



**UNIVERSITAT JAUME I**

**DEPARTAMENT DE CIENCIES EXPERIMENTALS**

**QUIMICA ANALITICA**

**DETERMINACION DE RESIDUOS DE  
HERBICIDAS POLARES MEDIANTE  
CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE  
ALTA RESOLUCION.  
APLICACION DE TECNICAS ACOPLADAS**



**TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR  
JUAN VICENTE SANCHO LLOPIS  
CASTELLO, SEPTIEMBRE 1994**



UNIVERSITAT *JAUME I* de Castelló  
*Departament de Ciències Experimentals*  
Química Analítica

**DETERMINACION DE RESIDUOS DE HERBICIDAS  
POLARES MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA  
DE ALTA RESOLUCION.  
APLICACION DE TECNICAS ACOPLADAS.**

TESIS DOCTORAL

PRESENTADA POR:

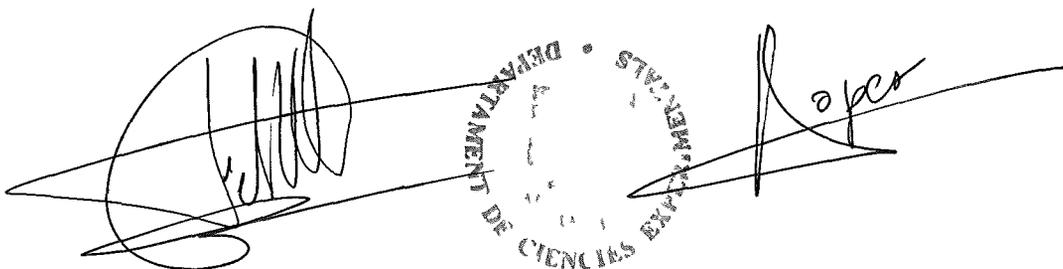
Juan Vicente Sancho Llopis

Castelló, Septiembre 1994

FELIX HERNANDEZ HERNANDEZ y FRANCISCO JOSE LOPEZ BENET, Profesores Titulares de Química Analítica de la Universitat *Jaume I* de Castelló,

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral "*Determinación de residuos de herbicidas polares mediante cromatografía líquida de alta resolución. Aplicación de técnicas acopladas.*", se ha desarrollado, bajo nuestra dirección, en el Area de Química Analítica del Departament de Ciències Experimentals de la *Universitat Jaume I*, por D. Juan Vicente Sancho Llopis.

Lo que certificamos para los efectos oportunos, en Castelló de la Plana, a 15 de Julio de mil novecientos noventa y cuatro.



The image shows two handwritten signatures in black ink. The signature on the left is a large, stylized scribble. The signature on the right is more legible, appearing to read 'F. Lopez'. Between the two signatures is a circular stamp. The text in the stamp is arranged in a circle and reads 'DEPARTAMENT DE CIÈNCIES EXPERIMENTALS DE LA UNIVERSITAT JAUME I'.

*El trabajo de investigación presentado se ha realizado en colaboración con el Laboratory of Organic-Analytical Chemistry del National Institute of Public Health and Environmental Protection (RIVM), Bilthoven (Holanda). Parte de las investigaciones fueron realizadas durante la estancia de 6 meses de D. Juan Vicente Sancho Llopis en dicho laboratorio (Octubre de 1991 a Marzo de 1992).*

*Así mismo, el trabajo correspondiente a los herbicidas Glifosato y Glufosinato se enmarca dentro del Proyecto "Network Project: Hyphenated Analytical Chemistry for Environmental and Public Health Research in the EU", del Human, Capital and Mobility Programme, Contrato N° ERBCHRXCT930274.*

*En primer lugar, quiero agradecer a Félix y Paco, su dirección, apoyo y comprensión, durante estos años, sin los que este trabajo no se podría haber realizado.*

*Igualmente, agradecer la buena acogida y el buen ambiente de trabajo a todos los LOC-BMers (RIVM), que me hicieron sentirme como en casa: René, Rob, Piet, Henk, Marijka, Veronica, Sjoerd, Willem, Dick, Ramón, Bert, Steven, Ellen, Joop, Cees, Peter,... y especialmente Matthieu. Todavía echo de menos las partidas de "snooker" y los "koffies met gebak, lekker!!!". Igualmente a José y Angeline, que me acogieron como uno más de la familia.*

*Debo un agradecimiento especial al amigo Elbert Hogendoorn (the column-switching man), de él he aprendido todo lo que sé sobre esta técnica, y su esfuerzo le ha costado.*

*También a todos los compañeros de Química Analítica: Roque, Nuria, Inma, Toni, Carmen, María, Mari Carmen, Rosabel, Angel, Xelo, etc. y en especial a Ximo, que me ha tenido que sufrir todos estos años.*

*Así mismo, a todos los miembros del Departament de Ciències Experimentals, en particular a Nacho, Marisa, Elena, Marc, Pilar, Michel, Leonor y un largo etcétera.*

*Igualmente deseo agradecer a Julio su dirección durante los inicios de este trabajo. Espero que el resultado final sea de su agrado.*

*También agradezco a mis padres sus sacrificios, comprensión y por haber podido contar con ellos siempre que los he necesitado.*

*A Isabel, por su continuo apoyo y comprensión, sobre todo en los momentos difíciles.*

## RESUMEN

Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las más sensibles y selectivas disponibles para la determinación de residuos de pesticidas en muestras medioambientales.

El principal objetivo de esta Tesis es estudiar el potencial de la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL) para el análisis de residuos de herbicidas polares seleccionados (*fenoxiácidos*, *glufosinato*, *glifosato* y el principal metabolito de éste último, *AMPA*). La aplicación de un procedimiento con acoplamiento CL-CL para la determinación de los residuos de estos herbicidas presenta numerosas ventajas, como son: menor tiempo de análisis, menor manipulación de la muestra, menor uso de disolventes orgánicos, mayor selectividad y sensibilidad y automatización de la etapa de purificación.

La combinación de dos procedimientos de EFS y el acoplamiento CL-CL proporcionan un procedimiento global capaz de determinar ocho herbicidas fenoxiácidos a nivel de  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  en diferentes muestras de agua con una elevada capacidad de análisis. El procedimiento está basado en la extracción en fase sólida mediante cartucho C18 de 50 ml de muestra de agua previamente acidificada. Posteriormente, se purifica el extracto mediante un cartucho relleno de silicagel. Una alícuota de 400  $\mu\text{l}$  se inyecta en el cromatógrafo líquido con columnas acopladas y detección UV a 228 nm. Se realiza una purificación sobre una pequeña columna de 10 mm rellena de la fase ISRP y se transfiere la fracción que contiene los analitos a la segunda columna de 100 mm rellena de Microspher C18, 3  $\mu\text{m}$ .

La aplicación de derivatización con FMOC antes de CL con columnas acopladas y detección fluorescente utilizando una columna de fase reversa acoplada a una de intercambio iónico es útil para la determinación de pesticidas muy polares como glufosinato, glifosato y AMPA en muestras de aguas a nivel de sub-ppb. La derivatización de la muestra de agua con FMOC se efectúa en medio tamponado borato; tras 30 min de reacción, se diluye con tampón borato y se inyectan 2 ml en el cromatógrafo líquido con columnas acopladas y detección fluorescente con  $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$ . Se realiza una purificación sobre una columna de 30 mm rellena de fase reversa C18 y se transfiere la fracción que contiene los analitos a la segunda columna de 250 mm rellena de Adsorbosphere  $\text{NH}_2$  de 5  $\mu\text{m}$ .

La rapidez del procedimiento de prederivatización y el corto tiempo de análisis posterior proporciona una elevada capacidad de análisis, de al menos 50 muestras por día. El método parece ser muy robusto ya que, durante el tiempo que duraron las experiencias, la columna C18 (C-1) mantuvo su resolución y el reajuste de las condiciones de purificación y transferencia no fue necesario. La columna amino (C-2) sufrió una pérdida gradual de eficiencia, sólo advertible tras dos meses de uso continuado.

## SUMMARY

Coupled chromatographic techniques are amongst the most sensitive and selective techniques available for the determination of pesticide residues in environmental samples.

The main scope of this Thesis is to study the potential of coupling liquid chromatography to liquid chromatography (LC-LC), in order to determine residues of selected polar herbicides (phenoxyacids, glufosinate, glyphosate and the main metabolite of the latter, AMPA). The use of a coupled LC-LC procedure for pesticide residue analysis reports many advantages, such as shorter analysis time, less sample handling, lower organic solvent consumption, better selectivity and sensitivity as well as automatization of the clean-up step.

Combination of two off-line SPE procedures with an on-line multi-dimensional precolumn switching system yielded an overall procedure capable of determining eight phenoxyacid herbicides down to a  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  level in various aqueous environmental samples with a high sample throughput. The procedure is based on a solid phase extraction on a C18 cartridge of 50 ml of previously acidified water sample. The extract is cleaned-up by means of a silicagel cartridge and 400  $\mu\text{l}$  are injected in the LC-LC system, applying a clean-up step on a small precolumn (10 mm) packed with ISRP and transferring the analyte fraction to a 100 mm column packed with Microspher C18, 3  $\mu\text{m}$ . Preliminary experiments indicated that the developed procedure is amendable to more polar acidic pesticides, as dicamba, and that step-gradient elution can serve as an adequate separation technique.

The application of FMOC derivatization prior to coupled-column LC with fluorescence detection using a reversed-phase column coupled to an ion-exchange column proved to be useful for the rapid determination of the very polar pesticides glufosinate, glyphosate and AMPA in a variety of environmental water samples at the ppb and sub-ppb level. The procedure is based on the water sample derivatization with FMOC in borate buffer, after 30 min reaction, it is diluted with borate buffer and 2 ml injected in the LC-LC system with fluorescence detection, applying a clean-up step on a 30 mm C18 column and transferring the analyte fraction to a 250 mm second column packed with Adsorbosphere  $\text{NH}_2$ , 5  $\mu\text{m}$ . The rapid precolumn derivatization procedure and the short time of the subsequent LC analysis result in a sample throughput of at least 50 per day. The method appears to be very robust. During the time of experiments, the C18 column maintained its performance and readjustment of column-switching conditions was not necessary. The amino column suffered a gradual decrease in efficiency only noticeable after two months of use.

## RESUM

Les tècniques cromatogràfiques acoblades es troben entre les més sensibles i selectives al nostre abast per a la determinació de residus de pesticides en mostres mediambientals

L'objectiu més important d'aquesta Tesi es estudiar el potencial de l'acoblament cromatografia líquida - cromatografia líquida (CL-CL) per a l'anàlisi de residus de herbicides polars (fenoxiàcids, glufosinat, glifosat i el principal metabolit d'aquest últim, AMPA) L'aplicació d'un procediment d'acoblament CL-CL per a la determinació de residus d'aquests herbicides presenta molts avantatges, com ara, temps d'anàlisi més curt, poca manipulació de mostra, poc consum de dissolvents orgànics, major selectivitat i sensibilitat, així com automatització de l'etapa de purificació

La combinació de dos procediments "off-line" d'extracció en fase sòlida amb un sistema d'acoblament CL-CL multi-dimensional proporciona un procediment global capaç de determinar residus de vuit herbicides fenoxiàcids a nivell de  $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$  en una gran varietat de mostres mediambientals aquoses amb una elevada capacitat d'anàlisi. Experiments preliminars indiquen que el procediment desenvolupat es aplicable a pesticides àcids més polars, com ara el dicamba, i que l'elució amb gradient agraonat pot utilitzar-se com una tècnica adequada de separació.

Hem comprovat que l'aplicació de derivatització amb FMOC abans de CL amb columnes acoblades i detecció fluorescent utilitzant una columna de fase inversa acoblada a una d'intercanvi iònic es útil per a la determinació de pesticides molt polars com glufosinat, glifosat i AMPA en mostres d'aigües mediambientals a nivell de parts per bilió. La rapidesa del procediment de derivatització precolumna y un temps curt del posterior anàlisi per CL té com a resultat una elevada capacitat d'anàlisi, al menys de 50 per dia. El mètode pareix ser molt robust. Durant el temps que es van realitzar les experiències, la columna C18 va mantindre la seua resolució, i el readjustament de les condicions de purificació i transferència no va ser necessari. La columna amino va sofrir un minvament gradual de la seua eficàcia, sols perceptible després de dos mesos d'ús. Si fora necessari, el límit de detecció es podria baixar mitjançant una senzilla preconcentració per evaporació o variant les condicions de la reacció de prederivatització.

## INDICE

	<u>Pag.</u>
<b>A. INTRODUCCION GENERAL</b> .....	1
I. ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS. ....	3
II. CONTAMINACION DE AGUAS POR PESTICIDAS. PROBLEMATICA DE LOS HERBICIDAS POLARES. ....	11
III. TECNICAS CROMATOGRAFICAS ACOPLADAS .....	27
III.1. Cromatografía de Gases - Cromatografía de Gases.....	31
III.2. Cromatografía Líquida - Cromatografía de Gases.....	31
III.3. Cromatografía Líquida - Cromatografía Líquida .....	33
IV. ACOPLAMIENTO CL-CL.....	37
IV.1. Introducción. Etapas del análisis.....	39
IV.2. Selección de las condiciones de acoplamiento .....	42
IV.3. Ventajas y limitaciones del acoplamiento CL-CL.....	44
IV.4. Aplicaciones del acoplamiento CL-CL.....	45
V. BIBLIOGRAFIA.....	53
 <b>B. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO</b> .....	 61
 <b>C. ANALISIS DE RESIDUOS DE HERBICIDAS FENOXIACIDOS</b> .....	 67
I. INTRODUCCION.....	69
I.1. Características Generales. ....	71
I.2. Herbicidas fenoxiácidos en el medio ambiente.....	85
I.3. Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos. Antecedentes .....	94
II. EXPERIMENTAL. ....	113
II.1. Reactivos, material y aparatos. ....	115
II.2. Determinación de residuos de los herbicidas 2,4-D y MCPA por Cromatografía Líquida .....	117
II.2.1. Estudio de la separación cromatográfica.....	117
II.2.2. Características analíticas. ....	118
II.2.3. Tratamiento de las muestras. ....	124
II.2.4. Procedimiento recomendado.....	131

	<u>Pag.</u>
<b>II.3. Determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.</b> .....	135
<i>II.3.1. Optimización de condiciones cromatográficas.</i> .....	135
<i>II.3.2. Características analíticas.</i> .....	161
<i>II.3.3. Extracción de los herbicidas fenoxiácidos y aplicación de la técnica de columnas acopladas.</i> .....	166
<i>II.3.4. Procedimiento recomendado.</i> .....	197
<i>II.3.5. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras de aguas medioambientales.</i> .....	200
<i>II.3.6. Persistencia de los herbicidas fenoxiácidos en diferentes medios.</i> .....	205
<b>II.4. Determinación conjunta de residuos de herbicidas fenoxiácidos y dicamba por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.</b> .....	207
<b>IV. BIBLIOGRAFIA.</b> .....	211
<b>D. ANALISIS DE RESIDUOS DE LOS HERBICIDAS GLIFOSATO Y GLUFOSINATO.</b> .....	219
<b>I. INTRODUCCION.</b> .....	221
<b>I.1. Características Generales</b> .....	223
<b>I.2. Glifosato y glufosinato en el medio ambiente</b> .....	229
<b>I.3. Análisis de residuos de los herbicidas glifosato y glufosinato.</b>	
<b>Antecedentes</b> .....	232
<b>II. EXPERIMENTAL.</b> .....	251
<b>II.1. Reactivos, Material y Aparatos.</b> .....	253
<b>II.2. Determinación de residuos de glifosato y glufosinato por Cromatografía Líquida</b> .....	255
<i>II.2.1. Optimización de condiciones cromatográficas.</i> .....	257
<i>II.2.2. Características analíticas.</i> .....	261
<b>II.3. Determinación de residuos de glufosinato por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas</b> .....	266
<i>II.3.1. Optimización de condiciones cromatográficas.</i> .....	266
<i>II.3.2. Características analíticas.</i> .....	275
<i>II.3.3. Procedimiento recomendado.</i> .....	278
<i>II.3.4. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras de aguas medioambientales.</i> .....	281

<b>II.4. Determinación de residuos de glifosato y AMPA por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas</b> .....	286
<i>II.4.1. Optimización de condiciones cromatográficas.</i> .....	286
<i>II.4.2. Características analíticas.</i> .....	295
<i>II.4.3. Procedimiento recomendado para el analisis de residuos de glifosato.</i> .....	301
<i>II.4.4. Procedimiento recomendado para el analisis de residuos de AMPA.</i> .....	305
<i>II.4.5. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras medioambientales.</i> .....	309
<b>III. BIBLIOGRAFIA</b> .....	321
<b>E. CONCLUSIONES</b> .....	327

## INDICE DE TABLAS.

	<u>Pag.</u>
<b>Tabla 1</b> <i>Pesticidas utilizados en Europa en cantidad superior a 50 Tm/año y considerados de movilidad intermedia o alta.</i> .....	19
<b>Tabla 2</b> <i>Uso total de pesticidas seleccionados en España (1989).</i> .....	20
<b>Tabla 3</b> <i>Características físico-químicas y estructura de varios pesticidas polares</i> .....	22
<b>Tabla 4</b> <i>Niveles máximos para pesticidas seleccionados en aguas potables según la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de EEUU</i> .....	23
<b>Tabla 5</b> <i>Características físico-químicas más importantes de los herbicidas fenoxiácidos estudiados.</i> .....	82
<b>Tabla 6</b> <i>Valores del índice GUS calculados para el herbicida fenoxiácido 2,4-D</i> .....	91
<b>Tabla 7</b> <i>Indices GUS calculados para algunos herbicidas fenoxiácidos.</i> .....	92
<b>Tabla 8</b> <i>Detección de residuos de herbicidas fenoxiácidos en aguas subterráneas de diversos países europeos</i> .....	92
<b>Tabla 9</b> <i>Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de suelos. Antecedentes bibliográficos.</i> .....	96
<b>Tabla 10</b> <i>Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas mediante extracción "on-line" con el sistema cromatográfico. Antecedentes bibliográficos.</i> .....	98
<b>Tabla 11</b> <i>Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas mediante extracción "off-line" con el sistema cromatográfico. Antecedentes bibliográficos.</i> .....	101
<b>Tabla 12</b> <i>Datos estadísticos (<math>p &lt; 0.01</math>) para las curvas de calibrado de 2,4-D y MCPA.</i> .....	121
<b>Tabla 13</b> <i>Precisión del sistema cromatográfico para la determinación de 2,4-D y MCPA (<math>4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>) mediante cromatografía líquida.</i> .....	121
<b>Tabla 14</b> <i>Límites de detección para la determinación de 2,4-D y MCPA por cromatografía líquida.</i> .....	123

<b>Tabla 15</b>	<i>Límites de detección para la determinación de 2,4-D y MCPA por cromatografía líquida en función del volumen de inyección. ....</i>	124
<b>Tabla 16</b>	<i>Efecto de la concentración de la muestra sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando ELL. Límites de detección.....</i>	125
<b>Tabla 17</b>	<i>Efecto del eluyente sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando EFS.....</i>	126
<b>Tabla 18</b>	<i>Efecto de la concentración de la muestra sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando EFS. Límites de detección.....</i>	128
<b>Tabla 19</b>	<i>Recuperación de pesticidas organoclorados, organofosforados y herbicidas fenoxiácidos mediante ELL conjunta. ....</i>	131
<b>Tabla 20</b>	<i>Parámetros iniciales (<math>t_R</math>, <math>k'</math>, <math>\lambda_{max}</math>, <math>\epsilon^0</math>) de los herbicidas fenoxiácidos estudiados. ....</i>	135
<b>Tabla 21</b>	<i>Influencia de la naturaleza del ácido de la fase móvil en la separación de Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP mediante CL en fase reversa C18.....</i>	137
<b>Tabla 22</b>	<i>Parámetros de polaridad de los distintos disolventes utilizados. ....</i>	138
<b>Tabla 23</b>	<i>Influencia de la naturaleza del modificador orgánico sobre la separación de los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna de Microspher C18 de 3 <math>\mu\text{m}</math> y 50 mm.....</i>	139
<b>Tabla 24</b>	<i>Selectividad (<math>4\sigma/k'</math>) del modificador orgánico de la fase móvil sobre los herbicidas fenoxiácidos. ....</i>	139
<b>Tabla 25</b>	<i>Disoluciones patrón de herbicidas fenoxiácidos utilizadas en el estudio de la concentración de modificador orgánico en la fase móvil. ....</i>	140
<b>Tabla 26</b>	<i>Factores de capacidad (<math>\ln k'</math>) de los herbicidas fenoxiácidos en función del porcentaje de modificador orgánico (MeOH) en la fase móvil. ....</i>	141
<b>Tabla 27</b>	<i>Coefficientes de regresión y coeficientes de correlación de la regresión parabólica entre el factor de capacidad y el porcentaje de MeOH de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos.....</i>	142

<b>Tabla 28</b>	<i>Influencia de la concentración de ácido trifluoroacético en la fase móvil sobre la separación de los herbicidas fenoxiácidos en una columna Microspher C18 (50 × 4.6 mm, 3 μm).....</i>	146
<b>Tabla 29</b>	<i>Factores de capacidad de los herbicidas fenoxiácidos en función de la temperatura.....</i>	148
<b>Tabla 30</b>	<i>Coefficientes de regresión y coeficientes de correlación de la regresión parabólica entre el factor de capacidad y la temperatura de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos. ....</i>	150
<b>Tabla 31</b>	<i>Datos estadísticos (<math>p &lt; 0.01</math>) para las curvas de calibrado (altura de pico) de los herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante acoplamiento CL-CL. ....</i>	163
<b>Tabla 32</b>	<i>Precisión del sistema cromatográfico en cuanto a medidas de tiempo de retención, área y altura de picos para los herbicidas fenoxiácidos analizados mediante acoplamiento CL-CL (<math>n = 7</math>). ....</i>	164
<b>Tabla 33</b>	<i>Límites de detección para la determinación de los herbicidas fenoxiácidos mediante acoplamiento CL-CL.....</i>	165
<b>Tabla 34</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la extracción en fase sólida sobre C18. ....</i>	167
<b>Tabla 35</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la ELL con diclorometano en: medio ácido(1) y mediante formación de pares iónicos(2).....</i>	169
<b>Tabla 36</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la ELL con diclorometano en medio ácido. Influencia del número de extracciones. ....</i>	169
<b>Tabla 37</b>	<i>Influencia del pH sobre la EFS de herbicidas fenoxiácidos .....</i>	171
<b>Tabla 38</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos de una muestra de 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de 5 μg l<sup>-1</sup> y EFS C18. Estudio de la etapa de elución. ....</i>	172

<b>Tabla 39</b>	<i>Efecto de la combinación ELL-EFS C18 y de la formación de pares iónicos sobre las recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea. ....</i>	173
<b>Tabla 40</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la extracción en fase sólida sobre C18 .....</i>	175
<b>Tabla 41</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel.....</i>	176
<b>Tabla 42</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano .....</i>	178
<b>Tabla 43</b>	<i>Recuperaciones de patrones de herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante EFS NH<sub>2</sub>. Influencia de la concentración de HAc en el eluyente.....</i>	180
<b>Tabla 44</b>	<i>Recuperaciones de patrones de herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante EFS NH<sub>2</sub>. Influencia del contenido de metanol en el eluyente.....</i>	181
<b>Tabla 45</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel o aminopropilsilano. ....</i>	182
<b>Tabla 46</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua potable obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel.....</i>	186
<b>Tabla 47</b>	<i>Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua subterránea y superficial obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel. ....</i>	188
<b>Tabla 48</b>	<i>Recuperación de los herbicidas fenoxiácidos en diferentes muestras de aguas fortificadas utilizando el procedimiento recomendado. ....</i>	200
<b>Tabla 49</b>	<i>Límites de detección para los herbicidas fenoxiácidos obtenidos mediante el procedimiento recomendado en aguas potables.....</i>	204
<b>Tabla 50</b>	<i>Recuperación de varios herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua potable fortificada a nivel de 5 µg·l<sup>-1</sup> a lo largo del tiempo. ....</i>	205

<b>Tabla 51</b>	<i>Persistencia de los herbicidas fenoxiácidos adsorbidos durante dos semanas sobre un cartucho de EFS C18.</i> .....	206
<b>Tabla 52</b>	<i>Características fisico-químicas más importantes de los herbicidas glifosato y glufosinato</i> .....	228
<b>Tabla 53</b>	<i>Valores del índice GUS para el glifosato en diferentes suelos</i> .....	230
<b>Tabla 54</b>	<i>Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en productos vegetales</i> .....	233
<b>Tabla 55</b>	<i>Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en suelos</i> .....	236
<b>Tabla 56</b>	<i>Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en aguas</i> .....	239
<b>Tabla 57</b>	<i>Datos estadísticos (<math>p &lt; 0.01</math>) para las curvas de calibrado de glifosato, glufosinato y AMPA obtenidas mediante cromatografía líquida.</i> .....	262
<b>Tabla 58</b>	<i>Repetibilidad del sistema cromatográfico para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida (<math>n=10</math>)</i> .....	263
<b>Tabla 59</b>	<i>Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida. (mezcla patrón de <math>28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math>) (<math>n=7</math>)</i> .....	263
<b>Tabla 60</b>	<i>Límites de detección para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA por cromatografía líquida</i> .....	264
<b>Tabla 61</b>	<i>Datos estadísticos (<math>p &lt; 0.01</math>) para las curvas de calibrado de glufosinato obtenidas mediante cromatografía líquida con columnas acopladas</i> .....	276
<b>Tabla 62</b>	<i>Recuperaciones de glufosinato en aguas analizadas mediante la aplicación del procedimiento recomendado</i> .....	281
<b>Tabla 63</b>	<i>Datos estadísticos (<math>p &lt; 0.01</math>) para las curvas de calibrado de glifosato y AMPA obtenidas mediante cromatografía líquida con columnas acopladas</i> ..	296
<b>Tabla 64</b>	<i>Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas (mezcla patrón de <math>200 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math>) (<math>n=7</math>)</i> .....	297

<b>Tabla 65</b>	<i>Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas (mezcla patrón de 4 ng·ml<sup>-1</sup>) (n=7).....</i>	297
<b>Tabla 66</b>	<i>Recuperaciones de glifosato y AMPA en aguas superficiales analizadas mediante la aplicación de los procedimientos recomendados (n=5).....</i>	309
<b>Tabla 67</b>	<i>Recuperaciones de glifosato y AMPA en extractos de suelos analizados mediante la aplicación del procedimiento recomendado para glifosato .....</i>	316

## INDICE DE FIGURAS.

	<u>Pag.</u>
<b>Figura 1</b> <i>Esquema general de las diferentes etapas de un procedimiento de ARP.....</i>	8
<b>Figura 2</b> <i>Factores que influyen en el transporte de los pesticidas a través del suelo.....</i>	15
<b>Figura 3</b> <i>Representación esquemática de un sistema cromatográfico acoplado.....</i>	29
<b>Figura 4</b> <i>Representación esquemática de la diferencia de selectividad entre las técnicas acopladas PC-CL y CL-CL.....</i>	34
<b>Figura 5</b> <i>Representación esquemática de un acoplamiento CL-CL.....</i>	39
<b>Figura 6</b> <i>Etapas de un procedimiento con acoplamiento CL-CL. (A) Inyección. (B) Purificación. (C) Transferencia. (D) Análisis. ....</i>	41
<b>Figura 7</b> <i>Representación esquemática del diseño para la determinación del volumen de purificación.....</i>	43
<b>Figura 8</b> <i>Representación esquemática del diseño para la determinación del volumen de transferencia.....</i>	44
<b>Figura 9</b> <i>Estructura química de los diferentes herbicidas fenoxiacéticos.....</i>	72
<b>Figura 10</b> <i>Estructura química de los herbicidas MCPA-Tioetil y 2,4-DES.....</i>	75
<b>Figura 11</b> <i>Estructura química de los herbicidas fenoxipropiónicos.....</i>	78
<b>Figura 12</b> <i>Estructura química de los derivados fenoxibutíricos.....</i>	80
<b>Figura 13</b> <i>Ruta de degradación del herbicida fenoxiácido 2,4-D hasta especies inorgánicas.....</i>	87
<b>Figura 14</b> <i>Ruta de degradación del herbicida fenoxiácido MCPA hasta especies inorgánicas.....</i>	88
<b>Figura 15</b> <i>Descomposición fotoquímica del 2,4-D hasta la formación de ácidos húmicos.....</i>	89
<b>Figura 16</b> <i>Conjugación del 2,4-D hidroxilado con glucosa y formación de glucósidos.....</i>	90

<b>Figura 17</b>	<i>Cromatograma de una mezcla de patrones de 2,4-D y MCPA de 4 <math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math> ....</i>	119
<b>Figura 18</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas tanto en área como altura de pico para 2,4-D y MCPA mediante cromatografía líquida. ....</i>	120
<b>Figura 19</b>	<i>Efecto del volumen de elución sobre la recuperación de los herbicidas MCPA y 2,4-D utilizando EFS.....</i>	127
<b>Figura 20</b>	<i>Efecto del volumen de muestra sobre la recuperación de los herbicidas MCPA y 2,4-D utilizando EFS.....</i>	129
<b>Figura 21</b>	<i>Esquema del procedimiento recomendado para el análisis de residuos de los herbicidas 2,4-D y MPCA.....</i>	132
<b>Figura 22</b>	<i>Esquema del procedimiento de análisis conjunto de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados y herbicidas fenoxiácidos.....</i>	134
<b>Figura 23</b>	<i>Representación esquemática del procedimiento de cálculo del volumen y asimetría de un pico cromatográfico. ....</i>	137
<b>Figura 24</b>	<i>Diagrama <math>\ln k'</math> frente al porcentaje de MeOH en la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos.....</i>	141
<b>Figura 25</b>	<i>Diagrama <math>\ln k'</math> frente al pH (ácido tricloroacético) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Chompher B C18 de 100 mm.....</i>	144
<b>Figura 26</b>	<i>Diagrama <math>\ln k'</math> frente al pH (ácido fosfórico) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Chompher B C18 de 100 mm. ....</i>	145
<b>Figura 27</b>	<i>Diagrama <math>\ln k'</math> frente al pH (ácido trifluoroacético) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Microspher C18 (50 <math>\times</math> 4.6 mm, 3 <math>\mu\text{m}</math>). ....</i>	146
<b>Figura 28</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos (Mezcla III).....</i>	147
<b>Figura 29</b>	<i>Diagrama de <math>\ln k'</math> de los herbicidas fenoxiácidos frente a la temperatura.. ....</i>	149
<b>Figura 30</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos (Mezcla III).....</i>	151

<b>Figura 31</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos al nivel de 0.5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math> .....</i>	153
<b>Figura 32</b>	<i>Representación esquemática secuencial del camino recorrido por los analitos durante la aplicación de la técnica de columnas acopladas .....</i>	152
<b>Figura 33</b>	<i>Representación esquemática de un diseño experimental de cromatografía líquida con columnas acopladas que permite realizar elución con gradientes escalonados en ambas columnas. ....</i>	154
<b>Figura 34</b>	<i>Representación esquemática del equipo básico de cromatografía líquida con columnas acopladas.....</i>	155
<b>Figura 35</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos de 0.5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido con C-1 conectada directamente al detector .....</i>	157
<b>Figura 36</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos de 0.5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante acoplamiento CL-CL .....</i>	158
<b>Figura 37</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para Dicamba, 2,4-D y MCPA mediante acoplamiento CL-CL.....</i>	161
<b>Figura 38</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-T mediante acoplamiento CL-CL.....</i>	162
<b>Figura 39</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante acoplamiento CL-CL. ....</i>	162
<b>Figura 40</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18.....</i>	168
<b>Figura 41</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por ELL.....</i>	170
<b>Figura 42</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido mediante lavado con eter etílico y posterior EFS C18 .....</i>	174
<b>Figura 43</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel.....</i>	177

<b>Figura 44</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano</i> .....	179
<b>Figura 45</b>	<i>Esquema general del procedimiento de análisis de herbicidas fenoxiácidos en aguas mediante acoplamiento CL-CL</i> .....	185
<b>Figura 46</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua potable fortificada a nivel de (A) 5 y (B) 0.5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	187
<b>Figura 47</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea fortificada a nivel de 0.5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	189
<b>Figura 48</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de 5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	190
<b>Figura 49</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de 5 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano (A) e isooctano (B)</i> .....	192
<b>Figura 50</b>	<i>Cromatogramas obtenidos conectando directamente C-1 (ISRP, 10x3mm, 5 <math>\mu\text{m}</math>) al detector UV para el cálculo del volumen de purificación y de transferencia</i> .....	195
<b>Figura 51</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de 2 <math>\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano/isooctano (20:80)</i> .....	196
<b>Figura 52</b>	<i>Esquema del procedimiento final recomendado para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas</i> .....	198
<b>Figura 53</b>	<i>Esquema del diseño experimental de acoplamiento CL-CL para la determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas</i> .....	199

<b>Figura 54</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de <math>0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	201
<b>Figura 55</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea fortificada a nivel de <math>0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	202
<b>Figura 56</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua potable fortificada a nivel de <math>0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	203
<b>Figura 57</b>	<i>Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de <math>2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel</i> .....	209
<b>Figura 58</b>	<i>Esquema del diseño experimental de acoplamiento CL-CL para la determinación conjunta de residuos de herbicidas fenoxiácidos y dicamba en muestras de aguas</i> .....	208
<b>Figura 59</b>	<i>Biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Modo de acción del herbicida glifosato</i> .....	224
<b>Figura 60</b>	<i>Reacción de derivatización postcolumna del glifosato mediante el reactivo OPA/2-ME y representación esquemática del equipo usado para la determinación de glifosato y AMPA</i> .....	245
<b>Figura 61</b>	<i>Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y el FMOC</i> .....	247
<b>Figura 62</b>	<i>Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y PITC</i> .....	247
<b>Figura 63</b>	<i>Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y DNP</i> .....	248
<b>Figura 64</b>	<i>Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y el cloruro de tosilo</i> .....	248
<b>Figura 65</b>	<i>Procedimiento de derivatización precolumna con FMOC para el análisis de glifosato y glufosinato en muestras de agua (eliminación del exceso de reactivo por ELL)</i> .....	255
<b>Figura 66</b>	<i>Variación del tiempo de retención en función del pH de la fase móvil para glufosinato, glifosato y AMPA</i> .....	258

<b>Figura 67</b>	<i>Variación del tiempo de retención en función de la concentración de tampón fosfato de la fase móvil para glufosinato, glifosato y AMPA. ....</i>	259
<b>Figura 68</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de 30 ng·ml<sup>-1</sup> .....</i>	260
<b>Figura 69</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en área de pico para glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida.....</i>	261
<b>Figura 70</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida.....</i>	262
<b>Figura 71</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de 14 ng·ml<sup>-1</sup> .....</i>	265
<b>Figura 72</b>	<i>Esquema del procedimiento de derivatización del glufosinato, con posterior dilución usando disolución tampón de borato .....</i>	269
<b>Figura 73</b>	<i>Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia para una muestra de agua fortificada con glufosinato a nivel de 100 µg·l<sup>-1</sup> obtenida tras derivatización con FMOC. (A) Inyección de 330 µl de disolución sin diluir (B) Inyección de 1 ml de disolución diluida tres veces con tampón borato .....</i>	270
<b>Figura 74</b>	<i>Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de glufosinato a nivel de 1 µg·ml<sup>-1</sup> obtenidos tras derivatización con FMOC y dilución por tres con tampón borato .....</i>	271
<b>Figura 75</b>	<i>Cromatogramas de una disolución patrón de glufosinato de 1 ng·ml<sup>-1</sup> obtenidos mediante CL-CL. (A) M-2: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05M (pH 5.5)/CH<sub>3</sub>CN (65:35), (B) M-2: KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M (pH 5.5)/CH<sub>3</sub>CN (65:35).....</i>	273
<b>Figura 76</b>	<i>Curva de calibrado obtenida en altura de pico para glufosinato mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	275
<b>Figura 77</b>	<i>Curva de calibrado obtenida en área de pico para glufosinato mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	276
<b>Figura 78</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glufosinato de 1 ng·ml<sup>-1</sup> obtenido mediante CL-CL .....</i>	277

<b>Figura 79</b>	<i>Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el glufosinato en muestras de agua</i> .....	278
<b>Figura 80</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glufosinato de 10 ng·ml<sup>-1</sup> obtenido mediante CL-CL</i> .....	280
<b>Figura 81</b>	<i>Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato al nivel de 1 µg·l<sup>-1</sup> obtenido mediante el procedimiento recomendado y acoplamiento CL-CL</i> .....	282
<b>Figura 82</b>	<i>Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato al nivel de 0.25 µg·l<sup>-1</sup> obtenido mediante el procedimiento recomendado y cromatografía líquida con columnas acopladas. (Cromatograma obtenido tras la substracción del blanco)</i> .....	283
<b>Figura 83</b>	<i>Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato a nivel de 0.1 µg·l<sup>-1</sup> obtenido mediante el procedimiento recomendado y cromatografía líquida con columnas acopladas. (La muestra, previamente, se concentró cinco veces por evaporación)</i> .....	285
<b>Figura 84</b>	<i>Efecto de la dilución posterior a la reacción de derivatización con FMOC para un patrón de AMPA de 0.4 µg·ml<sup>-1</sup>. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia: (A) sin diluir (40% acetonitrilo), (B), dilución por cuatro (10% acetonitrilo) y (C) dilución por ocho (5% de acetonitrilo)</i> .....	288
<b>Figura 85</b>	<i>Efecto de la dilución posterior a la reacción de derivatización con FMOC para un patrón de glifosato de 0.4 µg·ml<sup>-1</sup>. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia: (A) sin diluir (40% acetonitrilo), (B), dilución por cuatro (10% acetonitrilo) y (C) dilución por ocho (5% de acetonitrilo)</i> .....	289
<b>Figura 86</b>	<i>Esquema del procedimiento de derivatización del glifosato y AMPA, con posterior dilución usando disolución tampón de borato</i> .....	290
<b>Figura 87</b>	<i>Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de glifosato (0.4 µg·ml<sup>-1</sup>) obtenido tras derivatización con FMOC y posterior dilución por ocho con tampón borato</i> .....	291

<b>Figura 88</b>	<i>Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de AMPA (0.4 <math>\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}</math>) obtenido tras derivatización con FMOC y posterior dilución por cuatro con tampón borato.....</i>	292
<b>Figura 89</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato y AMPA de 40 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .</i>	294
<b>Figura 90</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en área de pico para glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	295
<b>Figura 91</b>	<i>Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	296
<b>Figura 92</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato de 4 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	299
<b>Figura 93</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de AMPA de 0.4 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	300
<b>Figura 94</b>	<i>Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el glifosato en muestras de agua .....</i>	302
<b>Figura 95</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato de 4 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas .....</i>	303
<b>Figura 96</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de 40 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.....</i>	304
<b>Figura 97</b>	<i>Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el AMPA en muestras de agua.....</i>	306
<b>Figura 98</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de AMPA de 4 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.....</i>	307
<b>Figura 99</b>	<i>Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de 40 <math>\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}</math> obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.....</i>	308

<b>Figura 100</b>	<i>Cromatograma de un agua superficial (Río Mijares) fortificada con AMPA al nivel de <math>0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante acoplamiento CL-CL.....</i>	310
<b>Figura 101</b>	<i>Esquema del procedimiento final de derivatización precolumna para el glifosato en muestras de agua .....</i>	311
<b>Figura 102</b>	<i>Cromatograma de un agua superficial (Río Mijares) fortificada con glifosato al nivel de <math>0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> obtenido mediante acoplamiento CL-CL .....</i>	312
<b>Figura 103</b>	<i>Cromatogramas de dos aguas superficiales (I) El Clot de la Mare de Déu (II) Río Mijares obtenidos mediante acoplamiento CL-CL. 1 Muestras sin fortificar. 2 Muestras fortificadas a <math>4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}</math> .....</i>	314
<b>Figura 104</b>	<i>Cromatogramas de dos extractos de suelos (A) T-10 (B) GC-30 obtenidos mediante acoplamiento CL-CL. 1 Muestras sin fortificar. 2 Muestras fortificadas a <math>40 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}</math> .....</i>	317
<b>Figura 105</b>	<i>Cromatograma de un extracto de suelo fortificado a <math>40 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}</math> obtenido mediante acoplamiento CL-CL.....</i>	318



## **A.- INTRODUCCION GENERAL.**

A. I.- ANALISIS DE RESIDUOS DE PESTICIDAS.

El uso generalizado de los pesticidas en la agricultura, así como en márgenes de vías férreas y carreteras, o también para uso doméstico, puede llegar a producir un empobrecimiento de la biodiversidad, contaminar las aguas subterráneas y superficiales y amenazar la salud humana tanto por exposición directa como a través de sus residuos en alimentos o en aguas potables.

