

Tabla 26. Factores de capacidad ($\ln k'$) de los herbicidas fenoxiácidos en función del porcentaje de modificador orgánico (MeOH) en la fase móvil.

	$\ln k'$					
	20%	30%	40%	50%	60%	70%
<i>Dicamba</i>	3.26	2.60	1.86	1.03	0.34	-0.22
<i>2,4-D</i>	4.68	3.80	2.83	1.86	1.03	0.26
<i>MCPA</i>	5.05	4.04	3.04	2.05	1.13	0.26
<i>2,4-DP</i>		4.68	3.59	2.52	1.53	0.59
<i>2,4,5-T</i>	5.75	4.77	3.70	2.60	1.59	0.74
<i>MCPP</i>	6.07	4.91	3.76	2.60	1.65	0.79
<i>MCPB</i>			4.32	3.10	1.96	0.92
<i>2,4,5-TP</i>			4.48	3.25	2.16	1.16

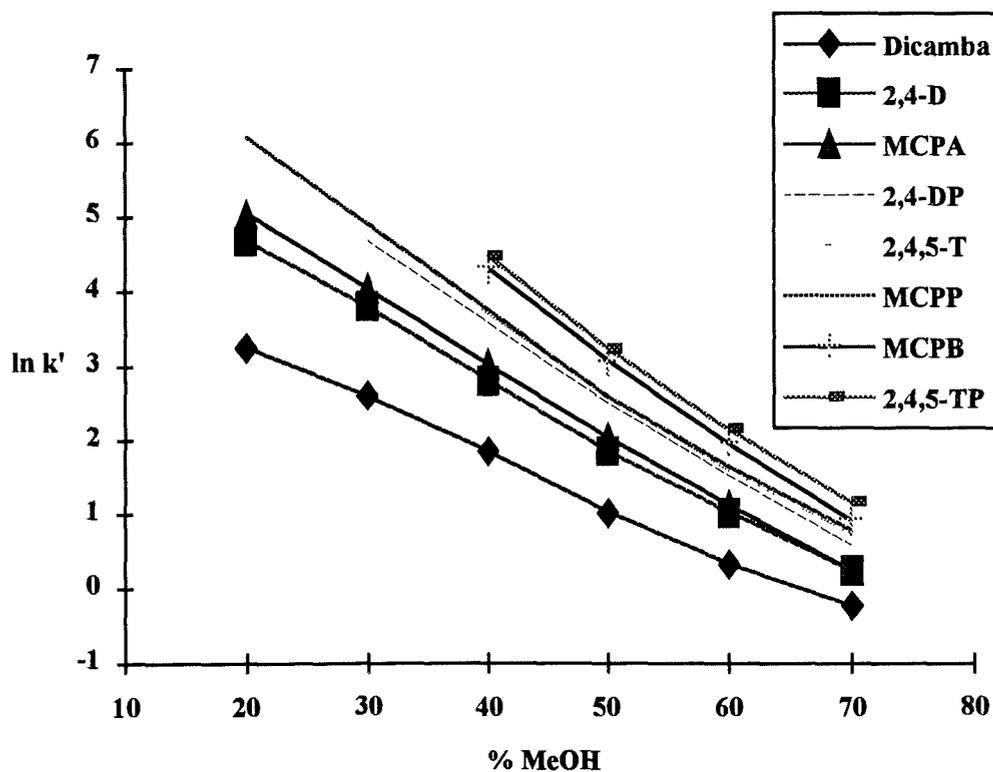


Figura 24. Diagrama $\ln k'$ frente al porcentaje de MeOH en la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos.

En la **Figura 24** se representan los valores de $\ln k'$ frente al porcentaje de metanol en la fase móvil para cada uno de los compuestos estudiados. Estos puntos se ajustan a una ecuación de segundo orden del tipo.

$$\ln k' = a + b \cdot \phi_{MeOH} + c \cdot \phi_{MeOH}^2$$

en donde ϕ representa el tanto por uno de metanol que permite predecir la retención de los herbicidas fenoxiácidos en función de la composición de la fase móvil. Los coeficientes a , b y c , junto con el coeficiente de correlación para los distintos herbicidas clorofenoxiácidos se muestran en la **Tabla 27**.

