



7^{mo}
Congreso de
Medio Ambiente

Actas 7mo Congreso de Medio Ambiente AUGM
22 al 24 de mayo de 2012. UNLP. La Plata Argentina

**VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE UNA METODOLOGÍA
BASADA EN CROMATOGRAFÍA IÓNICA CON DETECCIÓN
ULTRAVIOLETA PARA LA DETERMINACIÓN DE NITRATO Y
NITRITO EN AGUAS DEL RÍO DE LA PLATA**

**Validation and application of a methodology based in ionic Chromatography with
UV detection for nitrate and nitrite determination in waters of the Rio de la Plata**

Andrés Pérez-Parada, Mauricio Rodríguez Chialanza*, Leticia Parodi, Cristina Cacho,
Beatriz Brena, Gabriella Feola

Servicio Laboratorio de Calidad Ambiental, Intendencia de Montevideo,
Montevideo, Uruguay

* Autor para correspondencia: ++598 2711 2406 mauricio.r.rodriguez@imm.gub.uy

Título abreviado: Cromatografía iónica UV para determinar nitrato y nitrito

ABSTRACT

The determination of trace elements such as nitrate and nitrite by ion chromatography with a conductivity detector (CI-CD), with or without ionic suppression modes, has proved to be very useful for different matrices. However, in environmental matrices with high concentrations of halides such as marine or brine waters, the determination of these analytes requires more efficient strategies for the removal of interferences.

In this work, we have searched for a rugged alternative in the determination of nitrate and nitrite in these matrices using solid phase extraction (SPE) with IC-Ag (Alltech Inc., USA) commercial cartridges for the removal of interferences and UV absorption detection. We present method validation data in the determination of nitrate and nitrite in surface waters from beaches of Montevideo, Uruguay by ion chromatography with UV detection (210 nm). For these samples, it was identified a cut-off value of salinity to directly determine these analytes, avoiding the SPE treatment for the removal of chloride. The analytical procedure was validated for the following figures of merit: linearity, dynamic range, matrix effect (interferences study), repeatability, limit of detection, limit of quantitation, intermediate precision, robustness and uncertainty defined by the Organismo Uruguayo de Acreditación. The robustness of this methodology, measured through a factorial statistical design is satisfactory while detection limits for nitrate is 0.02 mg / L and 0.01 mg / L for nitrite. Intermediate precision measured as relative standard deviation (three operators in different weeks) for real samples showed to be 4.7 %. We also depict results of a winter to summer monitoring campaign (2011 to 2012 season) for these analytes, taking into account the importance of determining the eutrophication level in Montevideo certified beaches.

RESUMEN

La determinación por cromatografía iónica con detector de conductividad (CI-DC) de elementos trazas como el nitrato y nitrito, ya sea en modos de supresión o sin supresión, ha mostrado ser muy útil en diferentes matrices. Sin embargo, en matrices ambientales con alta concentración de haluros como aguas marinas o estuarinas, la determinación de estos analitos necesita de estrategias más eficientes para la remoción de interferencias. Por tal motivo, se ha buscado una alternativa de determinación de nitrato y nitrito en estas matrices empleando sistemas de detección más selectivos que el CDD tales como el detector UV y la utilización de extracción en fase solida (SPE) con cartuchos

comerciales IC-Ag (Alltech Inc., EE.UU) para la remoción de interferencias. En este trabajo, se presenta la validación de una metodología de determinación de nitrato y nitrito por cromatografía iónica con detector UV (210 nm) en muestras de aguas superficiales de playas de la ciudad de Montevideo, Uruguay. Se identificó un valor de salinidad máximo de estas aguas para la determinación de estos analitos de manera directa, evitando el tratamiento por SPE para remoción de cloruros. El procedimiento analítico fue validado para las siguientes cifras de mérito: linealidad, intervalo de trabajo, efecto matriz, repetitividad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión intermedia, robustez e incertidumbre definidas según el Organismo Uruguayo de Acreditación. Se destaca la robustez de la metodología, medida a través de un diseño estadístico factorial, con límites de detección para nitrato de 0.02 mg/L y 0.01 mg/L para nitrito y precisión intermedia medida como desviación estándar relativa (tres operadores en semanas diferentes) para muestras reales de 4.7 %. Se presentan además, resultados del monitoreo llevado a cabo en campañas durante el invierno y verano de los años 2011 y 2012, respectivamente, para estos analitos, dado su interés para determinar el nivel de eutrofización de las aguas de Montevideo.

