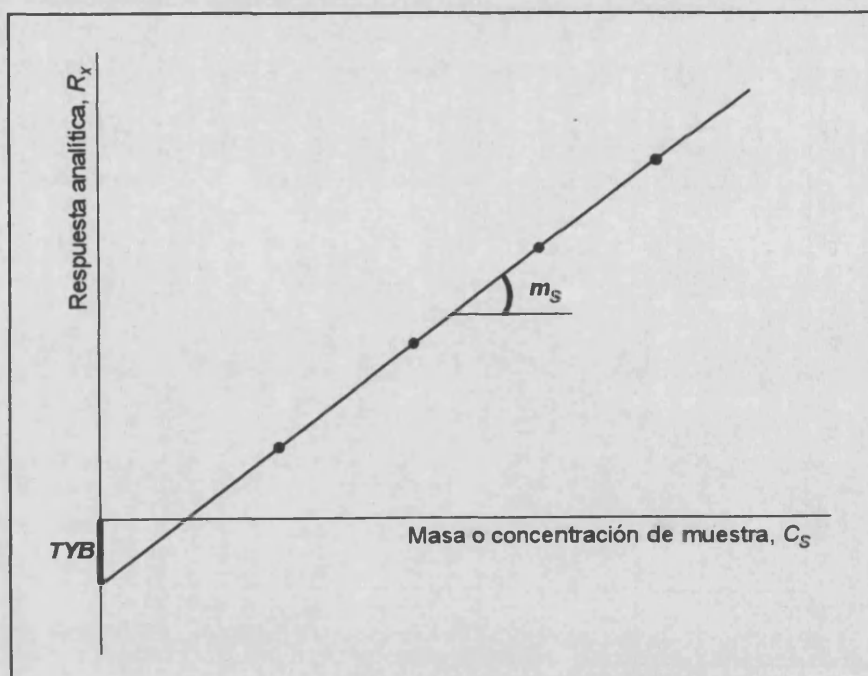


Figura 4: Recta de calibrado obtenida con la muestra de laboratorio y blanco total de Youden, TYB .

Dicho blanco total de Youden, TYB , está compuesto por señales debidas a los no analitos en la muestra y disolvente, al error sistemático en la pendiente, que se traduce en un error de signo contrario en la ordenada en el origen, según señalaron Mandel y Lining [Mandel,57], y, sobretodo, a la señal de interacción analito/matriz. El blanco del sistema, SB , tan solo contiene las señales de los no analitos en el disolvente y el error negativo en la pendiente.

La diferencia entre ambos será debida solamente a la señal de interacción analito/matriz, y se denominará *blanco de Youden* (YB).

Por tanto:

$$TYB - SB = YB \quad (3)$$

El blanco de Youden es de gran utilidad, puesto que denota los errores inherentes a la muestra. Una vez obtenido este parámetro, se debe examinar su consistencia con cero; si no lo es, las medidas deben corregirse, puesto que vienen afectadas de error sistemático constante. La concentración corregida vendrá dada por la expresión:

$$C_x = \frac{(R_x - YB) - SB}{m_p} \quad (4)$$

El error proporcional del método se deriva del hecho de que la pendiente de la recta de calibrado obtenida con patrones difiere de la pendiente de la recta de calibrado en presencia de muestra si existe efecto matriz [Cardone,85,86A,86B,87; Ferrús,87,88; Youden,47; Campíns,88]. El método de adición estándar permite la normalización "in situ" de dicho error.

Dicho método es ampliamente utilizado en Química Analítica para la determinación de especies en muestras en las que los efectos matriz conducen a resultados inexactos si se utiliza la calibración con patrones habitual, y fue propuesto por primera vez por Foster [Foster,35;37]

Si queremos obtener un resultado analítico exento de error sistemático, en el caso ideal utilizaremos un patrón de composición idéntica a la muestra; en el caso que nos ocupa, la matriz se reproduce haciendo entrar la porción de ensayo en la composición del patrón y añadiendo además cantidades conocidas de analito puro, de manera que ahora se tiene en el patrón la matriz propia de la muestra de laboratorio, pero no se conoce la cantidad total de analito.

Varias son las modalidades del método, dependiendo generalmente de la técnica instrumental elegida [Bader,80]:

- variación continua de patrón en un volumen total constante.
- variación continua de patrón y muestra en un volumen total constante.
- adición simple de un volumen variable de patrón.
- volumen total variable con variación continua de patrón.

En la primera modalidad, que es la más utilizada, se preparan distintas disoluciones que contienen un volumen constante de muestra (V_s) y cantidades múltiples (n) de un volumen de patrón (V_p), diluyéndose cada solución a un volumen constante prefijado (V_t). La respuesta analítica vendrá dada por la expresión:

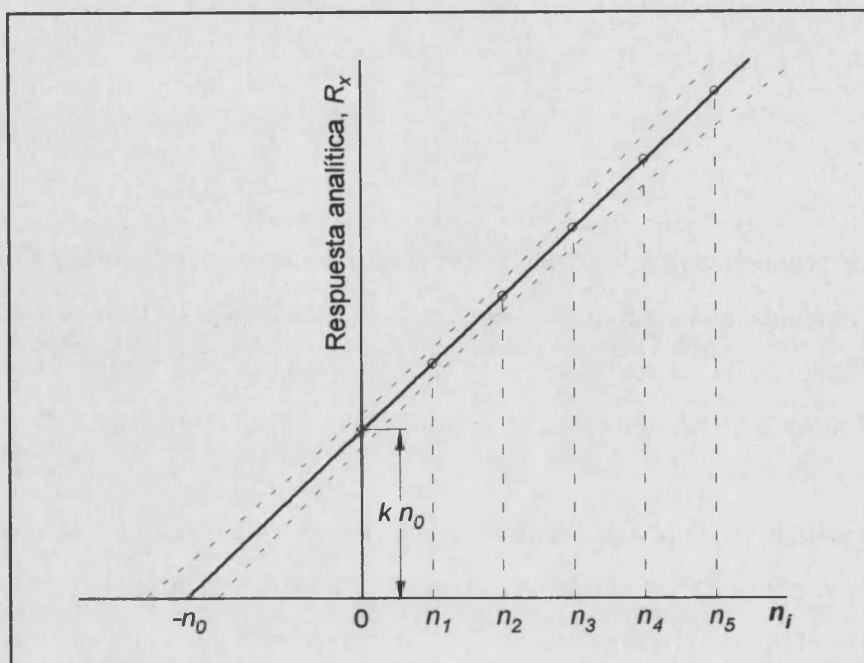


Figura 5: Representación gráfica del método de adición estándar, MOSA.

$$R_n = k \times n_0 + k \times n_i \quad (5)$$

con

$$n_0 = f_x \times C_x \quad (f_x = V_x / V_i) \quad (6)$$

y

$$n_i = f_p \times C_p \times n \quad (f_p = V_p / V_i, \quad n = 0, 1, \dots) \quad (7)$$

Siendo C_x la concentración de analito en la muestra y C_p la concentración de analito de la disolución madre de patrón. Si se representa R_n frente a n_i , figura 5, se obtiene una recta de pendiente k y ordenada en el origen $k \times n_0$, que corresponde a la señal presentada por la concentración de analito en la porción de muestra tomada. La concentración de analito en la primera disolución, que sólo contiene muestra, n_0 , vendrá dada por el punto de abscisa que se encuentra con el eje. Esta cantidad es la que tendríamos que sustraer de la porción de ensayo para tener concentración nula de analito. O sea, que en valor absoluto es la cantidad

buscada. El hecho de que este procedimiento requiera una extrapolación es desfavorable desde el punto de vista del intervalo de confianza del resultado analítico según han señalado diversos autores, aunque esta afirmación no es del todo cierta.

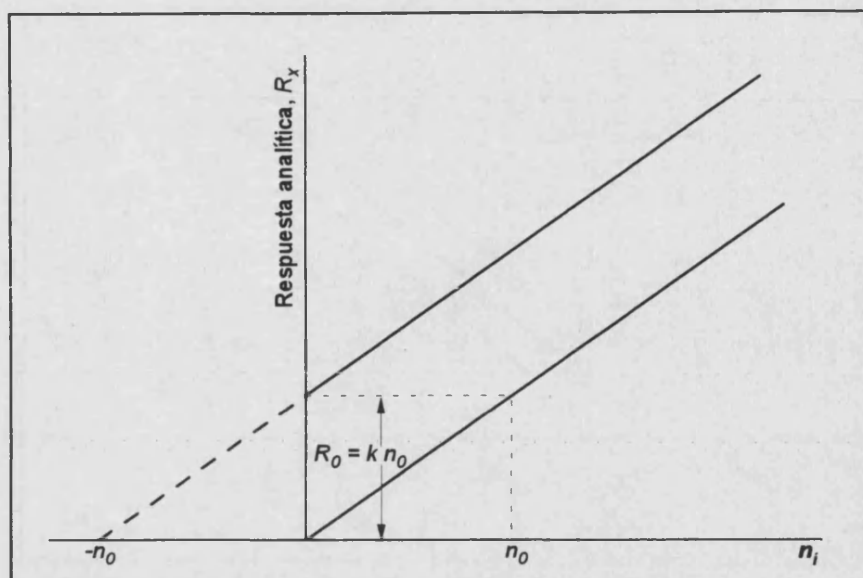


Figura 6: Representación gráfica del método de adición estándar según [Cardone, 86B]

Una representación más coherente con la funcionalidad del método, según señala Cardone [Cardone, 86B], sería la resultante de sustraer el valor de la ordenada en el origen, es decir, de la respuesta para la disolución constituida por el volumen V_x de muestra, de las señales obtenidas para cada adición de analito puro, con lo que obtendríamos la recta de respuesta del analito en la matriz, y entonces el valor incógnita se calcularía como la abcisa de la señal R_0 (figura 6).

También hay que tener en cuenta que la pendiente del método es independiente del tamaño de la adición de la muestra realizada, según ponen de manifiesto distintas investigaciones (figura 7). Para el desarrollo del modelo correcto del método, además de la constancia de la pendiente para los distintos tamaños de muestra tomados, se ha de considerar que en las respuestas analíticas obtenidas está incluido el blanco total de Youden, TYB , puesto que se trabaja con una muestra de laboratorio. En la figura 8, que une la representación de Youden y del método de adición estándar, se muestra la necesidad de esta corrección, y como modifica el resultado obtenido para la concentración incógnita. Por tanto, para obtener resultados válidos al aplicar el método, a las distintas señales analíticas obtenidas se les ha de restar el TYB , y representar entonces frente a la concentración de patrón añadido. Entendido el método de esta forma, lo que se obtiene es una recta de calibrado que tiene en cuenta la interacción analito/matriz, y ello siempre que las distintas adiciones de analito puro no modifiquen demasiado la relación analito/matriz de la muestra. Al utilizar este método se

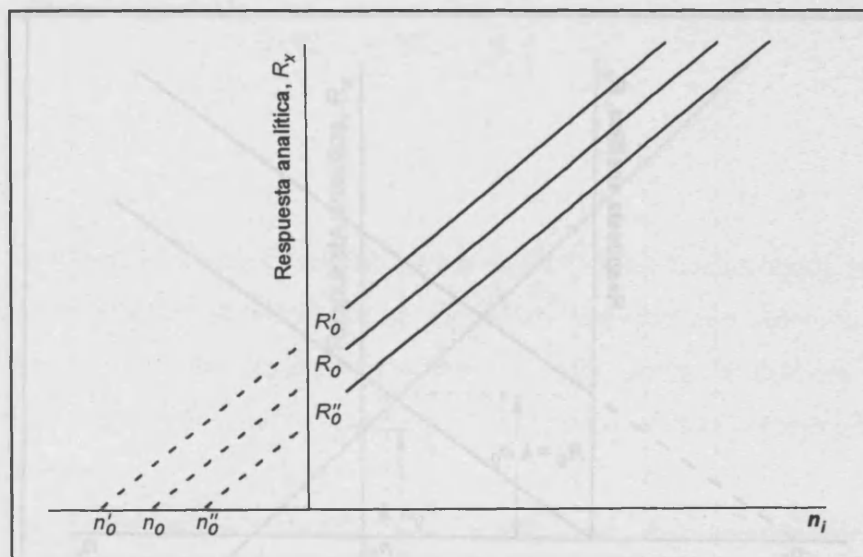


Figura 7: Independencia del valor de la pendiente del método del tamaño de la adición de muestra.

evitan los posibles errores sistemáticos proporcionales de que se vería afectado el resultado si se utilizara una calibración en la que en los patrones no se tuviera en cuenta aquel componente de la matriz que afecta la señal del analito de una forma proporcional.

La influencia del tamaño de la adición sobre la precisión de una medida de adición estándar ha sido tratada por Ratzlaff [Ratzlaff, 79]. El tamaño del incremento debe elegirse de forma que en la medida se mantenga una buena precisión y no se modifiquen las condiciones de la disolución. Los factores que afectan a la elección del tamaño del incremento los estudia considerando la contribución de varios tipos de incertidumbre sobre la función calibrado, agrupando la naturaleza de éstas en tres categorías: independiente, de raíz cuadrada y proporcional.

De este estudio concluye que cuando la relación incremento/analito es significativamente menor que la unidad, los resultados son poco precisos. Si bien la incertidumbre decrece con el aumento de esta relación, también hay que tener en cuenta que una adición grande de patrón puede modificar las condiciones de la disolución y consecuentemente la pendiente de la relación funcional. Este comportamiento no se tiene en cuenta en la valoración de los datos, aunque si ha sido remarcado en la literatura.

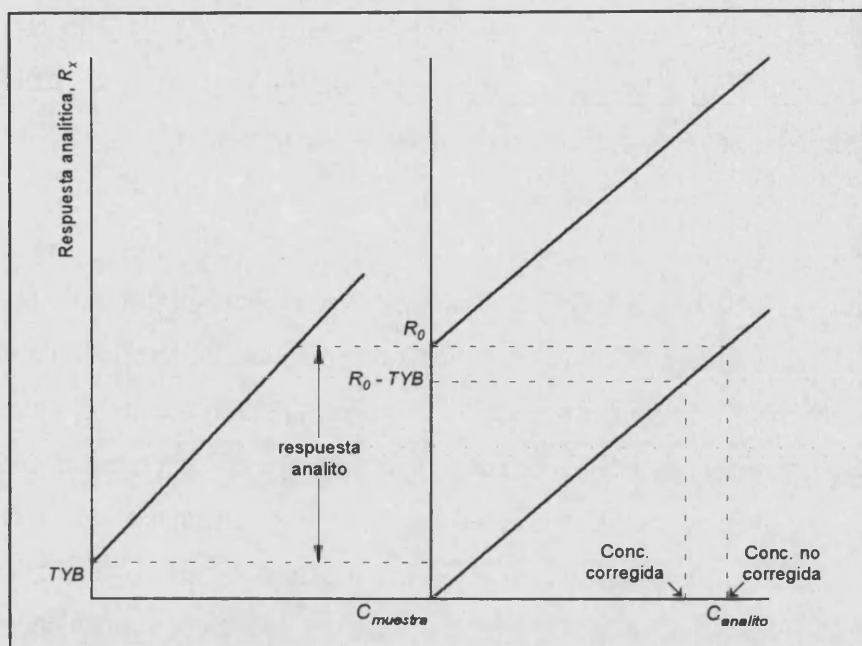


Figura 8: Representaciones de Youden y del método de adición estándar.

Cardone [Cardone,86B] apunta que a pesar de que la relación entre la pendiente del método de adición estándar (k) y la correspondiente a la curva de calibrado con patrones (m_p) está reconocida como el mejor diagnóstico para la detección de errores proporcionales, su uso explícito no ha sido reconocido, lo que atribuye a la confusión existente en la literatura y entre los analistas en cuanto a las características del método. Se define P , según la fórmula 13, como el factor de error proporcional. Cuando dicho valor P difiere de la unidad, se puede afirmar la presencia de error proporcional en el método.

$$P = \frac{k}{m_p} \quad (13)$$

Este método, capaz de corregir errores sistemáticos proporcionales, no puede corregir la influencia de interferentes directos, por lo que estos deberían ser eliminados antes de practicar el método.

Como ya se ha comentado anteriormente, cualquier error en el proceso de calibración causará un error sistemático en el resultado del análisis de la muestra. Por ejemplo, el uso de patrones higroscópicos manejados sin el debido cuidado, dará lugar a curvas de calibrado

1.-INTRODUCCIÓN

tanto más erróneas cuanto mayor sea la cantidad de agua adsorbida. Igualmente, errores en la calibración del sistema, como sobrepasar la linealidad de la curva de calibrado, o un proceso incorrecto de cálculo, dan lugar a resultados incorregibles.

Kowalski *et al* [Sharaf,86] definen esta operación como el proceso por el que la respuesta de un sistema de medida se transforma o se expresa en términos de una cualidad o cantidad de interés. En la etapa de medida, todas las diferencias entre el comportamiento real y el ideal son fuentes potenciales de error. Mientras que el comportamiento real incluye efectos de contaminación, interferencia, efectos matriz y distorsión de la respuesta, el comportamiento ideal refleja una relación teórica o semiempírica, o una calibración con patrones. El error potencial de tales diferencias debe ser reducido, suprimiéndolo química, matemática o instrumentalmente.

Wilson ([Wilson,74]) apunta los factores que afectan a la exactitud de las funciones calibrado, y que son su naturaleza y su determinación experimental.

La naturaleza de la función calibrado puede tener efectos importantes sobre factores prácticos. Por ejemplo, son más fáciles de definir exactamente funciones de forma lineal que aquellas de forma polinómica. La mayoría de métodos en Química Analítica expresan curvas de calibrado del primer tipo, y esto ha llevado a forzar la instrumentación a este modelo, en vez de trabajar con modelos que se ajusten al instrumento, y también a forzar las señales analíticas mediante aproximación, transformación o integración a comportamientos lineales frente a la concentración de analito, o frente a una función modificada de tal variable. La no adecuación de datos experimentales a modelos lineales conlleva a errores sistemáticos en el proceso de calibración.

Aunque no es la única, la función lineal más utilizada en el análisis cuantitativo espectrofotométrico es la conocida ley de Beer, establecida por Bouguer, Lambert y Beer, y que define la relación existente entre absorbancia y concentración como:

$$A = -\log(T) = -\log\left[\frac{I}{I_0}\right] = \varepsilon \times b \times C \quad (14)$$

donde A es la absorbancia, T la transmitancia, I_0 la intensidad de luz incidente, I la intensidad de luz transmitida, ε es la absorptividad molar ($L \times mol^{-1} \times cm^{-1}$), b el paso óptico (cm.) y C la concentración ($mol \times L^{-1}$).

En fluorescencia, en disoluciones suficientemente diluidas y bajo condiciones de no quenching, la intensidad de emisión viene descrita por la ecuación:

$$I_f = I_0 \Phi_f (1 - e^{-\varepsilon C l}) \quad (15)$$

donde I_0 es la intensidad incidente de radiación, ε es la absorptividad molar, Φ_f es el rendimiento cuántico aparente, l es el paso óptico efectivo de la celda y C es la concentración de analito. Entre intensidad de emisión de fluorescencia y concentración existe una relación lineal si la absorbancia de la disolución es menor de 0.05.

En fluorescencia sincrónica la intensidad de la señal viene descrita por:

$$I_s = K C l E_{exc(\lambda_{exc})} E_{ems(\lambda_{exc} + \Delta\lambda)} \quad (16)$$

donde K es una constante experimental, C es la concentración de analito, l es el paso óptico efectivo de la celda y $E_{exc(\lambda_{exc})}$ y $E_{ems(\lambda_{exc} + \Delta\lambda)}$ representan los espectros de excitación y emisión respectivamente, puesto que $\lambda_{ems} = \lambda_{exc} + \Delta\lambda$

La magnitud y carácter de los errores implicados en la determinación experimental de la función calibrado dependerá de la precisión de las medidas y de los patrones, de su calidad, de su adecuación a la muestra a determinar, de su número y de su distribución.

Tradicionalmente se ha utilizado un método de medida específico para determinar un constituyente dado. Esta metodología conduce a buenos resultados, pero asume que el componente siempre produce la misma señal a la misma concentración, y que ningún otro componente influye en la señal. Estas condiciones no son siempre fáciles de conseguir, y el procedimiento conduce a errores sistemáticos no corregibles si en la muestra existen interferentes directos. Entonces se opta por su eliminación química con el consiguiente gasto de tiempo.

1.2.- CALIBRACIÓN MULTIVARIADA.

Cuando la resolución del instrumento es adecuada, se pueden medir dos o más especies en la misma muestra, resolviendo indirectamente, en algunos casos, el problema de la presencia de interferentes directos sin recurrir a su separación química, por la vía de su determinación. En una determinación específica de un único componente, toda la información analítica está contenida, generalmente, en la intensidad de la señal, mientras que en una determinación multicomponente, la información se obtendrá a partir de la intensidad y posición de la señal analítica, a través de una calibración multivariada.

Los métodos de regresión, ajuste de datos a un modelo, se han usado en una gran variedad de contextos científicos denominados "*ciencia dura*" (ciencia basada en modelos duros, hard modeling), aunque mejor sería llamarla "*ciencia endurecida*" [Stone,90], en los que un modelo lineal es una representación adecuada de la realidad: el número de parámetros del modelo son pocos y todos ellos han de ser estimados. Son casos en los que se busca la comprensión del fenómeno en estudio a través del modelo ajustado, por ello también se han denominado métodos de calibración directa, y habitualmente reúnen estas características [Burgos,93]:

- No existe duda en cuanto al modelo.
- Las variables descriptoras mantienen una alta relación señal/ruido.
- El criterio de mínimos cuadrados es adecuado.

Un ejemplo de esta situación es la caracterización de una sustancia química por su absorbancia a una longitud de onda. Como ya se ha descrito, la ley de Beer postula un modelo lineal para la respuesta en función de la concentración; la absorptividad es específica de cada sustancia y basándose en ello se propondrá medir la absorbancia en tantas longitudes de onda como analitos se suponga componen la muestra y obtener los coeficientes por el método de mínimos cuadrados. La bondad del método dependerá del conocimiento que se tenga de la muestra problema ([Werner,77]).

En el otro extremo de la escala de dureza se encuentran las aplicaciones científicas blandas (ciencia basada en modelos blandos, soft modeling) en las que:

- Hay un gran número de variables predictoras.
- Se dispone de poco conocimiento formalizable sobre el problema.
- Se desea básicamente predecir.

El científico usará la información relacionable con la respuesta aportada por algunas o todas de estas variables construyendo unas nuevas, Z_i , diseñadas para conseguir una buena calidad en la predicción [Martens, 84; 85; Naes, 84]. A este tipo de metodología también se le ha denominado calibración indirecta.

Una ilustración de ciencia blanda, pero vitalmente útil, es la calibración de un NIR para la medida rápida del porcentaje de proteína en muestras de harina. Típicamente se tienen del orden de 25 objetos, muestras de calibrado; más de 700 variables predictoras con alto grado de colinealidad y no existe nada similar a la Ley de Beer que garantice la existencia de unos parámetros con significado físico que deban ser estimados.

Bershtein [Bershtein, 88] puntualizó diversos problemas en el análisis multicomponente aplicado a la espectroscopía UV-Visible:

- 1.- Elección entre sistemas determinados y sobreestimados.
- 2.- Elección de longitudes de onda óptimas.
- 3.- Elección entre incrementar el número de longitudes de onda utilizadas o el número de replicas.

En el trabajo, este autor estudia además la eficacia de criterios establecidos y de algoritmos en la selección de longitudes de onda óptimas.

El terreno entre las sólidas cumbres de la "ciencia endurecida" y las arenas movedizas de la "ciencia blanda" está ocupado por la "ciencia flexible", que en gran medida puede definirse como la inteligente selección de un sesgo en las estimaciones para obtener una mejor precisión en la respuesta esperada.

Muchas son las clasificaciones propuestas para los métodos de calibración multivariada. A continuación se describen algunas de las soluciones aparecidas en la bibliografía, generalmente empleando espectrofotometría UV-visible, para la resolución de

1.-INTRODUCCIÓN

muestras donde existe un error incorregible debido a la presencia de interferente(s) directo(s), sean éstos de naturaleza relevante o irrelevante. El orden establecido en la presente memoria atiende al grado de conocimiento de las interferencias :

- a.- Información completa: interferente(s) conocido(s).
- b.- Información parcial: interferente(s) modelado(s).
- c.- Información nula: interferente(s) desconocido(s).

Las opciones a) y b) utilizan patrones de calibración de analito(s) puro(s), o en su defecto muestra(s) más adiciones conocidas de analito puro(s), mientras que la opción b) emplea habitualmente muestras con concentraciones conocidas de los analitos y que incorporan suficiente variación de cada interferente para que el algoritmo pueda modelar y corregir su efecto.

1.2.1.- INTERFERENTE(S) CONOCIDO(S).

El *zero crossing method* fue desarrollado por O'Haver [O'Haver, 76; 79] y se basa en la resolución de mezclas binarias utilizando como longitudes de onda de medida aquellas donde el espectro de primera derivada de cada una de las especies se anula. En ese punto la amplitud medida es directamente proporcional a la concentración de la otra especie. Múltiples aplicaciones de este método aparecen en la bibliografía junto con el empleo de derivadas con el objeto de anular las diferencias espectrales en mezclas de dos o tres componentes.

El método de las *curvas de contenido aparente*, desarrollado en este mismo departamento, está basado en el estudio de la representación gráfica de la función $F_i = f(\lambda_i)$, siendo F_i :

$$F_i = \frac{(A_T)_i}{(\epsilon_a)_i} \quad (17)$$

donde $(A_T)_i$ representa la absorbancia de la muestra a la longitud de onda λ_i y $(\epsilon_a)_i$ la absortividad molar del compuesto a determinar a dicha longitud de onda. A partir de ellas se han resuelto mezclas binarias en espectrofotometría [Llobat, 92] y espectrofluorimetría

[Llobat,93] y mezclas ternarias en espectrofotometría [Mauri,93]. Otro método desarrollado ha sido el de las *absorbancias lineales* [Pascual,92].

El *método de regresión lineal multiparamétrico, MLRA*, propuesto por Blanco *et al* [Blanco,87;89;90], es un método gráfico de regresión lineal. Si se puede definir la absorbancia de una mezcla binaria como:

$$A_{S,i} = \varepsilon_{X,i} \times C_X + \varepsilon_{Y,i} \times C_Y \quad (18)$$

dividiendo para cada longitud de onda por la absorbancia de una disolución de referencia de la especie X, de concentración C_X^0 , se obtiene que:

$$\frac{A_{S,i}}{\varepsilon_{X,i} \times C_X^0} = \frac{C_X}{C_X^0} + \frac{\varepsilon_{Y,i} \times C_Y}{\varepsilon_{X,i} \times C_X^0} \quad (19)$$

que se puede simplificar a:

$$\frac{A_{S,i}}{\varepsilon_{X,i}} = C_X + C_Y \times \frac{\varepsilon_{Y,i}}{\varepsilon_{X,i}} \quad (20)$$

por lo que representando $\frac{A_{S,i}}{\varepsilon_{X,i}}$ frente a $\frac{\varepsilon_{Y,i}}{\varepsilon_{X,i}}$ para cada longitud de onda medida se

obtiene una línea recta de ordenada en el origen C_X y pendiente C_Y . Expresiones absolutamente equivalentes se obtienen si en vez de considerar la absorbancia de las disoluciones se opera con las derivadas de orden n de los espectros correspondientes.

Según dichos autores, el error global de la determinación se expresa como:

$$\% \Delta = \frac{\left[\sum (c_i \text{ calculado} - c_i \text{ añadido})^2 \right]^{1/2}}{\sum (c_i \text{ añadido})} \quad (21)$$

1.-INTRODUCCIÓN

La *espectrofotometría de cocientes de espectros derivados* ha sido propuesta por Salinas [Salinas,90]. Si se deriva la expresión (19) se obtiene que:

$$\frac{d}{d\lambda} \left[\frac{A_{S,i}}{\epsilon_{X,i} \times C_X^0} \right] = \left[\frac{C_Y}{C_X^0} \right] \frac{d}{d\lambda} \left[\frac{\epsilon_{Y,i}}{\epsilon_{X,i}} \right] \quad (22)$$

La ecuación (22) indica que la derivada del cociente de espectros de la mezcla es dependiente sólo de los valores de C_Y y C_X^0 , y es independiente de los valores de C_X en la muestra. Se pueden ver distintas aplicaciones del método en [Berzas,92]

Este método se ha ampliado a la resolución de mezclas ternarias uniendo dicha metodología y el *zero crossing method* [Berzas,92B].

Algunos métodos gráficos (junto con otros multicomponentes) han sido comparados en [Bautista,93].

Un método recientemente desarrollado es la Fluorescencia Sincrónica por Isopotenciales de la Matriz, *FSIM*, [Murillo,94] que desarrolla espectros sincrónicos siguiendo una trayectoria que une puntos de igual intensidad en el espectro total de fluorescencia de la matriz.

El modelo de calibración más utilizado es la regresión lineal múltiple, *MLR*, se basa en analizar diversos analitos en la misma muestra, utilizando para ello los datos obtenidos para n muestras con r analitos, midiendo con p sensores (p. ej. absorbancias a diferentes longitudes de onda), obteniéndose las matrices $\mathbf{R}_{n,p}$ (matriz de respuestas), $\mathbf{C}_{n,r}$ (matriz de concentraciones) y $\mathbf{K}_{r,p}$ (matriz de constantes de respuesta lineal, cuyos elementos representan la sensibilidad de cada sensor para cada analito). Por extensión del análisis univariante se tiene que:

$$\mathbf{R}_{n,p} = \mathbf{C}_{n,r} \mathbf{K}_{r,p}$$

Para que dicha ecuación matricial tenga solución, se debe cumplir que $p \geq r$. Para poder obtener el valor de la matriz \mathbf{K} , las disoluciones estándar deben cubrir los intervalos de concentraciones de interés de los distintos analito, con $n > r$.

K se calcula como:

$$\mathbf{K} = (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} (\mathbf{C}^T \mathbf{R})$$

donde \mathbf{C}^T es la matriz traspuesta de \mathbf{C} , y $(\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1}$ es la inversa de $\mathbf{C}^T \mathbf{C}$ (asumiendo que exista).

Si **K** no se calcula, sino que se toman sus valores a partir de disoluciones patrón de los analitos puros, se tiene el denominado análisis de multicomponentes (*MCA*).

La matriz $(\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1} \mathbf{C}^T$ se denomina inversa generalizada de \mathbf{C} . Conociendo la matriz de los factores de sensibilidad **K**, se pueden estimar las cantidades de analito en muestras desconocidas. Ello es equivalente al proceso de interpolación en el análisis de un solo componente. Si el número de sensores es igual al número de analitos ($p = r$), **K** es una matriz cuadrada. Si \mathbf{K}^{-1} existe, entonces las concentraciones se calculan como:

$$\mathbf{C}_s = \mathbf{R}_s \mathbf{K}^{-1}$$

donde \mathbf{C}_s es la matriz que contiene las concentraciones de analito en la muestra desconocida, y \mathbf{R}_s es la matriz de las respuestas obtenidas para la muestra desconocida. Idealmente, cuando sólo se utilizan sensores específicos para cada analito, la matriz **K** debería tener entradas distintas de cero sólo en la diagonal ($\mathbf{K}_{i,j} = 0$ para $i \neq j$ y $\mathbf{K}_{i,i} \neq 0$). Si los sensores no son específicos, pero si bastante selectivos, $\mathbf{K}_{i,j}$ tendrán un valor finito distinto de cero, positivo o negativo dependiendo de la naturaleza de la interferencia. Cuanto más selectivo es el sensor, menor valor absoluto para $\mathbf{K}_{i,j}$. Si existen interferencias es esencial incluirlas en el proceso de calibración y evaluar sus factores de sensibilidad.

Si el número de sensores es mayor que el de analitos ($p > r$), **K** no es una matriz cuadrada. \mathbf{C}_s se resuelve entonces utilizando la inversa generalizada de **K**:

$$\mathbf{C}_s = \mathbf{R}_s \mathbf{K}^T (\mathbf{K} \mathbf{K}^T)^{-1}$$

La sensibilidad del sistema analítico en el caso del análisis multicomponente con la matriz **K** cuadrada se puede definir como el valor absoluto del determinante de **K**:

$$\text{sensibilidad} = |\det \mathbf{K}|$$

Cuando el número de sensores es mayor que el de analitos, **K** no es una matriz cuadrada, y en este caso se define la sensibilidad como:

$$\text{sensibilidad} = |\det (\mathbf{K}^T \mathbf{K})|^{1/2}$$



1.-INTRODUCCIÓN

La calibración multivariada también puede realizarse por regresión lineal múltiple inversa. En este caso se considera la concentración de los r analitos como variable dependiente y la matriz de respuestas como variables independientes. Para n disoluciones de patrones con r analitos y p respuestas obtenidas con diferentes sensores se tiene que:

$$C_{n,r} = R_{n,p} K_{p,r}$$

de donde:

$$K = (R^T R)^{-1} R^T C$$

Para una muestra desconocida se tiene que:

$$C_x = R_x K$$

Las condiciones requeridas para aplicar el método son: 1) que los espectros de los analitos sean lo suficientemente distintos para poder calcular con precisión la matriz inversa R^{-1} y 2) que $n \geq p$, lo que significa un límite en el número de sensores a utilizar en el análisis.

La principal desventaja de *MLR* es que para realizar los cálculos es necesario invertir las matrices, lo que se convierte en problemático e introduce una posible fuente de error en situaciones próximas a la colinealidad.

Las dos limitaciones más importantes de la calibración multivariada son que los resultados pueden depender del intervalo de longitudes de onda que se seleccione para su aplicación [Rossi, 85], y que cualquier absorbancia adicional, debida a una variación de la línea base o a la presencia de un interferente no conocido, será considerada en el cálculo, produciendo un error no controlable en la cuantificación de los analitos. Cuando el solapamiento de las señales es acusado, el método de regresión lineal conduce a resultados no satisfactorios derivados del hecho de que algunas señales analíticas son combinación lineal de otras.

Se tiene un excelente desarrollo de la resolución del cálculo matricial en [Drapear, 81]. Algunos algoritmos para la resolución del análisis multicomponente son los descritos en [Blanco, 87B] y [Sala, 88].

Cuando se sospecha la existencia de efectos matriz, y no se dispone de sensores específicos, los métodos de calibración descritos son inadecuados. El método de adición

estándar generalizado, *GSAM*, propuesto por Saxberg y Kowalsky en 1979 (*Saxberg, 79j*), uno de los beneficios del método de adición estándar y de la calibración multivariada.

En el procedimiento de cálculo para el modelo lineal (el más sencillo, y generalmente el más utilizado), el vector de respuestas que contiene $n \times p$ elementos, después de n adiciones de patrón que contiene de 1 a r especies a las concentraciones dadas por el vector $C_{n,r}$, vendrá dado por la siguiente ecuación matricial:

$$R_{n,p} = C_{n,r} K_{r,p} \quad (23)$$

siendo R la matriz correspondiente a los vectores respuesta para las n adiciones, y cuyo valor es conocido, la matriz C es desconocida, ya que las concentraciones de analitos en los patrones durante el proceso de adición son desconocidas, puesto que no se conoce la concentración en la muestra, y por lo tanto es conveniente desglosarla en estas dos matrices:

$$C = \Delta C + C_0 \quad (24)$$

donde ΔC es la matriz correspondiente a las adiciones, y por tanto conocida, y C_0 la correspondiente a las concentraciones a determinar. Esta última matriz estará constituida por n filas idénticas. Si asumimos que K es constante en todo el intervalo de concentraciones, podemos escribir:

$$R = \Delta C K + C_0 K = \Delta R + R_0 \quad (25)$$

El rango de la matriz R debe ser igual a p para que ninguna de las señales analíticas sea combinación lineal de las restantes. Si el número de adiciones n es mayor que el número de analitos r , aplicando el método de mínimos cuadrados obtendremos la matriz K que describe las interferencias existentes y el efecto matriz:

$$K = (\Delta C^T \Delta C)^{-1} \Delta C^T \Delta R \quad (26)$$

Esta matriz puede tener componentes cuyo valor sea nulo, lo que indicaría que el componente en cuestión no interferirá la señal del analito correspondiente. K es una matriz $r \times p$, para que tenga inversa será necesario que r sea igual a p . Teniendo en cuenta esta consideración, la matriz de concentraciones desconocidas C_0 vendrá dada por la expresión:

$$C_0 = R_0 K^T (K K^T)^{-1} \quad (27)$$

Examinando los resultados de cada fila se puede determinar la bondad del ajuste, ya que las filas deben de ser idénticas.

Los autores también han generalizado el método para funciones de forma arbitraria. En la tabla I se expresa el número de medidas requeridas en función del número de componentes y la complejidad de la función calibrado. A medida que aumentan el número de componentes y la complejidad del modelo, aumentan también el número de medidas necesarias, es decir, el número de adiciones.

modelo	fórmula	número mínimo de medidas p = r =				
		2	3	4	5	10
lineal	$p + pr$	6	12	20	30	110
cuadrático	$p + pr + pr(r+1)/2$	12	30	60	105	660
cúbico	$p + pr + pr(r+1)/2 + pr(r+1) \times (2r+1)/6$	22	72	180	380	4510

Tabla I: Número de medidas necesario para la aplicación del método de adición estándar generalizado.

Kowalsky *et al.* (Jochum,81) estudian los factores de los que depende la exactitud en la determinación de la matriz C_0 :

- La exactitud de cada respuesta.
- La precisión en la manipulación de los patrones.
- La exactitud con la que la matriz K describa las interferencias existentes.
- El diseño experimental de las adiciones.
- Errores en los algoritmos matemáticos utilizados.

El método inicialmente se desarrolló para corregir efectos matriz e interferencias directas, y con este propósito se ha aplicado en espectrofotometría, espectrometría de emisión atómica con fuente de plasma acoplada por autoinducción, potenciometría empleando electrodos selectivos y voltametría de redisolución anódica. Se ha aplicado también para detectar y corregir interferencias que no son debidas a especies químicas en la muestra, es decir, interferencias debidas a la deriva instrumental. Kalivas (Kalivas,83) ha aplicado el

método a la resolución espectrofotométrica de una mezcla de cuatro componentes, utilizando sistemas sobreestimados, ampliando con ello las posibilidades del método.

Dentro de los procedimientos de análisis de multicomponentes que utilizan algoritmos iterativos o recursivos cabe diferenciar dos metodologías muy diferentes entre sí:

1. Procedimientos basados en el algoritmo SIMPLEX
2. Procedimientos basados en el filtro de Kalman

En ambos casos se asume una relación lineal de la absorbancia con la concentración del tipo

$$A_i = \sum k_{ij} \times C_j + e_i \quad (28)$$

El SIMPLEX es un procedimiento de optimización muy utilizado en diversos campos de la Química. En el caso del análisis de multicomponentes la función que se minimiza es:

$$U = \sum_{i=1} (A_i - \sum_{j=1} k_{ij} \times C_j)^2 \quad (29)$$

Los valores de $k_{i,j}$ se obtienen a partir de los espectros de disoluciones estándar de cada componente y, a partir de estos espectros estándar, el SIMPLEX calcula los valores de C_j que minimizan la función U . Se tiene una descripción del método SIMPLEX en [Cerde, 88], y algunas aplicaciones en [Beebe, 88; Sala, 88; Wilk, 89; Blanco, 92].

El filtro de Kalman es un procedimiento de filtrado de señales, desarrollado por Kalman [Kalman, 60], bien conocido desde hace treinta años en el campo de la ingeniería y cuya aplicación a la Química Analítica ha cobrado gran interés en los últimos años [Brown, 86]. Ha sido aplicado al análisis de multicomponentes y, recientemente, se ha implementado el software de un espectrofotómetro comercial UV-Vis con un programa de multicomponentes basado en su algoritmo.

1.-INTRODUCCIÓN

Esencialmente se puede describir como un algoritmo recursivo de mínimos cuadrados, en el que se introducen factores de peso estadístico con respecto al ruido de la señal. Sus hipótesis fundamentales de partida son el cumplimiento de la ley de Beer y que el ruido sea independiente de los otros parámetros y tenga un valor medio cero.

Recientemente se ha descrito una modificación del algoritmo, denominada filtro de Kalman ajustable (Adaptive Kalman Filtering) [Rutan,91].

La ecuación fundamental de la que se deriva es:

$$\hat{C}(i) = [K'(i) R^{-1} K(i)]^{-1} K'(i) R^{-1}(i) A(i) \quad (30)$$

donde $\hat{C}(i)$ es la estimación de las concentraciones de i medidas y R es una matriz diagonal cuyos elementos están asociados al error (e_j^2). Para evitar la operación de invertir matrices, el filtro de Kalman resuelve este sistema siguiendo un procedimiento recursivo.

Si llamamos $P(i) = [K'(i) R^{-1} K(i)]^{-1}$, donde $P(i)$ es una matriz de dimensiones $n \times n$, tenemos,

$$\hat{C}(i) = P(i) K'(i) R^{-1}(i) A(i) \quad (31)$$

Si añadimos una nueva observación, la nueva estimación de las concentraciones será

$$\hat{C}(i+1) = P(i+1) K'(i+1) R^{-1}(i+1) A(i+1) \quad (32)$$

La idea básica de los procedimientos recursivos es que:

$$\text{nueva estimación} = \text{antigua estimación} + \text{corrección}$$

Aplicando este concepto a las ecuaciones anteriores y al análisis de multicomponentes, tenemos

$$\hat{C}(i+1) = \hat{C}(i) + g(i+1) \times [A(i+1) - K'(i+1) \times \hat{C}(i)] \quad (33)$$

donde $A(i+1)$ es la absorbancia de la longitud de onda $i+1$; $K'(i+1) \times C(i)$ es el valor estimado de $A(i+1)$ a partir de los valores de concentración $C(i)$; $g(i+1)$ es el factor de ganancia de Kalman y es una estimación de la información adicional suministrada por la longitud de onda $(i+1)$. Se calcula según:

$$g(i+1) = \frac{P(i) \times K(i+1)}{R(i+1) + K'(i+1) \times P(i) \times K(i+1)} \quad (34)$$

donde $R(i+1)$ es el coeficiente de peso por el error a la longitud de onda $(i+1)$, y

$$P(i+1) = [1-g(i+1) \quad K'(i+1)] P(i) [1-g(i+1) \quad K'(i+1)]^t + g(i+1) R(i+1) \quad (35)$$

La matriz de calibración K se construye a partir de los espectros estándar de cada componente.

Para poder empezar el cálculo se necesitan unos valores iniciales de C y del ruido instrumental. Normalmente se inicia con las concentraciones igualadas a cero, $R(0) = \sigma_0^2$ y $P(0) = \sigma_0^2 In$, donde σ_0^2 es la varianza del ruido del blanco, medida experimentalmente, e In es la matriz identidad de orden n . Esta aproximación supone que la varianza es constante e independiente del valor de la absorbancia, lo que no ocurre normalmente. Otra aproximación propuesta es $R(i) = \sigma_0^2 (1 + IOA(i))$

A partir de los valores iniciales ($i=0$) y utilizando el valor de la absorbancia de la primera longitud de onda del intervalo considerado, se calcula el primer valor de $g(i)$, de $P(i)$ y la primera estimación de las concentraciones $\hat{C}(i)$. Este proceso se sigue iterativamente para todas las longitudes de onda.

Las ventajas que más frecuentemente se asocian a la utilización del filtro de Kalman son la eliminación del ruido experimental, la no inversión de matrices, rapidez de cálculo y

1.-INTRODUCCIÓN

bajos requerimientos de memoria computacional. Se ha descrito un algoritmo en [Brown,86] y algunas aplicaciones en [Rutan,88; Lavagnini,90; Gauglitz,92; Pérez,93; Quencer,93; Zhang,93].

1.2.2.- INTERFERENTE(S) MODELADO(S).

Cuando existe multicolinealidad, se debe optar por modelos de calibración que utilicen métodos de reducción de datos, como es el caso de la regresión en componentes principales, *PCR*, y la regresión parcial por mínimos cuadrados, *PLS*. Ambos métodos permiten utilizar un gran número de medidas experimentales simultáneamente, y se basan en la transformación de las variables originales en un número menor de otras, combinación lineal de éstas, y cuya propiedad principal es que no están correlacionadas entre sí [Kowalski,87; Bellaterra,90].

PCR descompone la matriz señal analítica, \mathbf{X} , en un producto de una matriz de scores, \mathbf{S} , y una matriz de loadings, \mathbf{L} . La matriz de scores (m columnas) representa los espectros en un espacio de m dimensiones, en lugar de las originales p dimensiones ($m < p$), conservando toda la varianza significativa de los datos.

Todos los n espectros se representan como n puntos en un espacio de p dimensiones. Si no tienen nada en común los unos con los otros, los n puntos estarán dispersos en el espacio. Si los n espectros están relacionados (por ejemplo espectros de mezclas de dos componentes en distintas proporciones), los n puntos estarán agrupados en subespacios de dimensión menor. Generalmente la dimensionalidad de los datos es igual al número de componentes en la mezcla.

El problema es cómo determinar el número de dimensiones, cómo hallar que los puntos del espacio de p dimensiones estarán finalmente localizados en una línea (1 dimensión), un plano (2 dimensiones), un cubo (3 dimensiones) o una hipersfera de mayor dimensión. Esto es lo que hace precisamente *PCR*.

Existen diversos algoritmos de cálculo. Uno muy conocido es el algoritmo de NIPALS [Wold,87]. Éste comienza tomando cualquier vector en el espacio de p dimensiones (una fila de la matriz) que rota a través del origen y busca la posición que ajusta mejor con la dirección principal de los datos. Por rotación del eje L_1 , y después de proyectar los puntos

en este eje, se puede calcular la varianza de los puntos proyectados. Habrá un ángulo para el cual la varianza sea máxima. El vector L_1 es entonces el primer componente principal. El primer componente principal es un vector en el espacio de p dimensiones que tiene como característica el describir lo mejor posible la dirección principal de los puntos. Este vector se define por sus coordenadas, llamadas *loadings* (l).

Proyectando los puntos (objetos) del espacio de p dimensiones en este vector, se halla una nueva coordenada para los puntos con respecto al vector del primer componente principal. Estas coordenadas se llaman *scores* (s). Estos scores representan a los objetos (filas de la tabla de datos) en una sola dirección.

Matemáticamente el producto del vector columna de los scores por el vector fila de los loadings proporciona una tabla de datos del mismo tamaño que la original:

$$R_{\text{calc}} = s l \quad (36)$$

donde R_{calc} será distinto del original R , pero s y l forman la mejor reproducción posible de R como producto de dos vectores fila y columna. Esto equivale a decir que s está colocado en la dirección de máxima variación de los objetos en el espacio de las variables.

En un segundo paso, se puede calcular un segundo vector de loading (y su correspondiente vector de scores). Para conseguir que este segundo vector de loading no esté correlacionado con el primero es necesario que sean ortogonales entre sí. Geométricamente, para calcular el segundo vector de loading se toma un vector ortogonal al primero y se gira alrededor del origen hasta que se halla la dirección de máxima varianza entre los objetos.

El número de componentes m representa el número de fuentes de variación en el espectro, p. ej. número de analitos, número de interferencias y la variación debida a efectos de matriz:

$$C_{n,r} = S_{n,m} K_{m,r} \quad (37)$$

queda una ecuación similar a la clásica de *MLR*. K puede calcularse por regresión:

$$K = (S^T S)^{-1} S^T C \quad (38)$$

La concentración de los analitos en una muestra desconocida es calculada a partir del espectro de la muestra r_x de la siguiente manera:

1.-INTRODUCCIÓN

Se calculan los scores del espectro problema, s_x , en el espacio de los loadings, L , de los patrones usados en el calibrado, $s_x = r_x L^T$. Las concentraciones de los r analitos se calculan a partir de la relación existente entre los scores y la concentración $c_x = s_x K$.

El calibrado mediante *PCR* requiere que el número de muestras empleadas sea mayor o igual que el número de analitos ($n > r$). El número de longitudes de onda debe ser como mínimo igual al número de analitos, pero escoger un número superior no tiene ningún efecto en el número de patrones empleados. Otra ventaja de *PCR* sobre otros métodos de calibrado es que no necesita conocer los espectros de los analitos ni tampoco saber previamente el número de compuestos que contribuyen a la señal ni el tipo y concentración de interferencias, aunque si es necesario que estén representadas en los patrones de calibración.

Un método derivado de *PCR* es la regresión parcial por mínimos cuadrados, *PLS*. Sus principios básicos fueron enunciados por Wold [Wold,66].

PCR consta de dos pasos independientes: primero la matriz R se descompone en un producto $S L$, y después S se correlaciona con C . Sin embargo *PLS* calcula los vectores de loading de R de una forma algo distinta. El primer vector de loading está situado en el espacio de p dimensiones de tal manera que el correspondiente vector de scores predice C de la mejor manera posible.

El método *PLS* utiliza las columnas de la matriz C para estimar los loadings de R . Al mismo tiempo, las columnas de R se utilizan para estimar los loadings de C . Así:

$$R = S_r L_r + E_r \quad (39)$$

$$C = S_c L_c + E_c \quad (40)$$

donde R es la matriz ($n \times p$) de las medidas; C es la matriz ($n \times r$) de las concentraciones; L_r es la matriz ($m \times p$) de los loadings de la matriz R según *PLS*; L_c es la matriz ($m \times r$) de los loadings de la matriz C según *PLS*; S_r y S_c son matrices ($n \times m$) de scores. Las matrices E_r y E_c son los errores asociados al realizar el modelo de R y C .

Los scores S_r no son óptimos para estimar las columnas de R como en el caso de *PCR*, sino que han sufrido una cierta rotación para describir también, y simultáneamente, la matriz C .

1.2.3.-INTERFERENTE(S) DESCONOCIDO(S)

Si las fuentes de variación en **R** y **C** son idénticas, S_r será igual a S_c . Sin embargo, en la mayoría de situaciones se halla la relación:

$$s_c = f s_r + e \quad (41)$$

donde **f** es la llamada "relación interna".

Para hallar la concentración de analitos de una muestra desconocida, se sigue el siguiente mecanismo: del espectro de la muestra r_x se calcula $(s_r)_x$ usando la matriz de loadings L_r , calculada a partir de los espectros del juego de patrones **R**. A partir de $(s_r)_x$ se calcula $(s_c)_x$, usando la relación interna, **f**. A partir de aquí se calcula c_x utilizando L_c , calculada a partir de los patrones.

El número óptimo *m* de componentes principales (*PCR*) o factores (*PLS*) se halla generalmente utilizando un criterio de cross-validation: buscar el mínimo de la representación de la suma de cuadrados en predicción, *PRESS*, frente al número de factores. *PRESS* se define como:

$$PRESS(m) = \sum_{i=1} (y_i - \hat{y}_{n \setminus i})^2 \quad (42)$$

donde $\hat{y}_{n \setminus i}$ es el valor estimado para el objeto *i*-ésimo con una regresión sobre *m* componentes en la que ha sido excluido precisamente el objeto *i*-ésimo. Este criterio tiende a sobreajustar el modelo, por lo que se han descrito procedimientos basados en el estadístico *F* de Snedecor [Haaland,88].

En general, *PLS* proporciona mejores resultados que *PCR*, como pone de manifiesto la bibliografía referente al tema, que en la actualidad es abundante [Marbach,92;Jong,93;Dupuy,94].

1.2.3.- INTERFERENTE(S) DESCONOCIDO(S).

Los métodos espectroscópicos para detectar la presencia de interferencias suele basarse en la comparación del espectro de la muestra con el de una disolución de referencia de la sustancia a analizar. Cuando la interferencia presente en la determinación del analito

1.-INTRODUCCIÓN

es de naturaleza irrelevante, la representación del valor de la señal analítica frente a la longitud de onda sólo puede utilizarse para detectar pequeñas distorsiones en el registro si las concentraciones de analito en la muestra y en la disolución de referencia son iguales. En este sentido, la representación del $\log(A)$ frente a la longitud de onda se demuestra superior, puesto que dos gráficos de $\log(A)$ vs λ a dos concentraciones distintas de la *misma* sustancia son completamente superponibles. El área de dichas funciones puede utilizarse como medida cuantitativa de la distorsión de dicho registro. Stearns [Stearns,50] define el "índice de impureza" como la siguiente diferencia:

$$\text{índice de impureza} = \left[\frac{A_{S,1}}{A_{S,2}} \right] - \left[\frac{A_{R,1}}{A_{R,2}} \right] \quad (43)$$

donde los subíndices S , R , 1 y 2 se refieren a la muestra, a la disolución de referencia del analito, y a las longitudes de onda λ_1 y λ_2 respectivamente. Generalmente λ_1 y λ_2 se seleccionan en el mínimo y en el máximo de la curva de absorción.

En contraste con el índice de impureza, que implica una diferencia entre cocientes de absorbancia, White [White,62] define el "índice de pureza espectrofotométrico" como:

$$\text{índice de pureza espectrofotométrico} = \frac{\left[\frac{A_{S,1}}{A_{S,2}} \right]}{\left[\frac{A_{R,1}}{A_{R,2}} \right]} \quad (44)$$

Los cocientes de coeficientes de función ortogonal fueron descritos por Agwu [Agwu,67], y se muestran superiores a los anteriormente descritos en dos aspectos: se basan en mayor información de la forma de la curva y son más robustos para detectar distorsiones en cualquier longitud de onda medida.

Wahbi [Wahbi,76] desarrolló un método para detectar interferencias calculando un coeficiente de función ortogonal no normalizado, a partir de una serie de representaciones

1.2.3.-INTERFERENTE(S) DESCONOCIDO(S)

de $\log(A)$ a intervalos igualmente espaciados de longitud de onda. Estos coeficientes se desvían significativamente cuando existe una absorción irrelevante en la muestra.

El método de compensación [Jones,51] es un método no matemático, muy útil en la práctica a pesar de necesitar de una decisión personal. La absorción irrelevante se asume que posee la forma más simple posible, y ninguna de las características del compuesto puro. Wahbi [Wahbi,89] realizó un programa para automatizar la obtención de dichas curvas.

La necesidad de corregir la absorción irrelevante lineal ha desarrollado un gran número de ecuaciones y técnicas gráficas, entre las que se puede citar [Wright,41; Banes,46; Mulder,63].

Si la absorbancia irrelevante es una función constante independiente de la longitud de onda, la primera derivada de la absorbancia eliminará automáticamente dicho efecto. O'Haver [O'Haver,79B] realizó un estudio sobre las técnicas derivativas y de modulación de la longitud de onda. En dicho trabajo se destaca el hecho de que aunque el proceso de diferenciación generalmente ofrece mayor selectividad que la espectrofotometría normal, o espectroscopía derivada de orden cero [Leviallin,86], el proceso de diferenciación degrada el cociente señal/ruido, SNR , y aunque dicha degradación depende de varias variables experimentales, en la práctica se observa un factor de degradación de dos por cada orden de diferenciación.

La obtención de los espectros derivados puede realizarse de varias formas, aunque la suavización y diferenciación numérica de los espectros se realiza habitualmente por la técnica descrita por Savitsky y Golay [Savitsky,64], corregida por [Steinier,72; Madden,78]. En [Sánchez,87] se realiza una revisión bibliográfica sobre el tema, incluyendo asimismo algunas aplicaciones prácticas, siendo los últimos artículos publicados sobre el tema [Bialkowski,89; Gorry,90].

En ausencia de un buen conocimiento de la naturaleza de la forma exacta de la curva de absorción irrelevante, Wahbi [Wahbi,86] propuso dos esquemas de trabajo para obtener información sobre la curva de absorción usando la primera derivada de los espectros de absorción.

1.-INTRODUCCIÓN

El método denominado "*Generalized Rank Annihilation Factor Analysis*" [Sánchez, 86], que utiliza sensores bilineales de segundo orden, ha sido propuesto para la determinación de analitos en presencia de interferentes desconocidos. En 1987, Kowalski *et al* [Sánchez, 87B] afirmaron que era el único método que permitía el análisis cuantitativo de un analito en presencia de interferentes desconocidos. Este método ha sido aplicado a la fluorescencia de excitación-emisión, cromatografía líquida-UV y cromatografía de capa fina-espectrofotometría de reflectancia. Cualquier matriz bilineal M puede ser expresada como una combinación lineal de n espectros bilineales μ_k correspondientes a n componentes puros:

$$M = \sum_{k=1}^n \beta_k \mu_k \quad (45)$$

donde $\mu_k = \mathbf{x}_k \mathbf{y}_k^T$ y $(\mu_k)_{ij} = x_{ik} y_{jk}$, siendo \mathbf{x}_k los vectores columna con información de un orden, p. ej. espectros de excitación, e \mathbf{y}_k^T los vectores fila con información en el segundo orden, p. ej. espectros de emisión. Si μ_k corresponde a concentración unidad, β_k es la concentración del componente k -ésimo en M . En notación matricial:

$$M = X \beta Y^T \quad (46)$$

donde X es una matriz cuyas columnas son los n \mathbf{x}_k vectores, Y^T es una matriz cuyas filas son los n \mathbf{y}_k^T vectores, y β es una matriz diagonal cuyos elementos diagonales corresponden a las concentraciones β_k .

En general se dispondrá de dos matrices de datos, la matriz de datos M de la muestra desconocida, y la matriz de calibración N :

$$N = X \xi Y^T \quad (47)$$

siendo ξ la matriz diagonal de los patrones de calibración. Operando se llega a:

$$N Z \beta = M Z \xi \quad (48)$$

siendo $Z \equiv (Y^T)^+$ es la pseudoinversa de la matriz Y^T .

Conociendo M , N y ξ se debe calcular Z y β . La solución de dicha ecuación depende de las distintas situaciones que se pueden presentar:

- 1.- N tiene un único componente que está también presente en M .
- 2.- N tiene varios componentes que son un subconjunto de los presentes en M .
- 3.- Los componentes de M son un subconjunto de los presentes en N .

1.2.3.-INTERFERENTE(S) DESCONOCIDO(S)

4.- El caso más general, cuando hay componentes de la muestra que no están incluidos en el calibrado y viceversa.

La calidad de los datos obtenidos por este método es función de varios factores. Los más importantes son: nivel de ruido, número de componentes que presentan señales analíticas solapadas, igualdad de las relaciones de concentración de los diferentes analitos, resolución de las distintas señales analíticas, y el propio hecho de necesitar datos bilineales, puesto que no todas las técnicas bidimensionales producen datos de este tipo. Estos se definen como datos bidimensionales donde la contribución de cada componente químico a los datos puede ser expresado como un producto externo de dos vectores.

El filtro de Kalman ajustable [Ruten,91] ha sido utilizado en la determinación por espectrofotometría UV-visible de un analito en presencia de un interferente desconocido en una mezcla binaria. La principal limitación del método es que debe existir alguna zona del espectro donde no solapen ambos componentes.

2.- DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

2.- DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

Del examen de la bibliografía consultada, se puede derivar que la obtención de la concentración de analito exenta de error sistemático en una muestra compleja es un tema en amplio debate y que requiere de nuevas investigaciones. En esta dirección ha trabajado este equipo investigador, proponiendo en 1986 una modificación del método de adición estándar, que se ha denominado *método de adición estándar del punto H (HPSAM)*.

Inicialmente fue propuesto para la resolución de mezcla binarias [Bosch,88;90;Campíns,90] en sistemas en estático, y donde el interferente era conocido, en ausencia ó presencia de blanco total de Youden, *TYB*. El método transforma el error incorregible debido a la presencia de un interferente directo en un error de tipo constante corregible. En un primer momento se utilizaron valores de absorbancia como señales analíticas, resolviendo mezclas binarias de compuestos con espectros de absorción marcadamente superpuestos, o incluso con máximos de absorción coincidentes.

Las bases desarrolladas para sistemas en estático se ampliaron a sistemas dinámicos, tanto cinéticos [Bosch,91] como cromatográficos [Campíns,92;92B], con una variable adicional, el tiempo. La metodología cinética permite resolver situaciones donde la reacción del analito es mucho más rápida que la del interferente (o ésta no tiene lugar), o cuando ambos compuestos evolucionen con el tiempo de forma similar. Su aplicación a la resolución de picos cromatográficos superpuestos permite resolver el analito utilizando valores de absorbancia (altura de pico) a su tiempo de retención. El interferente puede ser resuelto simultáneamente si su tiempo de retención coincide con el del analito. El método fue comparado con otros métodos quimiométricos utilizados en cromatografía como el método de supresión de picos o el de la segunda derivada, aportando mejores resultados en la mayoría de casos ensayados.

Esta memoria de investigación está dirigido al estudio, puesta a punto y comprobación de métodos analíticos generales que hagan factible la determinación de una especie(s) en

2.-DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

presencia de interferentes, cubriendo dos aspectos. Uno primero dedicado al estudio teórico de las bases del método y requisitos necesarios para su aplicación en diferentes situaciones y para resolver distintos problemas, y un segundo que se puede calificar como práctico, puesto que resuelve problemas analíticos difíciles de abordar. Por lo que el trabajo planteado reúne a la vez una dimensión teórica que beneficia al campo teórico de lo que se entiende por Química Analítica, y también una dimensión práctica, puesto que resuelve problemas concretos dentro del análisis químico, concretamente en la determinación de fenoles y anfetaminas.

El objetivo último de la investigación que se plantea, que sería general en relación con los autores que estudian acerca de la exactitud de los procedimientos analíticos, sería poder plantear o desarrollar un método capaz de determinar la concentración de un analito independientemente de la muestra en la que se encontrara sin ningún tipo de restricción. Este objetivo es muy ambicioso puesto que éste es un problema analítico tan viejo como la disciplina y que todavía no tiene solución. Siempre existen restricciones en todas las soluciones parciales planteadas tal como se puede derivar del estudio de la sección de introducción, y hay que tender a disminuirlas.

El problema a resolver es de gran trascendencia, puesto que su resolución simplificaría de una forma total la determinación de un analito en presencia de interferentes desconocidos, simplificando sensiblemente toda la metodología analítica al respecto. En esta línea nos movemos como se puede observar en el guión de esta memoria, que trata de visualizar los distintos pasos que hemos seguido hasta situarnos en el punto en el que estamos.

En primer lugar se ha adaptado el método aplicando incrementos de absorbancia, mostrándose particularmente útil en las determinaciones analíticas que utilizan un blanco absorbente, mejorando los resultados obtenidos por la metodología tradicional de medida frente al blanco reactivo. Se ha adaptado el HPSAM a la espectrofluorimetría molecular, tanto en medidas de emisión como sincrónicas y a cromatografía líquida con detección UV-V y fluorimétrica, empleando como señales analíticas áreas ampliando con ello sus posibilidades en esta técnica de separación. La aplicación práctica desarrollada se ha centrado en la determinación de fenoles en aguas naturales. Los fenoles se emplean como insecticidas,

2.-DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

fungicidas, antisépticos y desinfectantes, siendo su uso mundial elevado. Este amplio uso, y sus características tóxicas, justifican que su identificación y posterior determinación en aguas sean fundamentales para la salud pública.

Posteriormente se han desarrollado las bases para la resolución de mezclas ternarias utilizando valores de absorbancia, obteniéndose resultados comparables a la calibración multivariada. También se ha propuesto el HPSAM con doble adición.

Por último señalar que el método se ha aplicado a la determinación de analito en presencia de interferentes desconocidos. Los primeros intentos han sido resueltos con éxito. La primera aproximación fue determinar el analito en presencia de un interferente desconocido cuya absorbancia pudiera ser descrita de manera lineal en el máximo de absorción del analito. El método demostró ser capaz de cuantificar libre de error sistemático al analito en dicha situación, y además se han propuesto dos métodos para reconocer en una muestra desconocida cuando se produce dicho comportamiento para el interferente desconocido. Su aplicación a la determinación de fenol en el medicamento *Fungusol*[®] donde existe una absorbancia irrelevante desconocida demostró que era superior a metodologías propuestas para resolver dichas interferencias. Por último indicar que se han desarrollado sus bases para localizar intervalos lineales para el interferente desconocido en cualquier zona del espectro, lo que ha dado lugar al *método de adición estándar generalizado del punto H, GHPSAM*. Este método permite eliminar la interferencia de la orina en la determinación de anfetamina.

La metodología general a seguir esta establecida e implica las siguientes etapas: partiendo de los supuestos teóricos establecidos para cada caso, el siguiente paso es su comprobación. Para ello se preparan muestras sintéticas de comportamiento y naturaleza conocidas, y elegidas de acuerdo con la dificultad que supone la separación de los compuestos de la muestra, para posteriormente trasladar el procedimiento a la determinación de las especies estudiadas en muestras reales.

La presente memoria se ha desarrollado en base a un proyecto que fue el objeto de la concesión a D. Jorge Verdú Andrés de una beca predoctoral para la formación de personal investigador de la Conselleria d'Educació i Ciència de la Generalitat Valenciana.

2.-DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

Los trabajos científicos sobre el HPSAM se pueden esquematizar de la siguiente forma:

MUESTRAS CON INTERFERENTES CONOCIDOS:

Mezclas binarias:

- TÍTULO: H-Point Standard Additions Method: 1.- Fundamentals and Applications to Analytical Spectroscopy"
REVISTA: Analyst, 113 (1988) 1011 (Reino Unido)
- TÍTULO: "H-Point Standard Additions Method"
REVISTA: Analyst, 115 (1990) 111 (Reino Unido)
- TÍTULO: "Spectrophotometric analysis of mixtures of two components with extensively or completely overlapped spectra by the HPSAM"
REVISTA: Fresenius J. Anal. Chem., 338 (1990) 16 (Alemania)
- TÍTULO: "Amphetamine and methamphetamine determination in urine with sodium 1,2-Naphthoquinone sulphonate using the H-Point standard additions method"
REVISTA: Anal. Chim. Acta, 287 (1994) 41 (Países Bajos)
- TÍTULO: (*) "Application of the HPSAM by using absorbance increments values as analytical signals"
REVISTA: Talanta, 39 (1992) 1 (Reino Unido)
- TÍTULO: (*) "Development of the H-Point Standard Additions Method for the use of Spectrofluorimetry and Synchronous Spectrofluorimetry"
REVISTA: Analyst, 119 (1994) 2123 (Reino Unido)
- TÍTULO: (*) "H-Point Standard Additions Method (HPSAM) for resolution of binary mixtures with simultaneous addition of both analytes"
REVISTA: Anal. Chim. Acta (en revisión)
- TÍTULO: "Development of the H-Point Standard Addition Method for the UV-V spectroscopic Kinetic analysis of two component systems"
REVISTA: Anal. Chem., 63 (1991) 2424 (Estados Unidos)
- TÍTULO: "Development of the HPSAM for coupled HPLC/UV-V"
REVISTA: Anal. Chim. Acta, 257 (1992) 89 (Países Bajos)
- TÍTULO: "Determination of teophiline and paraxanthine in urine samples by HPLC using the HPSAM method"
REVISTA: Anal. Chim. Acta, 268 (1992) 73 (Países Bajos)

2.-DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

TÍTULO: (*) "H-Point Standard Additions Method (HPSAM) for resolution of overlapping chromatographic peaks with diode array detection by using area measurements. Determination of phenol and cresols in waters"

REVISTA: Enviado.