Tabla 27. Coeficientes 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.

	a	b	c	R^2
<i>Dicamba</i>	4.9106	-8.2707	1.2500	0.998
<i>2,4-D</i>	6.7881	-10.750	1.9821	0.999
<i>MCPA</i>	7.2397	-11.259	1.8214	1.000
<i>2,4-DP</i>	8.3263	-12.954	2.7143	1.000
<i>2,4,5-T</i>	8.0559	-11.628	1.5893	0.999
<i>MCPP</i>	8.8094	-14.365	4.1071	1.000
<i>MCPB</i>	10.117	-16.290	4.5000	1.000
<i>2,4,5-TP</i>	10.508	-17.375	5.7500	1.000

De los resultados obtenidos se deduce que es necesario aumentar la resolución entre los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-T, ya que presentan retenciones similares, tal como se puede observar por los valores de la **Tabla 26**. Para ello, utilizando una fase móvil MeOH/H₂O 0 05% ATC (50:50), se estudia el efecto del pH sobre la selectividad en la separación de estos tres compuestos. El valor de pH se modifica añadiendo disolución de NaOH a la fase acuosa. Además, se realiza también una experiencia con la fase móvil MeOH/H₂O 0 2% ATC (50:50) para obtener un pH más ácido.

Las fases móviles ensayadas fueron las siguientes:

- MeOH/H₂O (50:50) 0.2% ATC, pH 2.16
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 2.65
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 3.21
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 3.94
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 5.38

Para realizar estas experiencias se utilizó una nueva mezcla patrón (Mezcla IV) de estos compuestos (12.2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 2,4-DP, 11.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 2,4,5-T y 12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ MCPP), inyectándose también patrones individuales cuando fue necesario para la confirmación de los picos.

Tan sólo se obtuvieron resultados aceptables en cuanto a resolución para el pH más ácido (2.16), pero, en estas condiciones, la cantidad de ácido tricloroacético es tan elevada que a la longitud de onda de trabajo (228 nm) se produce una absorción de fondo que el detector no puede corregir, por lo que se debe trabajar a una longitud de onda algo mayor ($\lambda = 233$ nm).

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que con la columna de fase reversa Microspher C18 de 50 mm es necesario trabajar a un pH del orden de 2 para conseguir resolución entre el 2,4-DP, 2,4,5-T y MCPP, pero que el ácido tricloroacético no es adecuado para este propósito al presentar problemas en la detección. Así, son dos las alternativas a seguir:

- utilizar una columna diferente que proporcione buena resolución trabajando a pH mayores.
- utilizar otro ácido tamponante de la fase móvil que no presente problemas en la detección.

En primer lugar, se realizan experiencias utilizando una columna de fase reversa de 100 \times 4.6 mm d.i. rellena con Chromspher B C18 de 5 μm , $N \sim 3000$, analizando la Mezcla IV con las siguientes fases móviles:

- MeOH/H₂O (50:50) 0.2% ATC, pH 2.16
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 2.65
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 2.88
- MeOH/H₂O (50:50) 0.05% ATC, pH 3.21

Los resultados obtenidos en cuanto a $\ln k'$ se muestran en la **Figura 25**.