INTRODUCCIÓN

La determinación de aniones inorgánicos en agua por cromatografía iónica con detector de conductividad (CI-DC), es ampliamente utilizada destacándose entre esta técnica los modos operacionales con o sin supresión de ion sodio. La principal ventaja del sistema CI-DC en la determinación de aniones radica en la posibilidad de determinar simultáneamente bajo las mismas condiciones de ensayo una variedad de analitos. Incluso algunas técnicas oficiales emplean el modo operacional que incluye supresión en la determinación de aniones en aguas ambientales y potables (ASTM, 2001; USEPA, 1993). Sin embargo, este modo operacional tiene la limitación práctica que impone la dependencia a un sistema comercial de supresión de iones, las cuales poseen vida limitada y son de alto costo).

Las muestras estuarinas del Río de la Plata se destacan por poseer una salinidad variable. La determinación de aniones por CI-DC en estas muestras se ve generalmente comprometida por la concentración de haluros (cloruro y bromuro) y sulfato presentes debido a que distorsionan negativamente el proceso cromatográfico además de que actúan como interferentes en la determinación de aquellos analitos presentes en menores cantidades.

Específicamente para la determinación de nitrato y nitrito en agua, se encuentran problemas de especificidad de señal cuando se trabaja con sistemas sin supresión de iones (Dahllöf *et al.* 1997; Jackson, 2005).

Por tal motivo, se ha buscado una alternativa operacional a la determinación de nitrato y nitrito por CI en aguas superficiales de la ciudad de Montevideo empleando detección ultravioleta (UV) y la utilización de extracción en fase sólida (SPE) en cartuchos de intercambio iónico como estrategia de remoción de haluros previa a la inyección. En este trabajo, se presenta la validación de una metodología de determinación de nitrato (N-NO_3^-) y nitrito (N-NO_2^-) por cromatografía iónica con detector UV (210 nm) y su aplicación en muestras de aguas superficiales de playas de la ciudad de Montevideo, Uruguay.

METODOLOGIA

Materiales

Material volumétrico de vidrio aforado (clase A), agua bidestilada (calidad ASTM tipo

1). Pipeta automática 20-200 μ L (Socorex, Suiza). Filtros de acetato de celulosa HDPV de 13mm d.i. con poro de 0.22 μ m (Millipore, Brasil); Cartuchos de intercambio iónico IC-Ag (Alltech, EE.UU), soporte estireno-divinil benceno y grupo funcional acido sulfónico (capacidad 0.5 mL). Jeringa hipodérmica plástica de 20 mL. Estándares de NaNO₂ y NaNO₃ calidad analítica (>99.9%). NaHCO₃ y NaCO₃ calidad ACS (>99%).

Colección de muestras

Las muestras fueron colectadas de acuerdo al programa de monitoreo de playas que lleva a cabo el Laboratorio de Calidad Ambiental (LCA) en la ciudad de Montevideo, según procedimientos internos. Las playas sobre el Río de la Plata muestreadas fueron Playa Pocitos (34°54'41.18" 56°08'38.04"), Playa Malvín (34°53'49.78" 56°06'16.05"), Playa Ramírez (34°54'59.80" 56°10'12.34"), Playa Carrasco (34°53'30.97" 56°03'16.72"), Playa del Cerro (34°53'47.12" 56°15'09.48") y Playa Pajas Blancas (34°52'13.98" 56°20'25.83"). Las muestras fueron tomadas en envases de polipropileno, y conservadas a 4°C por un plazo máximo de 24 horas hasta el análisis (Jackson, 2005). Los resultados presentados comprenden una campaña entre el 1/09/2011 y el 1/03/12 donde fueron analizadas en total 113 muestras de playas, con un promedio de 19 muestras por playa.

Preparación de muestra

Tomar 5 mL de muestra con una pipeta y diluir (1/10) con agua bidestilada en matraz de 50 mL. Se utilizaron dos estrategias dependiendo del valor de salinidad encontrada en las muestras. a) Muestras con valores de salinidad inferiores a 8 ppt; hacer pasar la

solución diluída por un filtro de 0.45 μm , descartando los primeros mL, colectando en un vial y luego procediendo a la inyección. b) Muestras con valores de salinidad superiores a 8 ppt; acondicionar un cartucho de SPE IC-Ag con agua bidestilada, realizar la extracción en el cartucho con un flujo de 5 mL/min mediante presurización manual. Filtrar la muestra diluida luego de la extracción con un filtro de 0.45 μm . Colectar la muestra descartando los primeros mL y luego proceder a la inyección. Enjuagar el sistema con 5mL de agua bidestilada entre muestras para evitar contaminación cruzada.