TÍTULO: (*) "H-Point Standard Additions Method (HPSAM) for resolution of overlapped chromatographic peaks with fluorescence detection. Determination of phenol and cresols in waters"

REVISTA: Enviado.

Determinaciones analíticas que utilizan blancos reactivos.

TÍTULO: (*) "Evaluation and elimination of the "blank bias error" using the H-Point standard additino method. Application to spectrophotometric determinations using absorbent blank"

REVISTA: Anal. Chim. Acta, 270 (1992) 253 (Paises Bajos)

TÍTULO: (*) "Study of the behaviour of the absorbent blanks in analytical procedures by using the H-Point standard additions method (HPSAM)"

REVISTA: Talanta, 41 (1994) 39 (Reino Unido)

Mezclas ternarias.

TÍTULO: (*) "H-Point standard additions method (HPSAM) for analyte determinations in ternary mixtures"

REVISTA: Analyst, 120 (1995) 229 (Reino Unido)

MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

Interferente lineal en el máximo del analito.

TÍTULO: (*) "Development of the H-Point standard additions method for analyte determinations in unknown matrix. Location of linear matrix spectral interval"

REVISTA: Anal. Chim. Acta, 283 (1993) 831 (Paises Bajos)

TÍTULO: (*) "Elimination of the Unknown Irrelevant Matrix Absorbance by Using the H-Point Standard Additions Method (HPSAM)"

REVISTA: Talanta, 41 (1994) 1569 (Reino Unido)

Interferente lineal en cualquier zona del espectro.

TÍTULO: (*) "Generalized H-point standard additions method (GHPSAM) for analyte determinations in unknown samples"

REVISTA: Anal. Chim. Acta, 302 (1995) 323 (Paises Bajos)

2.-DISCUSIÓN SOBRE EL ESTADO ACTUAL DEL TEMA Y OBJETIVOS

La presente memoria se ha reflejado en los artículos reseñados con (*).

3.- REACTIVOS E INSTRUMENTOS

3.- REACTIVOS E INSTRUMENTOS

3.1- REACTIVOS.

Índigo Carmín (Fluka)

Azul de timol (Fluka)

Arsenazo III (BDH Chemicals)

Rojo de metilo (D'Hemio)

Rojo congo (Riedel-de Haën AG)

Ácido clorhídrico, 23° Be (Probus)

Hidróxido sódico, 97% (Probus)

Fenol (Merck)

o-Cresol (Merck)

m-cresol

p-cresol

Acetonitrilo (para CLAR, Scharlau)

Metanol (para CLAR, Scharlau)

Ácido fosfórico

NaCl (Probus)

Albumina de suero bovino, $M_r = 67000$ (Fluka)

Reactivo de Biuret: 8.65 g. de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Probus), 86.5 g. de citrato sódico tribásico (Panreac) y 50 g. de NaCO_3 anhidro (Probus) en 500 mL.

$\text{Th}(\text{NO}_3)_4$ (Merck)

Torón (BDH Chemicals)

$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ (Probus)

Amarillo de Titano (Riedel-de Haën AG)

Alcohol polivinílico, 40-46 centipoises, hidrolizado 87-89 % (Probus)

Clorhidrato de hidroxilamina (Probus)

dl-clorhidrato de metanfetamina (Sigma)

d-clorhidrato de metanfetamina (Sigma)

dl-sulfato de anfetamina (Sigma)

3.- REACTIVOS E INSTRUMENTOS

1,2-naftoquinona-4-sulfonato sódico (Sigma)
n-hexano (para CLAR, Scharlau)
Dihidrogenofostato de sodio monohidrato (Merck)
Monohidrogenofostato de sodio dodecahidrato (Probus)
4-clorofenol (Aldrich)
3,4-diclorofenol (Aldrich)
Fungusol[®] (Laboratorios Andreu)
4-cloro-3-metilfenol (Aldrich)
2,4-diclorofenol (Aldrich)
4-cloro-2-nitrofenol (Aldrich)
2,4,6-triclorofenol (Aldrich)

Los reactivos y el material volumétrico utilizado son de calidad r.a. y clase A., respectivamente.

3.2- INSTRUMENTOS.

Espectrofotómetro de doble haz Shimadzu UV-240, y unidad de programa OPI-2, que imprime los valores de absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas.

Espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer Lambda 16, conectado a un ordenador Ataió S-2000 AT.

Espectrofotómetro de fila de diodos Hewlett-Packard HP8452, conectado a un ordenador HP Vectra ES/12.

Espectrofluorímetro Perkin Elmer LS-50, equipado de lámpara de xenon (equivalente a 20kW durante una duración de 8 μ s), una exactitud de ± 1.0 nm. y una reproducibilidad de ± 0.5 nm. Conectado a un ordenador Epson PC AX2, controlado por el software FLDM (Perkin Elmer).

Espectrofluorímetro Hitachi F-4500, con una velocidad de barrido de 30000 nm/min.

Baño termostador Lauda RM 20.

Cubetas de cuarzo, de dos (espectrofotometría) y cuatro caras (espectrofluorimetría), de 1 cm. de camino óptico.

Cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1040A, equipado con un detector de fila de diodos Hewlett-Packard 1040M serie II conectado con el sistema de almacenamiento y procesado de datos Hewlett-Packard Chem-Station. El sistema se conectó con una bomba cuaternaria y un inyector automático (Hewlett-Packard serie 1050).

La columna analítica utilizada fue una HP-Lichrospher 100 RP-18 (5 μm , 250 mm \times 4 mm d.i.).

Columnas de extracción en fase sólida Bond Elut C18 (500 mg, Analytichem International), Bond Elut CH (500 mg, Analytichem International) e Isolute C18EC (500 mg, International Sorbent Technology).

Estación de procesado de muestras Vac Master-10 (International Sorbent Technology).

3.- REACTIVOS E INSTRUMENTOS

**4.- MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR
DEL PUNTO H: FUNDAMENTOS
TEÓRICOS Y APLICACIONES**

***4.1.- RESOLUCIÓN DE MUESTRAS CON
INTERFERENTES CONOCIDOS***



4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS.

El método desarrollado para la resolución de mezclas binarias dentro del campo de la espectroscopía utiliza como señales analíticas las obtenidas a dos longitudes de onda seleccionadas de forma que la especie interferente presente en ambas la misma absorbancia (espectrofotometría) o bien la misma intensidad de fluorescencia de emisión sincrónica (espectrofluorimetría). La distinta naturaleza de la señal analítica en ambos casos no afecta los fundamentos del método, siempre que se cumpla una relación lineal entre la señal analítica medida y la concentración de analito presente. Representando la señal analítica frente a la concentración añadida de analito, de manera análoga a como se opera en el método de adición estándar, se obtienen dos líneas rectas que tienen un punto en común, el Punto H, de coordenadas $(-C_H, A_H)$ (figura 9), donde C_H es la concentración desconocida de analito en la muestra, y A_H es la señal analítica debida al interferente (y al Blanco Total de Youden, TYB, si está presente). A partir de este valor, si se dispone de una recta de calibrado del interferente, puede estimarse la concentración de dicha especie en la muestra.

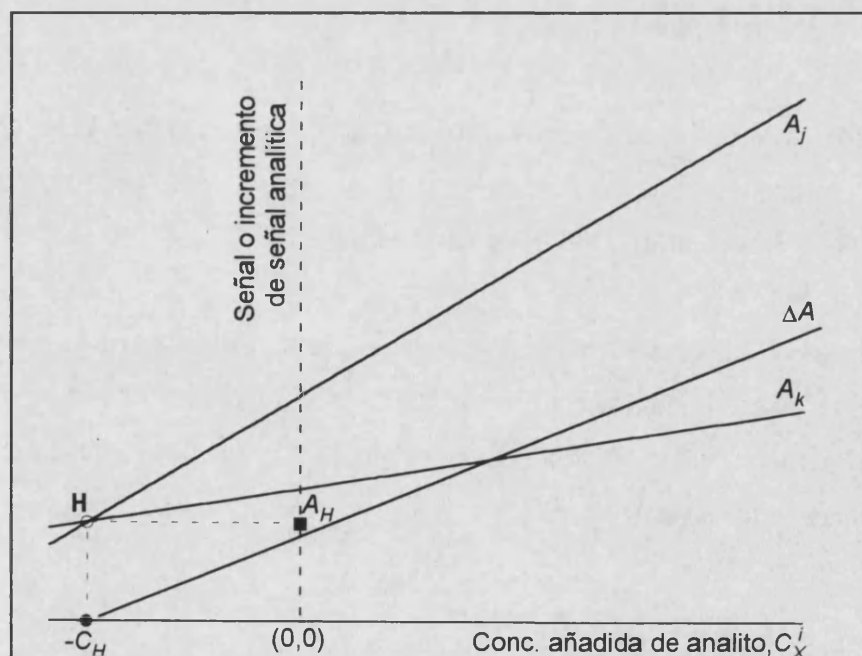


Figura 9: Representación del Método de Adición Estándar del Punto H.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Dicha metodología puede simplificarse usando una única recta de calibrado, cuando únicamente se desea conocer la concentración de analito o solamente se dispone del espectro global de la matriz de la muestra. En este caso se representa el incremento de señal analítica a las dos longitudes de onda seleccionadas frente a la concentración añadida de analito (figura 9). El incremento de señal analítica así obtenido sólo depende de la concentración de analito.

En este capítulo se estudiará la resolución de diversas mezclas binarias con distintas separaciones de sus máximos, tanto en espectrofotometría de absorción como en espectrofluorimetría de emisión sincrónica. Asimismo se desarrollará el HPSAM con doble adición que permite la cuantificación de los dos componentes de una mezcla binaria adicionando simultáneamente ambos analito y a partir de una única serie de calibrados. La adaptación del método a sistemas dinámicos, como es la cromatografía líquida, también se abordará en este apartado.

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO, UTILIZANDO SEÑALES ANALÍTICAS O INCREMENTOS DE SEÑALES ANALÍTICAS.

4.1.1.1.1- *Fundamentos teóricos.*

Consideremos la muestra binaria compuesta de dos especies X e Y, en concentraciones C_X y C_Y respectivamente, y cuyos espectros de absorción (espectrofotometría) o de emisión (espectrofluorimetría) se muestran en la figura 10.

Supongamos que queremos determinar la especie X cuando Y está presente, y además la matriz de la muestra introduce un error sistemático constante (TYB). Para aplicar el HPSAM hay que seleccionar dos longitudes de onda λ_j y λ_k de manera que la señal analítica del interferente sea la misma en ambas,

$$A_{Y,j} = A_{Y,k} \quad (49)$$

Consideremos además que la matriz de la muestra introduce un error sistemático constante (TYB), que en principio se puede considerar el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas:

$$TYB_j = TYB_k \quad (50)$$

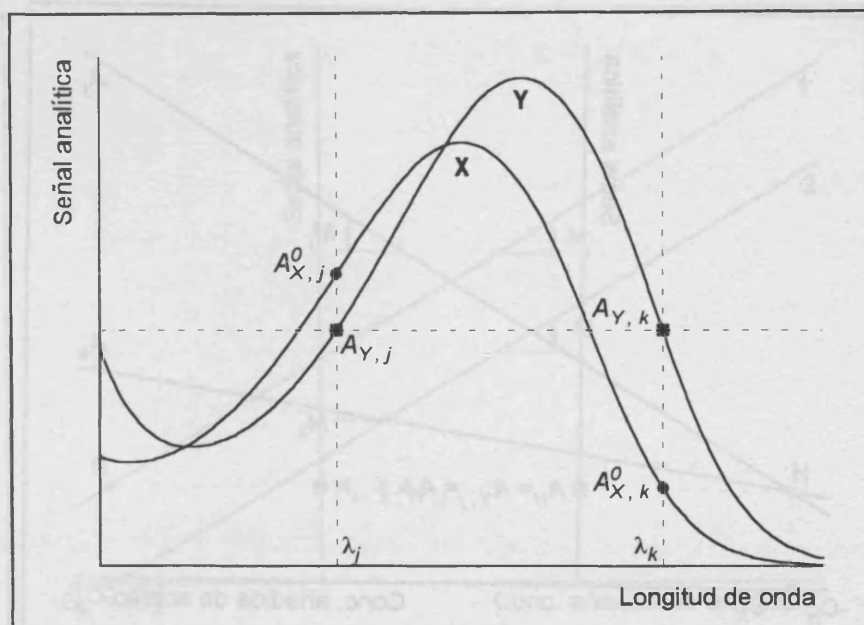


Figura 10: Espectros de absorción (o emisión) de dos compuestos, siendo X el analito e Y el interferente.

Representando la absorbancia como función de la concentración añadida de analito a las dos longitudes de onda seleccionadas, se obtiene que las ecuaciones de las rectas obtenidas serán (figura 11):

$$A_j = A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + TYB_j + M_j \times C_X^i \quad (51)$$

para λ_j , y

$$A_k = A_{X,k}^0 + A_{Y,k} + TYB_k + M_k \times C_X^i \quad (52)$$

para λ_k , donde C_X^i es la concentración añadida de analito, con $i=0,1,\dots,n$ (C_X^0 es la

concentración de analito en la muestra) $A_{X,k}^0$ y $A_{X,j}^0$ son las absorbancias del analito X

en la muestra a λ_j y λ_k ; $A_{Y,j}$ y $A_{Y,k}$ son las absorbancias del interferente Y en la muestra a λ_j y λ_k ; M_j y M_k son las pendientes de las representaciones a las dos longitudes de onda elegidas, λ_j y λ_k .

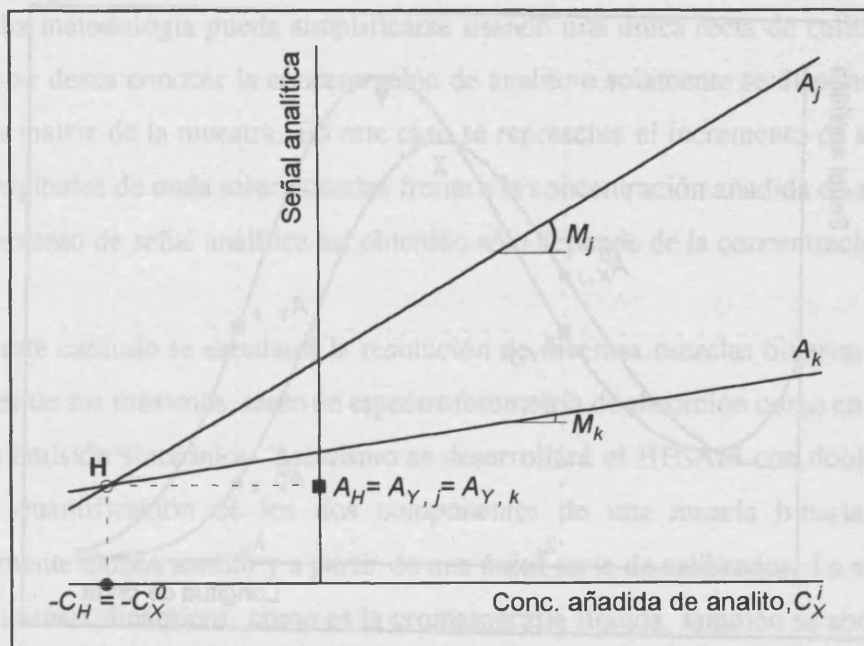


Figura 11: Representación de las rectas obtenidas aplicando el HPSAM a las dos longitudes de onda seleccionadas.

El punto H es común para ambas representaciones, y vendrá dado por:

$$A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + TYB_j + M_j \times (-C_H) = A_{X,k}^0 + A_{Y,k} + TYB_k + M_k \times (-C_H) \quad (53)$$

tal como se observa en la figura 11, de donde

$$-C_H = \frac{(A_{X,k}^0 - A_{X,j}^0) + (A_{Y,k} - A_{Y,j}) + (TYB_k - TYB_j)}{M_j - M_k} \quad (54)$$

Como la especie Y presenta el mismo valor de absorbancia a λ_j y λ_k (ecuación 49), y el TYB se ha supuesto el mismo a ambas longitudes de onda (ecuación 50), la ecuación (54) se simplifica a:

$$-C_H = \frac{A_{X,k}^0 - A_{X,j}^0}{M_j - M_k} \quad (55)$$

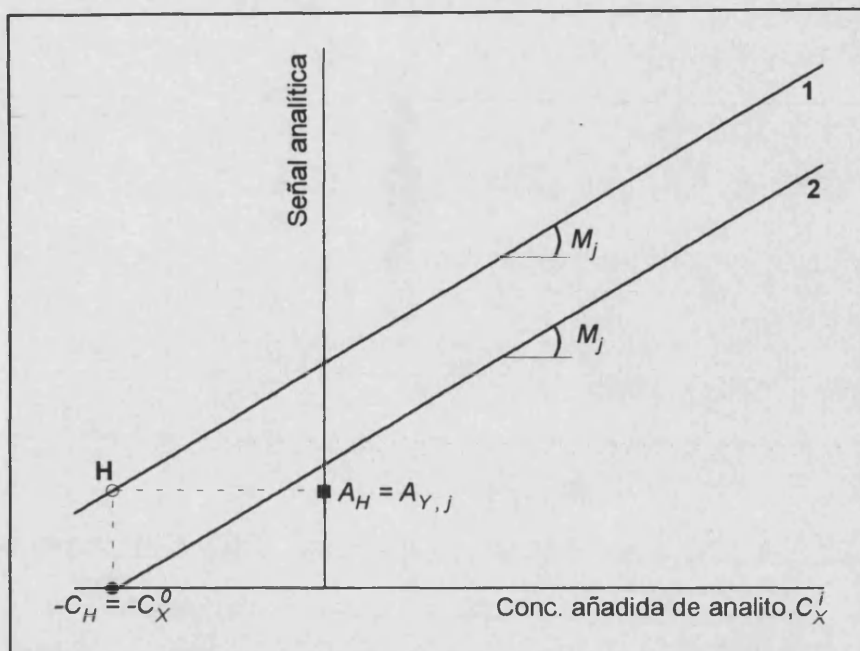


Figura 12: Representación de las rectas obtenidas aplicando el HPSAM a la longitud de onda λ_j en presencia (1) y ausencia (2) de la especie interferente Y.

lo que equivale a la concentración real de analito, C_X^0 , puesto que dicha expresión está relacionada sólo con variables dependientes de él:

$$-C_H = \frac{-A_{X,k}^0}{M_k} = \frac{-A_{X,j}^0}{M_j} = -C_X^0 \quad (56)$$

Las rectas de calibrado del HPSAM a λ_j en presencia y en ausencia de la especie interferente Y se comparan en la figura 12 (para λ_k se obtienen gráficas semejantes). Las pendientes de ambas rectas son iguales, por lo que sustituyendo $A_{X,j}^0$ y $A_{X,k}^0$ en función de C_X^i en la ecuación (55), se deriva que $-C_H = -C_X^0$, siendo C_X^0 la concentración de analito existente en la muestra.

Sustituyendo el valor de C_H obtenido de las ecuaciones (55) o (56), A_H puede ser determinado a partir de la ecuación (51) de la forma:

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

$$A_H = A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + TYB_j + M_j \times (-C_H) \quad (57)$$

Como $A_{X,j}^0 = M_j \times C_H$, entonces:

$$A_H = A_{Y,j} + TYB_j \quad (58)$$

De la misma forma se obtiene que:

$$A_H = A_{Y,k} + TYB_k \quad (59)$$

a partir de la ecuación (52), siendo análogas las ecuaciones (58) y (59), puesto que $A_{Y,j} = A_{Y,k}$ y $TyB_j = TyB_k$.

Como se ve, es posible obtener la concentración de analito libre de error, por aplicación del método de adición estándar del punto H, si el TYB es el mismo en las dos longitudes de onda seleccionadas.

La concentración de interferente estará libre de error proporcional, pero no de error constante si existe TYB, por lo que éste deberá corregirse con el método de Youden [Youden, 47] o por las técnicas de corrección del error corregible (CEC) [Cardone, 83; 86]. Para obtener buenos resultados no es necesario que el TYB sea el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas, ya que puede ser evaluado para ambas, y más tarde utilizarlo en la construcción de las gráficas del HPSAM, representando $A_j - TYB_j$ y $A_k - TYB_k$ como una función de la concentración añadida de analito.

La aplicación del método de adición estándar del punto H puede simplificarse usando una única recta de calibrado, cuando se desea conocer únicamente la concentración de analito, o solamente se dispone del espectro global de la matriz de la muestra. La señal analítica a utilizar en este caso, el incremento de absorbancia (ΔA) sólo depende de la concentración de analito.

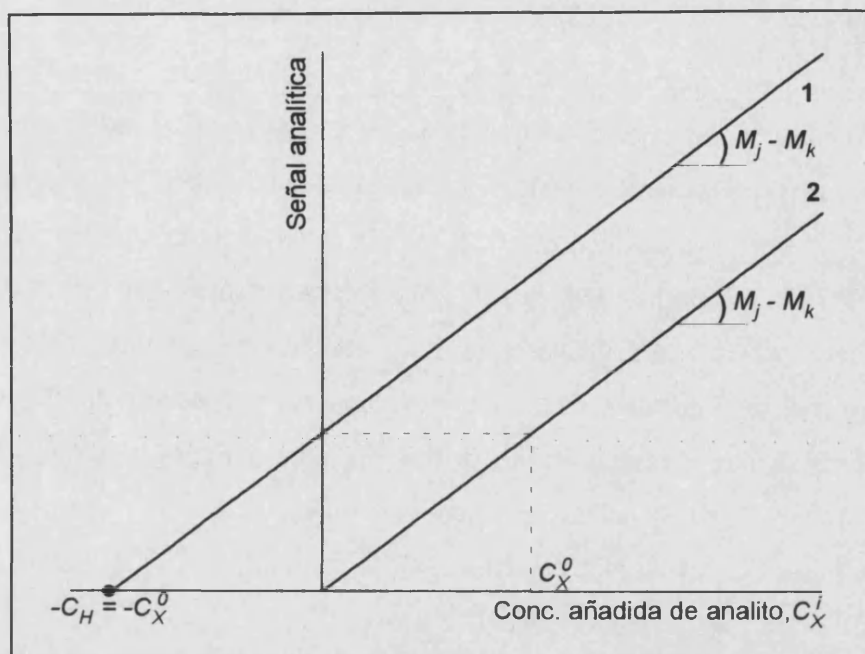


Figura 13: Representación del HPSAM utilizando valores de incremento de señal analítica.

A partir de las ecuaciones (51) y (52), y puesto que el valor de la absorbancia del interferente es el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas (ecuación 49), se tiene que:

$$\Delta A_{j,k} = A_j - A_k = (A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0) + (M_j - M_k) \times C_X^i \quad (60)$$

De acuerdo con esta ecuación, el incremento de absorbancia depende exclusivamente de la concentración de analito (figura 13), por lo que la representación de $\Delta A_{j,k}$ frente a C_X^i

será una línea recta de ordenada en el origen $(A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0)$, y pendiente $M_j - M_k$.

La concentración de analito puede calcularse a partir de los valores de ΔA por aplicación del HPSAM, extrapolando cuando el valor de la ordenada es cero. Dicho punto es el punto H y tendrá de coordenadas $(-C_H, 0)$, por tanto:

$$-C_H = \frac{A_{X,k}^0 - A_{X,j}^0}{M_j - M_k} = -C_X^0 \quad (61)$$

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

El valor de ΔA obtenido después de cada adición se relaciona exclusivamente con la concentración de analito, puesto que la absorbancia del interferente es la misma a las dos longitudes de onda, por lo que su contribución al ΔA será nula, independientemente de que la intensidad de su señal varíe en sucesivas adiciones de analito debido a interacciones con éste. Por tanto, las señales analíticas obtenidas estarán libres de error sistemático constante, y también de errores proporcionales, gracias a las características del método de adición estándar. Cuando tan solo se desea determinar la concentración de analito, o sólo se dispone del espectro global de la matriz de la muestra, una representación de ΔA frente a la concentración de analito añadida permite calcular la concentración desconocida libre de cualquier tipo de error a partir del punto donde la ordenada de la recta es cero. La figura 13 ilustra las dos posibilidades de la representación del método de adición estándar del punto H, usando valores de ΔA .

El trabajo habitual de un laboratorio de análisis generalmente incluye determinar el analito en una determinada muestra empleando el método de calibración de un único patrón, que requiere conocer la señal de la muestra, A_s , la señal del analito, A_r , y la concentración de patrón usado, C_r . De esta manera, la concentración de analito puede ser calculada a partir de los datos de absorbancia usando la siguiente ecuación:

$$C_s = \frac{A_s}{A_r} \times C_r \quad (62)$$

Las variables necesarias cuando se requiere de la aplicación del método de adición estándar son A_s y la señal analítica, A_t , debida a una disolución que contenga la muestra más una cantidad añadida conocida de analito puro, C_a . La ecuación que se aplica en este caso es:

$$C_s = \frac{A_s}{A_a} \times C_a = \frac{A_s}{A_t - A_s} \times C_a \quad (63)$$

Esta expresión se puede extender a la aplicación del método de adición estándar del punto H que utiliza ΔA como señales analíticas, requiriendo conocer ΔA para la muestra y

la disolución que contiene a la muestra y a la adición de analito puro y la concentración de la adición C_a . La selección previa de las longitudes de onda de medida permite eliminar la contribución de interferentes directos. La ecuación a usar será:

$$C_s = \frac{\Delta A_s}{\Delta A_t - \Delta A_s} \times C_a \quad (64)$$

4.1.1.1.2.- Significado del punto H.

Los espectros esquematizados para el analito X y el interferente Y, considerando solamente los puntos extremos λ_j y λ_k , serán los mostrados en la figura 3.5. De esta figura se deduce fácilmente que el espectro simplificado del analito puede describirse como una línea recta de pendiente no nula, de ecuación:

$$A_{X,k}^i = A_{X,j}^i + m_X^i \times \lambda ; (\lambda_j \leq \lambda \leq \lambda_k; i=0,1,\dots,n) \quad (65)$$

donde $A_{X,j}^i$ y m_X^i son la ordenada en el origen y la pendiente respectivamente. Ambos dependen de la concentración de analito presente, por medio del superíndice i , que se refiere a las distintas disoluciones que contienen de 0 a n adiciones de analito puro X realizadas para aplicar el método.

El término λ varía en el intervalo $[\lambda_j, \lambda_k]$, en donde el interferente Y presenta un espectro simplificado que es una línea recta de pendiente nula:

$$A_{Y,k} = A_{Y,j} + m_Y \times \lambda; (\lambda_j \leq \lambda \leq \lambda_k; m_Y=0) \quad (66)$$

Esta condición se cumple, ya que el interferente presenta la misma señal analítica a las dos longitudes de onda seleccionadas (ecuación 49).

La ecuación correspondiente a la primera disolución ($i=0$) preparada para aplicar el método, que sólo contiene muestra, y a la que no se le ha adicionado analito, será:

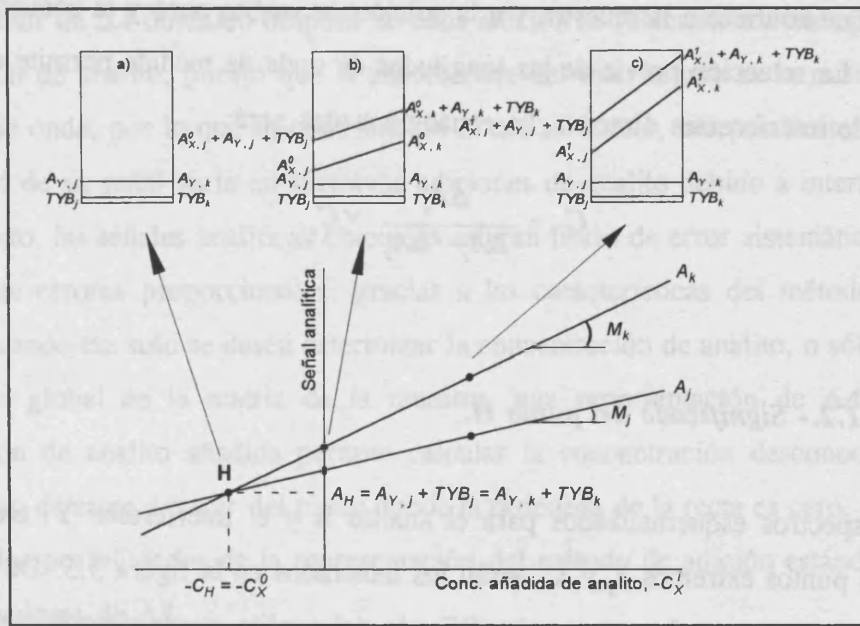


Figura 14: Caracterización del HPSAM en diferentes puntos de la recta de calibrado.

$$A_{X,k}^0 + A_{Y,k} + TYB_k = A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + TYB_j + m_X^0 \times \lambda \quad (67)$$

tal y como se observa en la figura 14(b). Dicha figura relaciona el gráfico del HPSAM con las distintas aproximaciones espectrales en distintos puntos de la recta de calibrado.

La representación $A = f(\lambda)$ correspondiente a la primera adición se muestra en la figura 14(c), y su ecuación es:

$$A_{X,k}^1 + A_{Y,k} + TYB_k = A_{X,j}^1 + A_{Y,j} + TYB_j + m_X^1 \times \lambda \quad (68)$$

El método de adición estándar calcula la concentración desconocida de analito por extrapolación cuando el valor de la ordenada es nulo. De acuerdo con el método que nos ocupa, $A_{X,k}^i = A_{X,j}^i = 0$ cuando $m_X^i = 0$, siendo éste el punto H (figura 14(a)). En dicho punto, y sólo en él, se cumple que la pendiente de la línea recta de la representación $A = f(\lambda)$ para el analito es igual que para el interferente. Se obtiene entonces que:

$$A_{Y,k} + TYB_k = A_{Y,j} + TYB_j = A_H \quad (69)$$

lo que coincide por otra parte con las ecuaciones (58) y (59) previamente obtenidas.

Lógicamente, para $TYB=0$, $A_{Y,k} = A_{Y,j} = A_H$, de donde A_H puede ser relacionada con la concentración de interferente.

En ausencia de interferente, y de manera análoga, $TYB_j = TYB_k = A_H$, de donde se puede determinar el valor para el Blanco Total de Youden.

El método permite el cálculo directo de la concentración de analito (C_X^0), exenta de error proporcional por las características intrínsecas del método de adición estándar, y de error sistemático constante, aun en presencia de un interferente directo, puesto que se logra transformar el error incorregible debido a la interferencia en un error sistemático constante corregible, puesto que λ_j y λ_k se eligen de forma que dicha especie presente el mismo valor de absorbancia. No necesariamente el comportamiento espectral para el interferente tiene que ser el reflejado en las figuras precedentes, la única condición necesaria y suficiente es que a las dos longitudes de onda la señal analítica de la especie interferente **Y** sea la misma. Ello facilita por otro lado la optimización de la señal analítica a utilizar, puesto que para cada mezcla binaria **X+Y** existen diferentes pares de longitudes de onda λ_j y λ_k donde es aplicable el método. La selección de los mejores pares se deberá realizar de manera que se obtengan los resultados más precisos. Esto ocurre para aquellos valores que hacen máximo el valor del denominador en la ecuación (55). Por otra parte, ello supone el cálculo de la concentración desconocida a partir de varias medidas.

El método también posibilita la determinación de la concentración de interferente **Y** a través del valor de A_H , previamente corregido en el caso de la existencia de TYB , puesto que se corresponderá con la señal analítica de **Y** a las longitudes de onda seleccionadas. Por tanto, disponiendo de una curva de calibrado de esta especie, es posible determinarla, aun en el caso de que los espectros de **X** e **Y** estén totalmente solapados, siempre y cuando varíe su forma. Las dos longitudes de onda elegidas λ_j y λ_k , como se ha mencionado con anterioridad, están situadas a ambos lados del máximo (o del mínimo) del interferente (y a la misma distancia si su forma es regular, figura 15(a)). Si el máximo de la especie **X** solapa

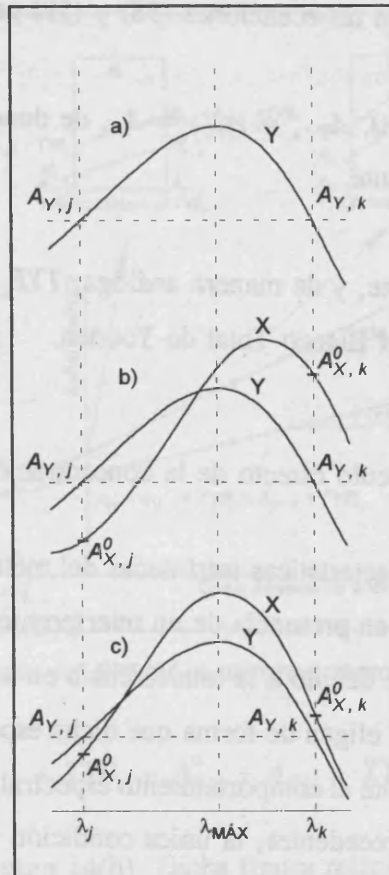


Figura 15: Espectros de absorción de: a) Y; b) X e Y, siendo la separación entre máximos de 5 nm.; c) X e Y, siendo la separación entre máximos de 0 nm.

parcial o totalmente al de Y (figura 15(b) y (c)), la especie X puede ser determinada todavía, aplicando la ecuación (55) en el primer caso, puesto que $A_{X,j}^0 \neq A_{X,k}^0$ y $M_j \neq M_k$. En el caso de solapamiento acusado, o incluso total, estos supuestos también son válidos si la forma de los máximos de X e Y son distintos. La sensibilidad puede ser incrementada eligiendo dos longitudes de onda lo suficientemente separadas del máximo de absorción.

A continuación se exponen los resultados obtenidos para diferentes mezclas binarias.

4.1.1.1.3.- Estudio espectrofotométrico de diferentes mezclas binarias con espectros parcial o totalmente solapados.

Procedimiento experimental

Se ensayó el método propuesto con seis mezclas binarias diferentes de indicadores, con separación de sus máximos de absorción entre 65 y 0 nm, para mostrar los límites máximos y mínimos de aplicación del método, así como caracterizarlo en términos de exactitud y precisión.

A este efecto se prepararon disoluciones acuosas de Índigo carmín, Azul de timol, Arsenazo III, Rojo de metilo y Rojo congo, mediante pesada de la cantidad apropiada de cada indicador. El pH necesario se consiguió mediante la adición de ácido clorhídrico o hidróxido sódico. Todas las disoluciones fueron medidas en el espectrofotómetro Shimadzu, a las longitudes de onda seleccionadas.

Las distintas situaciones espectrales ensayadas se muestran en la figura 16, observándose que en muchos de los casos el solapamiento de los picos es total, conduciendo a situaciones difíciles de abordar desde el punto de vista analítico.

Mezcla 1: Índigo carmín-Azul de timol a pH = 0.9, separación de máximos de absorción 65 nm.

El Azul de Timol a este valor de pH tiene un máximo de absorción localizado a 545 nm., mientras que el Carmín Índigo presenta el máximo de su banda de absorción a 610 nm., siendo por tanto la separación de sus máximos de 65 nm. (figura 16(a)).

El método de adición estándar del punto H fue aplicado a una muestra que contenía una concentración de Azul de Timol de 1.82×10^{-5} M y de Carmín Índigo de 3.80×10^{-5} M, siendo este último el analito, y añadiéndolo hasta una concentración de 8.88×10^{-5} M.

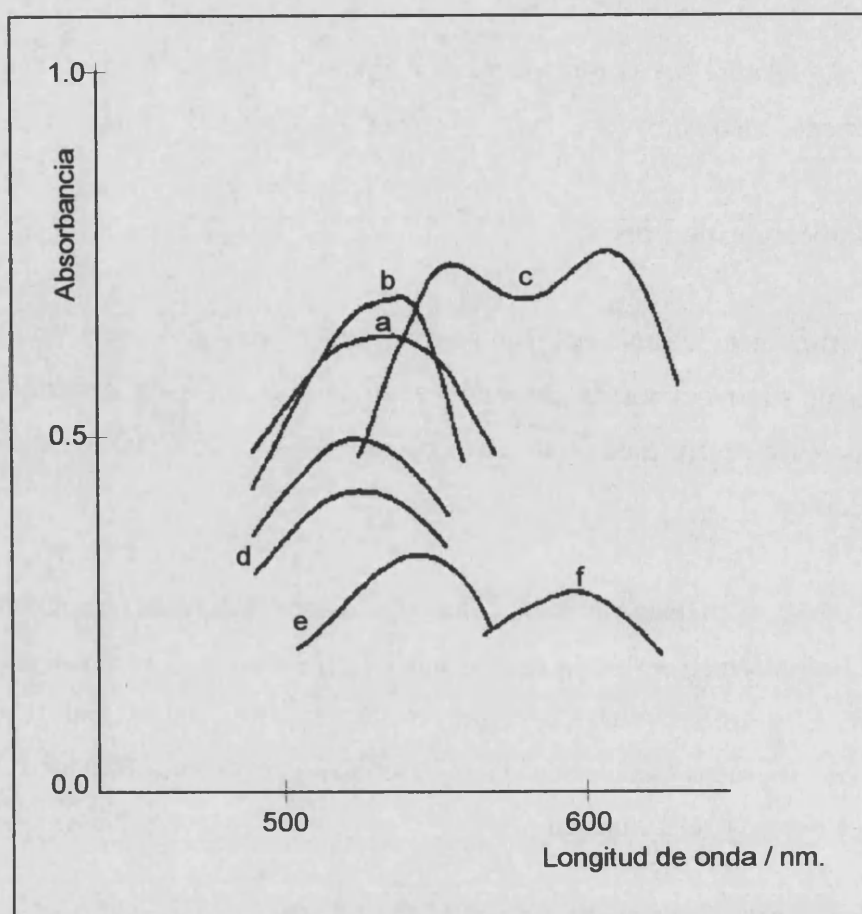


Figura 16: Espectros obtenidos para las distintas mezclas ensayadas: a) Índigo carmín-Azul de timol a $\text{pH}=0.9$; b) Rojo de metilo/Rojo congo a $\text{pH}=2.0$; c) Azul de timol/Rojo de metilo a $\text{pH}=0.9$; d) Arsenazo III/Rojo de metilo a $\text{pH}=0.9$; e) Azul de timol/Arsenazo III a $\text{pH}=0.9$ y f) Azul de timol/Arsenazo III a $\text{pH}=12.0$.

De acuerdo con la teoría del método propuesto, se midieron los valores de las absorbancias de las distintas disoluciones a las longitudes de onda de 555 y 535 nm., en las cuales el interferente (el Azul de Timol) presenta la misma absorbancia. Representando gráficamente la señal analítica frente a la concentración añadida de analito, se obtienen dos líneas rectas con un punto común, el punto H, de coordenadas $(-C_H, A_H)$, donde C_H es la concentración desconocida de analito, y A_H es la señal analítica debida al interferente.

Los resultados obtenidos para la concentración de analito se dan en la tabla II. Esta concentración, según los fundamentos del método, se calcula resolviendo el sistema de ecuaciones de las dos líneas rectas obtenidas. Los límites superior e inferior de la concentración calculada de analito fueron obtenidos considerando el procedimiento de cálculo de aquella y a partir de la expresión descrita en el apéndice [Chemometrics]. Dichos valores

Método de Adición Estándar		Concentración de analito $\times 10^5 / M$				Concentración de interferente $\times 10^5 / M$								
Réplica	Parámetro	555 nm.	535 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			Añadido	Encontrado		
								Parámetro	555 nm.	535 nm.		A_H	555 nm.	535 nm.
1	a	0.723	0.588	3.80	3.90	3.65	4.15	a	-1.30×10^{-2}	-1.12×10^{-2}	0.406	1.82	1.94	1.94
	b	8141.7	4669.3					b	21615.3	21491.9				
	s_{yx}	1.1×10^{-2}	8.2×10^{-3}					s_{yx}	4.0×10^{-3}	3.5×10^{-3}				
	Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal				
2	a	0.715	0.579	3.80	3.97	3.90	4.04				0.391	1.82	1.87	1.87
	b	8157.5	4732.3											
	s_{yx}	3.9×10^{-3}	1.6×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
3	a	0.727	0.588	3.80	4.10	3.95	4.25				0.394	1.82	1.88	1.89
	b	8126.0	4748.0											
	s_{yx}	4.9×10^{-3}	3.8×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
4	a	0.728	0.593	3.80	3.70	3.50	3.90				0.425	1.82	2.03	2.03
	b	8070.9	4464.6											
	s_{yx}	9.6×10^{-3}	5.8×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
5	a	0.724	0.586	3.80	4.29	4.20	4.38				0.385	1.82	1.84	1.85
	b	7926.4	4687.9											
	s_{yx}	4.1×10^{-3}	2.8×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
				\bar{x}	3.99						\bar{x}	0.400	1.91	1.92
				s_x	0.22						I. C.		0.02	0.03

Tabla II: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Índigo carmín) e interferente (Azul de timol) en la resolución de la mezcla Índigo carmín-Azul de timol.



4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

aparecen reflejados en la tabla II. La desviación estándar correspondiente a los cinco valores obtenidos también aparece en dicha tabla.

La concentración de interferente (tabla II), se calcula a partir de la ley de Beer a 555 y/o 535 nm. y de los valores de absorbancia (A_H) obtenidos de la resolución del citado sistema de ecuaciones. Esta concentración viene caracterizada estadísticamente por el intervalo de confianza que se calcula a partir de la expresión descrita en el apéndice [Chemometrics].

Las concentraciones de analito e interferente encontradas están en concordancia con las añadidas, como se puede ver en la tabla para las cinco réplicas realizadas.

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^5 / M$		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(555, 535)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.139 ± 0.002	3.80	4.3	0.2
	$b \pm s_b$	$(323 \pm 3) \times 10$			
	s_{yx}	2.8×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.135 ± 0.002	3.80	3.9	0.4
	$b \pm s_b$	$(347 \pm 3) \times 10$			
	s_{yx}	3.3×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.136 ± 0.002	3.80	4.0	0.3
	$b \pm s_b$	$(333 \pm 3) \times 10$			
	s_{yx}	2.9×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.138 ± 0.001	3.80	4.1	0.2
	$b \pm s_b$	$(338 \pm 4) \times 10$			
	s_{yx}	1.5×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
5	$a \pm s_a$	0.137 ± 0.002	3.80	4.0	0.3
	$b \pm s_b$	$(340 \pm 5) \times 10$			
	s_{yx}	2.2×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
			s_x	4.0	0.2

Tabla III: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Índigo carmín) en la mezcla Índigo carmín-Azul de timol, utilizando ΔA como señales analíticas.

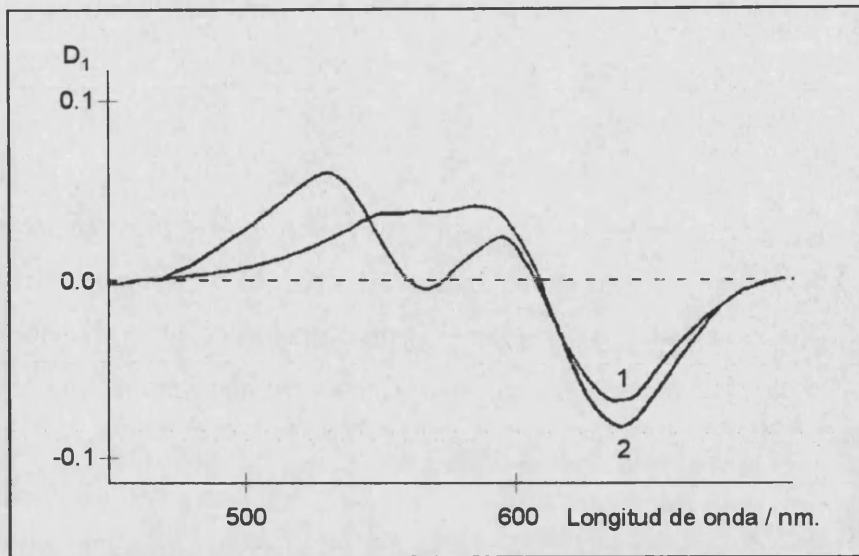


Figura 17: Espectros derivados de disoluciones de 1) Carmín Índigo 3.14×10^{-5} M y 2) mezcla Carmín Índigo (3.80×10^{-5} M)-Azul de Timol (1.82×10^{-5} M) a $pH=0.90$.

Una vez obtenidos los resultados de acuerdo con el método establecido, se aplicó el método utilizando como señal analítica el valor de ΔA , por el que se obtiene una única recta de calibrado. Los resultados se reflejan en la tabla III. El valor de la concentración de analito se obtiene para la abscisa donde $\Delta A = 0$, según las bases de este método, obteniéndose un valor para la concentración de analito en concordancia con el valor añadido, tal como se observa en la tabla III.

No se estudiaron separaciones de máximos de absorción superiores a 65 nm., puesto que en estos casos las determinaciones pueden ser realizadas generalmente por vía espectrofotométrica, o incluso por espectroscopía derivativa cuando sea necesario.

En el caso que nos ocupa la espectroscopía derivativa da asimismo buenos resultados con esta mezcla para la concentración de analito (error relativo entre el 4 y el 6%, para tres réplicas), midiendo a 637 nm., debido a que el pico del Índigo de carmín en el espectro derivado no se modifica mucho cuando el Azul de Timol está presente, como se puede ver en la figura 17, donde se muestra el espectro derivado para el Índigo carmín solo y en la muestra analizada.

Mezcla 2: Rojo de metilo - Rojo congo, a $pH = 2.0$, separación de máximos de absorción 50 nm.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

El Rojo de Metilo a $\text{pH} = 2.0$ tiene un máximo de absorción localizado a 518 nm. , mientras que el Rojo Congo, a ese mismo pH muestra una banda con un máximo a 568 nm. (figura 16(b)).

El método de adición estándar del punto H fue aplicado a una muestra preparada, que contenía Rojo Congo en una concentración de $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$ y Rojo de Metilo en una concentración inicial de $7.9 \times 10^{-6} \text{ M}$, siendo el analito este último, y añadiéndolo hasta una concentración de $2.98 \times 10^{-5} \text{ M}$. En todos los casos sólo se distingue un máximo de absorción.

Se midieron los valores de absorbancias para las diferentes disoluciones a las longitudes de onda de 578 y 558 nm. , en las que el interferente (Rojo Congo) presenta la misma absorbancia. De acuerdo con estos valores se obtienen los resultados para las concentraciones de analito que se muestran en la tabla IV. En la misma tabla se dan los valores de la concentración de interferente, calculados a partir de la ley de Beer a 578 y/o 558 nm. para el Rojo Congo, y de los valores de absorbancia, A_H , obtenidos de la resolución del sistema de ecuaciones.

Los valores encontrados para el interferente y el analito están en buena concordancia con los añadidos, para las cinco réplicas estudiadas.

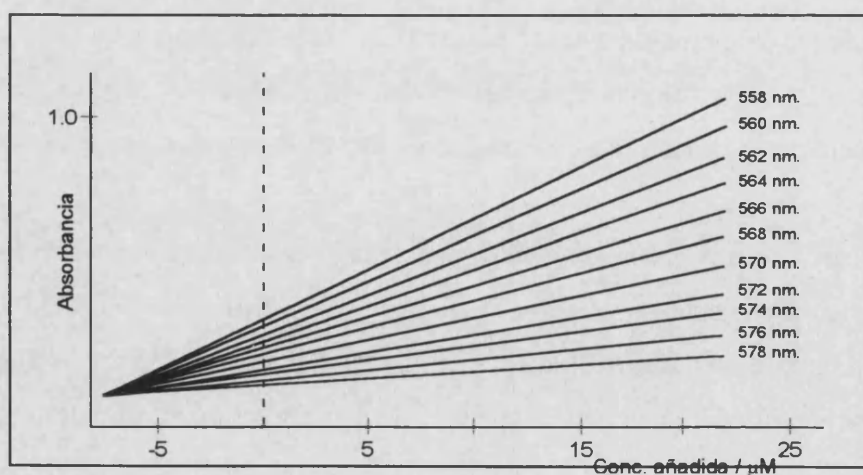


Figura 18: Método de adición estándar del punto H aplicado entre 558 y 578 nm. , a intervalos de 2 nm. , para la mezcla Rojo de metilo-Rojo Congo.

Método de Adición Estándar		Concentración de analito $\times 10^6 / M$				Concentración de interferente $\times 10^5 / M$								
Réplica	Parámetro	578 nm.	558 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			A_H	Añadido	Encontrado	
								Parámetro	578 nm.	558 nm.			578 nm.	558 nm.
1	a	0.377	0.519	7.9	7.9	7.2	8.6	a	3.4×10^{-4}	3.82×10^{-3}	0.352	2.50	2.52	2.50
	b	3082.9	21003.7					b	13961.3	13954.2				
	s_{yx}	1.1×10^{-2}	1.4×10^{-2}					s_{yx}	4.9×10^{-3}	2.8×10^{-3}				
	Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal				
2	a	0.366	0.505	7.9	7.9	7.1	8.7				0.343	2.50	2.45	2.43
	b	2948.2	20448.1											
	s_{yx}	1.1×10^{-2}	1.5×10^{-2}											
	Test- t	lineal	lineal											
3	a	0.372	0.514	7.9	8.0	7.2	8.8				0.349	2.50	2.47	2.49
	b	2855.4	20597.6											
	s_{yx}	1.4×10^{-2}	1.9×10^{-2}											
	Test- t	lineal	lineal											
4	a	0.383	0.524	7.9	7.6	7.0	8.1				0.364	2.50	2.58	2.60
	b	2471.7	20952.4											
	s_{yx}	9×10^{-3}	1.1×10^{-2}											
	Test- t	lineal	lineal											
5	a	0.391	0.540	7.9	8.2	7.4	9.0				0.362	2.50	2.57	2.59
	b	3477.8	21610.7											
	s_{yx}	1.3×10^{-2}	1.9×10^{-2}											
	Test- t	lineal	lineal											
				\bar{x}	7.9						0.354		2.51	2.53
				s_x	0.2						I. C.		0.03	0.04

Tabla IV: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Rojo de metilo) e interferente (Rojo congo) en la resolución de la mezcla Rojo de metilo-Rojo congo.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6$ / M		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(558, 578)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.142 ± 0.002	7.9	7.9	0.4
	$b \pm s_b$	$(179 \pm 2) \times 10^2$			
	s_{yx}	3.9×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.139 ± 0.003	7.9	8.0	0.5
	$b \pm s_b$	$(175 \pm 2) \times 10^2$			
	s_{yx}	5.0×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.141 ± 0.004	7.9	8.0	0.7
	$b \pm s_b$	$(177 \pm 3) \times 10^2$			
	s_{yx}	6.7×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.141 ± 0.002	7.9	7.6	0.8
	$b \pm s_b$	$(185 \pm 3) \times 10^2$			
	s_{yx}	6.2×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
5	$a \pm s_a$	0.149 ± 0.005	7.9	7.6	0.8
	$b \pm s_b$	$(181 \pm 4) \times 10^2$			
	s_{yx}	7.3×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
				7.9	
			s_x	0.2	

Tabla V: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Rojo de metilo) en la mezcla Rojo de metilo-Rojo congo, utilizando ΔA como señales analíticas.

Del mismo modo se aplicó el método utilizando como señal analítica el valor de ΔA , obteniéndose una única recta de calibrado. Los resultados obtenidos se dan en la tabla V.

Dado que la banda de absorción del Rojo Congo presenta una meseta suficientemente ancha se realizaron medidas de absorbancia de todas las disoluciones preparadas entre 578 y 558 nm., a intervalos de dos nm., para corroborar las bases del método, puesto que esta es la disposición teórica de espectros de absorción. Las gráficas obtenidas se muestran en la figura 18: todas ellas tienen un punto en común (el punto H), lo que permite afirmar que el Rojo Congo introduce un error constante en el intervalo 578-558 nm. en la determinación de Rojo de Metilo, error que se elimina aplicando el método.

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO

Este ejemplo demuestra claramente las bases de la teoría expuesta, y muestra las posibilidades del método para corregir errores sistemáticos constantes, y la capacidad del método para transformar el error incorregible debido a la presencia de un interferente directo en un error corregible de tipo constante.

Mezcla 3: Azul de timol - Rojo de metilo, a pH = 0.9, separación de máximos de absorción 27 nm.

El Rojo de Metilo a pH = 0.9 tiene un máximo en la banda de absorción localizado a 518 nm., mientras que el Azul de Timol, a ese mismo pH muestra una banda con un máximo a 545 nm. (figura 16(c)).

El método de adición estándar del punto H fue aplicado a una muestra preparada, que contenía Rojo de Metilo en una concentración de 7.85×10^{-6} M y Azul de Timol en una concentración inicial de 1.12×10^{-5} M, siendo el analito este último, y añadiéndolo hasta una concentración de 13.88×10^{-5} M. En este ejemplo se puede observar un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción de la mezcla a medida que aumenta la concentración de Azul de Timol añadida.

De acuerdo con la teoría del método, se midieron los valores de absorbancia para las diferentes disoluciones a las longitudes de onda de 528 y 508 nm., para las que el interferente (Rojo de Metilo) presenta la misma absorbancia. De acuerdo con estos valores se obtienen los resultados para las concentraciones de analito que se muestran en la tabla VI. En la misma tabla aparecen los valores de la concentración de interferente, calculados a partir de la ley de Beer a 528 y/o 508 nm. para el Rojo de Metilo, y de los valores de absorbancia (A_H) obtenidos de la resolución del sistema de ecuaciones correspondientes.

Los valores encontrados para el interferente y el analito están en buena concordancia con los añadidos, para las cinco réplicas estudiadas.

Los resultados obtenidos al aplicar el método con incrementos de absorbancia se dan en la tabla VII, estando de acuerdo con el valor añadido.

Método de Adición Estándar				Concentración de analito $\times 10^5 / M$				Concentración de interferente $\times 10^6 / M$						
Réplica	Parámetro	528 nm.	508 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			A_H	Añadido	Encontrado	
								Parámetro	555 nm.	535 nm.			555 nm.	535 nm.
1	a	0.590	0.517	1.12	1.12	1.08	1.16	a	6.45×10^{-3}	5.7×10^{-3}	0.399	7.85	7.74	7.8
	b	16997.6	10512.6					b	50668.8	50509.6				
	s_{yx}	2.4×10^{-3}	3.0×10^{-3}					s_{yx}	3.6×10^{-3}	4.9×10^{-3}				
	Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal				
2	a	0.596	0.521	1.12	1.16	1.08	1.24				0.399	7.85	7.74	7.8
	b	16826.0	10433.4											
	s_{yx}	7.1×10^{-3}	6.3×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
3	a	0.599	0.526	1.12	1.10	1.00	1.20				0.416	7.85	8.08	8.1
	b	17265.2	10350											
	s_{yx}	1.0×10^{-2}	1.0×10^{-2}											
	Test- t	lineal	lineal											
4	a	0.595	0.518	1.12	1.15	1.07	1.23				0.395	7.85	7.67	7.7
	b	17408.9	10701.2											
	s_{yx}	7.1×10^{-3}	4.9×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
5	a	0.586	0.511	1.12	1.10	1.00	1.20				0.394	7.85	7.65	7.7
	b	17780.4	10701.2											
	s_{yx}	9.1×10^{-3}	8.1×10^{-3}											
	Test- t	lineal	lineal											
				\bar{x}	1.13						\bar{x}	0.401	7.78	7.8
				s_x	0.03						I. C.		0.09	0.1

Tabla VI: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Azul de timol) e interferente (Rojo de metilo) en la resolución de la mezcla Azul de timol-Rojo de metilo.

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^5$ / M		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(528,508)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.073 ± 0.002	1.12	1.13	0.07
	$b \pm s_b$	$(649 \pm 7) \times 10$			
	s_{yx}	2.6×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.075 ± 0.002	1.12	1.20	0.10
	$b \pm s_b$	$(64 \pm 1) \times 10^2$			
	s_{yx}	3.8×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.080 ± 0.003	1.12	1.20	0.10
	$b \pm s_b$	$(67 \pm 1) \times 10^2$			
	s_{yx}	4.1×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.078 ± 0.004	1.12	1.16	0.09
	$b \pm s_b$	$(67 \pm 1) \times 10^2$			
	s_{yx}	3.7×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
5	$a \pm s_a$	0.075 ± 0.002	1.12	1.08	0.08
	$b \pm s_b$	$(692 \pm 8) \times 10$			
	s_{yx}	3.1×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
				1.15	
			s_x	0.05	

Tabla VII: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Azul de timol) en la mezcla Azul de timol-Rojo de metilo, utilizando ΔA como señales analíticas.

Mezcla 4: Arsenazo III - Rojo de metilo, a pH = 0.9, separación de máximos de absorción 16 nm.

El espectro de la mezcla presenta un solo máximo, como se ve en la figura 16(d). Los máximos de absorción del Rojo de Metilo y del Arsenazo III se encuentran a 518 y 534 nm. respectivamente.

En este caso se estudiaron dos muestras. La primera contenía Rojo de Metilo en una concentración de 4.25×10^{-6} M y Arsenazo III en una concentración de 5.96×10^{-6} M. La segunda contenía la misma concentración de arsenazo III y una concentración de Rojo de

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6 / M$				Concentración de interferente $\times 10^6 / M$								
Mezcla	Réplica	Parámetro	528 nm.	508 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer				Encontrado		
									Parámetro	528 nm.	508 nm.	A_H	Añadi- do	528 nm.	508 nm.
A	1	a	0.427	0.399	5.96	6.2	4	8	a	6.5×10^{-3}	4.4×10^{-3}	0.217	4.25	4.15	4.19
		b	33756.1	29254.1					b	50788.1	50771.5				
		s_{yx}	6.0×10^{-3}	5.9×10^{-3}				6 ± 2	s_{yx}	1.5×10^{-3}	1.9×10^{-3}				
		Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal				
	2	a	0.427	0.399	5.96	6.2	4	8				0.216	4.25	4.12	4.18
		b	33823.2	29338.0											
		s_{yx}	6.6×10^{-3}	6.4×10^{-3}				6 ± 2							
		Test- t	lineal	lineal											
	3	a	0.483	0.457	5.96	6.1	4	6				0.282	5.48	5.43	5.47
		b	33137.2	28835.8											
		s_{yx}	5.7×10^{-3}	5.9×10^{-3}				6 ± 2							
		Test- t	lineal	lineal											
B	4	a	0.491	0.464	5.96	6.4	5	7				0.281	5.48	5.41	5.45
		b	32920.0	28685.7											
		s_{yx}	3.2×10^{-3}	3.4×10^{-3}				6 ± 1							
		Test- t	lineal	lineal											
					\bar{x}	6.2									
					s_x	0.1									

Tabla VIII: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Arsenazo III) e interferente (Rojo de metilo) en la resolución de la mezcla Arsenazo III-Rojo de metilo, a las longitudes de onda 528/508 nm.

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6 / M$				Concentración de interferente $\times 10^6 / M$												
Mezcla	Répica	Parámetro	551 nm.	490 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			Encontrado							
									Parámetro	551 nm.	490 nm.	A_H	Añadi-do	551 nm.	490 nm.				
A	1	a	0.360	0.308	5.96	5.78	4.9	6.7	a	2.2×10^{-3}	5×10^{-4}	0.177	4.25	4.44	4.44				
		b	31728.2	22679.4					b	39314.4	39720.7								
		s_{yx}	5.0×10^{-3}	4.2×10^{-3}					s_{yx}	2.9×10^{-3}	2.1×10^{-3}								
		Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal								
	2	a	0.362	0.308	5.96	5.89	5.1	6.7				0.174	4.25	4.37	4.37				
		b	31912.8	22785.2															
		s_{yx}	4.8×10^{-3}	4.7×10^{-3}															
		Test- t	lineal	lineal															
	3	a	0.404	0.354	5.96	5.72	5.0	6.4				0.226	5.48	5.69	5.68				
		b	31157.7	22416.1															
		s_{yx}	4.2×10^{-3}	4.3×10^{-3}															
		Test- t	lineal	lineal															
B	4	a	0.410	0.360	5.96	5.72	5.4	6.0				0.233	5.48	5.87	5.86				
		b	31023.5	22281.9															
		s_{yx}	1.8×10^{-3}	1.5×10^{-3}															
		Test- t	lineal	lineal															
					\bar{x}	5.78													
					s_x	0.08													

Tabla IX: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Arsenazo III) e interferente (Rojo de metilo) en la resolución de la mezcla Arsenazo III-Rojo de metilo, a las longitudes de onda 551/490 nm.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

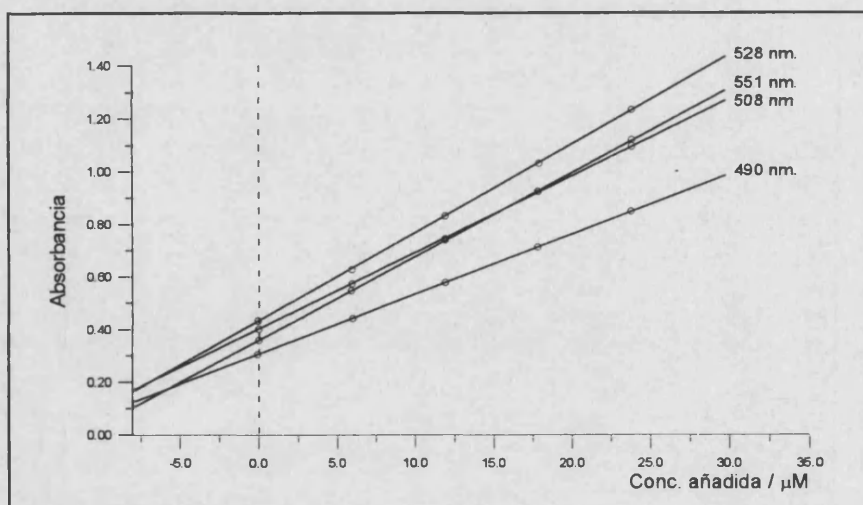


Figura 19: Representación gráfica del HPSAM para la mezcla Rojo de Metilo-Arsenazo III, a dos pares diferentes de longitudes de onda.

Metilo de 5.48×10^{-6} M, siendo el analito el Arsenazo III, y añadiéndolo hasta una concentración de 29.80×10^{-6} M.

Los valores de absorbancia de las distintas disoluciones fueron medidos a las longitudes de onda de 528 y 508 nm., donde el interferente (el Rojo de Metilo) presenta la misma absorbancia. Los resultados obtenidos para el analito y el interferente se dan en la tabla VIII. En dicha tabla se observa que las dos líneas rectas tienen ordenadas en el origen y pendientes muy cercanas, por lo que los elevados límites mayor y menor de C_H (concentración de analito) que se muestran son explicables.

Por tanto, si se quiere incrementar la precisión, se debe incrementar la diferencia entre las ordenadas en el origen y las pendientes de las dos líneas rectas, para lo que se puede medir a dos longitudes de onda más separadas, y donde el interferente continúe mostrando la misma absorbancia, dado que ese es el único requisito que exige los principios teóricos del método. En la figura 19 se muestra como las diferencias entre las ordenadas en el origen y las pendientes aumentan cuando la separación de las longitudes de onda donde se miden las absorbancias aumentan. En consecuencia los límites superior e inferior de C_H disminuyen tal como se observa en la tabla IX, y comparándolos con los obtenidos en la tabla VIII.

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6$ / M		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(551, 490)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.052 ± 0.001	5.96	5.79	0.08
	$b \pm s_b$	$(901 \pm 2) \times 10$			
	s_{yx}	3.1×10^{-4}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.054 ± 0.001	5.96	5.9	0.2
	$b \pm s_b$	$(916 \pm 4) \times 10$			
	s_{yx}	8.6×10^{-4}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.050 ± 0.001	5.96	5.7	0.3
	$b \pm s_b$	$(874 \pm 7) \times 10$			
	s_{yx}	1.4×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.050 ± 0.001	5.96	5.7	0.3
	$b \pm s_b$	$(874 \pm 5) \times 10$			
	s_{yx}	1.0×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
				5.78	
			s_x	0.06	

Tabla X: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Arsenazo III) en la mezcla Arsenazo III-Rojo de metilo, utilizando ΔA como señales analíticas.

La exactitud obtenida es similar en los dos casos, aunque la precisión es superior en el segundo, es decir, cuando el método de adición estándar del punto H se aplica a las longitudes de onda de 551 y 490 nm. El método permite mejorar los resultados variando simplemente las longitudes de onda de medida.

Se aplicó por tanto el método utilizando como señal analítica el valor de ΔA para los valores de 551 y 490 nm. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla X. La concentración de analito es concordante con el valor añadido, y con el obtenido al aplicar el método de adición estándar del punto H, utilizando como señales analíticas las absorbancias.

Mezcla 5: Azul de Timol-Arsenazo III, a pH = 0.90, separación de máximos de absorción 11 nm.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

El Azul de Timol y el Arsenazo III, a este valor de pH tienen máximos en sus bandas de absorción localizados a 545 y 534 nm., siendo por tanto la separación de 11 nm. (figura 16(e)).

El método aplicó a una muestra que contenía Arsenazo III en concentración 4.54×10^{-6} M y Azul de Timol en concentración 8.37×10^{-6} M, siendo el analito este último, y añadiéndolo hasta una concentración de 27.90×10^{-6} M.

De acuerdo con la teoría del método, se midieron los valores de las absorbancias para las diferentes disoluciones a las longitudes de onda de 544 y 524 nm., para las que el interferente (Azul de Timol) presenta la misma absorbancia. De acuerdo con estos valores se obtienen los resultados para las concentraciones de analito que se muestran en la tabla XI. Asimismo aparecen las desviaciones estándar correspondientes a los cinco valores obtenidos.

En la misma tabla aparecen los valores de la concentración de interferente, calculados a partir de la ley de Beer a 544 y 524 nm. para el Azul de Timol, y de los valores de absorbancia, A_H , obtenidos al resolver el sistema de ecuaciones correspondientes.

Como se puede ver en la tabla XI, los valores encontrados para el interferente y el analito están en buena concordancia con los añadidos, para las cinco réplicas estudiadas.

Del estudio de esta mezcla se puede concluir que la forma de las bandas de absorción afectan más a los resultados obtenidos por este método que la separación de los máximos de absorción. En efecto, en esta mezcla la separación es de sólo 11 nm., mientras que en el ejemplo anterior (Arsenazo III-Rojo de metilo, a pH = 0.9) la separación era de 16 nm. Sin embargo, en este caso, una separación de ± 10 nm. con respecto al máximo de absorción es suficiente para obtener resultados exactos y precisos a la vez. Pero cuando el máximo del analito es más ancho que el máximo del interferente, para obtener resultados precisos es necesario usar intervalos de longitud de onda superiores a ± 10 nm.

