



Desarrollo analítico de derivados del fenol en agua utilizando cromatografía de líquidos

Analytical development of phenol derivatives in water using liquid chromatography

Alfonso Lemus-Solorio¹, María Elena Núñez-Gaytán¹, Ana María Núñez-Gaytán¹, Martha Angélica Lemus-Solorio², Sandra Núñez-Hernández¹

¹Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

²Facultad de Ciencias Físico-Matemáticas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Ciudad Universitaria; Avenida Francisco J. Múgica S/N Ciudad Universitaria, Edificio "E", Planta Baja. Laboratorio de Investigación a Microescala. Morelia, Michoacán; México 1414433d@umich.mx, 1209689x@umich.mx, amnunez@umich.mx, amnunez@umich.mx, 9806299d@umich.mx.

Autor de correspondencia: Alfonso Lemus Solorio, Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. E-mail: 1209689x@umich.mx. ORCID: 0000-0003-2736-5600.

Recibido: 16 de Abril del 2021

Aceptado: 10 de Mayo del 2021

Publicado: 28 de Mayo del 2021

Resumen. - Se ha desarrollado un método analítico por cromatografía de líquidos de alta eficiencia para la determinación de cloro y nitrofenoles al nivel de trazas ($\mu\text{g/L}$) en agua, empleando un gradiente de elución de fase reversa y un detector ultravioleta (UV). Se empleó un método de Extracción en Fase Sólida (EFS), que implicó el diseño de un sistema bidimensional de pre-columnas acoplado con la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) con el fin de efectuar la preconcentración, purificación y aislamiento de los solutos en matrices acuosas ambientales. Estos compuestos fenólicos son considerados contaminantes prioritarios por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA); los compuestos son: 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-dimetilfenol, 4-cloro-3-metilfenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y pentaclorofenol. El método desarrollado es simple, rápido, exacto y preciso. Se obtuvieron recuperaciones mayores del 90 % para los fenoles 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol, aproximadamente 80 % para el pentaclorofenol y 52 % para el 2,4-dimetilfenol. Además, se obtuvo una precisión ($CV < 5\%$) aceptable para todos los solutos a estos niveles de concentración.

Palabras clave: Compuestos fenólicos; Gradiente de elución; Sistema de pre-columnas; Cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Abstract. - A high-performance liquid chromatographic analytical method has been developed for the determination of chlorine and nitrophenols at trace level ($\mu\text{g/L}$) in water, using a reversed-phase elution gradient and an ultraviolet (UV) detector. A Solid Phase Extraction (SPE) method was employed, which involved the design of a two-dimensional pre-column system coupled with high-performance liquid chromatography (HPLC) in order to preconcentrate, purify and isolate the solutes in environmental aqueous matrices. These phenolic compounds are considered priority pollutants by the United States Environmental Protection Agency (USEPA); the compounds are: 4,6-dinitro-2-methylphenol, 2,4-dimethylphenol, 4-chloro-3-methylphenol, 2,4-dichlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol and pentachlorophenol. The developed method is simple, fast, accurate and precise. Recoveries greater than 90 % were obtained for the phenols 4,6-dinitro-2-methylphenol, 2,4-dichlorophenol and 2,4,6-trichlorophenol, approximately 80 % for pentachlorophenol and 52 % for 2,4-dimethylphenol. In addition, an acceptable precision ($CV < 5\%$) was obtained for all solutes at these concentration levels.

Keywords: Phenolic compounds; Elution gradient; Pre-column system; High performance liquid chromatography.



1. Introducción

Los derivados fenólicos cloro, nitro y alquilo son ampliamente utilizados en diversos procesos químicos como intermediarios en la fabricación de plásticos, colorantes, pesticidas y medicamentos. Así, la presencia de estos compuestos en numerosos efluentes industriales ha dado origen a la contaminación de aguas superficiales y potables. Por su alta toxicidad para los organismos vivos y para el hombre, varios compuestos fenólicos han sido clasificados como contaminantes prioritarios y deben ser monitoreados continuamente, en ocasiones a muy bajos niveles de concentración, en matrices acuosas (USEPA, 1980). Este problema ha derivado en la necesidad de realizar un estricto control de los productos potencialmente peligrosos en el agua al desarrollar métodos sensibles y eficientes que permitan monitorear contaminantes traza en agua.