Preparación de estándares y fortificación de muestras

Se preparan soluciones stock individuales de concentración 1000 mg/L de N-NO₂ y N-NO₃ en agua bidestilada. Se fortifican tres clases de matrices: agua bidestilada, agua de playa de baja salinidad 8 ppt con una conductividad de 900 $\mu\text{S/cm}$ y agua de playa de salinidad 16 ppt (partes por mil), con una alta conductividad de 15000 $\mu\text{S/cm}$ a 4 concentraciones diferentes 0.05; 0.10; 1.0 y 2.0 mg/L de N-NO₂ y N-NO₃ mediante tomas apropiadas de la solución stock con pipeta automática. Estas muestras fortificadas se evalúan en ensayos de adiciones estándar y ensayos de recuperación.

Instrumentos

Cromatógrafo iónico modelo UFLC 20 (Shimadzu Co., Japón) dual equipado con un detector de conductividad CDD-10Asp y arreglo de diodos (UV) SPD-M20A. La fase móvil empleada es 1.8 mM de buffer Na₂CO₃ – 1.7 mM NaHCO₃. Las condiciones de análisis son: temperatura del horno 30°C, modo lámpara de deuterio, λ medida = 210

nm, flujo de bomba 1.0 mL/min, temperatura de la celda 40°C, columna Shim-pack IC-SA2 (partícula 9µm, 250mm x 4.0mm) con grupo amonio cuaternario como intercambiador de aniones (Shimadzu Co., Japón). Para adquisición y tratamiento de datos se utilizó el software LC Solution v1.25 (Shimadzu Co., Japón). Para las medidas de salinidad se utilizó un medidor de Conductividad YSI-33 (YSI Inco. EE.UU) con compensación de temperatura.

RESULTADOS Y DISCUSION

Ensayos preliminares

La detección por conductividad en muestras estuarinas presenta grandes dificultades dado que los picos correspondientes a los haluros (Cl^- , Br^-) enmascaran o dificultan la determinación de los analitos de interés (NO_2^- , NO_3^-). Teniendo en cuenta que el orden de elución de aniones en columnas de fase amonio cuaternario, generalmente, es: Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- , PO_4^- , SO_4^- . En la Figura 1 se muestra la saturación del detector de conductividad debido a Cl^- y Br^- en sistema CI-DC sin supresión de una muestra de alta salinidad. Se evidencia la falta de especificidad de señal para otros analitos tales como NO_2^- y NO_3^- .

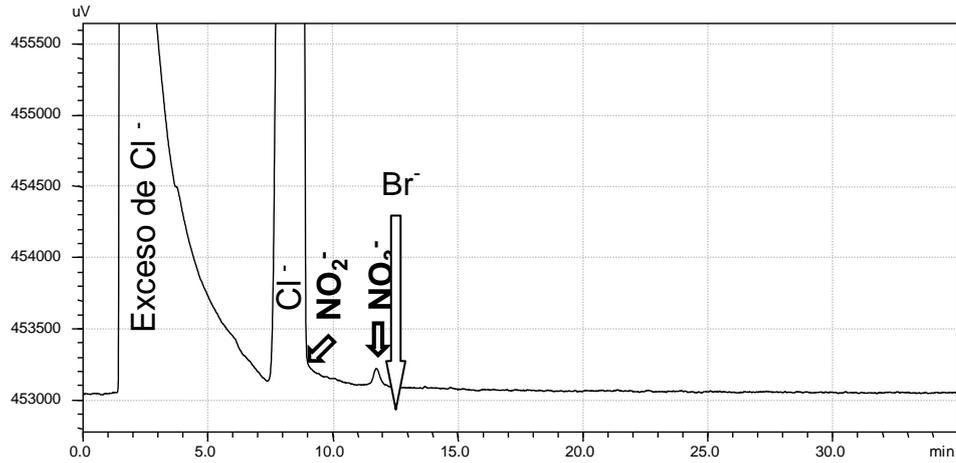


Figura 1. Cromatograma CI-CD. Muestra de agua de playa de alta salinidad sin remoción de haluros. Puede observarse que la señal del Cl^- enmascara la señal de N-NO_2 y por la posición la de Br^- dificultaría la determinación de N-NO_3 .