Con el objeto de contrastar el método con incrementos de absorbancia se aplicó éste en las condiciones ya descritas, obteniéndose una única recta de calibrado. Los valores obtenidos para la concentración de azul de timol se dan en la tabla XII. El valor de la

Método de Adición Estándar		Concentración de analito $\times 10^6 / M$				Concentración de interferente $\times 10^6 / M$								
Réplica	Parámetro	635 nm.	555 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			Añadido	Encontrado		
								Parámetro	635 nm.	555 nm.		A_H	635 nm.	555 nm.
1	a	0.150	0.192	5.58	5.3	5.1	5.5	a	4.4×10^{-3}	-3×10^{-4}	0.100	4.54	4.9	5.0
	b	10097.3	18105.5					b	19704.2	19893.0				
	s_{yx}	1.3×10^{-3}	1.3×10^{-3}				5.3 ± 0.2	s_{yx}	2.7×10^{-3}	1.6×10^{-3}				
	Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal				
2	a	0.150	0.192	5.58	5.3	5.1	5.5				0.097	4.54	4.7	4.9
	b	10087.1	18064.5											
	s_{yx}	7×10^{-4}	1.2×10^{-3}				5.3 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
3	a	0.151	0.194	5.58	5.4	5.2	5.6				0.097	4.54	4.7	4.9
	b	10061.4	18008.2											
	s_{yx}	1.1×10^{-3}	1.7×10^{-3}				5.4 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
4	a	0.152	0.194	5.58	5.4	5.2	5.6				0.096	4.54	4.7	4.9
	b	10209.9	17992.0											
	s_{yx}	1.2×10^{-3}	1.4×10^{-3}				5.4 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
5	a	0.151	0.194	5.58	5.5	5.4	5.6				0.095	4.54	4.6	4.8
	b	10138.2	17982.6											
	s_{yx}	5.0×10^{-3}	4.1×10^{-3}				5.5 ± 0.1							
	Test- t	lineal	lineal											
				\bar{x}	5.4						0.097		4.7	4.9
				s_x	0.1						$I. C.$		0.1	0.1

Tabla XI: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Azul de timol) e interferente (Arsenazo III) en la resolución de la mezcla Azul de Timol-Arsenazo III, a $pH = 0.9$.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

concentración de analito se obtiene por interpolación, hallando un valor para la concentración de analito en concordancia con el valor añadido.

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6$ / M		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(544, 524)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.051 ± 0.001	8.4	8.4	0.5
	$b \pm s_b$	$(606 \pm 7) \times 10$			
	s_{yx}	1.4×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.055 ± 0.001	8.4	8.4	0.7
	$b \pm s_b$	$(65 \pm 1) \times 10^2$			
	s_{yx}	2.4×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.054 ± 0.002	8.4	8.3	0.9
	$b \pm s_b$	$(65 \pm 2) \times 10^2$			
	s_{yx}	4.0×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.056 ± 0.001	8.4	8.8	0.5
	$b \pm s_b$	$(640 \pm 9) \times 10$			
	s_{yx}	1.6×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
5	$a \pm s_a$	0.054 ± 0.001	8.4	8.7	0.6
	$b \pm s_b$	$(620 \pm 9) \times 10$			
	s_{yx}	1.7×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
				8.5	
			s_x	0.2	

Tabla XII: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Azul de timol) en la mezcla Azul de Timol-Arsenazo III, a pH = 0.9, utilizando ΔA como señales analíticas.

Mezcla 6: Azul de Timol-Arsenazo III, a pH = 12.00, separación de máximos de absorción 0 nm.

Para esta mezcla, los máximos de absorción de ambos reactivos a pH = 12.00 se encuentran a 597 nm., como puede verse en la figura 16(f).

Aunque la superposición es total, la diferencia en la forma de ambas bandas hace posible la aplicación del HPSAM, como se demuestra a continuación.

Método de Adición Estándar		Concentración de analito $\times 10^6 / M$		Concentración de interferente $\times 10^6 / M$										
Réplica	Parámetro	635 nm.	555 nm.	Añadido	Encontrado (C_H)	Límite menor de C_H	Límite mayor de C_H	Ley de Beer			Añadido	Encontrado		
								Parámetro	635 nm.	555 nm.		A_H	635 nm.	555 nm.
1	a	0.150	0.192	5.58	5.3	5.1	5.5	a	4.4×10^{-3}	-3×10^{-4}	0.100	4.54	4.9	5.0
	b	10097.3	18105.5					b	19704.2	19893.0				
	s_{yx}	1.3×10^{-3}	1.3×10^{-3}				5.3 ± 0.2	s_{yx}	2.7×10^{-3}	1.6×10^{-3}				
	Test- t	lineal	lineal					Test- t	lineal	lineal	0.097	4.54	4.7	4.9
2	a	0.150	0.192	5.58	5.3	5.1	5.5							
	b	10087.1	18064.5											
	s_{yx}	7×10^{-4}	1.2×10^{-3}				5.3 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
3	a	0.151	0.194	5.58	5.4	5.2	5.6				0.097	4.54	4.7	4.9
	b	10061.4	18008.2											
	s_{yx}	1.1×10^{-3}	1.7×10^{-3}				5.4 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
4	a	0.152	0.194	5.58	5.4	5.2	5.6				0.096	4.54	4.7	4.9
	b	10209.9	17992.0											
	s_{yx}	1.2×10^{-3}	1.4×10^{-3}				5.4 ± 0.2							
	Test- t	lineal	lineal											
5	a	0.151	0.194	5.58	5.5	5.4	5.6				0.095	4.54	4.6	4.8
	b	10138.2	17982.6											
	s_{yx}	5.0×10^{-3}	4.1×10^{-3}				5.5 ± 0.1							
	Test- t	lineal	lineal											
				\bar{x}	5.4						0.097		4.7	4.9
				s_x	0.1						I. C.		0.1	0.1

Tabla XIII: Resultados obtenidos para las concentraciones de analito (Azul de timol) e interferente (Arsenazo III) en la resolución de la mezcla Azul de Timol-Arsenazo III, a pH = 12.0.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

La muestra se preparó conteniendo Arsenazo III en concentración 4.54×10^{-6} M, y Azul de Timol en concentración 5.58×10^{-6} M. Este último era el analito, añadiéndose hasta una concentración de 33.48×10^{-6} M para aplicar el método.

Los valores de absorbancia de las diferentes disoluciones fueron medidos a 635 y 555 nm. En este caso es necesario para obtener buenos resultados utilizar un intervalo de longitudes de onda superior a ± 10 nm.

Las concentraciones encontradas para analito e interferente vienen dadas en la tabla XIII. Como puede verse, los resultados obtenidos son tanto exactos como precisos.

Método de Adición Estándar			Concentración de analito $\times 10^6$ / M		
Réplica	Parámetro	$\Delta A(555, 635)$	Añadido	Encontrado (C_H)	Intervalo de confianza
1	$a \pm s_a$	0.042 ± 0.001	5.6	5.2	0.3
	$b \pm s_b$	$(801 \pm 3) \times 10$			
	s_{yx}	7×10^{-4}			
	Test-t	lineal			
2	$a \pm s_a$	0.042 ± 0.001	5.6	5.3	0.4
	$b \pm s_b$	$(798 \pm 4) \times 10$			
	s_{yx}	9×10^{-4}			
	Test-t	lineal			
3	$a \pm s_a$	0.042 ± 0.001	5.6	5.4	0.4
	$b \pm s_b$	$(795 \pm 4) \times 10$			
	s_{yx}	9×10^{-4}			
	Test-t	lineal			
4	$a \pm s_a$	0.042 ± 0.001	5.6	5.4	0.5
	$b \pm s_b$	$(778 \pm 5) \times 10$			
	s_{yx}	1.2×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
5	$a \pm s_a$	0.043 ± 0.001	5.6	5.5	0.5
	$b \pm s_b$	$(784 \pm 4) \times 10$			
	s_{yx}	1.0×10^{-3}			
	Test-t	lineal			
				5.4	
			s_x	0.1	

Tabla XIV: Resultados obtenidos para la concentración de analito (Azul de timol) en la mezcla Azul de timol-Arsenazo III, a pH = 12.0, utilizando ΔA como señales analíticas.

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO

Asimismo se aplicó el método utilizando como señal analítica el valor de ΔA , obteniéndose una única recta de calibrado. Los resultados de la tabla XIV muestran que la concentración de analito es concordante con el valor añadido.

Máxima separación de las mezclas (nm)	Mezcla	χ^2 de Bartlett	F de Snedecor
65	Azul de timol/Índigo Carmín Líneas a 555 nm Líneas a 535 nm	$\chi^2_{exp} = 6.22$ $\chi^2_{exp} = 8.47$ $\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{exp} = 0.66$ $F_{exp} = 1.79$ $F_{0.95}(8;28) = 2.29$
50	Rojo metilo/Rojo Congo Líneas a 578 nm Líneas a 558 nm	$\chi^2_{exp} = 1.38$ $\chi^2_{exp} = 2.46$ $\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{exp} = 2.12$ $F_{exp} = 0.96$ $F_{0.95}(8;30) = 2.27$
27	Rojo Metilo/Azul Timol Líneas a 528 nm Líneas a 508 nm	$\chi^2_{exp} = 9.30$ $\chi^2_{exp} = 8.41$ $\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{exp} = 2.09$ $F_{exp} = 1.30$ $F_{0.95}(8;30) = 2.27$
16 (A)	Rojo Metilo/Arsenazo III Líneas a 528 nm Líneas a 508 nm Líneas a 551 nm Líneas a 490 nm	$\chi^2_{exp} = 0.05$ $\chi^2_{exp} = 0.02$ $\chi^2_{exp} \sim 0$ $\chi^2_{exp} = 0.04$ $\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$	$F_{exp} = 0.01$ $F_{exp} = 0.02$ $F_{exp} = 1.05$ $F_{exp} = 2.65$ $F_{0.95}(2;6) = 5.14$
16 (B)	Rojo Metilo/Arsenazo III Líneas a 528 nm Líneas a 508 nm Líneas a 551 nm Líneas a 490 nm	$\chi^2_{exp} = 0.82$ $\chi^2_{exp} = 0.75$ $\chi^2_{exp} = 1.64$ $\chi^2_{exp} = 2.46$ $\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$	$F_{exp} = 2.52$ $F_{exp} = 2.35$ $F_{exp} = 1.73$ $F_{exp} = 2.55$ $F_{0.95}(2;6) = 5.14$
11	Azul de Timol/Arsenazo III (pH = 0.90) Líneas a 544 nm Líneas a 524 nm	$\chi^2_{exp} = 5.72$ $\chi^2_{exp} = 1.12$ $\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{exp} = 1.99$ $F_{exp} = 0.53$ $F_{0.95}(8;29) = 5.14$
0	Azul de Timol/Arsenazo III (pH = 12.0) Líneas a 635 nm Líneas a 555 nm	$\chi^2_{exp} = 1.62$ $\chi^2_{exp} = 4.56$ $\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{exp} = 2.33$ $F_{exp} = 0.33$ $F_{0.95}(8;20) = 2.45$

Tabla XV: Resultados obtenidos para el test de Bartlett de homogeneidad de las varianzas y para el test de Snedecor de coincidencia de líneas para cada mezcla ensayada utilizando valores de absorbancia.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

De este sexto ejemplo podemos concluir que el HPSAM permite cuantificar los dos componentes de una mezcla binaria, incluso cuando el solapamiento del máximo de las correspondientes bandas de absorción es total, eligiendo adecuadamente las longitudes de onda de trabajo, siempre que la forma de los espectros sea diferente. Esta es una posibilidad muy importante del método.

Máxima separación de las mezclas (nm)	Mezcla	χ^2 de Bartlett	F de Snedecor
65	Azul de timol	$\chi^2_{exp} = 1.77$	$F_{exp} = 1.76$
	Índigo Carmín	$\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{0.95}(8;18) = 2.51$
50	Rojo Metilo	$\chi^2_{exp} = 2.60$	$F_{exp} = 2.18$
	Rojo Congo	$\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{0.95}(8;24) = 2.36$
27	Rojo Metilo	$\chi^2_{exp} = 1.33$	$F_{exp} = 0.10$
	Azul de Timol	$\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{0.95}(8;28) = 2.29$
16	Rojo Metilo	$\chi^2_{exp} = 4.64$	$F_{exp} = 0.70$
	Arsenazo III	$\chi^2_{0.95}(3) = 7.82$	$F_{0.95}(6;12) = 3.00$
11	Azul de Timol	$\chi^2_{exp} = 9.00$	$F_{exp} = 2.19$
	Arsenazo III (pH = 0.90)	$\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{0.95}(8;29) = 2.28$
0	Azul de Timol	$\chi^2_{exp} = 1.11$	$F_{exp} = 2.33$
	Arsenazo III (pH = 12.0)	$\chi^2_{0.95}(4) = 9.49$	$F_{0.95}(8;20) = 2.49$

Tabla XVI: Resultados obtenidos para el test de Bartlett de homogeneidad de las varianzas y para el test de Snedecor de coincidencia de líneas para cada mezcla ensayada utilizando valores de incremento de absorbancia.

Se estudió la homogeneidad de la varianza de las rectas de calibrado obtenidas en las distintas longitudes de onda para todas las mezclas ensayadas, aplicando el test de Bartlett. Como χ^2_{tab} fue mayor que χ^2_{calc} para todos los conjuntos de líneas rectas obtenidas (tablas XV y XVI), las correspondientes varianzas eran homogéneas. El método de ANOVA también muestra que F_{tab} es mayor que F_{calc} en todos los casos, por lo que las diferentes rectas son coincidentes para las distintas mezclas estudiadas.

En caso de no querer conocer la concentración de interferente, la utilización del valor de ΔA como señal analítica permite obtener los mismos resultados, en exactitud y precisión, para la concentración de analito que el uso de dos rectas de calibrado, con un menor esfuerzo de cálculo. En la tabla XVII se muestran los errores relativos cometidos en la determinación del analito en las seis muestras estudiadas, donde también aparece la pendiente de la recta del método de adición estándar obtenida en cada caso, la absorbancia del interferente a las dos longitudes de onda seleccionadas y la separación entre máximos. Como puede observarse, el error relativo no depende de la absorbancia del interferente, sino de la pendiente de la recta de calibrado. Los resultados fueron muy satisfactorios.

Máxima separación (nm)	A_H	Δ Pendiente	% E _r
65	0.400	3382	5.3
50	0.354	17490	0.0
27	0.401	6642	2.7
16(A)	0.176	8913	-3.0
16(B)	0.230		
11	0.139	6332	1.2
0	0.097	7912	-3.6

Tabla XVII: Error relativo cometido aplicando el HPSAM con valores de incremento de absorbancia para las seis mezclas estudiadas.

Método de calibración de un único patrón

Los datos obtenidos de las seis mezclas fueron procesados según la ecuación (64) para la utilización del método de calibración de un único patrón. Los resultados obtenidos utilizando valores de ΔA se muestran en la tabla XVIII, donde asimismo aparecen las concentraciones de analito encontrada en cada réplica, la concentración media, la desviación estándar y el error relativo cometido en cada determinación.

Los resultados obtenidos fueron lo bastante exactos y precisos para todas las muestras ensayadas como para concluir que el HPSAM, utilizando ΔA como señal analítica, puede ser empleado satisfactoriamente en el trabajo de rutina.

Máxima separación (nm)	$C_{añadida} \times 10^6 / M$	$C_{encontrada} \times 10^6 / M$	$\bar{c} \times 10^6 / M$	$s \times 10^6$	% E_r
65	25.4	43, 36, 36, 40, 39	39	3	2.6
	38.1	42, 37, 38, 40, 39	39	2	2.6
	50.8	44, 38, 39, 41, 40	40	2	5.3
50	6.3	8.0, 8.6, 8.4, 8.0, 7.2	8.0	0.5	1.3
	9.5	8.3, 8.5, 8.2, 7.9, 7.6	8.1	0.3	2.5
	12.6	8.1, 8.5, 8.3, 8.3, 7.8	8.2	0.3	3.8
27	5.5	11.2, 12.2, 11.6, 10.2, 10.6	11.2	0.8	0.0
	11.0	11.5, 11.5, 10.6, 10.6, 11.0	11.0	0.5	-1.8
	16.6	11.4, 11.6, 11.4, 10.2, 10.8	11.1	0.6	-0.9
16	6.0	6.2, 6.0, 6.0, 6.1	6.1	0.1	1.7
	11.9	5.7, 6.0, 5.9, 5.9	5.9	0.1	-1.7
11	5.6	7.8, 9.0, 9.0, 8.6, 7.9	8.5	0.6	1.2
	8.4	8.1, 8.4, 7.9, 8.4, 8.2	8.2	0.2	-2.3
	11.2	8.2, 8.9, 7.9, 8.3, 8.3	8.3	0.4	-1.2
0	5.6	5.4, 5.4, 5.5, 5.7, 5.6	5.5	0.1	-1.8
	11.2	5.4, 5.3, 5.5, 5.7, 5.5	5.5	0.1	-1.8

Tabla XVIII: Resultados obtenidos por el HPSAM utilizando valores de ΔA para el método de calibración de un único patrón, para las seis mezclas analizadas.

4.1.1.1.4.- Determinación espectrofotométrica de fenol y *o*-cresol.

Procedimiento experimental:

El fenol y el *o*-cresol están disponibles comercialmente en un número de grados que generalmente indican el mínimo contenido nominal del fenol.

El HPSAM fue aplicado al grado comercial 82 en fenol y 50 en *o*-cresol. La resolución espectrofotométrica de estas mezclas resulta difícil, debido a que las bandas de absorción, en medio 0.1 M en hidróxido sódico, aparecen a 234 y 287 nm. para el fenol, y a 237 y 289 nm. para el *o*-cresol, y las absorptividades de ambos compuestos aromáticos presentan valores similares (figura 20).

Para el estudio de estas mezclas se prepararon muestras simuladas de la misma composición que el grado 82 en fenol (84:16 fenol:*o*-cresol) y 50 en *o*-cresol (49:49:2 fenol:*o*-cresol:*m/p*-cresol/2,6-xilenol), a partir de fenol y *o*-cresol de calidad reactivo analítico, que se diluyó apropiadamente. No se utilizaron el *m/p*-cresol ni el 2,6-xilenol, debido a que su contribución al espectro interferente en la zona del espectro de interés es pequeña y constante, debido a su extrema dilución.

El método de adición estándar se aplicó a muestras preparadas conteniendo 3.1 mg/L de fenol y originalmente 0.6 mg/L de *o*-cresol, siendo el analito este último, y añadiéndolo hasta una concentración de 6.5 mg/L. Todas las disoluciones fueron preparadas en medio 0.1 M en hidróxido sódico. Los valores de la absorbancia fueron medidos en el intervalo de longitudes de onda de 224-244 nm., correspondientes al primer máximo de absorción del fenol y *o*-cresol.

Se estudió asimismo otra muestra preparada con 10.6 mg/L de fenol y originalmente 2.1 mg/L de *o*-cresol, siendo este último el analito, y añadiéndolo hasta una concentración de 23.5 mg/L. Todas las disoluciones fueron preparadas en medio 0.1 M en hidróxido sódico. Los valores de la absorbancia fueron medidos en el intervalo de longitudes de onda

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

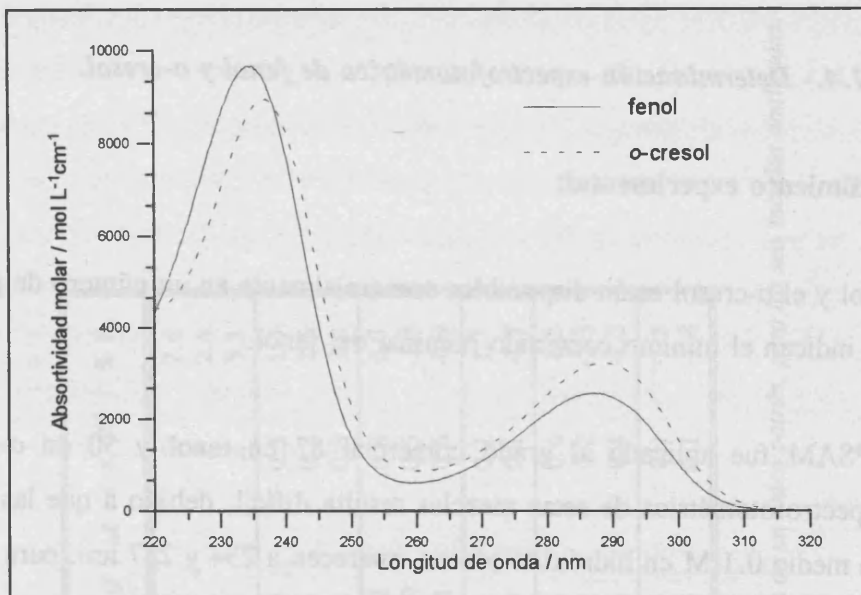


Figura 20: Coeficientes de absortividad molar del fenol y *o*-cresol en medio NaOH 0.1 M.

de 275-302 nm., correspondientes al segundo máximo de absorción de estos hidrocarburos aromáticos.

Para determinar el grado comercial 50% en *o*-cresol se preparó de manera semejante una muestra que contenía 2.0 mg/L de *o*-cresol y 2.0 mg/L de fenol, siendo el analito este último, y añadiéndolo hasta una concentración de 9.1 mg/L. Todas las disoluciones fueron preparadas en medio 0.1 M en hidróxido sódico, y los valores de la absorbancia fueron medidos en el rango de longitudes de onda de 224-244 nm.

Todas las medidas se realizaron en el espectrofotómetro Shimadzu, registrando los valores de absorbancia a las longitudes de onda seleccionadas.

Se realizaron tres réplicas de cada muestra.

Resultados:

Los porcentajes de peso encontrados para el fenol y el *o*-cresol en la muestra de grado 82 vienen dados en la tabla XIX. Los valores del % en peso del *o*-cresol fueron obtenidos a partir del valor de C_H , y los valores del % en peso del fenol a partir del valor de A_H y de

4.1.1.1.- ADICIÓN SIMPLE DE ANALITO

su ley de Beer a las correspondientes longitudes de onda. Los resultados encontrados están en buena concordancia con los añadidos, a pesar de la alta proporción interferente/analito y la pequeña separación entre los máximos de absorción de ambos fenoles.

Grado comercial	Fenol %(peso)			o-Cresol %(peso)		
	añadido	λ medidas	cantidad encontrada	añadido	λ medidas	cantidad encontrada
82	84.0	238,230	83 ± 1	16.0	238,230	16 ± 1
		241,226	83 ± 1		241,226	16.5 ± 0.5
		297,275	82 ± 1		297,275	17 ± 1

Tabla XIX: Composición y resultados obtenidos utilizando el método de adición estándar del punto H al grado comercial 82 del fenol.

Para aplicar el método utilizando valores de ΔA se eligieron dos pares de longitudes de onda para cada grado comercial. En el caso del 82%, se consideró al fenol como interferente, y en el 50%, el o-cresol. Los resultados fueron buenos para todos los casos estudiados, como se ve en la tabla XX. El tanto por ciento de error relativo en la determinación de la concentración de analito fue siempre menor del 10%, en ambos grados comerciales estudiados.

grado comercial	analito	% peso	λ medidas	$C_{encontrada} \pm s_c$
82	o-cresol	16.0	238,230	16 ± 1
			226,241	16.5 ± 0.6
50	fenol	49.0	234,239	49.5 ± 0.5
			229,243	49.0 ± 0.5

Tabla XX: Resultados obtenidos por el HPSAM utilizando valores de ΔA como señales analíticas, para los dos grados comerciales del fenol estudiados.

La aplicación del método a estas mezclas permite mejorar las posibilidades de este método espectrofotométrico de determinación a la hora de aumentar su selectividad. Los métodos de determinación espectrofotométricos para fenoles basados en su espectro de absorción ultravioleta se usan para cuantificar cantidades totales de fenoles en productos petroquímicos, aguas para consumo y oxidantes fenólicos [Svehla, 86].

4.1.1.1.5.- Estudio espectrofluorimétrico de mezclas fenol/o-cresol

En este apartado se muestra la aplicación del HPSAM utilizando medidas de fluorescencia sincrónicas. La determinación seleccionada ha sido la resolución de mezclas binarias fenol/*o*-cresol en medio acuoso, como representativas de especies marcadamente solapadas y en donde la banda de emisión Raman del disolvente solapa la señal de interés. Para eliminar esta interferencia del blanco se ha descrito en la bibliografía [Naley, 83] el cambio de longitud de onda de excitación a valores menores que el óptimo, con el consiguiente descenso en la señal de fluorescencia, y por tanto el aumento de los límites de detección (100 ppb para el fenol y 84 ppb para el *o*-cresol). La utilización de fluorescencia sincrónica permite la resolución de mezclas binarias fenol/*o*-cresol, eliminando la señal debida al blanco.

Procedimiento experimental:

Los calibrados de fenol y *o*-cresol se prepararon para dar concentraciones finales en el intervalo 0.0-250.0 ppb para el fenol y 0.0-300.0 ppb para el *o*-cresol, en medio tampón fosfato pH = 7.0.

Las muestras sintéticas se prepararon conteniendo 49.7 ppb de fenol y 49.5 ppb de *o*-cresol, y se realizó la adición estándar de fenol (hasta 200.0 ppb) y de *o*-cresol (hasta 250.0 ppb). Se añadió 2.5 mL de tampón fosfato, y el volumen final fue asimismo de 25 mL.

Las réplicas de los calibrados y las muestras se midieron en diferentes días.

La temperatura de la celda se mantuvo constante a 20.0 ± 0.1 °C.

Todas las disoluciones se midieron en el espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50, a una velocidad de barrido de 60 nm/min.

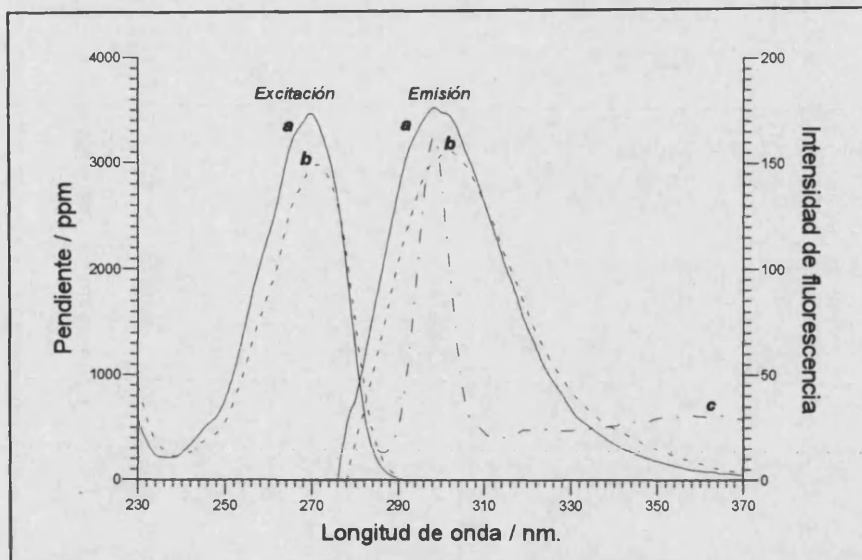


Figura 21: Eje izquierdo:
 Pendientes de las rectas de calibrado de excitación y emisión, en medio acuoso a pH = 7.0 (tampón fosfato), para:
 a) ——— Fenol (λ_{exc} de 230 a 290 nm; $\lambda_{ems} = 300$ nm; λ_{ems} de 276 a 370 nm; $\lambda_{exc} = 270$ nm)
 b) - - - - *o*-cresol (λ_{exc} de 230 a 290 nm; $\lambda_{ems} = 303$ nm; λ_{ems} de 278 a 370 nm; $\lambda_{exc} = 272$ nm)
 Eje derecho:
 c) · · · · · Espectro de emisión para el agua/tampón fosfato (pH = 7.0) (λ_{ems} de 282 a 370 nm; $\lambda_{exc} = 270$ nm)

Resultados:

En disolución acuosa a pH = 7.0, el fenol presenta un máximo de excitación a 270 nm. y el *o*-cresol a 272 nm. Excitando a estas longitudes de onda, el fenol presenta un máximo de emisión a 299 nm. y el *o*-cresol a 302 nm., como se ve en la figura 21 (eje izquierdo). En dicha figura se muestra la pendiente de las curvas de calibrado de excitación y emisión para el fenol y el *o*-cresol. De esta manera no se enmascara la banda de emisión Raman del disolvente en el espectro del analito. Como se puede observar, existe un gran solapamiento entre ambos espectros.

En estas condiciones experimentales, como se muestra en la figura 21 (eje derecho), la banda de emisión Raman del disolvente solapa completamente con los máximos de emisión

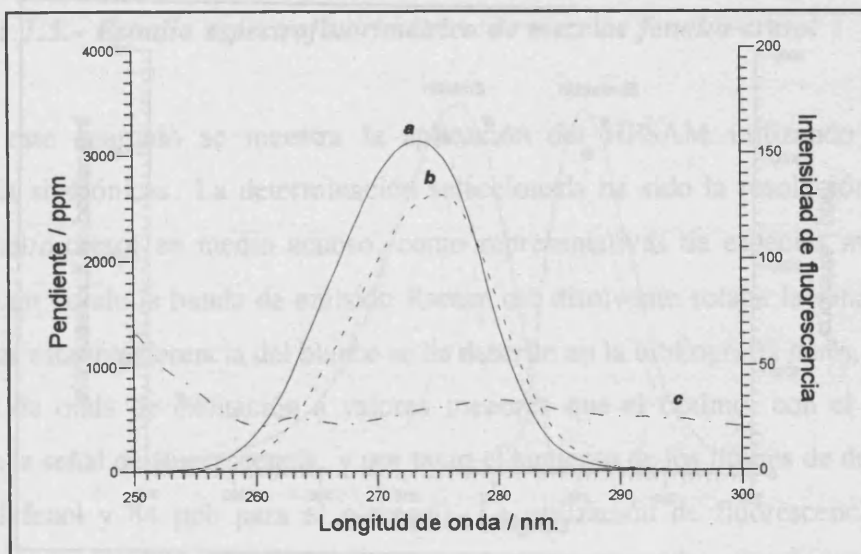


Figura 22: Eje izquierdo:
 Pendientes de las rectas de calibrado de fluorescencia sincrónica (con $\Delta\lambda = 18$ nm.)
 en medio acuoso a pH = 7.0 (tampón fosfato), para:
 a) ————— fenol.
 b) - - - - - o-cresol.
 Eje derecho:
 c) - . - . - Espectro de fluorescencia sincrónica para el agua/tampón fosfato (pH = 7.0).

de los analitos. [Para probar la aplicabilidad del HPSAM en la resolución espectrofluorimétrica de mezclas binarias de fenol y *o*-cresol, hay que eliminar la contribución del blanco. Para ello se probó si la fluorescencia sincrónica podía eliminar dicha señal. Se ensayaron $\Delta\lambda$ de 9 a 42 nm., siendo los mejores resultados los obtenidos al utilizar un $\Delta\lambda = 18$ nm., tal y como se muestra en la figura 22 (eje derecho), donde la banda de emisión Raman para el disolvente ha sido prácticamente eliminada. En estas condiciones, el fenol y el *o*-cresol presentan el comportamiento espectral descrito en la figura 22 (eje izquierdo). Hay que reseñar que la sensibilidad obtenida es muy parecida a la obtenida utilizando fluorescencia de emisión (figura 21).

Seleccionado el $\Delta\lambda$ óptimo para llevar a cabo la determinación, se prepararon muestras binarias sintéticas que contenían 49.7 ppb de fenol y 49.5 ppb de *o*-cresol. Ambos se utilizaron como analitos e interferentes para comprobar si existía diferencias en los resultados obtenidos. Los pares de longitudes de onda seleccionados se muestran en la tabla XXI cuando se considera al *o*-cresol como analito y en la tabla XXII cuando el analito es el fenol. Las concentraciones encontradas en ambos casos se muestran en las mismas tablas.

Resultados obtenidos para el analito (<i>o</i> -cresol) / ppb									
Réplica	$\lambda_y/\lambda_x/\text{nm.}$					$(x \pm s_x)/\text{ppb}$	$\%s_r$	$\%E_r$	
	270.0/276.5	270.5/276.0	271.5/275.5	272.0/275.0	272.5/274.5				
1	49.99	50.91	43.86	48.00	52.82	49.1 \pm 3.4	6.95	-0.75	
2	54.99	55.94	50.59	52.56	55.78	54.0 \pm 2.3	4.31	9.05	
3	53.07	54.87	45.69	47.90	52.10	50.7 \pm 3.8	4.50	2.51	
						media	51.3 \pm 2.5	4.82	3.60

Resultados obtenidos para el interferente (fenol) / ppb									
Réplica	$\lambda_y/\lambda_x/\text{nm.}$					$(x \pm s_x)/\text{ppb}$	$\%s_r$	$\%E_r$	
	270.0/276.5	270.5/276.0	271.5/275.5	272.0/275.0	272.5/274.5				
1	47.57/46.71	47.19/46.01	52.52/52.48	49.22/48.98	45.26/45.00	48.1 \pm 2.7	5.62	-3.24	
2	46.43/45.56	45.69/44.51	49.21/49.12	47.71/47.45	45.21/44.94	46.6 \pm 1.7	3.66	-6.28	
3	46.50/45.63	45.28/44.10	52.23/52.19	50.51/50.29	47.20/46.94	48.1 \pm 3.0	6.17	-3.24	
						media	47.6 \pm 0.9	1.83	-4.25

Tabla XXI: Resultados obtenidos para la resolución de una mezcla fenol (49.7 ppb)/*o*-cresol (49.5 ppb), usando el HPSAM con fluorescencia sincrónica ($\Delta\lambda = 18 \text{ nm.}$), cuando el *o*-cresol es considerado como analito y el fenol como interferente.

Resultados obtenidos para el analito (fenol) / ppb									
Réplica	$\lambda_y/\lambda_x/\text{nm.}$					$(x \pm s_x)/\text{ppb}$	$\%s_r$	$\%E_r$	
	263.0/284.0	263.5/283.5	271.5/278.0	273.0/277.0	274.5/276.0				
1	48.48	48.27	47.55	48.30	52.74	49.1 ± 2.1	4.25	-1.27	
2	53.38	52.30	46.90	48.71	53.19	50.9 ± 2.9	5.74	2.41	
3	50.19	49.61	55.95	43.14	43.09	48.4 ± 5.4	11.20	-2.62	
						media	49.5 ± 1.3	2.62	-0.48

Resultados obtenidos para el interferente (o-cresol) / ppb									
Réplica	$\lambda_y/\lambda_x/\text{nm.}$					$(x \pm s_x)/\text{ppb}$	$\%s_r$	$\%E_r$	
	263.0/284.0	263.5/283.5	271.5/278.0	273.0/277.0	274.5/276.0				
1	48.83/48.15	49.83/48.56	51.93/51.21	51.12/50.86	45.48/45.59	49.2 ± 2.3	4.64	-0.67	
2	44.38/43.63	45.61/44.37	53.27/52.57	51.36/51.11	45.78/45.90	47.8 ± 3.8	7.94	-3.41	
3	48.26/47.57	49.08/47.82	39.96/39.04	56.58/56.40	56.86/57.05	49.9 ± 6.8	13.64	0.75	
						media	48.9 ± 1.0	2.14	-1.11

Tabla XXII: Resultados obtenidos para la resolución de una mezcla fenol (49.7 ppb)/o-cresol (49.5 ppb), usando el HPSAM con fluorescencia sincrónica ($\Delta\lambda = 18 \text{ nm.}$), cuando el fenol es considerado como analito y el o-cresol como interferente.

Los resultados muestran una gran exactitud y precisión, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos métodos [Miller, 93]. Las varianzas son homogéneas, puesto que $F_{calc} < F_{0.95}(2;2) = 19.00$, siendo F_{calc} 2.09 y 6.25 cuando el analito es el fenol y el *o*-cresol respectivamente. Las medias no serían iguales si $t_{calc} > t_{0.95}(4) = 2.776$. Para ambos procedimientos t_{calc} es 2.077 y 1.547 cuando el analito es el fenol y el *o*-cresol respectivamente. Por tanto las medias son estadísticamente iguales.

4.1.1.1.6.- Conclusiones.

De todo este estudio se concluye que desde el punto de vista práctico es igual de poderoso en la determinación del analito el método de adición estándar del punto H que utiliza como señal analítica la absorbancia que el que utiliza incrementos de absorbancia. Este método puede utilizarse siempre que no sea necesario la determinación del interferente, ganando en sencillez. También, y de una forma clara, queda totalmente establecido que el incremento de absorbancia obtenido de acuerdo con las bases del método está única y exclusivamente relacionado con la concentración de analito, principio básico en el que se apoya el método propuesto.

Destacar además que ambas posibilidades del método resuelven con éxito situaciones difíciles desde el punto de vista analítico, y proporcionan resultados satisfactorios en un amplio margen de situaciones espectrofotométricas, siendo superior a la espectroscopía derivativa, y consiguiéndolo de una forma sencilla y rápida. También queda reflejado como el método es capaz de transformar los errores incorregibles debidos a la presencia de un interferente directo, en errores corregibles de tipo constante, de lo que se deriva que la concentración analítica se calcula exenta de cualquier tipo de error sistemático, debido a las propiedades intrínsecas del método de adición estándar para eliminar además los errores de tipo proporcional.

Se ha demostrado asimismo que las bases del HPSAM son extensibles a determinaciones espectrofluorimétricas, permitiendo la resolución de mezclas binarias. Estas ventajas se han demostrado particularmente útiles en la determinación de fenol y *o*-cresol, donde el método proporciona buenos resultados, sin la pérdida de sensibilidad que la metodología

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

usual propone (cambio de la longitud de onda de excitación a valores menores), ni la necesidad de técnicas de separación.

4.1.1.2.- DOBLE ADICIÓN DE ANALITO.

Esta variante del HPSAM permite la resolución de mezclas binarias de **X** e **Y** realizando la adición estándar simultánea de ambas especies, obteniéndose su concentración en la muestra a partir de una única serie de calibrado. Los datos necesarios para aplicar el método son las señales analíticas de la muestra y de la muestra a la que se han adicionado cantidades conocidas de **X** e **Y**, a las longitudes de onda previamente seleccionadas.

4.1.1.2.1.- Fundamentos teóricos.

La aplicación del método para obtener la concentración de **X** en la muestra requiere la selección de longitudes de onda λ_j y λ_k en las cuales se cumpla que la especie **Y** presente la misma absorbancia (figura 23):

$$A_{Y,j} = A_{Y,k} \quad (70)$$

La relación de concentraciones añadidas de especies **X** e **Y**, $\frac{C_Y^i}{C_X^i}$, es la misma en todas

las disoluciones preparadas para aplicar el método (puesto que la adición se realiza a partir de una mezcla patrón de ambos). Por lo tanto, las ecuaciones de las rectas que describen la señal analítica de las sucesivas adiciones estándar por aplicación del HPSAM frente a la concentración añadida de analito **X** a las longitudes de onda seleccionadas serán (figura 24):

$$\begin{aligned} \text{Para } \lambda_j: A_j &= A_{X,j}^0 + A_{Y,j}^0 + M_{X,j} \times C_X^i + M_{Y,j} \times C_Y^j = \\ &= A_{X,j}^0 + A_{Y,j}^0 + M_{X,j} \times C_X^i + M_{Y,j} \times \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times C_X^i = \\ &= A_{X,j}^0 + A_{Y,j}^0 + \left[M_{X,j} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,j} \right] \times C_X^i; (i=0,1,\dots,n) \end{aligned} \quad (71)$$

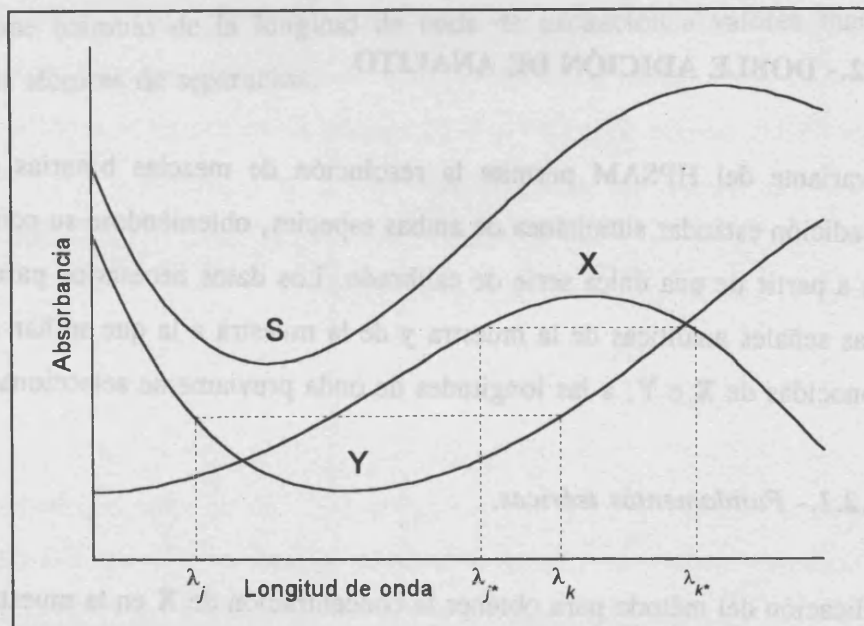


Figura 23: Espectros de los analitos X e Y, y de la muestra S.

$$\begin{aligned}
 \text{Para } \lambda_k: A_k &= A_{X,k}^0 + A_{Y,k}^0 + M_{X,k} \times C_X^i + M_{Y,k} \times C_Y^i = \\
 &= A_{X,k}^0 + A_{Y,k}^0 + M_{X,k} \times C_X^i + M_{Y,k} \times \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times C_X^i = \\
 &= A_{X,k}^0 + A_{Y,k}^0 + \left[M_{X,k} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,k} \right] \times C_X^i; \quad (i=0,1,\dots,n) \quad (72)
 \end{aligned}$$

donde A_j y A_k son las señales analíticas medidas a las dos longitudes de onda previamente seleccionadas; $A_{X,j}^0$, $A_{Y,j}^0$, $A_{X,k}^0$ y $A_{Y,k}^0$ son las señales debidas a las especies X e Y a las longitudes de onda λ_j y λ_k en la disolución que sólo contiene muestra; $M_{X,j}$ y $M_{Y,j}$ y $M_{X,k}$ y $M_{Y,k}$ son las pendientes debidas a la adición de X e Y en las rectas obtenidas a λ_j y λ_k ; C_X^i y C_Y^i son las concentraciones de X e Y añadidas en la disolución i ; n es el número de adiciones realizadas. Cuando $i = 0$ se tiene la disolución que solo contiene muestra. Para cualesquiera dos longitudes de onda que cumplan la condición de presentar la misma absorbancia para la especie Y son extensibles las ecuaciones descritas, por lo que para un problema dado siempre se pueden obtener varias estimaciones de la concentración.

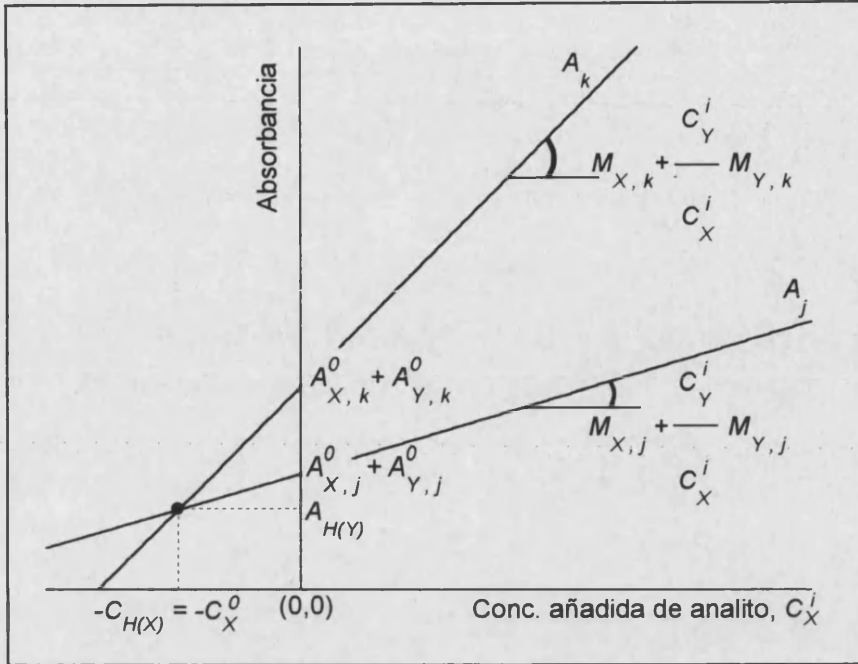


Figura 24: Rectas obtenidas por aplicación del HPSAM con doble adición de analito.

Si se representa la señal analítica a las dos longitudes de onda λ_j y λ_k frente a la concentración añadida de analito X, se obtienen dos líneas rectas, con ordenadas en el origen $A_{X,j}^0 + A_{Y,j}^0$

y $A_{X,k}^0 + A_{Y,k}^0$ y pendientes $M_{X,j} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,j}$ y $M_{X,k} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,k}$. Las pendientes

obtenidas son las mismas que se obtendrían si la adición se realizara con analito X sólo, con la suma de una constante, que depende de la concentración relativa de cada especie en el patrón y de la señal analítica de la especie Y a las longitudes de onda seleccionadas. Ambas líneas intersecan en el punto H, de coordenadas $(-C_{H(X)}, A_{H(Y)})$, donde $C_{H(X)}$ es la concentración de analito X en la muestra. Si operamos en las ecuaciones (71) y (72), y teniendo en cuenta que $A_{Y,j} = A_{Y,k}$, y que por tanto $M_{Y,j} = M_{Y,k}$ (ecuación 70):

$$\begin{aligned}
 & A_{X,j}^0 + A_{Y,j}^0 + \left[M_{X,j} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,j} \right] \times (-C_{H(X)}) = \\
 & = A_{X,k}^0 + A_{Y,k}^0 + \left[M_{X,k} + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,k} \right] \times (-C_{H(X)}) \quad (73)
 \end{aligned}$$

de donde:

$$-C_{H(X)} = \frac{(A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0) + (A_{Y,j}^0 - A_{Y,k}^0)}{(M_{X,k} - M_{X,j}) + \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times (M_{Y,k} - M_{Y,j})} = \frac{A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0}{M_{X,k} - M_{X,j}} \quad (74)$$

$C_{H(X)} = C_X^0$ es la concentración de analito X en la muestra, puesto que la ecuación (74) depende sólo de variables relacionadas con el analito, y es equivalente a las siguientes expresiones:

$$-C_{H(X)} = \frac{A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0}{M_{X,k} - M_{X,j}} = \frac{-A_{X,j}^0}{M_{X,j}} = \frac{-A_{X,k}^0}{M_{X,k}} \quad (75)$$

Por tanto, el error incorregible debido a la presencia de un interferente, y a pesar de que su concentración no es constante a lo largo de las distintas disoluciones, ha sido transformado en un error sistemático constante, que es fácilmente evaluable, como las bases teóricas del HPSAM predicen. En efecto, si se sustituye el valor de la ecuación (75) en las ecuaciones (71) ó (73), se puede demostrar que $A_{H(Y)}$ equivale a:

$$A_{H(Y)} = A_{Y,j}^0 - \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,j} \times C_{H(X)} = A_{Y,k}^0 - \frac{C_Y^i}{C_X^i} \times M_{Y,k} \times C_{H(X)} \quad (76)$$

Del mismo modo que para la especie X, se pueden derivar las siguientes expresiones para la determinación de Y, seleccionado dos longitudes de onda λ_{j^*} y λ_{k^*} donde la especie X presente la misma señal analítica:

$$A_{X,j^*} = A_{X,k^*} \quad (77)$$

De manera análoga a las expresiones (74) y (76) se obtiene que:

$$-C_{H(Y)} = \frac{A_{Y,j^*}^0 - A_{Y,k^*}^0}{M_{Y,k^*} - M_{Y,j^*}} \quad (78)$$

y

$$A_{H(X)} = A_{X,j}^0 - \frac{C_X^i}{C_Y^i} \times M_{X,j} \times C_{H(Y)} = A_{X,k}^0 - \frac{C_X^i}{C_Y^i} \times M_{X,k} \times C_{H(Y)} \quad (79)$$

donde $C_{H(Y)} = C_Y^0$ es la concentración de analito Y en la muestra.

La precisión de los resultados obtenidos depende del valor del denominador en las ecuaciones (74) y (78). Cuanto más alto sea dicho valor, mayor será la precisión obtenida.

Además, la precisión también dependerá de la relación entre $\frac{C_Y^i}{C_X^i}$ y la composición de la

muestra.

4.1.1.2.2.- Estudio de diferentes mezclas fenol/o-cresol.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, el fenol y el *o*-cresol, en medio básico, presentan espectros de absorción fuertemente solapados. Son por tanto un buen ejemplo para estudiar la aplicabilidad del método propuesto.

Procedimiento experimental.

Se prepararon disoluciones patrón de 1000 ppm de fenol y *o*-cresol, a partir de las cuales se prepararon las muestras sintéticas y las adiciones. Todas las disoluciones fueron preparadas en un medio 0.1 M en NaOH, y medidas, cada 0.2 nm., entre 220 y 310 nm. en el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda 16.

Resultados.

Para comprobar la aplicabilidad de HPSAM se prepararon tres situaciones experimentales diferentes. En la tabla XXIII se da la composición de cada una de las muestras, así como el intervalo de concentraciones añadidas para cada uno de los analitos. Las muestras B y C tienen la misma composición, pero no así el patrón añadido. Se pretende estudiar de esta forma la influencia que tiene en el resultado obtenido tanto la diferencia de

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

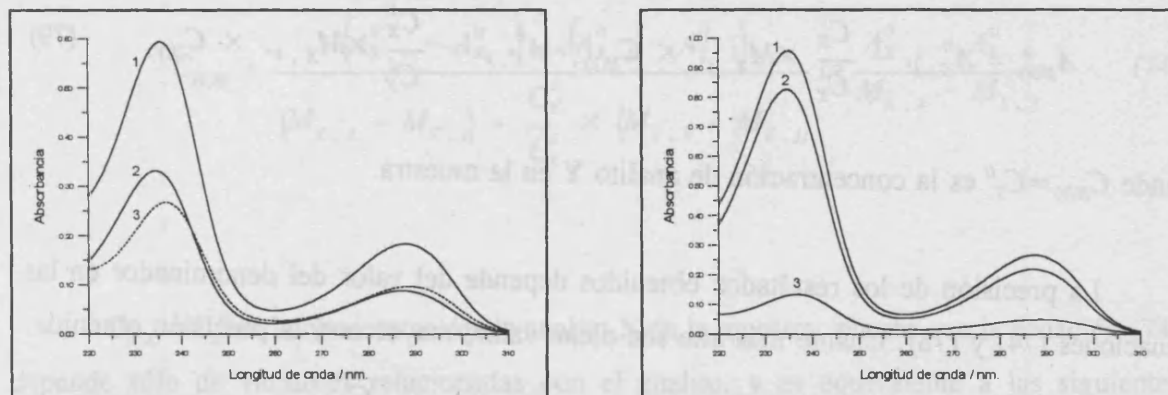


Figura 25: Espectros de: a) Muestra A (1:muestra; 2:fenol; 3:o-cresol)
 b) Muestras B y C (1:muestra; 2:fenol; 3:o-cresol)
 Composiciones en tabla XXIII

MUESTRA	A	B	C
$C(\text{fenol}) \times 10^5/\text{M}$	3.43	8.57	8.57
$C(o\text{-cresol}) \times 10^5/\text{M}$	2.99	1.50	1.50
$C(\text{fenol}) \text{ a\u00f1adida} \times 10^5/\text{M}$	0-4.28	0-4.28	0-10.71
$C(o\text{-cresol}) \text{ a\u00f1adida} \times 10^5/\text{M}$	0-3.74	0-3.74	0-1.87

Tabla XXIII: Composición de las tres muestras ensayadas, e intervalo de concentraciones de analito a\u00f1adidas en la adici\u00f3n est\u00e1ndar.

concentraciones de ambas especies en la muestra, como la del cociente $\frac{C_Y^i}{C_X^i}$ en el patr\u00f3n preparado con respecto a la concentraci\u00f3n de analitos en la muestra. Los espectros resultantes se muestran en la figura 25.

Para aplicar el m\u00e9todo hay que encontrar pares de longitudes de onda donde cada especie presente la misma absorbancia. Para ello se prepararon series de calibrados de fenol y de *o*-cresol puros. Con los datos de all\u00ed obtenidos, se seleccionaron pares de longitudes de onda donde ambos presentasen la misma absorbancia, de acuerdo con las ecuaciones (70) y (77). Dado el elevado n\u00famero de puntos registrados, se obtuvieron una gran cantidad de pares de longitudes de onda donde se cumpl\u00eda dicho requisito.

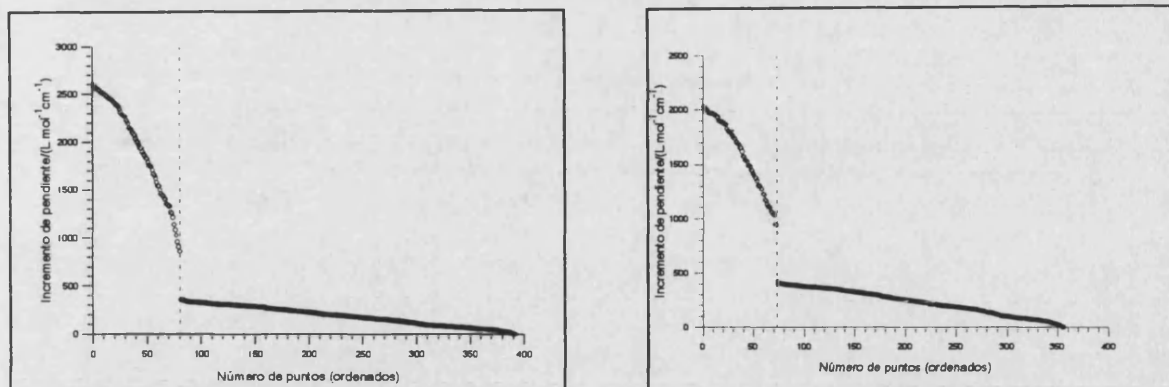


Figura 26: Representación del valor del incremento de pendiente como función del número de pares d e longitudes de onda seleccionadas para:

- a) fenol.
- b) *o*-cresol.

La optimización de la señal de medida se realiza siguiendo el criterio de que se obtenga el máximo valor del denominador en las ecuaciones (74) y (78). Estas ecuaciones pueden entenderse como un cociente de un incremento de absorbancia, ΔA , y un incremento de pendientes, ΔM . ΔM depende de las características espectrales del analito e interferente, mientras que ΔA también depende de la concentración de analito en la muestra. En la figura 26 se ha representado, para ambos analitos, el valor del incremento de pendiente (incremento de absorptividad molar) para cada par de longitudes de onda, ordenados de forma decreciente. Es fácil observar que existe un número crítico (ochenta puntos para el fenol y setenta y tres para el *o*-cresol), a partir del cual el valor de dicho incremento es tan pequeño que no servirían para obtener buenos resultados.

Para optimizar el mejor número de pares de longitudes de onda con los que trabajar, se estudió la diferencia en los resultados obtenidos seleccionando diferentes números. En la tabla XXIV se presenta el caso de la muestra A y en la tabla XXV los obtenidos para las muestra B y C. Se puede deducir fácilmente que no existen diferencias entre seleccionar todos los pares o sólo un número más pequeño. Por tanto, y para simplificar los cálculos, se podría trabajar con valores de incremento de pendiente mayores de $2500 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para el fenol (once puntos) y $2000 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ para el *o*-cresol (cuatro puntos).

Se debe reseñar que los resultados para la muestra A, donde ambas especies presentan similares valores de absorbancia, son altamente exactos y precisos, a pesar del gran solapamiento espectral que presentan.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

DETERMINACIÓN DE FENOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente / (L × mol ⁻¹ × cm ⁻¹)	(Conc. media ± desviación estándar) × 10 ⁵ /M	% error relativo	% R.S.D
11	2500	3.44 ± 0.06	0.43	1.53
41	2000	3.45 ± 0.05	0.55	1.33
62	1500	3.44 ± 0.04	0.34	1.13
77	1000	3.43 ± 0.05	0.22	1.42
80	862	3.43 ± 0.05	0.12	1.53

DETERMINACIÓN DE *o*-CRESOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente / (L × mol ⁻¹ × cm ⁻¹)	(Conc. media ± desviación estándar) × 10 ⁵ /M	% error relativo	% R.S.D
4	2000	3.02 ± 0.03	0.79	1.01
44	1500	3.05 ± 0.03	2.02	1.01
71	1000	3.06 ± 0.04	2.33	1.31
73	939	3.06 ± 0.04	2.42	1.21

Tabla XXIV: Resultados obtenidos para la muestra A (tres réplicas), usando diferente número de longitudes de onda para calcular las concentraciones.

En las muestras B y C, donde existe una mayor diferencia de concentraciones entre ambas especies, y por tanto una mayor diferencia de absorbancias, los resultados obtenidos para el fenol, la especie mayoritaria, son buenos en ambos casos, como era de esperar. En cuanto al *o*-cresol, cuya contribución a la señal analítica es menor, se obtienen errores relativos mayores. Sin embargo, el valor obtenido comprende al valor real con unos límites de confianza del 95%. Hay que resaltar por último que para la muestra C, donde la composición del patrón es más parecida a la de la muestra que en la muestra B, la desviación estándar de los resultados obtenidos es aproximadamente la mitad. Se deduce por tanto que cuanto más cercanas sean las composiciones de la muestra y del patrón, se obtendrán resultados más precisos. Ello puede resultar de utilidad cuando se estudian muestras donde existe una gran diferencia en la contribución de cada especie a la señal analítica total, como es el caso de la estudiada.

4.1.1.2.- DOBLE ADICIÓN DE ANALITO

MUESTRA B:

DETERMINACIÓN DE FENOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente $/(L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/\text{M}$	% error relativo	% R.S.D
11	2500	8.39 ± 0.20	-2.10	2.33
41	2000	8.45 ± 0.19	-1.40	2.30
62	1500	8.47 ± 0.21	-1.17	2.51
77	1000	8.52 ± 0.20	-0.58	2.37
80	862	8.56 ± 0.18	-0.12	2.15

DETERMINACIÓN DE *o*-CRESOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente $/(L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/\text{M}$	% error relativo	% R.S.D
4	2000	1.66 ± 0.21	10.67	12.91
44	1500	1.50 ± 0.23	0.00	15.13
71	1000	1.50 ± 0.26	0.00	17.19
73	939	14.9 ± 0.27	-0.67	18.13

MUESTRA C:

DETERMINACIÓN DE FENOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente $/(L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/\text{M}$	% error relativo	% R.S.D
11	2500	8.62 ± 0.13	0.58	1.53
41	2000	8.57 ± 0.16	0.00	1.83
62	1500	8.57 ± 0.15	0.00	1.77
77	1000	8.58 ± 0.19	0.12	2.16
80	862	8.57 ± 0.20	0.00	2.36

DETERMINACIÓN DE *o*-CRESOL

Número de puntos	Incremento mínimo de pendiente $/(L \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1})$	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/\text{M}$	% error relativo	% R.S.D
4	2000	1.66 ± 0.11	10.67	6.52
44	1500	1.65 ± 0.08	10.00	4.78
71	1000	1.72 ± 0.13	14.67	7.42
73	939	1.73 ± 0.12	15.33	7.04

Tabla XXV: Resultados obtenidos para las muestras B y C (tres réplicas), usando diferente número de longitudes de onda para calcular las concentraciones.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Como se ha mencionado, el ΔA depende de la concentración de analito, por lo que a continuación se realizará un estudio para determinar su influencia en la precisión y exactitud de los resultados.

Para ello, las ecuaciones (74) y (78) se pueden reescribir como:

$$C = \frac{\Delta A}{\Delta M} \quad (80)$$

de donde:

$$\left[\frac{s_C}{C} \right]^2 = \left[\frac{s_{\Delta A}}{\Delta A} \right]^2 + \left[\frac{s_{\Delta M}}{\Delta M} \right]^2 \quad (81)$$

siendo

$$s_{\Delta A}^2 = s_{A_1}^2 + s_{A_2}^2 \quad (82)$$

y

$$s_{\Delta M}^2 = s_{M_1}^2 + s_{M_2}^2 \quad (83)$$

las correspondientes varianzas, C la concentración de analito y s_C su desviación estándar.

De acuerdo con los resultados obtenidos, $\frac{s_M}{M} \approx 0.01$ y $s_{A_1} \approx s_{A_2}$. Por tanto, y para

diferentes valores de s_A e ΔA , los valores del cociente $\frac{s_C}{C}$ serán diferentes, como se muestra

en la figura 27. De dicha figura se deduce que existe un valor de ΔA a partir del cual la varianza de los resultados obtenidos puede suponerse constante. Si fijamos un valor para

$\frac{s_C}{C} \approx 0.05$, es decir, que la imprecisión de los resultados obtenidos sea menor del 5%

(requisito habitual), se tiene que $\Delta A = 0.02$ si $s_A = 1 \times 10^{-3}$; $\Delta A = 0.06$ si $s_A = 3 \times 10^{-3}$ o $\Delta A = 0.095$ si $s_A = 5 \times 10^{-3}$.

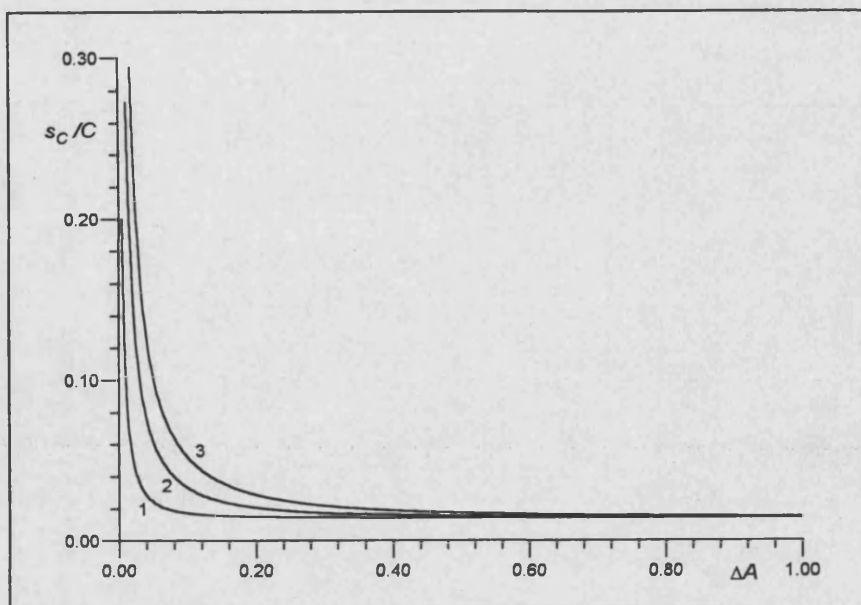


Figura 27: Gráficas obtenidas representando s_c/C vs ΔA para a) $s_A = 10^{-3}$; b) $s_A = 3 \times 10^{-3}$ y c) $s_A = 5 \times 10^{-3}$.

Si representamos los valores obtenidos para el cociente $\frac{e_c}{C}$ (e_c es el error absoluto cometido para cada determinación individual) para las tres muestras ensayadas y los dos analitos que las componen, se obtiene la figura 28. Puede observarse que el fenol está siempre bien estimado, pues sus valores de ΔA son siempre lo suficientemente elevados. En cuanto a los resultados obtenidos para el *o*-cresol, los de la muestra A son mejores que los de las muestras B y C, debido al mayor valor de ΔA que presenta en dicha muestra. Sin embargo, la estimación de dicho compuesto es aceptable para las muestras B y C, (tabla XXV), aunque estemos cerca del límite de aplicabilidad del método.

Cuando se sabe que el procedimiento no está afectado de efecto matriz, la metodología expuesta puede ser simplificada, sin necesidad de efectuar la adición estándar, utilizando como la ecuación (74) para la especie X y la ecuación (78) para la especie Y. Como valores de ΔA se utilizan los medidos para la muestra y para ΔM los obtenidos para las rectas de calibrado de las especies puras. Los resultados obtenidos aplicando este criterio se muestran en la tabla XXVI, de donde se deduce, comparándolos con los de tabla XXIV y XXV, que los resultados tienen una mayor dispersión. Cuando las señales analíticas son del mismo orden para ambas especies, no existe gran diferencia entre la aplicación de ambos

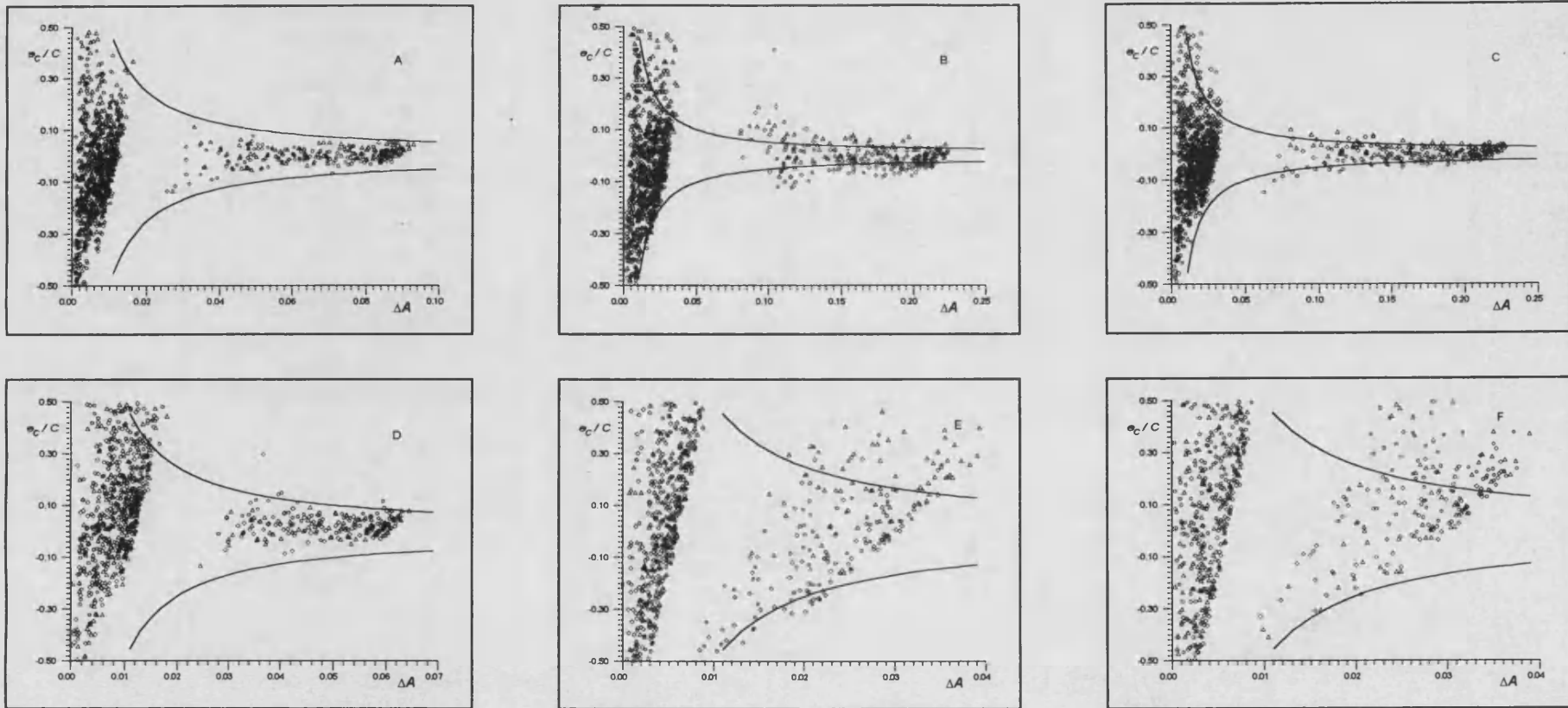


Figura 28: Gráficas obtenidas representando e_c/C vs ΔA para: a) fenol en la muestra A; b) fenol en la muestra B; c) fenol en la muestra C; d) o-cresol en la muestra A; e) o-cresol en la muestra B y e) o-cresol en la muestra C. Con línea continua se ha remarcado el valor de s_c/C para $s_A = 5 \times 10^3$.