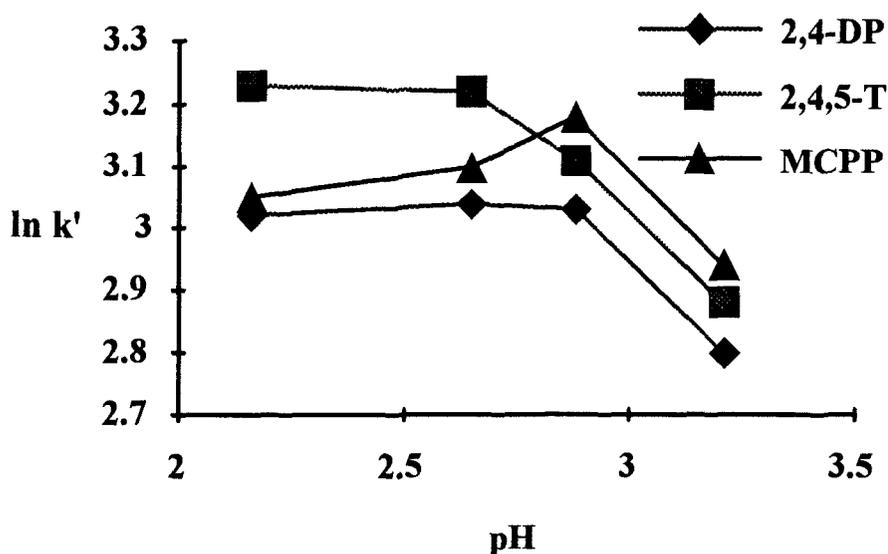


Figura 25. Diagrama $\ln k'$ frente al pH (ácido tricloroacético) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Chomspheer B C18 de 100 mm.

A la vista de los resultados, no se observa una zona de pH que proporcione una buena resolución entre los tres compuestos y, pensando en la aplicación de la técnica de columnas acopladas, parece más apropiado utilizar otro ácido que produzca una menor absorción de fondo, ya que cuando se realiza la etapa de transferencia se produce un gradiente escalonado que genera una distorsión de la línea base, mayor cuanto más alta sea la absorción de fondo de las fases móviles utilizadas. Por ello, se repitió la experiencia anterior con la misma columna, pero utilizando ácido fosfórico. Se prepararon las siguientes fases móviles:

- MeOH/H₂O (50:50) 0.5% H₃PO₄, pH 2.00
- MeOH/H₂O (50:50) 0.1% H₃PO₄, pH 2.29
- MeOH/H₂O (50:50) 0.1% H₃PO₄, pH 2.80
- MeOH/H₂O (50:50) 0.01% H₃PO₄, pH 3.43

Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 26**.

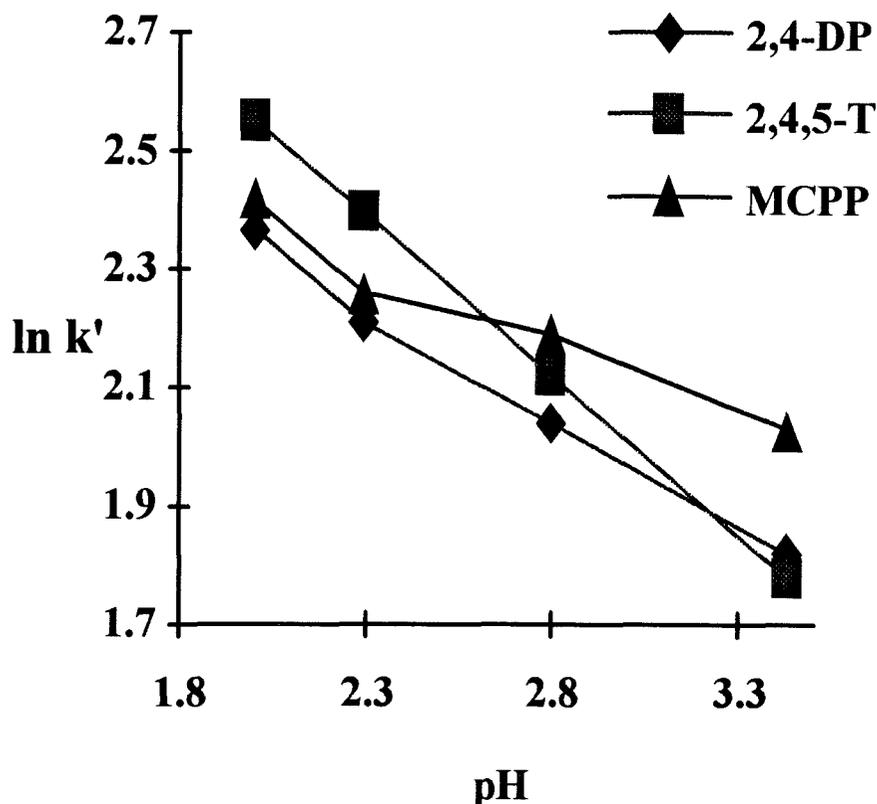


Figura 26. Diagrama $\ln k'$ frente al pH (ácido fosfórico) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Chomspher B C18 de 100 mm.