Figure 1. Chromatogram CI-CD. Sample of of high salinity beach water without halide removal. As can be seen, the Cl^- signal masks the N-NO_2 signal and because of the Br^- signal location the determination of N-NO_3 may be difficult.

La detección $\text{UV}_{210\text{nm}}$ ofreció mayor especificidad de señal en comparación a la detección DC, observándose únicamente señal aparente para NO_2^- , Br^- , NO_3^- y SO_4^{2-} .

La Figura 2, trata de ejemplificar el comportamiento observado en donde el perfil cromatográfico de la muestra se ve distorsionado cuando se trata de determinar NO_3^- y NO_2^- en muestras de alta salinidad. De la misma forma, utilizando detección UV en muestras de alta salinidad los haluros demuestran ser interferentes del análisis por supresión de los picos cromatográficos pertenecientes al NO_3^- y NO_2^- (Williams, 1983).

Por otra parte, las muestras con baja salinidad, presentan un perfil cromatográfico adecuado para la determinación de NO_3^- y NO_2^- . El uso de SPE con resinas de intercambio aniónico con grupos sulfonato ha sido reportado con anterioridad para la remoción de haluros en muestras de agua (Henderson *et al.*, 1991). Mediante la utilización preliminar de cartuchos comerciales de SPE IC-Ag se notó que la señal correspondiente a NO_3^- y NO_2^- se encontraba enmascarada por la vasta presencia de cloruros.

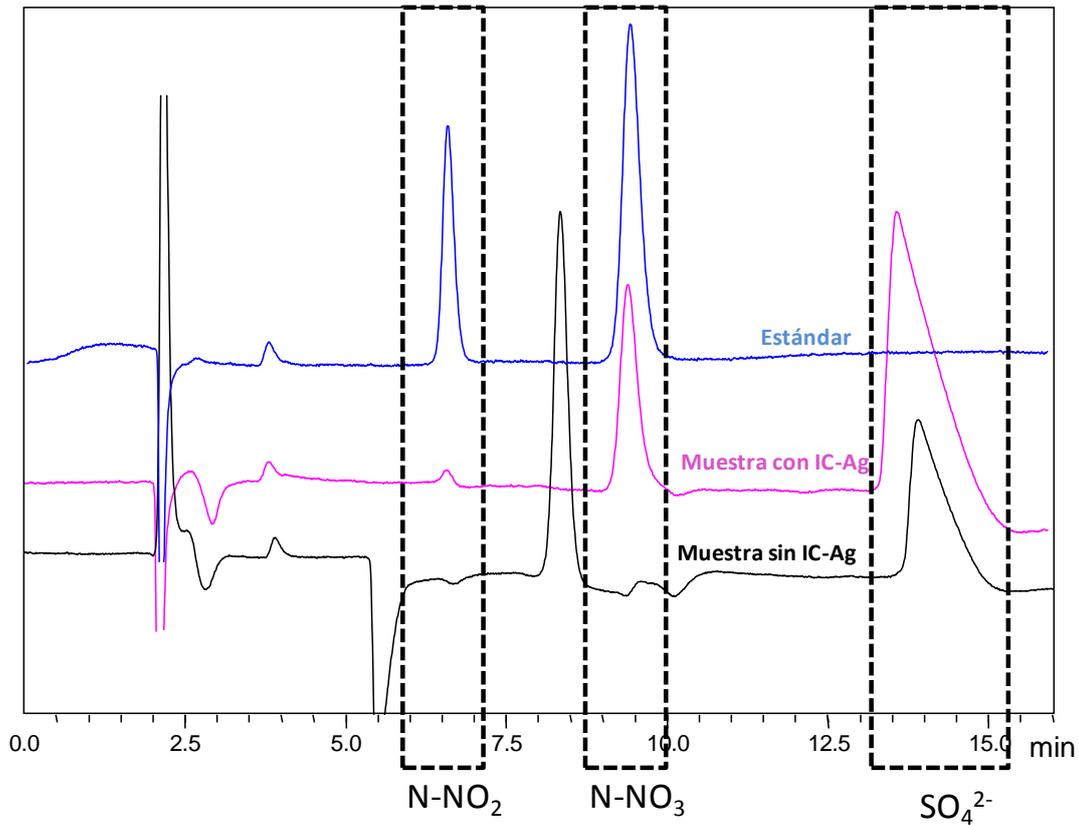


Figura 2. Cromatograma CI-UV_{210nm}. Estándar de N-NO₂⁻ y N-NO₃⁻ (azul); muestra de agua de playa de alta salinidad sin remoción de haluros por cartucho IC-Ag (negro); la misma muestra con remoción de haluros por cartucho IC-Ag (rosa). Puede observarse la señal suprimida de N-NO₂ y N-NO₃ en esta muestra si no se realiza preparación de muestra.