4.1.1.2.- DOBLE ADICIÓN DE ANALITO

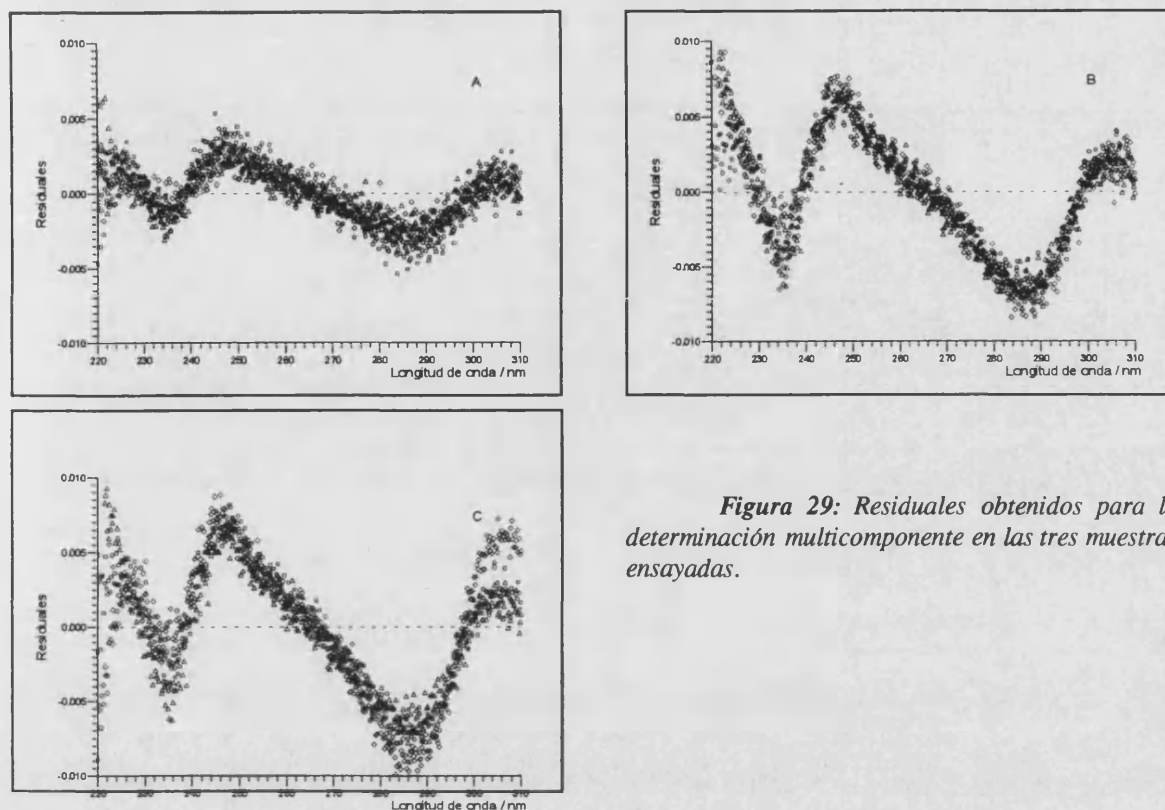


Figura 29: Residuales obtenidos para la determinación multicomponente en las tres muestras ensayadas.

métodos, pero si una especie contribuye mucho más que la otra, los resultados obtenidos para la especie minoritaria estarán afectados de mayor error.

Por otro lado se aplicó la calibración multivariada a las muestras, utilizando los 451 puntos medidos. Los resultados se dan en la tabla XXVII. La figura 29 representa los residuales obtenidos aplicando el método multivariado a las tres muestras, no obteniéndose residuales mayores de 0.01 u.a. en ningún caso. Esto nos haría suponer una buena exactitud en los resultados obtenidos. Sin embargo, dichos valores son peores que los obtenidos por el HPSAM con doble adición (tablas XXIV y XXV), incluso con valores de ε (tabla XVI). La exactitud mejora extraordinariamente para el *o*-cresol en las muestras B y C.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

MUESTRA	ANALITO	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/M$	%Error relativo	R.S.D.
A	fenol	3.56 \pm 0.13	3.79	3.53
	<i>o</i> -cresol	3.06 \pm 0.12	2.27	3.82
B	fenol	8.60 \pm 0.28	0.40	3.24
	<i>o</i> -cresol	1.72 \pm 0.28	15.24	16.23
C	fenol	8.59 \pm 0.45	0.19	5.22
	<i>o</i> -cresol	1.80 \pm 0.45	20.39	25.17

*Tabla XXVI: Resultados obtenidos para las muestras A, B y C (tres réplicas de cada), utilizando once pares de longitudes de onda para calcular la concentración de fenol y cuatro pares para calcular el *o*-cresol, sin utilizar el método de la adición estándar.*

MUESTRA	ANALITO	(Conc. media \pm desviación estándar) $\times 10^5/M$	%Error relativo	R.S.D.
A	fenol	3.16 \pm 0.10	-7.76	3.05
	<i>o</i> -cresol	3.42 \pm 0.10	14.37	2.96
B	fenol	7.74 \pm 0.22	-9.72	2.89
	<i>o</i> -cresol	2.58 \pm 0.26	72.73	10.04
C	fenol	7.71 \pm 0.40	-10.00	5.14
	<i>o</i> -cresol	2.61 \pm 0.38	74.40	14.44

Tabla XXVII: Resultados obtenidos para las tres muestras (tres réplicas de cada), utilizando determinación multicomponente.

4.1.1.2.3.- Conclusiones.

Se ha demostrado que el HPSAM permite cuantificar los dos analitos de una mezcla binaria efectuando la adición estándar simultánea de ambas especies. Los pares de longitudes de onda con los que trabajar se seleccionan fácilmente, y pueden ser optimizados para obtener los resultados más precisos. Las muestras ensayadas como ejemplos, mezclas binarias de fenol y *o*-cresol, con espectros fuertemente solapados, demuestran que se obtienen resultados exactos y precisos, incluso en los casos más desfavorables en donde la señal

4.1.1.2.- DOBLE ADICIÓN DE ANALITO

analítica de una de las especies es mucho menor que la de la otra. En estos casos, una adecuada elección de la concentración del patrón puede mejorar la precisión de los resultados obtenidos. Los resultados del HPSAM son mejores que los que se obtienen aplicando calibración multivariada.

4.1.1.3.- APLICACIÓN A SISTEMAS DINÁMICOS: CLAR.

Cuando la superposición de señales cromatográficas no puede eliminarse fácilmente mediante la modificación de los parámetros experimentales que gobiernan la separación, tales como la columna, naturaleza del eluyente, etc., se puede intentar recurrir a la resolución matemática de las mismas.

Este tipo de alternativas, que son derivadas de las que se reflejan en el apartado de introducción, han experimentado un notable desarrollo durante los últimos años, debido a la proliferación de los sistemas de detección multicanal, que han permitido obtener y almacenar información exhaustiva de cada muestra, a la vez que han facilitado el tratamiento matemático de dicha información.

De entre las numerosas estrategias propuestas con esta finalidad, cabe comenzar con la transformación en sus derivadas de primer o segundo orden, o incluso superior, de las matrices de datos $A-\lambda$ o $A-t$ [Fell, 82; Fell, 83; Grant, 85]. En particular, la segunda derivada de los perfiles de elución ha sido extensamente utilizada en la determinación del grado de pureza de un pico cromatográfico, ya que directamente, o a través de relaciones entre señales generadas, indica de una forma nítida la existencia de impurezas. Esta alternativa también ha sido utilizada con fines cuantitativos.

Otra de las propuestas más utilizadas es la supresión espectral de la contribución de uno de los componentes a la señal cromatográfica total. En este caso se requiere el conocimiento previo del espectro de absorción del compuesto cuya señal se desea suprimir [Berg, 75; Carter, 82; Fell, 83B].

Ebel y Mueck [Ebel, 88] compararon cuatro técnicas diferentes para la evaluación cuantitativa de especies que originan picos cromatográficos solapados cuando se dispone de sus espectros. La comparación incluyó la técnica de supresión de picos, la primera derivada de la señal cromatográfica, la generación de cromatogramas a través de sistemas de polinomios ortogonales y el análisis multicomponente por mínimos cuadrados propuesto por

Milano [Milano, 78]. Estos autores obtuvieron los mejores resultados mediante la aplicación de las técnicas de supresión de picos y el análisis multicomponente.

D'Allura y Juvet [D'Allura, 82] han propuesto otro método de mínimos cuadrados aplicable a cromatografía líquida, basado en los datos de absorbancia de cada componente a diferentes tiempos a lo largo del pico cromatográfico, que se ajustan a polinomios de segundo grado. Las concentraciones de cada componente en la mezcla son determinadas resolviendo el sistema de ecuaciones no lineales obtenido. Este tratamiento puede proporcionar resultados apropiados siempre que los componentes de la mezcla sean eluidos a tiempos ligeramente diferentes, o que presenten espectros lo suficientemente diferenciados. Cuando las posiciones relativas de cada componente de la mezcla se modifican, el método requiere correcciones adicionales.

En los últimos años han aparecido algunos métodos basados en el análisis factorial, que no requieren el conocimiento previo de los espectros de cada componente [Sharaf, 86B], siendo posible la resolución cuando cada pico cromatográfico corresponde a un máximo de tres componentes, cuando el solapamiento entre las señales no es muy acusado, o cuando los espectros de cada componente son lo suficientemente diferentes [Osten, 84; Lacey, 86].

En [Sánchez, 86; 87B] se ha aplicado el *rank annihilation method* que emplea las matrices de datos $A-t-\lambda$, y permite la cuantificación del analito en presencia de un interferente que no esté presente en los patrones utilizados para construir las curvas de calibrado, aunque requiere que los tiempos de retención tanto del analito como del interferente permanezcan constantes en muestras y patrones.

Otras alternativas están basadas en la utilización del algoritmo SIMPLEX [Cela, 83] y del filtro de Kalman. Así, Hayashi *et al* [Hayashi, 87] han propuesto un modelo menos general que los anteriores, pero cuyos cálculos son menos costosos. Sin embargo este método no es adecuado cuando el solapamiento de los picos cromatográficos es muy acusado, cuando los espectros de los componentes de la mezcla son muy parecidos, cuando el proceso de inyección de muestra es poco reproducible o cuando los tiempos de retención se modifican ligeramente [Hayashi, 87B]. Recientemente se ha estudiado la exactitud y precisión del método

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

cuando el pico del analito se superpone con el pico de un interferente desconocido [Hayashi,93].

Barker y Brown [Barker,89] han descrito un nuevo modelo iterativo, que no necesita correcciones en la posición o características de cada señal, aunque no proporciona resultados adecuados cuando en el cromatograma aparecen señales que no han sido incluidas en el modelo.

Poe y Rutan [Cecil,91; Poe,93] estudiaron la exactitud y precisión de diversas estrategias, utilizando datos de fluorescencia obtenidos con un detector de fila de diodos adaptado. Ensayaron valores de altura de pico, de área de pico, análisis factorial, *generalized rank annihilation method*, *GRAM* y el filtro de Kalman ajustable. En caso de solapamiento acusado, los resultados más precisos se obtuvieron aplicando el *GRAM*.

A continuación se desarrolla el HPSAM, ampliando las bases previamente descritas en [Campins,92] para la resolución de picos solapados en cromatografía líquida utilizando alturas de pico en el tiempo de retención del analito como señales analíticas.

4.1.1.3.1.- Fundamentos teóricos.

Supongamos la separación cromatográfica descrita en la figura 30, en donde las especies X e Y coeluyen, y además muestran un espectro de absorción o emisión solapado. Para aplicar el método hay que seleccionar dos longitudes de onda λ_j y λ_k tales que el interferente, Y, presente la misma absorbancia o intensidad de fluorescencia:

$$S_{Y,j} = S_{Y,k} \quad (84)$$

Si representamos los cromatogramas obtenidos a dichas longitudes de onda (figura 31), vemos que los correspondientes registros para la especie Y son coincidentes, por la forma de haber seleccionado λ_j y λ_k . Sin embargo la especie X no muestra la misma absorbancia (o emisión) a dichas longitudes de onda, y por tanto sus cromatogramas no son

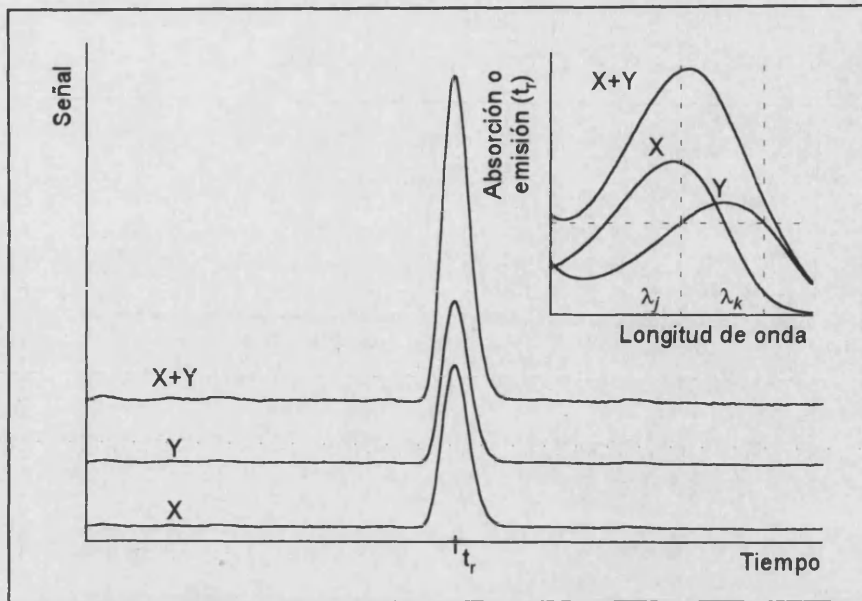


Figura 30: Separación cromatográfica de dos especies *X* e *Y* que coeluyen, y sus espectros de absorción (o emisión) en el tiempo de retención.

coincidentes. Esta diferencia de señal es proporcional a su concentración y es la que permite su cuantificación.

Para aplicar el método y cuantificar ambas especies se preparan diversas disoluciones que contienen la muestra sola y adicionada con cantidades conocidas de analito *X*. Se realiza la separación cromatográfica y se cuantifica la altura o el área de pico a las dos longitudes de onda seleccionadas. Si se utiliza un detector de fluorescencia, que produce una señal analítica monodimensional, son necesarias dos inyecciones consecutivas de la misma muestra, variando las longitudes de onda de emisión. Como se demostrará, el método propuesto es insensible a pequeños cambios en el tiempo de retención de las especies de una inyección a otra, si se utilizan como señales analíticas áreas de pico. Esto es una ventaja con respecto a otra metodologías previamente descritas.

Representando la altura o el área de pico medida frente a la concentración de analito añadida, figura 32, se obtienen dos líneas rectas que tendrán las siguientes ecuaciones:

$$a_j = a_{X,j}^0 + a_{Y,j} + M_j \times C_X^i \quad (85)$$

para λ_j y

$$a_k = a_{X,k}^0 + a_{Y,k} + M_k \times C_X^i \quad (86)$$

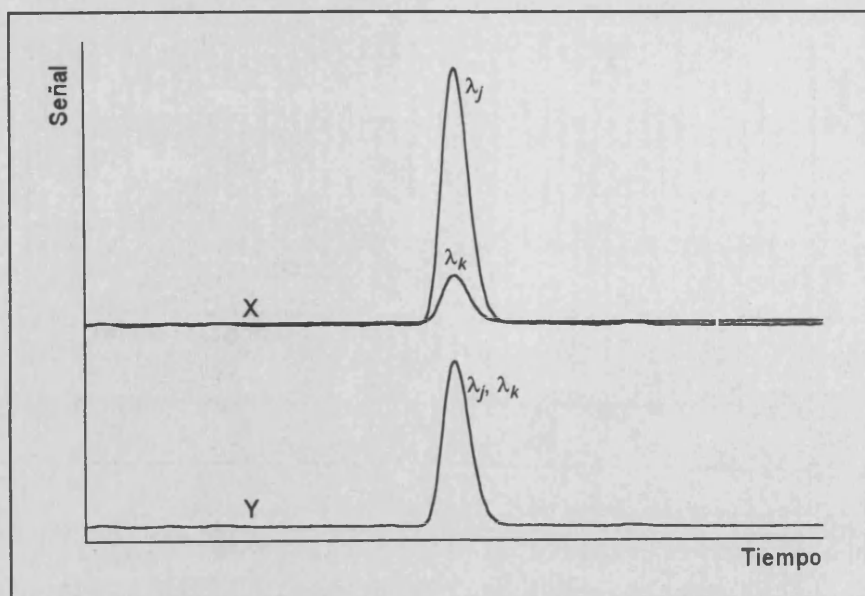


Figura 31: Cromatogramas obtenidos para las especies X e Y a las dos longitudes de onda λ_j y λ_k previamente seleccionadas.

para λ_k , donde $a_{X,j}^0$ y $a_{X,k}^0$ son las alturas o áreas de pico debidas a la especie X en la disolución que sólo contiene muestra a λ_j y λ_k ; $a_{Y,j}$ y $a_{Y,k}$ son las alturas o áreas de pico debidas a la especie Y en la disolución que sólo contiene muestra a λ_j y λ_k (y que serán las mismas para todas las disoluciones preparadas); M_j y M_k son las pendientes de las rectas de calibrado a λ_j y λ_k y C_X^i es la concentración añadida de analito para $i=0,1,\dots,n$ adiciones. Cuando $i=0$ se tiene la disolución que sólo contiene muestra.

Ambas rectas intersectan en el punto H, de coordenadas $(-C_H, a_H)$:

$$a_{X,j}^0 + a_{Y,j} + M_j \times (-C_H) = a_{X,k}^0 + a_{Y,k} + M_k \times (-C_H) \quad (87)$$

de donde:

$$-C_H = \frac{(a_{X,k}^0 - a_{X,j}^0) + (a_{Y,k} - a_{Y,j})}{M_j - M_k} \quad (88)$$

Como λ_j y λ_k han sido seleccionadas para dar la misma señal analítica para la especie Y (ecuación 84), la ecuación (88) se simplifica a:

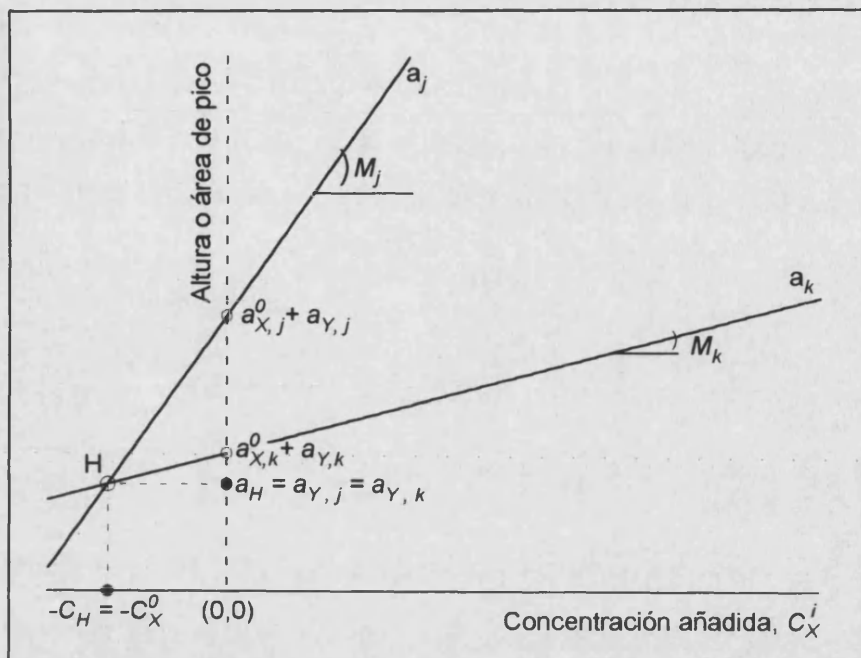


Figura 32: Rectas obtenidas aplicando el HPSAM a cromatografía líquida.

$$-C_H = \frac{a_{X,k}^0 - a_{X,j}^0}{M_j - M_k} \quad (89)$$

que es equivalente a la concentración de analito en la muestra, C_X^0 :

$$-C_H = \frac{a_{X,k}^0 - a_{X,j}^0}{M_j - M_k} = \frac{-a_{X,j}^0}{M_j} = \frac{-a_{X,k}^0}{M_k} = -C_X^0 \quad (90)$$

Si se sustituye el valor de C_H obtenido en (89) en las ecuaciones (85) ó (86), se obtiene que:

$$a_H = a_{Y,j} = a_{Y,k} \quad (91)$$

Por tanto, a partir de la abcisa del punto H y una recta de calibrado de la especie Y a las longitudes de onda seleccionadas, se puede estimar su concentración en la muestra.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Si se sabe que no existe efecto matriz, lo que ocurre normalmente en cromatografía líquida, la metodología expuesta puede simplificarse utilizando como valores para M_j y M_k los obtenidos de rectas de calibrado de la especie X (ε_j y ε_k), por lo que sólo se necesita medir la muestra a las longitudes de onda seleccionadas. La ecuación a utilizar para calcular la concentración de X será:

$$-C_H = \frac{a_{S,k}^0 - a_{S,j}^0}{\varepsilon_j - \varepsilon_k} \quad (92)$$

donde $a_{S,j}^0$ y $a_{S,k}^0$ son las alturas o áreas de pico medidas para la muestra a las longitudes de onda seleccionadas λ_j y λ_k y ε_j y ε_k son las pendientes de las rectas de calibrado de X a λ_j y λ_k . La concentración de la especie Y se obtendrá a partir de:

$$a_H = a_{S,j}^0 - C_H \times \varepsilon_j = a_{S,k}^0 - C_H \times \varepsilon_k \quad (93)$$

Esta posibilidad permite la simplificación experimental de la aplicación del método.

La utilización de alturas o áreas de pico como señales analíticas depende del grado de coelución de las dos especies. Si ambas presentan el mismo tiempo de retención, no hay diferencias en cuanto a la utilización de ambos métodos. Pero si ambos compuestos coeluyen sólo parcialmente, la utilización de alturas de pico en el tiempo de retención del analito lleva a buenos resultados para la concentración de analito, pero no para la de interferente; sin embargo, la utilización de áreas permite cuantificarlos de la manera habitual.

4.1.1.3.2.- Determinación cromatográfica de fenol y cresoles con detección espectrofotométrica o fluorimétrica.

El fenol y sus derivados se encuentran entre los contaminantes más tóxicos y ampliamente distribuidos en efluyentes industriales y aguas naturales.

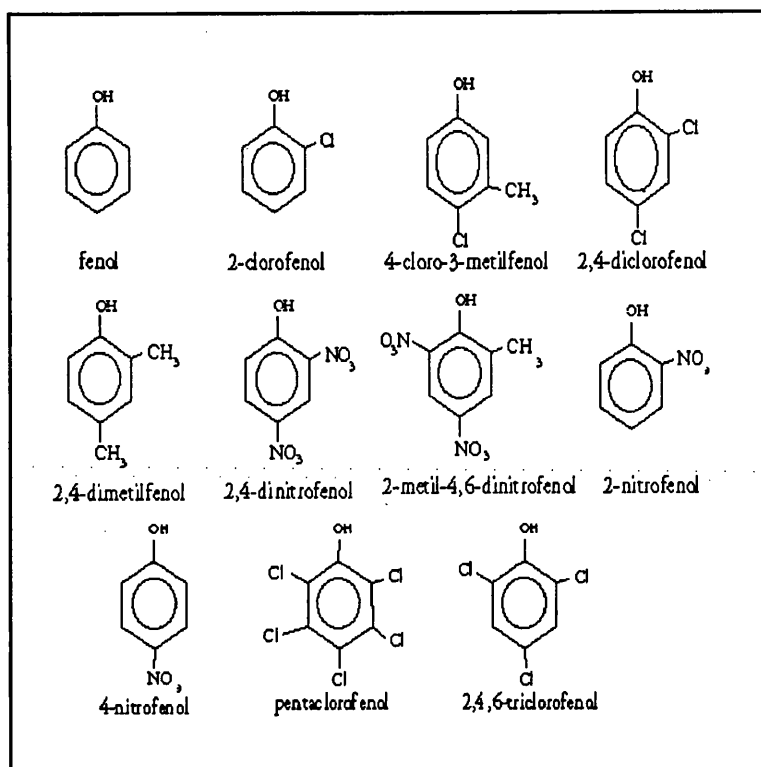


Tabla XXVIII: Los once fenoles contaminantes prioritarios, PPP, descritos por la United States Protection Agency.

Los fenoles se generan en un gran número de procesos [Grob,83], incluyendo la industria del carbón y del petróleo [Cook,65;Baird,77], emisiones de automóviles [Czuczwa,87], reacciones fotoquímicas [Nojima,75;76], industria del papel [Butler,92] y en la síntesis de plásticos y productos farmacéuticos [Realini,81]. Los fenoles clorados se han utilizado como insecticidas y pesticidas [Cremlyn,78], fungicidas para la protección de la madera, antisépticos [IARC,86] y desinfectantes, y se han encontrado en el agua potable tras la cloración [Deinzer,78], a la que proporcionan mal olor y sabor [Dietz,78; NRC,87].

La United States Environmental Protection Agency ha elaborado [USEPA,77] una lista con once fenoles sustituidos por grupos tales como cloro, metil y nitro, como contaminantes prioritarios, PPP (Priority Pollutants Phenols) (tabla XXVIII). En Australia, las recientes normativas de la *commonwealth* para las fábricas de blanqueo de pasta de papel [Fandry,89; Env.,89] indican que el nivel total de clorofenoles debe medirse en efluyentes, agua, sedimentos y biota, con el añadido de que los fenoles clorados considerados importantes deben incluirse en esquemas de monitorización individuales. Además, en muchos países, su concentración individual en agua está limitada por ley a 1 ppb. o menor.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Su análisis en muestras acuosas generalmente está basado en métodos que miden su concentración total (índice de fenol).

La determinación de fenoles a niveles de ppb en aguas por espectrofotometría UV es dificultosa, debido a sus bajos coeficientes de absortividad molar. Los métodos espectrofotométricos clásicos emplean la reacción de Emerson [Emerson, 43] entre los fenoles y el 4-aminoantipireno [APHA, 85; Fresenius, 88], pero dicha reacción tiene algunas desventajas, puesto que dicho compuesto no reacciona con los fenoles *p*-sustituidos y, además, necesita de una destilación previa para eliminar interferentes [Farino, 81], por lo que no proporciona buenos resultados para el índice de fenol. En [Bosch S., 87] se describe un procedimiento espectrofotométrico para la determinación de trazas de fenoles, en aguas naturales y de deshecho, basado en la reacción con monobromuro de yodo, que permite determinar fenoles *p*-sustituidos y clorofenoles.

Los procedimientos más sensibles para la determinación de fenol y cresoles son los métodos fluorimétricos, aunque tienen la desventaja de no detectar fenoles clorados.

El desarrollo de la cromatografía ha permitido la determinación de los distintos fenoles por separado. Se han descrito métodos basados en la cromatografía gaseosa [Voss, 81; Rennie, 82; Janda, 89], revisados en el artículo de Tesařová [Tesarova, 83]. Pero la cromatografía gaseosa es menos indicada para analitos polares con baja presión de vapor (como lo son los fenoles) que la cromatografía líquida. Son numerosos los procedimientos propuestos que hacen uso de este método de separación [Ugland, 81; Lee, 88; Olucha, 91; Bourguignon, 93; Makuch, 93; Buckman, 94].

Procedimiento experimental.

Condiciones cromatográficas:

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en un cromatógrafo líquido Hewlett-Packard 1040A, equipado con un detector de fila de diodos Hewlett-Packard 1040M series II, conectado a la ChemStation de Hewlett-Packard o un detector de fluorescencia Hewlett-Packard 1046A, conectado a la ChemStation (serie DOS) de Hewlett-Packard. El

4.1.1.3.- APLICACIÓN A SISTEMAS DINÁMICOS: CLAR

sistema se conectó a una bomba cuaternaria y un inyector automático (ambos de Hewlett-Packard). La columna utilizada fue una HP-Lichrospher 100 RP-18 ($5\ \mu\text{m}$, $250\ \text{mm} \times 4\ \text{mm}$ i.d.). La fase móvil utilizada fue una mezcla agua/acetonitrilo (64:36). Todas las experiencias se llevaron a cabo a temperatura ambiente. El detector espectrofotométrico se programó para registrar los cromatogramas a seis longitudes de onda diferentes. Los espectros de fluorescencia en tres dimensiones se llevaron a cabo en un espectrofluorímetro Hitachi F-4500, barriendo a una velocidad de $30000\ \text{nm}/\text{min}$.

El agua fue destilada y desionizada. Las disoluciones estándar de $1000\ \text{ppm}$ de fenol y cresoles se prepararon disolviendo en agua fenol, *o*-cresol, *m*-cresol y *p*-cresol, y se conservaron en frascos de vidrio borosilicatado en nevera.

Todos los disolventes se prepararon diariamente: se filtraron a través de membranas de nylon de $0.45\ \mu\text{m}$ (Teknokroma, España) y se desgasificaron con helio antes de utilizar. El flujo fue de $1\ \text{mL}/\text{min}$., y se inyectaron $50\ \mu\text{L}$ de cada muestra.

Extracción en fase sólida:

Dado que el contenido en fenol y derivados en efluyentes es generalmente muy pequeño, se recomienda para preconcentrar y limpiar las muestras la extracción en fase sólida. Puesto que la comparación de distintos resultados publicados muestran grandes diferencias en las recuperaciones obtenidas [Makuch,93], se ensayaron tres tipos de columna: Bond Elut C18, Bond Elut CH y Isolute C18 EC (masa de relleno, $500\ \text{mg}$ en todos los casos). Las columnas se acondicionaron pasando $5\ \text{mL}$. de metanol y $15\ \text{mL}$. de agua ($\text{pH}=3.0$ con H_3PO_4). Las muestras de agua se ajustaron a $\text{pH}=3.0$ con H_3PO_4 , y se añadió NaCl ($35\ \text{g}/\text{L}$) para aumentar la recuperación, pasándose a través de las columnas a un flujo de aproximadamente $5\ \text{mL}/\text{min}$., y dejándolas secar con aire en las mismas condiciones durante 5 minutos. Los fenoles se eluyeron con $1.5\ \text{mL}$ de una mezcla acetonitrilo/agua (1:1) (no se usó metanol, pues ensanchaba mucho los picos, ni fase móvil, que requería más de $2\ \text{mL}$ para la total elución). Los resultados obtenidos para la recuperación en las distintas columnas ensayadas con distintos volúmenes de muestra aparecen en la figura 33. Se seleccionaron las columnas Bond Elut C18. Las columnas con relleno ciclohexilo dan buenos resultados para los cresoles a bajos volúmenes, pero dan bajas recuperaciones para el fenol

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

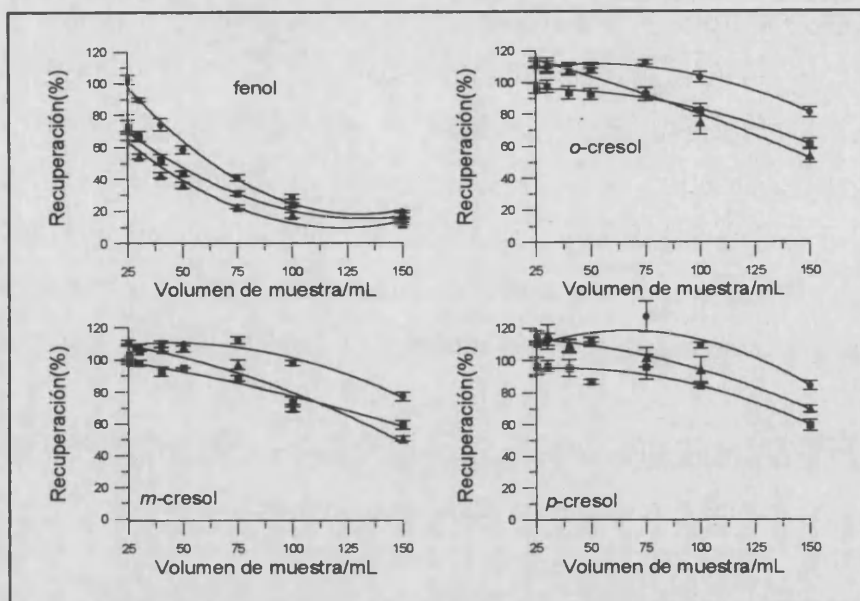


Figura 33: Recuperaciones obtenidas para el fenol y cresoles en las columnas de extracción en fase sólida estudiadas (● Bond Elut C18; ■ Isolute C18 EC; ▲ Bond Elut CH). $n = 2$ a 5 dependiendo del analito y volumen.

(el más polar). De entre las dos columnas C18, se seleccionó la Bond Elut, por sus mejores recuperaciones. Dicha diferencia puede explicarse en el hecho de que las columnas C18 EC tienen los grupos silano libres desactivados (end-capped), y por tanto, las interacciones polares secundarias asociadas con los grupos silanol de la superficie se reducen. Como volumen de muestra se seleccionó 100 mL., que permite una recuperación cercana al 100% para los cresoles, y aproximadamente del 30% para el fenol, que generalmente es el más abundante en muestras reales medioambientales. Sin embargo, la señal obtenida para éste es más alta que si sólo se seleccionaran 25 mL., debido al mayor volumen de muestra empleado. El procedimiento proporciona un factor de concentración de 20 para el fenol, y de 67 para los cresoles.

Las muestras reales (agua de la Albufera de Valencia y del puerto de Valencia) se trataron de la misma forma (excepto la adición de NaCl a las muestras de agua del puerto).

Detección espectrofotométrica:

En las condiciones experimentales descritas, y en concordancia con las separaciones cromatográficas descritas en la bibliografía [Czuczwa, 87; Lanin, 89; Brega, 90; Risner, 93], la mezcla de

4.1.1.3.- APLICACIÓN A SISTEMAS DINÁMICOS: CLAR

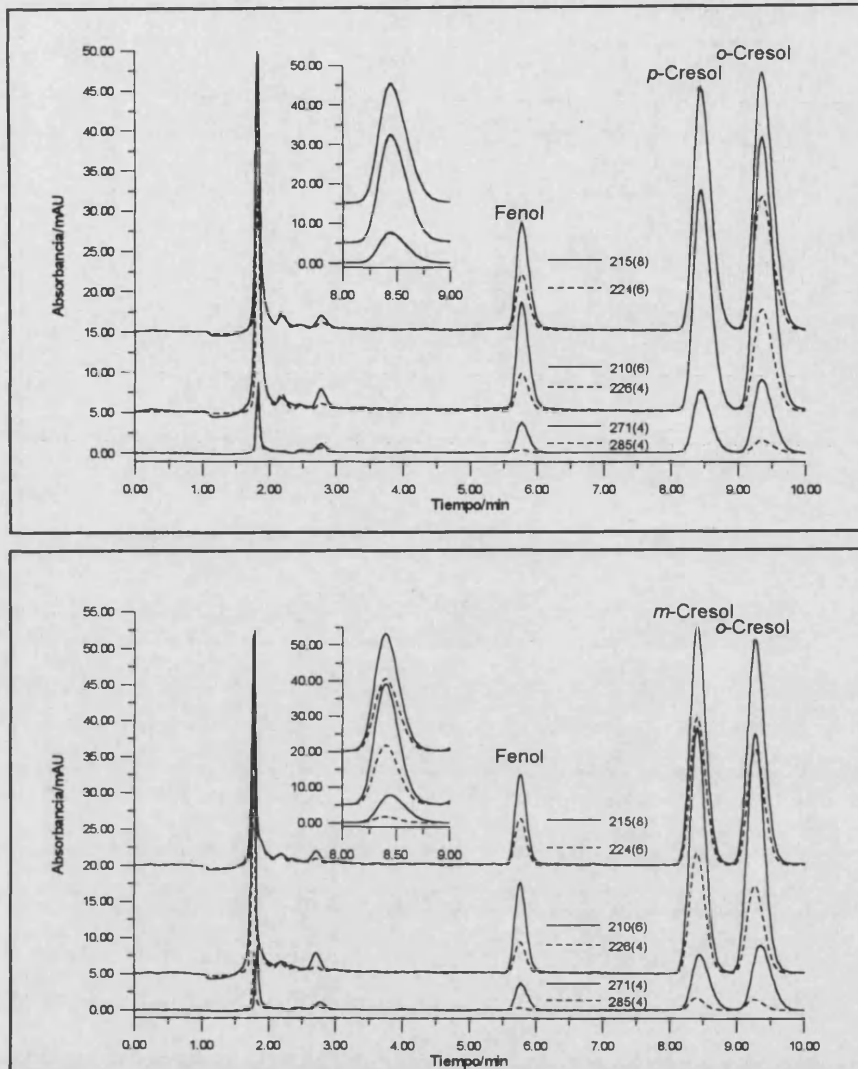


Figura 34: Separación cromatográfica de fenol, *o*-, *m*-, y *p*-cresol a las longitudes de onda seleccionadas para aplicar el HPSAM. Condiciones experimentales en el texto.

fenol y cresoles se resuelve en tres picos (figura 34): el primero corresponde al fenol, el segundo a la mezcla de *m*-/*p*-cresol y el tercero al *o*-cresol. Los espectros del *m*- y *p*-cresol en la fase móvil están solapados, como se ve en la figura 35, por lo que al solapamiento cromatográfico se le une el espectral. El método propuesto permite la determinación de los componentes de la mezcla. Para ello hay que encontrar dos longitudes de onda, λ_j y λ_k donde la especie que consideremos como interferente (en este caso el *p*-cresol, puesto que es más fácil seleccionarlas) presente la misma absorbancia. La señal cromatográfica de un detector de filas de diodos se compone de cuatro parámetros: una longitud de onda y un ancho de banda para la señal analítica, y una longitud de onda y un ancho de banda para la señal de referencia. El valor de la longitud de onda define el diodo central de la señal, y el ancho de banda el intervalo de diodos escogidos a ambos lados del diodo central, cuya señal se

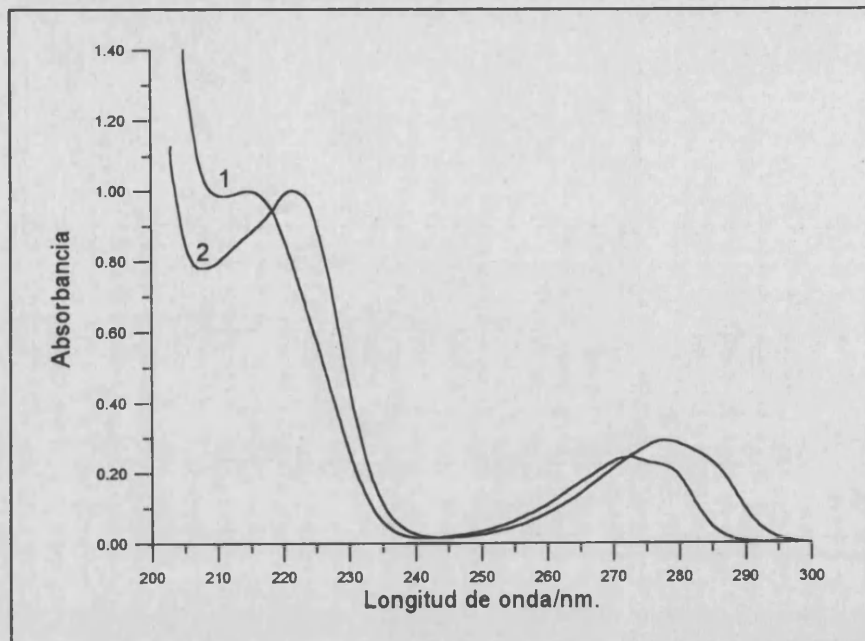


Figura 35: Espectros de absorción en la fase móvil de 1) *m*-cresol y 2) *p*-cresol.

promedia para dar la señal analítica final [HP,90]. Por tanto se puede realizar una adecuada selección de todos estos factores para encontrar las señales buscadas. Para la determinación buscada se seleccionaron tres pares: 215(8)/224(6); 210(6)/226(4) y 271(4)/281(4) (el primer número indica el diodo central y el número entre paréntesis el ancho de banda). En la figura 34 se muestran los cromatogramas así obtenidos. Debido a la selección de longitudes de onda, los cromatogramas para el *p*-cresol son coincidentes, pero no así para el *m*-cresol. Por tanto se cumplen los requisitos necesarios para aplicar el HPSAM. Como el fenol y el *o*-cresol absorben a las mismas longitudes de onda, éstas se han utilizado para su cuantificación.

Las rectas de calibrado obtenidas para el *p*-cresol a las longitudes de onda seleccionadas en tres situaciones distintas se muestran en la tabla XXIX. Los test estadísticos señalan que las señales obtenidas son coincidentes [Commisariat,78], de acuerdo con lo expuesto en la figura 34. A partir de estas rectas se calcula la concentración de *p*-cresol en las muestras, a partir del valor de A_H .

Para probar la aplicabilidad del HPSAM se prepararon cinco muestras sintéticas. En la tabla XXX se muestran las composiciones y los resultados obtenidos aplicando el HPSAM

Parámetro	215(8)	224(6)	210(6)	226(4)	271(4)	285(4)
$a \pm s_a$	0.2±5.9	-2.6±5.4	0.6±4.6	-1.9±5.7	0.8±1.9	-0.6±1.7
$(b \pm s_b)/ppb$	5.73±0.29	5.95±0.27	5.22±0.22	5.24±0.28	1.43±0.09	1.44±0.08
r	0.996185	0.996996	0.997228	0.995676	0.993861	0.995208
s_{yx}	5.61	5.41	4.56	5.46	1.78	1.58
Test F (homogeneidad de las varianzas)		1.18		0.63		1.27
Test F (coincidencia)		0.40		0.44		1.29

Parámetro	215(8)	224(6)	210(6)	226(4)	271(4)	285(4)
$a \pm s_a$	-13.8±19.9	-11.6±18.6	-12.9±16.9	-11.3±15.6	-2.9±4.8	-4.7±4.4
$(b \pm s_b)/ppb$	5.86±0.08	5.90±0.08	5.32±0.07	5.26±0.07	1.47±0.02	1.45±0.02
r	0.999710	0.999748	0.999746	0.999767	0.999736	0.999767
s_{yx}	30.58	28.7	26.0	24.6	7.33	6.78
Test F (homogeneidad de las varianzas)		1.13		1.12		1.17
Test F (coincidencia)		0.38		0.63		2.46

Parámetro	215(8)	224(6)	210(6)	226(4)	271(4)	285(4)
$a \pm s_a$	642.7±30.7	405.8±22.8	663.9±29.6	335.0±24.6	154.5±7.3	37.8±5.7
$(b \pm s_b)/ppb$	5.28±0.12	5.34±0.11	4.81±0.12	4.77±0.10	1.33±0.03	1.32±0.02
r	0.999147	0.999318	0.999049	0.999330	0.999232	0.999525
s_{yx}	47.33	42.8	45.5	37.9	11.3	8.8
Test F (homogeneidad de las varianzas)		1.22		1.44		1.64
Test F (paralelismo)		0.12		0.06		0.05

Tabla XXIX: Rectas de calibrado obtenidas para el p-cresol ($n = 5$) en los siguientes casos:

- 6.11-30.57 ppb.
- 23.38-477.62 ppb.
- 23.38-477.62 ppb, en presencia de 95.62 ppb de m-cresol.

Las varianzas son homogéneas si $1/F_{tab} < F_{calc} < F_{tab}$ ($F_{0.95}(3;3) = 9.28$); Las rectas son coincidentes si $F_{tab} > F_{calc}$ ($F_{0.95}(1;6) = 5.99$); Las rectas son paralelas si $F_{tab} >$

135 F_{calc} ($F_{0.95}(1;6) = 5.99$)

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

MUESTRA		FENOL	<i>o</i> -CRESOL	<i>m</i> -CRESOL	<i>p</i> -CRESOL
1	Cant. añadida/ppb	38.1	38.1	19.1	19.1
	Cant. encontrada/ppb (adición estándar)	44.3±1.6	40.3±0.8	21.3±2.1	19.5±1.7
	Cant. encontrada/ppb (calibrado)	43.2±1.5	41.8±0.6	21.6±1.8	20.7±0.7
2	Cant. añadida/ppb	119.0	119.2	23.9	95.5
	Cant. encontrada/ppb (adición estándar)	126.5±1.5	126.0±1.7	24.6±2.8	96.1±2.0
	Cant. encontrada/ppb (calibrado)	134.8±2.1	118.3±1.1	23.9±2.8	94.7±1.8
3	Cant. añadida/ppb	209.5	209.7	19.1	191.0
	Cant. encontrada/ppb (adición estándar)	197.7±3.0	212.2±2.4	21.6±3.5	186.8±2.8
	Cant. encontrada/ppb (calibrado)	191.1±2.3	207.2±2.6	20.1±2.6	181.8±2.1
4	Cant. añadida/ppb	95.2	95.3	76.5	19.1
	Cant. encontrada/ppb (adición estándar)	96.0±2.3	94.8±2.1	75.6±1.8	19.2±0.4
	Cant. encontrada/ppb (calibrado)	87.5±1.1	92.2±0.9	74.0±1.1	18.5±0.6
5	Cant. añadida/ppb	209.5	209.7	191.2	19.1
	Cant. encontrada/ppb (adición estándar)	210.0±1.4	212.9±1.5	193.5±1.2	19.9±0.8
	Cant. encontrada/ppb (calibrado)	208.0±1.2	220.3±1.0	200.7±0.8	20.0±0.7

Tabla XXX: Resultados obtenidos para cinco muestras sintéticas utilizando el HPSAM con adición estándar o calibrado.

con adición estándar o bien utilizando los valores de las pendientes de las rectas de calibrado de los analitos puros en la ecuación (89). Incluso cuando uno de los compuestos no resueltos está en una concentración 10 veces mayor que el otro (muestras 3 y 5), se obtienen buenos resultados. No se encontraron diferencias significativas en los resultados obtenidos para las sustancias seleccionadas como analito (*m*-cresol) e interferente (*p*-cresol). Los resultados

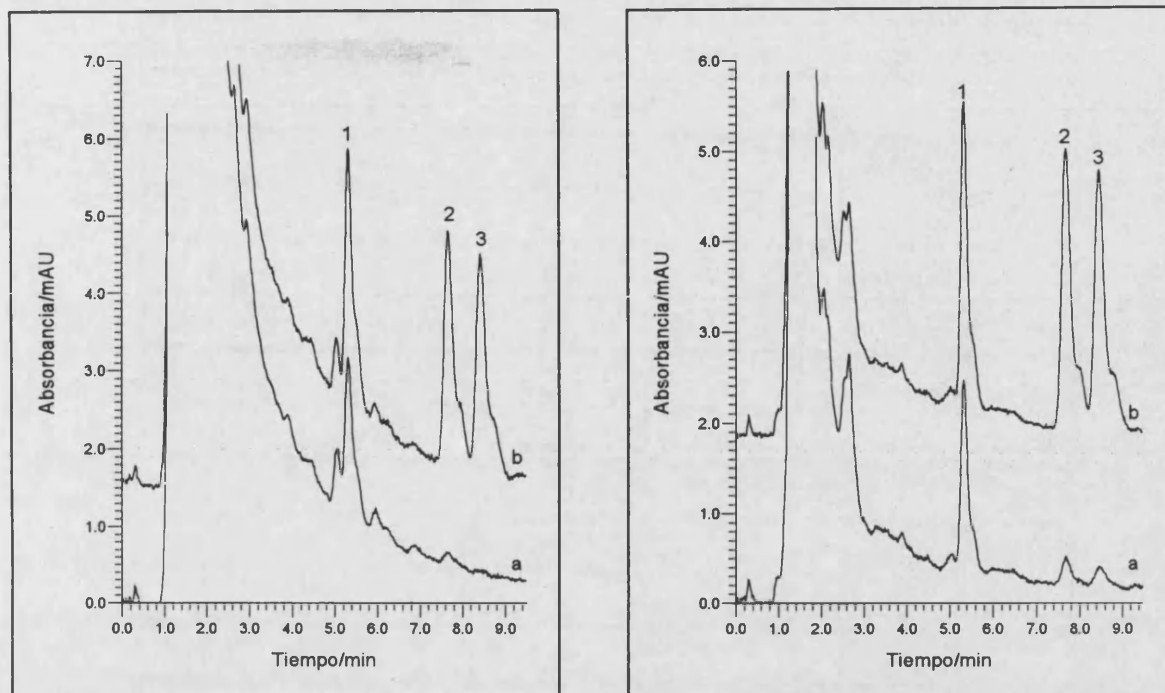


Figura 36: Cromatogramas obtenidos para:

I) A) agua de la Albufera y B) agua de la Albufera contaminada con 7.9 ppb de fenol (1), m-cresol (2) y o-cresol (3).

II) A) agua del puerto y B) agua del puerto contaminada con 7.9 ppb de fenol (1), m-cresol (2) y o-cresol (3).

menos preciso se obtuvieron para el fenol en baja concentración, debido a su menor recuperación.

Los límites de detección son de 1 ppb para el fenol, y por debajo de dicho valor para los cresoles. Como se ha visto anteriormente, pueden ser cuantificadas hasta 20 ppb de cada fenol.

Como aplicación práctica se analizó el contenido en fenol y cresoles de dos muestras reales: una del lago de la Albufera y otra del puerto de Valencia. Los eluidos están muy contaminados, pero afortunadamente la mayor parte de las impurezas eluyen al principio del cromatograma, y un pequeño pico (compuesto desconocido) a la izquierda del pico del fenol en la muestra de la Albufera, no interfiere en su determinación (figura 36). Los resultados obtenidos para la muestra de la Albufera proporcionan una concentración de fenol de 16 ± 4 ppb., y concentraciones de cresoles por debajo de 1 ppb. Este resultado está en concordancia con el dado en un trabajo anterior [Bosch S., 87], donde se obtuvo una concentración total de

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

MUESTRA	FENOL	<i>m</i> -CRESOL	<i>p</i> -CRESOL	<i>o</i> -CRESOL
ALBUFERA				
Conc. añadida/ppb	-	-	-	-
Conc. encontrada/ppb	16.6±1.3	-	-	-
Conc. añadida/ppb	7.9	7.9	-	7.9
Conc. encontrada/ppb	26.0±0.8	6.3±0.8	no detectado	8.4±0.9
Conc. añadida/ppb	15.7	15.7	-	15.7
Conc. encontrada/ppb	33.9±1.6	17.4±1.9	no detectado	15.2±0.7
PUERTO				
Conc. añadida/ppb	-	-	-	-
Conc. encontrada/ppb	16.1±1.6	-	-	-
Conc. añadida/ppb	7.9	7.9	-	7.9
Conc. encontrada/ppb	26.6±1.5	8.2±0.3	no detectado	6.9±1.4
Conc. añadida/ppb	15.7	15.7	-	15.7
Conc. encontrada/ppb	34.4±1.6	16.3±1.9	no detectado	15.6±1.0

Tabla XXXI: Resultados obtenidos para el análisis de las dos muestras reales de agua.

fenoles de 18 ppb para una muestra de agua procedente asimismo de la Albufera. En la muestra del puerto, la concentración de fenol encontrada fue de 14 ± 3 ppb, y la de cresoles sobre 1 ppb, pero por debajo del límite de cuantificación. Aplicando el HPSAM a muestras contaminadas en cantidades conocidas se obtienen los resultados de la tabla XXXI. Como se observa, los resultados hallados están en concordancia con los añadidos.

Detección fluorescente.

Para aplicar el método es necesario encontrar dos longitudes de onda donde una de las especies, considerada interferente, presente la misma intensidad de emisión de fluorescencia. En la figura 37, donde se muestran los espectros de fluorescencia en tres dimensiones para el *m*-cresol y *p*-cresol en la fase móvil, se puede observar que existe un gran solapamiento espectral entre ambas especies. Excitando a la longitud de onda del máximo de excitación del *m*-cresol (230 nm.), se tienen los espectros de emisión mostrados en la figura 38. Para aplicar el método se seleccionaron como longitudes de onda de emisión

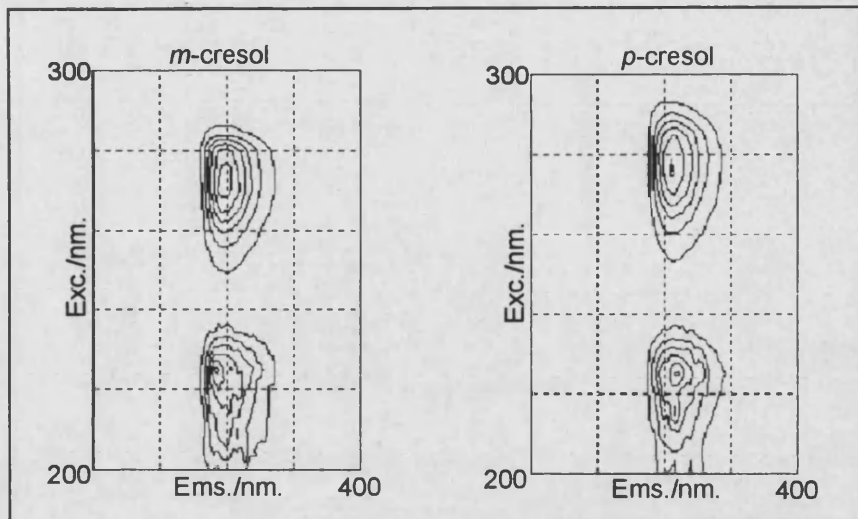


Figura 37: Espectros de fluorescencia en tres dimensiones en la fase móvil para el *m*- y *p*-cresol.

291 y 318 nm., donde el *m*-cresol presenta la misma intensidad de emisión, pero no así el *p*-cresol. Como el *o*-cresol presenta emisión de fluorescencia a dichas longitudes de onda, se cuantificó sin modificarlas. En cuanto al fenol, se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y emisión de su máximo ($\lambda_{exc} = 227$ nm. y $\lambda_{ems} = 305$ nm.). La menor recuperación se compensó con una ganancia mayor del detector para dicha especie. El cambio de

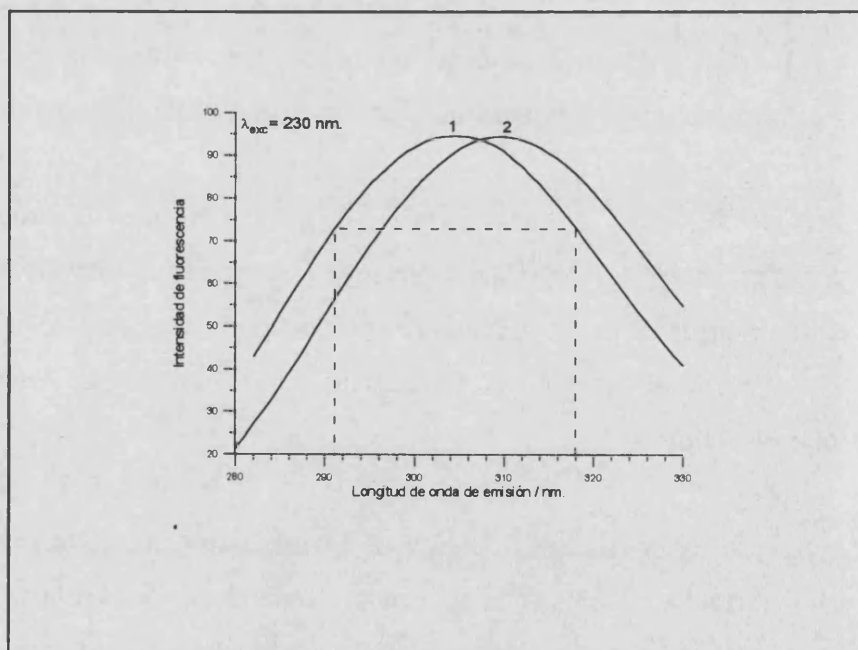


Figura 38: Espectros de emisión de fluorescencia en la fase móvil, con $\lambda_{exc} = 230$ nm., para el *m*- y *p*-cresol.

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

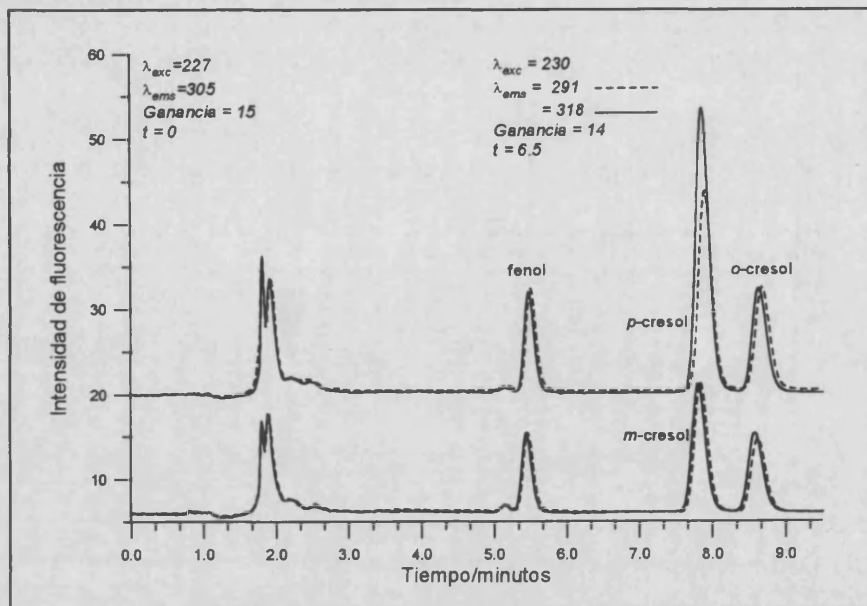


Figura 39: Cromatogramas obtenidos para la separación de fenol, o-, m- y p-cresol a las longitudes de onda seleccionadas.

longitudes de onda se realizó a los 6.5 min, donde no eluye ninguna especie, para no alterar la separación cromatográfica. Los cromatogramas así obtenidos se muestran en la figura 39. Puede observarse la total coincidencia de los picos cromatográficos del *m*-cresol, siendo diferentes para el *p*-cresol. Asimismo el fenol presenta los mismos cromatogramas, pues la señal analítica utilizada para su cuantificación siempre es la misma.

Las rectas de calibrado obtenidas para el *m*-cresol a las dos longitudes de onda seleccionadas a dos ganancias diferentes del detector se muestran en la tabla XXXII. Los test estadísticos muestran que las señales analíticas son coincidentes, de acuerdo con lo mostrado en la figura 39. A partir de estas rectas se calcula la concentración de *m*-cresol en las muestras, a partir del valor de I_H .

Para corroborar la aplicabilidad del método se prepararon diez muestras sintéticas, cuya composición y resultados obtenidos aplicando el método se dan en la tabla XXXIII. Debido a que ambas especies presentan el mismo tiempo de retención, se ha utilizado tanto la metodología de las alturas como la de las áreas para cuantificarlas. Como puede observarse, se han obtenido buenos resultados, incluso en el caso de que los compuestos coeluidos estuvieran en una proporción 1:5 ó 5:1 (muestras 1 y 5), y las concentraciones sean

Parámetro		291	318		291	318
$a \pm s_a$	ÁREA	-6.9±5.4	-3.4±4.2	ALTURA	-0.6±0.5	-0.6±0.4
$(b \pm s_b)/ppb$		115.2±2.6	113.0±2.0		8.65±0.21	8.54±0.20
r		0.99926	0.99952		0.99908	0.99916
s_{yx}		5.1	4.0		0.43	0.40
Test F (homogeneidad de las varianzas)			1.62			1.13
Test F (coincidencia)			0.55			0.39

Parámetro		291	318		291	318
$a \pm s_a$	ÁREA	23.6±7.0	21.3±5.1	ALTURA	1.55±0.47	1.09±0.28
$(b \pm s_b)/ppb$		488.9±11.2	487.4±8.2		35.52±0.75	36.21±0.44
r		0.99921	0.99958		0.99933	0.99978
s_{yx}		6.7	4.9		0.45	0.26
Test F (homogeneidad de las varianzas)			1.90			2.89
Test F (coincidencia)			0.76			0.72

Tabla XXXII: Rectas de calibrado obtenidas para el m-cresol ($n = 5$) en los siguientes casos:

a) Ganancia 14 del detector.

b) Ganancia 16 del detector.

Las varianzas son homogéneas si $F_{tab} > F_{calc} > 1/F_{tab}$ ($F_{0.95}(3;3) = 9.28$); Las rectas son coincidentes si $F_{tab} > F_{calc}$ ($F_{0.95}(1;6) = 5.99$); Las rectas son coincidentes si $F_{tab} > F_{calc}$ ($F_{0.95}(1;6) = 5.99$)

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

Muestra		fenol	<i>o</i> -cresol	<i>m</i> -cresol	<i>p</i> -cresol
1A	Conc. añadida	1.88	1.88	1.58	0.32
	Conc. hallada(área)	2.03±0.12	1.87±0.16	1.60±0.02	0.21±0.11
	Conc. hallada(altura)	2.03±0.13	1.87±0.15	1.53±0.19	0.27±0.02
2A	Conc. añadida	1.88	1.88	1.26	0.63
	Conc. hallada(área)	2.20±0.26	1.92±0.11	1.22±0.02	0.60±0.08
	Conc. hallada(altura)	2.22±0.20	1.90±0.08	1.17±0.02	0.64±0.07
3A	Conc. añadida	1.88	1.88	0.94	0.94
	Conc. hallada(área)	2.28±0.27	2.02±0.18	0.93±0.16	0.93±0.11
	Conc. hallada(altura)	2.22±0.31	1.98±0.20	0.83±0.09	1.01±0.01
4A	Conc. añadida	1.88	1.88	0.63	1.26
	Conc. hallada(área)	1.94±0.13	1.71±0.12	0.46±0.01	1.24±0.12
	Conc. hallada(altura)	1.96±0.11	1.71±0.12	0.54±0.05	1.47±0.26
5A	Conc. añadida	1.88	1.88	0.32	1.57
	Conc. hallada(área)	2.28±0.08	2.40±0.32	0.18±0.06	2.09±0.21
	Conc. hallada(altura)	2.22±0.07	2.33±0.29	0.10±0.05	2.33±0.08

Muestra		fenol	<i>o</i> -cresol	<i>m</i> -cresol	<i>p</i> -cresol
1B	Conc. añadida	0.38	0.38	0.32	0.06
	Conc. hallada(área)	0.49±0.04	0.44±0.02	0.31±0.01	0.09±0.01
	Conc. hallada(altura)	0.53±0.01	0.43±0.03	0.30±0.01	0.09±0.01
2B	Conc. añadida	0.38	0.38	0.25	0.13
	Conc. hallada(área)	0.41±0.01	0.44±0.05	0.25±0.05	0.12±0.03
	Conc. hallada(altura)	0.42±0.05	0.41±0.04	0.25±0.05	0.12±0.02
3B	Conc. añadida	0.38	0.38	0.19	0.19
	Conc. hallada(área)	0.49±0.05	0.41±0.06	0.10±0.07	0.25±0.06
	Conc. hallada(altura)	0.48±0.04	0.40±0.06	0.11±0.05	0.24±0.02
4B	Conc. añadida	0.38	0.38	0.13	0.25
	Conc. hallada(área)	0.40±0.07	0.44±0.08	0.06±0.03	0.22±0.03
	Conc. hallada(altura)	0.48±0.03	0.39±0.03	0.09±0.02	0.27±0.07
5B	Conc. añadida	0.38	0.38	0.06	0.32
	Conc. hallada(área)	0.39±0.01	0.42±0.03	0.05±0.01	0.34±0.02
	Conc. hallada(altura)	0.42±0.02	0.37±0.01	0.06±0.03	0.32±0.01

Tabla XXXIII: Resultados obtenidos para el análisis de las diez muestras sintéticas preparadas para corroborar la aplicabilidad del método. Todas las concentraciones expresadas en ppb.

tan bajas como 0.06 ppb. Tampoco se observan diferencias en los resultados obtenidos para las especies consideradas como analito (*p*-cresol) o interferente (*m*-cresol).

Como aplicación práctica se estudió el contenido en fenol y cresoles de una muestra de agua procedente del puerto de Valencia. Como puede verse, aunque existen gran cantidad

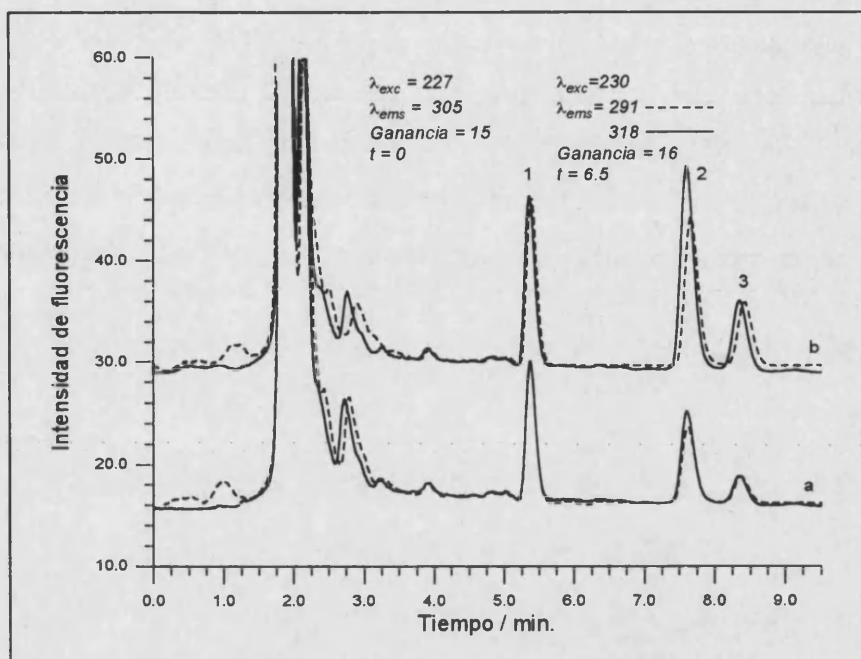


Figura 40: Cromatogramas obtenidos para: a) una muestra de agua del puerto y b) la misma muestra contaminada con 0.79 ppb de fenol (1), *p*-cresol (2) y *o*-cresol (3).

de especies fluorescentes en la muestra, éstas eluyen al principio del cromatograma y no interfieren en la determinación (figura 40). Los resultados obtenidos se dan en la tabla XXXIV.