Es de gran importancia disponer de datos fiables sobre los niveles de residuos de pesticidas en distintos tipos de muestras con el fin de poder valorar correctamente estos riesgos.

La ciencia de los pesticidas es un campo muy dinámico en el que continuamente se desarrollan nuevos compuestos con el fin de combatir nuevas plagas. Por otro lado, la creciente preocupación por los riesgos toxicológicos de los pesticidas obliga a desarrollar productos de menor persistencia y toxicidad y fácilmente degradables en el medio ambiente. Por ejemplo, se ha producido un claro desplazamiento en el uso de pesticidas apolares de larga persistencia, como compuestos organoclorados, que se acumulan en la fracción lipídica de la cadena alimenticia humana, hacia el uso de pesticidas más polares y más fácilmente degradables como los *N*-metilcarbamatos, entre otros. Por consiguiente, las metodologías analíticas deben estar en continua evolución con el fin de adaptarse a la situación actual en cuanto al uso de pesticidas modernos. Además, la utilización de pesticidas polares, con mayor movilidad en el medio ambiente, conlleva un incremento en la demanda de análisis de muestras de aguas subterráneas y superficiales, relacionadas con el suministro de agua potable.

El desarrollo de nuevos métodos y la mejora de las metodologías analíticas ya existentes en cuanto a su calidad, campo de aplicación y, por último, aunque no menos importante, su relación coste/eficacia, es un proceso en continua evolución.

La principal tarea de la disciplina analítica "análisis de residuos de pesticidas" (ARP), es proporcionar métodos fiables, rápidos y económicos para la identificación y cuantificación de los más de 400 pesticidas que pueden aparecer en una gran variedad de matrices, así como de numerosos productos de transformación que se originan en el medio ambiente. Con anterioridad a la década de los 60, la mayoría de los análisis se llevaban a cabo para pesticidas individuales, utilizando métodos relativamente poco específicos como espectrofotometría UV-Vis, métodos de halógenos totales (sólo para pesticidas organoclorados) y técnicas bioquímicas, que implicaban la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (sólo para pesticidas organofosforados).

El ARP sufrió una revolución al final de los 60 con la introducción de la Cromatografía de Gases (CG). El uso de esta técnica hizo posible separar un elevado

número de pesticidas e inició el desarrollo de los métodos multiresiduales. La introducción de la CG capilar a finales de los 70 y la posibilidad de disponer de detectores selectivos y sensibles, contribuyó enormemente al rápido aumento de popularidad de los procedimientos basados en CG. Las numerosas ventajas de esta técnica y el hecho de que los laboratorios de ARP estén, por razones históricas, generosamente dotados de cromatógrafos de gases, convierten, hoy en día, a la CG capilar en la principal técnica analítica para este tipo de análisis.

Desde la introducción, alrededor de 1980, de la Cromatografía Líquida (CL) en el campo del ARP, su aplicación se ha extendido considerablemente. Como cabe esperar, la CL se utiliza especialmente para la determinación de trazas de aquellos pesticidas que no pueden analizarse directamente por CG debido a su baja volatilidad, alta polaridad y/o inestabilidad térmica. Ejemplos típicos son los herbicidas clorofenoxiácidos, carbamatos y fenilureas. Estos analitos pueden separarse y detectarse eficazmente por medio de CL, mientras que su análisis por CG requiere, generalmente, un procedimiento complicado de derivatización previo a la inyección. La disponibilidad de detectores de CL más selectivos, como fluorescencia o electroquímicos, así como el gran avance experimentado por los detectores de barrido de diodos, realza el valor práctico de esta técnica de separación.

Desde un punto de vista económico y práctico, los Métodos Multiresiduales (MMR) presentan la ventaja de la detección y determinación cuantitativa de una serie de pesticidas en una única inyección, con lo que se reduce considerablemente el coste del análisis. Sin embargo, hay una serie de problemas asociados a este tipo de métodos:

- Existencia de muy diferentes tipos de muestras de composición muy variada. Las actuales metodologías se centran principalmente en el desarrollo de métodos para el análisis de diferentes pesticidas en una única matriz y tienden a desestimar el aspecto multimatriz. Para diseñar un método multimatriz adecuado se debería realizar un esfuerzo considerable en un futuro próximo.
- Los Límites Máximos de Residuos (LMR) de pesticidas en aguas potables están regulados por la Directiva de la Comunidad Europea para aguas de abastecimiento urbano (CEE, 1980), que establece que la concentración de pesticidas y compuestos relacionados no debe exceder el nivel de  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (ppb) por compuesto individual y  $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para el total de pesticidas. Estos mismos niveles se fijan en la Reglamentación Técnico-Sanitaria Española (BOE, 1990). Para alcanzar estos niveles de concentración se necesitan métodos muy sensibles, difíciles de conseguir en muchas ocasiones mediante la aplicación de MMR. Por otro lado, los LMR en alimentos se basan en evaluaciones científicas que estiman la ingesta diaria aceptable y el nivel de

residuo esperado cuando un pesticida se usa según una buena práctica agrícola. Como resultado, los LMR pueden variar varios órdenes de magnitud, lo cual genera un serio problema en el desarrollo de MMR de aplicación útil.

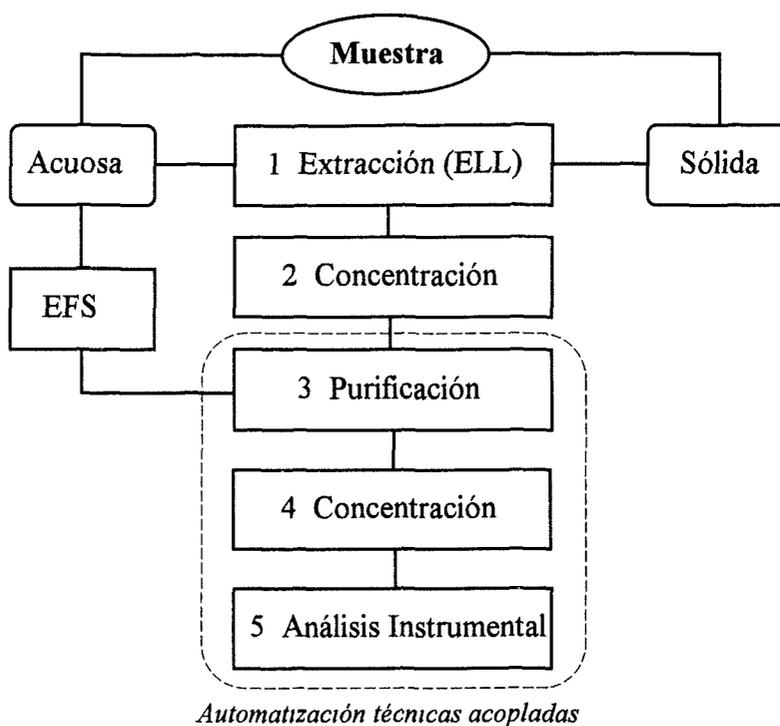
- Las diferencias en las propiedades físico-químicas de los pesticidas, como polaridad, volatilidad, estabilidad térmica y, ocasionalmente, el peso molecular, puede crear problemas en el desarrollo de MMR, que únicamente son aplicables al análisis de pesticidas de propiedades semejantes.

Todos estos problemas conducen a que los MMR existentes no puedan determinar todos los pesticidas utilizados. Por ejemplo, de acuerdo con la Food and Drug Administration (FDA) de los EEUU, sólo se pueden analizar mediante MMR 163 pesticidas de un total de 316 para los que ha fijado LMR.

Por consiguiente, para ese gran número de pesticidas que quedan fuera de los métodos multiresiduales, se deben diseñar Métodos de Residuo Individual (MRI) que sean capaces de determinar un pesticida individual, así como en muchas ocasiones, sus metabolitos y productos de transformación.

Evidentemente, los MRI no se consideran adecuados para realizar control rutinario, si este pesticida puede formar parte de un MMR ya existente; por consiguiente, cuando se necesita controlar un nuevo pesticida es necesario evaluar su comportamiento respecto a MMR conocidos. En caso negativo, se debe utilizar un MRI, desarrollado específicamente para el mismo, que permita una determinación rápida, sensible y selectiva del analito y sus metabolitos.

En la **Figura 1** se muestra un esquema del procedimiento general utilizado en ARP (Hogendoorn, 1993a).



**Figura 1.** Esquema general de las diferentes etapas de un procedimiento de ARP.

Cuando se analizan muestras sólidas, se pueden considerar cinco etapas generales:

- 1) extracción de los pesticidas de la muestra, generalmente por un disolvente orgánico
- 2) concentración del extracto por evaporación del disolvente orgánico
- 3) purificación del extracto por una gran variedad de técnicas
- 4) evaporación de la fracción recogida en la etapa anterior y redisolución en un pequeño volumen de un disolvente compatible con el sistema cromatográfico
- 5) análisis instrumental de una alícuota del extracto final y tratamiento de datos

Para una muestra líquida, la primera y segunda etapa pueden omitirse cuando se utiliza Extracción en Fase Sólida (EFS). En la mayoría de los procedimientos que aparecen en la bibliografía, los pasos 1-4 se realizan manualmente. Desafortunadamente, las operaciones manuales son más bien tediosas y largas, y conllevan errores, como pérdidas por volatilización o contaminación por la atmósfera del laboratorio, así como el uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos tóxicos.

Las características globales del procedimiento, así como la capacidad de análisis de muestras puede mejorarse automatizando las diferentes etapas que se observan en la **Figura 1**.

Generalmente, la automatización se dirige hacia la etapa de purificación. Esta implica una (pre)separación de los analitos de la gran cantidad de interferentes de la matriz, y se suele llevar a cabo con técnicas de baja resolución como cromatografía líquida en columna abierta, EFS sobre cartuchos desechables o Cromatografía de Exclusión por Tamaños.

En comparación con las muestras sólidas, las acuosas son más apropiadas para un procesado desatendido. Existen sofisticados sistemas de EFS que permiten automatizar las etapas 1 y 2, y, en ocasiones, hasta la etapa de purificación (etapa 3); la aplicación de técnicas de "precolumn-switching" puede proporcionar un procedimiento analítico completamente automatizado (etapas 1-5). De todas formas, para cualquier tipo de muestra, los pasos 3-5 se pueden automatizar utilizando sistemas cromatográficos acoplados.

La aplicación de técnicas cromatográficas acopladas presenta numerosas ventajas en el desarrollo de métodos ARP, permitiendo, además, la automatización de las etapas 3-5, e incluso la obtención de métodos automatizados completos (Hogendoorn, 1993a), tal como se indica en el apartado III de esta INTRODUCCION GENERAL.

A. II.- CONTAMINACION DE AGUAS POR PESTICIDAS.  
PROBLEMATICA DE LOS HERBICIDAS POLARES

La contaminación de aguas por pesticidas es un fenómeno que ocasiona gran preocupación social por las implicaciones toxicológicas que conlleva. Entre los distintos tipos de muestra que cabe considerar, las aguas subterráneas son motivo de especial atención ya que se utilizan, generalmente, para el suministro de agua potable en numerosas poblaciones.

El movimiento de los pesticidas hacia el agua subterránea es un fenómeno complejo en el que influyen numerosos factores, y que se ve afectado, en gran medida, tanto por la capa edáfica (en la que existe gran actividad biológica) como por la zona no saturada. Son numerosos los procesos que tienen lugar antes de que un pesticida alcance el agua subterránea. De modo general, se pueden resumir como: adsorción/desorción, degradación, volatilización, arrastre por escorrentía superficial y absorción por las plantas (Hernández, 1993).

Todos estos procesos influyen en el comportamiento de los pesticidas en el Medio Ambiente. La ausencia o presencia de pesticidas en el agua subterránea viene determinada, en gran medida, por la importancia de estos procesos, de modo que el suelo y la zona no saturada actúan generalmente como barrera protectora que evita, en la mayoría de los casos, la contaminación de las aguas.

Todos los procesos mencionados se pueden resumir en tres, tal como se indica a continuación (Hernández, 1993):

- 1) **Retención** del pesticida (*debido a la adsorción por el suelo*), la cual no afecta a la cantidad total de pesticida presente en el suelo, pero sí que puede disminuir e incluso llegar a eliminar la cantidad disponible para el transporte. Por ello, los procesos de adsorción pueden retardar o retener los pesticidas en su movimiento hacia el acuífero.
- 2) **Transformación**, mediante cambios en su estructura química (reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, sustitución o eliminación de grupos funcionales, complejación con iones metálicos, polimerización, etc.)

Los pesticidas también pueden sufrir la rotura de su estructura en fragmentos dando lugar a compuestos inorgánicos como productos finales de reacción ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , haluros, amonio, fosfato, etc.). En este caso, el proceso global se conoce como **degradación**, siendo ésta la única vía para que un pesticida sea totalmente eliminado del medio ambiente. Generalmente, se usa el término transformación para indicar todos los cambios sufridos en la estructura química del pesticida, sean del tipo que sean.

Los pesticidas se pueden transformar por vía química, fotoquímica o bioquímica, siendo ésta última la predominante en suelos, debido a la actividad de microorganismos. La

degradación fotoquímica por efecto de la radiación solar puede llegar a ser de gran importancia en áreas de altas temperaturas y de intensa actividad solar.

- 3) **Procesos de transporte**, siendo el más importante el transporte vertical de los pesticidas por el agua a lo largo de la zona no saturada hasta llegar al agua subterránea. Sin embargo, hay otros modos de transporte, como son el transporte lateral; el transporte a la atmósfera por volatilización, que es función de la presión de vapor del pesticida y depende, en gran medida, de la temperatura y del viento; y el arrastre por escorrentía superficial por el agua de lluvia o de riego, que depende fundamentalmente del tiempo transcurrido entre la aplicación del pesticida y las lluvias.

Por otro lado, las características de la zona no saturada influyen decisivamente en el movimiento de los pesticidas hacia el agua subterránea y, por tanto, en las posibilidades de contaminación de la misma. En este sentido, cabe destacar:

- Contenido en arcillas y materia orgánica (afectan a la retención y transformación).
- Textura, porosidad, estructura (afectan a los procesos de transporte).
- Humedad, pH, temperatura (afectan a la transformación).

Además de todos los factores indicados, que ejercen una notable influencia en el comportamiento de los pesticidas en el suelo y subsuelo, hay que mencionar las propiedades físico-químicas del propio pesticida, ya que su movilidad así como su persistencia en el medio son de vital importancia al considerar las posibilidades de contaminación de un agua por pesticidas.

En la **Figura 2**, se resumen los factores que influyen en el transporte de los pesticidas, desde el momento de su aplicación hasta su llegada al agua subterránea.

**I. PESTICIDA.**

- Propiedades químicas: estructura, solubilidad, volatilidad.
- Métodos de aplicación: formulados, dosis, técnicas de aplicación.
- Degradación: rutas de degradación, formación de metabolitos.

**II. SUELO.**

- Propiedades: tipo y cantidad de materia orgánica, arcillas, materiales amorfos, pH, estructura, permeabilidad.
- Condiciones: humedad, aireación, estado de los nutrientes, actividad microbiana, heterogeneidad.
- Geología: topografía, pendiente, drenajes, nivel piezométrico.

**III. PLANTAS.**

- Tipo de cultivo.
- Estado de crecimiento.
- Sistema de raíces y rizosfera.

**IV. MEDIO AMBIENTE.**

- Temperatura.
- Precipitaciones.
- Vientos.
- Nivel de radiación solar.

**Figura 2.** *Factores que influyen en el transporte de los pesticidas a través del suelo.*

Entre los distintos tipos de pesticidas usados en la actualidad, los herbicidas son uno de los más problemáticos por su aplicación directa al suelo y por sus mayores posibilidades de contaminar las aguas subterráneas.

El problema del control de las malas hierbas ha acompañado al hombre desde que se dedicó a la agricultura. Los métodos manuales de control se reemplazaron por la rotación y el desarrollo de la mecanización en la agricultura, pero no fue hasta la aparición de los herbicidas orgánicos cuando el agricultor tuvo realmente el control sobre las malas hierbas en los cultivos.

Los herbicidas se pueden clasificar de muy diversas maneras, según su grupo químico, su selectividad, su modo de aplicación o de acción, etc.

Por lo que respecta a la selectividad, los herbicidas pueden ser no selectivos o totales, que eliminan toda la vegetación, o selectivos, que controlan algunas plantas (las malas hierbas) mientras que dejan inalteradas a otras (los cultivos).

Según su modo de acción, los herbicidas se distinguen en herbicidas de contacto, que afectan sólo a aquellas partes de la planta sobre las que se aplican, o herbicidas de traslocación, que son transportados tanto por el floema como el xilema, a otras partes de la planta.

Los herbicidas también se pueden clasificar según su modo de aplicación, al suelo o a las hojas.

Pero es la clasificación según su estructura química la más utilizada. Según esta clasificación, los herbicidas se separan en (Kirkwood, 1987):

- 1) **Compuestos inorgánicos.** Un gran número de sales inorgánicas se han usado como herbicidas, tanto selectivos como totales. Uno de los primeros en utilizarse fue el *sulfato de cobre* ( $\text{CuSO}_4$ ), ya citado en 1896. También se ha utilizado el *ácido sulfúrico* ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ), el *clorato sódico* ( $\text{NaClO}_3$ ) y el *metaborato sódico* ( $\text{NaBO}_2$ ).
- 2) **Ácidos haloalcanoicos.** Se introdujeron en 1947 con el *ácido tricloroacético*, seguido en 1953 del *dalapón* (ácido 2,2-dicloropropiónico) y del *metil-clorfenprop* en 1968.
- 3) **Ácidos fenoxiácidos.** Este grupo está formado por los fenoxiacéticos, fenoxipropiónicos y fenoxibutíricos. Los fenoxiacéticos comprenden el *2,4-D*, *MCPA* y *2,4,5-T*, introducidos alrededor de 1945, mientras que los propiónicos, *2,4-DP* (diclorprop), *MCP* (mecoprop) y *2,4,5-TP* (fenoprop), lo fueron en 1955-1960. Los fenoxibutíricos, *2,4-DB* y *MCPB*, fueron comercializados en 1954-57.
- 4) **Ácidos aromáticos.** Esta constituido por el ácido *2,3,6-triclorobenzoico* (TBA), usado desde 1954, *cloramben* (ácido 3-amino-2,5-diclorobenzoico), en 1958, y *dicamba* (ácido 3,6-dicloro-*o*-anísico), en 1965.
- 5) **Amidas.** Se introdujeron en 1950 con el *naptalam* (ácido *N*-1-naftilftalámico), seguido de la *difenamida* (*N,N*-dimetildifenilacetamida) en 1960. Más tarde se han comercializado otras como *propizamida*, *butam*, *benzamizol* y *diflufenicam*.
- 6) **Nitrilos.** Se pueden dividir en dos grupos según su modo de acción; por un lado el *diclobenilo* (2,6-diclorobenzonitrilo) introducido en 1960, de aplicación al suelo, y por otro lado, el *ioxinilo* (4-hidroxi-3,5-diyodobenzonitrilo) y *bromoxinilo* (3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrilo), introducidos en 1963, de aplicación foliar. A este último grupo también pertenece el *bromofenoxim*.

7) **Anilidas.** Se pueden subdividir en tres grupos.

Grupo 1. Formado por *pentanoclor* (1958), *propanilo* (1960) y *monalida* (1963).

Grupo 2. Constituido por *propaclor* (1965), *alaclor* (1966), *butaclor* (1969), *metolaclor* (1974), *dimetaclor* (1977) y *metazaclor* (1979).

Grupo 3. Representado por *benzoilprop-etilo* (1969), *flamprop-isopropilo* (1972) y *flamprop-metilo* (1974).

8) **Nitrofenoles.** El *DNOC* (4,6-dinitro-*o*-cresol) se introdujo en 1932. Posteriormente se han comercializado el *dinoseb* (2-*sec*-butil-4,6-dinitrofenol) en 1958 y *dinoterb* (2-*ter*-butil-4,6-dinitrofenol) en 1967.

9) **Nitrofenil éteres.** Están formados por *nitrofen* (2,4-diclorofenil 4-nitrofenil éter), introducido en 1964, *fluorodifen* (1968), *bifenox* (1970), *clornitrofen* (1978), *clometoxifen* (1978) y *oxifluorfen* (1980).

10) **Nitroanilinas.** Se introdujeron en 1960 con la *trifluralina* ( $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluorometil-2,6-dinitro-*N,N*-dipropil-*p*-toluidina), seguida por *nitralina* (1966), *isopropalina* (1969) *orizalina* (1969), *profluralina* (1970), *butralina* (1971), *dinitramina* (1971), *etalfluralina* (1974) y *pendimetalina* (1974).

11) **Carbamatos.** Se pueden subdividir en dos grupos.

Carbamatos. Formado por *profam* (1946), *clorprofam* (1951), *barban* (1958), *clorbufam* (1958), *asulam* (1968), *fenmedifam*, *desmedifam* y *fenisofam* (1968-78).

Tiocarbamatos. Constituido por *EPTC* (1954), *vernolato* (1954), *sulfalato* (1954), *pebulato* (1959), *dialato* (1960), *trialato* (1961), *butilato* (1962), *cicloato* (1963), *molinato* (1967), *tiobencarb* (1970), *tiocarbazilo* (1972).

12) **Fenilureas.** Se introdujeron en 1950 con la *dicloral urea*, a la que siguieron *monuron* (1952), *diuron* (1954), *fenuron* (1957), *neburon* (1957), *monolinuron* (1958), *cicluron* (1958), *fluometuron* (1960), *cloroxuron* (1960), *linuron* (1960), *clorbromuron* (1961), *metobromuron* (1963), *siduron* (1964), *buturon* (1966), *benztiazuron* (1966), *metoxuron* (1968), *metabenztiiazuron* (1968), *clortoluron* (1969), *difenoxuron* (1970), *isoproturon* (1972), *tiazafluron* (1972), *isocarbamida* (1973), *butidazol* (1974) y *tebutiuron* (1974).

- 13) **Compuestos Nitrogenados Heterocíclicos.** A su vez, los podemos subdividir en varios subgrupos:

Triazinas. Desde 1956, se han desarrollado un gran número de triazinas, principalmente por Ciba Geigy AG, como son *simazina* (1956), *atrazina* (1958), *prometona* (1959), *propazina* (1962), *prometrina* (1962), *desmetrina* (1964), *ametrina* (1964), *metoprotrina* (1964), *terbutilazina* (1966), *terbutrina* (1966), *secbumetona* (1966), *terbumetona* (1966), *aziprotrina* (1967), *demetametrina* (1969), *cianazina* (1971), *dipropetrina* (1971), *trietazina* (1972), *prociazina* (1972), *metribuzina* (1971) y *metamitrona* (1975).

Piridinas. Las más conocidas son *diquat* (1957) y *paraquat* (1958). Posteriormente se desarrollaron *picloram* (1963), *triclopir* (1970), *dietamquat* (1975) y *fluridona* (1976)

Piridazinas. En 1962 se introdujo la *cloridazona* o *pirazona*, seguida de *norflurazona* (1974) y *piridato* (1976).

Pirimidinas o uracilos. Los uracilos se comercializaron en 1963 con el *bromacilo* y *terbacilo*. Posteriormente, en 1964 se introdujo el *lenacilo*.

Otros. Este grupo de herbicidas presenta una gran variedad de estructuras químicas y está representado por *endotal* (1954), *aminotriazol* (1955), *benazolina* (1965), *bentazona* (1968), *metazol* (1968), *oxadiazona* (1969), *difenzoquat* (1973), *isometiozina* (1975) y *etofumesato* (1980)

- 14) **Compuestos organoarsenicales.** Se introdujeron en 1956 como sales del *ácido metilarsénico* (MMA); en 1958 se introdujo el *ácido cacodílico*.
- 15) **Compuestos organofosforados.** Desde 1964 se han comercializado un gran número de herbicidas fosforados, como *bensulida* (1964), *piperofos* (1969), *butamifos* (1970), *glifosato* (1971), *fosamina* (1974), *aminofon* (1978), *anilofos* (1981) y *glufosinato* (1981).
- 16) **Sulfonilureas.** Son herbicidas de reciente aparición, desarrollados por Du Pont, como el *clorsulfuron* y *sulfometuron-metil* (1980).
- 17) **Imidazolinonas.** Al igual que las sulfonilureas, también son nuevos herbicidas, desarrollados recientemente por American Cyanamid Co. en 1982, como el *AC 222* y el *AC 293*.

Como puede observarse son muy numerosos los herbicidas existentes en la actualidad, presentando estructuras químicas muy diversas, lo cual complica extremadamente el análisis de estos compuestos al nivel de residuos en muestras medioambientales.

Un informe reciente publicado por la Comisión de la Comunidad Europea (CCE) indica cuales son los pesticidas más utilizados en Dinamarca, Francia, Alemania, Reino Unido, Grecia, Holanda, Italia, España y Suecia (Fielding *et al.*, 1992). En este informe se recoge una lista prioritaria de pesticidas, en la que se incluyen compuestos usados en cantidades superiores a las 50 toneladas por año y que además estén clasificados como de movilidad intermedia o alta (**Tabla 1**). En principio, se considera que estos pesticidas son los que mayores probabilidades presentan de contaminar las aguas subterráneas y hacia ellos se deben dirigir los esfuerzos para controlar sus niveles en suelos y aguas.

**Tabla 1.** Pesticidas utilizados en Europa en cantidad superior a 50 Tm/año y considerados de movilidad intermedia o alta.

<u>Alaclor</u>	Dinoseb	<u>Metabenzthiazuron</u> ✓
Aldicarb	<u>Diuron</u> ✓	Metiocarb
Amitrol	DNOC	Metil oxidemetón
<u>Atrazina</u>	EPTC	Fenmedifan ✓
<u>Benazolina</u>	Etofumesato	<u>Procloraz</u>
<u>Bentazona</u>	Etoprofos	Profam ✓
Bromofenoxima	Fenamifos	Prometina
<u>Carbaril</u> ✓	Fluoroxipir	<u>Propiconazol</u>
Carbendazima	<b>Glifosato</b>	Propizamida
<u>Carbetamida</u>	Iprodiona	<u>Piretrina</u>
<u>Cloridazon</u>	<u>Isoproturon</u>	Simazina
Clorpirifos	Linuron	Terbutilazina
<u>Clortoluron</u>	<u>Maneb</u>	Terbutrina
Cianazina	<b>MCPA</b>	Triademinol
<b>2,4-D</b>	<b>MCPP</b>	Triclorfon
Dalapon	Metamitrona	<u>Acido Tricloroacético</u>
Diazinon	<u>Metazaclor</u>	Vinclozolina
Diclobenilo	<u>Metam sodio</u>	Ziram
<u>Dimetoato</u>	<u>Metolaclor</u>	

*Subrayados los pesticidas utilizados en cantidad superior a 500 Tm/año*

*En negrita los compuestos estudiados en esta Memoria.*

Se puede apreciar que prácticamente ya no se utilizan a gran escala compuestos organoclorados y organofosforados, siendo sustituidos éstos por compuestos muchos más polares como triazinas, clorofenoxiácidos, fenilureas y una variedad de compuestos de estructura muy compleja. Así mismo, cabe indicar que la inmensa mayoría de los compuestos reflejados en la **Tabla 1** se utilizan como herbicidas, aplicados directamente al suelo, por lo que son contaminantes potenciales de las aguas subterráneas.

En la **Tabla 1** no se incluyen productos de transformación (PT), a pesar del interés en la determinación de tales productos. Al respecto, la Directiva de la CEE establece un límite máximo para pesticida individual y productos relacionados en aguas potables, aunque no deja claro qué son "productos relacionados", que podrían definirse como aquellos PT que también son tóxicos. En algunos casos, estos PT llegan a ser más tóxicos que los pesticidas originales, como ocurre con el fenitrooxon (del fenitrotion), 1-naftol (del carbaril) y etilenbistiourea (ETU) (del maneb).

En la **Tabla 2** se muestran datos sobre el uso de pesticidas en España en el año 1989 (Fielding *et al.*, 1992).

**Tabla 2.** *Uso total de pesticidas seleccionados en España (1989).*

Pesticida	Prod. activo (Tm)	Dosis (kg p.a./Ha)	Cultivo
Atrazina	250	1.5	maiz
<b>2,4-D</b>	810	0.7	cereales
1,3-dicloropropeno	2005	630	horticultura
Dimetoato	625	1.9	frutales
<b>Glifosato</b>	600	0.25	todos
Mancozeb	900	3.0	horticultura, vid
Maneb	450	2.5	horticultura, vid
<b>MCPA</b>	350	0.9	cereales
Metam sodio	2400	400	horticultura
Simazina	430	1.5	maiz, vid, olivo
Zineb	800	3.0	frutales, horticultura
Ziram	200	3.25	frutales, horticultura

*En negrita los compuestos estudiados en esta Memoria.*

Se observa que la mayoría de los pesticidas más utilizados en España son también especies polares que se usan, fundamentalmente, como herbicidas, fungicidas y fumigantes del suelo. La evolución sufrida en el uso de pesticidas desde el año 1989 también avanza en este sentido.

Por otro lado, es importante poder predecir la posibilidad de que un pesticida contamine el agua subterránea. Para ello, se necesita información sobre las propiedades del pesticida y del medio con el que entra en contacto. Los modelos para predecir el comportamiento de pesticidas en suelos son complejos, pero también existen modelos sencillos que permiten realizar una predicción aproximada utilizando sólo los parámetros

físico-químicos de los pesticidas. Normalmente, se utiliza la solubilidad en agua, coeficientes de partición en suelos, presión de vapor y tiempo de vida media en el suelo.

Gustafson (1989) propuso el Índice de Ubicuidad en Agua Subterránea (GUS) que permite una clasificación de los pesticidas en función de su movilidad, para cuyo cálculo se utiliza el coeficiente de adsorción en suelos ( $K_{oc}$ ) y el tiempo de vida media en suelos ( $T_{0.5}$ ).

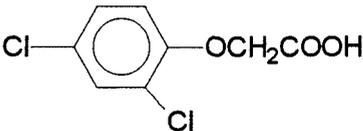
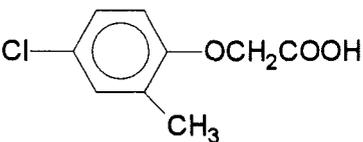
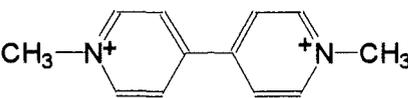
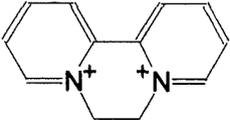
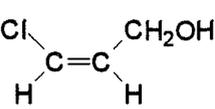
$$GUS = \log(T_{0.5}) \cdot (4 - \log K_{oc})$$

Los pesticidas se clasifican en compuestos de baja, intermedia y alta movilidad según el valor del índice GUS.

Índice GUS	Clasificación GUS
< 1.8	Baja movilidad ( <i>improbable leacher</i> )
1.8 - 2.8	Movilidad intermedia ( <i>transient leacher</i> )
> 2.8	Alta movilidad ( <i>probable leacher</i> )

En general, la polaridad es un factor importante que determina la movilidad de un pesticida. A continuación, en la **Tabla 3** se presentan las características físico-químicas de algunos pesticidas polares, potenciales contaminantes del agua subterránea, con elevados índices GUS.

**Tabla 3.** Características físico-químicas y estructura de varios pesticidas polares.

Pesticida	Estructura	p.v. (mPa)	Sol. H <sub>2</sub> O (g/l)	λ <sub>max</sub> (nm)	GUS
Glifosato	$\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{P}(\text{OH})_2$	0.04	12.0	-	3.17
Glufosinato	$\text{HOOC}-\overset{\text{NH}_2}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{P}(\text{OH})(\text{CH}_3)$	-	1400	-	-
2,4-D		-	0.62	228	2.06
MCPA		0.2	0.825	228	2.71
Aldicarb	$\text{CH}_3\text{S}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHCH}_3$	13	6.0	-	1.18
Paraquat		< 0.001	> 1000	257	-
Diquat		0.013	700	308	-
Aldicarb sulfóxido	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHCH}_3$	-	330	-	-
Aldicarb sulfona	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{S}}(\text{O})-\overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}}-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{NHCH}_3$	12	10	-	-
MITC	$\text{CH}_3-\text{N}=\text{C}=\text{S}$	1733000	8	237	-
CAAL		-	> 1000	205	-
ETU	$\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}=\text{S}$ $\text{CH}_2-\text{NH}$	-	20	233	-

Como ya se ha comentado anteriormente, la CEE ha fijado un límite máximo de 0.1 ppb para pesticida individual. Esta es una medida muy estricta, y los métodos analíticos actuales todavía deben ser mejorados para una gran variedad de pesticidas si se desea cumplir con esta Directiva. Sin embargo, la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de EEUU establece un nivel distinto para cada pesticida según una evaluación toxicológica. En la **Tabla 4**, se muestran algunos niveles máximos para varios pesticidas, de acuerdo con este criterio (Barceló, 1993).