Figure 1. Chromatogram CI-UV_{210nm}. Standards of N-NO₂⁻ and N-NO₃⁻ (blue line); Sample of high salinity beach water without halide removal using cartridge IC-Ag (black line); the same sample with removal of halides using cartridge IC-Ag (pink line). The suppression of the N-NO₂ and N-NO₃ signals may be observed when the sample is not previously conditioned.

Estudio de interferencias

El efecto matriz porcentual (EM%) definido como el cociente de pendientes de la curva de calibración entre playas de baja salinidad y agua bidestilada para el rango 0.05-3.00

mg/L fue de 45.5 % para N-NO_3^- . Esto redundaba en la existencia de interferencias multiplicativas de señal. Para el estudio de interferencias se realizó el test estadístico de pendiente y ordenada conjuntamente (Miller & Miller, 2001) entre aguas de playas de alta y baja salinidad en comparación a la calibración obtenida en agua bidestilada. Se obtuvo que la calibración en muestras de agua de playa de alta salinidad que incluyen preparación de muestra con cartuchos IC-Ag es estadísticamente similar a la preparada en agua bidestilada. Sin embargo, la calibración en muestras que no incluyen esta etapa (muestras de baja salinidad) se demuestra que existe afectación en la calibración. Se vio además que las muestras de aguas pueden subdividirse entre aquellas que presentan conductividades superiores e inferiores a $10000 \mu\text{S/cm}$ (salinidad ~ 8 ppt (part per thousand)) en cuanto a cuales deben ser sometidas a esta preparación de muestra. Teniendo en cuenta los valores de salinidad de las aguas esturinas surge la necesidad de analizar la gran mayoría de las muestras mediante la estrategia que incluye la etapa de remoción de haluros. Se demuestra además que puede utilizarse la calibración preparada en agua bidestilada para aquellas muestras preparadas por intercambio iónico mientras que aquellas de baja salinidad si son analizadas sin remoción de haluros deben ser sometidas a alguna corrección de calibración.

Validación de la metodología

Diferentes cifras de mérito fueron evaluadas durante la validación de esta metodología de acuerdo a los criterios definidos por el Organismo Uruguayo de Acreditación (OUA, 2010). Se evaluó linealidad de respuesta obteniéndose coeficientes de determinación $R^2 > 0,99$ con N-NO_2^- y N-NO_3^- para la curva de calibración mostrada en la Tabla 1. Se muestra además el rango dinámico evaluado así como los límites de detección (LOD) y

cuantificación (LOQ) obtenidos para estos analitos. Los LOD fueron calculados a través del método gráfico utilizando el criterio 3 Señal / Ruido obtenido mediante el software LC Solution v1.25. El LOQ fue determinado como 10 Señal / Ruido.

Tabla 1. Parámetros de calibración obtenidos. T_R : tiempo de retención; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

Table 1. Calibration parameters obtained. T_R : retention time; LOD: detection limit; LOQ: quantification limit.

Analito	T_R (min)	Curva de calibración	Rango dinámico (mg/L)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
$N-NO_2^-$	6.1	$y=3.72E^5x+4.02E^4$	0.03-5.00	0.01	0.03
$N-NO_3^-$	8.3	$y=5.46E^5x+4.99E^4$	0.06-5.00	0.02	0.06