Como antecedente importante de este trabajo se encuentran los estudios realizados por Soper y Smith, quienes ya desde 1926 habían publicado constantes de velocidad de cloración de diferentes compuestos, incluyendo el fenol y algunos clorofenoles [1]. En las últimas décadas (2006-2008) et al. [2-3], realizaron experimentos de cloración del fenol en el intervalo de pH 6-9 y presentaron los perfiles de concentración en función del tiempo del compuesto progenitor y los 5 clorofenoles formados a partir de éste. Los compuestos de interés fueron seguidos durante un periodo de 5 horas, utilizando cromatografía de líquidos con detección UV para su separación y cuantificación. Sin embargo, las altas concentraciones de fenol (~100 µM) y cloro (~400 µM) utilizadas en este estudio, restan interés a los resultados obtenidos.

Las técnicas analíticas más utilizadas en la determinación cuantitativa de fenoles son los métodos cromatográficos. La cromatografía de gases es una técnica analítica poderosa de alta resolución en la determinación de clorofenoles y

los detectores empleados como el de ionización de flama, el de captura de electrones y la espectrometría de masas son altamente sensibles. Sin embargo, debido a la alta polaridad del fenol y algunos clorofenoles, estos tienden a dar picos anchos y coleados. Este inconveniente se evita realizando una etapa de derivatización para transformarlos en analitos menos polares mejorando así sus propiedades cromatográficas. Por su parte, la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE), es una técnica analítica eficiente, sensible, precisa, exacta y de gran capacidad en la separación de isómeros de posición, permite ajustar la selectividad de la separación mediante cambios en la composición de la fase móvil (pH, naturaleza y contenido de disolventes orgánicos).

2. Metodología

Para aplicar el método en muestras de aguas naturales se requiere realizar un paso previo de filtración empleando vacío y una membrana de nylon de 0.45 µm de porosidad, previamente sumergida en metanol para minimizar los riesgos de contaminación de la muestra.

2.1 Extracción y concentración de los analitos

Este es el pretratamiento de la muestra que se realiza mediante la Extracción en Fase Sólida. Este paso se efectúa en una pre-columna de acero inoxidable (30 x 4.6 mm D.I.) empacada con un adsorbente polimérico del tipo estireno-divinilbenceno de 10 µm de tamaño de partícula (pre-columna RP en la figura 1). Este adsorbente es de gran capacidad, pero baja selectividad.

La muestra es acidificada a pH 2 para que los solutos queden retenidos en su forma molecular por el adsorbente no polar. Una bomba isocrática (P2) permite pasar la muestra a través de la pre-columna, ésta última se encuentra montada en una válvula de conmutación (válvula A) como se muestra en la figura 1.