**Tabla 4.** Niveles máximos para pesticidas seleccionados en aguas potables según la Agencia de Protección Medioambiental (EPA) de EEUU.

<i>Compuesto</i>	<i>Nivel máximo (ppb)</i>	<i>Compuesto</i>	<i>Nivel máximo (ppb)</i>
Alaclor	2	Diquat	20
Aldicarb	10	Endotal	100
Aldicarb sulfóxido	10	Endrin	2
Aldicarb sulfona	10	<b>Glifosato</b>	<b>700</b>
Atrazina	3	Metomilo	300
Bromacilo	80	Metil paration	2
Carbofuran	40	Metolaclor	10
Clortalonilo	2	Oxamilo	200
Cianazina	9	Picloram	500
<b>2,4-D</b>	<b>70</b>	Simazina	4
Dalapon	200	Trifluralin	2
Dinoseb	7		

*En negrita los compuestos estudiados en esta Memoria.*

Estos niveles parecen más lógicos que los niveles de la CEE, que se han fijado para todos los pesticidas individuales sin hacer ninguna distinción entre pesticidas de diferentes toxicidades.

Esta regulación restrictiva por parte de la Directiva comunitaria obliga a desarrollar métodos analíticos que puedan detectar pesticidas a niveles de 0.02 ppb, para poder así determinar los pesticidas con suficiente fiabilidad al nivel de 0.1 ppb. Además, es prácticamente imposible determinar todos los pesticidas permitidos en la CEE a este nivel de sensibilidad. Una aproximación consiste en centrar los esfuerzos analíticos en aquellos pesticidas indicados en la **Tabla 1** que presentan dos características importantes:

- a) son móviles y pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas
- b) se utilizan en grandes cantidades

La Directiva comunitaria también establece un límite de 0.5 ppb para pesticidas totales, difícil de cumplir, a menos que se asuma arbitrariamente un número máximo de pesticidas a analizar.

Una de las grandes diferencias entre las reglamentaciones de EEUU y Europa sobre residuos de pesticidas es que en Europa cada país utiliza sus propios métodos analíticos, mientras que en EEUU se encuentran ampliamente implementados los métodos de la EPA. Este será uno de los problemas principales que deberá afrontar la recientemente creada Agencia Europea del Medioambiente.

Además, el desarrollo de métodos muy sensibles para la determinación de residuos de pesticidas en aguas resulta más necesario en Europa a causa de los límites más estrictos en relación con la calidad del agua potable. Otra consideración general con respecto a los métodos oficiales es que muchos de ellos todavía están basados en extracción líquido-líquido, con los problemas asociados de eliminación de altos volúmenes de disolventes orgánicos. En un futuro cercano es previsible el desarrollo de métodos para una gran variedad de pesticidas basados en extracción en fase sólida, tanto "off-line" como "on-line", que permitan la determinación de pesticidas individuales a nivel de 0.1 ppb.

El desarrollo de métodos específicos de análisis de pesticidas particulares (inusuales según la EPA) es de gran interés, y así lo ha establecido la CEE (Fielding *et al.*, 1992) para aquellos pesticidas "difíciles", tales como glifosato, paraquat, diquat, maneb, ziram y metam sodio.

El uso de la CL se ha incrementado considerablemente en los métodos de análisis de residuos de pesticidas polares como resultado de su mejor aplicación a este tipo de compuestos, incluyendo sus productos de transformación. Los métodos basados en CL presentan también una ventaja muy importante frente a los de CG, que consiste en su compatibilidad con sistemas de reacción on-line, tanto en pre como en postcolumna, convirtiendo a la CL en una herramienta indispensable para el análisis de pesticidas modernos y sus metabolitos.

Los métodos de EFS pueden convertirse fácilmente en sistemas on-line automatizados acoplados a CL. Estos sistemas presentan ventajas adicionales, como menores límites de detección, y evitan pérdidas por evaporación y contaminación. Así mismo, si se utilizan columnas en lugar de precolumnas (técnica de acoplamiento CL-CL), se aumenta la selectividad al aplicar una técnica de transferencia de una fracción específica

desde la primera a la segunda columna, mejorando también la sensibilidad al poder realizar inyecciones de grandes volúmenes de muestra.

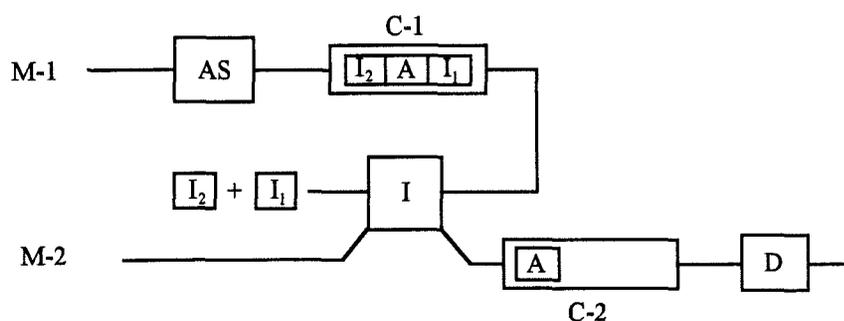
A. III.- TECNICAS CROMATOGRAFICAS ACOPLADAS.

La cromatografía multidimensional hace uso de dos o más columnas acopladas para conseguir separaciones no alcanzables con un único sistema. Se define esta técnica como un proceso de separación en el que una muestra es sometida a una secuencia de separaciones, cada una de las cuales actúa sobre el todo o parte de los componentes separados en una etapa previa cromatográfica, que difieren en su selectividad relativa y/o capacidad.

En las técnicas cromatográficas acopladas se efectúa una pre-separación de la muestra en una primera columna cromatográfica; posteriormente, una parte muy pequeña de la muestra conteniendo los analitos se transfiere "on-line" por medio de una interfase hacia la segunda columna cromatográfica en la que tiene lugar la separación de los mismos.

Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las técnicas más sensibles y selectivas disponibles para la determinación de residuos de pesticidas en muestras medioambientales. Las más utilizadas en la actualidad en ARP son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL), también denominada CL con "column switching", y la cromatografía líquida acoplada a cromatografía de gases capilar (CL-CG)

En la **Figura 3** se muestra un esquema básico de una técnica cromatográfica acoplada.



**Figura 3.** Representación esquemática de un sistema cromatográfico acoplado.

*M-1 y M-2 fases móviles. AS sistema de inyección o autoinyector. C-1 y C-2 primera y segunda columna. I interfase. I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> interferentes de la muestra. A analitos de interés. D sistema de detección.*

Los procedimientos cromatográficos con columnas acopladas consisten generalmente en cuatro etapas (van Zoonen *et al.*, 1992):

- Introducción de un volumen de muestra relativamente grande en la primera columna del sistema, mejorando, de este modo, la sensibilidad global del procedimiento analítico. En combinación con una apropiada compresión de pico durante la etapa de transferencia (tercera etapa) los volúmenes de inyección pueden aumentarse desde microlitros hasta mililitros, pudiendo mejorar la sensibilidad en varios órdenes de magnitud.
- Preseparación de una gran parte de los interferentes de la muestra de los analitos de interés en la primera columna, mejorando la selectividad del procedimiento al descartar la mayor parte de los interferentes. Para mejorar lo más posible la selectividad es importante que el mecanismo de separación de ambas columnas difiera considerablemente. Esto se puede conseguir fácilmente acoplando CL con CG, pero es menos obvio en acoplamiento CL-CL.
- Transferencia de la fracción de interés a la segunda parte del sistema de separación por medio de una técnica de compresión de pico, de modo que aumente tanto la selectividad, minimizando el volumen de transferencia, como la sensibilidad, mejorando la forma del pico cromatográfico. Para la interconexión entre ambas columnas de separación se necesita generalmente un método de focalización del pico. En CL-CG se usa generalmente una técnica de focalización por enfriamiento (*cold trapping*), mientras que en CL-CL se consigue la compresión de pico utilizando gradientes escalonados durante la transferencia de los analitos desde la primera a la segunda columna.
- Análisis de la muestra transferida a la segunda columna, realizándose una separación y detección convencional de los analitos de interés, después de haber eliminado la mayor parte de los interferentes.

Además de la mejora en selectividad y sensibilidad, las técnicas cromatográficas acopladas permiten integrar la preparación de muestra, la separación y la detección en un único sistema cromatográfico, ofreciendo un alto grado de automatización para el procedimiento analítico global.

La aplicación de estas técnicas en el desarrollo de MMR para ARP resulta, a veces, problemática debido a su elevada selectividad. La heterogeneidad de los pesticidas desde el punto de vista químico y, por consiguiente cromatográfico, hace difícil la aplicación de las cuatro etapas indicadas en un amplio grupo de compuestos.

A continuación, se comentan brevemente las técnicas acopladas más importantes.

### III.1. Cromatografía de Gases - Cromatografía de Gases (CG-CG).

Los primeros procedimientos de acoplamiento de dos columnas de CG se llevaron a cabo al principio de los 70 (Schomburg y Ziegler, 1972; Schomburg *et al.*, 1974). Sin embargo, actualmente apenas hay aplicaciones de esta técnica en ARP, quizás debido, en parte, a la introducción de la CG capilar.

Existen algunas aplicaciones CG-CG para la determinación de microcontaminantes orgánicos que presentan serios problemas de separación debido a sus propiedades muy semejantes, como bifenilos policlorados (PCB) y dioxinas (Schomburg *et al.*, 1985).

Probablemente, el uso de este acoplamiento se dirija en el futuro a la separación de pesticidas ópticamente activos, acoplando columnas no quirales a columnas quirales (Borwitzky y Schomburg, 1982).

### III.2. Cromatografía Líquida - Cromatografía de Gases (CL-CG).

El acoplamiento CL-CG, que se introdujo hace más de una década (Majors, 1980), se ha convertido en una técnica común para la determinación de contaminantes en una gran variedad de matrices. La aparición de una interfase que permite la transferencia de grandes volúmenes de disolventes orgánicos apolares desde un cromatógrafo de líquidos a un cromatógrafo de gases capilar, ha favorecido el desarrollo de numerosas aplicaciones CL-CG en el análisis de alimentos y muestras medioambientales (Grob, 1991). Actualmente, se utilizan dos técnicas de transferencia:

- 1) Técnicas de columna vacía (*retention gap*) que emplean un inyector "on-column" (Grob, 1982). Se desarrollaron para evitar la distorsión de picos por ensanchamiento de bandas (*flooding effect*) debido al flujo de la muestra líquida hacia el interior de la columna de gases (Grob, 1981). Una entrada en el cromatógrafo de gases formada por una columna libre de fase estacionaria y, por consiguiente, con muy poco poder de retención, permite la reconcentración de grandes bandas iniciales a la entrada de la columna analítica. Esto permite la inyección de grandes volúmenes de muestra siempre que se disponga de una columna vacía de suficiente longitud. Posteriormente (Munari *et al.*, 1985), se desarrolló una variante de la técnica de columna vacía que hace uso de la evaporación parcial del eluyente del cromatógrafo líquido durante la introducción del mismo en la precolumna de cromatógrafo de gases sin relleno, lo cual permite la introducción de mayores volúmenes de muestra y el uso de precolumnas más cortas. Más tarde Grob *et al.* (1986a) aplicaron la evaporación simultánea de disolvente (*concurrent solvent evaporation*), en donde todo el eluyente

del cromatógrafo líquido es evaporado durante la transferencia al cromatógrafo de gases, permitiendo la introducción de fracciones teóricamente de volumen ilimitado, aunque la pérdida del frente de disolvente produce un ensanchamiento de los picos de los compuestos más volátiles.

- 2) Evaporación simultánea del disolvente por medio de la llamada interfase tipo "loop". El uso de la interfase anterior para transferir grandes fracciones de eluyente tiene dos desventajas claras. Por un lado los tiempos de transferencia son largos debido al paso lento de los grandes volúmenes de vapores de disolvente a través de la columna de CG capilar. Además, el ajuste de condiciones que permitan una evaporación simultánea global del disolvente se hace más difícil.

La introducción de una interfase tipo "loop" junto con un suministro de gas portador con flujo controlado (Grob y Stoll, 1986b) simplifica enormemente la transferencia y acorta los tiempos de evaporación del disolvente.

Estas ventajas hacen que la mayoría de las aplicaciones CL-CG se lleven a cabo mediante evaporación simultánea de disolvente e interfase tipo "loop". Sin embargo, la evaporación parcial simultánea de disolvente e interfase tipo "on-column" sigue siendo el método elegido si se deben analizar compuestos volátiles.

Por lo que respecta al sistema CL empleado, hasta la fecha prácticamente todas las aplicaciones CL-CG emplean cromatografía líquida en fase normal, ya que el acoplamiento de CL en fase reversa con eluyentes acuosos crea muchos problemas para su transferencia a un sistema de CG.

Es interesante hacer notar que una de las primeras aplicaciones del acoplamiento CL-CG trata de la determinación del herbicida atrazina (Majors, 1980). Otros ejemplos de aplicaciones CL-CG en ARP son: el análisis del pesticida experimental CGA 80000 en tejidos biológicos por CL-CG-ECD (Mostert y Ramsteiner, 1989); la determinación de dicamba y otros herbicidas ácidos en hojas de tabaco mediante derivatización seguida de CL-CG (Häkkinen *et al.*, 1989), y varias determinaciones de pesticidas organoclorados y PCBs en varios tipos de muestras (Maris *et al.*, 1988; Grob *et al.*, 1987).

El potencial del acoplamiento CL-CG reside principalmente en su gran selectividad. Numerosos procedimientos analíticos incluyen una preseparación o purificación de la muestra mediante CL "off-line". La elevada eficacia obtenida por la CL permite la preseparación de grupos de compuestos muy semejantes, así como una purificación en el

análisis de trazas en matrices altamente complejas, donde es necesario aislar los compuestos de interés de la gran cantidad de interferentes, como ocurre en ARP.

Sin embargo, esta elevada selectividad no siempre es favorable en el desarrollo de MMR, por lo que sistemas de separación con menor poder de resolución son a veces más adecuados para acoplarlos a CG que sistemas con elevada capacidad de separación. Esta aproximación se ha comprobado satisfactoriamente utilizando un sistema automático de EFS (ASPEC) acoplado a un cromatógrafo de gases capilar para la determinación de piretroides en aguas superficiales (van der Hoff *et al.*, 1991).

### III.3. Cromatografía Líquida - Cromatografía Líquida (CL-CL).

La primera aplicación de CL con columnas acopladas se propuso en 1973 (Huber y van der Linden, 1973). Actualmente se realizan dos modos diferentes de acoplamiento: con precolumna enriquecedora (*trace enrichment*) (PC-CL) y con columnas acopladas (CL-CL).

#### PC-CL.

La aparición de PC-CL en fase reversa para el análisis directo de muestras acuosas (van Vliet *et al.*, 1979; de Jong, 1980; Roth *et al.*, 1981) produjo una proliferación de aplicaciones de la técnica de "*column-switching*", especialmente en el campo del análisis biomédico, ya que, además del análisis automatizado, proporcionaba un satisfactorio enriquecimiento de los analitos, reemplazando a las etapas de concentración por extracción líquido-líquido o por extracción en fase sólida manual. Para ese tipo de muestras se obtenía suficiente sensibilidad con la inyección directa de 0.1-0.5 ml de muestra; sin embargo, para el análisis de contaminantes en muestras acuosas a nivel de sub-ppb se requiere la inyección de volúmenes de muestra entre 50-500 ml, que se deben suministrar mediante una bomba de CL. Esta última aproximación se ha aplicado ampliamente para la determinación de residuos de contaminantes en muestras acuosas (Goewie *et al.*, 1981, 1984; Maris *et al.*, 1985; Nielen *et al.*, 1985, 1986, 1987; Subra *et al.*, 1988; Geerdink *et al.*, 1989; Marvin *et al.*, 1990; Brouwer *et al.*, 1990, 1991, 1992; Hennion *et al.*, 1991; Coquart y Hennion, 1991; Liska *et al.*, 1992; Reupert *et al.*, 1992).

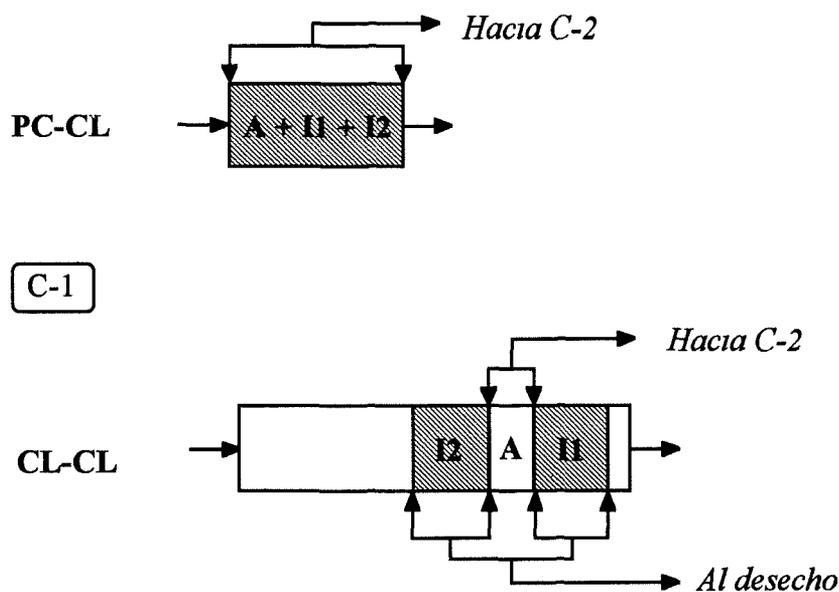
En la mayoría de las aplicaciones las precolumnas utilizadas presentan unas dimensiones entre 5-10 mm x 2-4.6 mm d.i.. Estos pequeños tamaños reducen el coste, permiten un muestreo rápido y previenen el ensanchamiento de bandas durante la transferencia del analito a la columna analítica. Generalmente, se empaquetan con rellenos

de 10-40  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula, en lugar de 3-10  $\mu\text{m}$ , para prevenir la obturación durante el análisis.

Sin embargo, mediante esta técnica la selectividad sólo mejora ligeramente. Se ha investigado el uso de fases estacionarias más selectivas como intercambiadores iónicos o fases con metales para el enriquecimiento y purificación de las muestras (Slobodnik *et al.*, 1992).

### CL-CL.

En un intento de mejorar la selectividad de la CL con "column switching", la pequeña precolumna se ha ampliado a las dimensiones de una auténtica columna separadora, lo cual permite llevar a cabo una separación cromatográfica completa, más que una etapa de enriquecimiento (Figura 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de la diferencia de selectividad entre las técnicas acopladas PC-CL y CL-CL.

Por otro lado, la combinación de dos columnas de separación que contengan fases estacionarias con similar selectividad también parece una buena aproximación, siendo fácil de aplicar. En 1976 se propuso un sistema CL-CL en fase normal para la purificación "on-

*line*" de pesticidas organoclorados en extractos lácteos (Dolphin *et al.*, 1976), que posteriormente se automatizó (Hogendoorn *et al.*, 1989a).

La CL-CL es una técnica muy adecuada para la determinación selectiva de un número limitado de analitos presentes en una matriz compleja. El aislamiento de una fracción apropiada de la primera columna y su transferencia a la segunda proporciona, generalmente, la selectividad requerida en el análisis de trazas.

Recientemente se han desarrollado algunas aplicaciones para la determinación de pesticidas polares en diferentes matrices utilizando CL-CL (Goewie y Hogendoorn, 1985, 1987a, 1987b; Hogendoorn y Goewie, 1988, 1989b; Hogendoorn y van Zoonen, 1990a, 1991c, 1992b; Hogendoorn *et al.*, 1990b, 1991a, 1991b, 1992a, 1993b).

A. IV.- ACOPLAMIENTO CL-CL.

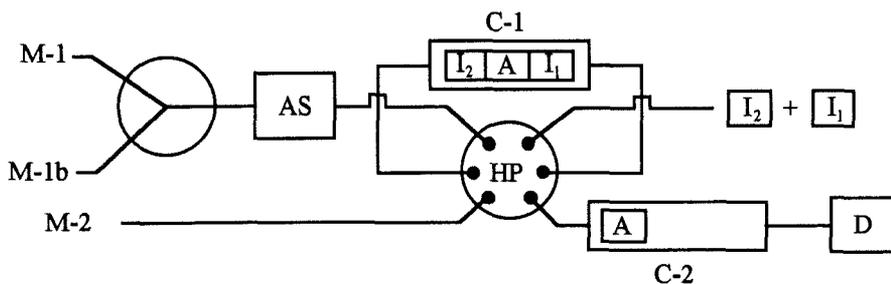
#### IV.1. Introducción. Etapas del análisis.

Como se ha comentado anteriormente, una de las características importantes de la CL es la capacidad de aplicar la técnica de columnas acopladas ("*column-switching*"), que ofrece la posibilidad de integrar la preparación de la muestra y la purificación de la misma en el procedimiento cromatográfico. Las primeras aplicaciones sobre ARP con "*column-switching*" se centraron en la preconcentración de analitos en muestras acuosas (van Vliet *et al.*, 1979; Goewie *et al.*, 1981, 1984). Para estas aplicaciones se utilizaron precolumnas de longitud entre 2-10 mm con d.i. entre 2-3 mm, rellenas con partículas C18 de 5-10  $\mu\text{m}$ , que resultaron adecuadas con respecto a la capacidad de carga y resolución (Goewie *et al.*, 1984). Con este diseño se evitan las extracciones manuales, pero se limita el campo de aplicación a muestras acuosas.

Debido a su bajo poder de separación estas pequeñas precolumnas son poco adecuadas para llevar a cabo la purificación, ya que no pueden proporcionar suficiente separación entre analitos e interferentes de la muestra.

Hogendoorn y Goewie (1988) establecieron que el uso de (pre)columnas más largas en combinación con procedimientos de extracción "off-line" producía un considerable aumento en la selectividad de la técnica de "*column-switching*", que ahora podemos denominar más correctamente acoplamiento CL-CL, ya que la primera columna es verdaderamente una columna separadora y no sólo enriquecedora.

En la **Figura 5** se muestra un sistema básico de acoplamiento CL-CL.



**Figura 5.** Representación esquemática de un acoplamiento CL-CL.

*C-1 y C-2 primera y segunda columna separadora; AS autoinyector;  $I_1$  e  $I_2$  interferentes de la muestra (de cabeza y de cola, respectivamente); A fracción de analito; M-1 fase móvil para la purificación en C-1 (eliminación de  $I_1$ ); M-1b eluyente fuerte (eliminación de  $I_2$ ); M-2 fase móvil de C-2; HP válvula de alta presión de 6 vías; D detector.*

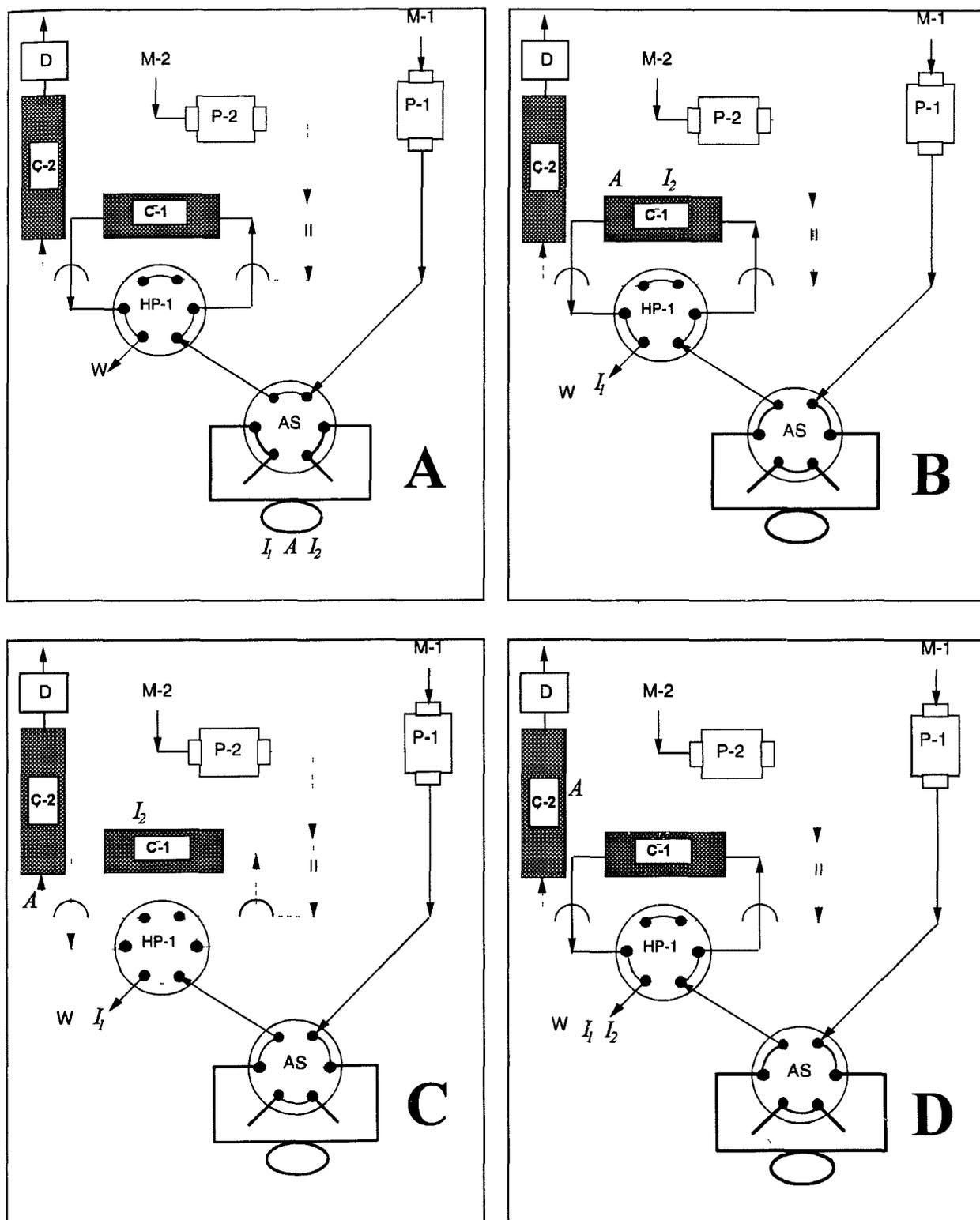
Cualquier procedimiento de acoplamiento CL-CL se encuentra diferenciado en cuatro etapas:

1) Inyección (Figura 6A). Durante esta etapa se toma la muestra de agua o el extracto obtenido y se carga en el "loop" del autoinyector mientras la fase móvil M-1 circula por la columna C-1 y la fase móvil M-2 por C-2. Se activa la válvula del autoinyector y comienza el análisis, pasando a la etapa de purificación.

2) Purificación (Figura 6B). Durante esta etapa se realiza una purificación de la muestra o extracto con un cierto volumen de fase móvil M-1; los interferentes menos retenidos ( $I_1$ ) se eliminan al desecho. Cuando el primer analito comienza a eluir de la columna C-1 se activa la válvula (HP-1) que actúa como interfase entre los dos sistemas CL, finalizando la etapa de purificación y comenzando la transferencia.

3) Transferencia (Figura 6C). La primera columna se coloca en línea con la segunda y se utiliza un cierto volumen de fase móvil M-2 para eluir de la columna C-1 hacia la C-2 la fracción que contiene los compuestos de interés (A). Cuando el último analito ya ha sido transferido desde C-1 a C-2 se activa nuevamente la válvula, finalizando la transferencia.

4) Análisis y lavado (Figura 6D). Durante esta etapa la fracción transferida desde C-1 a C-2 se separa mediante la fase móvil M-2, siguiendo una CL convencional. Simultáneamente, la primera columna (C-1) vuelve a ser eluida por la fase móvil M-1 que eliminará los interferentes que muestran mayor retención (*de cola*). Si la fase móvil no es capaz de eluirlos completamente mientras tiene lugar la separación en C-2 se puede lavar la primera columna con un eluyente más fuerte como metanol, acetonitrilo, etc. (M-1b), reacondicionándola posteriormente con M-1 antes de la próxima inyección.



**Figura 6.** Etapas de un procedimiento con acoplamiento CL-CL. (A) Inyección. (B) Purificación. (C) Transferencia. (D) Análisis.

C-1 y C-2 primera y segunda columna separadora; AS autoinyector, I<sub>1</sub> e I<sub>2</sub> interferentes de la muestra (de cabeza y de cola, respectivamente); A fracción de analito; P-1 y P-2 bombas CL; M-1 fase móvil para la purificación en C-1; M-2 fase móvil de C-2; HP-1 válvula de alta presión de 6 vías; D detector; W desecho.

## IV.2. Selección de las condiciones de acoplamiento.

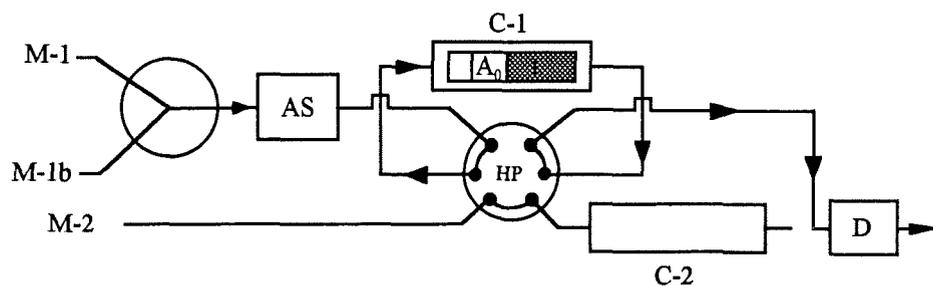
Los dos parámetros más importantes que se han de optimizar en un procedimiento de acoplamiento CL-CL son (Hogendoorn *et al.*, 1991a):

- a) la selección de la primera columna separadora (C-1). Para el análisis por CL en fase reversa de pesticidas moderadamente polares son adecuadas columnas C18 de 15 x 3.2 mm d.i. La utilización de un eluyente apropiado (M-1) suele proporcionar suficiente separación entre interfentes ( $I_1$ ) y analitos (A) en la mayoría de aplicaciones.
- b) la fuerza eluotrópica de la fase móvil utilizada en la purificación (M-1). Como ya se ha indicado, la elección de la fase móvil M-1 es crucial. Se debe llegar a una situación de compromiso ya que, por un lado, una fase móvil M-1 con una fuerza eluotrópica baja permitiría la inyección de volúmenes mayores de muestras acuosas sin un apreciable ensanchamiento de bandas, aunque restringiría la eliminación eficaz de los interferentes poco retenidos ( $I_1$ ). Por otro lado, una fase móvil M-1 con una elevada fuerza eluotrópica mejoraría la resolución entre  $I_1$  y la fracción de analitos (A), pero disminuiría el tiempo de purificación. La mejora en la selectividad al emplear una fase móvil M-1 con una correcta fuerza eluotrópica para mejorar la etapa de purificación se ha demostrado en varias aplicaciones (Goewie y Hogendoorn, 1985, 1987a, 1987b).

Después de la elección de la columna C-1 y de la composición de la fase móvil M-1, las condiciones finales del acoplamiento CL-CL se pueden determinar fácilmente mediante dos experiencias:

1) Determinación del volumen de purificación. Este valor se puede determinar conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el compuesto de interés que presente una menor retención con la fase móvil M-1 ( $A_0$ ). El volumen de ruptura que presente este analito en estas condiciones determinará el volumen máximo de purificación a aplicar en el método, representado en la figura como el área sombreada. (**Figura 7**).

Este volumen de purificación debe chequearse rutinariamente para asegurarse de que se realiza la purificación de modo correcto, sin pérdidas del analito  $A_0$ .

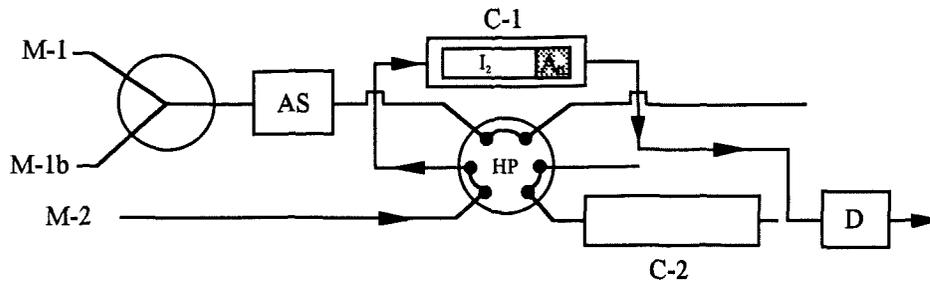


**Figura 7.** Representación esquemática del diseño para la determinación del volumen de purificación.

*C-1 y C-2 primera y segunda columna separadora; AS autoinyector;  $A_0$  analito menos retenido en C-1; M-1 fase móvil para la purificación en C-1 (eliminación de  $I_1$ ); M-1b eluyente fuerte (eliminación de  $I_2$ ); M-2 fase móvil de C-2; HP válvula de alta presión de 6 vías; D detector.*

2) Determinación del volumen de transferencia. Este valor se determina conectando directamente al detector la primera columna separadora (C-1) e inyectando el analito que presente una mayor retención ( $A_n$ ), pero siendo eluido con la fase móvil M-2 que es la que realiza la transferencia. El volumen de ruptura que posea este analito en estas condiciones fijará el volumen máximo de transferencia a utilizar, representado en la figura como el área sombreada. (**Figura 8**)

Este volumen de transferencia también debe chequearse rutinariamente para que la transferencia se realice de modo correcto, sin pérdidas del analito  $A_n$ . Además, como ya se ha comentado anteriormente, interesa que esta fracción transferida desde C-1 hacia C-2 tenga el menor volumen posible para minimizar el ensanchamiento de bandas y aumentar la sensibilidad.



**Figura 8.** Representación esquemática del diseño para la determinación del volumen de transferencia.

*C-1 y C-2 primera y segunda columna separadora; AS autoinyector;  $A_n$  analito más retenido en C-1; M-1 fase móvil para la purificación en C-1 (eliminación de  $I_1$ ); M-1b eluyente fuerte (eliminación de  $I_2$ ); M-2 fase móvil de C-2; HP válvula de alta presión de 6 vías; D detector.*

### IV.3. Ventajas y limitaciones del acoplamiento CL-CL.

Las ventajas más importantes del acoplamiento CL-CL ya se han comentado en puntos anteriores, y se pueden resumir como mejora de selectividad, aumento de sensibilidad y posibilidad de automatización, lo que hace que esta técnica tenga un gran futuro en ARP. Sin embargo, su mayor potencial no se encuentra en el desarrollo de MMR por las dificultades de obtener condiciones experimentales adecuadas para un amplio rango de compuestos. Su mayor campo de aplicación se encuentra en el análisis de compuestos "difíciles" como son pesticidas y otros contaminantes polares en muestras acuosas en las que resulta difícil o tedioso su aislamiento (preconcentración). Además, mediante la adecuada optimización de las condiciones se puede llegar a inyectar grandes volúmenes de muestra si el analito presenta una buena retención sobre C-1 y eluye sin ensanchamiento de bandas. Así ocurre, por ejemplo, en el análisis de bentazona e isotroturon en muestras de aguas a niveles de 0.1 ppb, donde se inyectaron directamente mediante CL-CL 2 y 4 ml de muestra, respectivamente (Hogendoorn y van Zoonen, 1992b; Hogendoorn *et al.*, 1993b). Por consiguiente, otra ventaja adicional que presenta la CL de columnas acopladas es su gran capacidad de análisis, pudiéndose analizar un elevado número de muestras por día (*sample throughput*), del orden de 30-50, ya que en la mayoría de los casos el pretratamiento es mínimo y el análisis por CL muy rápido.