Estos límites demuestran que la metodología es adecuada para el fin ya que se encuentra muy por debajo del límite máximo de la reglamentación uruguaya (Decreto 253/7, 1991) de 10 mg/L de $N-NO_3^-$ en aguas de uso recreativo. Se evaluó además la veracidad mediante ensayos de recuperación a dos niveles de concentración, uno bajo (0.1 mg/L de $N-NO_3^-$, 0.05 mg/L $N-NO_2^-$) y otro alto (0.25 mg/L para $N-NO_3^-$ y $N-NO_2^-$). La precisión fue evaluada como DSR% (desviación estándar relativa). El promedio de recuperaciones ($n=5$) fue de 100.8% con DSR de 1.0 % para $N-NO_2^-$ y 101.8% con DSR de 0.8% para $N-NO_3^-$. La repetibilidad del instrumento evaluada a 0.05 mg/L de $N-NO_3^-$ fue 1.3 %. La repetibilidad del método fue evaluada estadísticamente mediante análisis ANOVA (Miller & Miller, 2001) para dos operadores con resultado satisfactorio. La precisión intermedia fue evaluada para una misma muestra de alta salinidad (15ppt) que fue sujeta a análisis genuino e independiente por tres operadores en semanas

consecutivas. Así calculada la precisión intermedia para esta metodología demostró una DSR de 4.7%. La robustez fue evaluada tanto para muestras de alta o baja salinidad mediante un análisis factorial con tres parámetros a dos niveles (Miller & Miller, 2001). Los factores de influencia estudiados fueron la estabilidad de composición de la fase móvil (buffer HCO_3^- - CO_3^{2-}) preparada en el momento de análisis y de tres días de antigüedad), la filtración secuencial de muestras con enjuagado de jeringa para evaluar la contaminación cruzada y la agitación de muestras para evaluar la incidencia de sólidos suspendidos en los resultados. Se demuestra estadísticamente que no hay interacción significativa entre los factores de afectación y por lo tanto el método es robusto. Finalmente se evaluó la incertidumbre expandida con factor de cobertura $k=2$ ($\alpha=5\%$) tomando en cuenta las contribuciones de las incertidumbres estándar de dilución, recuperación, regresión inversa y repetibilidad (EURACHEM/CITAC, 2000).

Monitoreo de N-NO₂ y N-NO₃ en playas de Montevideo

Con el fin de controlar la calidad de las playas y prevenir riesgos a la salud de los bañistas, el LCA de la Intendencia de Montevideo realiza durante todo el año estudios de calidad del agua de las playas de Montevideo. En este trabajo, se muestran los resultados de monitoreo de seis puntos de interés, cuatro de ellos, corresponden a playas que se encuentran certificadas bajo la norma ISO 14001 (Feola *et al.*, 2010).