Analito	fenol	<i>o</i> -cresol	<i>m</i> -cresol	<i>p</i> -cresol
	3.08 ± 0.02	0.62 ± 0.06	0.25 ± 0.02	0.67 ± 0.03

Tabla XXXIV: Resultados obtenidos para el análisis del contenido en fenol y cresoles de una muestra de agua del puerto de Valencia. Todas las concentraciones expresadas en ppb.

4.1.1.3.3.- Conclusiones.

Las bases del HPSAM se ha ampliado para la resolución de picos cromatográficos solapados en cromatografía líquida. Como señales analíticas se utilizan las alturas de áreas obtenidas a dos longitudes de onda previamente seleccionadas donde la especie considerada como interferente presente la misma absorbancia o intensidad de fluorescencia. Los resultados obtenidos son buenos para picos altamente coeluidos y con espectros de absorción o emisión fuertemente solapados. Las principales ventajas del método son la sencillez para

4.1.1.- MEZCLAS BINARIAS

encontrar las longitudes de onda requeridas, su insensibilidad a cambios en el tiempo de retención del pico de una inyección a otra, y la posibilidad de utilizarlo en picos total o parcialmente coeluidos. Para la utilización con un detector fluorescente convencional, es necesario realizar dos inyecciones consecutivas de la misma muestra. Si los picos coeluyen sólo parcialmente, es preferible utilizar áreas para cuantificar correctamente ambas especies.

***4.1.2.- DETERMINACIONES
ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS
ABSORBENTES***

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES.

El blanco reactivo, blanco químico o blanco analítico es la respuesta obtenida de una disolución de muestra libre de analito. El blanco está considerado una parte de la técnica de medida, y su respuesta se cancela física o matemáticamente de las obtenidas para los calibrados y las muestras.

En espectrofotometría, cuando el producto formado y uno de los reactivos absorben luz a la misma longitud de onda, la absorbancia del blanco al final de la reacción puede ser inferior a la medida al principio, debido al consumo de reactivo. Por tanto, la absorbancia real debida al producto será superior a la medida. Considerando una recta de calibrado, esta diferencia será más acusada para las concentraciones más altas ensayadas, lo que incidirá en la exactitud de los resultados analíticos obtenidos.

Esta temática aparece en muy pocas ocasiones en la literatura. En [Zhou,83] se estudiaron los efectos del exceso de reactivo utilizado como blanco sobre las determinaciones espectrofotométricas que utilizan reacciones coloreadas, concluyendo que si el blanco absorbía a longitudes de onda próximas a las correspondientes al producto de reacción, se traducían en modificaciones en la absorptividad molar y distorsión de la recta de calibrado, lo que conducía a la obtención de resultados analíticos afectados de error sistemático.

Kroll y Elin [Kroll,85] han propuesto un factor de corrección del blanco, BCF, en estos supuestos, definido para reacciones de estequiometría 1:1 de la forma

$$BCF = \frac{\epsilon_P}{\epsilon_P - \epsilon_R} \quad (94)$$

siendo ϵ_P y ϵ_R los coeficientes de absorptividad molar del producto que se mide y del reactivo respectivamente. El porcentaje de error introducido en los casos en los que no se utiliza dicho factor vendrá dado, según señalan dichos autores, por la expresión:

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

$$\%Error = (1 - BCF^{-1}) \times 100 \quad (95)$$

Se pretende demostrar la utilidad del HPSAM en el caso de las determinaciones que requieren la utilización de un blanco absorbente, enunciando sus bases en este supuesto. Una de las ventajas inmediatas del método es que no requiere que en el blanco esté presente el reactivo, lo que puede ser beneficioso en algunas circunstancias, por ejemplo en el caso de utilización de reactivos costosos, además de proporcionar señales analíticas más precisas, al llegar al detector un haz de radiación de mayor potencia.

El HPSAM permite evidenciar, como se demostrará a continuación, diferentes comportamientos del blanco para distintas curvas de calibrado, lo que permite clarificar el significado del blanco reactivo.

Para el desarrollo teórico del método se han definido dos clases de blanco:

- a) *Blanco externo*: el obtenido a partir de disoluciones de reactivo, exentas de analito o placebo, y procesadas según el procedimiento analítico. Coincide con el habitualmente definido como blanco reactivo o disolución de referencia.
- b) *Blanco interno*: el obtenido por extrapolación a partir de los datos de la recta de calibrado del analito en presencia del reactivo, y su valor se obtiene de la ordenadas en el origen de las rectas de calibrado del analito obtenidas frente a blanco disolvente.

4.1.2.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Puesto que una recta de calibrado puede considerarse como una recta de adición estándar obtenida con una porción de muestra añadida igual a cero, las bases del método de adición estándar del punto H son extensibles a las rectas de calibrado obtenidas para determinaciones en las que el blanco absorbe, correspondiendo el primer punto de la adición estándar a la señal analítica de la disolución que sólo contiene el blanco absorbente en su concentración inicial.

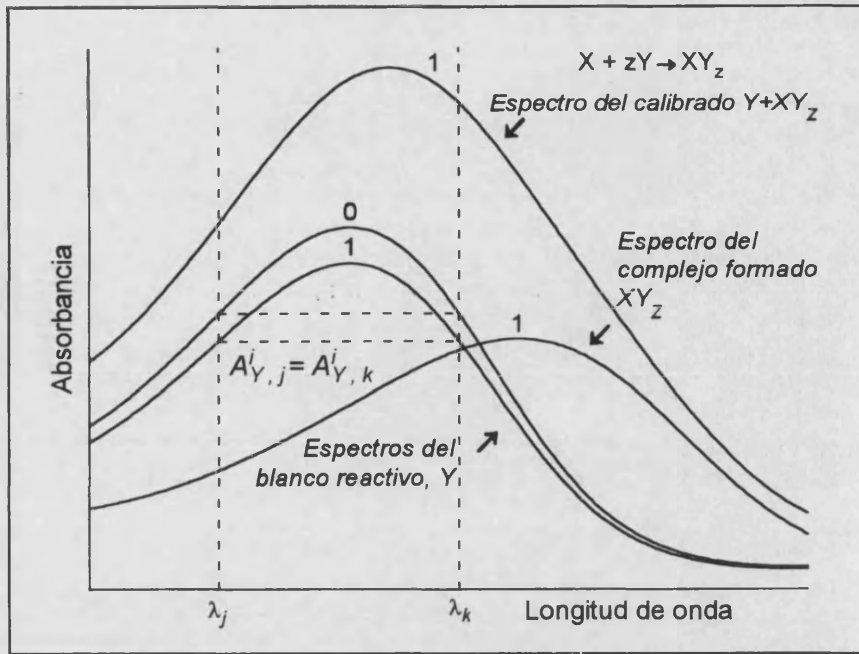


Figura 41: Espectros de absorción de dos compuestos, siendo Y el blanco absorbente y XY_z el producto formado.

Sean X el analito a determinar e Y el reactivo absorbente utilizado para su determinación. Supongamos que la reacción entre ambos viene descrita por:



Sus espectros de absorción se muestran en la figura 41.

Para aplicar el HPSAM hay que seleccionar dos longitudes de onda λ_j y λ_k donde la especie Y presente la misma absorbancia:

$$A_{Y,j}^i = A_{Y,k}^i ; i = 0, 1, \dots, n \quad (97)$$

Las absorbancias de la especie XY_z a λ_j y λ_k en las diferentes disoluciones del calibrado serán $A_{XY_z,j}^i$ y $A_{XY_z,k}^i$. La absorbancia de la especie Y en exceso será $A_{Y,j}^i$ a λ_j y $A_{Y,k}^i$ a λ_k , iguales para cada i .

Los espectros simplificados de ambas especies se muestran en la figura 42, y ambas absorbancias vienen descritas por las siguientes ecuaciones:

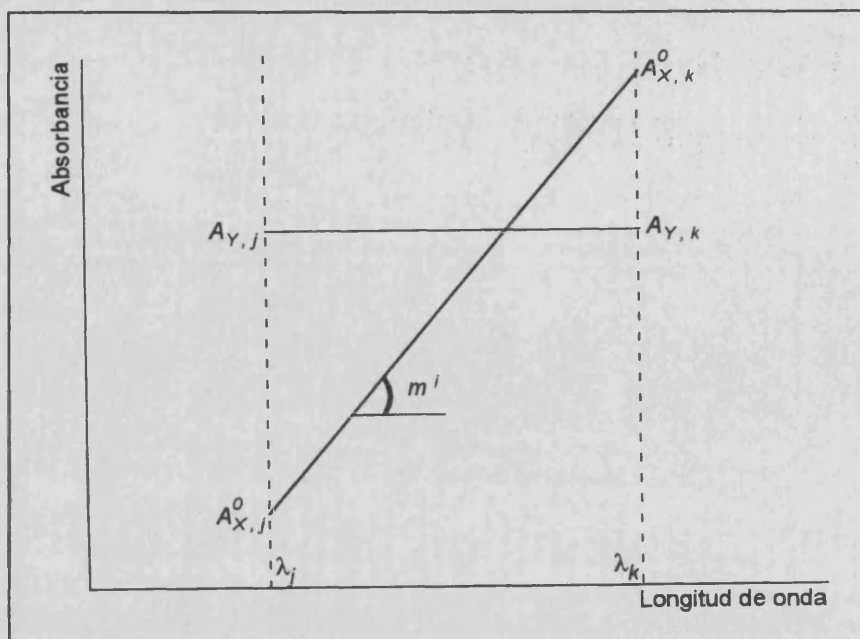


Figura 42: Espectros simplificados de Y y XY_z.

$$\text{Para } \text{XY}_z: \quad A_{\text{XY}_z, k}^i = A_{\text{XY}_z, j}^i + m^i \times \lambda; \quad (\lambda_j \leq \lambda \leq \lambda_k; \quad i = 0, 1, \dots, n) \quad (98)$$

$$\text{Para } \text{Y}: \quad A_{Y, k}^i = A_{Y, j}^i + m \times \lambda; \quad (\lambda_j \leq \lambda \leq \lambda_k; \quad m = 0; \quad i = 0, 1, \dots, n) \quad (99)$$

El superíndice i se refiere a las diferentes disoluciones para n adiciones. Cuando $i = 0$, $C_{X \text{añadido}} = C_{\text{XY}_z \text{formado}} = 0$. $A_{\text{XY}_z, j}^i$, $A_{\text{XY}_z, k}^i$ y m^i dependen de la concentración de X, debido a la formación de la especie XY_z . Por otro lado, $A_{Y, j}^i$ y $A_{Y, k}^i$ dependen del exceso de Y en la disolución, que también es variable en función de la concentración de XY_z formado.

La absorbancia de las mezclas Y-XY_z a λ_j y λ_k será:

$$A_j = A_{\text{XY}_z, j}^i + A_{Y, j}^i \quad (100)$$

$$A_k = A_{\text{XY}_z, k}^i + A_{Y, k}^i \quad (101)$$

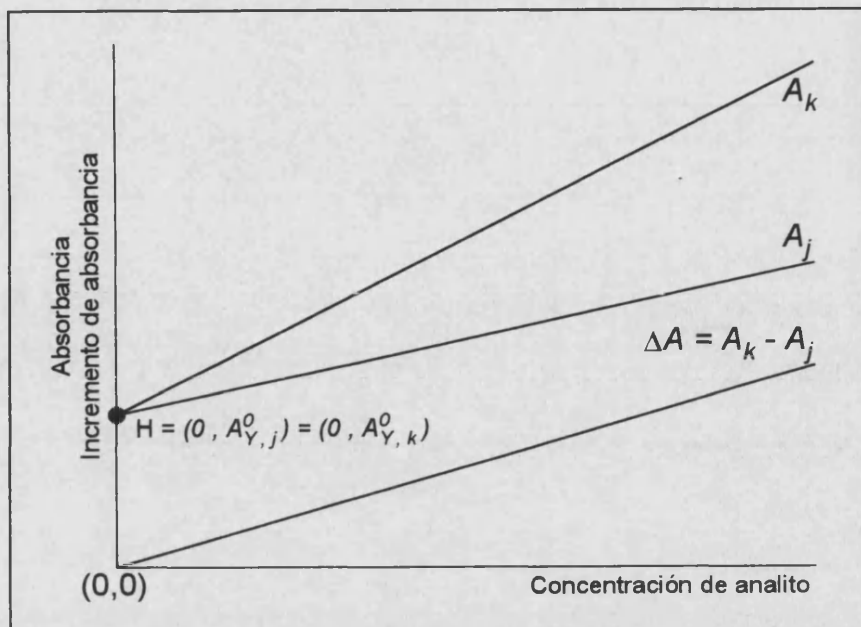


Figura 43: Rectas obtenidas aplicando el HPSAM a determinaciones que utilizan blancos absorbentes.

Por otro lado, la aplicación del HPSAM a dichas longitudes de onda conduce a (figura 43):

$$A_j = A_{XY_i, j}^0 + A_{Y, j}^i + M_j \times C_X^i \quad (102)$$

$$A_k = A_{XY_i, k}^0 + A_{Y, k}^i + M_k \times C_X^i \quad (103)$$

donde C_X^i es la concentración añadida de analito, $A_{XY_i, j}^0$ y $A_{XY_i, k}^0$ son los valores de absorbancia del producto formado cuando $i = 0$ (por tanto la concentración añadida de analito es nula, y entonces $C_{X \text{ añadido}} = C_{XY_i \text{ formado}} = 0$); M_j y M_k son las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas al aplicar el HPSAM a las longitudes de onda λ_j y λ_k , y $A_{Y, j}^i$ y $A_{Y, k}^i$ son los valores de absorbancia del reactivo en exceso en cada una de las disoluciones.

Ambas rectas intersectan en el punto H, de coordenadas $(-C_H, A_H) = (-C_{XY_i}, A_Y)$. En el punto común:

$$A_{XY_i, j}^0 + A_{Y, j}^i + M_j \times (-C_H) = A_{XY_i, k}^0 + A_{Y, k}^i + M_k \times (-C_H) \quad (104)$$

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

de donde

$$-C_H = \frac{(A_{XY_i, k}^0 - A_{XY_i, j}^0) + (A_{Y, k}^i - A_{Y, j}^i)}{M_j - M_k} \quad (105)$$

Como la especie Y presenta la misma absorbancia a λ_j y λ_k , se cumple que $A_{Y, j}^i = A_{Y, k}^i$ para cada i . Además, la especie X, para $i = 0$, no está presente, y por tanto, tampoco la especie XY₂, por lo que $A_{XY_i, j}^0 = A_{XY_i, k}^0 = 0$. De todo ello se deduce que la ecuación (105) puede simplificarse a:

$$-C_H = \frac{0}{M_j - M_k} = 0 \quad (106)$$

Utilizando valores de ΔA como señal analítica, a partir de las ecuaciones (102) y (103), y recordando que $A_{XY_i, j}^0 = A_{XY_i, k}^0 = 0$, para $i = 0$, se obtiene que:

$$\Delta A_{kj} = A_k - A_j = (A_{Y, k}^0 - A_{Y, j}^0) + (M_k - M_j) \times C_X^i \quad (107)$$

y en todos los casos, $A_{Y, j}^i = A_{Y, k}^i$, por lo que:

$$\Delta A_{kj} = (M_k - M_j) \times C_X^i \quad (108)$$

De acuerdo con esta expresión, el incremento de absorbancia depende exclusivamente de la concentración de analito, por lo que la representación de $\Delta A_{k, j}$ vs C_X^i conduce a una línea recta de ordenada en el origen nula, y pendiente $M_k - M_j$ (figura 43).

El exceso de reactivo libre no afecta a la precisión de la línea recta obtenida, pues su contribución es cancelada en cada punto, incluso en el caso de que su valor difiera de unas disoluciones a otras. Según las bases del HPSAM las ordenadas en el origen de las rectas $A_j = f(C_X^i)$ y $A_k = f(C_X^i)$ deben de ser iguales entre si e iguales al valor del blanco externo, siéste es equivalente al interno. Esta situación corresponde al caso más generalizado (figura 44A), tal y como se demuestra a continuación. Sin embargo, en la práctica, pueden

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

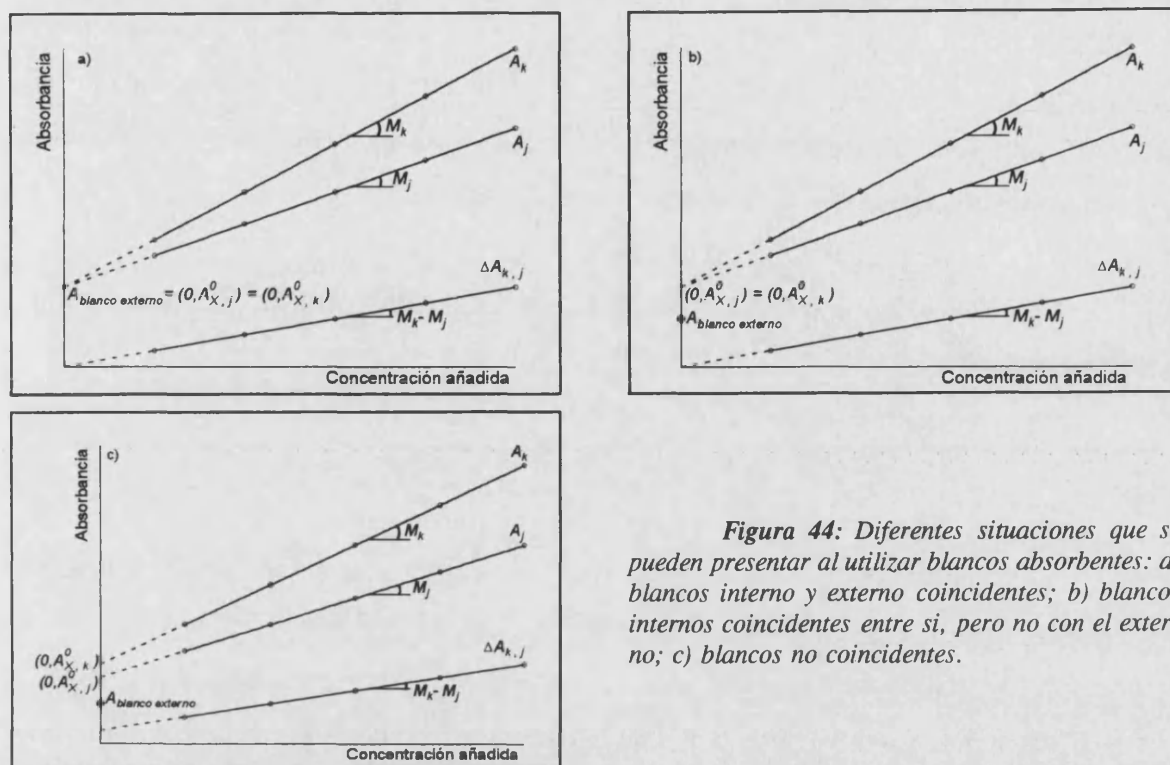


Figura 44: Diferentes situaciones que se pueden presentar al utilizar blancos absorbentes: a) blancos interno y externo coincidentes; b) blancos internos coincidentes entre si, pero no con el externo; c) blancos no coincidentes.

plantearse otra serie de casos en los que no existe una coincidencia entre el blanco interno y externo (figuras 44B y C), situaciones que se han podido evidenciar por la aplicación del HPSAM.

El error sistemático del blanco puede ser considerado como una interferencia variable y proporcional, si es constante para cada concentración de analito, pero no lo es con la concentración, siendo el método capaz de eliminarlo puesto que el incremento de absorbancia no depende del exceso de reactivo presente. En el caso de que se muestre constante con la concentración de analito, el método permitirá evidenciar si se está trabajando en las condiciones óptimas de exactitud. Esta metodología permite estudiar el comportamiento de los blancos reactivos en la etapa de calibración, y evidenciar el error que un comportamiento no reproducible de ellos introduce en las determinaciones donde son utilizados.

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DIVERSAS DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES.

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

Para estudiar la aplicabilidad del método se han seleccionado cinco determinaciones que utilizan un blanco absorbente. Cada una de ellas cumple unas determinadas condiciones:

- a.- determinación espectrofotométrica de proteínas mediante el método del Biuret.
- b.- determinación de torio con torón.
- c.- determinación de magnesio con amarillo de titanio.
- d.- determinación extracto-colorimétrica de anfetaminas con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato.
- e.- determinación espectrofluorimétrica de fenol.

En el primer caso, el exceso de reactivo es tan grande que su disminución a lo largo de las distintas disoluciones del calibrado no afecta a los resultados obtenidos por aplicación del método de medida frente a blanco reactivo.

El segundo caso es representativo de la determinación de iones metálicos utilizando compuestos orgánicos como formadores de complejos, que reaccionan con el catión para formar complejos quelatos, cuya medida está afectada del error en estudio.

En el tercer caso, la reacción estudiada es la formación de una laca fuertemente coloreada por adsorción del reactivo sobre el hidróxido metálico recién formado en medio básico.

Para la cuarta determinación, la concentración de reactivo extraído en la fase orgánica es constante e independiente de la concentración de analito presente en la muestra [Molins,94], por lo que puede considerarse que el blanco reactivo es constante con la concentración del analito.

En el quinto caso, las determinaciones fluorimétricas seleccionadas vienen afectadas de una interferencia debida a la emisión Raman del disolvente.

Las medidas en los tres primeros casos se realizaron en el Shimadzu y en el cuarto en el diodo-array. En el quinto caso se realizaron en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50, con rendijas de excitación y de emisión de 5 nm., y una velocidad de barrido de 60 nm./min. La temperatura de la celda se mantuvo constante a $20.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$

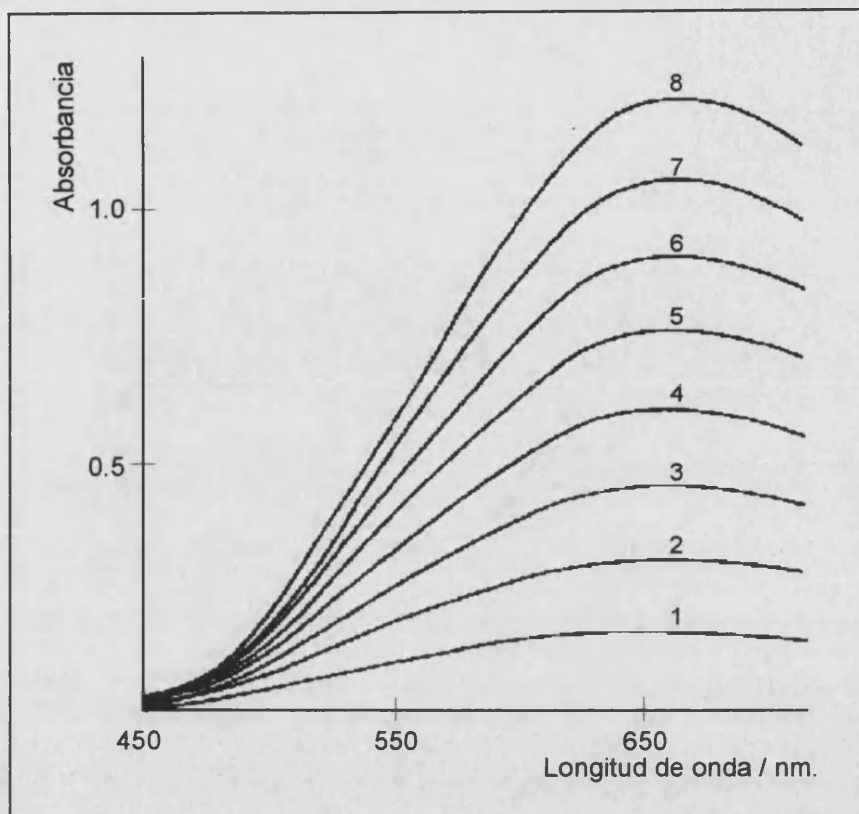


Figura 45: Espectros de absorción del reactivo del biuret (medio 0.625 M de NaOH) para las siguientes concentraciones de Cu^{2+} : 1) 4.93×10^{-3} M; 2) 9.87×10^{-3} M; 3) 1.48×10^{-2} M; 4) 1.97×10^{-2} M; 5) 2.47×10^{-2} M; 6) 2.96×10^{-2} M; 7) 3.45×10^{-2} M; 8) 3.94×10^{-2} M.

a.- Determinación de proteínas mediante el método del biuret

Se efectuó la determinación según las condiciones experimentales establecidas en [Henry,57]. La concentración de NaOH final fue en todas las experiencias de 0.625 M. La disolución madre de albúmina se preparó de una concentración 0.84% (p/v), y el reactivo de Biuret, mezclando en las proporciones adecuadas sulfato de cobre, citrato sódico tribásico y carbonato sódico anhidro, siendo la concentración de Cu^{2+} igual a 6.91×10^{-2} M.

El reactivo de biuret presenta en el medio de reacción un espectro de absorción ancho, con máximo a 670 nm. (figura 45). El cobre está presente en una concentración superior a casi 200 veces la concentración molar máxima de albúmina ensayada (0.070-0.42% (p/v)).

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

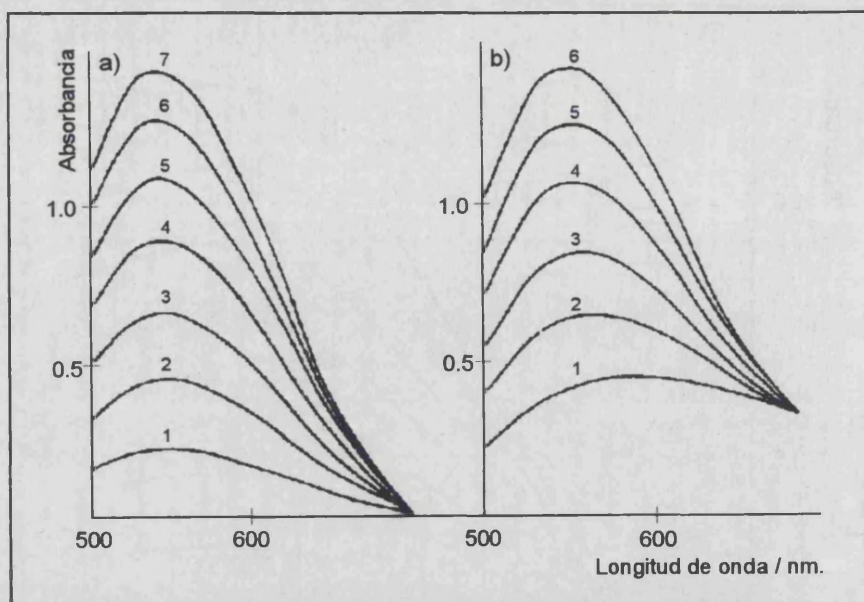


Figura 46: a) Espectros de disoluciones de biuret conteniendo $\text{Cu}^{2+} 1.97 \times 10^{-2} \text{ M}$ y las siguientes concentraciones de albúmina, medidas frente a blanco reactivo: 1) 0.07; 2) 0.14; 3) 0.21; 4) 0.28; 5) 0.35; 6) 0.42 y 7) 0.49%; b) Espectros de las disoluciones a) medidas frente a blanco disolvente.

Los espectros obtenidos para las distintas disoluciones preparadas para obtener las rectas de calibrado de albúmina, utilizando blanco reactivo y blanco disolvente, se muestran en la figura 46. Los espectros frente a blanco agua muestran un desplazamiento hipsocrómico del máximo de absorción a altas concentraciones de proteína añadida, lo que está de acuerdo con el solapamiento de los máximos de absorción correspondientes al producto formado (545 nm.) y al reactivo libre en exceso (670 nm.).

Los resultados obtenidos para la recta de calibrado de albúmina frente a blanco reactivo en el máximo de absorción del complejo formado se muestran en la tabla XXXV (dos réplicas), donde hay que reseñar que la ordenada en el origen es estadísticamente nula, debido a la escasa relación molar analito/reactivo en el intervalo de concentraciones ensayado, como ha sido mencionado anteriormente.

Para aplicar el método, y de acuerdo con las bases teóricas descritas, hay que seleccionar dos longitudes de onda tales que el reactivo presente la misma absorbancia frente a blanco disolvente. Finalmente se seleccionaron los siguientes pares: 700/636 nm., 690/644

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

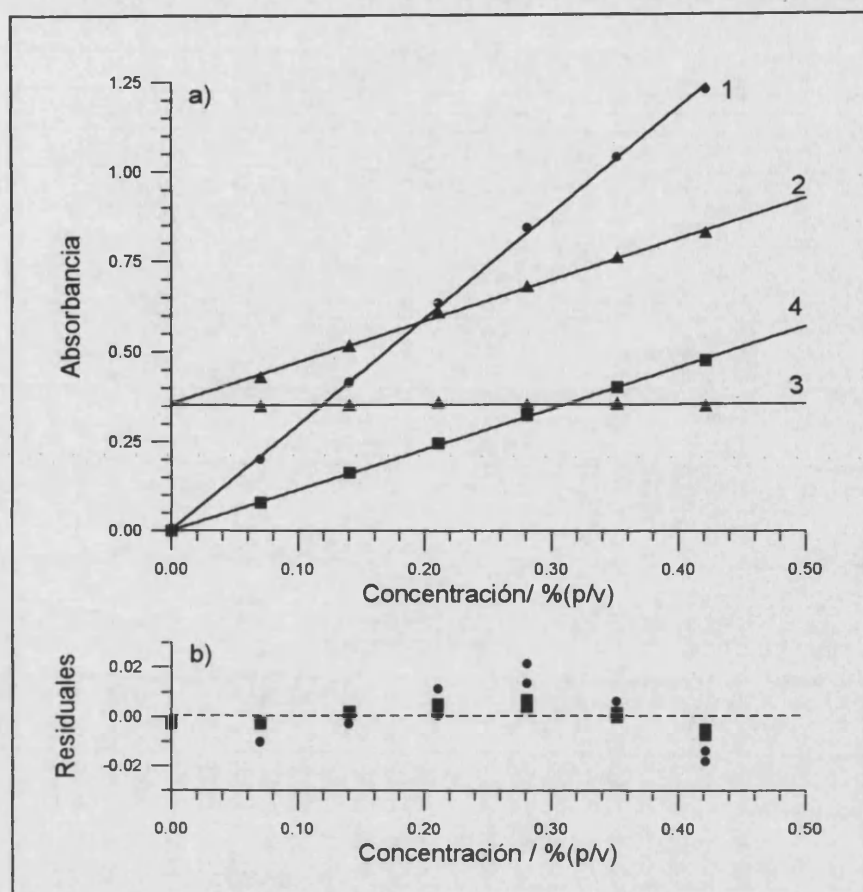


Figura 47: a) Aplicación del HPSAM a la determinación de albúmina con biuret con las siguientes señales: 1) absorbancia a 545 nm. frente a blanco reactivo; 2) absorbancia a 636 nm. frente a blanco disolvente; 3) absorbancia a 700 nm. frente a blanco disolvente; 4) incremento de absorbancia entre 636 y 700 nm. frente a blanco disolvente.

b) Residuales de las rectas 1 (●) y 4 (■).

nm. y 679/653 nm. En la tabla XXXVI se muestran los resultados obtenidos aplicando los test de Bartlett y ANOVA de homogeneidad de las varianzas y de coincidencia de rectas. De ellos se deduce que las rectas obtenidas son estadísticamente coincidentes para cada par seleccionado, por lo que la absorbancia del reactivo es la misma.

En la tabla XXXV se observan los resultados obtenidos para las rectas de calibrado obtenidas utilizando como señal analítica el incremento de absorbancia frente a blanco disolvente a los tres pares de longitudes de onda seleccionados. Tanto el blanco interno como el externo coinciden para todas las réplicas realizadas.

De la comparación de los resultados de la tabla XXXV se puede deducir que si bien el método tradicional de medida frente a blanco reactivo es lo suficientemente preciso como

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

Parámetro	Réplica	λ medida			
		545°	$\Delta A(700-636)$	$\Delta A(690-644)$	$\Delta A(679-653)$
n		6	7		
$a \pm s_a$	1	-0.00±0.04	0.003±0.009	0.002±0.007	0.001±0.005
	2	0.00±0.03	0.003±0.007	0.002±0.007	0.002±0.004
$b \pm s_b$	1	2.99±0.13	1.15±0.03	0.84±0.03	0.482±0.018
	2	2.94±0.11	1.14±0.03	0.83±0.03	0.474±0.017
r	1	0.99940	0.99964	0.99953	0.99937
	2	0.99958	0.99976	0.99959	0.99944
s_{yx}	1	0.015	0.005	0.004	0.003
	2	0.012	0.004	0.004	0.003
Límite de detección (%)	1	0.019	0.014	0.016	0.018
	2	0.016	0.011	0.015	0.017

Parámetro	Réplica	λ medidas					
		700	636	690	644	679	653
n		6					
$a \pm s_a$	1	0.348±0.013	0.353±0.025	0.355±0.014	0.358±0.025	0.359±0.016	0.361±0.023
	2	0.354±0.011	0.359±0.020	0.360±0.011	0.363±0.021	0.364±0.014	0.368±0.020
$b \pm s_b$	1	-0.01±0.05	1.14±0.09	0.10±0.05	0.93±0.09	0.24±0.06	0.72±0.09
	2	0.01±0.04	1.14±0.07	0.11±0.04	0.93±0.08	0.26±0.05	0.72±0.07
r	1	-0.18407	0.99801	0.92319	0.99718	0.98241	0.99574
	2	0.26093	0.99878	0.96020	0.99796	0.98780	0.99699

Tabla XXXV: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de albúmina con biuret. (λ medido frente a blanco reactivo).

para obtener buenos resultados, debido a las características de la reacción, la utilización del método propuesto permite obtener límites de detección equivalentes en todos los casos ensayados, a pesar de que las pendientes de calibrado de las rectas son menores. Ello demuestra que ambos modelos describen adecuadamente los datos experimentales, como se demuestra en los gráficos de residuales (figura 47).

b.- Determinación de torio con torón.

La determinación se realizó según las condiciones experimentales descritas en [Sandell,59]. La concentración de HCl final en todas las experiencias fue de 0.5 M. Se prepararon disoluciones madre de torio (IV), de concentración 2.01×10^{-2} M, a partir de nitrato de torio, y otra de torón 0.1% (p/v). En las experiencias realizadas, la concentración

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

Parámetro	λ medida					
	700	636	690	644	679	653
n	8					
$a \pm s_a$	0.002 \pm 0.009	0.002 \pm 0.006	0.000 \pm 0.009	-0.000 \pm 0.007	-0.000 \pm 0.009	-0.001 \pm 0.007
$b \pm s_b$	29.4 \pm 0.4	29.37 \pm 0.25	30.0 \pm 0.4	30.0 \pm 0.3	30.4 \pm 0.4	30.4 \pm 0.3
r	0.99991	0.99996	0.99992	0.99996	0.99993	0.99995
Test de Bartlett $\chi^2_{0.95}(1)=3.84$	$\chi^2_{calc}=0.98$		$\chi^2_{calc}=0.48$		$\chi^2_{calc}=0.20$	
Test de Snedecor $F_{0.95}(2;12)=3.89$	$F_{calc}=0.004$		$F_{calc}=0.17$		$F_{calc}=0.002$	

Tabla XXXVI: Resultados obtenidos para los test de Bartlett y Snedecor en la rectas de calibrado de biuret.

de torón se mantuvo constante, y fue de 1.50×10^{-4} M, estando las concentraciones ensayadas de torio comprendidas en el rango 8.05×10^{-6} M - 4.02×10^{-5} M.

El torón, en medio fuertemente ácido, presenta el espectro de absorción señalado en la figura 48, con el máximo a 477 nm.

Los resultados obtenidos para la recta de calibrado de torio frente a blanco reactivo se en el máximo de absorción del complejo formado (545 nm.) se muestran en la tabla XXXVII, donde hay que reseñar que aunque la ordenada en el origen es estadísticamente nula, está mucho peor descrita que en el caso anterior, y su valor es alto (0.02 u.a.). Ello es debido a que la variación molar analito/reactivo en este caso es mucho mayor, y por tanto, en los puntos de mayor concentración de analito, el blanco reactivo resta de la disolución una absorbancia mayor a la debida al exceso de reactivo realmente existente, como se ha mencionado en los fundamentos teóricos. Todo ello provoca la distorsión de la recta de calibrado, aumentando el valor de la ordenada en el origen, y disminuyendo el correspondiente a la pendiente y el coeficiente de correlación.

Para aplicar el método hay que seleccionar dos longitudes de onda tales que el reactivo presente la misma absorbancia frente a blanco disolvente. Se seleccionaron dos pares de longitudes de onda: 495/457 nm. y 487/466 nm. En la tabla XXXVIII se muestran los resultados obtenidos aplicando los test Bartlett y ANOVA. De ellos se deduce que las

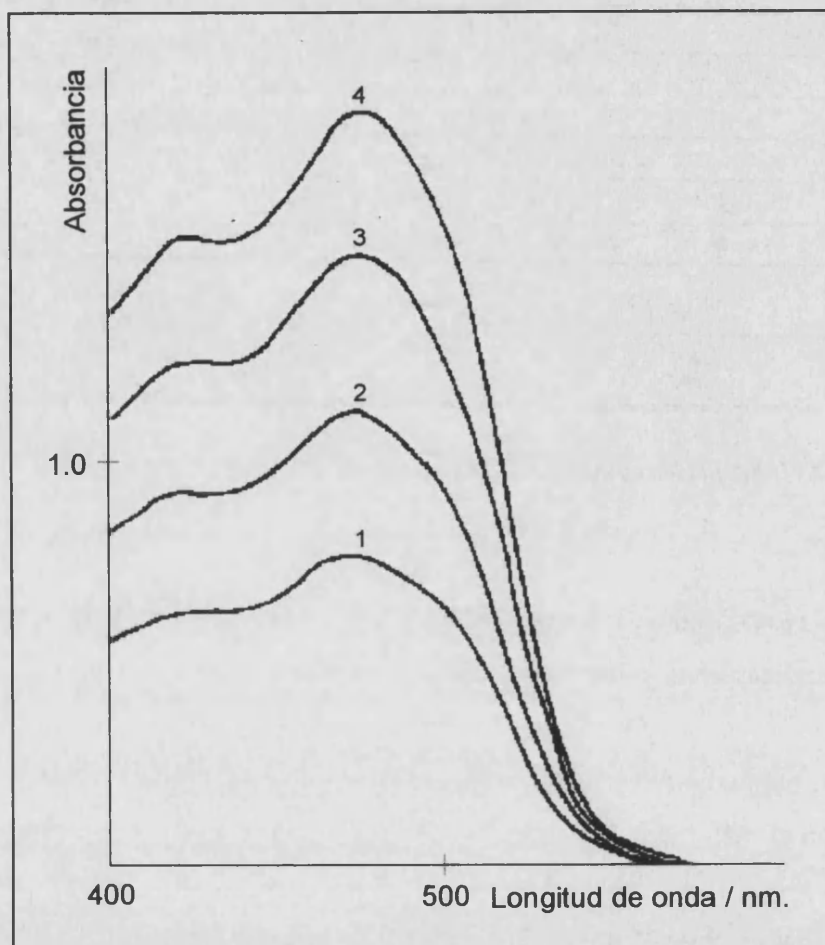


Figura 48: Espectros del torón en medio HCl 0.5 M para las siguientes concentraciones: 1) 7.5×10^{-5} M; 2) 11.3×10^{-5} M; 3) 15.0×10^{-5} M y 4) 18.8×10^{-5} M.

rectas obtenidas son estadísticamente coincidentes para cada par seleccionado, por lo que la absorbancia del reactivo es la misma.

En la tabla XXXVII se muestran los resultados obtenidos para las rectas de calibrado utilizando como señal analítica el incremento de absorbancia frente a blanco disolvente a los dos pares de longitudes de onda previamente seleccionados.

De la comparación de la tabla XXXVII se puede deducir que el método propuesto describe adecuadamente los datos experimentales, mientras que la metodología tradicional introduce distorsiones en la recta de calibrado. Por todo ello los límites de detección son menores con los calibrados de la metodología propuesta, a pesar de que las pendientes obtenidas son menores. Ello se ve mejor en la gráfica de residuales mostrada en la figura 49. Se puede observar que los puntos extremos son los que presentan una mayor desviación, y

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

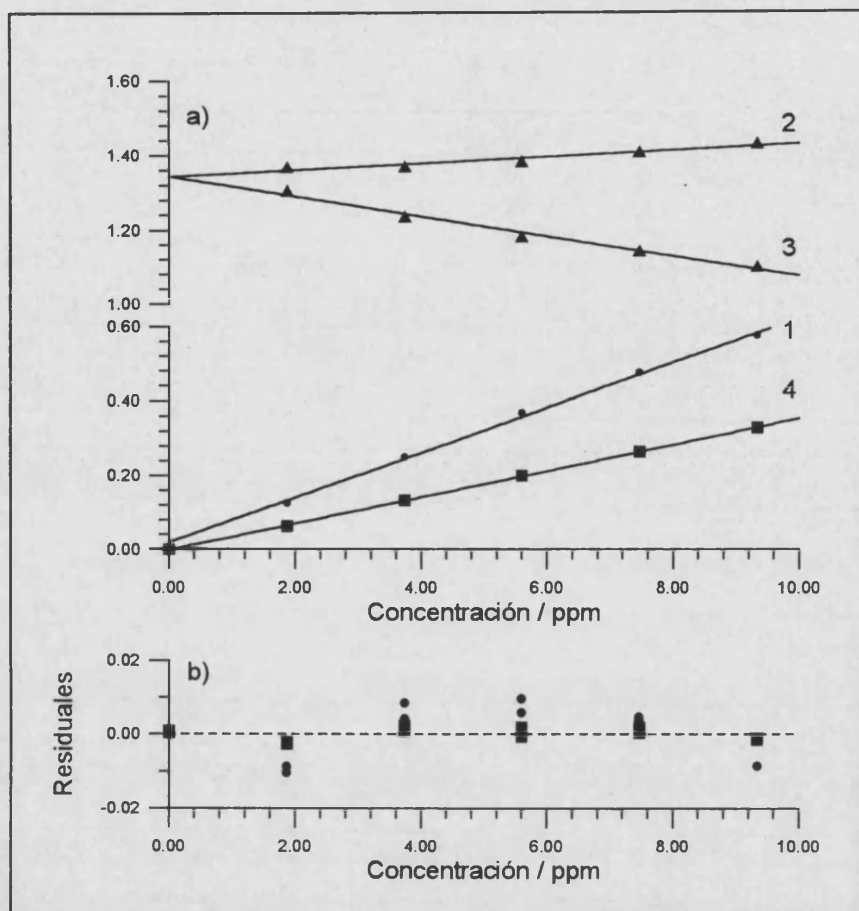


Figura 49: a) Aplicación del HPSAM a la determinación de torio con torón con las siguientes señales: 1) absorción a 545 nm. frente a blanco reactivo; 2) absorción a 495 nm. frente a blanco disolvente; 3) absorción a 457 nm. frente a blanco disolvente; 4) incremento de absorción entre 495 y 457 nm. frente a blanco disolvente.

b) Residuales de las rectas 1 (●) y 4 (■).

por tanto, un mayor error, de acuerdo con todo lo expuesto. Los blancos interno y externo son coincidentes.

c.- Determinación de magnesio con amarillo de titanio.

Se realizó el estudio de la determinación de Mg^{2+} con amarillo de titanio, siguiendo el método propuesto en [Kenion,55], realizándose todas las experiencias en un medio 0.8 M en NaOH. Se prepararon disoluciones madre de Mg^{2+} 0.127 M, a partir del nitrato de magnesio, y de amarillo de titanio 0.03 y 0.04 % (p/v). Para las experiencias realizadas, el margen de concentraciones de Mg^{2+} se situó en el intervalo 3.8×10^{-5} M y 1.90×10^{-4} M. La concentración de amarillo de titanio fue de 3.45×10^{-5} M y de 4.60×10^{-5} M.

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

Parámetro	Réplica	λ medida		
		545°	$\Delta A(487-466)$	$\Delta A(495-457)$
n		5	6	
$a \pm s_a$	1	0.02 ± 0.03	0.000 ± 0.005	0.001 ± 0.004
	2	0.02 ± 0.03	0.003 ± 0.005	-0.000 ± 0.004
$b \pm s_b$	1	0.060 ± 0.005	0.0229 ± 0.0009	0.0355 ± 0.0006
	2	0.059 ± 0.005	0.0223 ± 0.0009	0.0355 ± 0.0007
r	1	0.99893	0.99961	0.99992
	2	0.99873	0.99955	0.99989
s_{yx}	1	0.010	0.0025	0.0018
	2	0.010	0.003	0.0021
Límite de detección (mg/L)	1	0.7	0.4	0.17
	2	0.7	0.4	0.20

Parámetro	Réplica	λ medidas			
		487	466	495	457
n		5			
$a \pm s_a$	1	1.43 ± 0.03	1.43 ± 0.4	1.343 ± 0.025	1.34 ± 0.03
	2	1.339 ± 0.015	1.333 ± 0.020	1.254 ± 0.015	1.255 ± 0.019
$b \pm s_b$	1	-0.002 ± 0.005	-0.025 ± 0.006	0.009 ± 0.004	-0.026 ± 0.005
	2	-0.0020 ± 0.0025	-0.024 ± 0.003	0.0102 ± 0.0025	-0.025 ± 0.003
r	1	-0.63167	-0.98975	0.96191	-0.99298
	2	-0.78474	-0.99648	0.98853	-0.99706

Tabla XXXVII: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de torio con torón (λ medido frente a blanco reactivo).

Parámetro	λ medida			
	495	457	487	466
n	4			
$a \pm s_a$	0.02 ± 0.04	0.01 ± 0.04	0.02 ± 0.07	0.02 ± 0.06
$b \pm s_b$	0.091 ± 0.003	0.092 ± 0.003	0.097 ± 0.005	0.097 ± 0.004
r	0.99988	0.99991	0.99983	0.99988
Test de Bartlett $\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$	$\chi^2_{calc} = 0.028$		$\chi^2_{calc} = 0.046$	
Test de Snedecor $F_{0.95}(2,4) = 6.94$	$F_{calc} = 0.10$		$F_{calc} = 0.017$	

Tabla XXXVIII: Resultados obtenidos para los test de Bartlett y Snedecor en la rectas de calibrado de torón.

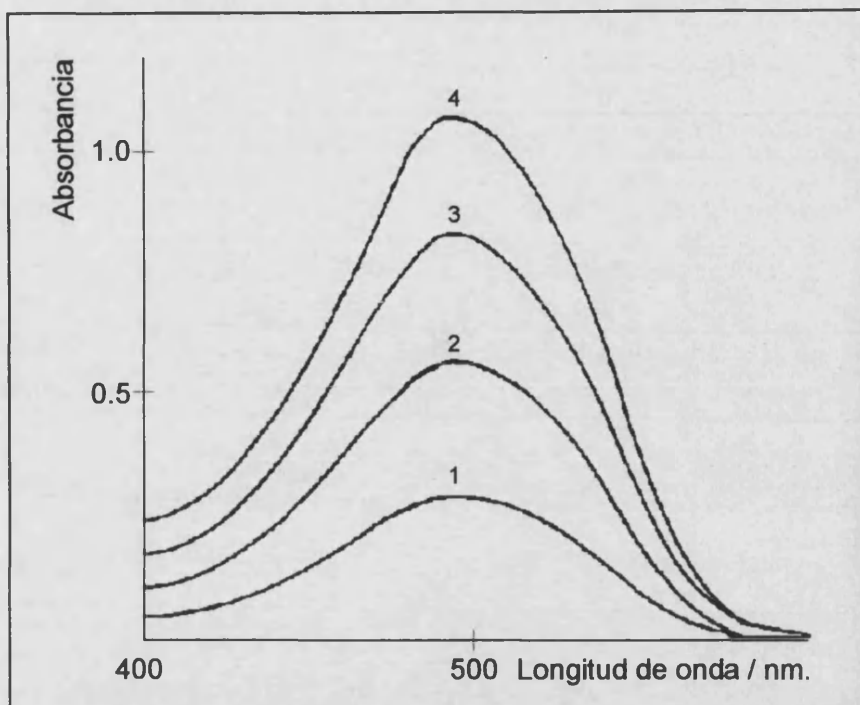


Figura 50: Espectros del amarillo de titanio en medio NaOH 0.5 M para las siguientes concentraciones: 1) 8.6×10^{-6} M; 2) 1.72×10^{-5} M; 3) 2.59×10^{-5} M y 4) 3.45×10^{-5} M.

El amarillo de titanio, en el medio de reacción, presenta el espectro señalado en la figura 50, con el máximo de absorción localizado a 499 nm.

Se estudiaron dos concentraciones diferentes de amarillo de titanio, pues se quería comprobar experimentalmente que los resultados obtenidos utilizando ΔA dependen exclusivamente de la concentración del analito presente, y no de la del reactivo.

Los resultados obtenidos para la recta de calibrado frente a blanco reactivo en el máximo de absorción del complejo formado (545 nm.), se muestran en la tabla XXXIX, para las dos concentraciones de reactivo ensayadas. Hay que reseñar que las pendientes de ambas rectas son similares, aunque la recta obtenida con la menor concentración de reactivo está peor descrita, ya que se ha sobrepasado el intervalo lineal de concentraciones, y el último punto debería descartarse. Las ordenadas en el origen son estadísticamente nulas, pero muy mal descritas ($s_a = 0.07$ y 0.03 u.a.), como en el caso de la determinación de torio, y por las mismas razones allí expuestas.

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

Parámetro	Réplica	λ medida		
		545*	$\Delta A(523-475)$	$\Delta A(529-470)$
n		5	6	
$a \pm s_a$	1	0.00 \pm 0.07	0.002 \pm 0.011	-0.003 \pm 0.012
	2	0.01 \pm 0.03	0.001 \pm 0.008	-0.003 \pm 0.011
$b \pm s_b$	1	0.101 \pm 0.023	0.095 \pm 0.004	0.106 \pm 0.004
	2	0.096 \pm 0.009	0.094 \pm 0.003	0.104 \pm 0.004
r	1	0.99046	0.99942	0.99947
	2	0.99802	0.99974	0.99958
s_{yx}	1	0.024	0.006	0.007
	2	0.010	0.004	0.006
Límite de detección (mg/L)	1	0.9	0.22	0.21
	2	0.5	0.15	0.19
Conc. amarillo de titano / M	1	3.452 \times 10 ⁻⁵		
	2	4.597 \times 10 ⁻⁵		

Parámetro	Réplica	λ medidas			
		523	475	529	470
n		5			
$a \pm s_a$	1	0.852 \pm 0.019	0.849 \pm 0.021	0.776 \pm 0.021	0.782 \pm 0.020
	2	1.47 \pm 0.04	1.46 \pm 0.03	1.35 \pm 0.04	1.35 \pm 0.03
$b \pm s_b$	1	0.074 \pm 0.006	-0.020 \pm 0.007	0.083 \pm 0.007	-0.024 \pm 0.007
	2	0.054 \pm 0.013	-0.039 \pm 0.011	0.064 \pm 0.013	-0.041 \pm 0.010
r	1	0.99858	-0.97700	0.99868	-0.98580
	2	0.98856	-0.98512	0.99165	-0.98956
Conc. amarillo titano / M	1	3.452 \times 10 ⁻⁵			
	2	4.597 \times 10 ⁻⁵			

Tabla XXXIX: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de magnesio con amarillo de titano (* medido frente a blanco reactivo).

Los pares de longitudes de onda donde el reactivo presente la misma absorbancia frente a blanco disolvente fueron 523/475 nm. y 529/470 nm. En la tabla XL se muestran los resultados obtenidos aplicando los test de Bartlett y ANOVA. De ellos se deduce que las rectas obtenidas son estadísticamente coincidentes para cada par seleccionado, por lo que la absorbancia del reactivo es la misma.

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

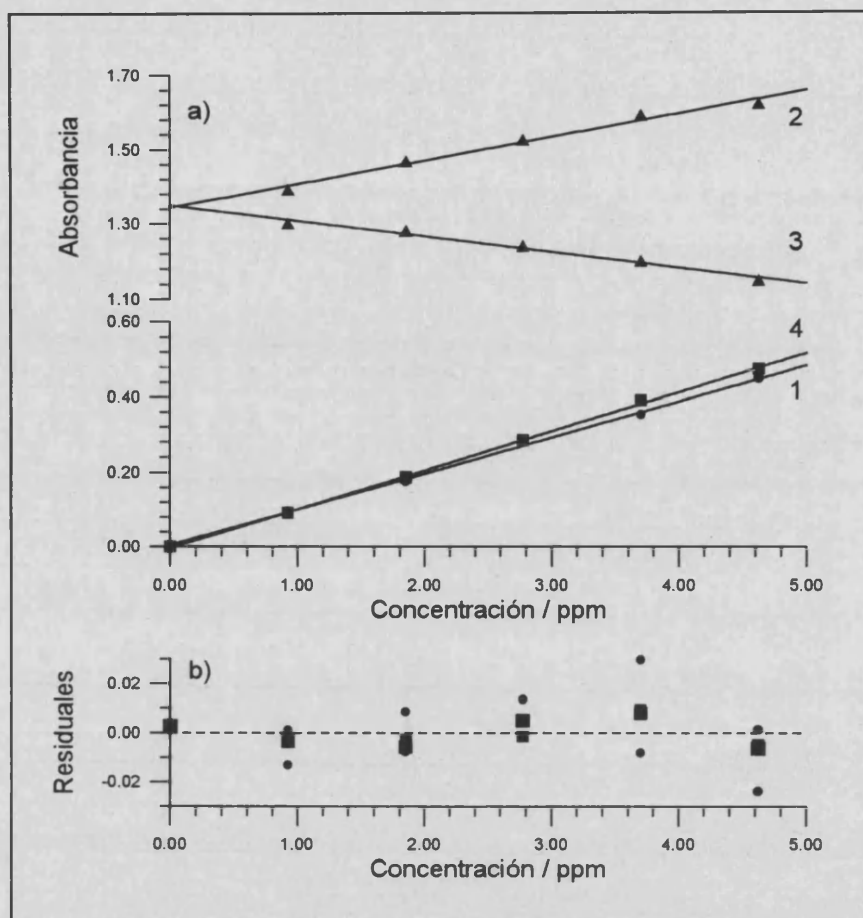


Figura 51: a) Aplicación del HPSAM a la determinación de torio con torón con las siguientes señales: 1) absorbancia a 545 nm. frente a blanco reactivo; 2) absorbancia a 529 nm. frente a blanco disolvente; 3) absorbancia a 470 nm. frente a blanco disolvente; 4) incremento de absorbancia entre 529 y 470 nm. frente a blanco disolvente.

b) Residuales de las rectas 1 (●) y 4 (■).

En la tabla XXXIX se muestran los resultados obtenidos para las rectas de calibrado de torio utilizando incrementos de absorbancia frente a blanco disolvente a los dos pares de longitudes de onda seleccionados. Hay que resaltar que, como se pretendía demostrar, para cada par de longitudes de onda seleccionado, los resultados son equivalentes, a pesar de la diferencia de concentraciones de blanco reactivo añadido. Como se ha comentado en las bases teóricas, el incremento de absorbancia sólo depende de la concentración de analito presente. Los blancos interno y externo son iguales.

Comparando la tabla XXXIX, se puede deducir que el método propuesto describe adecuadamente los datos experimentales, con pendientes de las rectas iguales o superiores a las obtenidas frente a blanco reactivo. Además, mientras que la metodología tradicional

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

introduce distorsiones en la recta de calibrado, el uso de incrementos de absorbancia permite describir mejor los resultados a un modelo lineal, con ordenadas en el origen estadísticamente nulas y bien descritas ($s_a=0.008$ y 0.0012 u.a.), límites de detección sensiblemente inferiores e intervalos lineales de concentración mucho mayores. La representación de los residuales mostrada en la figura 51 describe gráficamente todo lo expuesto.

Parámetro	λ medida (réplica 1)			
	523	475	529	470
n	5			
$a \pm s_a$	0.02 ± 0.03	0.04 ± 0.03	0.02 ± 0.05	0.03 ± 0.03
$b \pm s_b$	$(246 \pm 15) \times 10^2$	$(245 \pm 12) \times 10^2$	$(226 \pm 21) \times 10^2$	$(226 \pm 11) \times 10^2$
r	0.99965	0.99976	0.99914	0.99975
Conc. amarillo titano / M	3.452×10^{-5}			
Test de Bartlett $\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$	$\chi^2_{calc} = 0.08$		$\chi^2_{calc} = 0.62$	
Test de Snedecor $F_{0.95}(2;6) = 5.14$	$F_{calc} = 1.98$		$F_{calc} = 3.09$	

Parámetro	λ medida (réplica 2)			
	523	475	529	470
n	5			
$a \pm s_a$	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.05	0.02 ± 0.05	0.02 ± 0.05
$b \pm s_b$	$(317 \pm 12) \times 10^2$	$(317 \pm 15) \times 10^2$	$(292 \pm 16) \times 10^2$	$(294 \pm 16) \times 10^2$
r	0.99973	0.99956	0.99945	0.99944
Conc. amarillo titano / M	4.597×10^{-5}			
Test de Bartlett $\chi^2_{0.95}(1) = 3.84$	$\chi^2_{calc} = 0.19$		$\chi^2_{calc} = 0.001$	
Test de Snedecor $F_{0.95}(2;6) = 5.14$	$F_{calc} = 0.001$		$F_{calc} = 0.42$	

Tabla XL: Resultados obtenidos para los test de Bartlett y Snedecor en la rectas de calibrado de amarillo de titano.

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

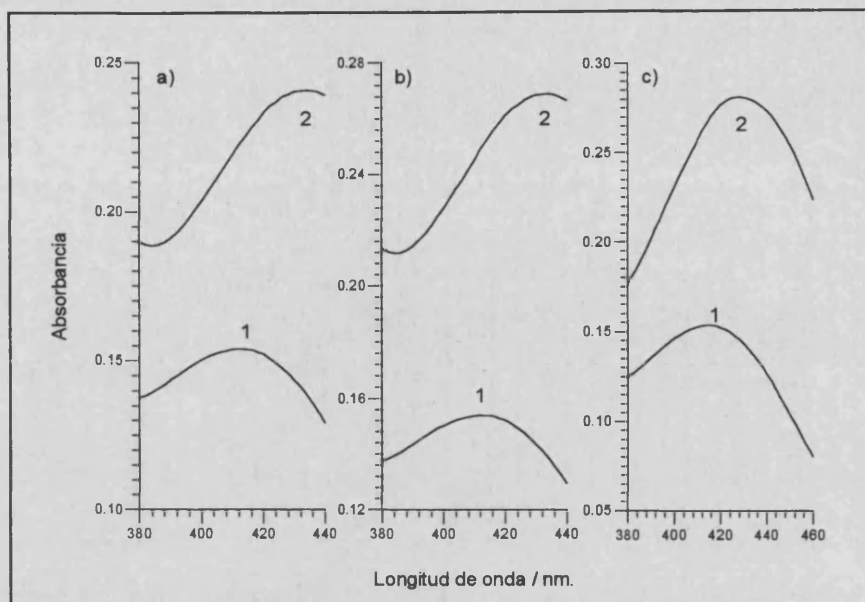


Figura 52: a) Espectros del blanco reactivo (1) y del blanco reactivo más 9.6 ppm de *dl*-metanfetamina (2) frente a blanco disolvente; b) Espectros del blanco reactivo (1) y del blanco reactivo más 8.66 ppm de *d*-metanfetamina (2) frente a blanco disolvente; c) Espectros del blanco reactivo (1) y del blanco reactivo más 8.66 ppm de *dl*-anfetamina (2) frente a blanco disolvente.

d.- Determinación extracto-colorimétrica de anfetaminas con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato.

El procedimiento experimental se ha descrito en [Molíns, 94]. Para realizar las rectas de calibrado de anfetamina y metanfetamina se tomaron volúmenes variables (0.1 a 1.0 mL.) de una disolución patrón de cada uno de los analitos, a los que se adicionó 1.0 mL de tampón (fosfato de pH=7.5 o bicarbonato de pH=10.0), 1.0 mL. de reactivo NQS al 0.5% y agua destilada hasta completar un volumen de 3.0 mL. La mezcla se calentó durante 30 min. a 70°C, o 5 min. a 45°C, y el producto de reacción se extrajo con cloroformo (volumen fase orgánica 3.0 mL.). Finalmente se registró la absorbancia del extracto orgánico entre 190 y 820 nm. cada 2 nm. frente a blanco (reactivo o disolvente).

En la figura 44A se describía la situación en la que el blanco interno y externo son iguales. La recta de calibrado de la *dl*-metanfetamina/NQS responde a dicha situación. En la figura 52A se muestran los espectros correspondientes al blanco reactivo y los correspondientes a la disolución de reactivo en presencia de 9.6 µg/mL de *dl*-metanfetamina.

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

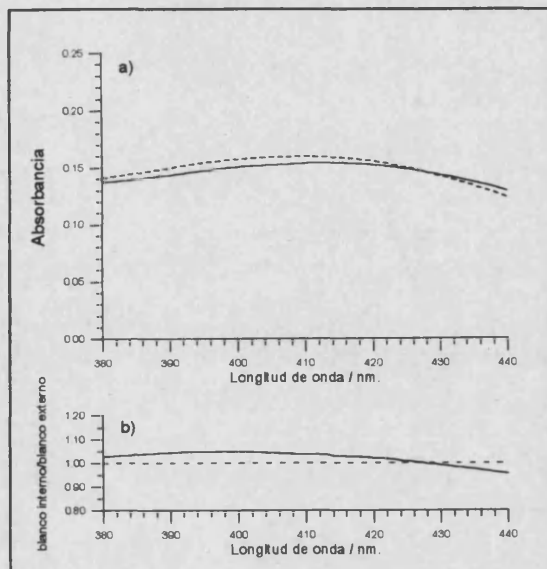


Figura 53: a) Representación del blanco interno (---) y externo (—) para el calibrado de dl-metanfetamina usando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción con CHCl_3 ; b) cociente blanco interno/blanco externo.

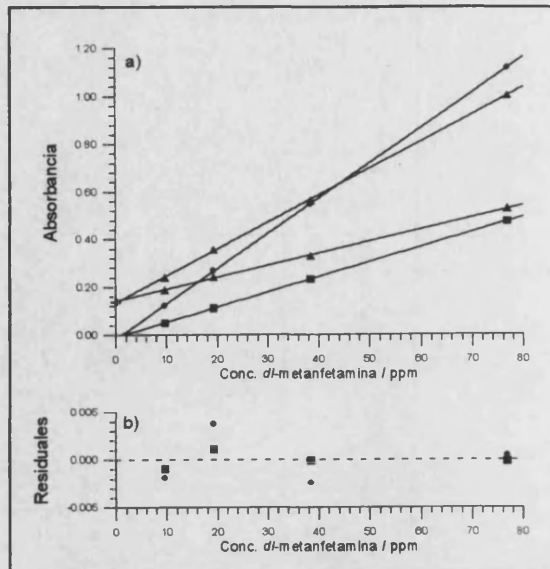


Figura 54: a) Rectas de calibrado obtenidas para la determinación de dl-metanfetamina usando las siguientes señales analíticas: 1) absorbancia a 382 nm. frente blanco disolvente; 2) absorbancia a 434 nm. frente blanco disolvente; 3) absorbancia a 464 nm. frente blanco reactivo; 4) $\Delta A(434-382)$. b) Residuales de las rectas 3 (●) y 4 (■).

Como puede observarse en la figura 53A, los blancos interno y externo son coincidentes, presentando valores que no difieren en más de un 5% (figura 53B). Por lo tanto, seleccionando dos longitudes de onda en las que el blanco externo presente la misma absorbancia, se obtienen dos rectas que intersectan en el punto H, de coordenadas $(0, A_{\text{blanco externo}})$ (figura 54A). El uso de ΔA como señal analítica permite obtener rectas que pasan por el origen de coordenadas, indicando por tanto que la contribución del blanco ha sido eliminada. En la tabla XLI se muestran los resultados obtenidos para tres pares de longitudes de onda diferentes, en los que la absorbancia del blanco reactivo es la misma. En todos los casos, los resultados obtenidos están de acuerdo con lo predicho por las bases teóricas del método.

En la figura 54A se representan el gráfico del HPSAM para el par 434/382 nm., la absorbancia del blanco externo y las rectas de calibrado utilizando incremento de absorbancia frente a blanco disolvente o absorbancia frente a blanco reactivo.

La utilización de valores de ΔA como señal analítica permite mejorar la linealidad respecto a la obtenida utilizando valores de absorbancia frente a blanco reactivo (tabla XLI).

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

En la figura 54B se muestra e gráfico de residuales, donde se observa que el HPSAM ajusta mejor los datos experimentales.

λ medidas	434	382	430	390	426	396
$a \pm s_a$	0.136 ± 0.005	0.143 ± 0.004	0.143 ± 0.005	0.150 ± 0.005	0.149 ± 0.005	0.155 ± 0.005
$(b \pm s_b) \times 10^3$	11.22 ± 0.11	4.97 ± 0.10	10.46 ± 0.11	4.47 ± 0.10	9.63 ± 0.12	4.67 ± 0.11
r	0.99990	0.99963	0.99988	0.99949	0.99985	0.99947
t_{calc}	101.754	51.986	91.887	44.240	81.091	43.470
$A_{blanco\ ext.}$	0.1387	0.1385	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479

λ medidas	464(blanco reactivo)	$\Delta A(434-382)$	$\Delta A(430-390)$	$\Delta A(426-396)$
$a \pm s_a$	-0.015 ± 0.003	-0.0070 ± 0.0009	-0.0074 ± 0.0008	-0.0063 ± 0.0007
$(b \pm s_b) \times 10^3$	14.67 ± 0.07	6.248 ± 0.019	5.990 ± 0.019	4.962 ± 0.017
r	0.99998	0.99999	0.99999	0.99999
t_{calc}	219.734	314.472	314.608	295.022
n	4	4	4	4
Límite de detección/ppm	1.32	0.92	0.92	0.98

Tabla XLI: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de *dl*-metanfetamina en presencia de NQS.