Por otro lado, una importante función adicional que realiza el acoplamiento CL-CL es la protección de la columna separadora principal (C-2) en aquellos casos donde no se aconseja una prefiltración de la muestra, ya que se pueden producir pérdidas de analitos durante la filtración, como en el análisis de dinitrofenoles en suelos (Hogendoorn, 1993a).

Para el análisis de muestras o extractos más limpios, con los que no se esperan problemas de obturación o de selectividad, se podría pensar en eliminar el acoplamiento CL-CL, pero, sin embargo, en muchos casos el uso del mismo es beneficioso al reducir el tiempo total de análisis, ya que ningún pico de interferente que eluya muy tarde ( $I_2$ ) se transfiere a la segunda columna separadora.

En cuanto a las limitaciones, cabe citar que, en comparación con los procedimientos "off-line", se debe realizar una inversión en equipamiento y se requiere destreza y práctica habitual en procedimientos de CL para diseñar y aplicar el acoplamiento CL-CL. Probablemente es ésta la razón por la que todavía no se utiliza ampliamente esta técnica en ARP.

En segundo lugar, la primera columna debe ser muy estable, ya que la inyección de extractos de muestra sin purificar combinados con continuas aplicaciones de disolventes de baja y elevada fuerza eluotrópica afecta a su vida media. Para la mayoría de las aplicaciones es posible utilizar durante una semana continuamente la misma columna sin apreciar una disminución de la selectividad.

Otro aspecto a tener en cuenta es la necesidad de realizar una comprobación, más o menos diaria, de los volúmenes de purificación y transferencia antes de procesar una nueva serie de muestras ya que, a pesar de la mejora en los rellenos C18, siempre existe una pequeña variación en la retención (*disminución*), observable a lo largo de un cierto período de utilización.

#### **IV.4. Aplicaciones del acoplamiento CL-CL.**

Como ya se ha comentado anteriormente existen un gran número de referencias sobre el uso del acoplamiento PC-CL para llevar a cabo una etapa de enriquecimiento de los analitos, pero existen muy pocas sobre el uso del acoplamiento CL-CL.

Una de las primeras aplicaciones en las que se realiza una purificación en línea de la muestra mediante "column-switching" se debe a Goewie y Hogendoorn (1985). Se trata de la determinación de residuos del fungicida iprodiona en aguas superficiales. Después de una ELL con diclorometano, 2 ml del extracto obtenido se inyectan en la precolumna enriquecedora, la cual se lava posteriormente con 5 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (20:80) antes de conectarla en línea con

la columna separadora. Realmente, se trata de una aplicación PC-CL con una etapa de lavado

La primera aplicación real de acoplamiento CL-CL, en la que se introduce el concepto de purificación y transferencia de una fracción adecuada desde la precolumna hasta la columna separadora, se debe también a Goewie y Hogendoorn (1987a) y trata sobre la determinación de residuos de *N*-metilcarbamatos en muestras de alimentos. Los autores indican que es necesario realizar una buena purificación de la muestra ya que si se utiliza PC-CL convencional, aunque se realice un lavado de la precolumna, el cromatograma obtenido presenta numerosos picos interferentes, lo que obliga a un tiempo de análisis muy largo. Conociendo el orden de elución de los analitos (*propoxur*, *carbofuran* y *carbaril*) sobre fase reversa C18, se establece un volumen de purificación de 2.6 ml de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (5:95) antes de que el primer analito (*propoxur*) eluya de la precolumna de 15 × 3.2 mm de RP18, y un volumen de transferencia de 0.42 ml de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (35:65). Durante el análisis en la segunda columna (150 × 4.6 mm, Hypersil ODS 5 μm), se lava la precolumna con 4 ml de acetonitrilo, reacondicionándose a continuación. Utilizando esta técnica, se alcanzan límites de detección de 0.3 ppb en la muestra analizada.

Posteriormente, Goewie y Hogendoorn (1987b) también demostraron las ventajas del acoplamiento CL-CL frente al PC-CL determinando residuos de los herbicidas bromacilo y diuron, así como el principal metabolito de este último, 3,4-dicloroanilina, en muestras de agua subterránea. Tras una ELL con diclorometano, 100 μl del extracto se analizan mediante acoplamiento CL-CL con un volumen de purificación de 2.5 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90) y un volumen de transferencia de 0.5 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (65:35), utilizando como C-1 una precolumna de 15 × 3.2 mm de RP18 y como C-2 una columna de 150 × 4.6 mm, Hypersil ODS 5 μm.

Se realiza una comparación con la preconcentración mediante PC-CL de 50 ml de muestra, comprobándose la pérdida total de bromacilo y 3,4-dicloroanilina en estas condiciones, mientras que el diuron se recupera completamente aunque se ve fuertemente interferido en el cromatograma. Si se intenta introducir una etapa de lavado tras la preconcentración con MeOH/H<sub>2</sub>O (10:90), se pierde el 50% del diuron. Utilizando acoplamiento CL-CL se obtienen unos límites de detección de 0.01 ppb para diuron, 0.02 ppb para 3,4-dicloroanilina y 0.2 ppb para bromacilo.

Hogendoorn y Goewie (1989b) determinan residuos de los herbicidas bentazona y cianazina en aguas superficiales mediante concentración por evaporación de 100 ml de agua hasta un volumen de 2 ml y posterior inyección de una alícuota de 100 μl en un sistema de CL

con columnas acopladas. El volumen de purificación es de 4 ml de MeOH/tampón fosfato 0.03M, pH 2.7 (5:95) sobre una precolumna de 15 × 3.2 mm de RP18 de 7 µm, y el volumen de transferencia es 0.5 ml de MeOH/tampón fosfato 0.03M, pH 2.7 (35:65). Como C-2 utilizan una columna de 150 × 4.6 mm, Hypersil ODS 5 µm. Este procedimiento proporciona un límite de detección de 0.5 ppb. Modificando ligeramente el procedimiento de extracción se alcanzaron niveles de 0.1 ppb.

A pesar de que, como ya se ha comentado, el acoplamiento CL-CL, por su selectividad inherente, parece menos apropiado para aplicaciones multirresiduales, Hogendoorn y van Zoonen (1990a) han aplicado un procedimiento de CL con columnas acopladas a la determinación de nueve pesticidas polares (*cloridazon, metoxuron, benazolina, bentazona, fenfuram, bromoxinilo, metabenztiuron, ioxinilo y desmedifam*) en muestras de cereales. 50 g de muestra se extraen por maceración con 100 ml de MeOH durante una noche. Tras la adición de 400 ml de agua acidificada, se realiza una ELL con diclorometano, se seca y se evapora el extracto disolviéndose finalmente en 1 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (20:80). 50 µl de este extracto final se inyectan en una columna de 50 × 3 mm de C18, donde se lleva a cabo la etapa de purificación con 1.5 ml de MeOH/0.025M NaAc, 0.03M fosfato, pH 2.7 (25:75); la transferencia se realiza mediante un gradiente escalonado con MeOH/0.025M NaAc, 0.03M fosfato, pH 2.7, con un tiempo total de análisis de aproximadamente 25 min. Como se observa, en este caso se utiliza como C-1 una columna más larga debido a la gran diferencia de polaridades, lo que obliga a que ya empiece la separación en la primera columna y continúe durante la "transferencia" (en este caso durante 12 min) en la segunda (50 × 3 mm de C18, 5 µm), obligando a realizar elución con gradiente escalonado. Utilizando este procedimiento, se alcanzaron límites de detección de 0.05 mg/kg.

Como ya hemos comentado, una posible aplicación de la CL con columnas acopladas sería el análisis rápido, sensible y selectivo de pesticidas o metabolitos "difíciles" por técnicas convencionales debido a su elevada polaridad y detección poco selectiva. Un ejemplo de estos compuestos sería el cloroalilalcohol (CAAL), metabolito del fumigante del suelo 1,3-dicloropropeno. Hogendoorn *et al* (1990b) han propuesto un método para su determinación en muestras de aguas a niveles de 0.1 ppb mediante el uso de CL con columnas acopladas. Se inyectan directamente 200 µl de muestra en una columna C-1 de 50 mm rellena de C18 de 5 µm y se aplica un volumen de purificación de 1 ml de H<sub>2</sub>O, transfiriéndose a la segunda columna mediante 0.8 ml de MeOH/H<sub>2</sub>O (5:95), realizándose la detección UV a 205 nm. En estas condiciones, se obtiene un límite de detección de 1 ppb. Para alcanzar 0.1 ppb se realiza una ELL con éter etílico, inyectándose 200 µl del extracto en el mismo sistema de columnas acopladas.

Baumann *et al.* (1991) comparan el uso de la CL con derivatización post-columna y el acoplamiento CL-CL en la determinación de residuos del fungicida ditiocarbámico *tiram* en manzanas. La extracción se realiza mediante maceración en acetato de etilo, el cual se concentra en rotavapor, obteniéndose finalmente un extracto en MeOH. 50  $\mu$ l de este extracto final se analizan mediante CL con columnas acopladas, realizándose una purificación con 1.9 ml de CH<sub>3</sub>CN/NH<sub>4</sub>Ac 0.01M, pH 5 (40:60) sobre una columna de 50  $\times$  4.6 mm rellena de Microspher C18 de 3  $\mu$ m y, posteriormente, se transfiere la fracción de *tiram* a la segunda columna de 100 mm con 0.6 ml de CH<sub>3</sub>CN/NH<sub>4</sub>Ac 0.01M, pH 5 (70:30), realizándose la detección a 280 nm. El procedimiento CL-CL mejora en todos los sentidos al anteriormente propuesto basado en el uso de la CL con derivatización post-columna en cuanto a límite de detección (0.01 mg/kg) y estabilidad de la respuesta.

La etilentiourea (ETU) es un metabolito polar que se forma por degradación de los etilendisitiocarbamatos. Hogendoorn *et al.* (1991b) presentan un método de columnas acopladas para la determinación de ETU en muestras acuosas a nivel de trazas. El procedimiento consiste en la inyección directa de 200  $\mu$ l de agua (o de extracto) en una primera columna de 150 mm rellena de Hypersil ODS de 5  $\mu$ m (se utiliza una columna de tal longitud debido a la elevada polaridad del analito), realizándose una purificación con 2.6 ml de H<sub>2</sub>O con un 1% de CH<sub>3</sub>CN y 0.2% de NH<sub>3</sub>. La transferencia a la segunda columna, idéntica a la primera, se realiza con 0.44 ml de la misma fase móvil. Inyectando directamente una muestra de agua se obtiene un límite de detección de 1ppb, mientras que si se realiza una concentración por evaporación y posterior ELL con diclorometano en presencia de tiourea, se alcanzan límites de detección de 0.1 ppb. La detección se realiza mediante UV á 233 nm.

Así mismo, Hogendoorn y van Zoonen (1991c) analizan residuos de ETU en zumo de manzana utilizando el mismo procedimiento anterior de acoplamiento CL-CL, pero realizando una EFS C18 previa de 2 ml de muestra que retiene los interferentes, pero no el analito, que pasa rápidamente por el cartucho de 100 mg. 100  $\mu$ l del extracto obtenido se analizan mediante el diseño anterior, con un volumen de purificación de 2.6 ml y un volumen de transferencia de 0.27 ml, aunque los flujos se mantienen ahora un poco más bajos (0.8 y 0.9 ml/min, respectivamente). El procedimiento permite alcanzar límites de detección de 0.01 mg/kg.

Continuando con otro metabolito polar, aunque no tanto como CAAL o ETU, Hogendoorn *et al.* (1992a) han desarrollado un método de acoplamiento CL-CL en el que

se introduce la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra para aumentar la sensibilidad del procedimiento cuando el analito presente poca respuesta al sistema de detección, pero suficiente retención sobre fase reversa C18. El procedimiento se desarrolló para el análisis de residuos de metilisotiocianato (MITC), metabolito del fumigante metam sodio, así como del pesticida dazomet, en muestras de agua utilizando inyección directa de grandes volúmenes de muestra. Realizando una inyección directa de 770  $\mu\text{l}$  de muestra, el procedimiento permite alcanzar límites de detección de 1 ppb. Para obtener una mejora en la sensibilidad se debe realizar una ELL con isooctano seguida de un cambio de disolvente de isooctano a agua. Para ello, se utiliza un cartucho de EFS de silicagel que retiene al analito, eluyendo finalmente con agua. Para llevar a cabo el acoplamiento CL-CL se utiliza una primera columna de 50 mm rellena de Microspher C18 de 3  $\mu\text{m}$ , donde se inyectan 770  $\mu\text{l}$  de muestra de agua o extracto y se purifica con 1.7 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (40:60); la transferencia se realiza con 0.4 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (50:50) hacia una segunda columna de 100 mm de longitud, utilizándose detección UV a 237 nm.

Se han desarrollado otras aplicaciones basadas en el acoplamiento CL-CL y en la inyección de grandes volúmenes de muestra para pesticidas polares con mejores características en cuanto a detección UV y retención sobre fase reversa C18, como son la bentazona y el isoproturon. Hogendoorn y van Zoonen (1992b) han desarrollado un procedimiento para la determinación de residuos del herbicida bentazona en aguas potables mediante inyección directa de 2 ml de muestra y detección UV a 220 nm. La muestra se acidifica con ácido fosfórico y se analiza mediante CL con columnas acopladas utilizando como C-1 una columna de 50 mm de C18 de 3  $\mu\text{m}$  y un volumen de purificación de 4.7 ml de  $\text{MeOH}/0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4$  (50:50). La transferencia se realiza con 0.5 ml de  $\text{MeOH}/0.1\% \text{H}_3\text{PO}_4$  (60:40) a una columna de 100 mm de C18 de 3  $\mu\text{m}$ . El límite de detección del procedimiento es de 0.1 ppb con un tiempo total de análisis por muestra inferior a 10 min.

Así mismo, Hogendoorn *et al.* (1993b) también han desarrollado un procedimiento para la determinación de residuos del herbicida isoproturon en muestras de aguas potables, superficiales y subterráneas a nivel de 0.1 ppb mediante CL con columnas acopladas, inyección directa de 4 ml de muestra y detección UV a 244 nm. La muestra se analiza mediante CL con columnas acopladas utilizando como C-1 una columna de 50 mm de C18 de 3  $\mu\text{m}$  y un volumen de purificación de 5.85 ml de  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (47.5:52.5). La transferencia se realiza con 0.4 ml de la misma fase móvil a una columna de 100 mm de C18 de 3  $\mu\text{m}$ .

Como conclusión, cabe indicar que la CL con columnas acopladas es una técnica adecuada para el análisis rápido de trazas de pesticidas polares en muestras de aguas. Según las características de estos pesticidas, tales como retención sobre fase reversa C18 y detectabilidad, se pueden alcanzar límites de detección próximos a 0.1 ppb, e incluso inferiores, utilizando inyección directa de grandes volúmenes de muestra.

A. V. - BIBLIOGRAFÍA.

- Barceló, D. (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 117.
- Baumann, R.A.; Dijkman, E.; Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P. (1991), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **56**, 941.
- BOE (1990), Real decreto 1138/1990, *Boletín Oficial del Estado*, 20 de septiembre de 1990.
- Borwitzky, H.; Schomburg, G. (1982), *J. Chromatogr.*, **240**, 309.
- Brouwer, E.R.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th. (1990), *Chromatographia*, **29**, 415.
- Brouwer, E.R.; Liska, I.; Geerdink, R.B.; Fintrop, P.C.M.; Mulder, W.H.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th. (1991), *Chromatographia*, **32**, 445.
- Brouwer, E.R.; van Iperen, D.J.; Liska, I.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th. (1992), *Int.J. Environ. Anal. Chem.*, **47**, 257.
- CEE (1980), "Council Directive of 15 July 1980, Relating to the Quality of Water Intended for Human Consumption", 80/778/EEC, Bruselas, Comunidad Económica Europea.
- Coquart, V.; Hennion, M.C. (1991), *J. Chromatogr.*, **585**, 67.
- Dolphin, R.J.; Willmott, F.W.; Mills, A.D.; Hoogeveen, L.P.J. (1976), *J. Chromatogr.*, **122**, 259.
- Fielding, M.; Barceló, D.; Helweg, A.; Galassi, S.; Torstensson, L.; van Zoonen, P.; Wolter, R.; Angeletti, G. (1992), en *Pesticides in Ground and Drinking Water (Water Pollution Research Report, 27)*, Bruselas, Comunidad Económica Europea, pg 1-136.
- Geerdink, R.B.; van Balkom, C.A.A.; Brouwer, H.J. (1989), *J. Chromatogr.*, **481**, 275.
- ✓ • Goewie, C.E.; Brinkman, U.A.Th.; Frei, R.W. (1981), *Anal. Chem.*, **53**, 2072.
- ✓ • Goewie, C.E.; Kwakman, P.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th.; Maasfeld, W.; Seshadri, T.; Kettrup, A. (1984), *J. Chromatogr.*, **284**, 73.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A. (1985), *Sci. Total Environ.*, **47**, 349.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A. (1987a), *J. Chromatogr.*, **404**, 352.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A. (1987b), *J. Chromatogr.*, **410**, 211.
- Grob, K. (1981), *J. Chromatogr.*, **213**, 3.
- Grob, K. (1982), *J. Chromatogr.*, **237**, 15.

- Grob, K.; Walder, Ch.; Schilling, B. (1986a), *HRC & CC*, **9**, 95.
- Grob, K.; Stoll, J.M. (1986b), *HRC & CC*, **9**, 519.
- Grob, K.; Müller, E.; Meier, W. (1987), *J. High resolut. Chromatogr.*, **10**, 416.
- Grob, K. (1991), *On-line coupled LC-GC*, Hüthig, Heidelberg.
- Gustafson, D.I. (1989), *Environ. Toxicol. Chemistry*, **8**, 339.
- Häkkinen, V.; Grob, K.; Bürgi, Ch. (1989), *J. Chromatogr.*, **473**, 353.
- Hennion, M.C.; Subra, P.; Coquart, V.; Rosset, R. (1991), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 488.
- Hernández, F. (1993), "Análisis de Residuos de Plaguicidas", en "La Zona no Saturada y la Contaminación de las Aguas Subterráneas". L. Candela y M. Varela Eds., CIMNI, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E. (1988), "Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs", 5a edición. Greve, P.A. editor, SDU Publishers, La Haya, Países Bajos, parte II, p.158.
- Hogendoorn, E.A.; van der Hoff, G.R.; van Zoonen, P. (1989a), *HRC & CC*, **12**, 784.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E. (1989b), *J. Chromatogr.*, **475**, 432.
- ✓ • Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P. (1990a), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **55**, 1275.
- Hogendoorn, E.A.; de Jong, A.P.J.M.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th. (1990b), *J. Chromatogr.*, **511**, 243.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E.; van Zoonen, P. (1991a), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **339**, 348.
- ✓ • Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th. (1991b), *Chromatographia*, **31**, 285.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P. (1991c), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **56**, 933.
- Hogendoorn, E.A.; Verschraagen, C.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th. (1992a), *Anal. Chim. Acta*, **268**, 205.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P. (1992b), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **343**, 73.

- Hogendoorn, E.A. (1993a), "*Strategies in Method Development for the Determination of Polar Pesticides with Coupled-Column Liquid Chromatography*", Tesis Doctoral.
- Hogendoorn, E.A.; Brinkman, U.A.Th.; van Zoonen, P. (1993b), *J. Chromatogr.*, en prensa.
- van der Hoff, G.R.; Gort, S.M.; Baumann, R.A.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th. (1991), *HRC & CC*, **14**, 465.
- Huber, J.F.K.; van der Linden, R. (1973), *J. Chromatogr.*, **83**, 267.
- de Jong, G.J. (1980), *J. Chromatogr.*, **183**, 203.
- Kirkwood, R.C. (1987), *Herbicides and plant growth regulators*, en "Herbicides", D.H. Hutson y T.R. Roberts, Editores. Ed. John Wiley & Sons Ltd.
- Liska, I.; Brouwer, E.R.; Ostheimer, A.G.L.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th.; Geerdink, R.B.; Mulder, W.H. (1992), *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **47**, 267.
- Majors, R. (1980), *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 571.
- Maris, F.A.; Geerdink, R.B.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th. (1985), *J. Chromatogr.*, **323**, 113.
- Maris, F.A.; Noroozian, E.; Otten, R.R., van Dijck, R.C.J.M.; de Jong, G.J.; Brinkman, U.A.Th. (1988), *J. High resolut. Chromatogr.*, **11**, 197.
- Marvin, C.H.; Brindle, I.D.; Hall, C.D.; Chiba, M. (1990), *J. Chromatogr.*, **503**, 167.
- Mostert, I.A.; Ramsteiner, K.A. (1989), *J. Chromatogr.*, **477**, 359.
- Munari, F.; Trisciani, A.; Mapelli, G.; Trestianu, S.; Grob, K. Colin, J.M. (1985), *HRC & CC*, **8**, 601.
- Nielen, M.W.F.; Brinkman, U.A.Th.; Frei, R.W. (1985), *Anal. Chem.*, **57**, 806.
- Nielen, M.W.F.; Bleeker, R.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th. (1986), *J. Chromatogr.*, **358**, 393.
- Nielen, M.W.F.; Valk, A.J.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th.; Mussche, Ph.; de Nijs, R.; Ooms, B.; Smink, W. (1987), *J. Chromatogr.*, **393**, 69.
- Reupert, R.; Zube, I.; Plöger, E. (1992), *LC-GC Intl.*, **5**, 43.
- Roth, W.; Beschke, K.; Jauch, R.; Zimmer, A.; Koss, F.W. (1981), *J. Chromatogr.*, **222**, 13.

- Schomburg, G.; Ziegler, E. (1972), *Chromatographia*, **5**, 6.
- Schomburg, G.; Hussmann, H.; Weeke, F. (1974), *J. Chromatogr.*, **99**, 63.
- Schomburg, G.; Hussmann, H.; Hübinger, E. (1985), *HRC & CC*, **8**, 395.
- Slobodnik, J.; Brouwer, E.R.; Geerdink, R.B.; Mulder, W.H.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th. (1992), *Anal. Chim. Acta*, **268**, 55.
- Subra, P.; Hennion, M.C.; Rosset, R.; Frei, R.W. (1988), *J. Chromatogr.*, **456**, 121.
- van Vliet, H.P.M.; Bootsman, Th.C.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th. (1979), *J. Chromatogr.*, **185**, 483.
- van Zoonen, P.; Hogendoorn, E.A.; van der Hoff, G.R.; Baumann, R.A. (1992), *Tr. in Anal. Chem.*, **11**, 11.

## **B.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO**

Las técnicas cromatográficas acopladas se encuentran entre las más sensibles y selectivas disponibles para la determinación de residuos de pesticidas en muestras medioambientales. Con estas técnicas se efectúa una preseparación de los componentes de la muestra en una primera columna cromatográfica; posteriormente, una parte muy pequeña de la muestra, conteniendo los analitos, se transfiere "on-line" por medio de una interfase hacia la segunda columna cromatográfica en la que tiene lugar la separación de los mismos. Las técnicas cromatográficas acopladas más utilizadas en la actualidad en análisis de residuos de pesticidas son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL), también denominada con el término inglés de "column switching", y la cromatografía líquida acoplada a cromatografía de gases capilar (CL-CG).

El principal objetivo de esta Tesis es estudiar el potencial de la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (CL-CL) para el análisis de residuos de herbicidas polares seleccionados (*fenoxiácidos*, *glufosinato*, *glifosato* y el principal metabolito de éste último, *AMPA*).

Los métodos existentes para el análisis de residuos de estos herbicidas todavía utilizan mayoritariamente, bien la extracción líquido-líquido y determinación mediante cromatografía de gases con derivatización previa (*fenoxiácidos*), o bien concentración por evaporación de grandes volúmenes de muestra, purificación del extracto obtenido y cromatografía líquida con derivatización postcolumna y detección fluorescente (*glifosato* y *AMPA*). En ambos casos, se trata de procedimientos laboriosos y se utilizan agentes derivatizantes tóxicos; por otro lado, cuando se aplica la extracción líquido-líquido se consume una gran cantidad de disolventes orgánicos.

Además, en la actualidad sólo existe un procedimiento para el análisis de residuos de *glufosinato*, que es el propuesto por la casa comercial Hoescht, y recogido en el Manual de los Métodos Oficiales de Análisis de Residuos de Pesticidas alemán. Este procedimiento resulta extremadamente laborioso y no puede considerarse como un método aplicable al control rutinario de residuos de este herbicida; además, utiliza la CG previa derivatización con trimetilortoacetato. Aproximadamente, la duración del procedimiento completo de análisis podría estimarse en unas 7 horas.

La aplicación de un procedimiento con acoplamiento CL-CL para la determinación de los residuos de estos herbicidas presenta numerosas ventajas, como son: menor tiempo de análisis, menor manipulación de la muestra, menor uso de disolventes orgánicos, mayor selectividad y sensibilidad y automatización de la etapa de purificación.

Los objetivos específicos de la presente Tesis se pueden resumir en los siguientes puntos:

• **Herbicidas fenoxiácidos:**

- Desarrollo de un procedimiento para el análisis de residuos de MCPA y 2,4-D por cromatografía líquida en muestras de agua, realizando un estudio comparativo de la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida para el tratamiento previo de las muestras de agua.
- Desarrollo de un método de análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos mediante acoplamiento CL-CL y detección UV.

• **Glufosinato, glifosato y AMPA:**

- Estudio del comportamiento de estos herbicidas en columnas de fase amino con objeto de proponer procedimientos para su determinación por cromatografía líquida directa y estudiar las posibilidades de análisis utilizando técnicas cromatográficas acopladas.
- Desarrollo de un nuevo método para la determinación rápida, sensible y selectiva de residuos de glufosinato en aguas, para el que no existen métodos alternativos al propuesto por el fabricante, que resulta largo y tedioso. Para ello, se utiliza derivatización precolumna con FMOC y acoplamiento CL-CL con inyección de grandes volúmenes de muestra.
- Desarrollo de un método para la determinación rápida, sensible y selectiva de residuos de glifosato y su principal metabolito, AMPA, en aguas. Para ello, se utiliza derivatización precolumna con FMOC y acoplamiento CL-CL con inyección de grandes volúmenes de muestra.

Para la consecución de estos objetivos se ha seguido el Plan de Trabajo que se detalla a continuación:

- Revisión bibliográfica sobre antecedentes y estado actual de la determinación de los herbicidas seleccionados en muestras medioambientales.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de los herbicidas fenoxiácidos 2,4-D y MCPA por cromatografía líquida y determinación de las características analíticas del método.

- Estudio de las condiciones óptimas para la extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida de residuos de 2,4-D y MCPA en muestras de agua.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la separación mediante acoplamiento CL-CL de ocho herbicidas fenoxiácidos.
- Estudio de las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida de residuos de ocho herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua y optimización de la purificación de los extractos obtenidos.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos de ocho herbicidas fenoxiácidos y dicamba en muestras de aguas mediante acoplamiento CL-CL.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de los herbicidas glifosato, glufosinato y AMPA por cromatografía líquida con columna de fase amino y determinación de las características analíticas del método.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos del herbicida glufosinato en muestras de aguas mediante derivatización precolumna con FMOC y acoplamiento CL-CL con inyección de grandes volúmenes de muestra.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos del herbicida glifosato y su principal metabolito, AMPA, en muestras de aguas mediante derivatización precolumna con FMOC y acoplamiento CL-CL con inyección de grandes volúmenes de muestra.

El presente trabajo ha quedado reflejado en los siguientes artículos que, hasta el momento, se han publicado en revistas de carácter internacional:

"Study of multi-residue methods for the determination of selected pesticides in groundwater"

F. Hernández, J. Beltran, J.V. Sancho.

*The Science of Total Environment*, **132**, 297-312, (1993).

"Development of a multiresidue method for the analysis of chlorophenoxy herbicides in cow stomach tissue using off-line SPE and on-line precolumn switching"

E.A. Hogendoorn, W.F. de Graaf, J.V. Sancho, M.J.M. Smiers, P. van Zoonen.

*Med. Fac. Landbouww.* **57**, 1247-1254, (1992).

"A rapid method for the residue analysis of eight chlorophenoxyacids in environmental water samples using off-line SPE and on-line selective precolumn switching"

J.V. Sancho, F. Hernández, E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen.

*Analytica Chimica Acta*, **283**, 287-296, (1993)

"Rapid determination of glufosinate in environmental water samples using 9-fluorenylmethoxycarbonyl precolumn derivatization, large-volume injection and coupled-column liquid chromatography"

J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen.

*Journal of Chromatography*, (1994), en prensa.

**C.- ANALISIS DE RESIDUOS DE HERBICIDAS FENOXIACIDOS**

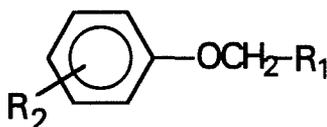
## C. I.- INTRODUCCION

### I.1. Características Generales.

La utilización de herbicidas ha sustituido en las últimas décadas a los métodos mecánicos en el control de las malas hierbas en aquellas zonas donde se practica una agricultura intensiva. Los herbicidas han contribuido, junto con los fertilizantes y otros pesticidas, a la obtención de mayores rendimientos y a la reducción de costes en la actividad agrícola. El mayor empleo de herbicidas se sitúa en América del Norte, Europa Occidental, Japón y Australia.

Además, los herbicidas también se utilizan en polígonos industriales, cunetas de carretera, vallados, canales de riego, líneas de ferrocarril, pistas de aeropuertos, etc., eliminando plantas no deseadas que pueden causar daño, peligro de incendio o impedir el trabajo de los operarios.

Dentro de los diferentes tipos de herbicidas utilizados (triazinas, fenilureas, glifosato, etc.), los herbicidas fenoxiácidos constituyen uno de los grupos más empleados actualmente. Estos herbicidas se caracterizan por la siguiente fórmula general:

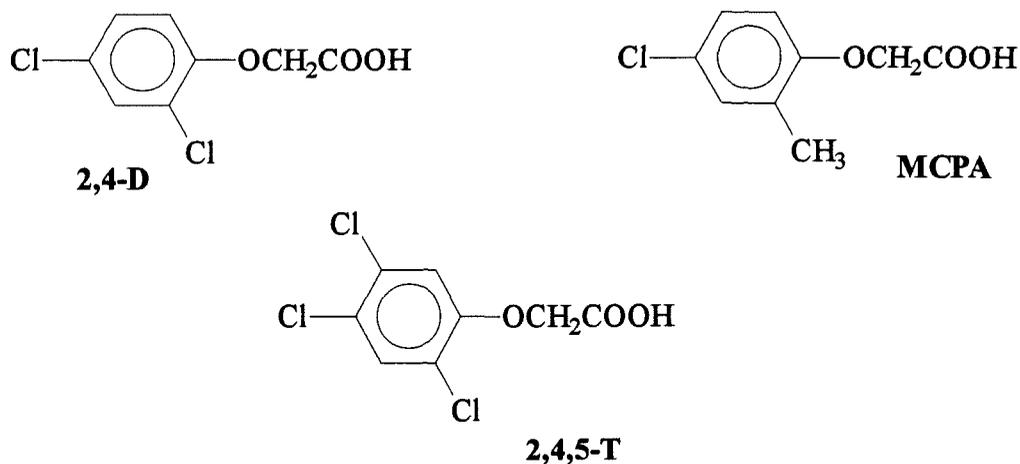


en la que R<sub>1</sub> representa un grupo ácido (acético, propiónico, butírico, etc.) y R<sub>2</sub> el conjunto de sustituyentes del núcleo aromático, donde siempre se encuentra presente algún átomo de cloro, por lo que también se conocen como herbicidas clorofenoxiácidos. Algunos de los herbicidas correspondientes a este grupo, como el 2,4-D o el MCPA, se emplean desde hace muchos años. Estos compuestos presentan cierta actividad hormonal, por lo que clásicamente estos herbicidas y otros homólogos se conocen como herbicidas hormonales. La continua evolución en este campo ha dado lugar a otros herbicidas de este tipo que ya no tienen ninguna actividad hormonal y que se alejan bastante en sus propiedades genéricas de los "herbicidas hormonales". Por esta razón, se prefiere la denominación general herbicidas fenoxiácidos o clorofenoxiácidos, e incluso "*fenoxialcanoicos*" -quizás más correcta, pues el radical R<sub>1</sub> es siempre un ácido alcanoico- para estos compuestos, sin involucrar actividades hormonales que en unos casos existen y en otros no.

Dentro del grupo de herbicidas fenoxiácidos se puede distinguir entre fenoxiacéticos, fenoxipropiónicos y fenoxibutíricos.

### Herbicidas Fenoxiacéticos.

Los compuestos que se pueden considerar como prototipos de este grupo de herbicidas son el 2,4-D, 2,4,5-T y MCPA.



**Figura 9.** Estructura química de los diferentes herbicidas fenoxiacéticos.

En este tipo de compuestos el radical R<sub>1</sub> es el ácido acético. Son los conocidos desde hace más tiempo y se les ha denominado clásicamente *herbicidas hormonales*. Se trata de herbicidas de post-emergencia de malas hierbas, que se absorben por los tejidos vegetales y se trasladan por la savia a velocidad notable (10-100 cm/hora), de modo que llegan a los puntos donde el consumo de alimento es mayor y ejercen allí su acción. Así pues, son herbicidas de contacto —precisan ser absorbidos por la hierba presente— y su actividad óptima se da cuando la mala hierba se encuentra en crecimiento activo. La absorción no es igual para todos los compuestos; ello explica ciertas particularidades en cuanto a selectividad y resistencia, así como algunos matices diferentes en su modo de acción.

Su mecanismo de acción no está aún perfectamente aclarado. En ocasiones se ha atribuido a una inhibición de la fosforilación oxidativa, pero parece que este camino, aunque existe, no es importante ni preponderante. Otras teorías más extendidas atribuyen su acción a un desencadenamiento de reacciones complejas que influyen en la síntesis del

ARN, de modo que se provoca una proliferación celular que es la que ocasiona los síntomas bien conocidos de su acción. Como ya se ha indicado, varios de estos herbicidas, como el 2,4-D y 2,4,5-T, se comportan como productos hormonales, aunque a muy bajas dosis.

En su metabolismo todos estos compuestos siguen, aproximadamente, un proceso similar. En los animales son poco degradados y se excretan prácticamente inalterados. En las plantas sufren diversas alteraciones metabólicas que conducen, de modo principal, a la pérdida del grupo acético y a la hidroxilación del núcleo. Lo más importante de este proceso es la formación de una serie de conjugados con componentes vegetales, especialmente azúcares y aminoácidos, que han sido especialmente estudiados. En el suelo los derivados fenoxiacéticos sufren una degradación microbiana dando lugar a ácidos cloromúxicos, que pasan luego a cloruros, dióxido de carbono y agua. Aunque no actúan a través del suelo, se ha estudiado su persistencia en el mismo, cifrándose en 6-8 semanas según el tipo de suelo y formulado empleado. Todos estos compuestos pueden considerarse "no persistentes", siendo el 2,4-D el que lo es menos y el 2,4,5-T el que más, ocupando el MCPA un lugar intermedio.

Los derivados fenoxiacéticos no se emplean en forma libre, sino como sales o ésteres. El uso de ésteres volátiles, antes frecuente, fue causa, en épocas anteriores, de daños a cultivos próximos, no tratados, y alcanzados por la deriva de vapores de la pulverización. Por esta razón han sido sustituidos por ésteres de baja volatilidad y por sales de amina y etanolamina, carentes prácticamente de volatilidad, y que proporcionan una mayor seguridad a los cultivos vecinos.