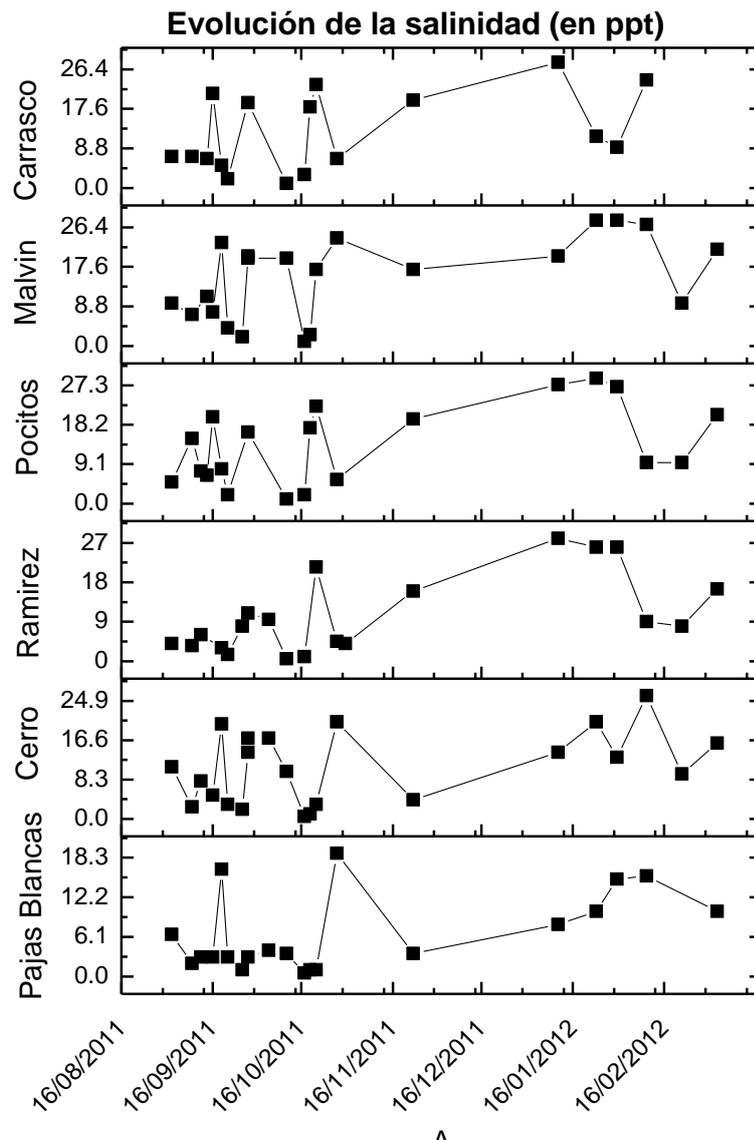


Figura 3. Evolución temporal de la salinidad en las muestras analizadas..

Figure 3. Temporal evolution of salinity in the analyzed samples..

La Figura 3 muestra la evolución temporal de la salinidad (en ppt) para las muestras de agua de diferentes playas de Montevideo durante el periodo de esta campaña. Se puede notar que esta variabilidad de la salinidad conlleva la utilización de una estrategia analítica robusta que contemple estos cambios en las características de la muestra.

Cabe destacar que en las muestras estudiadas, únicamente en casos excepcionales se encontró la presencia de N-NO_2^- . Sin embargo, N-NO_3^- fue quien presentó mayores variaciones tanto en concentración como en función del tiempo durante el transcurso de esta campaña. En la Figura 4 se muestra los valores promedios, mínimos y máximos en la concentración en mg/L de N-NO_3^- en las playas estudiadas. El valor promedio de todas las muestras fue 0.51 mg/L siendo el máximo valor encontrado en la playa Pocitos con 2.74 mg/L de N-NO_3^- . De esta forma, se demuestra que todas las muestras analizadas cumplen con la reglamentación nacional de aguas aptas para recreación (Decreto 253/7, 1991).

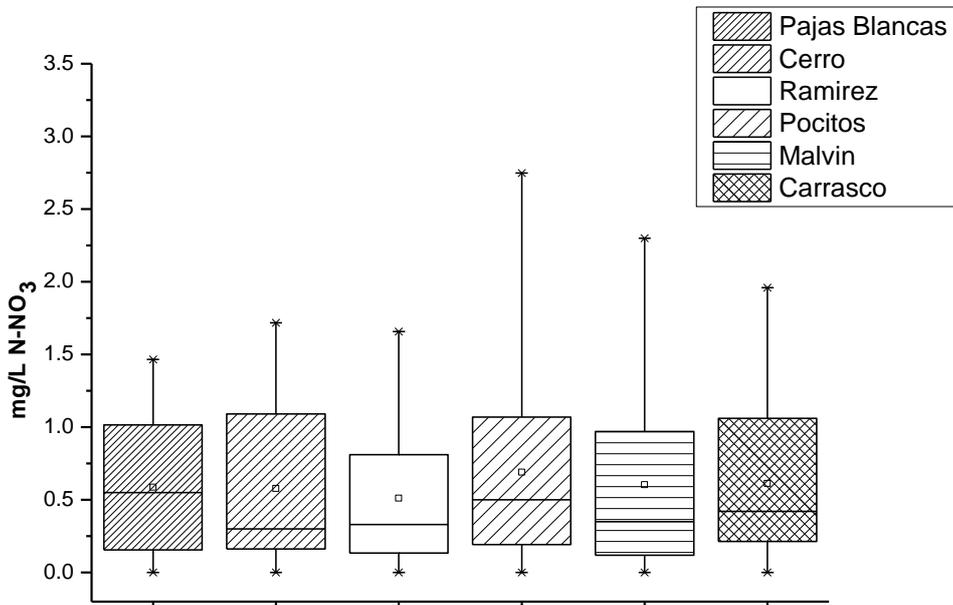


Figura 4. Valor promedio (□), valores máximos y mínimos (*) de N-NO_3^- en mg/L en cada playa estudiada.

Figure 4. N-NO_3^- (in mg/L) mean (□) and maximum and minimum (*) values at each studied beach.

En la Figura 5 se muestra la evolución de la concentración de N-NO_3^- durante el

período de estudio. Se observa que en el mes de enero de 2012 se obtuvieron los valores máximos de N-NO_3^- en todas las playas de estudio.

Estas medidas están siendo evaluadas de forma integral junto con otros parámetros de monitoreo de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo total, coliformes totales, cianobacterias y microcistinas de forma de medir la evolución de las actividades antrópicas como el vertimiento de aguas residuales industriales y domésticas o el escurrimiento derivado de actividades agrícola-ganaderas.