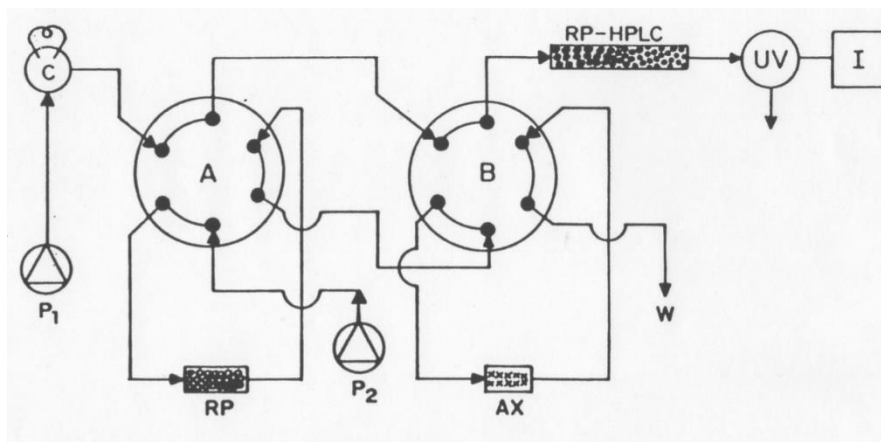


Figura 1. Sistema experimental en línea para efectuar la preconcentración, limpieza y análisis de fenoles. P₁: sistema HPLC para gradiente binario, P₂: bomba isocrática, A y B: válvulas de conmutación, C: inyector, W: deshechos, UV: detector ultravioleta, RP: pre-columna polimérica de extracción, AX: pre-columna aniónica de purificación, RP-HPLC: columna analítica C-18.

El volumen de muestra que se carga en la pre-columna es de 50 mL, con el cual ninguno de los analitos se fuga de la pre-columna.

2.2 Limpieza del extracto

Debido a la baja selectividad del adsorbente polimérico, es necesario efectuar un paso de limpieza del extracto, para ello se aprovechan las propiedades ácido-base de los fenoles y la característica de los adsorbentes poliméricos de retener muy poco a los compuestos ionizados. Los valores de los pK_a en agua de los seis fenoles: 4,6-dinitro-2-metilfenol (pK_a 4.35), 2,4-dimetilfenol (pK_a 10.58), 4-cloro-3-metilfenol (pK_a 9.55), 2,4-diclorofenol (pK_a 7.85), 2,4,6-triclorofenol (pK_a 6.42) y pentaclorofenol (pK_a 5.26).

La limpieza del extracto se efectúa transfiriendo los fenoles con una mezcla metanol-sosa, desde la pre-columna de fase reversa hacia una segunda pre-columna (20 x 2 mm D.I.), empacada con un

intercambiador de aniones de 10 µm y colocada en una segunda válvula de conmutación (pre-columna AX en válvula B de la figura 1). Las condiciones óptimas para la transferencia son con 25 mL de una mezcla metanol-sosa (pH 11) 40:60 v/v.

2.3 Separación y análisis de la mezcla de fenoles

La separación y determinación cromatográfica de los analitos se realiza acoplado en línea la pre-columna aniónica con la columna analítica (RP-HPLC) (150 x 4.6 mm D.I.) empacada con una fase reversa C-18, (Spherisorb Ods-2) de 5 µm de tamaño de partícula. Se utilizó un gradiente de disolventes acetonitrilo-agua (pH 4.5), con un buffer de acetatos. El flujo usado fue de 1 mL/min. La detección de los analitos se realizó con un detector UV. Se fijó la longitud de onda de detección a 270 nm que es un valor típico para la detección de fenoles (Puig, Barceló, 1996).

3. Resultados y Discusiones

El análisis de la muestra concentrada y purificada se realiza acoplado en línea la pre-columna aniónica con una columna analítica de alta

eficiencia. Para lograr una buena separación de la mezcla de los seis fenoles era necesario determinar la composición adecuada de la fase móvil tal que



permitiera efectuar la elución de los solutos, es decir la transferencia en línea de los analitos de la pre-columna aniónica hacia la columna analítica y su posterior separación cromatográfica. Al efectuar diversos ensayos se observó que con la corrida isocrática no se logra obtener una resolución aceptable de la mezcla de fenoles hidrofóbicos. Los primeros solutos (nitrofenoles y monoclorofenoles) eluyen rápidamente mientras que los fenoles multiclorados tienen tiempos de retención muy largos y dan lugar a picos excesivamente anchos y difíciles de integrar.

Además, como este método se desarrolló para aplicarlo en muestras de agua residuales y superficiales, se pretendió que los tiempos de retención de los primeros solutos eluidos fueran

relativamente grandes con el objeto de que todas las interferencias presentes en la matriz, no eliminadas durante los procesos de preconcentración y limpieza, y que generalmente eluyen a tiempos de retención muy cortos, pudieran interferir en el análisis y detección de los solutos de interés [6].