La sal sódica del 2,4-D, soluble en agua, fue el primer producto empleado de esta clase, pero hoy en día apenas se usa, habiéndose sustituido por las sales de amina y los ésteres. Estos últimos son más enérgicos que las sales, se absorben mejor, precisan menor dosis, son más resistentes a la lluvia y tienen mejor acción que las sales. Los ésteres se dividen en dos clases, de alta y baja volatilidad; de los primeros (*muy volátiles*) puede citarse el etílico, que se evapora fácilmente y es arrastrado por el aire pudiendo causar daños a los cultivos vecinos sensibles. Los de baja volatilidad son de acción más lenta, aunque más eficaces, y se cuentan entre ellos los ésteres butílicos, octílico, de propilenglicol, butoxietanol, etc., de mayor a menor volatilidad. Actualmente, están cada día más extendidas las formulaciones que utilizan las sales de amina o trietanolamina, fácilmente solubles en agua, que tienen la ventaja de ser muy poco volátiles. Las formulaciones de sales de amina, trietanolamina, etc. pueden conducir a la formación de sales calcáreas insolubles al diluirlas en aguas corrientes, usuales para su aplicación. Por

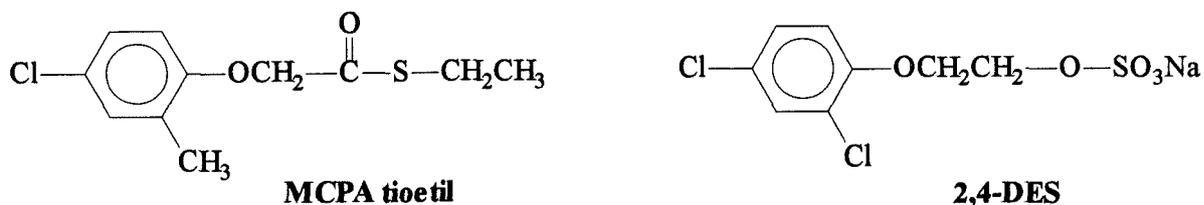


que aún prosigue. Igualmente, esta dioxina ha sido la causa de problemas de contaminación del medio ambiente. Este compuesto puede causar lesiones muy variadas, de las que las más conocidas son las dérmicas, como el acné, pero hay otras menos manifiestas como las cancerígenas y teratógenas, no completamente aclaradas. Su modo de acción es poco conocido y, en resumen, la TCDD es un tóxico poderoso, cuyas consecuencias en la salud humana y su modo de acción son objeto de numerosos estudios.

La mejora en la síntesis y control de su fabricación han permitido ya desde hace años rebajar considerablemente la cuantía de la TCDD como impureza del 2,4,5-T. Si inicialmente en el uso del "Agent Orange" se llegó a 65 ppm, actualmente se ha rebajado a menos de 0.1 ppm, que es el límite máximo tolerado en la mayoría de países.

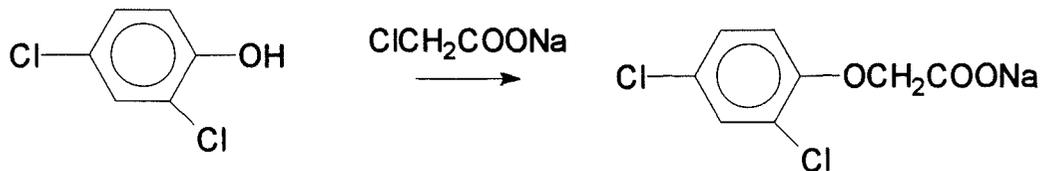
Aunque se ha temido por razones varias que otros derivados fenoxiacéticos pudiesen arrastrar TCDD como contaminante, lo cierto es que de acuerdo con los métodos de síntesis habituales en su obtención ello no puede ocurrir. En el caso del 2,4-D pueden formarse dioxinas, pero no la TCDD. Como contaminante del 2,4-D se cita la 1,3,6,8-TCDD, que se encuentra también en herbicidas derivados de difeniléter y en la incineración de maderas. Es mucho menos tóxica que la 2,3,7,8-TCDD y se degrada en el suelo (Muir, 1985).

Dentro de este tipo de productos, se encuentran también el MCPA-Tioetil (Fenotiol), de origen japonés y que tiene utilidad en arroz, cereales y cultivos frutales contra dicotiledóneas; y el 2,4-DES (Disul), derivado sulfonado del 2,4-D que, aunque es poco usado, merece mención especial por sus peculiares características (**Figura 10**). Mientras los demás herbicidas de este grupo son de contacto, el 2,4-DES no tiene acción como tal, sino que se aplica como pre-emergente convirtiéndose en el suelo en 2,4-D que es el que ejerce su acción. Su persistencia en el suelo es escasa y, como precisa acción microbiana para transformarse en 2,4-D, es inactivo en suelo estéril. Como productos similares pueden mencionarse el 2,4-ETN, 2,4-DED y 2,4-DEB que, aunque fueron utilizados en un tiempo, ya no se emplean en la actualidad.



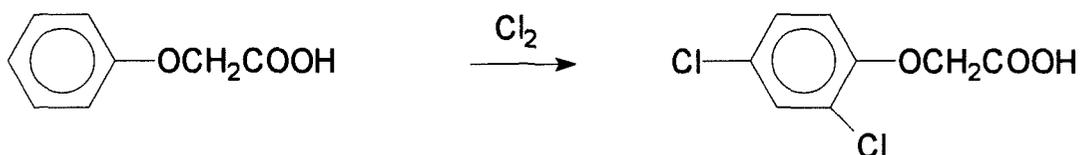
**Figura 10.** Estructura química de los herbicidas MCPA-Tioetil y 2,4-DES.

El 2,4-D a gran escala se prepara, generalmente, por condensación de 2,4-diclorofenol con la sal sódica o amónica del ácido monocloroacético:



El 2,4-D preparado de este modo siempre contiene 2,4-diclorofenol, como impureza.

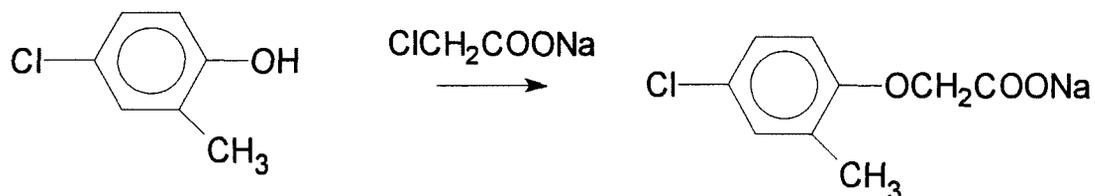
La cloración del ácido fenoxiacético, en medio acuoso o en un disolvente orgánico, genera un producto más puro pero, también encarece el proceso:



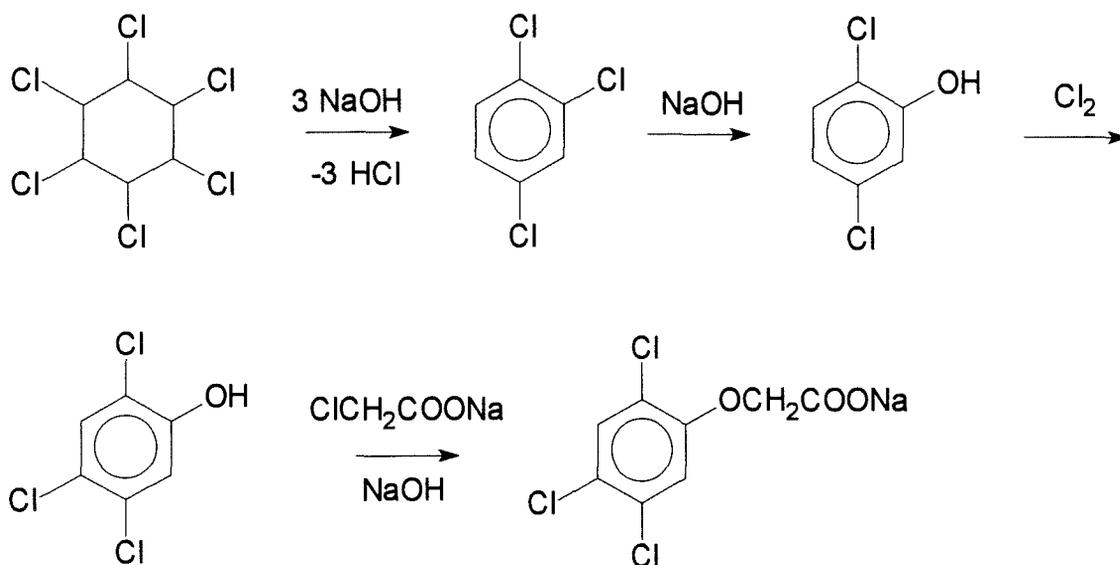
El producto así sintetizado no contiene diclorofenol, de desagradable olor.

Los ésteres se obtienen a partir del ácido por calefacción en presencia de catalizador, siendo el isopropil éster el más utilizado.

Respecto al MCPA, se obtiene por condensación de 4-cloro-*o*-cresol con monocloroacetato sódico en disolución acuosa alcalina. Como el isómero 6-cloro-*o*-cresol siempre está presente como una impureza del 4-cloro-*o*-cresol, el MCPA preparado también contiene el ácido 6-cloro-3-metilfenoxiacético. En el MCPA técnico, la proporción del isómero 4-cloro y 6-cloro es, aproximadamente, 60:40.



La fabricación del 2,4,5-T se basa en la obtención, en primer lugar, de 2,4,5-triclorofenol a partir de hexaclorociclohexano y la posterior condensación con monocloroacetato sódico.



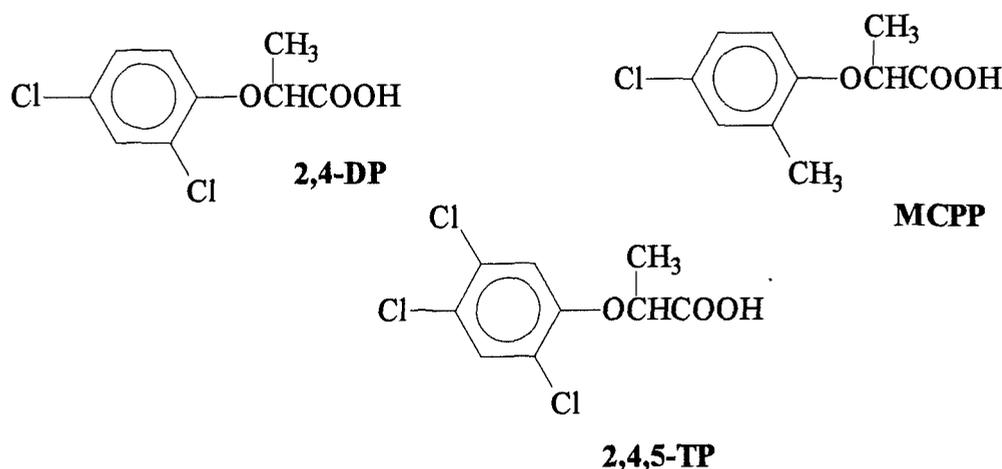
### Herbicidas Fenoxipropiónicos

En este grupo las cadenas laterales del radical "fenoxi" están constituidas por 3 átomos de carbono. Los llamados "propiónicos" son, realmente, 2-(fenoxipropiónicos), es decir, se les puede considerar como fenoxi(metil)acéticos, lo que les confiere cualidades asimilables a los derivados fenoxiacéticos antes considerados. Sólo la forma D(+) de este grupo de compuestos es activa, mientras que la forma L(-) no lo es (Burström *et al.*, 1955).

Los productos técnicos suelen ser mezclas racémicas, que contienen los dos isómeros en igual cantidad.

Los derivados fenoxipropiónicos ejercen una buena acción sobre una serie de malas hierbas en las que los fenoxiacéticos no actúan eficazmente como son, por ejemplo, *Galium* y *Stellaria*. Por tal razón, se usan frecuentemente en mezclas con fenoxiacéticos y otros herbicidas.

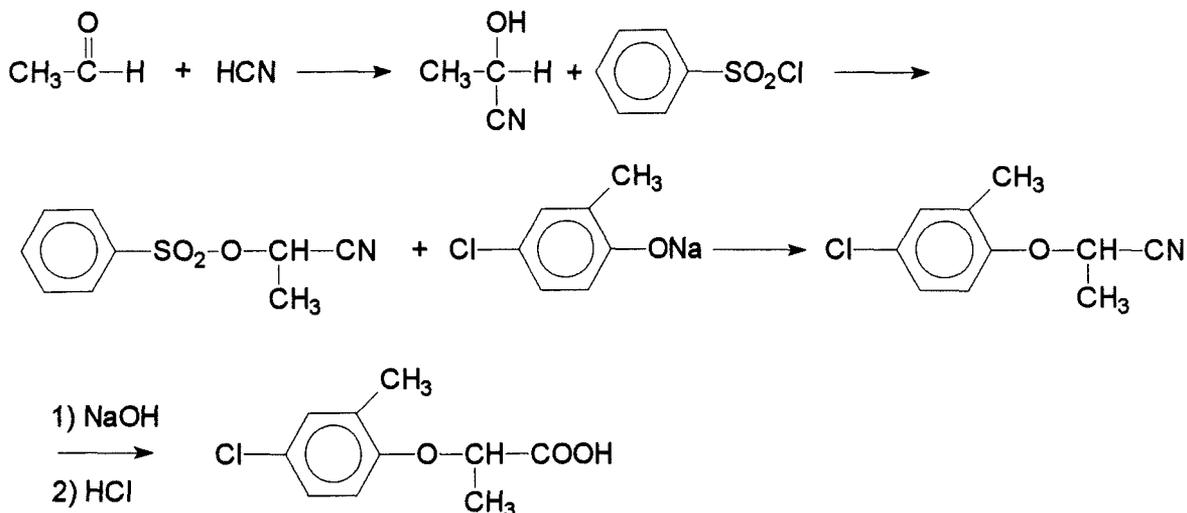
Los tres compuestos más importantes de este grupo son el 2,4-DP (diclorprop), el MCPP (mecoprop) y el 2,4,5-TP (fenoprop) (Figura 11).



**Figura 11.** Estructura química de los herbicidas fenoxipropiónicos.

El diclorprop se prepara por condensación del 2,4-diclorofenol y el ácido  $\alpha$ -cloropropiónico, o por cloración del ácido  $\alpha$ -fenoxipropiónico. El producto técnico es una mezcla 1:1 del biológicamente activo isómero dextro y del inactivo levo.

El mecoprop se prepara por condensación del *p*-cloro-*o*-cresol con ácido  $\alpha$ -cloropropiónico, aunque también se recomienda la siguiente ruta alternativa:



Dentro de este grupo merece consideración aparte el Fenoprop (2,4,5-TP o "Sylvex") que es considerado como un regulador fisiológico, lo mismo que el Diclorprop. Como herbicida el Fenoprop se asemeja a su análogo 2,4,5-T, poseyendo excelente acción contra arbustos y plantas leñosas, pero al igual que el 2,4,5-T ha quedado sujeto a los problemas derivados de la contaminación por TCDD, con las restricciones consiguientes que en Estados Unidos han conducido a la cancelación de las aplicaciones concedidas a ambos herbicidas.

### Herbicidas Fenoxibutíricos.

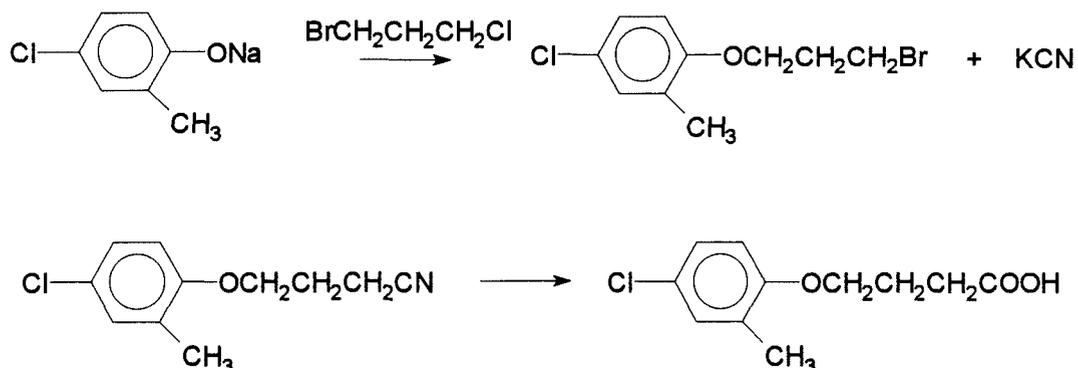
Los fenoxibutíricos, con una cadena lateral y lineal de 4 carbonos, precisan un proceso de  $\beta$ -oxidación con el fin de ejercer su acción. Este proceso consiste en una oxidación del átomo de carbono en posición  $\beta$  respecto al radical carboxi, que termina con la descomposición en un ácido con dos átomos de carbono menos, según el siguiente esquema general:



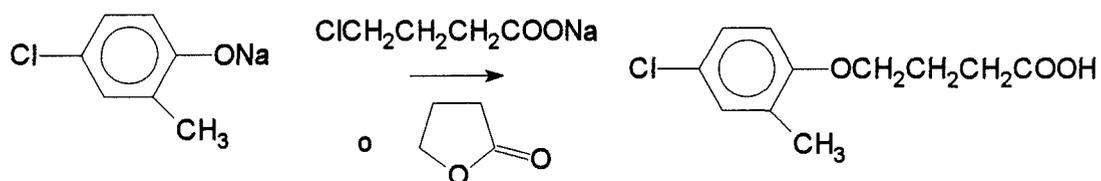
Synerholm y Zimmermann (1947) investigaron siete ácidos 2-4-diclorofenoxialcanoicos en hojas de tomate, de los cuales sólo los que contenían un número impar de grupos metileno (acético, butírico, caproico y caprílico) fueron activos. Debido a



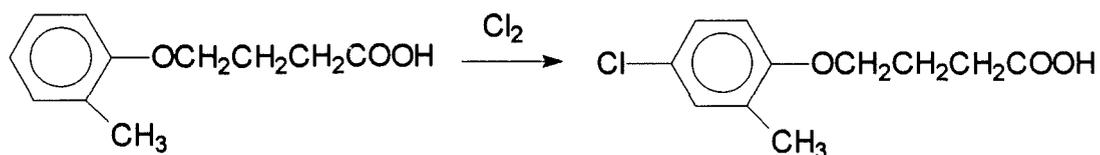
1) Reacción de la sal sódica del fenol sustituido con 1-bromo-3-cloropropano, con posterior conversión del intermedio formado en nitrilo y saponificación de este último:



2) Reacción de la sal sódica del fenol sustituido con  $\gamma$ -butirolactona o con monoclorobutirato sódico:

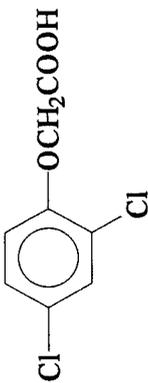
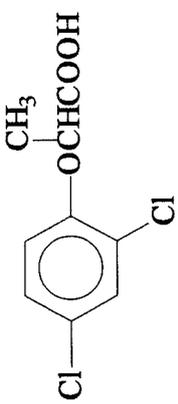
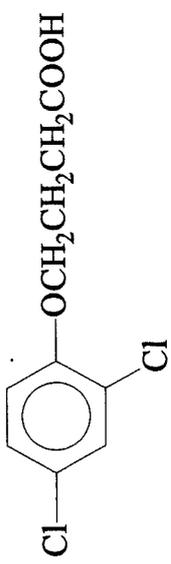


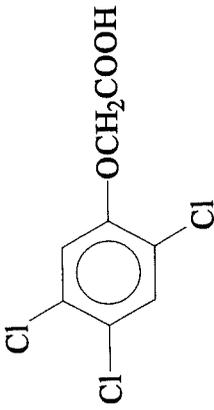
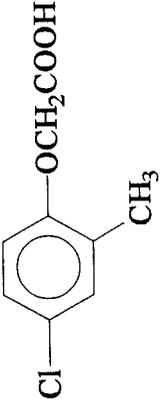
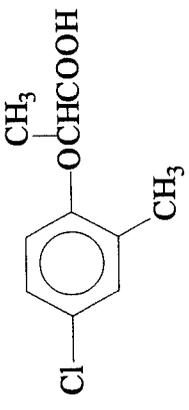
3) Cloración del ácido 3-(2-metilfenoxi)butírico en medio acuoso o en medio orgánico:

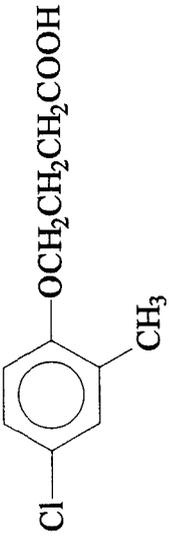
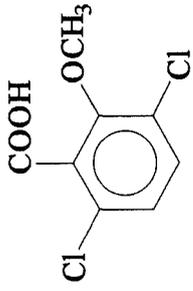


A continuación, se detalla la información más relevante sobre los herbicidas clorofenoxiácidos estudiados en esta Memoria, así como Dicamba, herbicida derivado del ácido clorobenzoico de estructura química parecida, y que se analiza frecuentemente junto con los fenoxiácidos.

**Tabla 5. Características físico-químicas más importantes de los herbicidas fenoxiacidos estudiados (Pesticide Manual, 1991).**

Herbicida	Estructura química	Sol. en agua (mg/l)	pKa	Formulados	Toxicidad
2,4-D	<p>Nomenclatura (IUPAC)</p>  <p>ácido (2,4-diclorofenoxi)acético</p>	620	2.64	<p>dimetilamonio: <i>Agricorn, Ferrimine.</i></p> <p>amina: <i>Cloroxone, Quinoxone.</i></p> <p>isooctil: <i>Esteron, Araltan</i></p> <p>butilglicólico: <i>Fermesta, Hedonal</i></p>	<p>LD<sub>50</sub> (mg/kg) 375</p> <p>LC<sub>50</sub> (mg/l) 0.5-1.2</p>
2,4-DP (diclorprop)	 <p>ácido (RS)-2-(2,4-diclorofenoxi)propiónico.</p>	350	3.0	<p>potasio: <i>Hedonal DP.</i></p> <p>dimetilamonio: <i>Duplosan DP.</i></p>	<p>LD<sub>50</sub> (mg/kg) 800</p> <p>LC<sub>50</sub> (mg/l) &gt; 100</p>
2,4-DB	 <p>ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)butírico</p>	46	4.8	<p>dimetilamonio: <i>Butoxone.</i></p> <p>sodio y potasio: <i>Embutox.</i></p> <p>isooctil: <i>Butoxone Ester, Embutox E</i></p>	<p>LD<sub>50</sub> (mg/kg) 700</p>

Herbicida	Estructura química Nomenclatura (IUPAC)	Sol. en agua (mg/l)	pKa	Formulados	Toxicidad
2,4,5-T	 <p>ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético</p>	150	2.85	amina: <i>Silvioxone SL</i> isooctil: <i>Silvioxone EC</i> butofil: <i>Silvioxone</i>	LD <sub>50</sub> (mg/kg) 300 LC <sub>50</sub> (mg/l) 350
MCPA	 <p>Acido (4-cloro-2-metilfenoxi)acético</p>	825	3.07	dimetilamonio: <i>Hedonal M, Hermenon.</i> amina: <i>Cornar 40, U46 M.</i> potasio: <i>Agroxone, Linoxone</i>	LD <sub>50</sub> (mg/kg) 700 LC <sub>50</sub> (mg/l) 117
MCPP (mecoprop)	 <p>ácido (RS)-2-(4-cloro-<i>o</i>-toliloxi)propiónico.</p>	620	3.78	potasio: <i>Primma Galium.</i> dimetilamonio: <i>Duplosan KV</i>	LD <sub>50</sub> (mg/kg) 930

Herbicida	Estructura química	Sol. en agua (mg/l)	pKa	Formulados	Toxicidad
MCPB	<p>Nomenclatura (IUPAC)</p>  <p>ácido 4-(4-cloro-<i>o</i>-toliloxi)butírico</p>	44	4.84	<p>dimetilamonio: <i>Butoxone 200.</i></p> <p>sodio y potasio: <i>Embutox.</i></p> <p>isooctil: <i>Butoxone Ester,</i> <i>Embutox E</i></p>	<p>LD<sub>50</sub> (mg/kg) 680</p> <p>LC<sub>50</sub> (mg/l) 65</p>
Dicamba	 <p>ácido 3,6-dicloro-<i>o</i>-anísico.</p>	6500	1.95	<p>dimetilamonio: <i>Barvel 2S.</i></p> <p>sodio: <i>Barvel II.</i></p>	<p>LD<sub>50</sub> (mg/kg) 1700</p> <p>LC<sub>50</sub> (mg/l) 135</p>

## I.2. Herbicidas fenoxiácidos en el medio ambiente.

Los herbicidas incluyen un grupo muy variado de compuestos tóxicos, aunque, en general, lo son menos que otros pesticidas para los mamíferos, ya que han sido diseñados para interferir en el metabolismo de las plantas, más que en sistemas animales. Sin embargo, existe una gran preocupación por la presencia de estos compuestos en el medio ambiente, especialmente en las aguas, debido a las ingentes cantidades de herbicidas que se usan en la actualidad. Por ello, se necesita conocer la persistencia de estos compuestos en el medio ambiente, así como su movilidad y las posibilidades de que puedan llegar hasta el agua subterránea.

Los herbicidas, una vez aplicados sobre el suelo, pueden sufrir transformación por procesos químicos o biológicos, pudiendo llegar a producirse en muchos casos una completa mineralización. La persistencia en el suelo de un herbicida depende de la rapidez con que se metaboliza o transforma en productos de degradación, así como de su movilidad en el mismo, lo que le permita alcanzar el agua subterránea y contaminarla. Por otro lado, herbicidas que difícilmente podrían contaminar un agua subterránea por su poca persistencia o movilidad en el medio, pueden generar productos de transformación de alta persistencia y movilidad, e incluso con mayor toxicidad que el producto de partida. Por todo ello, resulta necesario conocer los productos de transformación de los herbicidas y diseñar métodos fiables de análisis para determinar residuos, no sólo de los herbicidas aplicados, sino también de sus productos de transformación en el medio ambiente.

Las estructuras de los herbicidas fenoxiácidos se basan en ácidos fenoxiacético, fenoxipropiónico y fenoxibutírico clorados, que normalmente se formulan como aminas sustituidas, ésteres y sales alcalinas. Una vez presentes en el suelo, se ha establecido que los formulados como ésteres sufren una rápida hidrólisis para formar el anión fenoxialcanoato ( $\text{Ph-O-CH}_2\text{-COO}^-$ ). Por consiguiente, los ésteres butilglicólico, *n*-butílico e isooctílico del 2,4-D se convierten rápidamente en el anión del ácido 2,4-D en suelos con humedades elevadas (Smith, 1972). Análogamente, los ésteres butilglicólico, *n*-butílico e isooctílico de MCPA y 2,4,5-T, se hidrolizan en el suelo a sus correspondientes aniones (Smith y Hayden, 1980). Estos aniones podrían reasociarse con cationes inorgánicos presentes en el suelo antes de sufrir degradación biológica (Smith, 1989).

También se ha observado que los herbicidas fenoxiácidos se transforman biológicamente por rotura del enlace entre el oxígeno y el carbono en la posición 2 de la cadena lateral. Los fenoles así formados pueden sufrir metilación biológica para formar los correspondientes anisoles (McCall *et al.*, 1981; Smith, 1985). La  $\beta$ -oxidación también parece

ser un mecanismo importante mediante el cual los ácidos fenoxibutíricos se convierten en el suelo a ácidos fenoxiacéticos (Smith y Hayden, 1981).

Las principales reacciones metabólicas asociadas a los fenoxiácidos son:

- Hidroxilación del anillo aromático.
- $\beta$ -oxidación de la cadena alifática.
- Rotura del enlace éter.
- Deshalogenación.
- Rotura del anillo.

Entre todos los herbicidas fenoxiácidos, son el 2,4-D y el MCPA los más utilizados y, por ello, los más conocidos en cuanto a su comportamiento en el medio ambiente. Así, se ha llegado a diseñar un mapa completo de degradación de estos compuestos desde la molécula original hasta metabolitos ecológicamente aceptables. En las **Figura 13** y **14** se muestran las secuencias de reacciones de degradación sugeridas para el 2,4-D y MCPA, respectivamente.

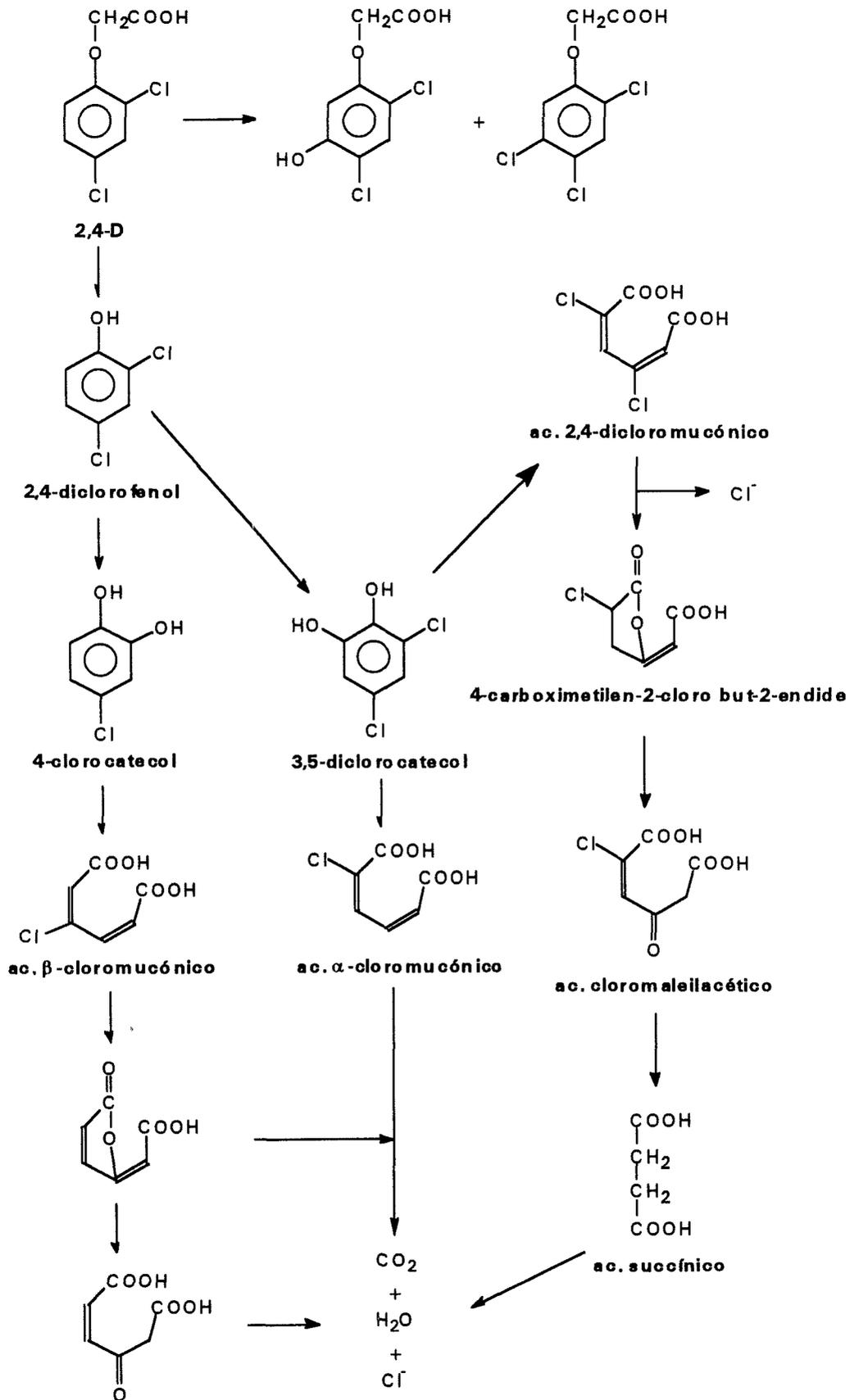


Figura 13. Ruta de degradación del herbicida fenoxiácido 2,4-D hasta especies inorgánicas

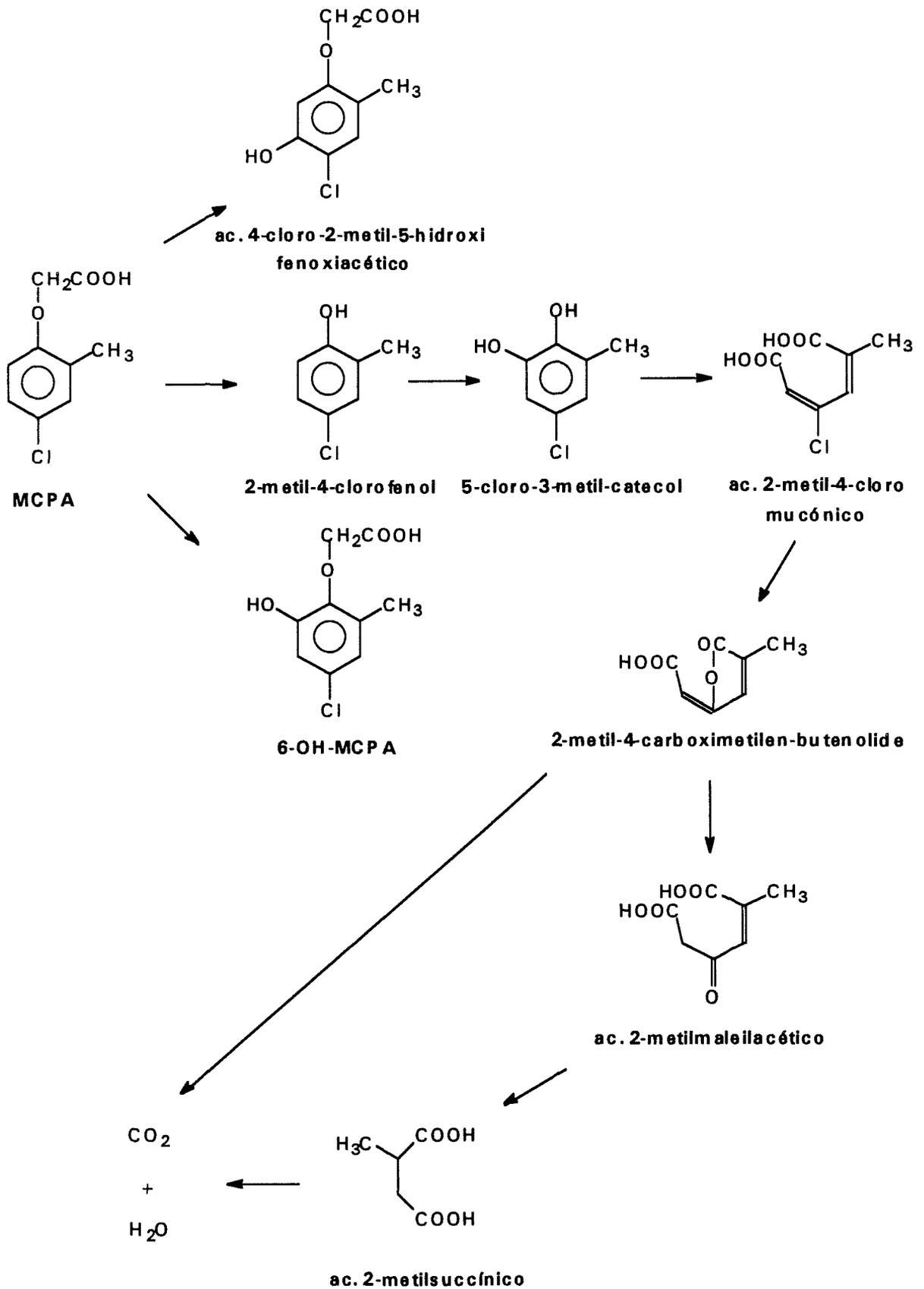
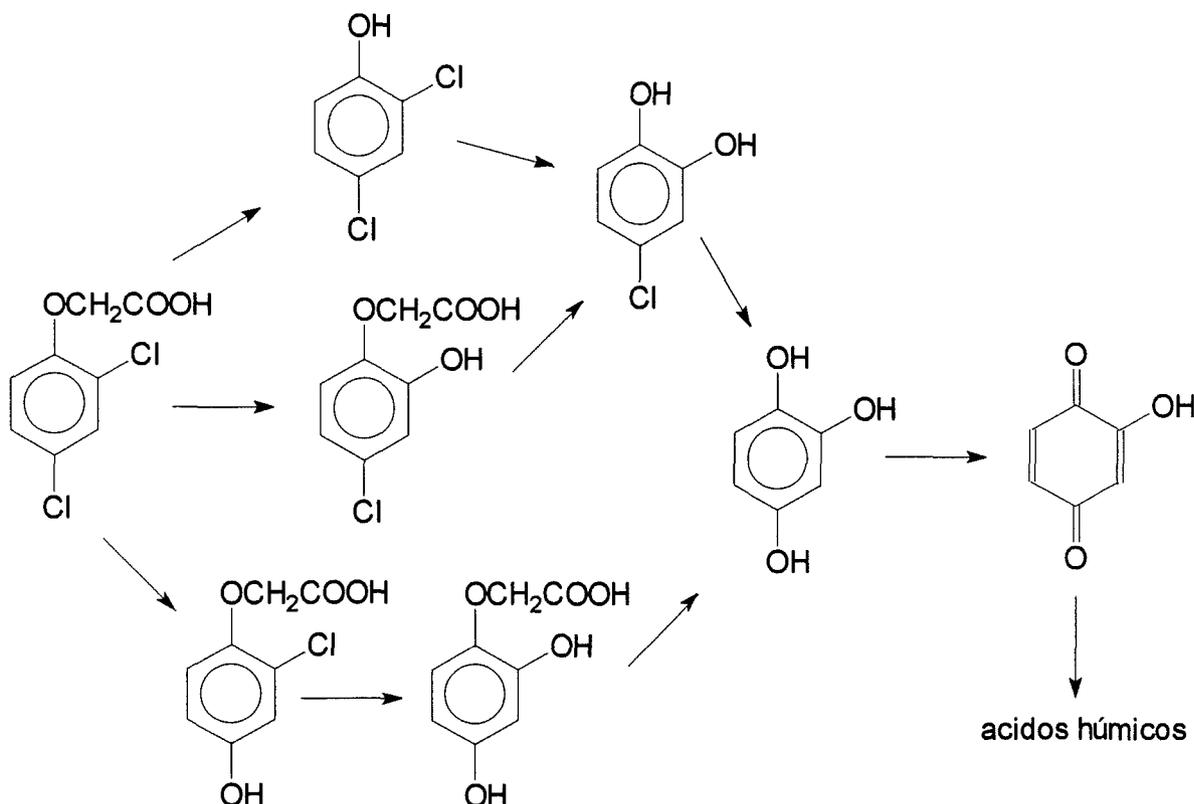


Figura 14. Ruta de degradación del herbicida fenoxiácido MCPA hasta especies inorgánicas.