En la figura 44B se describía la situación en la que las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado a λ_j y λ_k (blanco interno) son iguales, pero no lo son con el valor esperado del blanco externo. Las causas de esta situación pueden ser diversas, p. ej. que el reactivo no haya sido preparado correctamente, o que la adición del mismo a los patrones no haya sido reproducible. En este caso es importante tener en cuenta un factor adicional: la extracción ineficiente del reactivo en presencia de analito. En esta situación, la utilización de incrementos de absorbancia como señales analíticas puede eliminar este tipo de error sistemático, que no podría ser eliminado mediante la aplicación del método tradicional. En la figura 55A se muestra el comportamiento del blanco interno y externo para la determinación de *d*-metanfetamina (espectros en figura 52B). En este caso, y aunque el blanco interno y externo no son coincidentes, la relación entre ellos es constante en el intervalo de longitudes de onda estudiado (figura 55B). En la tabla XLII se muestran los resultados obtenidos para tres pares de longitudes de onda en las que el blanco externo presenta el mismo valor de absorbancia. En la figura 56A se muestra el gráfico del HPSAM para el par

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

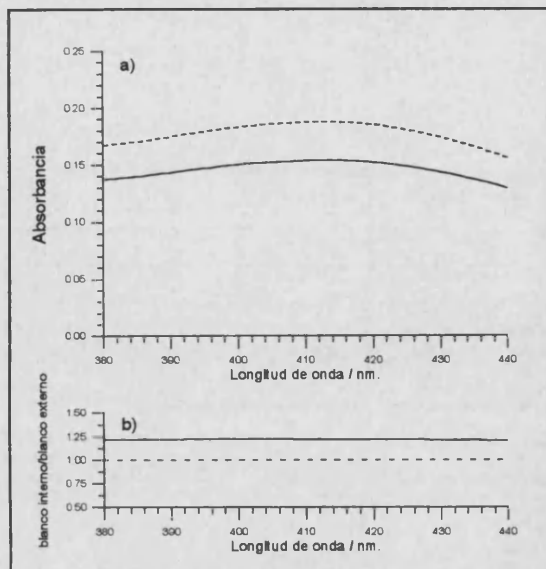


Figura 55: a) Representación del blanco interno (---) y externo (—) para el calibrado de *d*-metanfetamina usando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción con CHCl_3 ; b) cociente blanco interno/blanco externo.

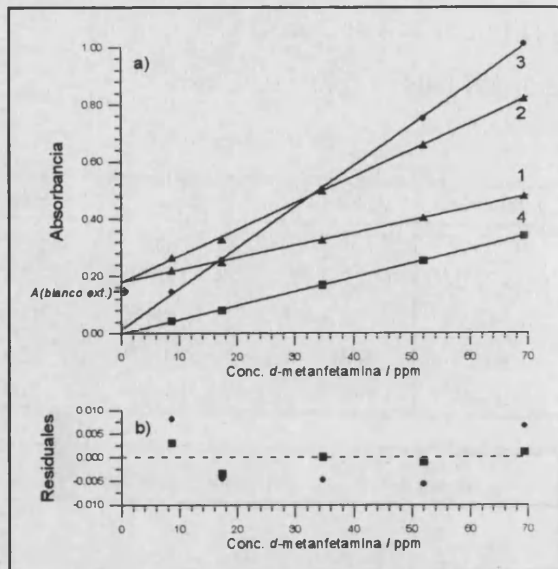


Figura 56: a) Rectas de calibrado obtenidas para la determinación de *d*-metanfetamina usando las siguientes señales analíticas: 1) absorbancia a 396 nm. frente blanco disolvente; 2) absorbancia a 426 nm. frente blanco disolvente; 3) absorbancia a 464 nm. frente blanco reactivo; 4) $\Delta A(426-396)$. b) Residuales de las rectas 3 (●) y 4 (■).

426/396 nm., la absorbancia del blanco externo y las rectas de calibrado utilizando incremento de absorbancia frente a blanco disolvente o absorbancia frente a blanco reactivo.

La utilización de valores de ΔA como señal analítica no permite una mejora de la linealidad respecto a la obtenida utilizando valores de absorbancia frente a blanco reactivo (tabla XLII), pero si elimina el error constante que una ordenada en el origen no nula introduciría en la determinación del analito. En la figura 54B se muestra el gráfico de residuales, siendo éstos más pequeños cuando se utiliza el HPSAM.

También se pueden encontrar ejemplos donde los espectros del blanco interno y externo no sean coincidentes (figura 44C), como se ha podido demostrar mediante la aplicación del HPSAM. En este sentido, se ha observado que réplicas de disoluciones clorofórmicas del reactivo presentan diferencias en el intervalo de longitudes de onda entre 380 y 420 nm. En estos casos, las rectas de calibrado obtenidas a la longitud de onda donde el blanco interno y externo coinciden proporciona el mínimo error.

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

λ medidas	430	390	426	396	424	398
$a \pm s_a$	0.174±0.006	0.175±0.003	0.180±0.006	0.180±0.003	0.182±0.005	0.182±0.003
$(b \pm s_b) \times 10^3$	10.03±0.14	4.09 ± 0.07	9.21 ± 0.13	4.29 ± 0.08	8.79 ± 0.13	4.45 ± 0.08
r	0.99973	0.99958	0.99970	0.99952	0.99968	0.99951
t_{calc}	74.188	59.541	70.354	56.011	68.683	55.285
$A_{blanco\ ext.}$	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479	0.1494	0.1493

λ medidas	464(blanco reactivo)	$\Delta A(430-390)$	$\Delta A(426-396)$	$\Delta A(424-398)$
$a \pm s_a$	0.014±0.007	-0.001±0.004	-0.0008±0.0024	-0.0005±0.0021
$(b \pm s_b) \times 10^3$	14.26 ± 0.16	5.94 ± 0.07	4.92 ± 0.06	4.35 ± 0.05
r	0.99982	0.99979	0.99981	0.99981
t_{calc}	90.686	83.688	88.318	87.885
n	5	5	5	5
Límite de detección/ppm	2.25	2.44	2.31	2.32

Tabla XLII: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de *d*-metanfetamina en presencia de NQS.

En la figura 52 C se mostraba el espectro del blanco reactivo y del producto NQS/*dl*-anfetamina (8.66 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los blancos interno y externo correspondientes a la determinación de *dl*-anfetamina son diferentes, como se observa en la figura 57A. En la tabla XLIII se dan los resultados obtenidos al utilizar incrementos de absorbancia como señales analíticas a tres pares de longitudes de onda distintos, donde el blanco externo presenta la misma absorbancia. Sin embargo el blanco interno proporciona valores diferentes, como se deduce al comparar las ordenadas en el origen obtenidas a las distintas longitudes de onda.

En la figura 58A se muestra el gráfico del HPSAM para el par 432/394 nm., la absorbancia del blanco externo y las rectas de calibrado utilizando incremento de absorbancia frente a blanco disolvente o absorbancia frente a blanco reactivo. En este caso, la ordenada en el origen de la recta obtenida utilizando incrementos de absorbancia no es cero, puesto que $A_j^0 \neq A_k^0$. Además, el valor del estadístico t_{calc} es menor que el obtenido para la recta de calibrado utilizando valores de absorbancia frente a blanco reactivo como señales analíticas, debido a que los fundamentos del método ya no son aplicables, y los incrementos de absorbancia no dependen sólo de la concentración de analito. La figura 58B evidencia esto, al ser mayores los residuales para el HPSAM. Cuando se presenta una situación de este tipo, para aplicar el HPSAM no se pueden seleccionar dos longitudes de onda en las que el blanco externo presente la misma absorbancia. El tratamiento de los datos de forma tradicional, o

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

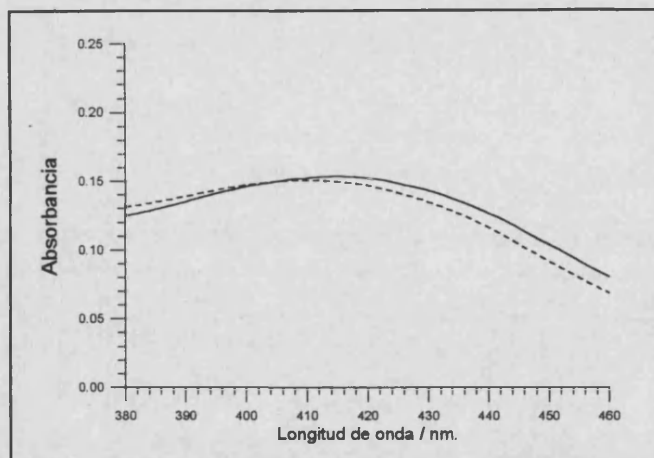


Figura 57: Representación del blanco interno (---) y externo (—) para el calibrado de dl-anfetamina usando NQS como reactivo y extrayendo el producto de reacción con CHCl_3 .

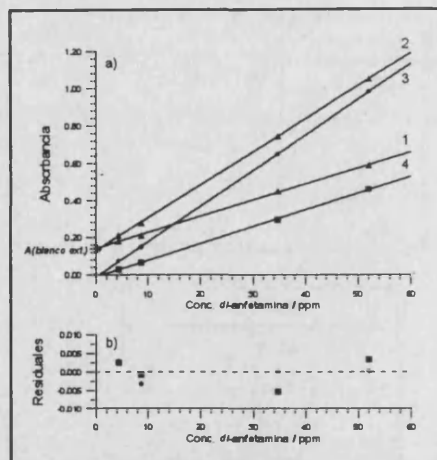


Figura 58: a) Rectas de calibrado obtenidas para la determinación de d-metanfetamina usando las siguientes señales analíticas: 1) absorbancia a 394 nm. frente blanco disolvente; 2) absorbancia a 432 nm. frente blanco disolvente; 3) absorbancia a 450 nm. frente blanco reactivo; 4) $\Delta A(432-394)$.

b) Residuales de las rectas 3 (●) y 4 (■).

mediante la aplicación del HPSAM, conduce a la obtención de resultados afectados de error, si no se aplica un procedimiento para eliminarlo. El procedimiento tradicional puede ser utilizado si se puede demostrar que existe al menos una longitud de onda donde blanco interno y externo coincidan, y además la concentración de reactivo pueda considerarse constante para todo el intervalo dinámico de concentraciones del analito. Esta última condición no puede cumplirse si no se trabaja en condiciones de gran exceso de reactivo, o en el caso de procedimientos extracto-espectrofotométricos, si en la fase orgánica no se extrae la misma cantidad, independientemente de la concentración de analito presente. Cuando estas condiciones no se cumplen, se obtiene un valor para la pendiente de la recta de calibrado diferente al real de la misma.

e.- Determinación fluorimétrica de fenol.

Se preparó una disolución patrón de 500 ppm de fenol, y tampón fosfato de $\text{pH}=7.0$. Los calibrados de fenol se prepararon en matraces aforados de 25 mL., a los que se añadió 2.5 mL. de tampón fosfato y cantidades variables de disolución patrón (previamente diluida) para dar concentraciones finales en el intervalo 0-250 ppb.

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

λ medidas	440	382	432	394	424	404
$a \pm s_a$	0.116 ± 0.003	0.133 ± 0.006	0.132 ± 0.004	0.143 ± 0.005	0.143 ± 0.004	0.150 ± 0.005
$(b \pm s_b) \times 10^3$	18.67 ± 0.11	5.99 ± 0.20	17.72 ± 0.12	8.69 ± 0.17	16.49 ± 0.13	11.26 ± 0.15
r	0.99997	0.99887	0.99995	0.99963	0.99994	0.99981
t_{calc}	176.594	29.761	144.414	51.623	125.176	73.160
$A_{blanco\ ext.}$	0.1436	0.1436	0.1478	0.1479	0.1494	0.1493

λ medida	450(blanco reactivo)	$\Delta A(440-382)$	$\Delta A(432-394)$	$\Delta A(424-404)$
$a \pm s_a$	-0.0122 ± 0.0025	-0.016 ± 0.006	-0.011 ± 0.004	-0.0066 ± 0.0022
$(b \pm s_b) \times 10^3$	19.14 ± 0.08	12.68 ± 0.20	9.03 ± 0.13	5.23 ± 0.07
r	0.99998	0.99976	0.99981	0.99983
t_{calc}	240.709	64.528	71.717	76.509
n	4	4	4	4
Límite de detección/ppm	0.89	3.24	2.93	2.75

Tabla XLIII: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación de dl-anfetamina en presencia de NQS.

En disolución acuosa a $pH=7.0$, el fenol presenta un máximo de excitación a 270 nm. Excitando a dicha longitud de onda, se observa un máximo de emisión a 299 nm., como se puede ver en la figura 59. En dicha figura se muestra la pendiente de las curvas de calibrado de excitación y emisión para el fenol (eje izquierdo). De esta manera se considera solamente el comportamiento espectral del analito. En estas condiciones experimentales, y como puede verse en la figura 59, eje derecho, la banda de emisión Raman del disolvente solapa completamente con los máximos de emisión de los analitos.

En este apartado se pretende determinar fenol en medio acuoso a $pH=7.0$ (tampón fosfato). Si se quiere eliminar la contribución del blanco la bibliografía ha descrito procedimientos basados en cambiar la longitud de onda de excitación a valores menores [Naley,83], aunque ello conlleva una pérdida de sensibilidad al no estar trabajando en las condiciones óptimas. Para aplicar el HPSAM, se tienen que seleccionar dos longitudes de onda tales que éste presente la misma intensidad de emisión de fluorescencia.

Ante todo se ha comprobado la coincidencia del blanco interno y externo, para determinar cualquier anomalía en su comportamiento. En este caso, la señal debida al blanco puede suponerse constante en todo el intervalo de concentraciones del analito, debido a su

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

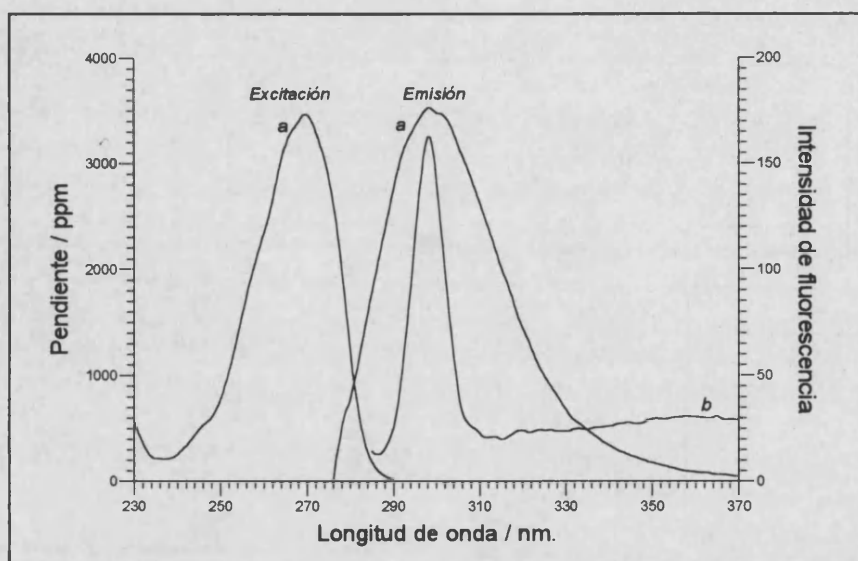


Figura 59: Eje izquierdo: Pendientes de las rectas de calibrado de excitación y emisión, en medio acuoso a pH=7.0 (tampón fosfato) para a) Fenol (λ_{exc} de 230 a 290 nm.; $\lambda_{ems} = 300$ nm.; λ_{ems} de 276 a 370 nm.; $\lambda_{exc} = 270$ nm.)

Eje derecho: b) Espectro de emisión para el agua/tampón fosfato (pH = 7.0). λ_{ems} de 282 a 370 nm.; $\lambda_{exc} = 270$ nm.

naturaleza. En la figura 60 se representan ambos, donde se observa que coinciden totalmente. Una vez comprobado esto, se seleccionaron pares de longitudes de onda donde el blanco presentase la misma intensidad de fluorescencia. Los datos estadísticos de las rectas obtenidas se representan en la tabla XLIV. Puede observarse que las rectas obtenidas cuando se utiliza ΔI_f como señal analítica tienen ordenadas en el origen nulas, puesto que la contribución debida al Raman del disolvente ha sido eliminada. En cuanto a la recta obtenida en el máximo de emisión, la contribución del blanco ha sido eliminada por el sistema habitual de restarle el valor medio de una serie de medidas de éste.

Los límites de detección son más pequeños cuando se utiliza ΔI_f en vez del valor habitual de I_f en el máximo de emisión (restándole el valor de la señal del blanco), a pesar de que las pendientes obtenidas son menores. Esto se explica fácilmente viendo que el valor del estadístico t_{calc} de linealidad es mayor utilizando el HPSAM, y por lo tanto los datos obtenidos ajustan mejor a dicho modelo.

Del mismo modo la concentración de saturación (concentración de analito que al ser medida da una intensidad de fluorescencia de 1000, el máximo que puede medir el equipo) es mayor cuando se utiliza incrementos de intensidad. En este caso, se ha tomado como

4.1.2.2.- ESTUDIO DE DETERMINACIONES QUE UTILIZAN BLANCOS ABSORBENTES

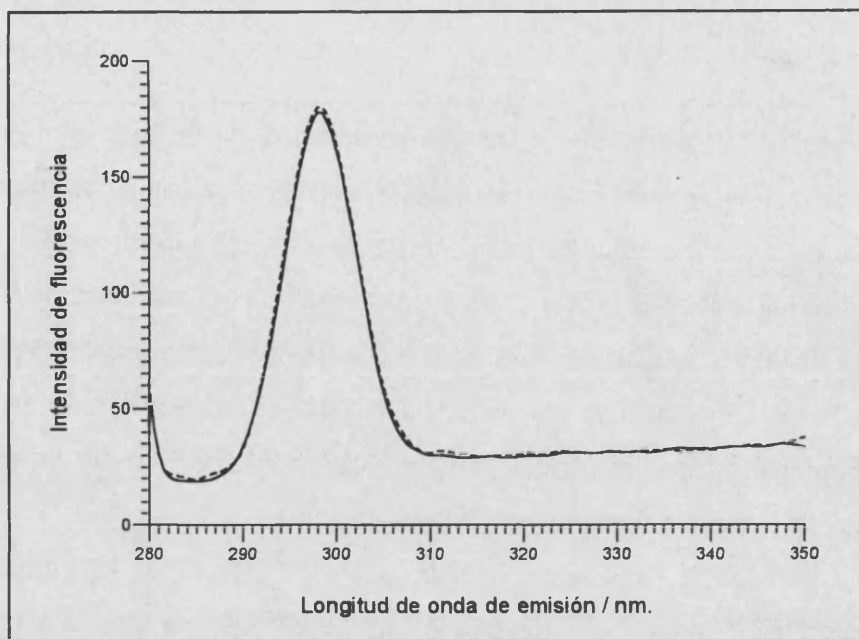


Figura 60: Blancos interno (- - -) y externo (—) para el agua/tampón fosfato (pH = 7.0). λ_{ems} de 280 a 350 nm.; λ_{exc} = 270 nm.

concentración de saturación la más pequeña de la de las rectas que sirven para su construcción.

λ medida	n	$a \pm s_a$	$(b \pm s_b)/ppm$	r	s_I	Límite de detección/ppb	t_{calc}	Conc. saturación/ppb
$I_f(289.5)$	5	29 ± 4	3128 ± 30	0.99986	3.6	-	104.214	-
$I_f(315.5)$	5	29 ± 5	2248 ± 34	0.99965	4.1	-	65.440	-
$\Delta I (289.5/315.5)$	5	-0 ± 1	879 ± 5	0.99996	0.6	3.0	187.864	310.4
$I_f(290.0)$	5	33 ± 4	3239 ± 31	0.99986	3.8	-	103.291	-
$I_f(335.0)$	5	32 ± 2	533 ± 12	0.99923	1.5	-	44.235	-
$\Delta I (290.0/335.0)$	5	0 ± 3	2706 ± 20	0.99992	2.4	4.1	137.197	298.5
$I_f(290.0)$	5	33 ± 4	3239 ± 31	0.99986	3.8	-	103.291	-
$I_f(341.0)$	5	33 ± 2	354 ± 14	0.99758	1.7	-	24.826	-
$\Delta I (290.0/341.0)$	5	0 ± 2	2885 ± 18	0.99994	2.1	3.5	161.243	298.5
$I_f(298.5)$ (máximo emisión)	5	2 ± 7	4049 ± 56	0.99972	6.7	7.6	72.840	246.5

Tabla XLIV: Resultados obtenidos para las rectas de calibrado en la determinación mediante espectrofluorimetría de fenol.

4.1.2.- DETERMINACIONES ANALÍTICAS QUE UTILIZAN BLANCOS REACTIVOS

4.1.2.3.- CONCLUSIONES.

La aplicación del HPSAM utilizando incrementos de señales analíticas en las determinaciones que utilizan blancos absorbentes permite evaluar y eliminar el error sistemático que el exceso de reactivo introduce en dichas determinaciones si se utiliza la tradicional metodología de medida frente a blanco añadido en su concentración inicial. Para el desarrollo de las bases teóricas del método se han definido dos nuevos conceptos: *blanco interno*, correspondiente al hallado por extrapolación de rectas de calibrado del analito en presencia del reactivo, y *blanco externo*, a partir de disoluciones de reactivo. La comparación del valor de ambos permite evidenciar y caracterizar el error, si existe, que la presencia del blanco reactivo introduce en el análisis. Como aplicación práctica se han estudiado cinco determinaciones distintas, representativas cada una de ella de una situación experimental distinta, y utilizando tanto espectrofotometría como espectrofluorimetría.

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

En este apartado se amplían las bases teóricas del HPSAM para la resolución de mezclas ternarias, buscando longitudes de onda para los dos interferentes donde se cumpla una determinada relación. A partir de estos valores, y mediante una adecuada transformación, conseguimos igualar el comportamiento espectral de ambas especies, resolviendo la muestra ternaria como si se tratara de una mezcla binaria.

4.1.3.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

Sea una mezcla ternaria **S** de los compuestos **X**, **Y** y **Z**, cuyos espectros se muestran en la figura 61. La absorbancia de la muestra a cada longitud de onda vendrá descrita por la suma de las absorbancias de cada especie a dicha longitud de onda:

$$A_S = \varepsilon_X \times C_X^0 + \varepsilon_Y \times C_Y^0 + \varepsilon_Z \times C_Z^0 = A_X^0 + A_Y^0 + A_Z^0 \quad (109)$$

donde ε_X , ε_Y y ε_Z son los coeficientes de absortividad molar para **X**, **Y** y **Z**; C_X^0 , C_Y^0 y C_Z^0 son las concentraciones de las especies **X**, **Y** y **Z** en la muestra **S**, y A_X^0 , A_Y^0 y A_Z^0 son las absorbancias individuales de las especies **X**, **Y** y **Z** en la muestra **S** a la longitud de onda en estudio.

Si se quiere determinar la concentración de la especie **X** en la muestra **S**, donde además están presentes los otros dos compuestos **Y** y **Z**, utilizando el HPSAM. Para ello necesitamos encontrar dos longitudes de onda $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ donde se cumpla la siguiente condición:

$$\frac{A_{Y,X(j)}}{A_{Y,X(k)}} = \frac{A_{Z,X(j)}}{A_{Z,X(k)}} = r_{Y,Z} \quad (110)$$

En la figura 62 se representa el comportamiento espectral de la muestra **S** cuando sólo se consideran las longitudes de onda $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$. También se representa el mismo gráfico, pero tras la transformación de los datos considerando el factor $r_{Y,Z}$, que sólo depende de la

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

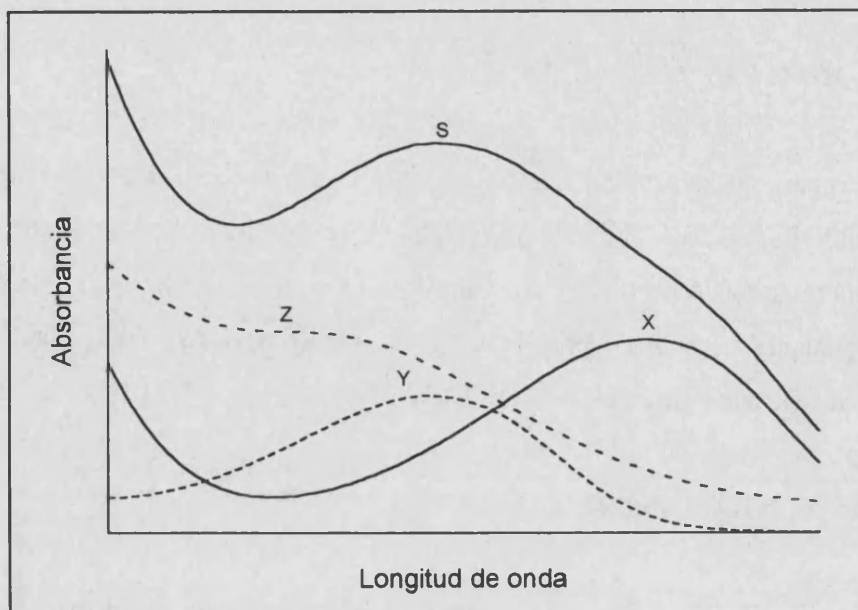


Figura 61: Comportamiento espectral del analito X, interferentes Y y Z, y la muestra S.

naturaleza de los compuestos Y y Z. El factor $r_{Y,Z}$ permite transformar la señal analítica de Y y Z entre $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ en una línea recta de pendiente nula. De esta manera, las bases teóricas descritas para mezclas binarias son fácilmente aplicables a la resolución de mezclas ternarias.

Las ecuaciones de las rectas obtenidas por aplicación del HPSAM a las dos longitudes de onda $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ previamente seleccionadas serán (figura 63):

$$\text{Para } \lambda_{X(j)}: A_{X(j)} = A_{X, X(j)}^0 + A_{Y, X(j)}^0 + A_{Z, X(j)}^0 + M_{X, X(j)} \times C_X^i; i=0,1,\dots,n \quad (111)$$

$$\text{Para } \lambda_{X(k)}: A_{X(k)} = A_{X, X(k)}^0 + A_{Y, X(k)}^0 + A_{Z, X(k)}^0 + M_{X, X(k)} \times C_X^i; i=0,1,\dots,n \quad (112)$$

donde $A_{X(j)}$ y $A_{X(k)}$ son las absorbancias medidas a las dos longitudes de onda previamente seleccionadas; $M_{X, X(j)}$ y $M_{X, X(k)}$ son las pendientes de las rectas obtenidas a $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$; C_X^i es la concentración de analito X añadida en la disolución i ; n es el número de adiciones de analito puro realizadas. Cuando $i = 0$ se tiene la disolución que sólo contiene muestra.

Si multiplicamos la ecuación 112 por el factor $r_{Y,Z}$ obtenido en la expresión 110, se obtiene que (figura 63):

$$r_{Y,Z} \times A_{X(k)} = r_{Y,Z} \times A_{X, X(k)}^0 + r_{Y,Z} \times A_{Y, X(k)}^0 + r_{Y,Z} \times A_{Z, X(k)}^0 + r_{Y,Z} \times M_{X, X(k)} \times C_X^i =$$

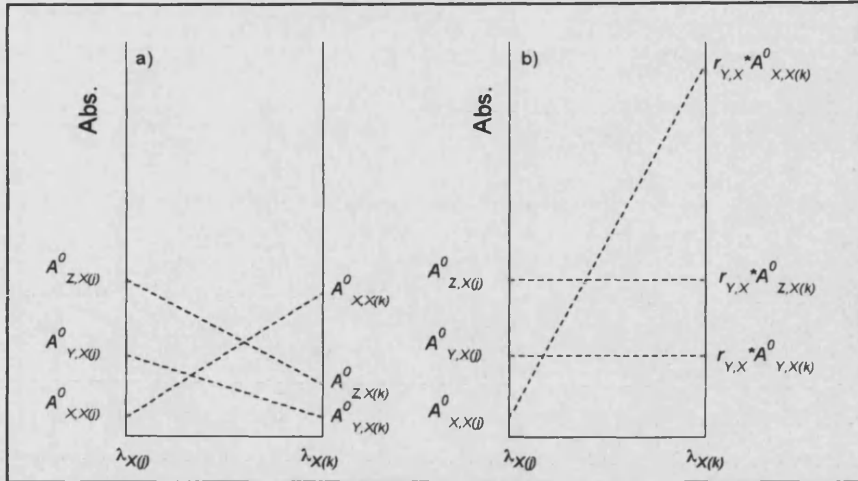


Figura 62: Linealización del comportamiento espectral de los interferentes Y y Z cuando son corregidos por el factor $r_{Y,Z}$ (sólo se consideran $\lambda_{X(0)}$ y $\lambda_{X(k)}$).

$$= r_{Y,Z} \times A_{X, X(k)}^0 + A_{Y, X(0)}^0 + A_{Z, X(0)}^0 + r_{Y,Z} \times M_{X, X(k)} \times C_X^i \quad (113)$$

Las rectas (111) y (113) permiten el cálculo de la concentración de analito X exenta de error, a partir de la abcisa de su punto de corte, que es el punto H, de coordenadas ($-C_{H(X)}, A_{H(Y,Z)}$):

$$\begin{aligned} & A_{X, X(0)}^0 + A_{Y, X(0)}^0 + A_{Z, X(0)}^0 + M_{X, X(0)} \times (-C_{H(X)}) = \\ & = r_{Y,Z} \times A_{X, X(k)}^0 + A_{Y, X(0)}^0 + A_{Z, X(0)}^0 + r_{Y,Z} \times M_{X, X(k)} \times (-C_{H(X)}) \\ & -C_{H(X)} = \frac{A_{X, X(0)}^0 - r_{Y,Z} \times A_{X, X(k)}^0}{r_{Y,Z} \times M_{X, X(k)} - M_{X, X(0)}} \end{aligned} \quad (114)$$

donde $C_{H(X)} = C_X^0$ es la concentración de analito X en la muestra, puesto que la ecuación (114) depende sólo de variables relacionadas con el analito. El error incorregible debido a la presencia de dos interferentes directos ha sido transformado en un error sistemático constante, que es fácilmente evaluable, como predicen las bases del HPSAM. Si se sustituye el valor obtenido en la ecuación (114) en (111) ó (113) se obtiene para $A_{H(Y,Z)}$:

$$A_{H(Y,Z)} = A_{Y, X(0)}^0 + A_{Z, X(0)}^0 = r_{Y,Z} \times \left\{ A_{Y, X(k)}^0 + A_{Z, X(k)}^0 \right\} \quad (115)$$

Las longitudes de onda donde se cumple la ecuación (110) se localizan fácilmente, como se deduce de dicha ecuación, reordenándola de la siguiente forma:

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

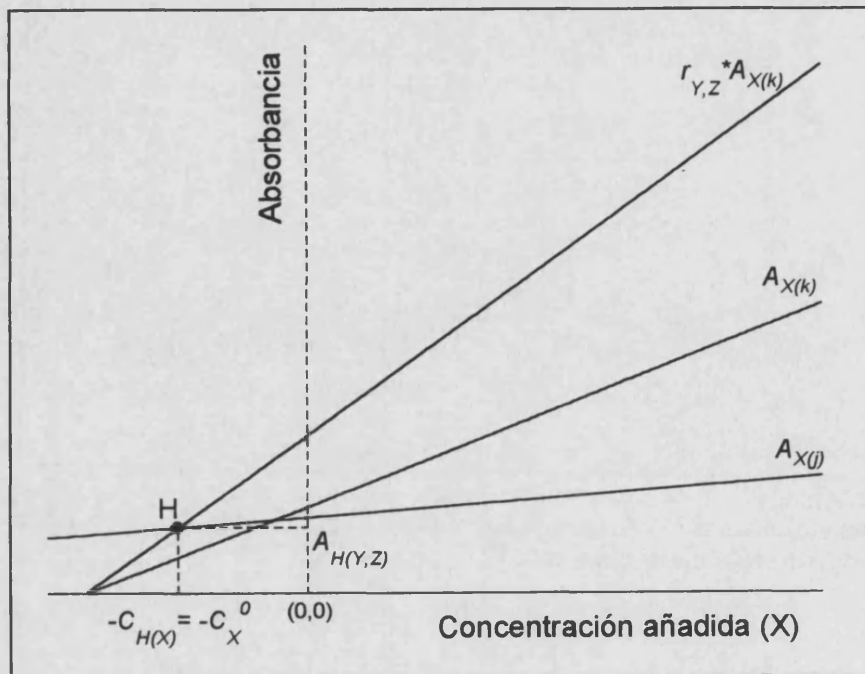


Figura 63: Representación gráfica de las rectas obtenidas aplicando el HPSAM a mezclas ternarias.

$$\frac{A_{Y,X(j)}}{A_{Z,X(j)}} = \frac{r_{Y,Z} \times A_{Y,X(k)}}{r_{Y,Z} \times A_{Z,X(k)}} = \frac{A_{Y,X(k)}}{A_{Z,X(k)}} \quad (116)$$

puesto que en este caso $r_{Y,Z}$ será el mismo para **Y** y para **Z**.

Por tanto, para calcular las longitudes de onda, sólo son necesarios un espectro de la especie **Y** y otro de **Z**. Después se realiza el cociente de ambos y se localizan los pares de longitudes de onda que presenten el mismo valor para el cociente. Aunque el valor de dicha relación depende de las concentraciones de **Y** y **Z** en los espectros obtenidos, su valor será el mismo a las dos longitudes de onda seleccionadas. En la figura 64 se muestra dicho cociente para un espectro de **Y** y otro de **Z**, y dos longitudes de onda $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ donde la ecuación (116) se cumple. Dichos valores dependen de la naturaleza de los compuestos **Y** y **Z**, pero no de la de **X**. Por tanto, dichos valores de pares de longitudes de onda sirven para calcular cualquier analito **X** en presencia de **Y** y **Z** simultáneamente. De todos los pares de longitudes de onda posibles, existen para cada analito determinados pares que dan a la

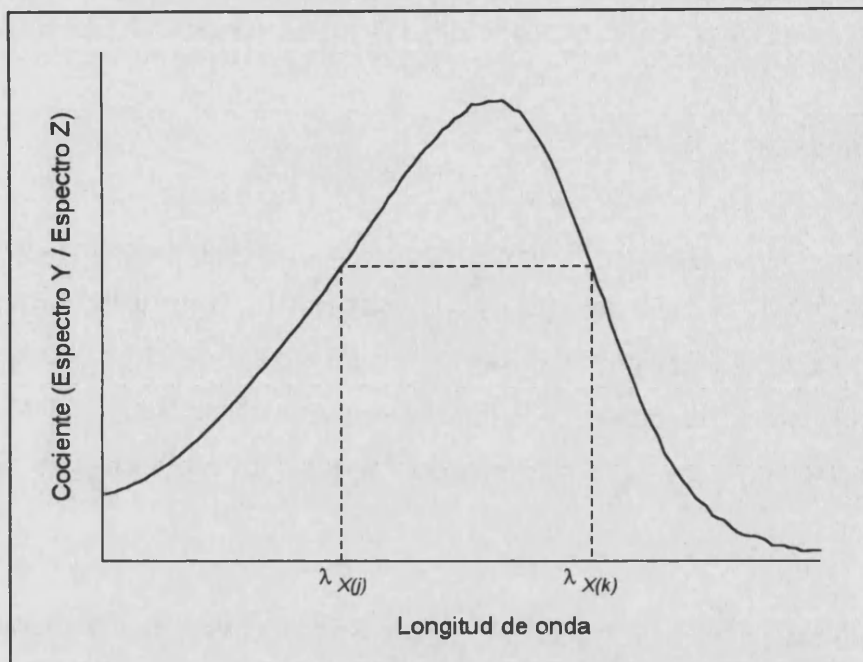


Figura 64: Cociente entre los espectros de los interferentes Y y Z. Selección de dos longitudes de onda $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ donde se cumple la ecuación 110.

determinación la máxima precisión. Estos son los que hacen al denominador de la ecuación (114) lo más grande posible.

Cuando se sabe que en la determinación no existe efecto matriz, el método puede simplificarse experimentalmente, midiendo los valores de absorbancia de la muestra a $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$, y tomando como valores para $M_{X,X(j)}$ y $M_{X,X(k)}$ los obtenidos en las rectas de calibrado de X (los coeficientes de absorptividad molar). En este caso la ecuación (114) se transforma en:

$$-C_{H(X)} = \frac{A_{S, X(j)} - r_{Y,Z} \times A_{S, X(k)}}{r_{Y,Z} \times \epsilon_{X, X(k)} - \epsilon_{X, X(j)}} \quad (117)$$

que permite el cálculo de la concentración de analito X en la muestra sin necesidad de realizar la adición estándar, así como determinar las concentraciones de Y y Z en la muestra (independientemente del método elegido para calcular la de X). La optimización del valor del denominador en las ecuaciones (114) ó (117) puede hacerse para cada especie, con lo que siempre se obtendrán los resultados más precisos.

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

4.1.3.2.- ESTUDIO DE DIFERENTES MEZCLAS TERNARIAS FENÓLICAS.

Procedimiento.

Se obtuvieron los espectros de absorción para distintos calibrados de fenol, *o*-cresol, 4-clorofenol y 3,4-diclorofenol (preparadas en NaOH 0.1 M inmediatamente antes de medirlas). El intervalo de longitudes de onda seleccionado fue de 220 a 320 nm. cada 0.2 nm. en el Perkin Elmer Lambda 16, y la línea base se obtuvo con NaOH 0.1 M antes de la medida de cada serie. Estos datos sirvieron para calcular los coeficientes de absorptividad molar de cada especie.

Para aplicar el método propuesto, se prepararon cuatro mezclas ternarias, cuya composición se muestra en la tabla XLV, donde se ha remarcado la especie considerada como analito (descrita como **X**). Las concentraciones de analito añadidas para cada mezcla cuando se aplicó el método de adición estándar del punto H variaron para cada muestra entre 0 y 1.063×10^{-4} M para el fenol, 0 y 9.307×10^{-5} M para el *o*-cresol, 0 y 7.771×10^{-5} M para el 4-clorofenol y 0 y 6.215×10^{-5} M para el 3,4-diclorofenol. Los espectros se registraron cada 0.2 nm., en el Perkin-Elmer Lambda 16.

MUESTRA	$X \times 10^5 / \text{mol} \times L^{-1}$	$Y \times 10^5 / \text{mol} \times L^{-1}$	$Z \times 10^5 / \text{mol} \times L^{-1}$
A	<i>o</i> -cresol	4-clorofenol	3,4-diclorofenol
	4.467	3.730	2.983
B	3,4-diclorofenol	fenol	<i>o</i> -cresol
	2.983	5.104	4.467
C	fenol	<i>o</i> -cresol	4-clorofenol
	5.104	4.467	3.730
D	4-clorofenol	fenol	3,4-diclorofenol
	3.730	5.104	2.983

Tabla XLV: Composición de las cuatro muestras ensayadas.

4.1.3.2.- ESTUDIO DE DIFERENTES MEZCLAS TERNARIAS FENÓLICAS

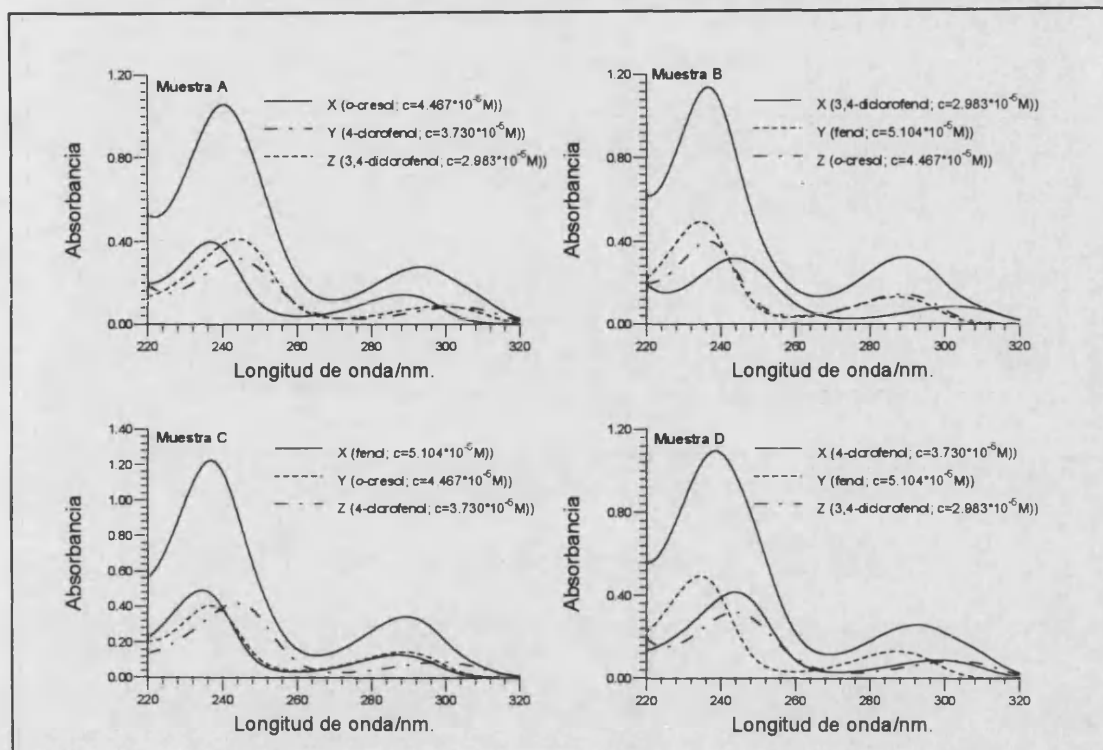


Figura 65: Espectros de las cuatro muestras ensayadas de acuerdo con la composición de la tabla XLV.

Resultados y discusión.

La figura 65 muestra los espectros de las diferentes muestras ternarias preparadas de acuerdo con la tabla XLV. Como puede observarse, en las cuatro muestras se produce un gran solapamiento entre los espectros de las especies consideradas como analito e interferentes. Además, en las dos últimas muestras, las denominadas C y D, el espectro del analito solapa casi por completo con uno de los interferentes (muestra C, máximos del fenol a 234.6 y 287.0 nm. y máximos del *o*-cresol a 236.6 y 288.4 nm.; muestra D, máximos del 4-clorofenol a 243.8 y 298.4 nm. y máximos del 3,4-diclorofenol a 243.8 y 303.0 nm.). Los ejemplos seleccionados son representativos de situaciones espectrales extremas con el objeto de verificar la aplicabilidad del método propuesto.

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

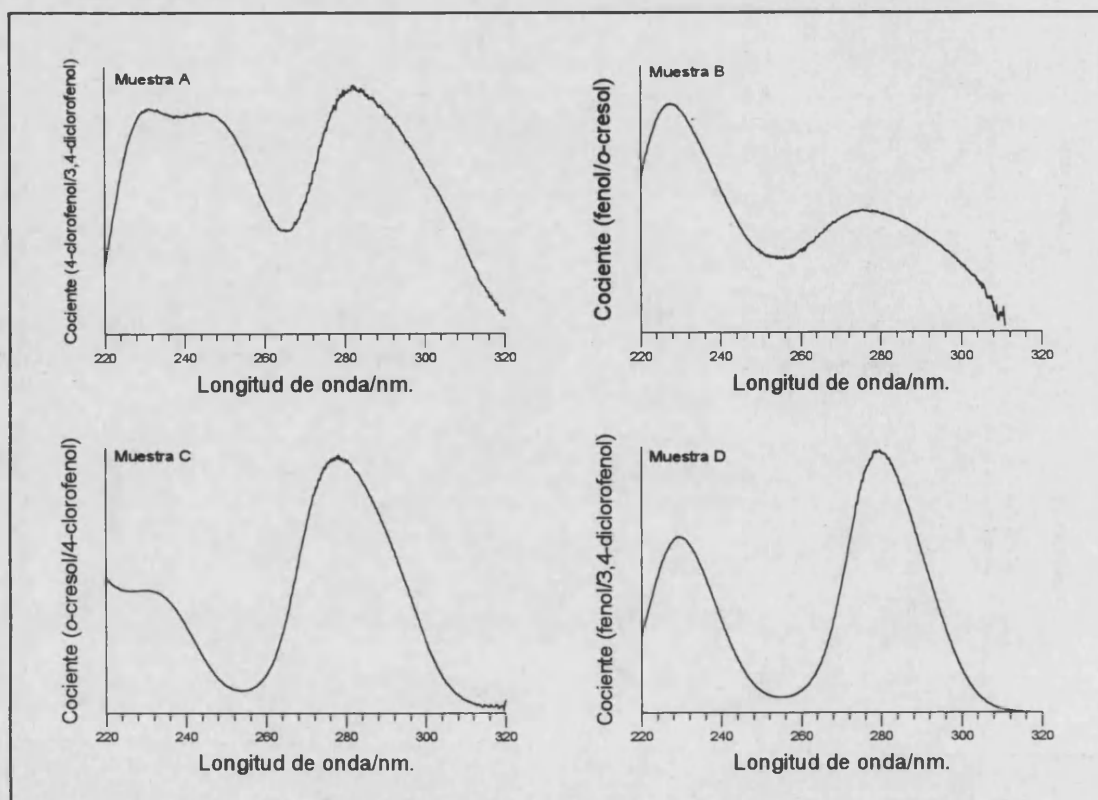


Figura 66: Cociente de los espectros de los interferentes en las cuatro muestras ensayadas.

De acuerdo con los fundamentos expuestos, lo primero que se realizó fue el cociente entre los espectros de las especies **Y** y **Z** para calcular los valores de $\lambda_{X(j)}$ y $\lambda_{X(k)}$ donde se cumple la ecuación (110), de acuerdo con la ecuación (116). Dichos cocientes se muestran en la figura 66. Como valores de absorbancia se seleccionaron las pendientes de las curvas de calibrado de cada especie, lo que equivale a utilizar los coeficientes de absortividad molar.

De la observación de la figura 66 se puede deducir que si el comportamiento espectral de las especies consideradas como interferentes es similar, como en el caso de las muestras A y B (figuras 65A y B), los cocientes se obtiene con cierto ruido (figuras 66A y B). A pesar de ello, los resultados obtenidos posteriormente demostraron que no era necesario realizar ningún tipo de suavizado de los datos obtenidos para dicho cociente. En el caso de las otras dos muestras, C y D, en las que el comportamiento espectral de los interferentes no es tan parecido, (figuras 65C y D), los cocientes obtenidos estuvieron mucho mejor definidos (figuras 66C y D). A partir de estas gráficas, como ya se ha mencionado, se seleccionan aquellos pares de longitudes de onda donde los interferentes muestran el mismo comporta-

4.1.3.2.- ESTUDIO DE DIFERENTES MEZCLAS TERNARIAS FENÓLICAS

miento espectral. Además, dichos gráficos sirven para determinar cualquier analito X en presencia de los compuestos Y y Z utilizados para calcular el cociente. Una vez seleccionados los pares de longitudes de onda se optimizó su selección atendiendo a un

MUESTRA	Pares de longitudes de onda seleccionados / nm.				
	$r_{Y,Z}$				
	$r_{Y,Z} \times M_{X,X(k)} - M_{X,X(j)}$				
A (<i>o</i> -cresol analito)	246.4,276.4	245.0,276.4	244.6,276.4	248.8,276.2	244.4,276.4
	12.1210	12.3984	12.4340	11.1835	12.4547
	-20387	-20001	-19787	-19697	-19684
B (3,4-diclorofenol analito)	243.6,283.2	243.0,279.8	244.0,285.0	243.8,284.4	243.0,280.6
	2.1189	2.6334	1.9157	1.9916	2.5352
	8087	8029	8016	8015	8013
C (fenol analito)	232.8,295.6	234.4,296.0	235.2,296.2	233.0,266.4	229.8,266.6
	3.2031	3.5074	3.6347	7.7956	6.5184
	3695	3565	3461	3095	3066
D (4-clorofenol analito)	220.0,241.4	220.2,241.2	220.8,240.4	245.4,300.0	243.0,298.0
	0.6420	0.6351	0.6126	3.8146	4.0208
	-3350	-3191	-2750	2101	1618

Tabla XLVI: Pares de longitudes de onda seleccionados para la determinación de analito en las cuatro muestras ensayadas. Se muestran asimismo los valores para el factor $r_{Y,Z}$ a dichas longitudes de onda.

compromiso entre la complejidad del cálculo y la obtención de un valor promedio que minimizase el error introducido por el ruido. Para ello se realizó un sencillo programa, capaz de leer los valores de absorbancia del analito a los pares de longitudes de onda donde el cociente de los interferentes presentase el mismo valor, calcular el valor del factor $r_{Y,Z}$, calcular el incremento de absorbancia (corregido por el factor $r_{Y,Z}$), que equivale al denominador de la ecuación 116, y ordenarlos de mayor a menor. Como ejemplo, en la tabla XLVI se muestran los mejores cinco pares de longitudes de onda seleccionados para cada determinación, el valor obtenido para el factor $r_{Y,Z}$, estimado de acuerdo con la ecuación 110 y el del denominador de la ecuación 116, $r_{Y,Z} \times M_{X, X(k)} - M_{X, X(j)}$, a dichas longitudes de onda.

En la figura 67 se representa la manera de obtener la concentración de analito a partir de las rectas de calibrado y el factor $r_{Y,Z}$.

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

De la tabla XLVI, donde se muestran los resultados obtenidos para la concentración de analito para tres réplicas de cada muestra, se observa que la desviación estándar de los resultados de las muestras A y B es menor que la obtenida para las muestras C y D, debido

Muestra A (<i>o</i> -cresol como analito)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		4.56 ± 0.01		4.69 ± 0.01	
Réplica 2		4.64 ± 0.01		4.42 ± 0.01	
Réplica 3		4.55 ± 0.07		4.24 ± 0.01	
Media de tres valores		4.58 ± 0.05		4.45 ± 0.23	
%RSD	%E _r	1.01	2.57	5.11	-0.38

Muestra B (3,4-diclorofenol como analito)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		2.96 ± 0.04		3.03 ± 0.01	
Réplica 2		3.10 ± 0.01		3.08 ± 0.01	
Réplica 3		3.19 ± 0.01		3.11 ± 0.01	
Media de tres valores		3.09 ± 0.11		3.07 ± 0.04	
%RSD	%E _r	3.77	3.45	1.35	3.05

Muestra C (fenol como analito)		HPSAM		M.L.R.	
Replica 1		5.50 ± 0.18		5.52 ± 0.02	
Replica 2		4.71 ± 0.39		4.99 ± 0.02	
Replica 3		4.52 ± 0.49		5.11 ± 0.02	
Media de tres valores		4.91 ± 0.52		5.11 ± 0.37	
%RSD	%E _r	10.62	-3.84	7.17	0.06

Muestra D (4-clorofenol como analito)		HPSAM		M.L.R.	
Replica 1		4.34 ± 0.18		4.31 ± 0.02	
Replica 2		3.62 ± 0.17		3.57 ± 0.01	
Replica 3		4.04 ± 0.51		3.80 ± 0.03	
Media de tres valores		4.00 ± 0.36		3.89 ± 0.38	
%RSD	%E _r	9.07	7.16	9.75	4.29

Tabla XLVII: Resultados obtenidos para la concentración de analito X ($\times 10^5/\text{mol} \times \text{L}^{-1}$) en las cuatro muestras ensayadas, utilizando el HPSAM y la calibración multivariada (501 puntos).

4.1.3.2.- ESTUDIO DE DIFERENTES MEZCLAS TERNARIAS FENÓLICAS

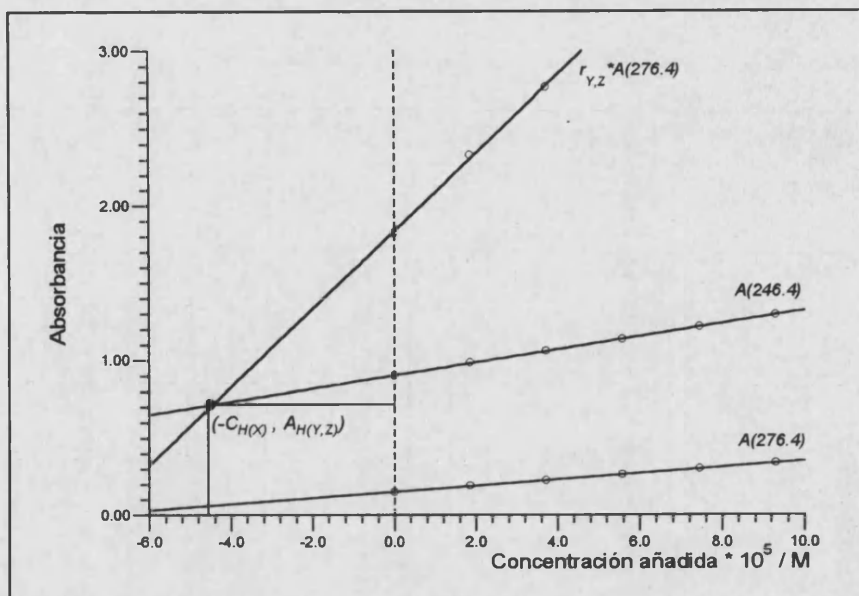


Figura 67: Representación gráfica de las líneas rectas obtenidas aplicando el HPSAM a la muestra A, utilizando el mejor par de longitudes de onda.

a que como se ha comentado, la precisión del método depende principalmente del valor del denominador en la ecuación 116. Como puede deducirse de la figura 65, este valor dependerá de la similitud del comportamiento espectral del analito y los interferentes. Cuanto mayor sea ésta, más pequeños serán los valores obtenidos para dicho denominador.

Los resultados precedentes se compararon con los obtenidos por aplicación de la regresión lineal múltiple (MLR) a lo largo de todo el intervalo de longitudes de onda medido (501 puntos), usando el método de mínimos cuadrados según el algoritmo matricial descrito en [Draper]. Dichos datos se muestran en la tabla XLVII. Puede observarse que la exactitud de los resultados obtenidos es similar entre el método propuesto, que utiliza sólo cinco puntos (diez longitudes de onda), y el obtenido por MLR. Ello es debido a que los pares de longitudes de onda que utiliza el método han sido previamente optimizados para cada muestra para dar los mejores resultados. Este factor debe ser tenido en cuenta a la hora de diseñar el procedimiento experimental. Además, la desviación estándar del método para cada réplica es más parecida a la desviación estándar observada entre réplicas que la obtenida utilizando MLR.

Muestra A (analito: 4-clorofenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		4.16 ± 0.28		3.87 ± 0.01	
Réplica 2		3.56 ± 0.23		4.63 ± 0.03	
Réplica 3		4.00 ± 0.12		4.29 ± 0.02	
Media de tres valores		3.91 ± 0.31		4.17 ± 0.26	
%RSD	%E _r	8.07	4.80	6.25	11.87

Muestra B (analito: fenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		5.13 ± 0.05		5.20 ± 0.02	
Réplica 2		4.85 ± 0.03		4.76 ± 0.01	
Réplica 3		4.64 ± 0.05		4.63 ± 0.02	
Media de tres valores		4.87 ± 0.24		4.86 ± 0.30	
%RSD	%E _r	5.03	-4.53	6.08	-4.73

Muestra C (analito: o-cresol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		4.18 ± 0.06		4.22 ± 0.02	
Réplica 2		4.44 ± 0.10		4.58 ± 0.02	
Réplica 3		4.71 ± 0.09		4.65 ± 0.02	
Media de tres valores		4.44 ± 0.27		4.48 ± 0.24	
%RSD	%E _r	6.00	-0.60	5.25	0.38

Muestra D (analito: fenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		4.84 ± 0.01		5.10 ± 0.01	
Réplica 2		5.02 ± 0.02		5.10 ± 0.01	
Réplica 3		5.05 ± 0.01		4.95 ± 0.01	
Media de tres valores		4.97 ± 0.11		5.05 ± 0.09	
%RSD	%E _r	2.25	-2.63	1.74	-1.11

Muestra A (analito: 3,4-diclorofenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		2.52 ± 0.08		2.75 ± 0.01	
Réplica 2		3.18 ± 0.12		2.43 ± 0.03	
Réplica 3		3.09 ± 0.10		2.59 ± 0.02	
Media de tres valores		2.93 ± 0.36		2.59 ± 0.16	
%RSD	%E _r	12.27	-1.75	6.16	-13.14

Muestra B (analito: o-cresol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		4.70 ± 0.05		4.49 ± 0.01	
Réplica 2		4.68 ± 0.13		4.78 ± 0.01	
Réplica 3		4.78 ± 0.09		4.84 ± 0.03	
Media de tres valores		4.72 ± 0.05		4.70 ± 0.19	
%RSD	%E _r	1.11	5.65	3.97	4.75

Muestra C (analito: 4-clorofenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		3.66 ± 0.01		3.63 ± 0.01	
Réplica 2		3.82 ± 0.04		3.84 ± 0.01	
Réplica 3		3.85 ± 0.02		3.88 ± 0.01	
Media de tres valores		3.78 ± 0.10		3.78 ± 0.14	
%RSD	%E _r	2.72	1.21	3.63	1.46

Muestra D (analito: 3,4-diclorofenol)		HPSAM		M.L.R.	
Réplica 1		2.12 ± 0.23		2.35 ± 0.01	
Réplica 2		2.87 ± 0.11		3.20 ± 0.01	
Réplica 3		3.73 ± 0.12		3.34 ± 0.03	
Media de tres valores		2.91 ± 0.80		2.96 ± 0.54	
%RSD	%E _r	27.65	-2.43	18.21	-0.67

Tabla XLVIII: Resultados obtenidos para la concentración de los interferentes Y y Z ($*10^5/\text{mol}*\text{L}^{-1}$) en las cuatro muestras ensayadas, utilizando el HPSAM (con valores de absorbancia de la muestra y coeficientes de absorción molar para cada compuesto como valor de M) y calibración multivariada (501 puntos).

En la tabla XLVIII se muestran los resultados obtenidos para la determinación de las especies Y y Z en cada una de las muestras, usando los valores de absorbancia de la muestra, y los coeficientes de absorción molar como valores para M , según la ecuación 117. Puede observarse que los valores obtenidos son comparables a los que proporciona MLR, incluso en los casos más desfavorables, donde la especie considerada como analito solapa casi completamente con alguno de los interferentes. Como ejemplo, en la muestra A, la optimización previa de las longitudes de onda de medida permite obtener resultados más exactos que los proporcionados por MLR. En cuanto a la desviación estándar, sirven los mismos comentarios que los efectuados anteriormente.

4.1.3.3.- CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en diferentes muestras ternarias, se puede afirmar que el Método de Adición Estándar del Punto H permite calcular la concentración de analito libre de error en mezclas ternarias a partir de la abcisa del punto H. Las principales ventajas del método son: 1.- Se utilizan valores de absorbancia, y no valores de primera derivada. Por tanto, el cociente señal/ruido no disminuye. Además se tiene en cuenta la existencia de posible efecto matriz, corrigiéndolo por las propiedades del método de adición estándar. 2.- Es muy sencillo encontrar los pares de longitudes de onda donde debe medirse, a partir, solamente, de los espectros de los interferentes. 3.- Sólo se necesitan cinco puntos (diez pares de longitudes de onda) para obtener resultados comparables a los obtenidos por regresión lineal múltiple, y un sólo punto (dos longitudes de onda) para estimar adecuadamente la concentración de X. 4.- El método obtiene buenos resultados, incluso en aquellos casos en los que analito e interferente solapan completamente, como ha quedado demostrado.

4.1.3.- MEZCLAS TERNARIAS

4.2.- RESOLUCIÓN DE MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

4.2.- RESOLUCIÓN DE MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS.

Hasta ahora se ha demostrado la utilidad del Método de Adición Estándar del Punto H para la resolución de forma sencilla de situaciones espectrales en las que la señal analítica de la especie a determinar venía interferida por la presencia de uno o dos compuestos de naturaleza conocida. Sin embargo, el cálculo de la concentración de analito cuando la naturaleza de la interferencia es desconocida es un problema de difícil solución. En este apartado se expondrá el desarrollo realizado del HPSAM para la resolución de situaciones en las que el comportamiento espectral del interferente desconocido puede suponerse lineal en la zona del máximo de absorción del analito, demostrando su aplicabilidad tanto en situaciones en las que el interferente produce una absorbancia irrelevante (y comparando el método propuesto con los previamente descritos en la bibliografía para su resolución), como cuando dicha absorbancia es del mismo orden que la exhibida por el analito. Posteriormente se generalizarán las bases del método a zonas donde el comportamiento espectral del interferente puede ser descrito de manera lineal, pero ya no en el máximo de absorción del analito, con lo que se logra resolver el análisis espectrofotométrico de una sustancia en presencia de cualquier interferente, objetivo último de la presente memoria. Dicha metodología ha sido denominada Método de Adición Estándar Generalizado del Punto H, GHPSAM.

La espectroscopía derivativa y las propias bases del método permiten localizar y validar las zonas de linealidad del interferente sin un conocimiento previo sobre su existencia o naturaleza.

El HPSAM determina el analito X en presencia de un interferente directo Y , a partir de dos gráficos de adición estándar con pendientes M_j y M_k para las dos longitudes de onda seleccionadas, rectas que intersectan en el punto H de coordenadas $(-C_H, A_H)$. El punto H es una función de la concentración de analito, C_X , como se ha demostrado anteriormente, a partir de la expresión:

4.2.- RESOLUCIÓN DE MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

$$-C_H = \frac{(A_{X,k}^0 - A_{X,j}^0) + (A_{Y,k} - A_{Y,j})}{M_j - M_k} = -C_X + \frac{A_{Y,k} - A_{Y,j}}{M_j - M_k} \quad (118)$$

donde $A_{X,j}^0$ y $A_{X,k}^0$ son los valores de absorbancia para el analito y $A_{Y,j}$ y $A_{Y,k}$ para el interferente. Si λ_j y λ_k se seleccionan de forma que $A_{Y,j} = A_{Y,k}$, la abcisa del punto H corresponde a C_X . Por ello el espectro del interferente debe conocerse. En la situación que se plantea en este apartado el problema se resuelve desarrollando un método de compensación para el parámetro $\frac{A_{Y,k} - A_{Y,j}}{M_j - M_k}$ que permite el cálculo de C_X .

**4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL
DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL
ANALITO**

4.2.1- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DEL ANALITO.

4.2.1.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

Supongamos una muestra que contiene nuestro analito **X** en presencia de un interferente global desconocido **Y**, cuya variación $\frac{\Delta A}{\Delta \lambda}$ es constante en la zona del máximo de absorción del analito. Sus espectros se muestran en la figura 68.

A diferencia del HPSAM propuesto para interferentes conocidos, en la situación actual deben de seleccionarse dos longitudes de onda, λ_j y λ_k , a ambos lados del máximo de absorción del analito, de manera que la absorbancia para dicho compuesto sea la misma en ambas. Se cumplirá entonces la siguiente igualdad:

$$A_{X,j}^i = A_{X,k}^i; i=0,1,\dots,n \quad (119)$$

donde $A_{X,j}^i$ es la absorbancia de **X** a λ_j y $A_{X,k}^i$ a λ_k . El superíndice i se refiere a las diferentes disoluciones de 0 a n adiciones de analito **X** realizadas de acuerdo con el método; cuando $i = 0$ se tiene la disolución que sólo contiene muestra. Para el interferente los valores de absorbancia serán $A_{Y,j}$ a λ_j y $A_{Y,k}$ a λ_k .

Para esta variante del método es necesario seleccionar una tercera longitud de onda, λ_m . A partir de ella se definen dos nuevos parámetros, p y q , que describen su posición relativa dentro del intervalo $[\lambda_j, \lambda_k]$:

$$p = \frac{\lambda_k - \lambda_m}{\lambda_k - \lambda_j} \quad (120)$$

$$q = \frac{\lambda_m - \lambda_j}{\lambda_k - \lambda_j} \quad (121)$$

Las ecuaciones (120) y (121) conducen a:

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

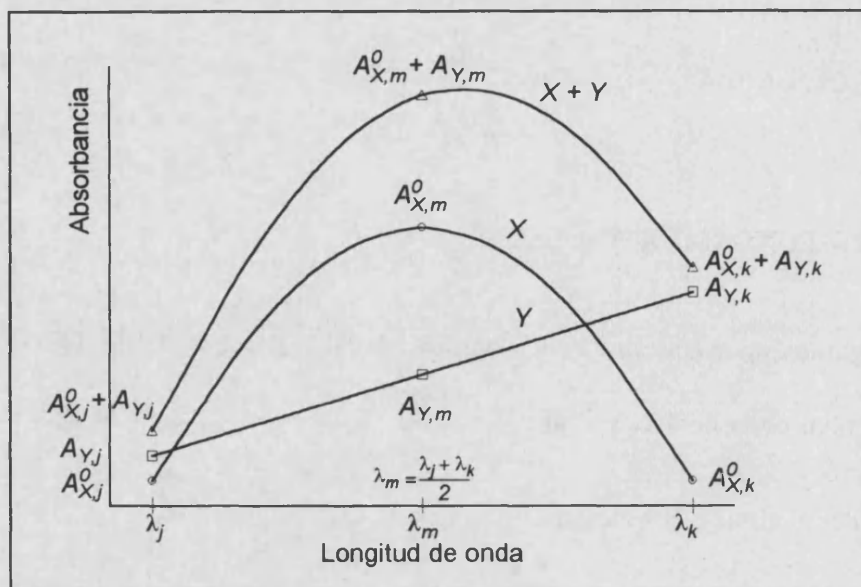


Figura 68: Comportamiento espectral del analito X, el interferente lineal Y, y la muestra S.

$$p + q = 1 \quad (122)$$

Para simplificar los siguientes cálculos se ha seleccionado λ_m como la longitud de onda media de λ_j y λ_k :

$$\lambda_m = \frac{\lambda_j + \lambda_k}{2} \quad (123)$$

por lo que $p = q = 1/2$.

Los valores de absorbancia para el analito y el interferente a λ_m , serán $A_{X,m}^i$ ($i = 0, 1, \dots, n$) y $A_{Y,m}$, respectivamente. $A_{Y,j}$, $A_{Y,m}$ y $A_{Y,k}$ permanecen constantes en todas las disoluciones preparadas para aplicar el método, puesto que la cantidad de muestra añadida a cada disolución es la misma.

Si se representan los valores de absorbancia obtenidos frente a la concentración añadida de analito a las tres longitudes de onda seleccionadas (λ_j , λ_m y λ_k), se obtienen tres líneas rectas (R_j , R_m y R_k), cuyas ecuaciones serán (figura 69):

$$\text{Para } \lambda_j, R_j: A_j = A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + M_j \times C_X^i \quad (124)$$

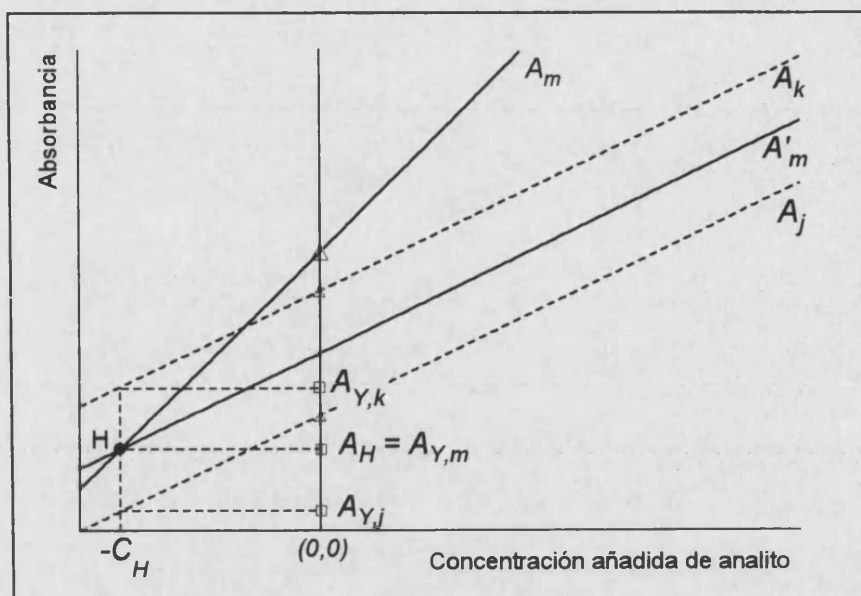


Figura 69: Rectas obtenidas por aplicación del HPSAM para la determinación del analito en presencia de un interferente desconocido lineal en el máximo de absorción del analito.

$$\text{Para } \lambda_m, R_m: A_m = A_{X,m}^0 + A_{Y,m} + M_m \times C_X^i \quad (125)$$

$$\text{Para } \lambda_k, R_k: A_k = A_{X,k}^0 + A_{Y,k} + M_k \times C_X^i \quad (126)$$

donde A_j , A_m y A_k son los valores de absorbancia medidos para las distintas disoluciones a las tres longitudes de onda seleccionadas; M_j , M_m y M_k son las pendientes de las rectas obtenidas a dichas longitudes de onda y C_X^i es la concentración añadida de analito. Si la absorbancia del interferente desconocido puede ser descrita como una línea recta de pendiente nula, R_j y R_k serán coincidentes. Si dicha pendiente es distinta de cero, ambas líneas serán paralelas pero no coincidentes.