En efecto, cuando se trabaja con muestras de aguas naturales, es común observar al principio del cromatograma la elución de un gran pico de matriz que desciende muy lentamente y dificulta o hace imposible la cuantificación precisa de los analitos poco retenidos. Por esta razón, se ensayó la elución en gradiente, siendo la separación cromatográfica más adecuada la mostrada en la figura 2.

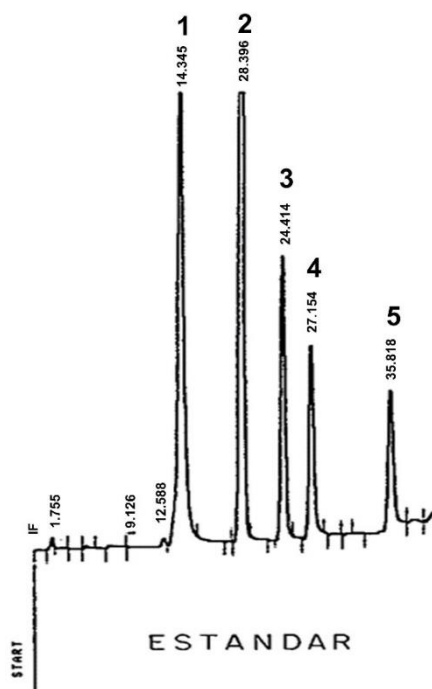


Figura 2. Separación de la mezcla de fenoles con gradiente de elución usando como fase móvil: Fase A: acetonitrilo-agua (pH 4.5) (15:85) v/v, y la fase B: acetonitrilo-agua (pH 4.5) (70:30). Buffer de ácido acético- acetato de sodio. El tiempo de separación es de aproximadamente 40 minutos. Flujo 1 mL/min, detector UV. Sensibilidad 0.05 AUFS. El orden de elución de los analitos es: 1) 4,6-dinitro-2-metilfenol, 2) 2,4-dimetilfenol, 3) 4-cloro-3-metilfenol, 4) 2,4-diclorofenol, 5) 2,4,6-triclorofenol y 6) pentaclorofenol.

El gradiente usado es el siguiente (tabla 1):

Tabla 1. Gradiente de concentración utilizado.

Tiempo (min)	0	35	50
% B	8	60	60

La evaluación estadística de este método desarrollado para la determinación de trazas de cloro y nitrofenoles en agua mediante el empleo de un sistema bidimensional de pre-columnas acopladas en línea con la cromatografía de



líquidos permitió determinar su precisión y exactitud, los cuáles se determinaron al analizar 8

réplicas de agua dopada con los fenoles a una concentración de 13.3 µg/L (Tabla 2).

Tabla 2. Precisión y exactitud del método

Compuesto	% de recobro	% Coeficiente de variación (CV)
4,6-dinitro-2-metilfenol	95.2	1.8
2,4-dimetilfenol	52.6	2.5
4-cloro-3-metilfenol	94.4	2.0
2,4-diclorofenol	94.6	1.1
2,4,6-triclorofenol	100.3	2.6
pentaclorofenol	82.2	2.8

Intervalo lineal del método. Este parámetro debe estudiarse adecuadamente cuando se analizan trazas de analitos. Representa el intervalo lineal de concentraciones en el cual se cumple la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Dentro de este intervalo lineal se puede determinar el compuesto de interés por interpolación [7]. El estudio de la linealidad de este método desarrollado se analizaron muestras de agua grado cromatográfico dopadas con cada uno de los seis fenoles empleando un intervalo de concentraciones de 1.33 a 100 µg/L. El método es lineal en el intervalo de concentraciones de ~ 1.3 a ~ 90 µg/L.

Se desarrolló un método simple y eficiente para la determinación de cloro, nitro y metilfenoles en agua. En esta metodología la manipulación de la muestra es mínima por lo que se favorece la precisión de las determinaciones y se reducen los riesgos para el analista. Una ventaja adicional es que el método puede ser casi completamente automatizado utilizando válvulas de conmutación activadas mediante señales eléctricas, por lo cual resulta idóneo para emplearse en análisis de rutina [8].