La descomposición fotoquímica del 2,4-D por hidrólisis y oxidación puede conducir a través de varios intermedios a ácidos húmicos poliquinoidales libres de cloro. El intermedio 1,2,4-trihidroxibenceno formado se oxida en contacto con el aire para formar 2-hidroxibenzoquinona, que se polimeriza para generar ácidos húmicos (Crosby y Tutass, 1966):

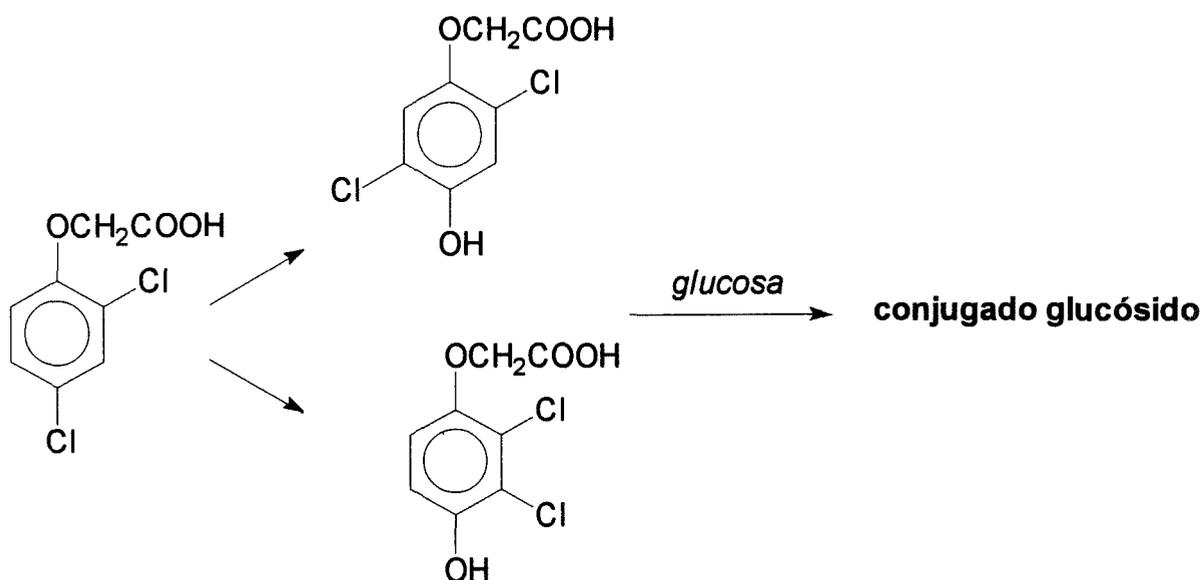


**Figura 15.** Descomposición fotoquímica del 2,4-D hasta la formación de ácidos húmicos.

De los herbicidas fenoxiacéticos, parece ser que es el 2,4,5-T el que se degrada más lentamente por vía microbiológica, aproximadamente unas tres veces más que el 2,4-D. Además, se ha demostrado (Alexander y Lustigman, 1966) que los ácidos fenoxialcanoicos que contienen un átomo de cloro en posición meta en el anillo con respecto al enlace éter son más persistentes que los que no lo poseen.

La actividad excretora de las plantas superiores es considerablemente menor que la de los animales. Para la eliminación de sustancias peligrosas, como los pesticidas, las plantas forman conjugados, en reacciones catalizadas por enzimas, con los compuestos que entran en

las células. El pesticida metabolizado por conjugación es depositado (en ocasiones, después de sufrir polimerización) en partes inactivas de la planta, como la pared celular. Se ha demostrado que los fenoxiácidos forman conjugados con la glucosa, aminoácidos y proteínas de las plantas superiores. Durante su metabolismo, el 2,4-D se hidroxila en el anillo y el grupo hidroxilo se conjuga con la glucosa formándose el  $\beta$ -D-glucósido del ácido 4-hidroxi-2,5-diclorofenoxiacético y del 4-hidroxi-2,3-diclorofenoxiacético (Feung *et al.*, 1971) (Figura 16).



**Figura 16.** Conjugación del 2,4-D hidroxilado con glucosa y formación de glucósidos.

Así mismo, el 2,4-D se conjuga rápidamente por medio de un enlace amida con varios aminoácidos como el ácido glutámico, ácido aspártico, alanina, valina, leucina, fenilalanina y triptófano (Feung *et al.*, 1974). El 2,4-D también se puede asociar a macromoléculas, como proteínas (Galston y Davies, 1969).

Matolcsy *et al.* (1988) indican que durante la descomposición de los herbicidas fenoxiácidos no se forma ningún producto de transformación o metabolito más tóxico que los compuestos originales, por lo que no existe peligro crónico para los humanos ni para el medio ambiente. Sin embargo, no parece ser ésta la opinión generalizada. Así, Somasundaram *et al.* (1990), estudiaron la toxicidad de los herbicidas 2,4-D y 2,4,5-T, así como sus metabolitos 2,4-diclorofenol y 2,4,5-triclorofenol, respectivamente, indicando que éstos últimos eran más tóxicos que los compuestos originales.

Por lo que respecta a la movilidad de los herbicidas clorofenoxiácidos en el suelo y a su facilidad para alcanzar las aguas subterráneas, como ya se ha indicado en el apartado de Introducción General, se puede utilizar el índice GUS como una aproximación sencilla al problema.

Como ejemplo se calcula a continuación el índice GUS para el 2,4-D. En la bibliografía se encuentran valores de  $T_{0.5}$  entre 2 y 14 días, con una media de 8 días, mientras que el valor de  $K_{oc}$  oscila entre 10.2 y 95.2  $ml \cdot g^{-1}$  con una media de 52.7 (Fielding *et al.*, 1992).

**Tabla 6.** Valores del índice GUS calculados para el herbicida fenoxiácido 2,4-D.

$T_{0.5}$ (días)	$K_{oc}$ ( $ml \cdot g^{-1}$ )	GUS	Clasificación
8 (medio)	52.7 (medio)	2.06	Movilidad intermedia
14 (máximo)	95.2 (máximo)	2.32	Movilidad intermedia
2 (mínimo)	10.2 (mínimo)	0.90	Baja movilidad
2 (mínimo)	95.2 (máximo)	0.61	Baja movilidad
14 (máximo)	10.2 (mínimo)	3.43	Alta movilidad

Se puede observar (**Tabla 6**) que la variación en los valores de  $T_{0.5}$  y  $K_{oc}$  disponibles en la bibliografía conlleva una notable diferencia en los valores del índice GUS, repercutiendo en la posible predicción sobre si el herbicida será capaz de alcanzar el agua subterránea. De este modo, se comprueba que si se utiliza un método matemático sencillo como el GUS, cualquier pequeña variación en los valores de los parámetros de entrada puede cambiar la clasificación de un herbicida desde baja movilidad hasta alta, como ocurre en el caso del 2,4-D.

Por lo tanto, el índice GUS debe considerarse con precaución, aunque en principio aquellos herbicidas con  $GUS > 1.8$ , y que se utilizan en grandes cantidades presentan un gran potencial de migrar hacia el agua subterránea y, por tanto, contaminarla.

A continuación, se presentan en la **Tabla 7** los índices GUS calculados para algunos herbicidas fenoxiácidos.

**Tabla 7.** *Indices GUS calculados para algunos herbicidas fenoxiácidos.*

Herbicida	T <sub>0.5</sub> <sup>a</sup> (días)	K <sub>oc</sub> <sup>a</sup> (ml·g <sup>-1</sup> )	GUS	Clasificación
2,4-D	8	52.7	2.06	Movilidad intermedia
MCPA	15	49.3	2.71	Movilidad intermedia
MCPD	28	127	2.74	Movilidad intermedia

<sup>a</sup> Valores medios (Fielding *et al.*, 1992)

Teniendo en cuenta la persistencia y movilidad de los herbicidas fenoxiácidos, se puede concluir que éstos son, en principio, capaces de alcanzar las aguas subterráneas, pero este hecho se debe confirmar con datos reales sobre la aparición de residuos de estos herbicidas en aguas subterráneas. En la **Tabla 8** se presentan los datos sobre detección de residuos de herbicidas fenoxiácidos en aguas subterráneas de diversos países europeos (Alemania, Italia, Dinamarca, Reino Unido y Suecia) (Fielding *et al.*, 1992), a lo largo de 1987-1991.

**Tabla 8.** *Detección de residuos de herbicidas fenoxiácidos en aguas subterráneas de diversos países europeos.*

Herbicida	Alemania	Italia	Dinamarca	Reino Unido	Suecia
2,4-D	45 <sup>a</sup> /955 <sup>b</sup>	4/106	9/91	3/	-
MCPA	51/457	4/106	13/91	1/	23/338
2,4-DP	73/200	2/106	7/91	1/	20/338
MCPD	112/735	-	2/91	1/	7/338
2,4,5-T	45/126	-	-	5/	-
MCPB	4/65	-	-	7/	-
2,4-DB	1/48	-	-	-	-
2,4,5-TP	1/62	-	-	-	-

<sup>a</sup> número de muestras positivas (> 0.1 µg l<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> número total de muestras analizadas.

Como se puede observar en la **Tabla 8**, el MCPA y 2,4-DP han sido encontrados en alguna ocasión en todos los países, mientras que el 2,4-D y MCPP en todos excepto uno, por lo que se puede concluir que estos cuatro herbicidas son, entre los fenoxiácidos, los más frecuentemente detectados en las aguas subterráneas europeas.

*Número de países europeos en que se han detectado residuos de herbicidas fenoxiácidos*

<b>5</b>	<b>4</b>	<b>2</b>	<b>1</b>
2,4-DP	2,4-D	MCPB	2,4,5-TP
MCPA	MCPB	2,4,5-T	2,4-DB

Teniendo en cuenta todas las consideraciones anteriores, se deduce que los herbicidas fenoxiácidos son compuestos relativamente móviles en suelo y subsuelo, y que pueden llegar a contaminar las aguas subterráneas. El hecho de que se hayan detectado en diferentes países europeos confirma que estos compuestos se pueden considerar como contaminantes de las aguas subterráneas en zonas de intensa actividad agrícola. De hecho, varios de estos herbicidas (2,4-D, MCPA y MCPP) han sido considerados como prioritarios para llevar a cabo su control en las aguas, debido a su movilidad y uso en grandes cantidades en la agricultura (Barceló, 1993).

### I.3. Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos. Antecedentes.

Los herbicidas fenoxiácidos se han venido determinando, generalmente, mediante cromatografía de gases (CG) tras derivatización para producir especies volátiles. El diazometano, a pesar de su toxicidad y peligrosidad, todavía se utiliza como agente derivatizante. También se han aplicado otros reactivos derivatizantes más seguros como el bromuro de pentafluorobencilo, 2-cloroetanol, etc. La necesidad de realizar una derivatización en el análisis por cromatografía de gases, lo cual consume tiempo y puede introducir errores en el método analítico, hace de la cromatografía líquida (CL) una alternativa atractiva para la determinación de estos compuestos. La detección en CL se lleva a cabo, generalmente, mediante UV, aunque también se ha utilizado la detección selectiva ofrecida por la espectrometría de masas.

En el análisis de residuos de contaminantes en el medio ambiente casi siempre se necesita una preconcentración y posterior purificación de la muestra. Para los herbicidas fenoxiácidos la técnica más utilizada es la extracción líquido-líquido, aunque también se ha aplicado la extracción en fase sólida.

La discusión de los antecedentes bibliográficos que sigue a continuación se ha centrado, en primer lugar, en el tipo de muestras más frecuentes objeto de análisis, indicando el tratamiento de las mismas previo a la determinación analítica. Posteriormente, se han considerado las diferentes técnicas de análisis.

#### Tipos de Muestras

a) *Productos vegetales.* La determinación de herbicidas fenoxiácidos en muestras vegetales no es muy frecuente, ya que se aplican sobre malas hierbas que no son precisamente objeto de riguroso control. Sólo se han estudiado sobre plantas de interés que hayan sufrido una exposición involuntaria al herbicida por un proceso de deriva al aplicar vía aerosol en campos vecinos. En este sentido, cabe destacar el trabajo de Allender (1989) sobre la determinación de cinco herbicidas fenoxiácidos en tejidos vegetales, mediante extracción por maceración en acetona acidificada y posterior derivatización con bromuro de pentafluorobencilo (PFBBBr). Los extractos se purifican sobre Florisil y se analizan mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones.

b) *Suelos*. El análisis de herbicidas fenoxiácidos, o de cualquier otro tipo de herbicidas, en suelos tiene gran interés, ya que el producto se aplica directamente sobre el suelo produciendo una contaminación inmediata del mismo, con altas probabilidades, además, de afectar a las aguas subterráneas si se trata de un herbicida móvil y persistente. En este sentido, tiene mucha importancia el tipo de suelo, especialmente su contenido en materia orgánica y en arcillas, tal como se ha comentado en el apartado anterior.

Para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de suelos se han propuesto diferentes procedimientos. Todos tienen en común la agitación de la muestra con algún disolvente capaz de extraer los herbicidas fenoxiácidos. Esta agitación y las condiciones en que se lleve a cabo determinarán la necesidad o no de realizar una purificación adicional previa a la inyección en el sistema cromatográfico, típicamente cromatografía de gases.

En la **Tabla 9** se resume la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica realizada sobre el análisis de herbicidas fenoxiácidos en muestras de suelo. Como puede observarse, se han utilizado diferentes disolventes orgánicos o mezclas de éstos, de distinta polaridad, pero en todos los casos se realiza una acidificación previa que permite la extracción cuantitativa de los herbicidas fenoxiácidos. La técnica de análisis empleada ha sido la cromatografía de gases, por lo que se requiere la derivatización previa a la inyección con agentes derivatizantes de uso generalizado como el diazometano o el PFBB<sub>r</sub>, o muy específicos como el diseñado para la derivatización de ácidos orgánicos que permite el uso de detección NPD (Bertrand, 1987). En todos los casos, tras la derivatización, es necesaria una etapa de purificación para eliminar posibles interferentes. En cuanto al detector utilizado, prevalece el ECD frente al NPD, mientras que se utiliza MSD cuando se pretende llevar a cabo una correcta identificación de los picos.

Tabla 9. Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de suelos. Antecedentes bibliográficos.

Sistema de extracción	Derivatización	Purificación	Análisis	Nivel de Fortificación ( $\mu\text{g/g}$ ) Recuperación (%)	Referencia
Tolueno + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.25M	PFBBr <sup>a</sup>	Partición tolueno	GC/ECD	0.1 (72-107)	Cotterill, 1979
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O + HAC	CEDMSDEA <sup>b</sup>	Partición diclorometano	GC/NPD	0.5 (79-90)	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
Diclorometano + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> conc.	PFBBr	Sílica gel	GC/MSD	0.025 (77-94)	Tsukioka y Murakami, 1989
CH <sub>3</sub> CN/H <sub>2</sub> O + HAC			Técnicas radioquímicas	2.0 (87-90)	Smith y Aubin, 1991
Eter etílico + HCl (1:1)	Diazometano	Florisil	GC/ECD	0.002 (86-101)	Ngan e Ikesaki, 1991

<sup>a</sup> Bromuro de pentafluorobencilo<sup>b</sup> (2-cianoetil)dimetil(dietilamino)silano

c) *Aguas*. La matriz más importante para la que se han desarrollado la mayoría de los procedimientos para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos es el agua, incluyendo aguas potables, superficiales, subterráneas, etc. Ello es debido a la facilidad con que los herbicidas fenoxiácidos pueden alcanzar la zona saturada y difundirse por el acuífero, a causa de su elevada polaridad y solubilidad en el agua.

El carácter ácido de estos compuestos hace imprescindible, en la mayoría de los casos, una acidificación previa de la muestra de agua para efectuar su extracción, impidiendo su ionización química mediante el uso de HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, generalmente a pH < 2. Esto es necesario en el caso de la extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico, que no podría extraer cuantitativamente los herbicidas fenoxiácidos en su forma iónica. Cuando se utilizan sistemas de extracción en fase sólida generalmente también se acidifica, ya que el relleno más utilizado (C<sub>18</sub>) sólo extrae moléculas apolares y no iónicas. Existen tan sólo algunos trabajos donde no se realiza la acidificación previa de la muestra (Di Corcia *et al.*, 1989), siendo entonces necesaria la combinación de rellenos y eluciones laboriosas.

Inicialmente, se pueden considerar dos aproximaciones generales a la determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos en aguas dependiendo del sistema de extracción:

- Sistema de extracción "on-line" con el sistema cromatográfico.
- Sistema de extracción "off-line" con el sistema cromatográfico.

En la **Tabla 10** se resume la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica realizada sobre el análisis de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas utilizando un sistema de extracción "on-line" con el sistema cromatográfico.

A la vista de la **Tabla 10** se deduce que prácticamente todas las aplicaciones realizan una extracción en fase sólida "on-line" utilizando algún tipo de relleno que retenga a los herbicidas fenoxiácidos, que posteriormente son eluidos por la misma fase móvil o con un eluyente adecuado. Se han utilizado diferentes rellenos como PLRP (*poliestireno-divinilbenceno*) (Geerdink *et al.*, 1989; Coquart y Hennion, 1993; De Ruiter *et al.*, 1991), así como NH<sub>2</sub> (Haman y Kettrup, 1987) o C<sub>18</sub> (Åkerblom, 1985). También existen algunos trabajos que desarrollan una extracción líquido-líquido "on-line" en flujo continuo (Farrán *et al.*, 1990) o mediante el uso de membranas (Nilvé *et al.*, 1989). En todos estos casos, el sistema cromatográfico consistió en un cromatógrafo líquido, aunque actualmente se están realizando intentos para acoplar el sistema de extracción a un cromatógrafo de gases.

**Tabla 10. Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas mediante extracción "on-line" con el sistema cromatográfico. Antecedentes bibliográficos.**

Sistema de Extracción	Análisis	Nivel de Fortificación ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Referencia
		Rec. (%)	
ELL, Flujo continuo (heptano)	HPLC/UV(230) HPLC/MSD		Farrán <i>et al.</i> , 1990
ELL, Membrana	HPLC/UV(280)		Nilvé <i>et al.</i> , 1989
EFS, C <sub>18</sub> Medio, HAc 10M	HPLC/UV(230/280)	10 (100)	Åkerblom, 1985
EFS, NH <sub>2</sub> Medio, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HPLC/UV(230/280)	1 (89-103)	Haman y Kettrup, 1987
EFS, C <sub>18</sub> y NH <sub>2</sub> Medio, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> y TBAHS <sup>a</sup>	HPLC/UV(230/280)		Haman <i>et al.</i> , 1989
EFS, PLRP-S Medio, HClO <sub>4</sub> , pH 3	HPLC/UV(230/280) pares iónicos		Geerdink <i>et al.</i> , 1989
EFS, PLRP-S	HPLC/Fluorescencia	5	De Ruiter <i>et al.</i> , 1991
EFS, PRP-1	HPLC/UV(230)	0.1 (95-99)	Coquart y Hennion, 1993

<sup>a</sup> Hidrogenosulfato de tetrabutilamonio

Existen pocas aplicaciones "on-line" que determinen conjuntamente los ocho herbicidas fenoxiácidos más importantes: 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4,5-T, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP, principalmente debido a las dificultades para resolver satisfactoriamente mediante CL los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-T. Generalmente, se elimina arbitrariamente uno de estos compuestos o se estudian en mezclas separadas. Ninguna de estas soluciones parece acertada, debiéndose realizar un esfuerzo tanto en la optimización de la etapa de preconcentración, como en la separación cromatográfica posterior.

Por lo que respecta a la etapa de preconcentración, se han estudiado básicamente dos tipos diferentes de fases: poliméricas y base sílica. Las primeras presentan un mayor intervalo de pH de trabajo, así como una mayor retención para los herbicidas fenoxiácidos, pudiéndose pasar en algunos casos hasta un litro de muestra acuosa (Coquart y Hennion, 1993) sin pérdidas aparentes de analito. Esta misma característica hace más difícil la elución posterior de los herbicidas, presentando problemas de ensanchamiento de bandas durante la transferencia desde la precolumna enriquecedora hacia la columna analítica. Por otro lado, para las precolumnas con relleno tipo C18 o amino, se han utilizado volúmenes de muestra de 2 ml (Haman y Kettrup, 1987).

Prácticamente en todas las aplicaciones el proceso se encuentra automatizado, aunque esta automatización no produzca un aumento espectacular en la capacidad de análisis, ya que para pasar estos volúmenes de muestra por una pequeña precolumna se emplean flujos bajos, de alrededor de 5 ml/min (por ejemplo, 500 ml de muestra tardarían 1 h. 40 min.), que alargan considerablemente el tiempo de análisis por muestra. Además, como el análisis se realiza secuencialmente y se debe acondicionar la precolumna antes de la siguiente inyección, la capacidad global de análisis se ve mermada, en comparación a procedimientos de extracción "off-line", más rápidos y que procesan simultáneamente varias muestras.

Por otro lado, como ya se ha comentado en la Introducción General, los sistemas de extracción "on-line" proporcionan un aumento de la sensibilidad, pero no un aumento de la selectividad, ya que se concentran simultáneamente tanto analitos como interferentes. En algunos casos, estos interferentes, sobre todo ácidos húmicos, dificultan la correcta identificación y cuantificación de los herbicidas fenoxiácidos durante el análisis de muestras de aguas medioambientales a bajos niveles de concentración (Coquart y Hennion, 1993).

Para la eliminación de estos interferentes en la extracción de muestras de agua se han aplicado membranas líquidas soportadas (Nilvé *et al.*, 1989). Los ácidos húmicos consisten en especies de elevado peso molecular que varían entre unos cientos y varios millones. La estructura química no está bien definida y poseen un número inusual de grupos funcionales

(Choudry, 1984). Las sustancias húmicas son perjudiciales tanto para las columnas de CG como las de CL y deben ser eliminadas antes de la inyección, lo cual se consigue con el uso de estas membranas. Además, si se desean obtener factores de concentración que permitan alcanzar teóricamente un límite de detección de 0.1 ppb, se deben enriquecer aproximadamente 300 ml de muestra lo que, a un flujo de 0.25 ml/min, representa un tiempo de preconcentración de 20 horas, excesivamente largo para un procedimiento de análisis aplicable al control de residuos de herbicidas fenoxiácidos.

Así mismo, también se han realizado experiencias aplicando una extracción líquido-líquido en flujo segmentado continuo a la determinación de herbicidas fenoxiácidos mediante CL-MSD (Farrán *et al.*, 1990). Estos procedimientos sólo aportan un factor de concentración de aproximadamente un orden de magnitud, por lo que no son muy adecuados para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos.

En la **Tabla 11** se resume la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica realizada sobre el análisis de herbicidas clorofenoxiácidos en muestras de aguas utilizando un sistema de extracción "off-line" con el sistema cromatográfico.

Los sistemas de extracción aplicados tipo "off-line" son, fundamentalmente, dos: Extracción Líquido-Líquido, utilizándose generalmente como extractante diclorometano (Ahmed *et al.*, 1989; Haman y Kettrup, 1987; Lee *et al.*, 1986), acetato de etilo (Agemian y Chau, 1977; Hill *et al.*, 1983; Suzuki y Watanabe, 1991) y éter etílico (Jiménez *et al.*, 1989; Ngan e Ikesaki, 1991) y Extracción en Fase Sólida, mediante el uso de cartuchos de C<sub>18</sub> (Wells y Michael, 1987; Hoke *et al.*, 1986; Incorvia, 1991; Wang y Huang, 1989), C<sub>8</sub> (Bogus *et al.*, 1990), Florisil (Wang y Huang, 1989), XAD-2 (Ahmed *et al.*, 1989), así como de un cartucho formado por Carbo-pack B y resina intercambiadora aniónica fuerte (Di Corcia *et al.*, 1989). En ningún caso se realiza una purificación posterior del extracto, a menos que se vaya a realizar una etapa de derivatización previa a la inyección en un cromatógrafo de gases, en cuyo caso, se han utilizado Florisil (Ngan e Ikesaki, 1991) y silicagel (Agemian y Chau, 1977; Hill *et al.*, 1983, Jiménez *et al.*, 1989).

**Tabla 11. Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas mediante extracción "off-line" con el sistema cromatográfico. Antecedentes bibliográficos.**

Sistema de extracción	Derivatización	Purificación	Análisis	Nivel de fortificación (µg-l <sup>-1</sup> ) Rec. (%)	Referencia
ELL, Acetato de Etilo	PFBB <sup>a</sup>	Partición	GC/ECD	0.01	Agemian y Chau,
200/50/50 ml	BCl <sub>3</sub>	KHCO <sub>3</sub> /DCM		(64-109)	1977
Acidificación con HCl		Silica gel			
ELL, Acetato de Etilo	2-cloroetanol	Partición	GC/ECD	1	Hill <i>et al.</i> , 1983
150/100 ml	2,2,2-tricloroetanol	KHCO <sub>3</sub> /DCM	GC/MSD	(90-232)	
Acidificación con HCl, pH 2	PFBB <sup>a</sup>	Silica gel			
ELL, Diclorometano				0.05	Lee <i>et al.</i> , 1986
3 × 50 ml				(66-100)	
Acidificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
ELL, Eter etílico	Diazometano	Silica gel	GC/ECD	0.4	Jiménez <i>et al.</i> , 1989
2 × 100 ml			GC/MSD	(86-97)	
Acidificación con HCl					

<sup>a</sup> Bromuro de pentafluorobencilo.

Sistema de extracción	Derivatización	Purificación	Análisis	Nivel de Fortificación ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Referencia
				Rec. (%)	
ELL, Diclorometano 3 × 50 ml	CEDMSDEA <sup>b</sup>		GC/NPD	0.1 (92-100)	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
Acidificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
ELL, Diclorometano, 100 ml, Acidificación H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 24hr			HPLC/UV	L <sub>D</sub> 20-90 ppt	Schüssler, 1990
			HPLC/FD		
ELL, Acetato Etilo/Hexano (80:20) 3 × 2 ml, HCl	ADAM <sup>c</sup>		HPLC/FD	0.5 (>93)	Suzuki y Watanabe, 1991
ELL, Eter etílico 4 × 100 ml	Diazometano	Florisil	GC/ECD	0.05 (96-102)	Ngan e Ikesaki, 1991
Acidificación con HCl					
EFS, C <sub>18</sub>			HPLC/UV	20 (80-105)	Hoke <i>et al.</i> , 1986
Acidificación con HCl, pH 2.5					
EFS, C <sub>18</sub>			HPLC/UV	5 (96)	Wells y Michael, 1987
Acidificación con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>					
<sup>b</sup> (2-cianoetil)dimetil(dietilamino)silano					
<sup>c</sup> 9-antrildiazometano					

Sistema de extracción	Derivatización	Purificación	Análisis	Nivel de Fortificación ( $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ )	Referencia
				Rec. (%)	
EFS, XAD-2	CEDMSDEA <sup>b</sup>		GC/NPD	0.1 (96-102)	Ahmed <i>et al.</i> , 1989
EFS, Carbo-pack B + SAX inter. anión.			HPLC/UV	0.1 (95-99)	Di Corcia <i>et al.</i> , 1989
EFS, C <sub>18</sub> , Florisil			GC/ECD	patrones de ésteres	Wang y Huang, 1989
EFS, C <sub>8</sub>			HPLC/UV	10	Bogus <i>et al.</i> , 1990
Acidificación con HCl, pH 2.2			patres iónicos	(74-95)	
EFS, C <sub>18</sub>			HPLC/MSD	20	Incorvia, 1991
Acidificación con HCl				(109-134)	

<sup>b</sup> (2-cianoetil)dimetil(dietilamino)silano

Todos los procedimientos que realizan ELL "off-line" de los herbicidas fenoxiácidos requieren de una acidificación previa de la muestra de agua con un ácido fuerte ( $H_2SO_4$  o  $HCl$ ) hasta pH inferior a 2 para obtener buenas recuperaciones. Sólo los procedimientos más antiguos realizan una partición adicional con bicarbonato y posterior reextracción en medio ácido de los fenoxiácidos con diclorometano (Agemian y Chau, 1977; Hill *et al.*, 1983), lo que aumenta considerablemente el tiempo de análisis y, además, implica el uso de mayores volúmenes de disolventes, con la posibilidad de que el número de errores sea mayor.

En todos los casos se debe concentrar el extracto orgánico obtenido mediante evaporación con rotavapor o Kuderna-Danish a temperatura suave, lo que también representa un paso largo y tedioso, pudiéndose producir pérdidas por volatilización.

Cabe comentar además que, al ser la ELL una técnica tradicional, casi todos los trabajos utilizan otra técnica convencional como es la cromatografía de gases. Sólo Schüssler (1990) y Suzuki y Watanabe (1991) utilizan posteriormente la técnica más moderna de cromatografía líquida.

Finalmente, todos los procedimientos que utilizan ELL se aplican en métodos multiresiduales para la determinación de la mayoría de los herbicidas fenoxiácidos, aunque se suele eliminar arbitrariamente alguno de ellos por problemas cromatográficos en la separación.

Por otro lado, los procedimientos que utilizan EFS "off-line" para la extracción de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua son de aplicación mucho más reciente que la ELL tradicional. Permiten la extracción simultánea de varias muestras, aumentando la capacidad de análisis del método, y en ellos se disminuye el consumo de disolventes orgánicos. Así mismo, ofrecen la posibilidad de automatización y acoplamiento al sistema cromatográfico, tanto de CG como CL

Existe una gran variedad de fases estacionarias para los cartuchos de EFS, pero en la mayoría de los casos se han utilizado rellenos de fase reversa C18, los cuales requieren una acidificación previa de la muestra de agua para exhibir retención sobre los fenoxiácidos, ahora protonados. En todos los casos se acidifica con  $HCl$  o  $H_2SO_4$  hasta  $pH < 2$ , a excepción de Di Corcia *et al.* (1989) que utilizan como extractante un cartucho relleno de dos fases, Carbopack B y una resina de intercambio aniónico fuerte. El Carbopack B retiene los fenoxiácidos de una muestra acuosa a pH neutro; posteriormente, se eluyen en medio básico y quedan atrapados en la resina de intercambio aniónico, de la que se eluyen finalmente con una mezcla  $MeOH/H_2O$  a pH ácido. Este procedimiento presenta una gran selectividad, pero resulta laborioso ya que las

muestras se extraen secuencialmente y se introducen varias etapas de lavado del cartucho con agua y acetonitrilo.

La ventaja que presenta este último procedimiento es que es el único que se aplica a la extracción de los ocho herbicidas fenoxiácidos junto con dicamba. Todos los demás trabajos, que utilizan fundamentalmente fase reversa C18, sólo estudian de uno a tres herbicidas, sin desarrollar un verdadero método multiresidual para estos compuestos utilizando EFS "off-line".

A la vista de las **Tablas 10 y 11** se puede observar cómo ha ido evolucionando el análisis de los herbicidas fenoxiácidos desde el trabajo de Agemian y Chau en 1977, pasando de utilizar cromatografía de gases con columnas de relleno y derivatización con agentes poco selectivos a cromatografía líquida de alta resolución y sistemas de extracción en fase sólida específicos que reducen la etapa de purificación. Asimismo, también existe una tendencia hacia el uso de la extracción "on-line" con el sistema cromatográfico, generalmente de cromatografía líquida, lo cual permite una menor manipulación de la muestra y una preconcentración en línea automática. El mecanismo de extracción más utilizado es la fase sólida, aunque también se utilizan sistemas de extracción líquido-líquido.

#### Técnicas de análisis.

La técnica más utilizada para la determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos es la cromatografía, tanto de gases como de líquidos, aunque para la primera se deben aplicar reacciones de derivatización previas a la inyección en el cromatógrafo de gases debido a la baja volatilidad y alta termolabilidad de estos herbicidas. En los análisis por cromatografía líquida no es necesario realizar dicha prederivatización, pudiéndose analizar directamente los compuestos en el cromatógrafo líquido.

Así pues, se pueden considerar estas dos técnicas: la cromatografía de gases, que conlleva un importante trabajo adicional, y la cromatografía líquida, que ofrece las ventajas de alta flexibilidad, versatilidad y rapidez.

a) *Cromatografía de gases*. Como ya se ha indicado, es necesario aplicar una etapa de derivatización de los analitos. Para llevar a cabo este paso se han propuesto una gran variedad de agentes derivatizantes, todos ellos dirigidos a la obtención de ésteres volátiles de los fenoxiácidos mediante alquilación, 2-cloroetilación, pentafluorobencilación, 2,2,2-tricloroetilación, 2,2,2-trifluoroetilación, así como con el uso de reactivos más específicos como el (2-cianoetil)dimetil(dietilamino)silano.

Para llevar a cabo la alquilación se han utilizado el  $\text{BCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  (Chau y Terry, 1975; Agemian y Chau, 1977) y el diazometano (Tsukioka y Murakami, 1989; Jiménez *et al.*, 1989; Ngan e Ikesaki, 1991). La utilización de estos reactivos presenta desventajas importantes:

- El diazometano es un producto cancerígeno y puede explotar si se calienta a  $100^\circ\text{C}$  o en contacto con metales alcalinos.
- El  $\text{BCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}$  no produce una alquilación cuantitativa de todos los herbicidas fenoxiácidos.

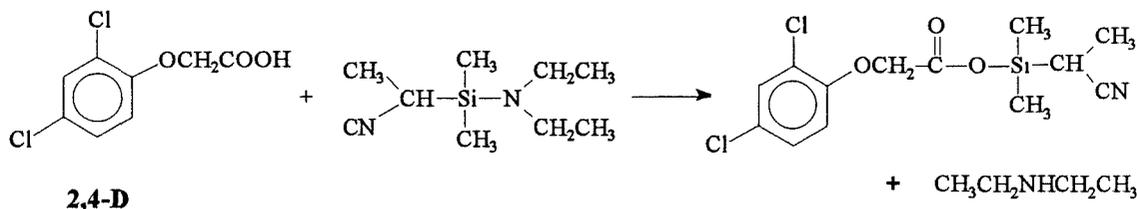
Por ello, se han desarrollado diferentes alternativas para la obtención de ésteres con un mayor rendimiento y mejor respuesta al detector de captura de electrones. Entre estas opciones se encuentran la 2-cloroetilación, para la que se ha utilizado la mezcla  $\text{BCl}_3/\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{OH}$  (Chau y Terry, 1975; Agemian y Chau, 1977; Hill *et al.*, 1983), así como la mezcla dicitclohexilcarbodiimida/ $\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{OH}$  (Agemian y Chau, 1977), y la trihaloetilación con la mezcla  $\text{BX}_3/\text{CX}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , utilizando  $\text{X}=\text{Cl}$  (Mierzwa y Witek, 1977; Hill *et al.*, 1983) y  $\text{X}=\text{F}$  (Tsukioka y Murakami, 1989).

Sin embargo, la opción más utilizada ha sido la pentafluorobencilación, ya que es mucho más simple de llevar a cabo. Además, se suele realizar en medio acetona que es fácil de eliminar en contraste con las haloetilaciones que requieren la eliminación de cualquier resto de disolvente orgánico que pudiera quedar de la extracción antes de la reacción.