A partir de R_j y R_k podemos obtener una nueva línea recta, que denominaremos R'_m (figura 69); dicha recta permite localizar correctamente el punto H, y se obtiene a partir de las siguientes expresiones:

$$\begin{aligned} \text{Para } \lambda'_m, R'_m: A'_m &= p \times A_j + q \times A_k = \frac{A_j + A_k}{2} = \\ &= \frac{A_{X,j}^0 + A_{X,k}^0}{2} + \frac{A_{Y,j} + A_{Y,k}}{2} + \frac{M_j + M_k}{2} \times C_X^i \end{aligned} \quad (127)$$

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

Como $A_{X,j}^0 = A_{X,k}^0$, puesto que el analito presenta la misma absorbancia a ambas longitudes de onda (ecuación 119), se tiene del mismo modo que $M_j = M_k$. Por tanto R'_m puede reescribirse de la siguiente forma:

$$A_m' = A_{X,j}^0 + \frac{A_{Y,j} + A_{Y,k}}{2} + M_j * C_X^i = A_{X,k}^0 + \frac{A_{Y,j} + A_{Y,k}}{2} + M_k \times C_X^i \quad (128)$$

Como se deduce de la figura 68, si $A_{Y,j}$, $A_{Y,m}$ y $A_{Y,k}$ están linealmente relacionadas, aunque no necesariamente por una línea recta de pendiente nula, se tiene que:

$$A_{Y,m} = \frac{A_{Y,j} + A_{Y,k}}{2} \quad (129)$$

por lo que la ecuación (128) se transforma en:

$$A_m' = A_{X,j}^0 + A_{Y,m} + M_j \times C_X^i = A_{X,k}^0 + A_{Y,m} + M_k \times C_X^i \quad (130)$$

Las rectas (125) y (130) intersectarán en el punto H. Su valor se obtiene resolviendo el correspondiente sistema de ecuaciones (figura 69):

$$A_{X,m}^0 + A_{Y,m} + M_m \times (-C_H) = A_{X,k}^0 + A_{Y,m} + M_k \times (-C_H) \quad (131)$$

de donde

$$-C_H = \frac{A_{X,m}^0 - A_{X,k}^0}{M_k - M_m} \quad (132)$$

donde C_H es la concentración de analito en la muestra, C_X^0 , puesto que la expresión (132) depende sólo de variables relacionadas con el analito, y es equivalente a las expresiones:

$$-C_H = \frac{-A_{X,j}^0}{M_j} = \frac{-A_{X,m}^0}{M_m} = \frac{-A_{X,k}^0}{M_k} = -C_X^0 \quad (133)$$

Al igual que la ecuación (132), se puede obtener una expresión equivalente para λ_j y λ_m .

Por tanto, y como se pretendía demostrar, el error incorregible debido a la presencia de un interferente de comportamiento espectral lineal en el máximo de absorción del analito se ha transformado en un error constante evaluable, y fácilmente eliminable. Ello es debido a que el espectro lineal del interferente ha sido transformado en una línea recta de pendiente nula entre λ_j , λ_m y λ_k , por lo que todos los fundamentos expuestos para mezclas binarias son aplicables ahora.

Sustituyendo las ecuaciones (132) y (133) en la ecuación (131), se tiene que el valor de A_H obtenido es:

$$A_H = \frac{A_{Y, m} \times \{ M_k - M_m \}}{M_k - M_m} = A_{Y, m} \quad (134)$$

Esta expresión demuestra que el valor de A_H obtenido se corresponde con la señal analítica del interferente global a λ_m , lo que permite estimar su contribución a la señal analítica total.

Al igual que en el caso de mezclas binarias, la metodología expuesta puede simplificarse utilizando valores de ΔA como señales analíticas, si el valor de A_H obtenido no nos aporta información de interés. En este caso podemos definir el incremento de absorbancia a partir de las ecuaciones (125) y (130) como:

$$\begin{aligned} \Delta A_{m, m'} &= A_m - A_{m'} = A_{X, m}^0 + A_{Y, m} + M_m \times C_X^i - A_{X, m'} - \frac{A_{Y, j} - A_{Y, k}}{2} - \\ &- M_k \times C_X^i = (A_{X, m}^0 - A_{X, k}^0) + (M_m - M_k) \times C_X^i \end{aligned} \quad (135)$$

De acuerdo con esta expresión, el incremento de absorbancia así obtenido depende exclusivamente de la concentración de analito presente, por lo que la representación de $\Delta A_{m, m'}$ frente a C_X^i será una línea recta de ordenada en el origen $A_{X, m}^0 - A_{X, k}^0$ y pendiente $M_m - M_k$. La concentración de analito puede ser calculada a partir de los valores de ΔA así obtenidos por extrapolación a cero:

$$-C_H = \frac{A_{X, k}^0 - A_{X, m}^0}{M_m - M_k} = -C_X^0 \quad (136)$$

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

equivalente a la ecuación (132) previamente obtenida, y en donde C_x^0 es la concentración de analito en la muestra.

Si el pico de absorción del analito no es simétrico, λ_m puede seleccionarse de manera que se obtengan mayores valores en el denominador de las ecuaciones (132) ó (136), modificando adecuadamente los parámetros p y q . Esto permite obtener resultados más precisos en la determinación de la concentración de analito. Dicha posibilidad se demostrará de gran utilidad en la resolución de interferentes lineales fuera del máximo de absorción del analito.

Los valores de ΔA obtenidos tras cada adición sólo dependen de la concentración de analito añadida, puesto que la absorbancia del interferente es compensada y eliminada, y su contribución a ΔA será nula. La figura 70 muestra las rectas de calibrado obtenidas utilizando valores de absorbancia y de incremento de absorbancia como señales analíticas.

Cuando el comportamiento espectral del interferente no se corresponde con el comportamiento lineal simplificado mostrado anteriormente, pero en el intervalo de longitudes de onda seleccionado muestra un comportamiento espectral globalmente lineal, el método propuesto obtiene la concentración de analito libre de error, puesto que se pueden seleccionar distintos pares de longitudes de onda y la estructura fina del espectro del interferente se compensa de un par a otro, por lo que el resultado final estará libre de error.

Por otro lado, el trabajo de rutina generalmente determina el analito en una muestra usando el método de calibración de un único patrón, el cual requiere conocer la señal analítica de la muestra (A_s), la señal analítica del analito (A_r) y la concentración del patrón usado (C_r). La concentración de analito se calcula a partir de los datos obtenidos como:

$$C_s = \frac{A_s}{A_r} \times C_r \quad (137)$$

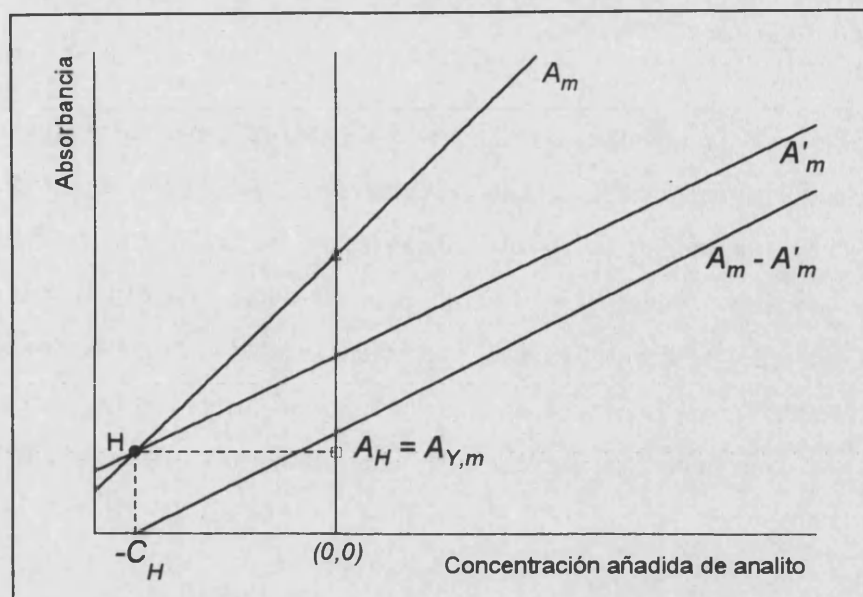


Figura 70: Rectas obtenidas aplicando el HPSAM con valores de absorbancia y de ΔA como señales analíticas en la determinación de un analito en presencia de un interferente desconocido lineal en el máximo de absorción del analito.

Las variables necesarias para aplicar el método de adición estándar son A_s y la señal analítica obtenida, A_t , para una disolución que contiene la muestra y una concentración conocida de analito añadida, C_a . La ecuación a aplicar en este caso es:

$$C_s = \frac{A_s}{A_a} \times C_a = \frac{A_s}{A_t - A_s} \times C_a \quad (138)$$

Para aplicar el HPSAM con valores de ΔA se necesita conocer el valor de absorbancia de la muestra y de la muestra adicionada con una concentración conocida de analito a las tres longitudes de onda seleccionadas. La ecuación a utilizar será:

$$C_s = \frac{\Delta A_s}{\Delta A_t - \Delta A_s} \times C_a \quad (139)$$

Selección de la zona de medida.

Hasta ahora se ha demostrado como el HPSAM es capaz de resolver el error introducido en la determinación de un analito por la presencia de un interferente desconocido de comportamiento espectral lineal. El método carecería de utilidad si no fuera posible conocer de alguna manera cuando el interferente presenta dicho comportamiento en la zona del máximo de absorción del analito. Para ello se han desarrollado dos metodologías distintas que permiten conocer si la muestra problema cumple con los requisitos necesarios para aplicar el HPSAM. Uno se basa en el estudio del valor de la primera derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito, y el otro en la consistencia del valor de la abcisa del Punto H obtenido para distintos pares de longitudes de onda.

a) Estudio del valor de la primera derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito.

La única información disponible del interferente desconocido es el valor de su primera derivada a la longitud de onda del máximo de absorción del analito, $\lambda_{\max(X)}$. En efecto (figura 71):

$$\left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), X+Y} = \left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), X} + \left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), Y} = \left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), Y} \quad (140)$$

Por otro lado sabemos que los valores de absorbancia de la muestra a λ_y y λ_k serán la suma de los correspondientes valores de absorbancia del analito e interferente. La diferencia entre ambas absorbancias, $\Delta A_{k,j}$, será:

$$\Delta A_{k,j} = A_k - A_j = A_{X,k}^0 + A_{Y,k} - A_{X,j}^0 - A_{Y,j} = A_{Y,k} - A_{Y,j} \quad (141)$$

puesto que $A_{X,j}^0 = A_{X,k}^0$ (ecuación 119).

Si se divide el valor obtenido en la ecuación (141) por el correspondiente valor de $\Delta\lambda = \lambda_k - \lambda_j$, se obtendrá un valor que es el de la pendiente de la recta que une las absorbancias del interferente a las longitudes de onda seleccionadas. Si el comportamiento del interferente

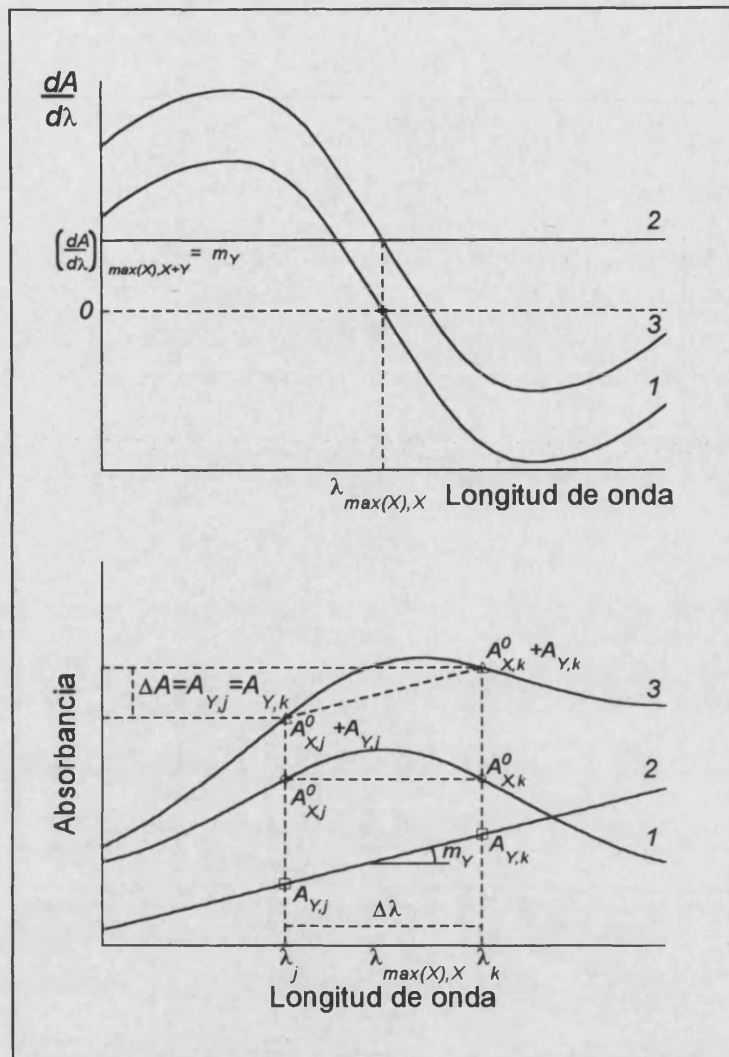


Figura 71: Espectros de absorción y su primera derivada respecto a la longitud de onda para: 1) Analito X; 2) Interferente Y; 3) Muestra S.

es lineal en el intervalo $[\lambda_j, \lambda_k]$ seleccionado, dicho valor coincidirá con el previamente obtenido para la primera derivada de la absorbancia de la muestra en el máximo de absorción del analito:

$$\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} = \frac{A_{Y,k} - A_{Y,j}}{\lambda_k - \lambda_j} = \left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), Y} \quad (142)$$

Para seleccionar el máximo intervalo $[\lambda_j, \lambda_k]$ donde el comportamiento espectral del interferente pueda ser descrito de manera lineal, hay que seleccionar intervalos crecientes para λ_j y λ_k situados a ambos lados del máximo de absorción del analito, y comprobar que

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

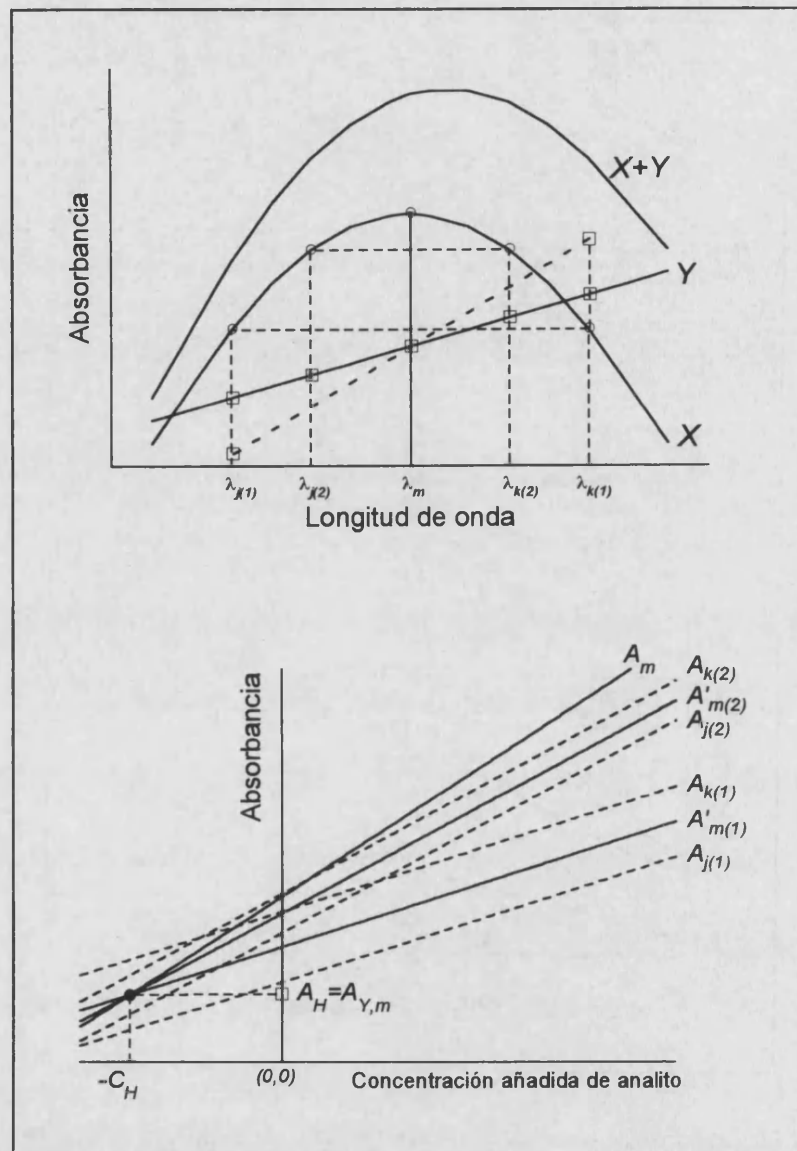


Figura 72: Espectros de absorción y rectas obtenidas para dos pares diferentes de longitudes de onda λ_j y λ_k .

el valor de $\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}}$ es estadísticamente equivalente al previamente obtenido para $\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\max(X), X+Y}$

La condición requerida en esta metodología es más restrictiva que la necesaria para aplicar el método propuesto, pero es una manera sencilla y rápida de comprobar si la muestra problema podrá ser analizada por el método propuesto.

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA

b) estudio de la consistencia de los valores obtenidos para la abcisa del Punto H.

Si el comportamiento espectral del interferente es lineal para $\lambda_{j(1)}$, $\lambda_{m(1)}$ y $\lambda_{k(1)}$, y $\lambda_{j(2)}$, $\lambda_{m(2)}$ y $\lambda_{k(2)}$, para ambos tríos de longitudes de onda se cumplirán los supuestos necesarios para aplicar el método, y la abcisa de los puntos H así obtenidos coincidirán entre si, y se corresponderán con la concentración de analito en la muestra, C_x^0 . En la figura 72 se muestran dos pares de longitudes de onda $\lambda_{j(1)}$, $\lambda_{k(1)}$, y $\lambda_{j(2)}$, $\lambda_{k(2)}$, cuyas rectas intermedias $R'_{m(1)}$ y $R'_{m(2)}$ intersectan con R_m en el mismo punto H. Cualquier otro comportamiento espectral no lineal para el interferente producirá abcisas del punto H estadísticamente no equivalentes.

La condición requerida en este caso es menos restrictiva que en el apartado anterior, y siempre obtendremos intervalos lineales para el interferente iguales o superiores a los allí obtenidos.

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA.

Procedimiento experimental.

Para estudiar la aplicabilidad del método se determinó el contenido en 4-cloro-3-metilfenol de un preparado farmacéutico, Fungusol® (Laboratorios Andreu, Barcelona), cuyo contenido nominal es de un 1% de 4-cloro-3-metilfenol, y que además contiene óxido de cinc (10%), aerosil (3%) y excipiente (c.s.),

Para disolver el analito presente en la muestra, se prepararon disoluciones que contenían aproximadamente 2.7 gL^{-1} de muestra (equivalente a $2.7 \times 10^{-2} \text{ gL}^{-1}$ de analito). Tras agitación mecánica, la suspensión resultante se filtró a través de un filtro de vidrio

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

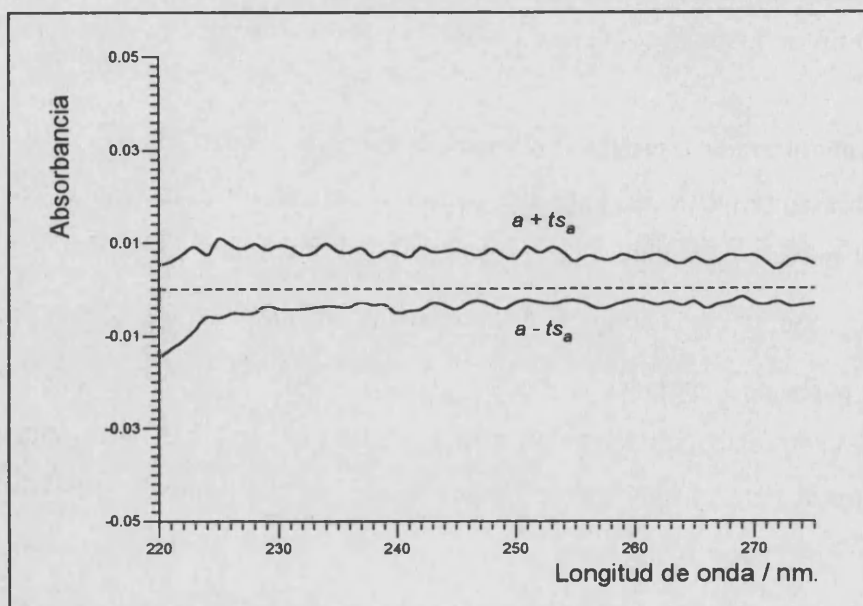


Figura 73: Estudio de la existencia de Blanco Total de Youden, TYB, en la muestra analizada.

fritado (numero 3) a presión reducida. La disolución filtrada se conservó en frascos de vidrio borosilicatado y en nevera hasta su análisis.

El estudio de la optimización del tiempo de agitación se realizó midiendo la señal obtenida de diferentes muestras preparadas con distintos tiempos de agitación. A los cinco minutos la señal obtenida es constante, por lo que se prepararon todas las muestras en dicho tiempo.

Las adiciones de analito puro se realizaron en el intervalo $0-6.923 \times 10^{-5}$ M, en un medio NaOH 0.1 M. Se realizaron seis réplicas de la muestra. Los espectros de absorción se midieron en el intervalo 220-275 nm., cada nanómetro, en el espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 16.

Resultados y discusión.

Se estudió la posible existencia de un blanco total de Youden (TYB) [Youden,47]. Para ello se preparó un calibrado conteniendo distintas cantidades de muestra. Realizado el

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA

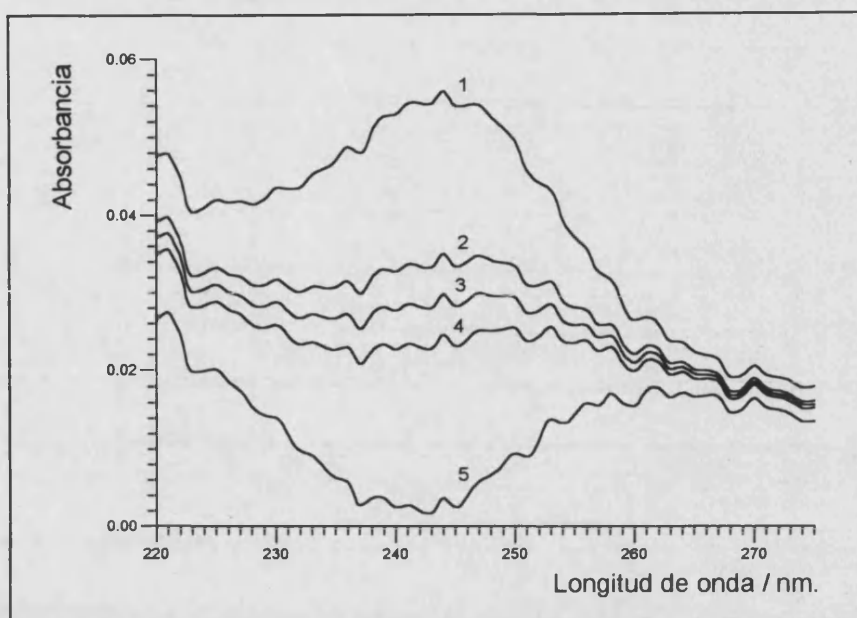


Figura 74: Curvas del método de compensación [Wahbi, 89]. Las curvas representan el espectro diferencia de la muestra menos una concentración de analito de referencia de: 1.- 3.30×10^{-5} M; 2.- 3.55×10^{-5} M; 3.- 3.60×10^{-5} M; 4.- 3.65×10^{-5} M; 5.- 3.90×10^{-5} M.

calibrado se comparó estadísticamente la coincidencia de los valores de las ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas a las diferentes longitudes de onda con cero. En la figura 73 se muestran los valores obtenidos para $a \pm t \times s_a$ (para un nivel de probabilidad del 95%) a las distintas longitudes de onda medidas. Puede observarse que en el intervalo de longitudes de onda medido el cero está incluido entre los límites superior e inferior [Miller, 91]. Se demuestra por tanto que en la muestra analizada no existe TYB.

El estudio de la primera derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito nos induce a pensar que la interferencia, si existe, tendrá pendiente nula, pues tanto el analito como la muestra presentan el máximo de absorción a la misma longitud de onda.

Una vez registrados los espectros se obtuvieron las rectas del método de adición estándar en el máximo de absorción del analito (243 nm.), en el máximo de la primera derivada del analito (234 nm.), y usando valores de ΔD_1 y D_1 (corregidos) como señales analíticas, siguiendo la metodología propuesta por Wahbi *et al* [Wahbi, 86] (usando valores a 234, 252 y 270 nm.). En la figura 74 se muestran además los gráficos obtenidos por el

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

A)

Método	% analito \pm RSD ($n=6$)	% RSD
Met. Ad. Est.	0.992 \pm 0.015	1.54
Calibración (Abs)	0.978 \pm 0.017	1.76
1ª derivada	0.926 \pm 0.019	2.08
Calibración (D_1)	0.929 \pm 0.011	1.21
ΔD_1	0.930 \pm 0.021	2.27
D_1 (corregido)	0.92 \pm 0.04	4.02

B)

Réplica	λ_j, λ_k $C_{encontrado}/\% (p/p)$										% analito \pm RSD
1	221,256	222,256	226,255	228,254	230,253	232,252	235,250	236,249	238,248		
	0.939	0.944	0.950	0.958	0.946	0.959	0.948	0.944	0.938		0.947 \pm 0.007
2	226,255	228,254	230,253	232,252	235,250	236,249	238,248	240,246	241,246		
	0.964	0.961	0.959	0.967	0.960	0.951	0.950	0.958	0.950		0.958 \pm 0.006
3	226,255	228,254	230,253	236,249							
	0.944	0.952	0.943	0.942							0.945 \pm 0.005
4	228,254	230,253	233,251	236,249	237,248						
	0.922	0.918	0.932	0.912	0.929						0.923 \pm 0.008
5	219,245	228,254	230,253	233,251	236,249	237,248	239,247	240,246	240,245	241,245	
	0.934	0.944	0.946	0.947	0.943	0.940	0.962	0.975	0.973	0.973	0.954 \pm 0.015
6	219,255	225,255	233,251	236,249	237,248	241,245					
	0.940	0.938	0.937	0.931	0.954	0.936					0.939 \pm 0.008
											0.944 \pm 0.012 %RSD=1.36

Tabla IL: Resultados obtenidos para la concentración de analito utilizando: A) el método de adición estándar (valores de absorbancia); la calibración directa (valores de absorbancia); el método de adición estándar (valores de primera derivada); calibración directa (valores de primera derivada); y los métodos propuestos en [Wahbi,86] usando valores de ΔD_1 y D_1 (corregido); B) utilizando el HPSAM.

método de compensación propuesto por Wahbi *et al* [Wahbi,89]. No se dan resultados concretos aplicando dicho método, puesto que como se observa, es difícil discernir a que concentración exacta se obtiene el espectro de pendiente nula. Se obtuvieron asimismo las rectas de calibrado usando valores de absorbancia y de primera derivada de la absorbancia en sus máximos correspondientes. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla IL A. En la tabla IL B se dan los resultados obtenidos aplicando el HPSAM utilizando ΔA como señales

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA

Métodos comparados	Homogeneidad de la varianza: F_{calc}	Equivalencia de las medias: t_{calc}
MOSA/HPSAM	1.43 - Sí	5.796 - No
Calibración (Abs)/HPSAM	1.81 - Sí	3.816 - No
1ª Derivada/HPSAM	2.27 - Sí	1.904 - Sí
Calibración (D_1)/HPSAM	1.28 - Sí	2.138 - Sí
ΔD_1 /HPSAM	2.72 - Sí	1.419 - Sí
D_1 (corregido)/HPSAM	8.40* - No	1.286 - Sí

Tabla L: Equivalencia de los resultados obtenidos entre el HPSAM y los otros métodos estudiados. Las varianzas son homogéneas si $F_{calc} < F_{0.95}(5;5) = 5.05$. Las medias son equivalentes si $t_{calc} < t_{0.95}(10) = 2.228$.

*En este caso $F_{calc} > F_{tab}$. Los grados de libertad que definen estadísticamente la comparación son 4 ($t_{0.95}(4) = 2.776$)

analíticas. Los pares de longitudes de onda donde el analito muestra la misma absorbancia fueron seleccionando en cada muestra, obteniendo pares de rectas paralelas a ambos lados del máximo de absorción del analito. La homogeneidad de la varianza de dichas rectas se estudió aplicando los test de Snedecor y Bartlett; si resultaban positivos, se estudió el paralelismo con los test de Student y Snedecor [*Commissariat; Chemometrics*]. La coincidencia de los valores obtenidos para la concentración de analito con diferentes pares de longitudes de onda en la misma muestra nos permite validar experimentalmente la linealidad del interferente en el intervalo de longitudes de onda seleccionado. Como además se cumple que el máximo de absorción de la muestra coincide con el del analito, se corrobora que la pendiente de la línea recta que describe el comportamiento espectral del interferente será nula.

La comparación estadística de los resultados obtenidos aplicando los métodos descritos (tabla L) muestra que los resultados obtenidos aplicando el HPSAM, el método de adición estándar con valores de primera derivada, a partir de las rectas de calibrado con valores de primera derivada y las obtenidas utilizando ΔD_1 y D_1 (corregido) como señales analíticas son estadísticamente equivalentes. Sin embargo, los resultados obtenidos por el HPSAM son estadísticamente diferentes y menores que los obtenidos utilizando el método de adición estándar y las rectas de calibrado con valores de absorbancia. Dicha diferencia se explica

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

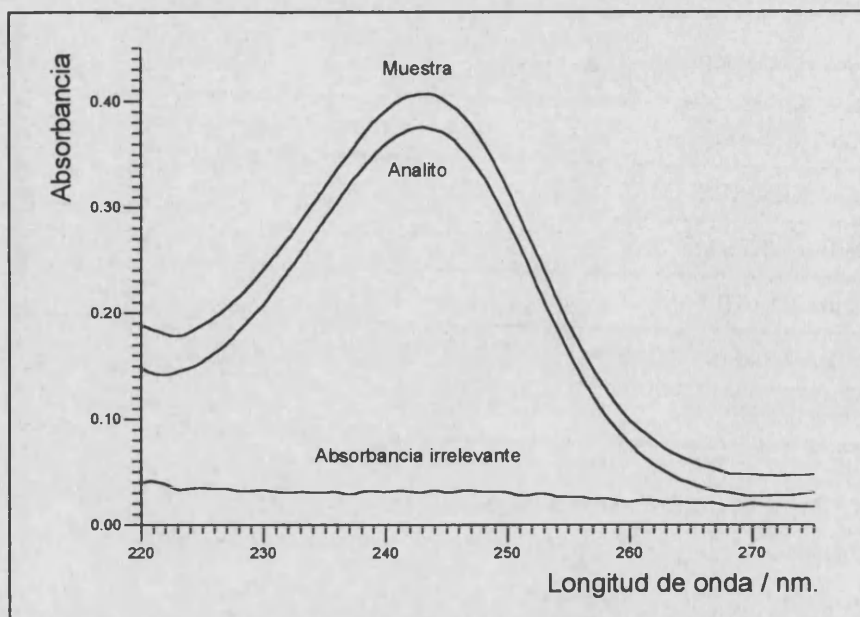


Figura 75: Espectros para la muestra, el analito en su concentración encontrada, y su diferencia, atribuible a la presencia de una absorbancia irrelevante desconocida.

fácilmente si se tiene en cuenta la presencia de una absorción irrelevante desconocida, que produce un error de tipo constante. Este error se elimina aplicando el HPSAM, y en este caso concreto, puesto que la pendiente de la línea recta que describe el comportamiento espectral del interferente es nula, aplicando los diferentes métodos que utilizan valores de primera derivada.

La presencia de la interferencia irrelevante desconocida se muestra en la figura 75, donde se muestran los espectros de la muestra, del analito en su concentración encontrada y el espectro diferencia de ambos. Dicha diferencia es atribuible a la presencia del interferente (aproximadamente un 5% de la señal del analito en su máximo), que lleva a la obtención de valores de concentración de analito superiores a los reales cuando se aplica directamente valores de absorbancia (método de adición estándar o calibrado).

Como puede observarse de la figura 75, el espectro de la interferencia irrelevante desconocida es aproximadamente lineal, como ya se había demostrado a partir de los resultados de la aplicación del HPSAM. Como la pendiente de dicha recta es nula, la utilización de datos en primera derivada conduce a resultados equivalentes a los obtenidos

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA

Método	MOSA	HPSAM (λ_j, λ_k)	1ª Derivada	ΔD_1	D_1 (corregida)
Lim. de detección $\times 10^6 / M$	1.29	1.06 (228,254) 1.05 (236,249)	2.59	1.81	1.99
Pendiente de la recta de calibrado ($b \pm s_b$)	$(1052 \pm 7) \times 10$	$(531 \pm 5) \times 10$ (228,254) 1900 ± 17 (236,249)	468 ± 5	1191 ± 13	950 ± 15

Tabla LI: Límites de detección y pendientes de la recta de calibrado para los distintos métodos ensayados.

por aplicación del HPSAM. Si la pendiente no fuese nula, los resultados obtenidos estarían afectados de error constante, mientras que el HPSAM continuaría obteniendo resultados correctos al compensar la contribución del interferente a la tres longitudes de onda seleccionadas, que se corroborarían al obtener resultados coincidentes para diferentes pares de longitudes de onda seleccionados.

En la tabla LI se muestran los límites de detección obtenidos [Chemometrics] y los valores de las pendientes de las rectas de calibrado. Los menores límites de detección y las mayores pendientes (y por tanto las mayores sensibilidades) se obtienen cuando se utilizan valores de incremento de absorbancia como señal analítica. Los límites de detección obtenidos con el método propuesto son aproximadamente la mitad que los obtenidos por los métodos que utilizan valores de primera derivada, debido a la degradación del cociente señal/ruido (SNR), como se ha descrito en la bibliografía [O'Haver, 79].

En la figura 76A se muestra gráficamente la existencia de un interferente lineal. En dicha figura se representan las rectas de calibrado R_m obtenidas (en el máximo del analito) y las correspondientes rectas $R'm$ para diferentes $\lambda_j - \lambda_k$. Todas las rectas intersectan en el mismo punto ($-C_H, A_H$), donde C_H representa la concentración de analito presente en la muestra y A_H el valor de la absorbancia irrelevante a λ_m . En la figura 76B se muestran los mismos datos utilizando valores de ΔA como señal analítica. Todas las rectas intersectan en

216 $\Delta A(243/228,254)$

$C_s \times 10^5 / M$	% analito \pm RSD (n=6)	% RSD
1.385	0.914 \pm 0.028	3.05
2.769	0.942 \pm 0.029	3.07
4.154	0.934 \pm 0.017	1.87
5.539	0.944 \pm 0.022	2.36
6.923	0.940 \pm 0.017	1.83

$\Delta A(243/236,249)$

$C_s \times 10^5 / M$	% analito \pm RSD (n=6)	% RSD
1.385	0.928 \pm 0.030	3.22
2.769	0.939 \pm 0.022	2.33
4.154	0.934 \pm 0.019	2.07
5.539	0.940 \pm 0.021	2.23
6.923	0.936 \pm 0.014	1.44

1ª Derivada

$C_s \times 10^5 / M$	% analito \pm RSD (n=6)	% RSD
1.385	0.862 \pm 0.026	3.07
2.769	0.900 \pm 0.032	3.55
4.154	0.893 \pm 0.025	2.77
5.539	0.896 \pm 0.020	2.22
6.923	0.913 \pm 0.012	1.32

ΔD_1

$C_s \times 10^5 / M$	% analito \pm RSD (n=6)	% RSD
1.385	0.931 \pm 0.027	2.87
2.769	0.931 \pm 0.017	1.85
4.154	0.937 \pm 0.023	2.47
5.539	0.929 \pm 0.018	1.94
6.923	0.931 \pm 0.017	1.86

D_1 (corregida)

$C_s \times 10^5 / M$	% analito \pm RSD (n=6)	% RSD
1.385	0.948 \pm 0.038	4.01
2.769	0.939 \pm 0.027	2.92
4.154	0.944 \pm 0.022	2.32
5.539	0.934 \pm 0.030	3.26
6.923	0.936 \pm 0.028	2.94

Tabla LII: Resultados obtenidos aplicando el método de calibración de un único patrón, con las diferentes señales obtenidas.

4.2.1.2.- ELIMINACIÓN DE LA ABSORBANCIA IRRELEVANTE DESCONOCIDA

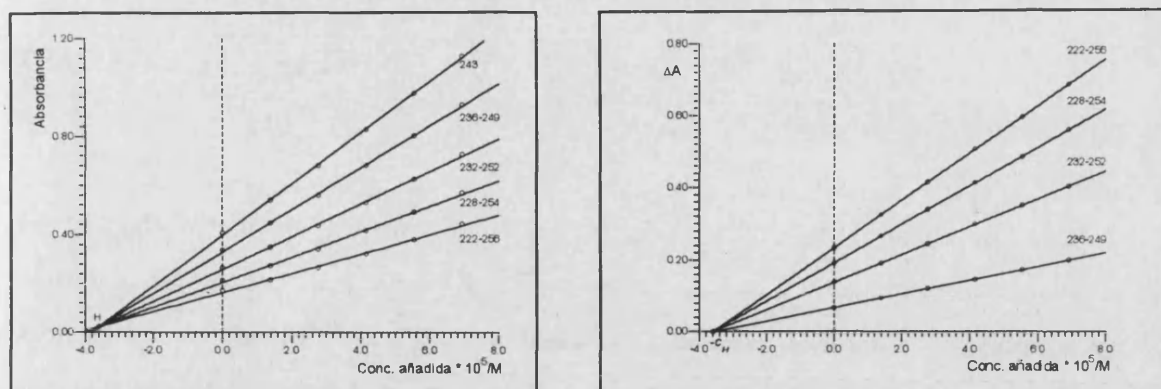


Figura 76: Rectas obtenidas aplicando el HPSAM: A) utilizando valores de absorbancia y B) utilizando valores de incremento de absorbancia.

el mismo punto, $(-C_H, 0)$, donde C_H representa la concentración de analito en la muestra y la contribución de la absorbancia irrelevante ha sido eliminada.

Los resultados obtenidos con el método de calibración de un único patrón [Cardone, 80] se muestran en la tabla LII. A partir de dichos valores se puede demostrar que el método propuesto permite eliminar la interferencia lineal desconocida presente de manera sencilla, por lo que es fácilmente aplicable al trabajo de rutina.

4.2.1.3.- RESOLUCIÓN DE INTERFERENTES LINEALES EN EL MÁXIMO DE ABSORCIÓN DEL ANALITO.

Para comprobar la aplicabilidad del método propuesto cuando la absorbancia del interferente desconocido es del mismo orden que la del analito, se prepararon muestras binarias y ternarias de fenol, 4-clorofenol y 4-cloro-3-metilfenol, sustancias con espectros fuertemente solapados, y representativas del tipo de muestras que se pretenden resolver por el método propuesto.

Procedimiento.

Para aplicar el HPSAM, se prepararon muestras sintéticas que contenían una concentración de fenol de 2.73×10^{-5} M, y se realizaron adiciones de analito en el intervalo 6.82×10^{-6} - 3.41×10^{-5} M. En la tabla LIII se describe la composición de las muestras ensayadas. Todas se prepararon en un medio NaOH 0.1 M, y los espectros se registraron en el intervalo 220-265 nm. cada nm. (por debajo de 220 nm. la absorbancia del blanco es tan alta que no se obtienen resultados reproducibles). Se utilizó el espectrofotómetro Shimadzu UV-240. Se realizaron seis réplicas de cada muestra.

Resultados y discusión.

En la figura 77 se dibujan los espectros de las muestras sintéticas preparadas de acuerdo con las composiciones de la tabla LIII, y en donde se ha remarcado el comportamiento espectral lineal del interferente en el máximo de absorción del analito. Como puede observarse, existen zonas del espectro donde el comportamiento espectral del interferente puede considerarse completamente lineal, y además existen zonas donde dicho comportamiento se cumple para λ_j , λ_m y λ_k . En la tabla LIV se muestran los resultados obtenidos aplicando el test t de linealidad para el intervalo de longitudes de onda donde el interferente muestra dicho comportamiento.

4.2.1.3.- DETERMINACIÓN DE ANALITO EN PRESENCIA DE COMP. DE NAT. DESCONOCIDA

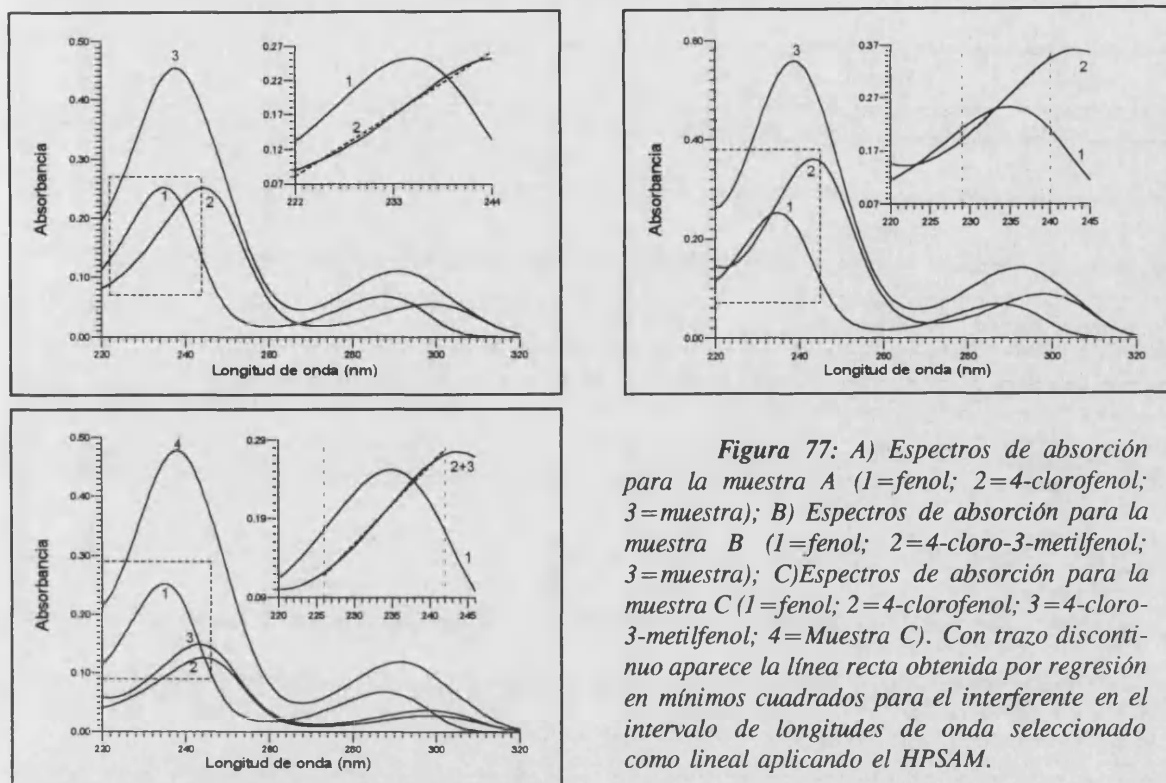


Figura 77: A) Espectros de absorción para la muestra A (1=fenol; 2=4-clorofenol; 3=muestra); B) Espectros de absorción para la muestra B (1=fenol; 2=4-cloro-3-metilfenol; 3=muestra); C) Espectros de absorción para la muestra C (1=fenol; 2=4-clorofenol; 3=4-cloro-3-metilfenol; 4=Muestra C). Con trazo discontinuo aparece la línea recta obtenida por regresión en mínimos cuadrados para el interferente en el intervalo de longitudes de onda seleccionado como lineal aplicando el HPSAM.

Muestra	Conc. fenol	Conc. 4-clorofenol	Conc. 4-cloro-3-metilfenol
A	2.73×10^{-5} M	2.50×10^{-5} M	-
B	2.73×10^{-5} M	-	3.52×10^{-5} M
C	2.73×10^{-5} M	1.25×10^{-5} M	1.76×10^{-5} M

Tabla LIII: Composición de las tres muestras ensayadas.

Como se ha demostrado en las bases teóricas del método, para aplicar el HPSAM en la determinación de un analito en una muestra donde el interferente es completamente desconocido, lo primero que se ha de hacer es confirmar su comportamiento lineal en la zona del máximo de absorción del analito.

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

A)

Intervalo de longitudes de onda	Número de puntos	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	r	t_{calc}	$t_{0.95}(21)$
[222-244]	23	-1.74 ± 0.04	$(8.19 \pm 0.15) \times 10^{-3}$	0.99669	56.209	2.080

B)

Intervalo de longitudes de onda	Número de puntos	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	r	t_{calc}	$t_{0.95}(10)$
[229-240]	12	-3.11 ± 0.03	$(14.41 \pm 0.14) \times 10^{-3}$	0.99954	103.982	2.228

C)

Intervalo de longitudes de onda	Número de puntos	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$	r	t_{calc}	$t_{0.95}(15)$
[226-242]	17	-2.39 ± 0.04	$(11.14 \pm 0.17) \times 10^{-3}$	0.99834	67.147	2.131

Tabla LIV: Linealidad global del interferente en el intervalo de longitudes de onda $[\lambda_j, \lambda_k]$ en las tres muestras ensayadas (se cumple la condición de linealidad cuando $t_{calc} > t_{tab}$).

Si suponemos completamente desconocido el interferente presente en las tres muestras sintéticas preparadas, los resultados obtenidos por aplicación de los métodos descritos anteriormente son los siguientes:

a) Estudio del valor de la primera derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito.

Para aplicar dicha metodología, se seleccionan pares de longitudes de onda a ambos lados del máximo de absorción del analito donde éste presente la misma absorbancia. La diferencia de ordenadas en el origen de las rectas de calibrado obtenidas a λ_j y λ_k será

$$\Delta A_{k,j}, \text{ y por tanto es posible calcular el valor de } \left[\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right].$$

4.2.1.3.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

En la tabla LIV se muestran los valores medios estimados para $\left[\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right]$ en las tres muestras estudiadas y el valor obtenido para $\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\max(X), X+Y}$ en el máximo de absorción del analito, obtenido a partir de su espectro de primera derivada. Se ha supuesto que los valores para $\left[\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right]$ son estadísticamente similares cuando están incluidos en el intervalo $\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\max(X), X+Y} \pm 3 \times s \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\max(X), X+Y}$, con $s \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{\max(X), X+Y} = 0.0005$ (valor experimental). Los intervalos encontrados por este procedimiento (tabla LV) están incluidos dentro de los hallados para disoluciones patrón del interferente (tabla LIV). Por tanto, el procedimiento descrito es efectivamente satisfactorio. Es un método rápido y sencillo para comprobar la linealidad del interferente en la región del máximo de absorción del analito. Comprobado este comportamiento, se aplica la siguiente metodología.

b) estudio de la consistencia de los valores obtenidos para la abcisa del Punto H.

En los tres ejemplos siempre se ha seleccionado el fenol como analito. La zona espectral de estudio será la correspondiente a su máximo de absorción ($\lambda_{\max(X)} = 235$ nm.). Se obtuvieron para cada réplica las rectas de calibrado obtenidas representando la absorbancia medida frente a la concentración añadida de analito a las longitudes de onda incluidas en el intervalo seleccionado ($\Delta \lambda = 220-250$ nm.). Los pares de longitudes de onda donde el analito presenta la misma absorbancia (y por tanto cumplen la ecuación de las bases teóricas) se seleccionaron bajo el criterio de presentar valores de pendiente estadísticamente equivalentes. Los test estadísticos utilizados fueron: análisis de la homogeneidad de la varianza con los test de Snedecor y Bartlett. Si las varianzas de las rectas eran homogéneas, se estudió el paralelismo con los test de Student y Snedecor. Los pares de longitudes de onda así seleccionados son similares entre réplicas, aunque no exactamente iguales. Ello es debido al error aleatorio, por lo que el tratamiento estadístico se realizó para cada réplica.

Réplica	1	2	3	4	5	6
n	3	6	5	6	4	7
$\left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right) \pm s \left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right)$	0.0102 ± 0.0004	0.0104 ± 0.0008	0.0098 ± 0.0007	0.0106 ± 0.0009	0.0101 ± 0.0012	0.0095 ± 0.0005
$\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y} \pm 3 \times s \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y}$	$0.0092 - 0.0122$	$0.0088 - 0.0118$	$0.0082 - 0.0112$	$0.0093 - 0.0123$	$0.0082 - 0.0112$	$0.0077 - 0.0107$
Máximo intervalo lineal	228,241	226,242	224,243	226,242	222,244	224,243

Réplica	1	2	3	4	5	6
n	2	3	3	2	2	2
$\left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right) \pm s \left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right)$	0.0149 ± 0.0006	0.0156 ± 0.0009	0.0141 ± 0.0003	0.0136 ± 0.0005	0.0136 ± 0.0005	0.0132 ± 0.0001
$\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y} \pm 3 \times s \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y}$	$0.0141 - 0.0171$	$0.0138 - 0.0168$	$0.0135 - 0.0165$	$0.0125 - 0.0155$	$0.0118 - 0.0148$	$0.0126 - 0.0156$
Máximo intervalo lineal	229,240	230,239	229,240	230,239	230,239	232,238

Réplica	1	2	3	4	5	6
n	2	3	4	3	3	5
$\left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right) \pm s \left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right)$	0.0124 ± 0.0006	0.0116 ± 0.0010	0.0113 ± 0.0007	0.0125 ± 0.0004	0.0118 ± 0.0003	0.0118 ± 0.0009
$\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y} \pm 3 \times s \left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y}$	$0.0115 - 0.0145$	$0.0106 - 0.0136$	$0.0101 - 0.0131$	$0.0118 - 0.0148$	$0.0110 - 0.0140$	$0.0105 - 0.0135$
Máximo intervalo lineal	229,240	226,242	226,242	229,240	229,240	226,242

Tabla LV: Valores estimados para el parámetro $\left(\frac{\Delta A_{k,j}}{\Delta \lambda_{k,j}} \right)$ en las tres muestras ensayadas, el valor correspondiente para $\left(\frac{dA}{d\lambda} \right)_{235, X+Y}$, y el máximo intervalo

de longitudes de onda donde el interferente puede ser considerado lineal a partir de dichos datos.

4.2.1.3.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

Cuando se han seleccionado diferentes pares de valores λ_j y λ_k , a partir de las rectas obtenidas a λ_j , λ_m y λ_k , y siguiendo el procedimiento descrito en el apartado experimental (ecuación 132), se calcularon los valores para la concentración de analito a los diferentes pares de longitudes de onda. Los resultados se muestran en la tabla LVI A-C, donde los valores aberrantes han sido eliminados por aplicación de los test Q de Dixon o el ensayo *ts*. Dichos valores aparecen en la tabla marcados con un asterisco. Puede observarse que el mayor número de ellos están localizados en los intervalos de longitudes de onda más cortos, y en donde la diferencia entre las pendientes de R_m y R'_m es menor. Esta pequeña diferencia produce resultados poco precisos para el punto de corte de las rectas, como se deduce rápidamente del denominador de la ecuación (132). Existe una gran concordancia entre los valores calculados y el real, a pesar de la gran intensidad de la señal del interferente en el máximo de absorción del analito (75% en la muestra A, 110% en la muestra B y 80% en la muestra C, referido a la absorbancia del analito a 235 nm.).

Como todas las rectas R'_m intersectan con R_m en el mismo punto (el punto H), la linealidad del interferente queda confirmada.

En la tabla LVII se indican los valores medios encontrados para la concentración de analito en las seis réplicas de cada una de las tres muestras. Dichos valores son equivalentes a los añadidos, con errores relativos y desviaciones estándar menores al 3% en todos los casos. Por todo ello se demuestra la capacidad del método para resolver situaciones espectrales como las descritas.

Como las muestras A y B son binarias, se comprobó la exactitud de la ecuación 134 de las bases teóricas. Para ello se procesó el valor de A_H en las rectas de calibrado de la especie interferente a $\lambda_{Max(\lambda)}$ (235 nm.). Los resultados se muestran en la tabla LVI D-E, y los valores medios obtenidos también se dan en la tabla LVII, donde se observa que las concentraciones estimadas coinciden con las añadidas, y por lo tanto el valor de A_H es debido a la absorbancia del interferente a la longitud de onda máxima del analito.

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

RÉPLICA		ANALITO, MUESTRA A										C ± RSD	
1	λ_j, λ_k	225,243	228,241	229,240	232,238	233,237							2.76 ± 0.04
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.80	2.79	2.71	2.74	2.43*							
2	λ_j, λ_k	226,242	229,240	230,239	231,238	232,238	233,236	233,237					2.75 ± 0.07
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.77	2.79	2.70	3.02*	2.85	2.76	2.65					
3	λ_j, λ_k	224,243	226,242	227,241	229,240	230,239	231,238	232,237	233,236				2.62 ± 0.03
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.62	2.60	2.62	2.64	2.59	2.46*	2.67	2.59				
4	λ_j, λ_k	226,242	229,240	231,238	232,238	233,236	233,237						2.76 ± 0.17
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.69	2.68	2.52	2.76	3.00	2.91						
5	λ_j, λ_k	222,244	227,241	231,238	232,237	233,236							2.81 ± 0.07
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.80	2.73	2.82	2.89	3.14*							
6	λ_j, λ_k	224,243	227,241	229,240	230,239	231,238	232,237	232,238	233,236	233,237			2.63 ± 0.10
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.72	2.70	2.66	2.73	2.49	2.38*	2.51	2.94*	2.58			

RÉPLICA		ANALITO, MUESTRA B										C ± RSD	
1	λ_j, λ_k	224,243	226,242	229,240	230,239	232,238	233,237						2.81 ± 0.05
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.75	2.84	2.86	2.80	3.04*	3.14*						
2	λ_j, λ_k	220,245	222,244	224,243	226,242	229,240	230,239	232,238	232,237	233,237			2.76 ± 0.12
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.61	2.75	2.87	2.98*	2.99*	2.90	2.79	2.65	2.42			
3	λ_j, λ_k	226,242	229,240	231,239	232,238	233,237							2.73 ± 0.14
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.86	2.79	2.73	2.54	2.42*							
4	λ_j, λ_k	226,242	230,239	232,238	233,237								2.86 ± 0.02
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.84	2.86	2.87	2.48*								
5	λ_j, λ_k	221,245	224,243	229,240	230,239	231,238	232,237	233,237					2.85 ± 0.10
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.75	2.81	3.08*	2.99	2.83	3.13*	3.49*					
6	λ_j, λ_k	223,244	225,243	228,241	230,240	231,239	232,238	233,237					2.64 ± 0.08
	$C_{\text{enc}} \times 10^5 / M$	2.66	2.67	2.59	2.64	2.68	2.57	2.68					

4.2.1.3.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

RÉPLICA	ANALITO, MUESTRA C										C ± RSD
	λ_j, λ_k	222,244	224,243	226,242	229,240	230,239	232,238	233,237	$C_{enc} \times 10^5/M$		
1	λ_j, λ_k	222,244	224,243	226,242	229,240	230,239	232,238	233,237	$C_{enc} \times 10^5/M$		2.82 ± 0.06
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.77	2.82	2.79	2.79	2.93	2.54*	2.20*			
2	λ_j, λ_k	224,243	226,242	229,240	230,239	232,238	233,236	233,237	$C_{enc} \times 10^5/M$		2.77 ± 0.07
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.75	2.75	2.84	2.85	3.05*	2.68	3.12*			
3	λ_j, λ_k	226,242	229,240	230,239	231,238	232,238	233,236	233,237	$C_{enc} \times 10^5/M$		2.80 ± 0.09
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.78	2.77	2.73	3.02*	2.93	3.98*	3.48*			
4	λ_j, λ_k	221,245	223,244	229,240	231,239	232,238	233,237		λ_j, λ_k		
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.81	2.81	2.86	2.82	2.80	2.65*		$C_{enc} \times 10^5/M$		2.82 ± 0.02
5	λ_j, λ_k	226,242	229,240	232,238	233,237				λ_j, λ_k		
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.81	2.60	2.81	2.75				$C_{enc} \times 10^5/M$		2.74 ± 0.10
6	λ_j, λ_k	226,242	229,240	231,238	232,238	233,236	233,237		λ_j, λ_k		
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.84	2.88	2.98	2.96	5.09*	2.82		$C_{enc} \times 10^5/M$		2.90 ± 0.07

INTERFERENTE, MUESTRA A											C ± RSD	
RÉPLICA	λ_j, λ_k	225,243	228,241	229,240	232,238							
1	λ_j, λ_k	225,243	228,241	229,240	232,238							
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.60	2.61	2.71	2.66							2.64 ± 0.05
2	λ_j, λ_k	226,242	229,240	230,239	232,238	233,236	233,237					
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.62	2.61	2.72	2.53	2.64	2.77					2.65 ± 0.08
3	λ_j, λ_k	224,243	226,242	227,241	229,240	230,239	232,237	233,236				
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.75	2.77	2.75	2.73	2.79	2.69	2.79				2.75 ± 0.03
4	λ_j, λ_k	226,242	229,240	231,238	232,238	233,236	233,237					
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.59	2.63	2.83	2.54	2.23	2.36					2.53 ± 0.21
5	$\lambda_j, \lambda_k Z$	222,244	227,241	231,238	232,237							
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.49	2.58	2.49	2.40							2.49 ± 0.07
6	λ_j, λ_k	224,243	227,241	229,240	230,239	231,238	232,238	233,237				
	$C_{enc} \times 10^5/M$	2.65	2.68	2.73	2.64	2.94	2.90	2.82				2.77 ± 0.11

RÉPLICA		INTERFERENTE, MUESTRA B							C ± RSD
1	λ_j, λ_k	224,243	226,242	229,240	230,239			3.56 ± 0.06	
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.63	3.53	3.50	3.58				
2	λ_j, λ_k	220,245	222,244	224,243	230,239	232,238	232,237		3.50 ± 0.14
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.69	3.52	3.38	3.35	3.43	3.65		
3	λ_j, λ_k	226,242	229,240	231,239	232,238			3.52 ± 0.15	
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.38	3.45	3.50	3.73				
4	λ_j, λ_k	226,242	230,239	232,238					3.21 ± 0.01
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.21	3.21	3.22					
5	λ_j, λ_k	221,245	224,243	230,239	231,238			3.53 ± 0.13	
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.65	3.57	3.34	3.56				
6	λ_j, λ_k	223,244	225,243	228,241	230,240	231,239	232,238	233,237	3.65 ± 0.06
	$C_{enc} \times 10^5/M$	3.63	3.60	3.72	3.66	3.60	3.75	3.60	

Tabla LVI: Resultados obtenidos para el analito e interferente aplicando el HPSAM en las distintas muestras ensayadas.

Muestra	$C_{añad}$ (analito)	C_{enc}	% E_r	% RSD ($n=6$)
A	2.73×10^{-5} M	$(2.72 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ M	-0.37	2.94
B	2.73×10^{-5} M	$(2.78 \pm 0.08) \times 10^{-5}$ M	1.83	2.88
C	2.73×10^{-5} M	$(2.81 \pm 0.05) \times 10^{-5}$ M	2.93	1.78

Muestra	$C_{añad}$ (interferente)	C_{enc}	% E_r	% RSD ($n=6$)
A	2.50×10^{-5} M	$(2.64 \pm 0.11) \times 10^{-5}$ M	5.60	4.17
B	3.52×10^{-5} M	$(3.50 \pm 0.15) \times 10^{-5}$ M	-0.57	4.29

Tabla LVII: Resultados finales obtenidos para analito e interferente en las muestras analizadas.

4.2.1.4.- CONCLUSIONES.

Los resultados demuestran que el HPSAM utilizando absorbancia o incremento de absorbancia como señales analíticas es una poderosa herramienta para obtener valores de concentración exentos de error sistemático constante cuando existe en la muestra una absorbancia irrelevante desconocida. Las principales ventajas del HPSAM frente a los métodos propuestos en la bibliografía para este fin son: 1.- no es necesario comparar el espectro de la muestra con el del analito puro. Además no es necesario registrarlo, pues se puede obtener de las disoluciones preparadas para aplicar el método, a partir de las pendientes de la representación $A = f(C_{añadida})$; 2.- el método utiliza valores de absorbancia o de incremento de absorbancia, por lo que el cociente señal/ruido (SNR) no disminuye como en el caso de utilizar valores de derivada; 3.- aunque es necesario que la absorbancia irrelevante desconocida muestre un comportamiento espectral lineal a las tres longitudes de onda seleccionadas, no es necesario que la pendiente de dicha recta sea nula (a diferencia de los otros métodos propuestos que requieren dicha condición); 4.- los resultados obtenidos para las muestras hacen posible distinguir entre interferentes lineales y no lineales.

Asimismo el método propuesto permite su adaptación al método de calibración de un único patrón, para su aplicación al análisis de rutina.

4.2.1.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN EL MÁXIMO DEL ANALITO

Por otra parte, a partir de los datos obtenidos, podemos afirmar que aplicando el HPSAM es posible calcular la concentración de analito en una muestra donde el interferente es totalmente desconocido, libre de error, a partir de la abcisa del punto H, incluso en el caso de que la absorbancia desconocida no sea de tipo irrelevante.

Para la correcta aplicación del método, es necesario seleccionar intervalos del espectro donde el comportamiento espectral del interferente sea lineal. Se proponen dos metodologías para seleccionar dichos intervalos.

La ordenada del punto H permite calcular la intensidad de la interferencia. Si la mezcla es binaria (y el interferente conocido), a partir de dicho valor se puede calcular su concentración.

**4.2.2.- INTERFERENTE LINEAL
DESCONOCIDO EN CUALQUIER ZONA
DEL ESPECTRO: MÉTODO DE
ADICIÓN ESTÁNDAR DEL PUNTO H:
GHPSAM**

4.2.2.- INTERFERENTE LINEAL DESCONOCIDO EN CUALQUIER ZONA DEL ESPECTRO: EL MÉTODO DE ADICIÓN ESTÁNDAR GENERALIZADO DEL PUNTO H, GHPSAM.

4.2.2.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS.

Supongamos que el comportamiento espectral del interferente puede ser considerado lineal en el intervalo de longitudes de onda $[\lambda_j, \lambda_k]$, como se muestra en la figura 78, aunque no necesariamente en el máximo de absorción del analito. La absorbancia del analito a λ_j y λ_k no tiene porque ser la misma, a diferencia del caso expuesto en el apartado anterior.

Para aplicar el método se requiere seleccionar una tercera longitud de onda, λ_m , perteneciente al intervalo de longitudes de onda seleccionado $[\lambda_j, \lambda_k]$. Dicha longitud de onda permite localizar correctamente el punto H. Para ello definimos dos nuevos parámetros p y q de la siguiente forma:

$$p = \frac{\lambda_m - \lambda_j}{\lambda_k - \lambda_j} \quad (143)$$

$$q = \frac{\lambda_k - \lambda_m}{\lambda_k - \lambda_j} \quad (144)$$

De donde fácilmente se deduce que:

$$p + q = 1 \quad (145)$$

Para simplificar los siguientes cálculos, se selecciona λ_m como la longitud de onda media de λ_j y λ_k :

$$\lambda_m = \frac{\lambda_j + \lambda_k}{2} \quad (146)$$

y por tanto:

$$p = q = 1/2 \quad (147)$$

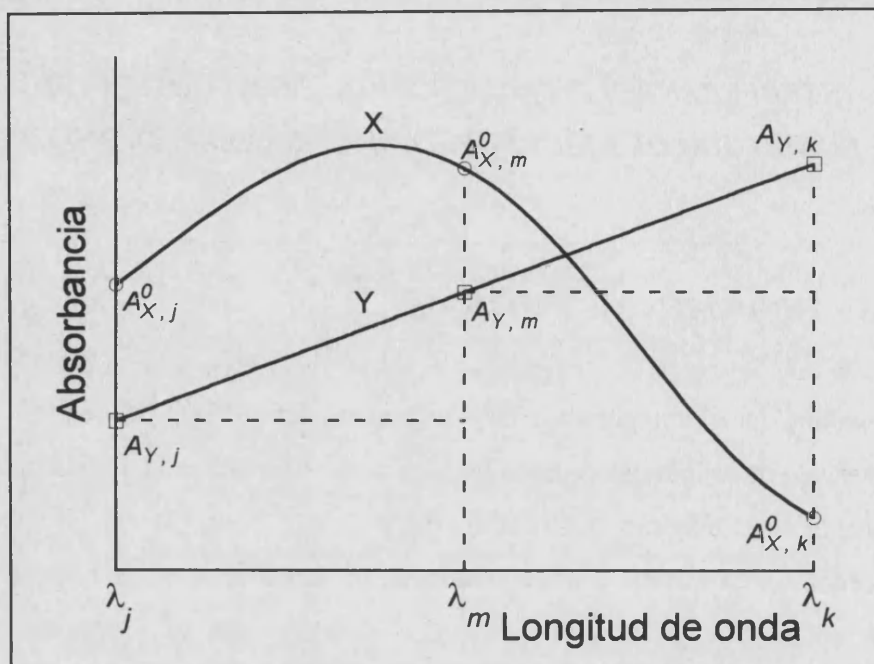


Figura 78: Espectros de absorción para el analito X y el interferente global Y.