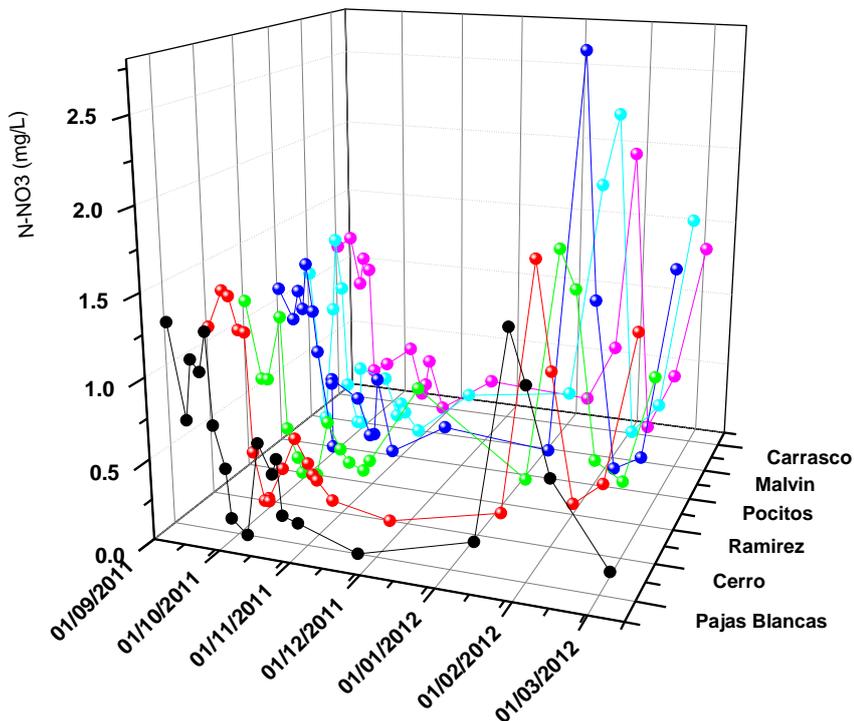


Figura 5. Evolución temporal de N-NO_3^- en cada playa estudiada durante la campaña de monitoreo.

Figura 5. Temporal evolution of N-NO_3^- at each studied beach during the monitoring campaign.

CONCLUSIONES

La metodología propuesta que incluye la remoción de haluros por intercambio iónico y determinación por HPLC-UV ha demostrado ser apta para el monitoreo de nitrato y nitrito en aguas de playas del Río de la Plata. Esta metodología ha sido validada de acuerdo a los requerimientos del OUA y está siendo satisfactoriamente utilizada para el monitoreo ambiental de playas en Montevideo.

AGRADECIMIENTOS

Intendencia de Montevideo, ASM (Montevideo, Uruguay)

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ASTM. 2001. *Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography*. Document D4327-03: 1p
- Dahllöf I, Svensson O & Tortensson C. 1997. Optimizing the determination of nitrate and phosphate in sea water with ion chromatography using experimental design. *Journal of Chromatography A*, 771: 163-168
- Uruguay (República Oriental del). 1991. Decreto 253/79 *Código de Aguas*: 1-14
- EURACHEM/CITAC Guide 2000, *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. QUAM: 1 p
- Feola G, Brena B, Risso J & Sienna D. 2010 *Programa de Monitoreo de Agua de Playas y Costa de Montevideo. Informe 2007-2010*. Intendencia de Montevideo, Uruguay
- Henderson IK, Saari-Nordhaus R & Anderson Jr JM. 1991. *Journal of Chromatography*, 546: 61-71

- Jackson PE. 2005 Ion Chromatography in Environmental Analysis. P 14 En: Meyers RA (Ed), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd
- Miller JN & Miller JC. 2001 *Estadística y Quimiometría para Química Analítica* Prentice Hall, 4th Ed. Madrid, España
- OUA (Organismo Uruguayo de Acreditación). 2010. *Directriz para validación de métodos de de ensayo*. Documento OUA-DOC033: 1 p
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). 1993. *Determination of inorganic anions by ion chromatography*. Method 300.1: 1p
- Williams RJ. 1983 Determination of inorganic anions by ion chromatography with ultraviolet absorbance detection. *Analytical Chemistry* 55: 851-854