La primera pentafluorobencilación de fenoles y ácidos carboxílicos se llevó a cabo en 1968 por Kawahara y en 1973 Johnson la utilizó para la determinación de 2,4-D. Desde entonces, se ha venido utilizando ampliamente para la derivatización de los herbicidas clorofenoxiácidos (Chau y Terry, 1976; Agemian y Chau, 1977; Cotterill, 1979; Hill *et al.*, 1983; Lee y Chau, 1983; Lee *et al.*, 1986; Gurka *et al.*, 1987; Allender, 1989; Tsukioka y Murakami, 1989; Cline *et al.*, 1990).

Por último, cabe citar el uso del (2-cianoetil)dimetil(dietilamino)silano como reactivo derivatizante (Bertrand *et al.*, 1986, 1987), que permite introducir un grupo ciano en los derivados, con lo que los análisis se pueden efectuar con el detector de nitrógeno-fósforo

(NPD), de mayor selectividad que el ECD. La reacción es casi instantánea a temperatura ambiente:



El derivado obtenido presenta ventajas como son una respuesta uniforme al detector NPD y una buena confirmación mediante el uso de la espectrometría de masas.

Como sistema de detección, se ha utilizado generalmente el detector de captura de electrones (ECD), ya que los derivados formados contienen átomos de halógeno, muy sensibles al ECD. También se han realizado intentos con otros detectores como el ya citado NPD, para lo cual se deben utilizar agentes derivatizantes específicos. Así mismo, para una adecuada confirmación, se ha utilizado la espectrometría de masas, tanto en modo *SCAN* como *SIM*.

b) *Cromatografía líquida*. La ventaja más importante que presenta el uso de la cromatografía líquida frente a la de gases consiste en la posibilidad de la inyección directa de los herbicidas clorofenoxiácidos, tanto de la muestra como del extracto correspondiente, en el sistema cromatográfico sin derivatización previa. Debido a su carácter ácido-base se pueden separar sobre una columna de fase reversa utilizando cromatografía de pares iónicos (Farrán *et al.*, 1990; Geerdink *et al.*, 1989; Bogus *et al.*, 1990) o de supresión iónica, siendo esta última la más utilizada (Haman y Kettrup, 1987; Haman *et al.*, 1989; Wells y Michael, 1987; Åkerblom, 1985; Hoke *et al.*, 1986; Schüssler, 1990; Di Corcia *et al.*, 1989; Coquart y Hennion, 1993; Nilvé *et al.*, 1989; De Ruiter *et al.*, 1991; Incorvia, 1991).

Para realizar la supresión iónica se han utilizado diferentes ácidos en la fase móvil: acético, fosfórico, tricloroacético, trifluoroacético, etc. En principio, el más adecuado será aquel que produzca menor absorción a la longitud de onda de trabajo, lo cual permitirá aumentar su concentración en la fase móvil sin que se produzca un ruido importante en la línea base. Por ello, aunque haya sido el ácido acético el más utilizado, actualmente (Di Corcia *et al.*, 1989) se prefiere el trifluoroacético, especialmente si se utiliza detección UV a 230 nm

para mejorar la sensibilidad. Para la formación de pares iónicos se utilizan generalmente sales de amonio cuaternarias, como los fosfatos de tetrabutilamonio (Geerdink *et al.*, 1989) y octiltriethylamonio (Bogus *et al.*, 1990) en concentraciones entre 0.005-0.01 M.

Por lo que respecta al sistema de detección empleado, la detección UV, tanto a 230 como 280 nm, es la más utilizada, habiéndose ensayado otras posibilidades como el detector de fluorescencia (Schüssler, 1990; de Ruiter *et al.*, 1991; Suzuki y Watanabe, 1991), el detector electroquímico (Schüssler, 1990) y, por supuesto, con fines confirmatorios la espectrometría de masas (Incorvia, 1991).

### Métodos Oficiales de Análisis de Residuos de Herbicidas Fenoxiácidos.

Finalmente, se van a comentar los Métodos Oficiales de Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos que han sido propuestos por diferentes organismos públicos como la Agencia de Protección del Medio Ambiente (EPA) de EEUU, el Grupo de Trabajo de Análisis de Residuos de Pesticidas (DFG) de Alemania y el Ministerio de Sanidad de Holanda, así como compañías privadas importantes en el ámbito del análisis como Hewlett Packard.

**a) Método EPA 515.1 (1989).** Es un método de cromatografía de gases aplicable a la determinación de residuos de 2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DP, 2,4,5-T y 2,4,5-TP y Dicamba en muestras de agua.

El método se basa en una hidrólisis inicial en medio básico de un litro de muestra acuosa a pH 12 durante una hora. Posteriormente, se acidifica con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> conc hasta pH < 2 y se extrae por triplicado con 120/60/60 ml de éter etílico. Las fases orgánicas combinadas se secan sobre sulfato sódico anhidro y se evaporan mediante Kuderna-Danish hasta unos 5 ml. A continuación, se derivatiza el extracto mediante diazometano, formando los correspondientes ésteres metílicos, y se purifica mediante cromatografía en columna abierta con Florisil. El análisis del extracto final se lleva a cabo por CG capilar con detección de captura de electrones (ECD). Para confirmación se utiliza detección por espectrometría de masas.

**b) DFG (1992).** El método permite la identificación y cuantificación de residuos de 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, MCPP, MCPB y 2,4,5-T. Se basa en el análisis de los derivados nitrados y posteriormente derivatizados con metanol. Los ésteres formados se separan mediante cromatografía de gases con detector ECD.

El método se basa en una concentración inicial mediante rotavapor de un litro de muestra, alcalinizada a pH 12 con hidróxido sódico, hasta un volumen final de aproximadamente 100 ml. Posteriormente, se acidifica con  $H_2SO_4$  y se extrae por triplicado con 100/100/100 ml de acetato de etilo. Los extractos orgánicos se secan y evaporan hasta sequedad mediante Kuderna-Danish. El residuo se derivatiza con  $H_2SO_4/HNO_3$  (9:1) para formar los derivados nitrados, que se esterifican posteriormente con metanol. Se particionan los extractos con benceno, que se seca sobre sulfato sódico anhidro, y se concentra hasta 1 ml. Posteriormente, se realiza una purificación del extracto bencénico sobre columna de alúmina. Finalmente, se analiza mediante CG con detección ECD.

**c) Ministry of Welfare and Health (1988).** Se proponen dos métodos alternativos.

c.1) Aplicable a 2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-TP, MCPA, MCPB, MCPP y dicamba en muestras vegetales. Se realiza la extracción de los herbicidas mediante acetona, que se evapora a sequedad, y el residuo se hierve en medio básico para hidrolizar los conjugados. Tras acidificar, los herbicidas se extraen con diclorometano y se derivatizan mediante PFBBBr. El extracto, así obtenido, se purifica sobre columna de silicagel y se analiza mediante CG con ECD.

c.2) Aplicable a 2,4-D, 2,4-DP, MCPA y MCPP en muestras vegetales. La muestra (50 g) se extrae en medio básico con 100 ml de hidróxido sódico, que posteriormente se acidifica y se extrae por triplicado con 30/30/30 ml de diclorometano. La fase orgánica se seca sobre sulfato sódico y se evapora hasta 2 ml mediante Kuderna-Danish. El extracto se purifica mediante columna de silicagel y se analiza mediante CL con detección UV a 230 nm.

**d) Hewlett Packard (1994).** Propone un método aplicable a la determinación de residuos de 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-T y 2,4,5-TP, así como dicamba, en muestras de aguas.

La extracción de los herbicidas se puede realizar mediante ELL de un litro de muestra acidificada a pH 2 con ácido fosfórico y extraída con 3 x 100 ml de acetato de etilo. Los extractos combinados se secan sobre sulfato sódico anhidro y se concentran hasta 4-5 ml mediante Kuderna-Danish; posteriormente, se evapora hasta sequedad bajo corriente de nitrógeno.

La extracción también se puede realizar mediante EFS de dos litros de muestra acidificada a pH 2 con ácido fosfórico sobre un cartucho relleno de 1.0 g de C18. El cartucho

se seca durante 20 min y se eluye con 4 ml de acetona. El extracto se evapora mediante corriente de nitrógeno

Para el análisis de los extractos obtenidos, tanto por ELL como por EFS, se puede utilizar CL con detector de barrido de diodos (DAD) o CG capilar con detección MSD. En el caso de utilizar esta última se debe realizar una derivatización previa a la inyección con diazometano y posterior purificación sobre columna de silicagel o florisil.

Se comenta el hecho de que, para el análisis mediante CL de muestras de aguas superficiales y subterráneas, la presencia de ácidos húmicos puede causar una deriva de la línea base y posibles interferencias en la identificación y cuantificación de los analitos

————— o —————

Como puede observarse de la revisión efectuada, los métodos adoptados por organismos oficiales todavía utilizan mayoritariamente la extracción líquido-líquido y la determinación mediante cromatografía gases con derivatización previa, lo que demuestra la inercia de estos organismos a modificar y actualizar los métodos propuestos, a pesar de que implican un proceso laborioso, con poca capacidad de análisis, que utilizan gran cantidad de disolventes orgánicos y agentes derivatizantes tóxicos.

Sólo los métodos propuestos por compañías privadas y algún organismo oficial que realiza una actualización de sus procedimientos contemplan el uso de la cromatografía líquida como técnica recomendada, y tan sólo Hewlett Packard propone la utilización de la EFS con cartuchos C18 para la extracción de los herbicidas fenoxiácidos.

————— o —————

Las ventajas que proporciona un procedimiento combinando la EFS de los residuos de herbicidas fenoxiácidos con su posterior análisis mediante CL con detección UV son claras en cuanto a menor tiempo de análisis, menor manipulación de la muestra, sin necesidad de derivatización previa, extracción simultánea de varias muestras, menor uso de disolventes orgánicos, etc. La principal desventaja sería la no disponibilidad de un detector selectivo que permita la confirmación de los analitos, como ocurre en CG con el MSD, aunque cada día se está avanzando más en el desarrollo de mejores interfases para acoplar la CL y la espectrometría de masas.

Esta desventaja de la menor selectividad de la CL frente a la CG-MSD se puede compensar mediante la aplicación del acoplamiento CL-CL, que como ya se ha indicado en la Introducción General de este trabajo, aumenta la selectividad del método, así como la sensibilidad del mismo al permitir la inyección de grandes volúmenes de muestra

## C. II.- EXPERIMENTAL

**VIRACEPT**  
de F. Hoffmann - La Roche

10 01 VIR-G12

*Viracept*

*2.5*

Mantiene abierto el horizonte terapeutico

## II.1. Reactivos, material y aparatos.

### Reactivos

- Agua calidad HPLC (*Nanopure II, MilliQ*).
- Disolventes orgánicos calidad HPLC: metanol, acetonitrilo, tetrahidrofurano (*Scharlau, Promochem*).
- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de residuos: metanol, acetona, acetato de etilo, diclorometano, hexano, isooctano (*Scharlau, SDS, Promochem*).
- Cloruro sódico, sulfato sódico (*Baker*), tratados a 300°C durante una noche.
- Acido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido ortofosfórico, hidróxido sódico, calidad para análisis (*Merck, Panreac*).
- Acido acético, ácido tricloroacético, ácido trifluoroacético, ácido fórmico, calidad para análisis (*Merck, Janssen, Fluka*).
- Reactivos formadores de pares iónicos: tetrabutilamonio, tetrahexilamonio.
- Patrones de dicamba y herbicidas fenoxiácidos: 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4,5-T, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP (*Dr. Ehrenstorfer, Riedel de Haën*). Disoluciones stock de 500 µg·ml<sup>-1</sup> disolviendo 25 mg en 50 ml de metanol HPLC, conservadas en congelador a -18°C. Las disoluciones de trabajo se prepararon por dilución con agua HPLC, conservándose en frigorífico a 4°C.

### Material

- Material volumétrico clase A (probetas, pipetas, matraces aforados, etc.).
- Material de vidrio (embudos de caña fina, pipetas Pasteur, erlenmeyers, etc.).
- Evaporador Kuderna-Danish provistos de tubos de centrifuga graduados de 10 ml con ajuste esmerilado y fondo cónico.
- Micropipetas de volúmenes entre 10 y 1000 µl (*Brand, Gilson*).
- Jeringa HPLC de 25 µl (*Hamilton*) y 250 µl (*SGE*).
- Cartuchos de EFS de 100 mg de C<sub>18</sub> (*Analytichem, Baker*), silica (*Baker*) y amino (*Baker*).
- Equipo de filtración de Millipore con filtros de 0.45 µm de tamaño de poro y diámetro 47 mm.

- Columnas HPLC:
  - Spherisorb ODS-2, 120 × 4,6 mm d.i., 3 µm (*Scharlau*).
  - Microspher C18, 50 × 4,6 mm d.i., 3 µm (*Chrompack*).
  - Microspher C18, 100 × 4,6 mm d.i., 3 µm (*Chrompack*).
  - Chromspher B C18, 100 × 4,6 mm d.i., 5 µm (*Chrompack*)
  - RP8, 15 × 3.2 mm d.i., 7 µm (*Brownlee*)
  - GFF II ISRP, 10 × 3 mm d.i., 5 µm (*Pinkerton*)

#### Aparatos.

- pHmetro (*Crison, Metrohm*).
- Baño de ultrasonidos (*Selecta, Sonik*).
- Sistema de EFS (*Analytichem, Baker*).
- Cromatógrafo líquido compuesto por dos bombas isocráticas *LKB 2150*, controlador *LKB 2152* y detector de barrido de diodos *LKB 2140*.
- Cromatógrafo líquido *Hewlett Packard* compuesto por una bomba cuaternaria 1050, autoinyector 1050 y detector ultravioleta-visible de longitud de onda variable 1050.
- Cromatógrafo líquido *GILSON* compuesto por cinco bombas isocráticas 306, autoinyector, detector UV-116.
- Cromatógrafo líquido compuesto por bomba Perkin Elmer LC-10, autoinyector de *Spark Holland* y detector UV de *Kratos*.
- Detector de barrido de diodos *Applied Biosystems (ABI)*
- Integrador *Hewlett Packard HP 3396A*.
- Registrador (*Kipp & Zoonen*).
- Detector de fluorescencia *Hewlett Packard HP 1046A* con convertidor analógico-digital *Hewlett Packard HP 35900*.
- Frigoríficos y congeladores.

## II.2. Determinación de residuos de los herbicidas 2,4-D y MCPA por Cromatografía Líquida.

### II.2.1. Estudio de la separación cromatográfica.

Se han descrito varios sistemas de Cromatografía Líquida en Fase Reversa para la separación de los herbicidas clorofenoxiácidos (Jandera *et al.*, 1984). Cuando se utiliza como eluyente mezclas de agua con un modificador orgánico (metanol, acetonitrilo), los herbicidas eluyen generalmente cerca del volumen muerto de la columna observándose picos fuertemente distorsionados. Esto se debe fundamentalmente a efectos de exclusión iónica, que pueden evitarse del siguiente modo:

- a) Añadiendo un agente formador de pares iónicos a la fase móvil.
- b) Utilizando una fase móvil que contenga una sal inorgánica que cause un efecto salino sobre los solutos orgánicos.
- c) Suprimiendo la ionización de los clorofenoxiácidos mediante el uso de una fase móvil tamponada a un pH suficientemente bajo.

Otra posibilidad consiste en el uso de una columna rellena con fase estacionaria tipo amino ( $-NH_2$ ) que, en medio ácido, se protona actuando como intercambiador aniónico débil. En este caso es necesario utilizar una elevada concentración de ácido, por ejemplo ácido acético, en la fase móvil.

Por otra parte, para conseguir un funcionamiento satisfactorio del sistema de detección y de bombeo existen varias limitaciones con respecto al eluyente, como son el uso de elevadas concentraciones de ácido acético que pueden interferir en la detección UV, o de elevadas concentraciones de sales que pueden afectar a la vida media de las bombas y de las columnas.

Por todo ello, se ha elegido como mejor opción la utilización de una fase móvil tamponada que suprima la ionización química de los herbicidas fenoxiácidos y que permita separarlos en una columna de fase reversa con detección UV. Se ha escogido como agente tamponante de la fase móvil el ácido acético que es uno de los más utilizados (Åkerblom, 1985; Hoke *et al.*, 1986; Wells y Michael, 1987; Haman y Kettrup, 1987; Haman *et al.*, 1989; Nilvé *et al.*, 1989; Schüssler, 1990; Incorvia, 1991).

En primer lugar, se estudia la influencia de la naturaleza del modificador orgánico sobre la separación cromatográfica de una mezcla de 2,4-D y MCPA de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Se prueban como modificadores metanol y acetonitrilo, utilizando una columna de fase reversa de  $120 \times 4.6$  mm rellena de ODS-2 de  $3 \mu\text{m}$ , con detección UV a 230 nm. La concentración de ácido acético en la fase móvil se fijó inicialmente en 0.5% (v/v) y se estudiaron como fase móvil diferentes

mezclas  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  desde 25% hasta 50% de modificador orgánico, observándose la selectividad y la forma de los picos. El modificador más adecuado resultó ser el acetonitrilo, con una composición óptima en la fase móvil del 32.5%.

A continuación, se estudia el efecto de la concentración del ácido acético en la fase móvil sobre la separación cromatográfica en el intervalo 0.5% - 0.001% (v/v). Los resultados obtenidos muestran que cuando la concentración de ácido acético disminuye los compuestos eluyen antes y aumenta su resolución. Para concentraciones de ácido inferiores a 0.01% los picos prácticamente coeluyen con el frente de disolvente. En consecuencia, la fase móvil escogida es  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (32.5:67.5) con un 0.01% (v/v) de ácido acético.

El último parámetro estudiado es el flujo de la fase móvil, desde 0.5 hasta 1 25  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ . Se escogió como flujo óptimo 0.75  $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , que dio lugar a un menor tiempo de retención sin disminuir la resolución cromatográfica de los picos.

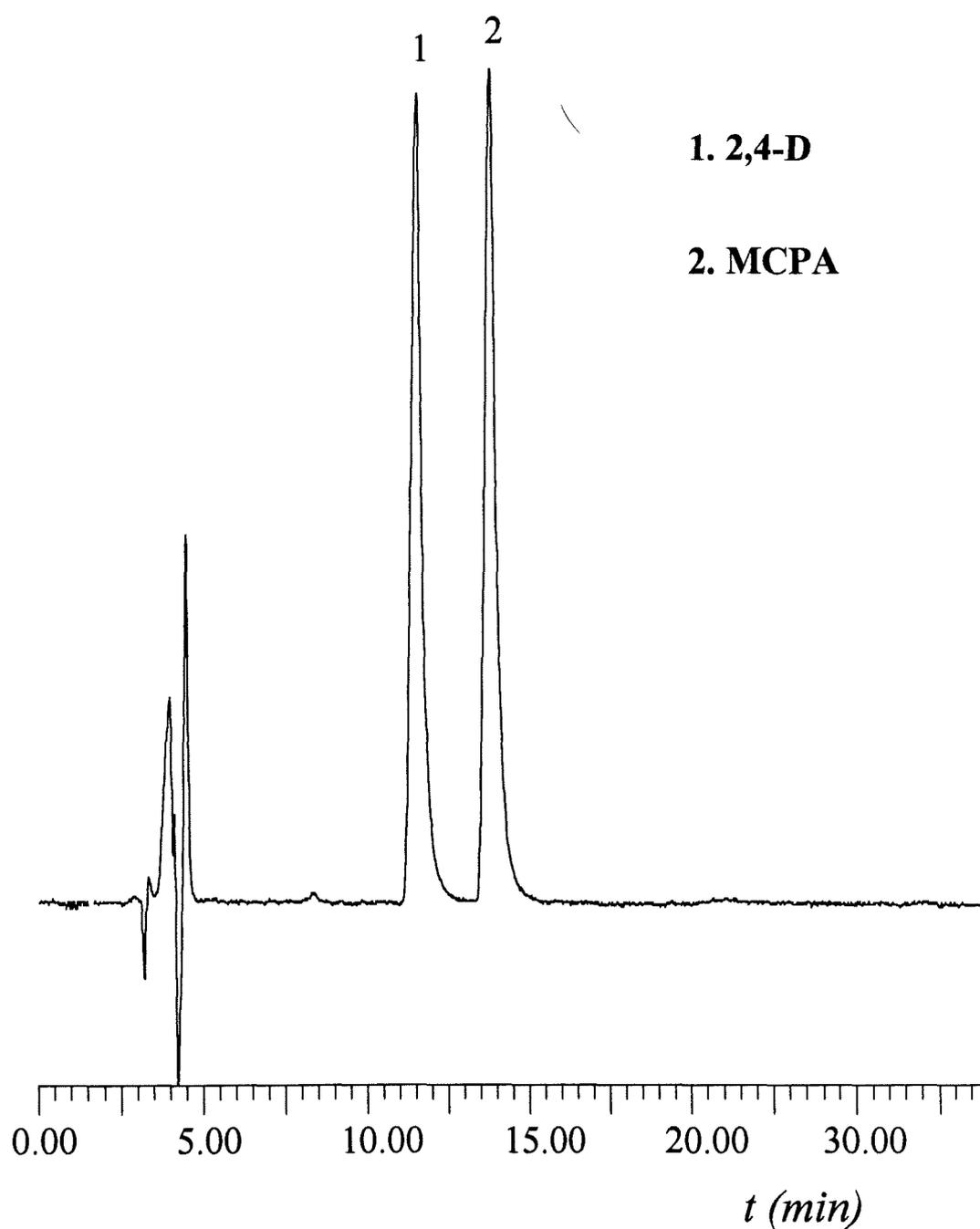
En la **Figura 17** se muestra un cromatograma de una mezcla de patrones de 2,4-D y MCPA de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  obtenido en las condiciones óptimas indicadas.

### ***II.2.2. Características analíticas.***

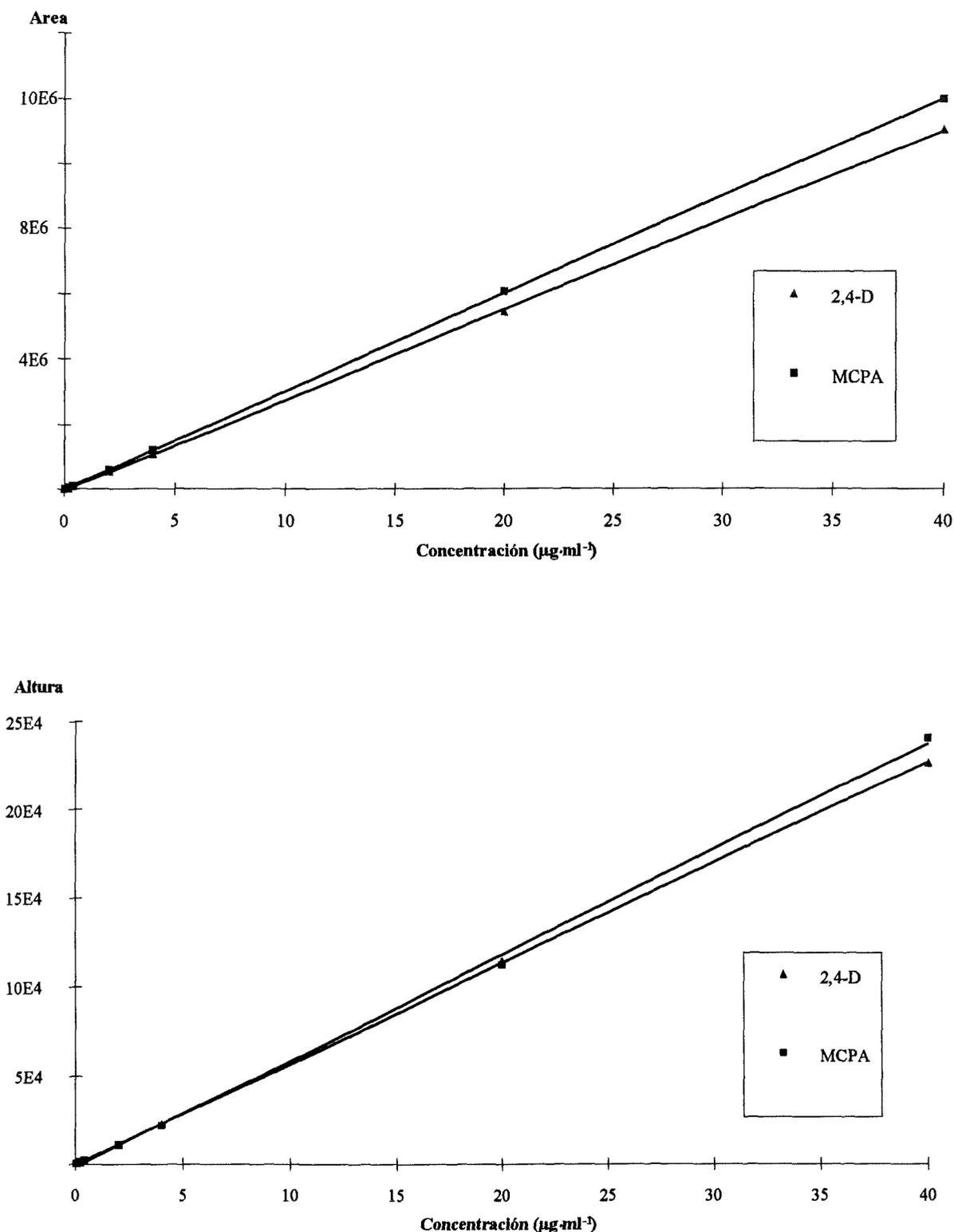
Una vez obtenidas las condiciones de separación, se estudian las características analíticas del método en cuanto a linealidad, precisión y límites de detección.

#### Curva de Calibrado.

Para estudiar la relación entre la concentración de analito y la respuesta del detector UV se utilizaron diferentes mezclas de 2,4-D y MCPA con concentraciones entre 0.04 y 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y un volumen de inyección de 100  $\mu\text{l}$ . En la **Figura 18** se muestran las curvas de calibrado obtenidas tanto en área como altura de pico. Se observa una buena relación lineal entre la concentración y la respuesta del detector para todo el rango de concentraciones estudiado que comprende tres órdenes de magnitud. En la **Tabla 12** se muestran los datos estadísticos de la regresión de las curvas de calibrado.



**Figura 17.** Cromatograma de una mezcla de patrones de 2,4-D y MCPA de  $4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Condiciones: columna Spherisorb ODS-2,  $125 \times 4 \text{ mm d.i.}$ ,  $3 \mu\text{m}$ ; fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (32.5:67.5) con un 0.01% HAc (v/v) a  $0.75 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ ; volumen inyección  $100 \mu\text{l}$ .



**Figura 18.** Curvas de calibrado obtenidas tanto en área como altura de pico para 2,4-D y MCPA mediante cromatografía líquida.

Condiciones: columna Spherisorb ODS-2, 125 × 4 mm d.i., 3 µm; fase móvil CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (32.5:67.5) con un 0.01% HAc (v/v) a 0.75 ml·min<sup>-1</sup>; volumen inyección 100 µl.

**Tabla 12.** Datos estadísticos ( $p < 0.01$ ) para las curvas de calibrado de 2,4-D y MCPA.

	2,4-D		MCPA	
	Area	Altura	Area	Altura
<i>Ordenada Origen</i>	-10847.5	-18.94	7729.4	-1204.9
<i>Error Estándar Ordenada Origen</i>	18677.8	253.5	10003	1457.3
<i>Pendiente</i>	276057	5679.1	300411	5973.6
<i>Error Estándar Pendiente</i>	1099.4	14.92	588.8	85.78
<i>Error Estándar</i>	40928.4	555.48	21919.6	3193.40
<i>Coef. correlación</i>	0.99996	0.99998	0.99999	0.99949
<i>Nivel Significación</i>	1.902E-11	2.377E-12	5.491E-13	1.156E-8

### Precisión

Para estudiar la precisión del sistema cromatográfico se realizaron siete inyecciones de 100  $\mu\text{l}$  de una disolución de 4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de 2,4-D y MCPA. En la **Tabla 13** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a tiempos de retención, áreas de pico y alturas de pico.

**Tabla 13.** Precisión del sistema cromatográfico para la determinación de 2,4-D y MCPA (4  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) mediante cromatografía líquida.

	Area		Altura		Tiempo retencion	
	2,4-D	MCPA	2,4-D	MCPA	2,4-D	MCPA
	1089039	1243237	22524	21623	11.321	13.062
	1086156	1231850	23100	22126	11.301	13.032
	1087694	1232361	23378	22277	11.250	12.982
	1087427	1232849	23547	22485	11.293	13.023
	1089499	1234605	23698	23072	11.274	13.000
	1092867	1236354	23953	23647	11.251	12.980
	1092341	1237027	23856	23609	11.284	13.027
<b>Media</b>	1089289	1235469	23437	22691	11.282	13.015
<b>Desv. Est.</b>	2331	3663	458.7	714.7	0.024	0.027
<b>Desv. Est. Rel</b>	0.21%	0.30%	2.0%	3.2%	0.21%	0.21%

Se observa que la precisión en los tiempos de retención es aceptable en ambos casos, lo que permite una correcta identificación de los dos herbicidas clorofenoxiácidos. Por otro lado, la precisión es mejor cuando se trabaja en áreas de pico que en alturas (*desviaciones estándar relativas del orden de diez veces mayores para alturas*), por lo que la mejor opción para el cálculo de la concentración de estos herbicidas es la medida de área de pico.

### Límites de Detección.

En términos generales el límite de detección de un analito se puede definir como aquella concentración que produce una señal instrumental ( $y$ ) *significativamente diferente* de la señal del blanco o del fondo. Es obvio que esta definición da gran libertad al químico analítico para establecer el límite de detección, basándose en la interpretación subjetiva de la frase "significativamente diferente" (Miller y Miller, 1993).

Una definición utilizada normalmente en la bibliografía de Química Analítica es que el límite de detección es la concentración de analito que da una señal igual a la del blanco más tres veces la desviación estándar del mismo.

$$y = y_B + 3 \cdot S_B$$

Se han realizado algunos intentos para definir otro límite, el "límite de cuantificación" (o de determinación), considerado como el límite más bajo para mediciones cuantitativas precisas, en oposición a detección cualitativa. Se ha sugerido para este límite un valor de

$$y = y_B + 10 \cdot S_B$$

pero todavía no se ha puesto en práctica de modo generalizado.

Para el cálculo de los límites de detección en este trabajo se han seguido dos criterios de distinto fundamento, uno estadístico y otro más empírico, ampliamente utilizado.

- El criterio estadístico utilizado en cromatografía se basa en el cálculo de un límite de detección estimado (LDE) a partir de la desviación estándar obtenida para las medidas de concentración de una disolución patrón multiplicada por el valor de la  $t$  de Student para  $n-1$  grados de libertad con un nivel de confianza del 99% (Glasser, *et al.*, 1981; Jiménez *et al.*, 1989):

$$LDE = t_{n-1,99\%} \cdot S_{patr} (\mu\text{g} \cdot \text{l}^{-1})$$

A partir de los datos de la **Tabla 13** se obtienen las desviaciones estándar para las medidas de 2,4-D y MCPA. El valor de  $t_{n-1, 99\%}$ , para seis grados de libertad, es de 3.71 (Miller y Miller, 1993).

- El criterio más empírico, aplicado al análisis cromatográfico, define el límite de detección como aquella concentración de analito que produce un pico cromatográfico tres veces mayor que el ruido de fondo del cromatograma. Su cálculo se realiza a partir del cromatograma del patrón de menor concentración inyectado, en nuestro caso  $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

En la **Tabla 14** se muestran los valores de límites de detección obtenidos para los herbicidas clorofenoxiácidos 2,4-D y MCPA aplicando los dos criterios

**Tabla 14.** Límites de detección para la determinación de 2,4-D y MCPA por cromatografía líquida.

	Estadístico <sup>a</sup>		Empírico <sup>b</sup>			
	Desv. Est. ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	$L_D$ ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	Ruido ( $\text{mm}$ )	Señal ( $\text{mm}$ )	Altura pico ( $\text{mm}$ )	$L_D$ ( $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ )
2,4-D	8.6	32	30	90	170	21
MCPA	11.9	44	30	90	162	22

<sup>a</sup>  $LDE = t_{n-1, 99\%} \cdot S_{\text{patrón}} (\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$ , donde  $t_{n-1} = 3.7$ .

<sup>b</sup> Calculado a partir del cromatograma del patrón de  $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

Se pueden obtener límites de detección más bajos utilizando volúmenes de inyección mayores, siempre que el sistema cromatográfico lo permita. En la **Tabla 15** se muestran los límites de detección para estos compuestos obtenidos experimentalmente a partir de los cromatogramas de una mezcla de  $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  utilizando volúmenes de inyección de 100, 200, 300 y 400  $\mu\text{l}$ .

**Tabla 15.** Límites de detección para la determinación de 2,4-D y MCPA por cromatografía líquida en función del volumen de inyección.

	$L_D$ (ng·ml <sup>-1</sup> )			
	100 $\mu$ l	200 $\mu$ l	300 $\mu$ l	400 $\mu$ l
2,4-D	21	14	4.9	2.0
MCPA	22	13	4.7	1.9

Se pueden alcanzar, por tanto, límites de detección (*en inyección directa*) del orden de 2 ppb con un volumen de inyección de 400  $\mu$ l. Por consiguiente, aplicando una etapa de preconcentración, no parece problemático alcanzar límites de detección del orden de 0.1  $\mu$ g·l<sup>-1</sup> en aguas, que es el límite máximo para pesticidas permitido por la CEE.

### II.2.3. Tratamiento de las muestras.

Una vez establecidas las condiciones cromatográficas de separación para el 2,4-D y el MCPA, se estudió la etapa de extracción utilizando muestras de aguas fortificadas. Se han realizado experiencias aplicando las técnicas de extracción líquido-líquido (ELL) y de extracción en fase sólida (EFS).

#### Extracción Líquido-Líquido.

Debido al carácter polar de los herbicidas a estudiar se ha elegido como extractante un disolvente moderadamente polar como el diclorometano (Lee *et al.*, 1986; Ahmed *et al.*, 1989; Tsukioka y Murakami, 1989; Schüssler, 1990). La optimización de las condiciones de extracción se ha realizado utilizando una muestra de agua subterránea fortificada al nivel de 8  $\mu$ g·l<sup>-1</sup>. El procedimiento general utilizado es el siguiente: se toman 500 ml de agua, ajustando el pH a aproximadamente 1 con ácido sulfúrico, y se realiza la extracción por triplicado con 100, 50 y 50 ml de diclorometano. Los extractos orgánicos combinados se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentran en evaporador Kuderna-Danish hasta, aproximadamente, 5 ml. Se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo se disuelve en 500  $\mu$ l de acetonitrilo. Se inyecta un volumen de 20  $\mu$ l bajo las condiciones cromatográficas descritas en el apartado anterior.

En primer lugar, se estudió el efecto de la concentración salina sobre la recuperación de los herbicidas, realizándose experiencias por duplicado en ausencia de NaCl y con un 10% (p/v) de NaCl. Las recuperaciones obtenidas fueron mejores en presencia de NaCl (94.9% y 88.3% frente a 82.5% y 82.9%, para MCPA y 2,4-D, respectivamente).

A continuación, se estudió el efecto del volumen de extractante, manteniendo la adición de un 10% (p/v) de NaCl. Se probaron volúmenes de diclorometano de 100/50/50 y 50/25/25 ml, observándose una disminución de la recuperación de los herbicidas clorofenoxiácidos al disminuir el volumen de extractante.

Asimismo, se estudió también la influencia del pH de la muestra de agua, realizándose experiencias a  $\text{pH} < 1$  (*añadiendo 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.*) y a pH neutro (*sin adición de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc.*). Las recuperaciones sólo fueron aceptables en medio ácido fuerte, ya que a pH neutro no se recuperó ninguno de los dos herbicidas clorofenoxiácidos.

Así pues, el procedimiento de extracción propuesto comprende la extracción de una alícuota de 500 ml de agua, acidificada a  $\text{pH} < 1$  con 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc., y a la que se adicionan 50 g de NaCl, con 100, 50 y 50 ml de diclorometano.

Este procedimiento se aplicó a muestras de aguas subterráneas fortificadas a diferentes concentraciones (8, 1 y  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) con objeto de comprobar la independencia del factor de recuperación con la concentración de analito. En el caso de la muestra fortificada a  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , el volumen final fue de 250  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. La **Tabla 16** muestra las recuperaciones obtenidas y los límites de detección, calculados a partir de los cromatogramas correspondientes al agua fortificada a  $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . El procedimiento propuesto permite obtener resultados satisfactorios. El límite de detección obtenido ( $0.12 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) se puede considerar adecuado para la legislación vigente en materia de residuos de pesticidas en aguas medioambientales.