Las ecuaciones de las rectas obtenidas por aplicación del GHPSAM representando los valores de absorbancia a λ_j , λ_m y λ_k frente a la concentración añadida de analito son (figura 79a):

$$\text{Para } \lambda_j, \quad A_j = A_{X,j}^0 + A_{Y,j} + M_j \times C_X^i \quad (148)$$

$$\text{Para } \lambda_m, \quad A_m = A_{X,m}^0 + A_{Y,m} + M_m \times C_X^i \quad (149)$$

$$\text{Para } \lambda_k, \quad A_k = A_{X,k}^0 + A_{Y,k} + M_k \times C_X^i \quad (150)$$

A partir de estas tres rectas podemos definir otras nuevas como diferencia entre A_m y A_j y A_k y A_m (figura 79b):

$$\Delta A_{m,j} = A_m - A_j = (A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0) + (A_{Y,m} - A_{Y,j}) + [M_m - M_j] \times C_X^i \quad (151)$$

$$\Delta A_{k,m} = A_k - A_m = (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0) + (A_{Y,k} - A_{Y,m}) + [M_k - M_m] \times C_X^i \quad (152)$$

Estas dos líneas rectas permiten el cálculo de la concentración de analito libre de error a partir de la abcisa de su punto de corte, que es el punto H, de coordenadas $(-C_H, \Delta A_H)$:

4.2.2.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

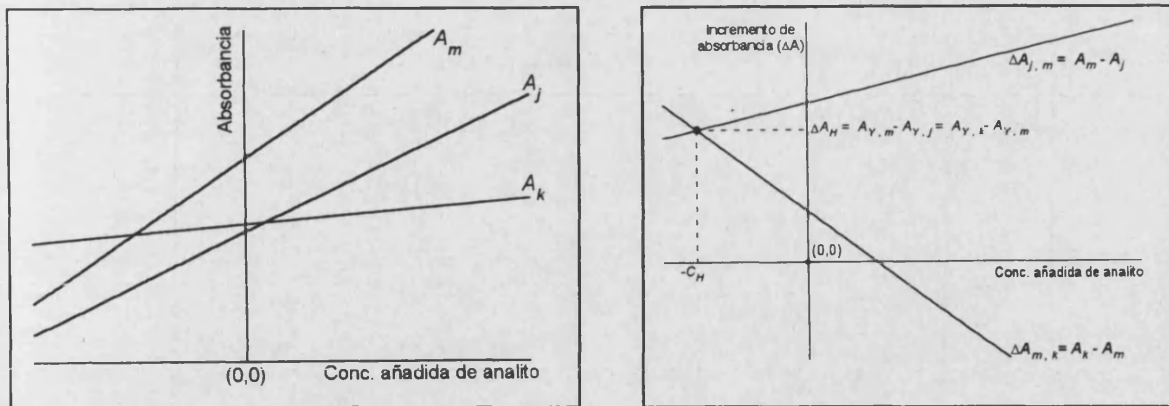


Figura 79: A) Rectas del método de adición estándar del punto H a $\lambda_j(A_j)$, $\lambda_m(A_m)$ y $\lambda_k(A_k)$.
B) Rectas del método de adición estándar del punto H usando incrementos de absorbancia como señales analíticas.

$$= (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0) + (A_{Y,k} - A_{Y,m}) + [M_k - M_m] \times (-C_H) \quad (153)$$

Si observamos la figura 78, y teniendo en cuenta que $A_{Y,j}$, $A_{Y,m}$ y $A_{Y,k}$ están linealmente relacionadas y que λ_m es equidistante de λ_j y λ_k , se obtiene que:

$$A_{Y,m} - A_{Y,j} = A_{Y,k} - A_{Y,m} \quad (154)$$

por lo que la ecuación (153) se simplifica a:

$$(A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0) + [M_m - M_j] \times (-C_H) = (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0) + [M_k - M_m] \times (-C_H)$$

$$-C_H = \frac{(A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0) - (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0)}{[M_k - M_m] - [M_m - M_j]} = \frac{2A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0}{M_j + M_k - 2M_m} \quad (155)$$

donde C_H es la concentración de analito en la muestra exenta de error, C_X^0 , puesto que la ecuación (155) depende sólo de variables relacionadas con el analito y es equivalente a las siguientes expresiones:

$$-C_H = \frac{2A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0 - A_{X,k}^0}{M_j + M_k - 2M_m} = \frac{A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0}{M_j - M_m} = \frac{A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0}{M_m - M_k} =$$

$$= \frac{-A_{X,j}^0}{M_j} = \frac{-A_{X,m}^0}{M_m} = \frac{-A_{X,k}^0}{M_k} = -C_X^0 \quad (156)$$

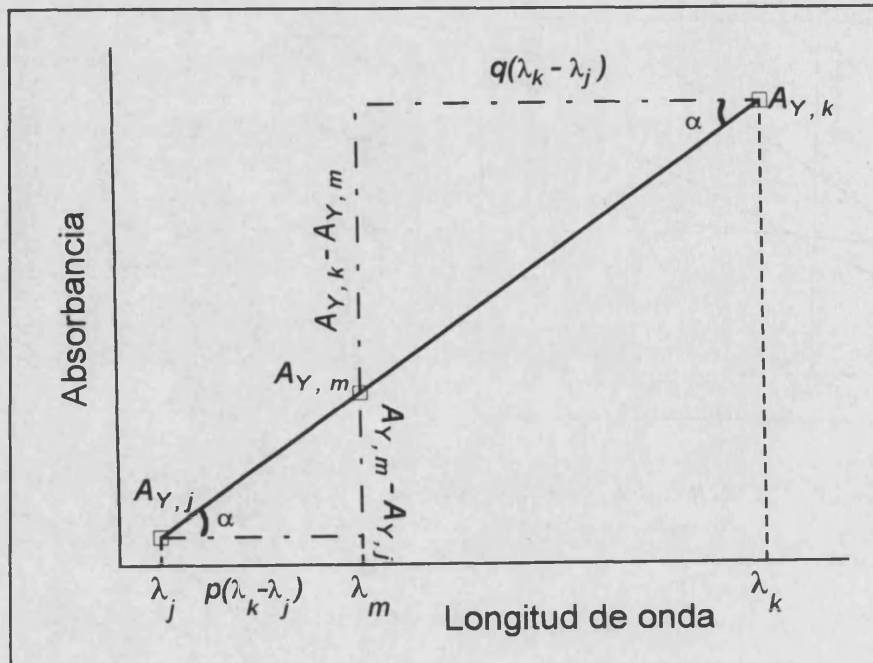


Figura 80: Demostración geométrica para la igualdad $(A_{Y,m} - A_{Y,j}) / p = (A_{Y,k} - A_{Y,m}) / q$. α es el mismo para ambos ángulos.

Si se introduce el valor obtenido en (155) y (156) en (151) ó (152), podemos demostrar que el valor de la ordenada en el punto de corte (el punto H), ΔA_H , es equivalente a:

$$\Delta A_H = A_{Y,m} - A_{Y,j} = A_{Y,k} - A_{Y,m} \quad (157)$$

por lo que, como proponen las bases del GHPSAM, el error incorregible debido a la presencia de un interferente desconocido se transforma en un error sistemático constante, fácilmente evaluable y corregible.

Un desarrollo más general cuando $p \neq q$ conduce a las siguientes expresiones:

$$\Delta A_{m,j} = q \times \{A_m - A_j\} = q \times (A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0) + q \times (A_{Y,m} - A_{Y,j}) + q \times [M_m - M_j] \times C_X^i \quad (158)$$

$$\Delta A_{k,m} = p \times \{A_k - A_m\} = p \times (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0) + p \times (A_{Y,k} - A_{Y,m}) + p \times [M_k - M_m] \times C_X^i \quad (159)$$

El valor debido a la presencia del interferente es el mismo en ambas líneas, puesto que, si observamos la figura 80, por semejanza de triángulos se cumple que:

$$\frac{A_{Y,m} - A_{Y,j}}{p \times (\lambda_k - \lambda_j)} = \frac{A_{Y,k} - A_{Y,m}}{q \times (\lambda_k - \lambda_j)} \quad (160)$$

por lo que:

$$p \times A_{Y,k} - A_{Y,m} = q \times A_{Y,m} - A_{Y,j} \quad (161)$$

y por lo tanto el punto de corte viene definido por:

$$-C_H = \frac{q \times (A_{X,m}^0 - A_{X,j}^0) - p \times (A_{X,k}^0 - A_{X,m}^0)}{p \times [M_k - M_m] - q \times [M_m - M_j]} = \frac{A_{X,m}^0 - q \times A_{X,j}^0 - p \times A_{X,k}^0}{q \times M_j + p \times M_k - M_m} \quad (162)$$

Si $p = q = 1/2$, la ecuación (162) se transforma en la previamente deducida ecuación (155).

Del mismo modo que la ecuación (157) se obtiene que:

$$\Delta A_H = q \times (A_{Y,m} - A_{Y,j}) = p \times (A_{Y,k} - A_{Y,m}) \quad (163)$$

A partir de las ecuaciones (157) y (163), y considerando el valor del intervalo de longitudes de onda $[\lambda_j, \lambda_m]$ y $[\lambda_m, \lambda_k]$, se puede estimar el valor de la pendiente de la línea recta que describe el comportamiento del interferente, de modo análogo a como se ha hecho en el caso de interferentes lineales en el máximo de absorción del analito. Si dicho valor es estadísticamente equivalente al de la primera derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito, se confirmará la linealidad del interferente.

Para obtener los resultados más precisos se debe hacer máximo el valor del denominador en la ecuación (162) ($q \times M_j + p \times M_k - M_m$). Dicha optimización se realiza rápidamente en un ordenador, con los mismos datos obtenidos para la absorbancia de la muestra.

De las ecuaciones (160) y (162) podemos concluir que los resultados estará afectados de error sólo si:

- a) $q \times [A_{Y, m} - A_{Y, j}] \neq p \times [A_{Y, k} - A_{Y, m}]$, es decir, el interferente no es realmente lineal en el intervalo de longitudes de onda seleccionado. Se demostrará que el método propuesto selecciona intervalos lineales para el comportamiento espectral del interferente.
- b) $q \times M_j + p \times M_k \approx M_m$, es decir, el comportamiento espectral del analito también puede ser descrito de manera lineal en el mismo intervalo de longitudes de onda que el interferente. Este es el único caso en el que el GHPSAM no puede ser empleado con buenos resultados.

- Localización de intervalos espectrales lineales para la matriz desconocida.

La correcta aplicación del método necesita localizar intervalos espectrales lineales para el interferente. Para ello se ha desarrollado la siguiente metodología, basado en cocientes de espectros de segunda derivada.

Sea **X** el analito a determinar e **Y** la interferencia global desconocida. Sus espectros se muestran en la figura 81A. La absorbancia de la muestra **S** a cada longitud de onda será la suma de las absorbancias de las especies **X** e **Y**.

$$A_s = \varepsilon_x \times C_x^0 + \varepsilon_y \times C_y^0 = A_x^0 + A_y^0 \quad (164)$$

Si suponemos que el interferente **Y** muestra un comportamiento espectral lineal entre las longitudes de onda λ_j y λ_k , la línea recta que describe dicho comportamiento es:

$$A_{Y, k} = A_{Y, j} + b \times \lambda_l ; \quad \lambda_l \in [\lambda_j , \lambda_k] \quad (165)$$

Dicha recta es la misma para las diferentes disoluciones preparadas para 0 a n adiciones de cantidades conocidas de analito **X**, puesto que la cantidad de muestra añadida es la misma para todas las disoluciones preparadas.

La absorbancia del analito a dichas longitudes de onda vendrá descrita por:

$$A_{X, l}^i = C_x^i \times \varepsilon_l ; \quad \lambda_l \in [\lambda_j , \lambda_k] ; \quad i = 0, 1, \dots, n \quad (166)$$

4.2.2.1.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

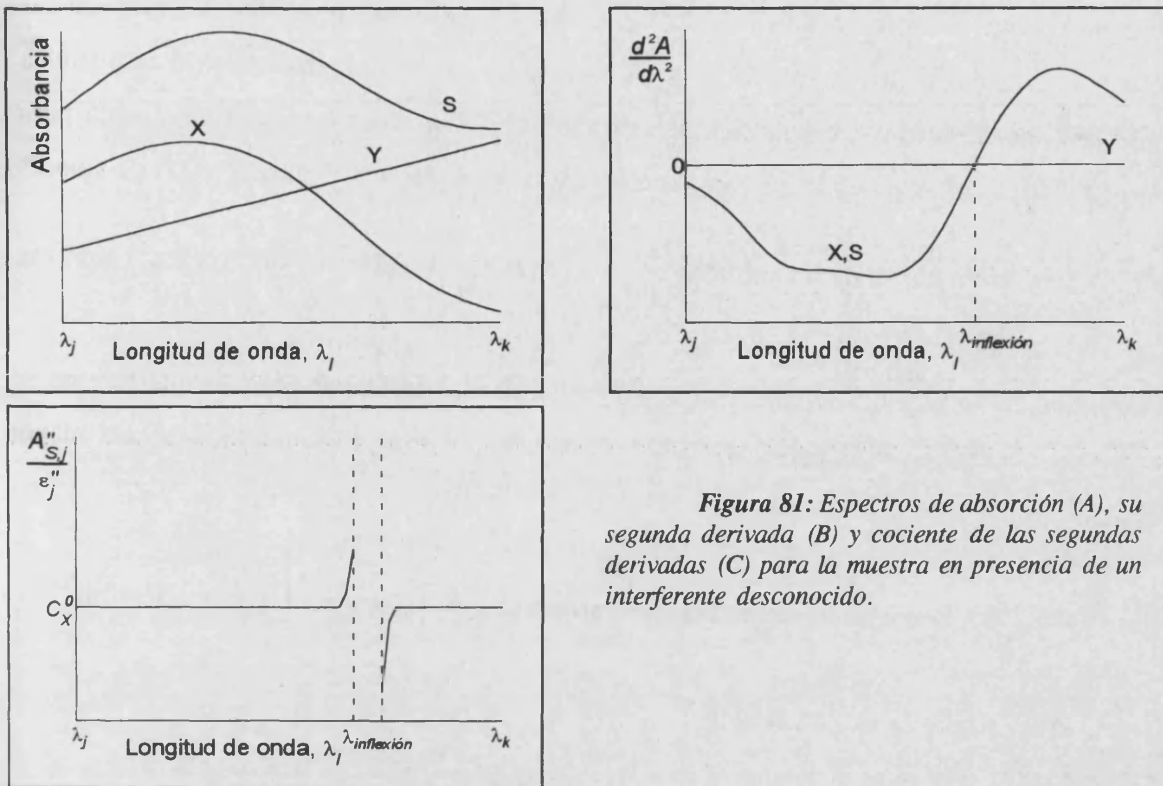


Figura 81: Espectros de absorción (A), su segunda derivada (B) y cociente de las segundas derivadas (C) para la muestra en presencia de un interferente desconocido.

Para $i = 0$ se tiene la disolución a la que no se le ha añadido patrón. Su absorbancia a λ_j será:

$$A_{S, l} = A_{X, l}^0 + A_{Y, l} = C_X^0 \times \varepsilon_l + A_{Y, j} + b \times \lambda_l ; \quad \lambda_l \in [\lambda_j , \lambda_k] \quad (167)$$

La segunda derivada de la absorbancia de la muestra respecto a la longitud de onda en dicho intervalo puede describirse como (figura 81B):

$$\frac{d^2 A_{S, l}}{d\lambda^2} = \frac{d^2 A_{X, l}^0}{d\lambda^2} + \frac{d^2 A_{Y, l}}{d\lambda^2} = C_X^0 \frac{d^2 \varepsilon_l}{d\lambda^2} = C_X^0 \varepsilon_l'' = A_{S, l}'' ; \quad \lambda_l \in [\lambda_j , \lambda_k] \quad (168)$$

La ecuación (168) puede reescribirse como:

$$\frac{A_{S, l}''}{\varepsilon_l''} = C_X^0 \quad (169)$$

Para localizar intervalos espectrales lineales para la matriz desconocida basta con calcular el cociente entre la segunda derivada de la muestra y ε_l'' , a cada longitud de onda medida, y seleccionar el intervalo donde dicho valor pueda ser considerado constante. ε_l''

4.2.2.- GHPSAM

se calcula a partir de las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas a partir de las segundas derivadas de los espectros de la muestra y de las distintas adiciones. Las posibles divisiones por cero (puntos de inflexión del analito) deben de ser tenidas en cuenta para eliminar dichos valores, por lo anormalmente altos o bajos que son (figura 81C). Los valores de C_x^0 obtenidos a partir de las gráficas de $\frac{A_{s,i}''}{\epsilon_i}$ frente a λ_i deben de optimizarse, como se

demostrará en la sección de resultados. La hipótesis de linealidad para el interferente se corrobora cuando se aplica el GHPSAM. Además, en este caso se estima con mayor precisión la concentración de analito.

4.2.2.2.- Resolución de diferentes muestras con interferentes desconocidos.

Procedimiento experimental.

Mezclas fenólicas:

Se prepararon mezclas que contenían una concentración final de fenol de 16.10×10^{-5} y 8.05×10^{-5} M en NaOH 0.1M. El intervalo de longitudes de onda medido fue de 260 a 320 nm. cada 0.5 nm (espectrofotómetro Lambda 16). La corrección de la línea base se realizó con NaOH 0.1 M inmediatamente antes de la medida de cada réplica. Las composiciones de las muestras ensayadas se da en la tabla LVIII.

Muestra	fenol/M (analito)	2,4-diclorofenol/M	4-cloro-2-nitrofenol/M	2,4,6-triclorofenol/M
1	16.10×10^{-5}	4.73×10^{-5}	-	-
2	16.10×10^{-5}	-	4.34×10^{-5}	-
3	16.10×10^{-5}	-	-	3.85×10^{-5}
4	16.10×10^{-5}	1.89×10^{-5}	1.74×10^{-5}	1.54×10^{-5}
5	8.05×10^{-5}	9.46×10^{-5}	-	-
6	8.05×10^{-5}	-	8.68×10^{-5}	-
7	8.05×10^{-5}	-	-	7.71×10^{-5}
8	8.05×10^{-5}	2.37×10^{-5}	2.17×10^{-5}	1.93×10^{-5}

Tabla LVIII: Composición de las ocho muestras fenólicas sintéticas preparadas.

4.2.2.2.- RESOLUCIÓN DE DIFERENTES MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

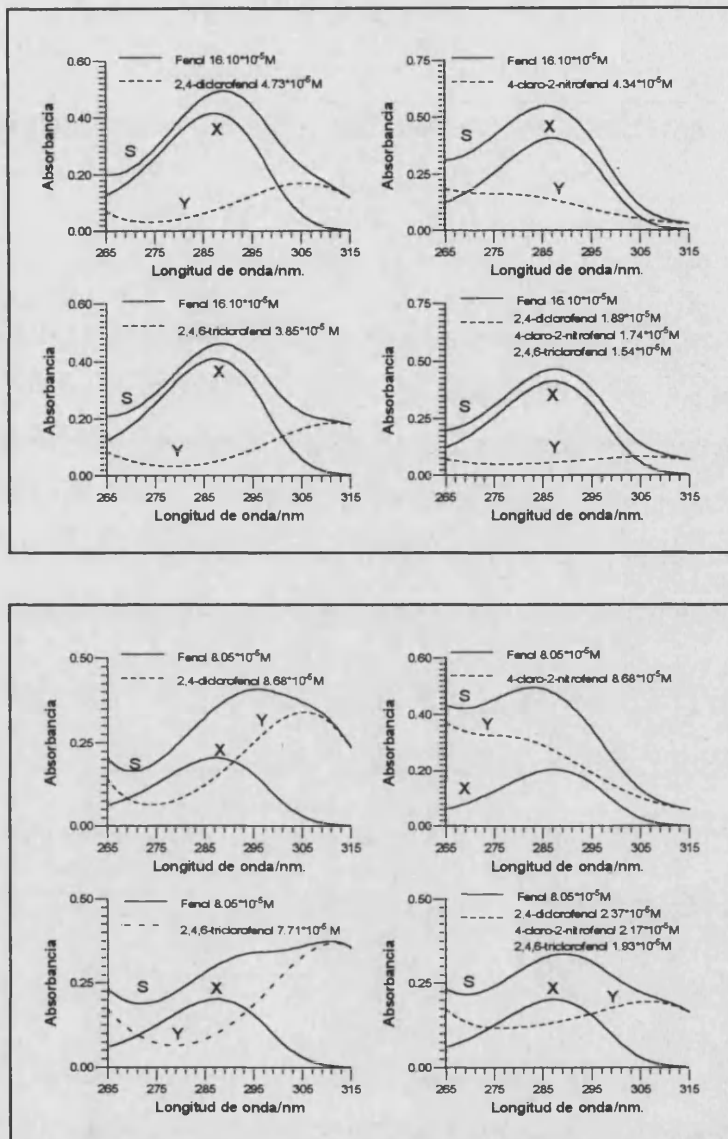


Figura 82: Espectros de las ocho muestras fenólicas ensayadas, cuya composición se da en la tabla LVIII.

Muestras de orina:

Preparadas como se ha descrito en [Molins, 93], y medidos en el diode-array de Hewlett-Packard.

Resultados y discusión.

4.2.2.- GHPSAM

En la figura 82 se muestra el espectro de del analito e interferentes para las ocho muestras fenólicas ensayadas (tabla LVIII). Los valores de ϵ_j o de ϵ_j'' son iguales para las ocho mezclas ensayadas, puesto que el analito es el mismo en todos los casos (fenol). La

figura 83 son las gráficas de $\frac{A_{s,j}''}{\epsilon_j}$ frente a λ_j utilizados para localizar el intervalo de

longitudes de onda donde el comportamiento espectral del interferente puede ser considerado lineal. Dicha zona se corresponde con la de valor constante para C_x^0 . Los intervalos seleccionados para las ocho muestras aparecen en la tabla LIX. Como las bases teóricas predecían, el comportamiento espectral de los interferentes en los intervalos seleccionados es casi lineal, como se puede ver en la figura 82. El valor de C^0 obtenido de esta forma también se muestra en dicha tabla. Dichos valores no son lo suficientemente precisos como para determinar la concentración de analito, pero sirven como estimación aproximada para aplicar el GHPSAM.

Muestra	Intervalos de longitudes de onda seleccionados	Valores encontrados para $(C_x^0 \pm s) \times 10^5 / M$
1	280/294 + 301/307	12.88 ± 2.39
2	280/297 + 299.5/310	17.86 ± 1.62
3	283/297.5 + 299.5/305	13.83 ± 0.88
4	283/308	15.32 ± 1.01
5	284/295 + 301/304	3.84 ± 4.14
6	284/297 + 300/310	10.52 ± 2.07
7	285/297.5 + 299/300	4.24 ± 1.39
8	282/297.5 + 300/302	6.86 ± 0.87

Tabla LIX: Valores obtenidos para C_x^0 a partir de los valores de las gráficas de $A_{s,j}'' / \epsilon_j''$ frente a λ para las ocho muestras sintéticas ensayadas.

Cuando el intervalo donde el interferente puede ser considerado lineal está acotado, el GHPSAM calcula la concentración de analito libre de error a partir de la ecuación (162).

Los resultados se muestran en la tabla LX. Los valores para $\left[\frac{dA}{d\lambda} \right]_{\max(X), X, Y}$ (primera

4.2.2.2.- RESOLUCIÓN DE DIFERENTES MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

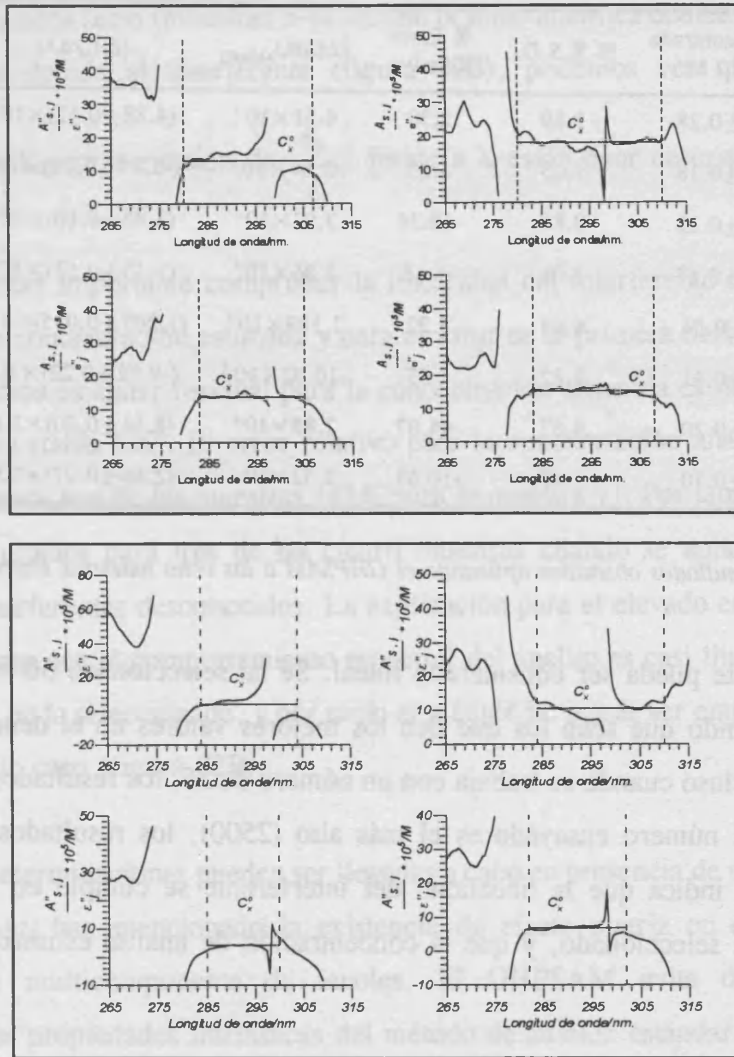


Figura 83: Gráficas para $A''_{s,j} / \epsilon_j''$ frente a λ_j obtenidas para las ocho muestras fenólicas.

derivada de la muestra en el máximo de absorción del analito) y para $\left[\frac{\Delta A_H}{\Delta \lambda} \right] \pm s \left(\frac{\Delta A_H}{\Delta \lambda} \right)$ (que

será equivalente al valor de la primera derivada de la muestra a $\lambda_{\max(X)}$ si el comportamiento espectral del interferente es lineal) se dan también en dicha tabla. Dichos valores se han obtenido para corroborar la linealidad del interferente, como se ha descrito en el apartado anterior. En todos los casos, los valores obtenidos son estadísticamente equivalentes.

Se ha calculado la concentración de analito como la media de los resultados obtenidos de diferentes intervalos de longitudes de onda tomados dentro del máximo intervalo $[\lambda_j, \lambda_k]$

4.2.2.- GHPSAM

Muestra	Conc. encontrada $\times 10^5 / M$	% R.S.D.	% Error Relativo	$(dA/d\lambda)_{\lambda_{Max(\lambda)}}$	$(\Delta A_H/\Delta\lambda)$	% R.S.D.
1	16.47 ± 0.28	1.69	2.30	4.51×10^{-3}	$(4.88 \pm 0.12) \times 10^{-3}$	2.54
2	16.91 ± 0.18	1.05	5.03	-3.64×10^{-3}	$(-3.81 \pm 0.12) \times 10^{-3}$	3.02
3	14.11 ± 0.12	0.88	-12.36	3.93×10^{-3}	$(3.86 \pm 0.10) \times 10^{-3}$	2.58
4	15.91 ± 0.17	1.06	-1.18	1.86×10^{-3}	$(1.13 \pm 0.13) \times 10^{-3}$	11.04
5	8.47 ± 0.54	6.43	5.22	1.189×10^{-2}	$(1.207 \pm 0.035) \times 10^{-2}$	2.94
6	8.16 ± 0.31	3.82	1.37	-10.02×10^{-3}	$(-9.32 \pm 0.22) \times 10^{-3}$	2.40
7	4.18 ± 0.20	4.87	-48.07	7.85×10^{-3}	$(8.11 \pm 0.20) \times 10^{-3}$	2.48
8	7.19 ± 0.10	1.45	-10.68	2.52×10^{-3}	$(2.66 \pm 0.07) \times 10^{-3}$	2.76

Tabla LX: Resultados obtenidos aplicando el GHPSAM a las ocho muestras sintéticas.

donde el interferente pueda ser considerado lineal. Se ha seleccionado 50 valores para los cálculos, considerando que sean los que den los mejores valores en el denominador de la ecuación (162). Incluso cuando se trabaja con un número de 25, los resultados obtenidos son buenos. Cuando el número ensayado es el más alto (2500), los resultados siguen siendo buenos. Todo ello indica que la linealidad del interferente se cumple en el intervalo de longitudes de onda seleccionado, y que la concentración de analito estimada está libre de error.

Para la primera serie (muestras 1-4), donde la señal analítica para el analito es mayor que la del interferente (figura 82A), podemos ver que los intervalos horizontales en la

representación de $\frac{A_{s,i}}{\varepsilon_i}$ frente a λ_i están bien descritos (figura 83A). Esto se cuantifica en

la tabla LX, puesto que el tanto por ciento de desviación estándar relativa es menor que 2% de la concentración encontrada, y por tanto los intervalos espectrales donde el interferente muestra un comportamiento lineal han sido correctamente localizados. El error relativo obtenido para la concentración de analito es menor del 5% para tres muestras (12% para la muestra número 3), por lo que se obtienen muy buenos resultados cuando se aplica el GHPSAM a muestras desconocidas.

4.2.2.2.- RESOLUCIÓN DE DIFERENTES MUESTRAS CON INTERFERENTES DESCONOCIDOS

Para la segunda serie (muestras 5-8), donde la señal analítica debida al analito es igual o menor que la debida al interferente (figura 82B), podemos ver que los intervalos horizontales para la representación de $\frac{A_{s,j}''}{\varepsilon_j}$ frente a λ_j están peor descritos (figura 83B) y

en este caso es más importante comprobar la linealidad del interferente con los resultados obtenidos para la concentración estimada y para el valor de la primera derivada. El tanto por ciento de desviación estándar residual para la concentración obtenida es mayor en esta serie que en la primera (tabla LX). El error relativo para la concentración añadida de analito es menor del 10% para tres de las muestras (48% para la muestra 7). Por tanto se han obtenido muy buenos resultados para tres de las cuatro muestras cuando se aplica el GHPSAM a muestras con interferentes desconocidos. La explicación para el elevado error en la muestra 7 se explica puesto que el comportamiento espectral del analito es casi lineal en el intervalo de longitudes de onda seleccionado, y por tanto el método no puede ser empleado con buenos resultados en este caso (figura 82B).

Dichas determinaciones pueden ser llevadas a cabo en presencia de nitrofenoles. Otros autores [Navarro,91] han mencionado la existencia de efecto matriz en dicho caso en las determinaciones multicomponente de fenoles. El GHPSAM evita dichos problemas, aprovechando las propiedades intrínsecas del método de adición estándar.

El método se aplicó también a muestras de orina para la determinación de anfetamina. En este caso el blanco reactivo no tiene un comportamiento definido, por lo que se ha efectuado un estudio sistemático del mismo. Como puede verse en la figura 84, la primera de las muestras de orina no tiene problemas de blanco, pero en la segunda el blanco interno y el externo sólo coinciden en más de un 90% en el intervalo de longitudes de onda 406-538 nm. Por tanto sólo dicha zona puede ser utilizada en los cálculos. En intervalo donde la absorbancia del interferente cambia linealmente con la longitud de onda se muestra en la figura 85, donde se han representado las gráficas de $\frac{A_{s,j}''}{\varepsilon_j}$ frente a λ_j . A partir de aquí,

seleccionados los intervalos lineales para el interferente, se aplica el GHPSAM y los

4.2.2.- GHPSAM

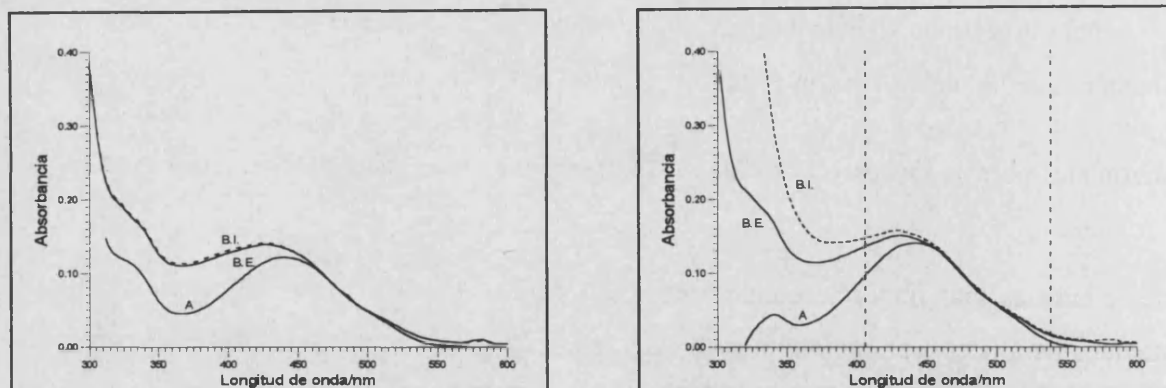


Figura 84: A) Espectros del blanco externo, B.E. (—), blanco interno, B.I. (- - -) y una disolución de analito, A, para la primera réplica de orina estudiada.
 B) Espectros del blanco externo, B.E. (—), blanco interno, B.I. (- - -) y una disolución de analito, A, para la segunda réplica de orina estudiada. Se ha remarcado el intervalo donde los blancos internos y externos coinciden en más del 90%.

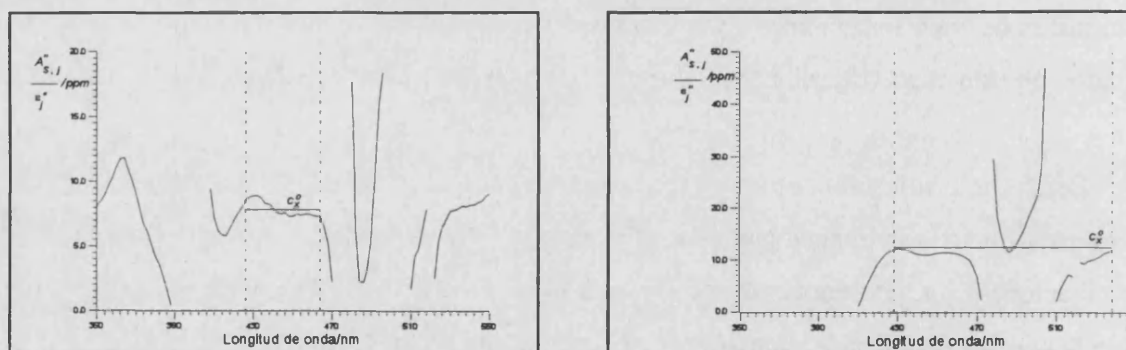


Figura 85: A) Gráfica obtenida para $A''_{s,j} / \epsilon''_j$ frente a λ_j para la primera réplica. Se ha remarcado el intervalo constante para C^0 .
 B) Gráfica obtenida para $A''_{s,j} / \epsilon''_j$ frente a λ_j para la segunda réplica. Se ha remarcado el intervalo constante para C^0 .

resultados obtenidos se muestran en la tabla LXI, donde puede observarse que para la primera réplica, sin problemas de blanco, el resultado obtenido tiene un 1% de error relativo, y que para la segunda réplica, con problemas de reproducibilidad del blanco, el error relativo es aproximadamente del 10%. Estos errores son habituales en procedimientos analíticos complejos que presentan un error sistemático constante introducido por la matriz de la orina [Molins,93]. Para corregir dicho error en [Molins,93] se ha propuesto utilizar el método de Youden [Youden,47], que requiere la construcción de una recta de calibrado con diferentes cantidades de muestra añadida, o la utilización de un placebo (una muestra de orina sin

4.2.2.3.- CONCLUSIONES

analito). Sin embargo, cuando se aplica el GHPSAM, sólo son necesarias las disoluciones utilizadas para aplicar el método.

Réplica	Conc. añadida	Conc. encontrada	% R.S.D.	% Error Relativo	$(dA/d\lambda)_{X(Max),X+Y}$	$(\Delta A_H/\Delta\lambda)$	% R.S.D.
1	7.65	7.73±0.19	2.48	1.05	-7.18×10^{-4}	$(-7.04 \pm 0.09) \times 10^{-4}$	1.34
2	7.17	6.38±0.36	5.67	-11.02	-7.44×10^{-4}	$(-7.32 \pm 0.25) \times 10^{-4}$	3.35

Tabla LXI: Resultados obtenidos para la determinación de amfetamina en las dos muestras de orina ensayadas (todas las concentraciones en ppm).

4.2.2.3.- CONCLUSIONES.

Se ha demostrado que las gráficas de $\frac{A_{s,j}}{\epsilon_j}$ frente a λ_j permiten localizar intervalos

donde el comportamiento espectral del interferente puede ser descrito de manera lineal.

Cuando se conoce los intervalos donde el interferente presenta dicho comportamiento, se han desarrollado las bases del GHPSAM para poder obtener la concentración de analito libre de error.

Del estudio de las distintas muestras sintéticas se deriva que los mejores resultados se obtienen cuando la señal del analito es mayor que la del interferente. Cuando la señal del analito es igual o inferior que la del interferente, el tanto por ciento de error relativo obtenido aumenta.

Además, cuando el comportamiento espectral del interferente puede ser considerado como un espectro ancho en un intervalo de longitudes de onda amplio, los resultados mejoran. Esto tiene gran aplicabilidad para determinadas muestras (orina, suero, ...), donde el comportamiento espectral de la matriz puede ser descrito de esa forma. De esta manera

4.2.2.- GHPSAM

se ha demostrado la aplicabilidad del método para determinar anfetamina en muestras de orina.

El método falla sólo en dos casos: cuando la señal debida al interferente no puede ser descrita de manera lineal en ningún intervalo, o cuando el comportamiento espectral del analito es lineal en la misma zona que el interferente. El GHPSAM es capaz de corregir el error introducido por un interferente desconocido en todos los demás casos.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

5.- CONCLUSIONES GENERALES

De todo este estudio se concluye que desde el punto de vista práctico es igual de poderoso en la determinación del analito el método de adición estándar del punto H que utiliza como señal analítica la absorbancia que el que utiliza incrementos de absorbancia. Este método puede utilizarse siempre que no sea necesario la determinación del interferente, ganando en sencillez. También, y de una forma clara, queda totalmente establecido que el incremento de absorbancia obtenido de acuerdo con las bases del método está única y exclusivamente relacionado con la concentración de analito, principio básico en el que se apoya el método propuesto.

Destacar además que ambas posibilidades del método resuelven con éxito situaciones difíciles desde el punto de vista analítico, y proporcionan resultados satisfactorios en un amplio margen de situaciones espectrofotométricas, siendo superior a la espectroscopía derivativa, y consiguiéndolo de una forma sencilla y rápida. También queda reflejado como el método es capaz de transformar los errores incorregibles debidos a la presencia de un interferente directo, en errores corregibles de tipo constante, de lo que se deriva que la concentración analítica se calcula exenta de cualquier tipo de error sistemático, debido a las propiedades intrínsecas del método de adición estándar para eliminar además los errores de tipo proporcional.

Se ha demostrado asimismo que las bases del HPSAM son extensibles a determinaciones espectrofluorimétricas, permitiendo la resolución de mezclas binarias. Estas ventajas se han demostrado particularmente útiles en la determinación de fenol y *o*-cresol, donde el método proporciona buenos resultados, sin la pérdida de sensibilidad que la metodología usual propone (cambio de la longitud de onda de excitación a valores menores), ni la necesidad de técnicas de separación.

Se ha demostrado que el HPSAM permite cuantificar los dos analitos de una mezcla binaria efectuando la adición estándar simultánea de ambas especies. Los pares de longitudes de onda con los que trabajar se seleccionan fácilmente, y pueden ser optimizados para

5.- CONCLUSIONES GENERALES

obtener los resultados más precisos. Las muestras ensayadas como ejemplos, mezclas binarias de fenol y *o*-cresol, con espectros fuertemente solapados, demuestran que se obtienen resultados exactos y precisos, incluso en los casos más desfavorables en donde la señal analítica de una de las especies es mucho menor que la de la otra. En estos casos, una adecuada elección de la concentración del patrón puede mejorar la precisión de los resultados obtenidos. Los resultados del HPSAM son mejores que los que se obtienen aplicando calibración multivariada.

Las bases del HPSAM se ha ampliado para la resolución de picos cromatográficos solapados en cromatografía líquida. Como señales analíticas se utilizan las alturas de áreas obtenidas a dos longitudes de onda previamente seleccionadas donde la especie considerada como interferente presente la misma absorbancia o intensidad de fluorescencia. Los resultados obtenidos son buenos para picos altamente coeluidos y con espectros de absorción o emisión fuertemente solapados. Las principales ventajas del método son la sencillez para encontrar las longitudes de onda requeridas, su insensibilidad a cambios en el tiempo de retención del pico de una inyección a otra, y la posibilidad de utilizarlo en picos total o parcialmente coeluidos. Para la utilización con un detector fluorescente convencional, es necesario realizar dos inyecciones consecutivas de la misma muestra. Si los picos coeluyen sólo parcialmente, es preferible utilizar áreas para cuantificar correctamente ambas especies.

La aplicación del HPSAM utilizando incrementos de señales analíticas en las determinaciones que utilizan blancos absorbentes permite evaluar y eliminar el error sistemático que el exceso de reactivo introduce en dichas determinaciones si se utiliza la tradicional metodología de medida frente a blanco añadido en su concentración inicial. Para el desarrollo de las bases teóricas del método se han definido dos nuevos conceptos: *blanco interno*, correspondiente al hallado por extrapolación de rectas de calibrado del analito en presencia del reactivo, y *blanco externo*, a partir de disoluciones de reactivo. La comparación del valor de ambos permite evidenciar y caracterizar el error, si existe, que la presencia del blanco reactivo introduce en el análisis. Como aplicación práctica se han estudiado cinco determinaciones distintas, representativas cada una de ella de una situación experimental distinta, y utilizando tanto espectrofotometría como espectrofluorimetría.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

A partir de los resultados obtenidos en diferentes muestras ternarias, se puede afirmar que el Método de Adición Estándar del Punto H permite calcular la concentración de analito libre de error en mezclas ternarias a partir de la abcisa del punto H. Las principales ventajas del método son: 1.- Se utilizan valores de absorbancia, y no valores de primera derivada. Por tanto, el cociente señal/ruido no disminuye. Además se tiene en cuenta la existencia de posible efecto matriz, corrigiéndolo por las propiedades del método de adición estándar. 2.- Es muy sencillo encontrar los pares de longitudes de onda donde debe medirse, a partir, solamente, de los espectros de los interferentes. 3.- Sólo se necesitan cinco puntos (diez pares de longitudes de onda) para obtener resultados comparables a los obtenidos por regresión lineal múltiple, y un sólo punto (dos longitudes de onda) para estimar adecuadamente la concentración de X. 4.- El método obtiene buenos resultados, incluso en aquellos casos en los que analito e interferente solapan completamente, como ha quedado demostrado.

Los resultados demuestran que el HPSAM utilizando absorbancia o incremento de absorbancia como señales analíticas es una poderosa herramienta para obtener valores de concentración exentos de error sistemático constante cuando existe en la muestra una absorbancia irrelevante desconocida. Las principales ventajas del HPSAM frente a los métodos propuestos en la bibliografía para este fin son: 1.- no es necesario comparar el espectro de la muestra con el del analito puro. Además no es necesario registrarlo, pues se puede obtener de las disoluciones preparadas para aplicar el método, a partir de las pendientes de la representación $A = f(C_{añadida})$; 2.- el método utiliza valores de absorbancia o de incremento de absorbancia, por lo que el cociente señal/ruido (SNR) no disminuye como en el caso de utilizar valores de derivada; 3.- aunque es necesario que la absorbancia irrelevante desconocida muestre un comportamiento espectral lineal a las tres longitudes de onda seleccionadas, no es necesario que la pendiente de dicha recta sea nula (a diferencia de los otros métodos propuestos que requieren dicha condición); 4.- los resultados obtenidos para las muestras hacen posible distinguir entre interferentes lineales y no lineales.

Asimismo el método propuesto permite su adaptación al método de calibración de un único patrón, para su aplicación al análisis de rutina.

Por otra parte, a partir de los datos obtenidos, podemos afirmar que aplicando el HPSAM es posible calcular la concentración de analito en una muestra donde el interferente

5.- CONCLUSIONES GENERALES

es totalmente desconocido, libre de error, a partir de la abcisa del punto H, incluso en el caso de que la absorbancia desconocida no sea de tipo irrelevante.

Para la correcta aplicación del método, es necesario seleccionar intervalos del espectro donde el comportamiento espectral del interferente sea lineal. Se proponen dos metodologías para seleccionar dichos intervalos.

La ordenada del punto H permite calcular la intensidad de la interferencia. Si la mezcla es binaria (y el interferente conocido), a partir de dicho valor se puede calcular su concentración.

Se ha demostrado que las gráficas de $\frac{A_{S,j}''}{\epsilon_j}$ frente a λ_j permiten localizar intervalos

donde el comportamiento espectral del interferente puede ser descrito de manera lineal.

Cuando se conoce los intervalos donde el interferente presenta dicho comportamiento, se han desarrollado las bases del GHPSAM para poder obtener la concentración de analito libre de error.

Del estudio de las distintas muestras sintéticas se deriva que los mejores resultados se obtienen cuando la señal del analito es mayor que la del interferente. Cuando la señal del analito es igual o inferior que la del interferente, el tanto por ciento de error relativo obtenido aumenta.

Además, cuando el comportamiento espectral del interferente puede ser considerado como un espectro ancho en un intervalo de longitudes de onda amplio, los resultados mejoran. Esto tiene gran aplicabilidad para determinadas muestras (orina, suero, ...), donde el comportamiento espectral de la matriz puede ser descrito de esa forma. De esta manera se ha demostrado la aplicabilidad del método para determinar anfetamina en muestras de orina.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

El método falla sólo en dos casos: cuando la señal debida al interferente no puede ser descrita de manera lineal en ningún intervalo, o cuando el comportamiento espectral del analito es lineal en la misma zona que el interferente. El GHPSAM es capaz de corregir el error introducido por un interferente desconocido en todos los demás casos.

5.- CONCLUSIONES GENERALES

6.- BIBLIOGRAFÍA

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [Agwu,67] I. Agwu y A.L. Glenn, *J. Pharm. Pharmacol.* 19 (1967) supl. 76S
- [APHA,85] "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater", 16^a ed., American Public Health Association, Washington, D.C., 1985.
- [Bader,80] M. Bader, *J. Chem. Ed.* 57 (1980) 703
- [Baird,77] R.B. Baird, L.G. Carmona y R.L. Jenkins, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 17 (1977), 764.
- [Banes,46] F.W. Banes y L.T. Eby, *Anal. Chem.* 18 (1946) 535
- [Barker,89] T. Barker y S.D. Brown, *J. Chromatogr.* 469 (1989) 77
- [Bautista,93] R.D. Bautista, F. Jiménez, A.I. Jiménez y J.J. Arias, *Talanta* 40 (1992) 1687
- [Beebe,88] K.R. Beebe y B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 60 (1988) 2273
- [Bellaterra,90] "Adquisición y tratamiento de la señal analítica", Sociedad Española de Química Analítica; Bellaterra, 13-15 junio 1993.
- [Berg,75] R.G. Berg, C.Y. Ko, J.M. Clemons y H.M. McNair, *Anal. Chem.* 47 (1975) 2480
- [Bershtein,88] J.Y. Bershtein, *Fresenius J. Anal. Chem.* 332 (1988) 227
- [Berzas,92] J.J. Berzas Nevado, J.M. Lemus Gallego y G. Castañeda Peñalvo, *Fresenius J. Anal. Chem.* 342 (1992) 723
- [Berzas,92B] J.J. Berzas Nevado, C. Guiberteau Cabanillas y F. Salinas, *Talanta* 39 (1992) 547
- [Bialkowski,89] S.E. Bialkowski, *Anal. Chem.* 61 (1989) 1308
- [Blanco,87] M. Blanco, J. Gené, H. Iturriaga, S. MasPOCH y J. Riba, *Talanta* 34 (1987) 987
- [Blanco,87B] M. Blanco, J. Gené, H. Iturriaga y S. MasPOCH, *Analyst* 112 (1987) 619
- [Blanco,89] M. Blanco, H. Iturriaga, S. MasPOCH y P. Tarin, *J. Chem. Educ.* 66 (1989) 178
- [Blanco,90] M. Blanco, J. Coello, H. Iturriaga, S. MasPOCH y J. Riba, *Química Analítica* 9 (1990) 269
- [Blanco,92] M. Blanco, V. Cerdà, J. Coello, J. Gené, H. Iturriaga y S. MasPOCH, *Anal. Letters* 25 (1992) 543

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [Bosch,88] F. Bosch Reig y P. Campíns Falcó, *Analyst*, **113** (1988) 1011.
- [Bosch,90] F. Bosch Reig y P. Campíns Falcó, *Analyst*, **115** (1990) 111.
- [Bosch,91] F. Bosch Reig, P. Campíns Falcó, A. Sevillano Cabeza, R. Herráez Hernández y C. Molíns Legua, *Anal. Chem.* **257** (1992) 2424.
- [Bosch S,87] F. Bosch Serrat, G. Font y J. Mañes, *Analyst*, **112** (1987), 1335.
- [Bourguignon,93] B. Bourguignon, F. Marcenac, H.R. Keller, P.F. de Aguiar y D.L. Massart, *J. Chromatog.* **628** (1993) 171.
- [Brega,90] A. Brega, P. Prandini, C. Amaglio y E. Pafumi *J. Chromatogr.* **535** (1990) 311
- [Brown,86] S.D. Brown, *Anal. Chim. Acta* **181** (1986) 1
- [Buckman,84] N.G. Buckman, J.O. Hill, R.J. Magee y M.J. McCormick, *J. Chromatog.* **284** (1984) 441.
- [Burgos,93] Curso Comett II-Eurochemometrics; Quimiometría: construcción y evaluación de modelos de regresión; Burgos, 2-4 de noviembre de 1993.
- [Butler,92] E.C.V. Butler y G. Dal Pont, *J. Chromatogr.*, **609** (1992), 113.
- [Campíns,88] P. Campíns Falcó, "Calibración en Química Analítica", Cuadernos de Ciencias y Técnicas Ambientales, vol. 1, 37-82 (1988), Bellaterra (Barcelona)
- [Campíns,90] P. Campíns Falcó, F. Bosch Reig y A. Molina Benet, *Fresenius J. Anal. Chem.* **338** (1990) 16.
- [Campíns,92] P. Campíns Falcó, F. Bosch Reig, R. Herráez Hernández y A. Sevillano Cabeza, *Anal. Chim. Acta*, **257** (1992) 89.
- [Campíns,92B] P.Campíns Falcó, F. Bosch Reig, R. Herráez Hernández y A. Sevillano Cabeza, *Anal. Chim. Acta* **268** (1992) 73.
- [Cardone,83A] M.J. Cardone, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66** (1983) 1257
- [Cardone,83B] M.J. Cardone, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **66** (1983) 1283
- [Cardone,85] M.J. Cardone y J.G. Lehman, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **68** (1985) 199
- [Cardone,86A] M.J. Cardone, *Anal. Chem.* **58** (1986) 433
- [Cardone,86B] M.J. Cardone, *Anal. Chem.* **58** (1986) 438
- [Cardone,87] M.J. Cardone, *Anal. Chem.* **59** (1987) 2818
- [Carter,82] G.T. Carter, R.E. Schiesswohl, H. Burke y R.J. Yang, *Pharm. Sci.* **71** (1982) 317
- [Cecil,91] T.L. Cecil, R.B. Poe y S.C. Rutan, *Anal. Chim. Acta* **250** (1991) 37
- [Cela,83] R. Cela y J.A. Pérez Bustamante, *Comput. Appl. Lab.* **1** (1983) 137

- [Cerdà,88] J. Cerdà y V. Cerdà, "Optimización mediante el método del SIMPLEX" Cuadernos de Ciencias y Técnicas Ambientales, vol. 1, 1988, Bellaterra (Barcelona)
- [Commissariat,78] Commissariat a l'Energie Atomique, *Statistique Appliquée a l'Exploitation des Mesures*, Masson, Paris, 1978
- [Cook,65] R. Cook y O.W. Graham, *Air Water Pollut.* **9** (1965) 97
- [Cremlyn,78] R. Cremlyn, *Pesticides: Preparation and Mode of Action*, Wiley, Chichester, 1978.
- [Czuczwa,87] J. Czuczwa, C. Leuenberger, J. Tremp, W. Giger y M. Ahel, *J. Chromatogr.*, **403** (1987), 233.
- [D'Allura,82] N.J. D'Allura y R.J. Juvet Jr., *J. Chromatogr.* 239 (1982) 439
- [Deinzer,78] M. Deinzer, R. Schaumburg y E. Klein, *Environ. Health Perspect.* **24** (1978), 209.
- [Dietz,78] F. Dietz y J. Traud, *Gas-Wasserfach, Wasser-Abwasser*, **119** (1978), 318.
- [Draper,81] N.R. Draper y H. Smith, *Applied Regression Analysis*, Wiley, Nueva York, 1981
- [Dupuy,94] N. Dupuy, L. Anponchel, B. Amram, J.P. Huvenne y P. Legrand, *J. Chemom.* **8** (1994) 333
- [Ebel,88] S. Ebel y W. Mueck, *Chromatographia* **25** (1988) 1039
- [Eisenhart,63] C. Eisenhart, *J. Res. NBS* **67C** (1963) 161
- [Emerson,43] E. Emerson, H.H. Beacham y L.C. Beegle, *J. Org. Chem.*, **8** (1943), 417.
- [Env.,89] Environmental Guidelines for New Bleached Eucalipt Kraft Pulp Mills, Commonwealth of Australia, Canberra, 1989.
- [Fandry,89] C.B. Fandry, R.E. Johanes y P.J. Nelson, *Pulp Mills: Modern Technology and Environmental Protection*, Report to Senator the Hon. John Button, Minister for Industry, Technology and Commerce, CSIRO, Canberra, 1989.
- [Farino,81] J. Farino, G. Norwitz, W. J. Boyko y P. N. Keliher, *Talanta*, **28** (1981), 705.
- [Fell,82] A.F. Fell, H.P. Scott, R. Hill y A.C. Moffat, *Chromatographia* **16** (1982) 69
- [Fell,83] A.F. Fell, H.P. Scott, R. Hill y A.C. Moffat, *J. Chromatogr.* **273** (1983) 3
- [Fell,83B] A.F. Fell, H.P. Scott, R. Hill y A.C. Moffat, *J. Chromatogr.* **282** (1983) 123
- [Ferrús,87] R. Ferrús, *Anal. Chem.* **59** (1987) 2816
- [Ferrús,88] R. Ferrús y F. Torrades, *Anal. Chem.* **60** (1988) 1281

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [Foster,35] J.S. Foster, G.O. Langstroth y D.R. McRae, *Proc. R. Soc. London Serie A* 153 (1935) 141
- [Foster,37] J.S. Foster y C.A. Hortan, *Proc. R. Soc. London Serie B* 123 (1937) 422
- [Fresenius,88] W. Fresenius, R.E. Quentin y W. Schneider (Editores), *"Water Analysis - a Practical Guide to Physico-Chemical, Chemical and Microbiological Water Examination and Quality Assurance"*, Springer, Berlin, 1988.
- [Gauglitz,92] G. Gauglitz, M. Mettler y S. Weiss, *Trends in Anal. Chem.* 11 (1992) 203
- [Gorry,90] P.A. Gorry, *Anal. Chem.* 62 (1990) 570
- [Grant,85] A. Grant y P.K. Bhattacharryya, *J. Chromatogr.* 347 (1985) 219
- [Griepink,90] B. Griepink, *Fresenius J. Anal. Chem.* 337 (1990) 812
- [Grob,83] R.L. Grob (Editor), *"Chromatographic Analysis of the Environment"*, Marcel Dekker, New York, 2ª ed., 1983.
- [Haaland,88] D.M. Haland y E.V. Thomas. *Anal. Chem.* 60 (1988) 1193
- [Hayashi,87] Y. Hayashi, T. Shibazaki, R. Matsuda y M.J. Uchiyama, *J. Chromatogr.* 407 (1987) 59
- [Hayashi,87B] Y. Hayashi, T. Shibazaki, y M.J. Uchiyama, *Anal. Chim. Acta* 201 (1987) 185
- [Hayashi,93] Y. Hayashi y S.C. Rutan, *Anal. Chim. Acta* 271 (1993) 91
- [Henry,57] R.J. Henry, C. Sobel y S. Berckman, *Anal. Chem.* 29 (1957) 1491.
- [HP,90] Trace-level diode-array detection in HPLC; Product note; Publication number 12-5952-1743; Hewlett-Packard, Alemania 1990.
- [IARC,86] IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Humans, 41 (1986), 319.
- [Janda,89] V. Janda y H. van Langenhove, *J. Chromatogr.*, 472 (1989), 327.
- [Jochum,81] C. Jochum, P. Jochum y B.R. Kowalsky, *Anal. Chem.* 53 (1981) 85
- [Jones,51] J.H. Jones, G.R. Clark y L.S. Harrow, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 34 (1951) 135
- [Jong,93] S. de Jong, *J. Chemom.* 7 (1993) 551
- [Kalivas,83] J.H. Kalivas, *Anal. Chem.* 55 (1983) 565
- [Kalman,60] R.E. Kalman, *J. Basic. Eng.* 82 (1960) 34
- [Kenyon,55] O.A. Kenyon y G. Oplinger, *Anal. Chem.* 27 (1955) 1125.
- [Kowalski,87] B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 59 (1987) 1007A
- [Kroll,85] M.H. Kroll y R.J. Elin, *Clin. Chem.* 31 (1985) 462.
- [Lacey,86] R.F. Lacey, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1404

- [Lanin,89] S.N. Lanin y Yu.S. Nikitin, *Talanta*, **36** (1989), 573.
- [Lavagnini,90] I. Lavagnini, P. Pastore y F. Magno, *Anal. Chim. Acta* **239** (1990) 95
- [Lee,88] H.K. Lee, S.F.Y. Li e Y.H. Tay, *J. Chromatog.* **438** (1988) 429.
- [Leviain,86] P. Leviain y D. Fompeyde, *Analisis* **14** (1986) 1
- [Llobat,92] M. Llobat Estellés, R. Marín Sáez y M.D. San Martín Ciges, *Fresenius J. Anal. Chem.* **342** (1992) 538
- [Llobat,93] M. Llobat Estellés, C. Álvarez Alonso y A.R. Maurí Aucejo, *Analisis* **21** (1993) 35
- [Madden,78] H.H. Madden, *Anal. Chem.* **50** (1978) 1383
- [Makuch,93] B. Makuch, K. Gazda y M. Kamiński, *Anal. Chim. Acta* **284** (1993) 53
- [Mandel,57] F.J. Mandel y L. Lining, *Anal. Chem.* **29** (1957) 921
- [Marbach,92] R. Marbach y H.M. Heise, *Trends in Anal. Chem.* **11** (1992) 270
- [Martens,84] H. Martens y T. Næs, *Trends in Anal. Chem.* **3** (1984) 204
- [Martens,85] H. Martens, *Multivariate calibration: Quantitative interpretation of non-selective chemical data* Dr. Techn. Thesis; The Norwegian Institute of Technology (NTH); University of Trondheim; Noruega, 1985
- [Maurí,93] A.R. Maurí Aucejo, M. Llobat Estellés, R. Marín Sáez, M.D. San Martín Ciges y C. Álvarez Alonso, *Fresenius J. Anal. Chem.* **346** (1993) 888
- [Milano,78] M.J. Milano, *J. Chromatogr.* **149** (1978) 599
- [Miller,93] J.C. Miller y J.N. Miller, *Estadística para Química Analítica*, 2ª ed., Addison-Wesley Iberoamericana, Wilmington (USA), 1993
- [Mulder,63] F.J. Mulder, F.J. Spruit y K.J. Keuning, *Pharm. Weekbl.* **98** (1963) 745
- [Murillo,94] J.A. Murillo y A. Alañón, *Anal. Chim. Acta* **296** (1994) 87
- [Næs,84] T. Næs y H. Martens, *Trends in Anal. Chem.* **3** (1984) 266
- [Nojima,75] K. Nojima, K. Fuyaka, S. Fukui y S. Kanno, *Chemosphere*, **4** (1975), 77.
- [Nojima,76] K. Nojima, K. Fuyaka, S. Fukui, S. Kanno, S. Nishiyama y V. Wada, *Chemosphere*, **5** (1976), 25.
- [NRC,87] NRC (National Research Council), *"Drinking Water and Health: Disinfection and Disinfectant by Products"*, Vol. 7, National Academy Press, Washington, D.C., 1987.
- [O'Haver,76] T.C. O'Haver y G.L. Green, *Anal. Chem.* **48** (1976) 312
- [O'Haver,79] T.C. O'Haver, *Clin. Chem.* **25** (1979) 1548
- [O'Haver,79B] T.C. O'Haver, *Anal. Chem.* **51** (1979) 91A

6.- BIBLIOGRAFÍA

- [Osten,84] D.W. Osten y B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 56 (1984) 991
- [Pascual,92] M.C. Pascual Martí, M. Llobat Estellés y M.I Roig Marco, *Fresenius J. Anal. Chem.* 343 (1992) 259
- [Pérez,93] L.V. Pérez Arribas, F. Navarro Villoslada, M.E. León González y L.M. Polo Díez, *J. Chemom.* 7 (1993) 267
- [Poe,93] R.B. Poe y S.C. Rutan, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 845
- [Quencer,93] B.M. Quencer y S.R. Crouch, *Analyst* 118 (1993) 695
- [Ratzlaff,79] K.L. Ratzlaff, *Anal. Chem.* 51 (1979) 232
- [Realini,81] P.A. Realini, *J. Chromatogr. Sci.* 19 (1981), 124.
- [Rennie,82] P.J. Rennie, *Analyst*, 107 (1982), 327.
- [Risner,93] C.H. Risner, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 4117.
- [Rossi,85] D.T. Rossi y H.L. Pardue, *Anal. Chim. Acta* 175 (1985) 153
- [Rutan,88] S.C. Rutan y P.W. Carr, *Anal. Chim. Acta* 215 (1988) 131
- [Rutan,91] S.C. Rutan, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1103A
- [Sala,88] G. Sala, S. Maspoch, H. Iturriaga, M. Blanco y V. Cerdà, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 6 (1988) 765
- [Salinas,90] F. Salinas, J.J. Berzas Nevado y A. Espinosa Mansilla, *Talanta* 37 (1990) 347
- [Sánchez,86] E. Sánchez y B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496
- [Sánchez,87] F. Sánchez Rojas, C. Bosch Ojeda y J.M. Cano Pavón, *Talanta* 35 (1988) 753
- [Sánchez,87B] E. Sánchez, L.S. Ramos y B.R. Kowalski, *J. Chromatogr.* 385 (1987) 151
- [Sandell,59] E.B. Sandell, "Colorimetric Determination of Traces of Metals", Interscience Publishers Inc., Nueva York, 1959.
- [Savitsky,64] A. Savitsky y M.J.E. Golay, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627
- [Saxberg,79] B.E.H. Saxberg y B.R. Kowalsky, *Anal. Chem.* 51 (1979) 1031
- [Sharaf,86] M.A. Sharaf, D.L. Illman y B.R. Kowalski, "Chemometrics", Wiley-Interscience, Nueva York, 1986
- [Sharaf,86B] M.A. Sharaf, *Anal. Chem.* 58 (1986) 3084
- [Stearns,50] E.I. Stearns, en M.G. Mellon, editor: "Analytical Absorption Spectroscopy", Wiley, Nueva York, 1950
- [Steinier,72] J. Steinier, Y. Termonia y J. Deltour, *Anal. Chem.* 44 (1972) 1906
- [Stone,90] M. Stone y R.J. Brooks, *Journal of the Royal Statistical Society, Ser. B.* 52 (1990) 237

- [Svehla,86] G. Svehla (ed), "Comprehensive Analytical Chemistry, v. XIX", Elsevier, Amsterdam, 1986.
- [Tesarova,83] E. Tesařová y V. Pacáková, *Chromatographia*, **17** (1983), 269.
- [Ugland,81] K. Ugland, E. Lundanes, T. Greibrokk y A. Bjørseth, *J. Chromatogr.* **213** (1981) 83.
- [USEPA,77] "Sampling and Analysis Procedures for Screening of Industrial Effluents for Priority Pollutants", U.S.E.P.A., Environment Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH, 1977.
- [Valcárcel,92] "La calidad en los laboratorios analíticos"; M. Valcárcel y A. Ríos, coordinadores. Ed. Reverté, S.A., 1992, Barcelona
- [Voss,81] R.H. Voss, J.T. Wearing y A. Wong en L.H. Keith (Editor), Advances in the Identification and Analysis of Chlorinated Phenolics in Pulp Mill Effluents, Ann Arbor Sc. Publ., Ann Arbor, MI, 1981.
- [Wahbi,76] A.M. Wahbi y B. Unterhalt, *Fresenius Z. Anal. Chem.* **282** (1976) 31
- [Wahbi,86] A.M. Wahbi, M.A. Abounassif y H.M.G. Al-Kathani, *Analyst* **111** (1986) 777
- [Wahbi,89] A.M. Wahbi, H. Mahgoub y M. Barary, *Analyst* **114** (1989) 505
- [Werner,77] I.M. Werner, E.R. Davidson y G.D. Christian, *Anal. Chem.* **49** (1977) 2155
- [White,62] R.G. White, en H. Szymansky, editor: "Progress in Infrared Spectroscopy", Plenum Press, Nueva York, 1962
- [Wilk,89] H.R. Wilk y S.D. Brown, *Anal. Chim. Acta* **225** (1989) 37
- [Wilson,70] A. L. Wilson, *Talanta* **17** (1970) 21
- [Wilson,74] A.L. Wilson, *Talanta* **21** (1974) 1109
- [Wold,66] H. Wold en "Research Papers in Statistics", Ed. F. Davis, Wiley, Nueva York, 1966.
- [Wold,87] S. Wold, K. Esbensen y P. Geladi, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **2** (1987) 3
- [Wright,41] N. Wright, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **13** (1941) 1
- [Youden,47] W.J. Youden, *Anal. Chem.* **19** (1947) 946
- [Zhang,93] J.Y. Zhang, J.F. Yang, Y. Ren e Y. Zhang, *Anal. Chim. Acta* **279** (1993) 281
- [Zhou,83] F. Zhou, *Fenxi Huaxue* **11** (1983) 398.

6.- BIBLIOGRAFÍA

UNIVERSIDAD DE VALENCIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

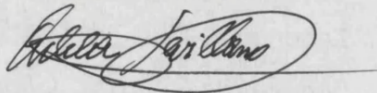
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la fecha,
acordó otorgar, por unanimidad, a esta Tesis doctoral de

D. JOSÉ VERDU ANDRÉS

la calificación de APTO CUM LAUDE (Unanimidad)

Valencia, a 6 de julio de 1995

El Secretario,



El Presidente