4. Conclusiones

La determinación cuantitativa de trazas de cloro y nitrofenoles en agua a niveles de trazas (µg/L) se puede realizar de manera simple, rápida y eficiente empleando un método en línea de EFS acoplada a la cromatografía de líquidos. Esta metodología desarrollada permite minimizar los riesgos de pérdida y contaminación de la muestra. El método es lineal en el intervalo de concentraciones de ~ 1.3 a ~ 90 µg/L. La precisión de recuperación es aceptable (CV < 5 %) y la exactitud obtenida para cinco de los fenoles se considera buena para estos niveles de concentración.

5. Reconocimiento de autoría

Alfonso Lemus-Solorio: Investigación; Escritura borrador original; Metodología. **María Elena Núñez-Gaytán:** Investigación; Metodología; Supervisión; Adquisición de fondos. **Ana María Núñez-Gaytán:** Conceptualización; Metodología; Recursos. **Martha Angélica Lemus-Solorio:** Análisis formal; Curación de datos; Metodología; Escritura borrador original. **Sandra Núñez-Hernández:** Conceptualización; Validación; Análisis formal.



Referencias

- [1] F. G. Soper and G. F. Smith, "CCVI. —The halogenation of phenols," *J. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 0, pp. 1582–1591, 1926, <https://doi.org/10.1039/JR9262901582>.
- [2] F. Ge, L. Zhu, and H. Chen, "Effects of pH on the chlorination process of phenols in drinking water," *J. Hazard. Mater.*, vol. 133, no. 1, pp. 99–105, 2006, <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2005.09.062>.
- [3] F. Ge, L. Zhu, and J. Wang, "Distribution of chlorination products of phenols under various pHs in water disinfection," *Desalination*, vol. 225, no. 1, pp. 156–166, 2008, <https://doi.org/10.1016/j.desal.2007.03.016>.
- [4] USEPA. Ambient Water Quality Criteria for Chlorinated Phenols, United States Environmental Protection Agency, EPA 440/5-80-032. A1-C124, Washington D.C. (1980).
- [5] D. Puig and D. Barceló, "Comparison of different sorbent materials for on-line liquid-solid extraction followed by liquid chromatographic determination of priority phenolic compounds in environmental waters," *J. Chromatogr. A*, vol. 733, no. 1, pp. 371–381, 1996, [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01136-6](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01136-6).
- [6] A. M. Núñez-Gaytán, L. E. Vera-Avila, M. G. De Llasera, and R. Covarrubias-Herrera, "Speciation and transformation pathways of chlorophenols formed from chlorination of phenol at trace level concentration," *J. Environ. Sci. Heal. Part A*, vol. 45, no. 10, pp. 1217–1226, Jul. 2010, <https://doi.org/10.1080/10934529.2010.493785>.
- [7] A. M. Núñez-Gaytán, L. E. Vera-Ávila, and M. del R. Covarrubias-Herrera, "On-line methodology for the trace level determination of the chlorinated phenol family in water samples," *J. Mex. Chem. Soc.*, vol. 52, pp. 185–192, 2008, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-249X2008000300003&nrm=iso.
- [8] I. Canals, E. Bosch, and M. Rosés, "Prediction of the separation of phenols by capillary zone electrophoresis," *Anal. Chim. Acta*, vol. 458, no. 2, pp. 355–366, 2002, [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(02\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(02)00079-X).



Este texto está protegido por una licencia [Creative Commons 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

Usted es libre para Compartir —copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato— y Adaptar el documento —remezclar, transformar y crear a partir del material— para cualquier propósito, incluso para fines comerciales, siempre que cumpla la condición de:

Atribución: Usted debe dar crédito a la obra original de manera adecuada, proporcionar un enlace a la licencia, e indicar si se han realizado cambios. Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que tiene el apoyo del licenciante o lo recibe por el uso que hace de la obra.

[Resumen de licencia - Texto completo de la licencia](#)