**Tabla 16.** Efecto de la concentración de la muestra sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando ELL. Límites de detección.

Herbicida	Recuperación (%)			
	$8 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ *	$\text{LD} (\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1})$
2,4-D	88.3	88.1	105	0.12
MCPA	94.9	82.4	81.3	0.12

\* Utilizando un volumen final de 250  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo.

Extracción en Fase Sólida.

La optimización de las condiciones para el procedimiento de extracción en fase sólida (EFS) se ha realizado de acuerdo con el siguiente esquema (Wells y Michael, 1987):

## 1. Control de la retención:

100 ml de agua fortificada a  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , acidificada a pH 2.  
cartucho  $\text{C}_{18}$  100 mg

## 2. Optimización de la elución:

elección eluyente  
volumen de elución

## 3. Optimización de la retención:

pH  
tipo de relleno del cartucho  
volumen de muestra  
concentración de la muestra  
masa adsorbente

Se fijaron como condiciones iniciales 100 ml de agua fortificada al nivel de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , acidificada a pH 2 con HCl conc. y un cartucho de 100 mg de relleno tipo  $\text{C}_{18}$ .

En primer lugar, se estudió la **etapa de elución** suponiendo que con las condiciones iniciales se produce la retención de los herbicidas. Se ensayaron distintos eluyentes (metanol, acetato de etilo y acetona), utilizando un volumen de elución de 1 ml con el fin de estudiar el efecto del eluyente.

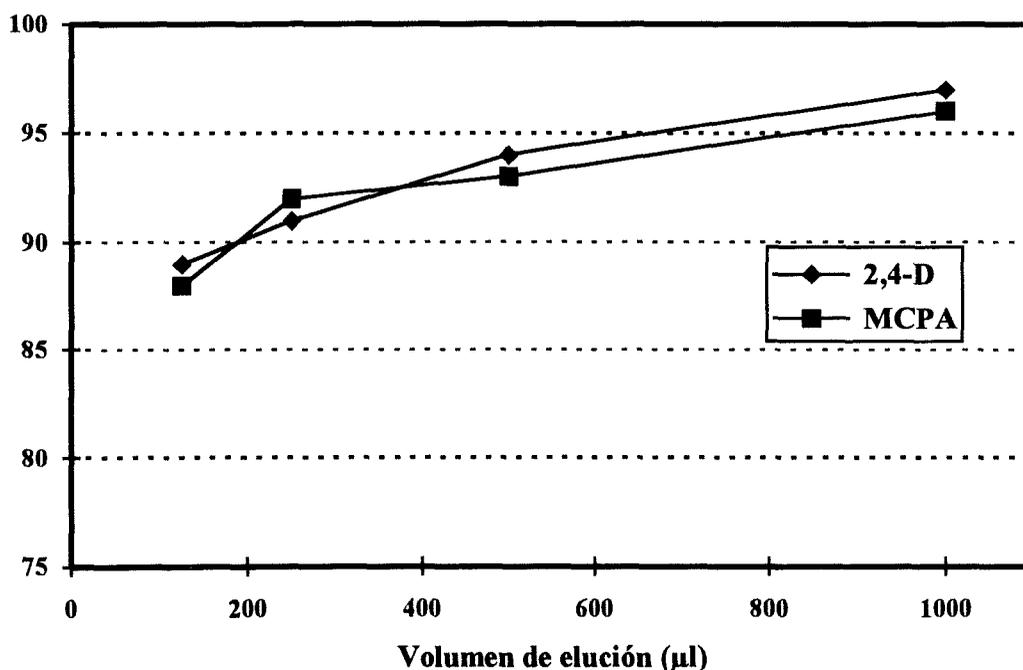
En la **Tabla 17** se muestran los resultados obtenidos.

**Tabla 17.** Efecto del eluyente sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando EFS. Condiciones: volumen de muestra, 100 ml; concentración de herbicidas,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; cartucho, 100 mg  $\text{C}_{18}$ .

Herbicida	Recuperación (%)		
	Metanol	Acetato de etilo	Acetona
2,4-D	103	75.7	114
MCPA	103	90.4	122

El metanol es la mejor opción entre los disolventes ensayados ya que el acetato de etilo y acetona, aunque proporcionan buenas recuperaciones, deben ser previamente evaporados y redisolventes en otro disolvente antes de la inyección en el sistema cromatográfico a causa de la fuerte absorción que presentan a la longitud de onda de medida (230 nm). Por el contrario, el metanol permite su inyección directa sin previa evaporación, disminuyendo el tiempo de preparación de muestra, así como las posibles fuentes de error.

A continuación, se estudia el volumen de elución, ensayándose diferentes volúmenes de metanol (entre 125 y 1000  $\mu\text{l}$ ), con objeto de establecer el volumen mínimo que permita obtener recuperaciones aceptables. Los resultados obtenidos se representan en la **Figura 19**.



**Figura 19.** Efecto del volumen de elución sobre la recuperación de los herbicidas MCPA y 2,4-D utilizando EFS. Condiciones: volumen de muestra, 100 ml; concentración de herbicidas,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ; cartucho, 100 mg C18; eluyente, metanol.

Se observa que incluso volúmenes tan bajos como 125  $\mu\text{l}$  producen buenas recuperaciones. Se fijó un volumen mínimo de elución de 250  $\mu\text{l}$  para evitar mayores errores en esta etapa, aunque en cualquier caso el volumen final de elución recogido debe medirse antes

de la inyección para conocer el volumen real del extracto metanólico obtenido. Los resultados demuestran que tanto el 2,4-D como el MCPA son inmediatamente eluidos del cartucho de C<sub>18</sub> por el frente de metanol.

La segunda etapa a estudiar fue la **optimización de la retención** de los herbicidas clorofenoxiácidos en el cartucho de extracción. Las condiciones iniciales producen una retención que se debe optimizar. En primer lugar se considera el pH de la muestra de agua, teniendo en cuenta la necesidad de acidificar la muestra de agua. Se realizó una experiencia a pH neutro con resultados negativos en cuanto a la recuperación de los herbicidas clorofenoxiácidos 2,4-D y MCPA. Por lo tanto, se mantuvo la acidificación previa de la muestra de agua con HCl conc. a pH 2.

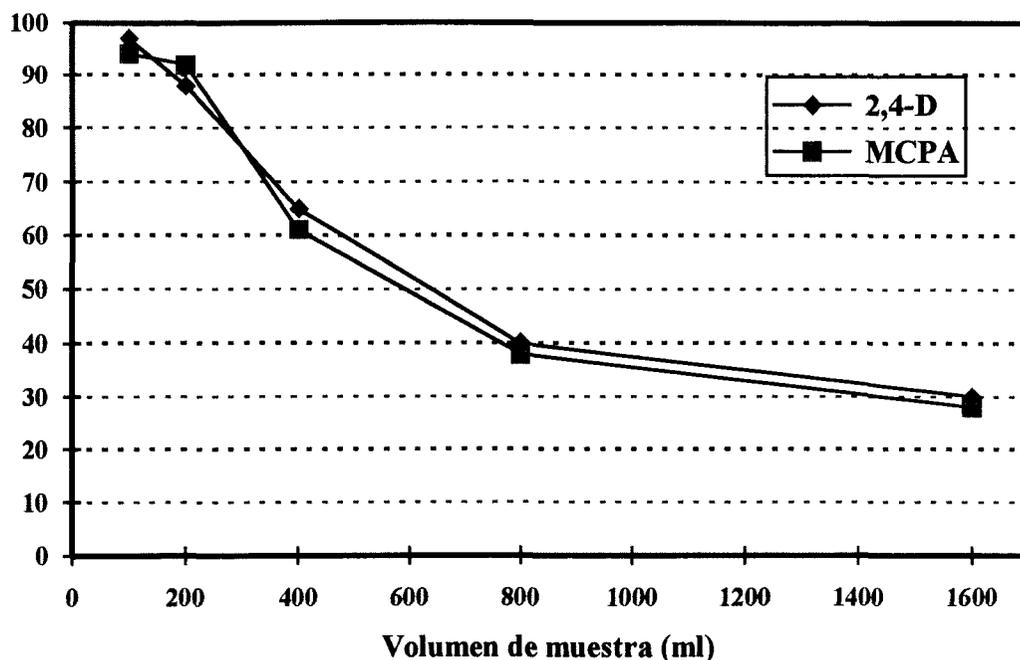
A continuación, se estudia el volumen de muestra máximo que se puede utilizar sin tener pérdidas considerables en la recuperación, es decir, el volumen de ruptura. Se realizaron diferentes experiencias con 100, 200, 400, 800 y 1600 ml de muestra de agua fortificada de manera que la cantidad total de herbicida fue de 4 µg en todos los casos. Las recuperaciones obtenidas se representan en la **Figura 20**, donde se observa que el volumen de ruptura tanto para el MCPA como para el 2,4-D es de 200 ml empleando un cartucho de 100 mg relleno de C<sub>18</sub>. Este volumen es pequeño en comparación con los de otros tipos de pesticidas, organofosforados y organoclorados, que normalmente presentan volúmenes de ruptura mayores de 600 ml, pero del mismo orden que los de otros pesticidas más polares como el dimetoato.

Finalmente, se estudió el efecto de la concentración de la muestra a diferentes niveles entre 20 y 1 µg·l<sup>-1</sup>. En la **Tabla 18** se muestran los resultados obtenidos, observándose una independencia clara de las recuperaciones con la concentración.

**Tabla 18.** Efecto de la concentración de la muestra sobre la recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA utilizando EFS. Límites de detección. Condiciones: volumen de muestra, 200 ml; cartucho, 100 mg C<sub>18</sub>; eluyente, 1 ml metanol.

Herbicida	Recuperación (%)			
	20 µg·l <sup>-1</sup>	10 µg·l <sup>-1</sup>	1 µg·l <sup>-1</sup> *	L <sub>D</sub> (µg·l <sup>-1</sup> )
2,4-D	90.4	90.5	94.6	0.25
MCPA	94.8	103	94.7	0.29

\* Utilizando un volumen final de 250 µl de acetoneitrilo.



**Figura 20.** Efecto del volumen de muestra sobre la recuperación de los herbicidas MCPA y 2,4-D utilizando EFS. Condiciones: masa de herbicidas, 40  $\mu\text{g}$ ; cartucho, 100 mg C18; eluyente, 1 ml metanol.

Así pues, el procedimiento de EFS propuesto consiste en pasar una alícuota de 200 ml de muestra de agua acidificada con HCl a pH 2 por un cartucho de fase reversa C18 de 100 mg (previamente acondicionado con 1 ml de MeOH y 1 ml de HCl 0.01M) a vacío con un flujo alrededor de 3-4 ml/min. Tras pasar la muestra acuosa, el cartucho se seca durante 10 min con el mismo vacío y, posteriormente, se eluye con la cantidad necesaria de MeOH. Este procedimiento permite alcanzar límites de detección del orden de 0.2-0.3  $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  para los herbicidas 2,4-D y MCPA (Tabla 18).

### Procedimiento conjunto para Organoclorados, Organofosforados y Fenoxiácidos.

Una vez comprobada la nula recuperación de los herbicidas 2,4-D y MCPA mediante extracción líquido-líquido con diclorometano en medio neutro, se ha estudiado la posibilidad de aplicar un procedimiento conjunto para el análisis de estos herbicidas fenoxiácidos junto con otros pesticidas de distintas características ácido-base como organoclorados y organofosforados. Este procedimiento presentaría un interés especial en aquellos estudios de control en los que se quisiera analizar ambos grupos de compuestos y el volumen de muestra disponible no fuera suficiente para llevar a cabo dos extracciones.

El procedimiento se basa en una primera ELL de los pesticidas organoclorados y organofosforados con diclorometano en medio neutro, seguida de la acidificación de la muestra y extracción posterior de los herbicidas 2,4-D y MCPA, también con diclorometano.

Se toman 500 ml de agua subterránea fortificada al nivel de  $10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  y se le añaden 50 g de NaCl, realizándose la extracción por triplicado con 50, 25 y 25 ml de diclorometano, de modo que se recuperan en la fase orgánica los pesticidas organoclorados y organofosforados. La fase acuosa se conserva para una posterior extracción de los herbicidas fenoxiácidos. Los extractos orgánicos se secan con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se evaporan hasta unos 5 ml en Kuderna-Danish y se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno. El residuo se disuelve en 500  $\mu\text{l}$  de hexano y se analiza por cromatografía de gases capilar con detección de captura de electrones y nitrógeno-fósforo.

La fase acuosa se acidifica con 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. y se extrae de nuevo por triplicado con 100, 50 y 50 ml de diclorometano. Los extractos combinados se secan, concentran y evaporan a sequedad, y el residuo se disuelve en 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo. El análisis de los herbicidas clorofenoxiácidos se lleva a cabo mediante cromatografía líquida con supresión iónica y detección UV a 230 nm.

Los pesticidas estudiados fueron, además del 2,4-D y MCPA, los organofosforados Dimetoato, Fenitrothion y Metidation, y los organoclorados Lindano, Dicofol, Clorfenson y Tetradifon. En la **Tabla 19** se muestran las recuperaciones obtenidas, observándose que el procedimiento permite la determinación de estos compuestos en una única muestra de agua con buena recuperación y precisión, y evita la necesidad de duplicar muestras para la extracción por separado de los pesticidas organoclorados y organofosforados y los herbicidas clorofenoxiácidos.

**Tabla 19.** Recuperación de pesticidas organoclorados, organofosforados y herbicidas fenoxiácidos mediante ELL conjunta.

Pesticida	Recuperación (%)	
	CG-ECD	CG-NPD
Dimetoato	92 (1.4)	93 (4.1)
Lindano	68 (4.3)	
Fenitrothion	86 (1.0)	84 (5.1)
Dicofol	79 (0.9)	
Metidation	92 (1.6)	94 (4.3)
Clorfenson	86 (0.8)	
Tetradifon	95 (0.8)	
	HPLC-UV	
2,4-D	81 (3.4)	
MCPA	85 (4.4)	

Entre paréntesis, la desviación estándar relativa para tres replicados.

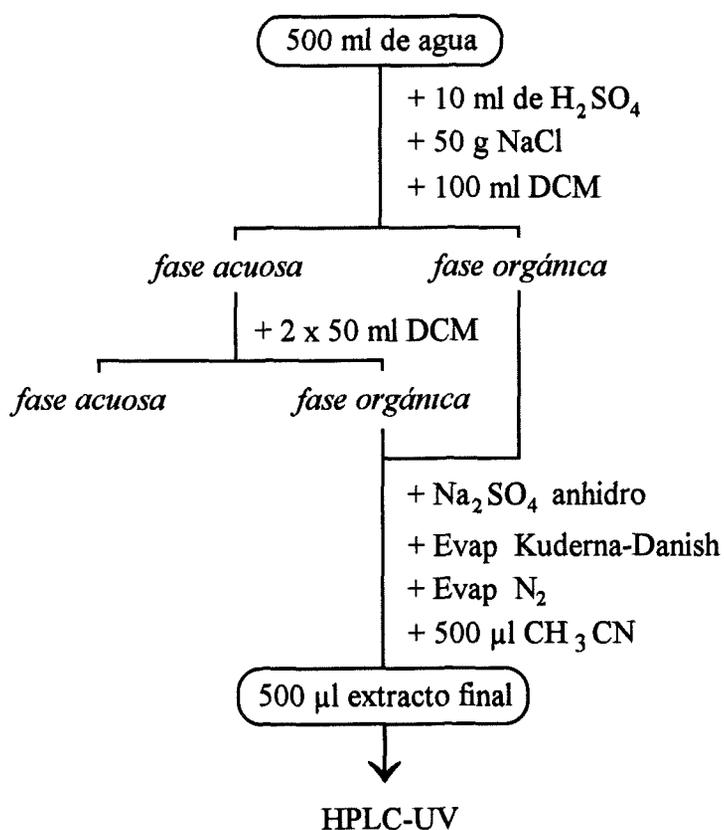
#### II.2.4. Procedimiento recomendado.

##### Análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos.

El procedimiento final recomendado para el análisis de residuos de MCPA y 2,4-D en muestras de agua medioambientales se representa en la **Figura 21**.

Se toman 500 ml de una muestra de agua, se acidifica a  $\text{pH} < 1$  con 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. y se añaden 50 g de NaCl, agitando hasta su disolución. Se añaden 100 ml de diclorometano y se agita durante 2 min. Se dejan separar las fases durante 10 minutos, y la fase orgánica (*inferior*) se recoge en un matraz erlenmeyer. La fase acuosa (*superior*) se extrae dos veces más con 50 ml de diclorometano y las tres fases orgánicas se recogen y combinan en el mismo matraz erlenmeyer. Estos extractos orgánicos se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro haciéndolos pasar a través de un embudo provisto de un tapón de algodón y unos gramos de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . El extracto se recoge directamente en la parte inferior del sistema Kuderna-Danish,

donde se concentra hasta unos 5 ml, llevándose finalmente a sequedad completa en baño a 40°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo se redissuelve en 500 µl de acetonitrilo, inyectándose 20 µl en el sistema de cromatografía líquida, consistente en una columna de fase reversa de 120 mm × 4.6 mm rellena de ODS-2 de 3 µm y una fase móvil CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (32.5/67.5) y ácido acético 0.01% (v/v) con detección UV a 230 nm. La cuantificación se realiza mediante la técnica del patrón externo utilizando medidas de área de los picos.



**Figura 21.** Esquema del procedimiento recomendado para el análisis de residuos de los herbicidas 2,4-D y MCPA.

### Análisis conjunto de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados y herbicidas fenoxiácidos

El procedimiento conjunto recomendado para el análisis de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados y de los herbicidas fenoxiácidos MCPA y 2,4-D se representa en la **Figura 22**

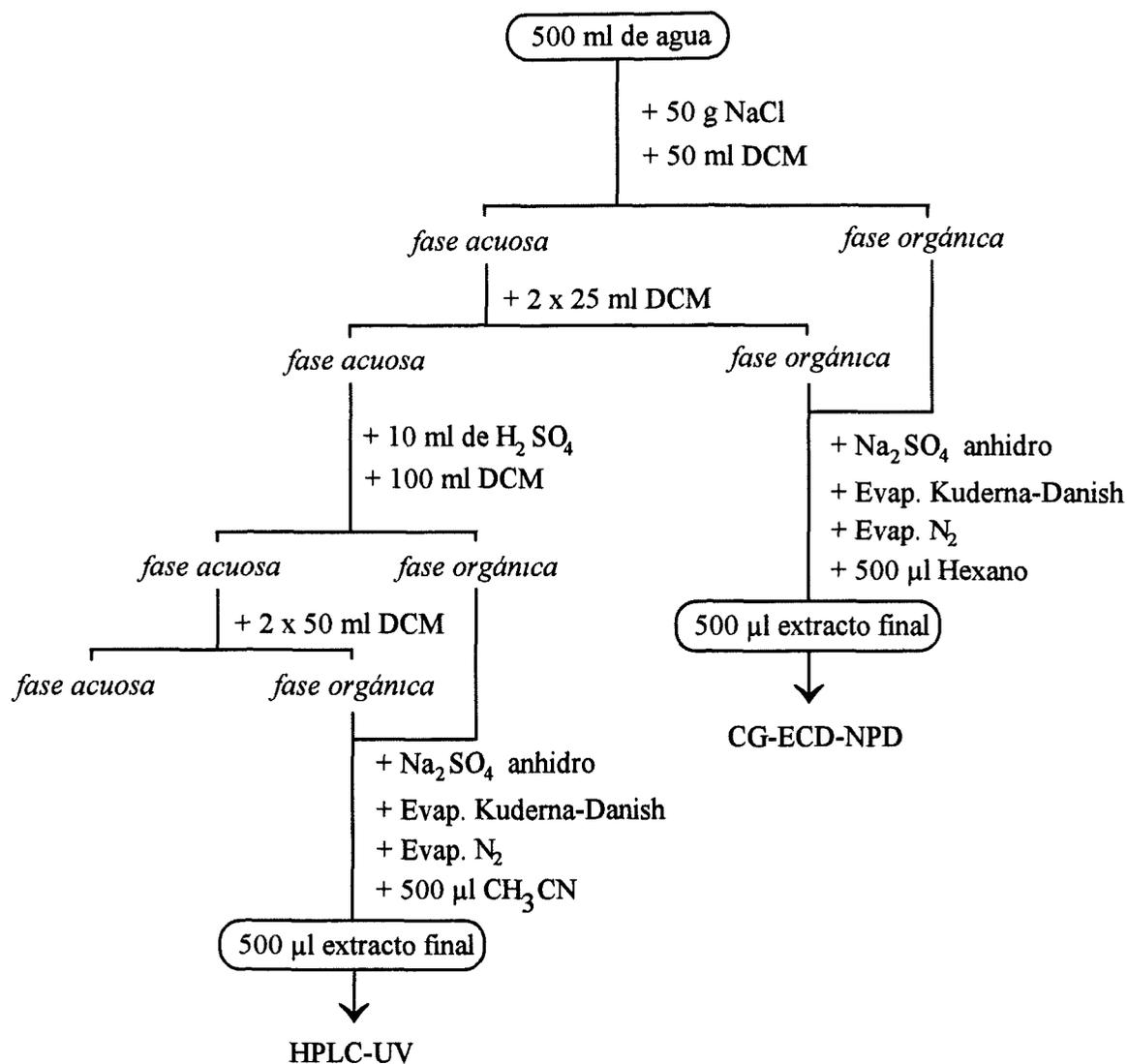
Se toman 500 ml de una muestra de agua y se añaden 50 g de NaCl, agitando hasta su disolución. Se añaden 50 ml de diclorometano y se agita durante 2 min. Se dejan separar las fases durante 10 minutos y la fase orgánica (*inferior*) se recoge en un matraz erlenmeyer. La fase acuosa (*superior*) se extrae dos veces más con 25 ml de diclorometano, combinándose las tres fases orgánicas en el mismo matraz erlenmeyer. La fase acuosa superior se conserva para la posterior extracción de los herbicidas fenoxiácidos. Los extractos orgánicos obtenidos se secan sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se recogen directamente en la parte inferior del sistema Kuderna-Danish, donde se concentran hasta unos 5 ml, llevándose posteriormente hasta sequedad en baño a 40°C bajo corriente de nitrógeno. El residuo se disuelve en 500 µl de hexano y se analiza por cromatografía de gases capilar con detectores ECD y NPD bajo las siguientes condiciones:

- columna sílice fundida HP Ultra2, 25 m × 0,25 mm di, 0,33 µm de espesor de película, 5% fenilmetilsilicona
- temperaturas inyector 270°C, detector ECD 300°C, detector NPD 270°C
- programa de temperaturas

$$90^{\circ}\text{C} \xrightarrow[1\text{min}]{30^{\circ}\text{C}/\text{min}} 180^{\circ}\text{C} \xrightarrow[15\text{min}]{4^{\circ}\text{C}/\text{min}} 270^{\circ}\text{C}$$

- flujo de gas portador, He 1 ml min<sup>-1</sup>
- volumen de inyección, 2 µl

La cuantificación se realiza mediante la técnica del patrón externo utilizando medidas de área de los picos.



**Figura 22.** Esquema del procedimiento de análisis conjunto de residuos de pesticidas organoclorados y organofosforados y herbicidas fenoxiácidos.

La fase acuosa que se había conservado se acidifica con 10 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  conc. y se extrae de nuevo por triplicado con 100, 50 y 50 ml de diclorometano. Estos extractos orgánicos se secan sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro recogiendo los directamente en la parte inferior del sistema Kuderna-Danish, donde se concentran hasta unos 5 ml, continuándose la evaporación a  $40^\circ\text{C}$  bajo corriente de nitrógeno hasta llegar a sequedad completa. El residuo se disuelve en 500  $\mu\text{l}$  de acetonitrilo, inyectándose 20  $\mu\text{l}$  en el sistema de cromatografía líquida, consistente en una columna de fase reversa de  $120\text{ mm} \times 4.6\text{ mm}$  rellena de ODS-2 de  $3\ \mu\text{m}$  y una fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (32.5:67.5) y ácido acético 0.01% (v/v) con detección UV a 230 nm. La cuantificación se realiza mediante la técnica del patrón externo utilizando medidas de área de los picos.

### II.3. Determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.

#### II.3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.

##### a) Estudio de la separación en columna de fase reversa C18.

En primer lugar, se optimizan las condiciones cromatográficas para la separación de los herbicidas fenoxiácidos en una columna de fase reversa de  $50 \times 4.6$  mm d.i. rellena de fase estacionaria Microsphere C18 de  $3 \mu\text{m}$ ,  $N \sim 6000$ . Los herbicidas estudiados son 2,4-D, MCPA, 2,4,5-T, 2,4-DP, MCPP, MCPB y 2,4,5-TP, además de Dicamba.

Inicialmente, se trabaja con una fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  0.1% HAc (50:50, v/v) a un flujo de  $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$  y con detector de barrido de diodos. En estas condiciones se inyectaron disoluciones patrón individuales de cada uno de los herbicidas, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 20**, donde además se indican los factores de capacidad ( $k'$ ) y los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon^\circ$ ) para cada compuesto medidos a su longitud de onda óptima.

El factor de capacidad ( $k'$ ) se determinó como:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad ; \text{ donde } t_0 = 0.5 \text{ min}$$

**Tabla 20.** Parámetros iniciales ( $t_R$ ,  $k'$ ,  $\lambda_{\text{max}}$ ,  $\epsilon^\circ$ ) de los herbicidas fenoxiácidos estudiados.

Herbicida	Conc. ( $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ )	$t_R$ (min)	$k'$	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon^\circ$ ( $l \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )
Dicamba	56.2	0.93	0.86	212	5973
2,4-D	64.8	1.21	1.42	228	5810
MCPA	51.5	1.25	1.50	227	5972
2,4,5-T	44.4	1.51	2.02	230	7883
2,4-DP	60.8	1.55	2.10	228	5410
MCPP	47.9	1.57	2.14	227	6646
MCPB	74.4	1.93	2.86	229	6197
2,4,5-TP	47.1	1.97	2.94	230	8253

Para el cálculo del coeficiente de extinción molar se aplicó la siguiente ecuación:

$$\epsilon^0 = \frac{h(m) \cdot AUFS(UA)}{AUFS(mm)} \cdot \frac{M(g \cdot mol^{-1}) \cdot F(ml \cdot min^{-1}) \cdot \sigma(ml) \cdot 2500}{C(\mu g \cdot ml^{-1}) \cdot V_1(ml)} \cdot \frac{1}{b(cm)}$$

donde M: peso molecular del analito

C. concentración del analito en la muestra inyectada.

F. flujo de fase móvil

$V_1$ : volumen de inyección.

$\sigma$ : mitad de la anchura del pico cromatográfico a un 60% de la altura total expresada en ml.

b: paso de luz para la celda del detector UV

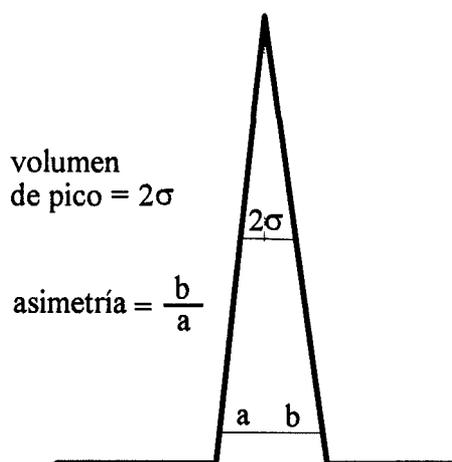
h: altura de pico cromatográfico expresada en milímetros

AUFS: escala total en unidades de absorbancia (UA) o en milímetros (mm).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se selecciona como longitud de onda óptima de trabajo para todos los compuestos 228 nm. Asimismo, a la vista de los valores de  $k'$ , se decide llevar a cabo la optimización cromatográfica con una mezcla de los compuestos Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP, que abarcan todo el rango de factores de capacidad. Se prepara para ello una mezcla a partir de las disoluciones concentradas anteriores conteniendo 2.8, 3.0 y 4.7  $\mu g \cdot ml^{-1}$  de Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP, respectivamente.

Debido a las características ácidas de estos herbicidas es necesario trabajar en modo de supresión iónica, esto es, en un medio lo suficientemente ácido. Así, el siguiente parámetro a estudiar es el efecto de la naturaleza del ácido que se utiliza en la fase móvil sobre la forma y volumen de pico. Además, se modifica también la relación  $CH_3CN/H_2O$  en la fase móvil para obtener una menor fuerza eluotrópica, ya que los valores de  $k'$  obtenidos en la experiencia anterior son, en general, bajos.

Las experiencias se realizan con una fase móvil  $CH_3CN/H_2O$  (40:60) añadiendo a la fase acuosa un 0.1% en volumen de los diferentes ácidos a estudiar: ácido acético, ácido fórmico, ácido tricloroacético y ácido fosfórico. Se inyectó la mezcla de Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP en las diferentes fases móviles, cuantificándose el volumen de los picos y sus valores de asimetría. Para determinar el volumen de pico se calculó  $2\sigma$  en  $\mu l$ , que corresponde a la anchura de pico cromatográfico al 60% de su altura, mientras que la asimetría del pico se calculó como la relación entre la anchura de la segunda mitad del pico cromatográfico y la primera, medidas al 10% de la altura total del mismo, como se observa en la **Figura 23**.



**Figura 23.** Representación esquemática del procedimiento de cálculo del volumen y asimetría de un pico cromatográfico.

En la **Tabla 21** se muestran los resultados obtenidos, observándose que son el ácido tricloroacético y el ácido fosfórico los que proporcionan mejores características. Se escoge el tricloroacético porque produce menores volúmenes de pico, aunque la asimetría es algo mayor

**Tabla 21.** Influencia de la naturaleza del ácido de la fase móvil en la separación de Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP mediante CL en fase reversa C18.

Herbicida	f.m. A		f.m. B		f.m. C		f.m. D	
	2σ (μl)	Asim.						
Dicamba			80	2.29	90	2.13	100	1.89
2,4-DP	100	2.33	120	2.20	110	1.91	120	1.66
2,4,5-TP	140	1.62	160	1.71	120	1.61	160	1.94

f.m. A: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60) 0.1% acético, pH 3.26.

f.m. B: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60) 0.1% fórmico, pH 2.73.

f.m. C: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60) 0.1% tricloroacético, pH 2.43.

f.m. D: CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60) 0.1% fosfórico, pH 2.32.

A continuación, se estudia el efecto de la concentración de ácido tricloroacético (ATC) en el agua de la fase móvil. Utilizando la fase móvil CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60, v/v) se realizaron experiencias para un contenido de ATC en la fase acuosa de 0.01% (pH 3.34), 0.05% (pH

2.68) y 0.1% (pH 2.43). No se estudiaron contenidos mayores de ATC al presentar un pH demasiado ácido para la fase estacionaria utilizada (pH < 2).

Al comparar los cromatogramas obtenidos para la mezcla Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP en cada una de las fases móviles, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a volumen de pico, asimetría y factor de capacidad entre las fases móviles con 0.05 y 0.1% de ATC. Se escoge como óptimo un 0.05% ATC porque presenta un pH mayor, menos agresivo para la columna.

Seguidamente, se estudia la selectividad para distintos modificadores orgánicos de la fase móvil manteniendo constante la fuerza eluotrópica. Así pues, en primer lugar hay que calcular la composición de la fase móvil para que la fuerza eluotrópica sea la misma. Se han ensayado, además de acetonitrilo, otros modificadores como tetrahidrofurano (THF) y metanol (MeOH).

Para ello se utiliza el concepto de polaridad de un disolvente, teniendo en cuenta que la polaridad de una mezcla de disolventes es la media aritmética de los valores de polaridad de los disolventes puros, ponderada según la fracción de volumen de cada disolvente. Para una mezcla binaria compuesta por dos disolventes A y B, la polaridad de la mezcla vendría dada por

$$\delta_{AB} = \phi_A \cdot \delta_A + \phi_B \cdot \delta_B$$

A partir de la polaridad ( $\delta_i$ ) de los distintos disolventes (**Tabla 22**) se puede calcular la composición de las fases móviles THF/H<sub>2</sub>O y MeOH/H<sub>2</sub>O para que tengan la misma polaridad (fuerza eluotrópica) que la de CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (40:60) utilizada en experiencias anteriores, haciendo uso de la ecuación citada anteriormente.

**Tabla 22.** *Parámetros de polaridad de los distintos disolventes utilizados.*

Disolvente	H <sub>2</sub> O	MeOH	CH <sub>3</sub> CN	THF
Polaridad ( $\delta_i$ )	25.52	15.85	13.14	9.88

Las fases móviles isoeluotrópicas resultaron ser las siguientes:

- CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 0.05% ATC (40:60)
- THF/H<sub>2</sub>O 0.05% ATC (32:68)
- MeOH/H<sub>2</sub>O 0.05% ATC (51:49)

Utilizando cada una de estas fases móviles, se inyecta la mezcla de Dicamba, 2,4-DP y 2,4,5-TP, y a partir de los cromatogramas se obtienen los valores de volumen de pico, asimetría y factor de capacidad (**Tabla 23**).

**Tabla 23.** Influencia de la naturaleza del modificador orgánico sobre la separación de los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna de Microspher C18 de 3  $\mu\text{m}$  y 50 mm.

Herbicida	f.m. A				f.m. B				f.m. C			
	$t_R$ (min)	$2\sigma$ ( $\mu\text{l}$ )	Asim	$k'$	$t_R$ (min)	$2\sigma$ ( $\mu\text{l}$ )	Asim	$k'$	$t_R$ (min)	$2\sigma$ ( $\mu\text{l}$ )	Asim	$k'$
Dicamba	1.59	90	2.00	2.18	3.27	120	1.73	5.54	1.9	100	1.7	2.82
2,4-DP	3.22	120	1.67	5.44	7.35	250	1.75	13.70	6.5	200	1.3	12.0
2,4,5-TP	5.22	170	1.72	9.44	13.00	440	1.36	25.0	13.2	410	1.3	25.4

f.m. A:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (40:60) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

f.m. B:  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (32:68) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

f.m. C:  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (51:49) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

Así mismo, también se calcula el parámetro  $4\sigma/k'$ , que cuantifica la selectividad de la fase móvil. Cuanto menor sea el valor de este parámetro, la fase móvil utilizada proporcionará mejor separación sobre la columna, ya que aumenta el factor de capacidad (retención), sin un excesivo aumento del volumen de pico (dispersión). En la **Tabla 24** se muestran los valores obtenidos para  $4\sigma/k'$ .

**Tabla 24.** Selectividad ( $4\sigma/k'$ ) del modificador orgánico de la fase móvil sobre los herbicidas fenoxiácidos.

Herbicida	f.m. A	f.m. B	f.m. C
Dicamba	82.60	43.32	70.92
2,4-DP	44.12	36.49	33.33
2,4,5-TP	36.02	35.20	32.28

f.m. A:  $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$  (40:60) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

f.m. B:  $\text{THF}/\text{H}_2\text{O}$  (32:68) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

f.m. C:  $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$  (51:49) 0.05% tricloroacético, pH 2.68.

Se escoge como modificador orgánico el metanol porque, además de tener un parámetro de selectividad bajo para los dos herbicidas fenoxiácidos, presenta una menor asimetría para todos los picos cromatográficos.

Una vez escogido el modificador orgánico (MeOH), se estudia la influencia de la composición de la fase móvil sobre la retención de los distintos herbicidas. Se ensayan diferentes fases móviles MeOH/H<sub>2</sub>O 0.05% ATC variando el contenido en MeOH entre 20 y 70 %. Para el estudio se preparan dos mezclas de patrones de herbicidas, así como una mezcla global de todos ellos (**Tabla 25**), con objeto de facilitar la identificación de los picos. A partir de los cromatogramas se obtienen los valores del factor de capacidad para cada compuesto en cada fase móvil (**Tabla 26**).

**Tabla 25.** Disoluciones patrón de herbicidas fenoxiácidos utilizadas en el estudio de la concentración de modificador orgánico en la fase móvil.

	Concentración ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )		
	Mezcla I	Mezcla II	Mezcla III
<i>Dicamba</i>	5.62		2.53
<i>2,4-D</i>	12.96		5.83
<i>MCPA</i>		4.29	4.64
<i>2,4-DP</i>		12.16	5.47
<i>MCPP</i>	19.16		8.62
<i>2,4,5-T</i>	17.76		7.99
<i>2,4-DB</i>		11.92	5.36
<i>MCPB</i>		18.60	8.37
<i>2,4,5-TP</i>	23.55		10.59