Se observa que el H_3PO_4 tampoco proporciona una zona de pH que de lugar a una buena resolución entre los compuestos, ya que siempre se produce la coelución de dos ó más compuestos.

A continuación, se ensayó la utilización del ácido trifluoroacético (ATF) para la fase móvil (Di Corcia *et al.*, 1991), ya que con este ácido es posible aumentar su concentración para disminuir el pH sin tener problemas de detección a la longitud de onda de trabajo (228 nm).

Se estudiaron las siguientes fases móviles:

- MeOH/ H_2O (50:50) 0.136% ATF, pH 2.02.
- MeOH/ H_2O (50:50) 0.1% ATF, pH 2.15.
- MeOH/ H_2O (50:50) 0.08% ATF, pH 2.23.

tanto en la columna Microspher (50mm) como en la Chromspher B (100 mm), siendo posible medir la absorbancia a 228 nm sin ninguna dificultad (Tabla 28, Figura 27).

Tabla 28. Influencia de la concentración de ácido trifluoacético en la fase móvil sobre la separación de los herbicidas fenoxiácidos en una columna Microspher C18 (50 × 4.6 mm, 3 μm).

	ln k'		
	pH 2.02	pH 2.15	pH 2.23
2,4-DP	2.52	2.54	2.56
MCP	2.59	2.63	2.65
2,4,5-T	2.68	2.67	2.71

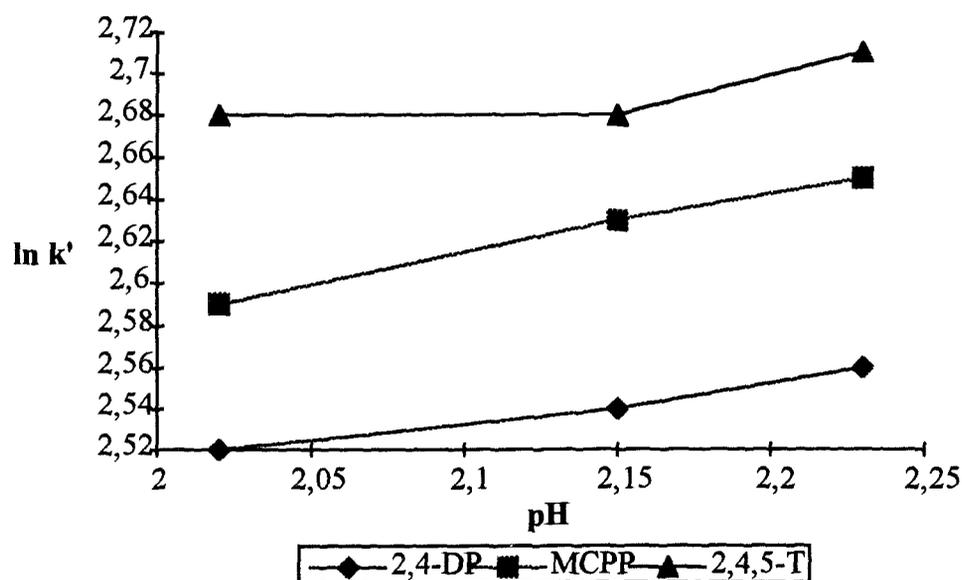


Figura 27. Diagrama ln k' frente al pH (ácido trifluoroacético) de la fase acuosa de la fase móvil para los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna Microspher C18 (50 × 4.6 mm, 3 μm).

El uso del ATF 0.1% (pH 2.15) resulta ser una buena opción sólo para la columna de fase reversa de 50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 μm, aunque los picos presentan una acusada cola, tal como se puede apreciar en la **Figura 28**.

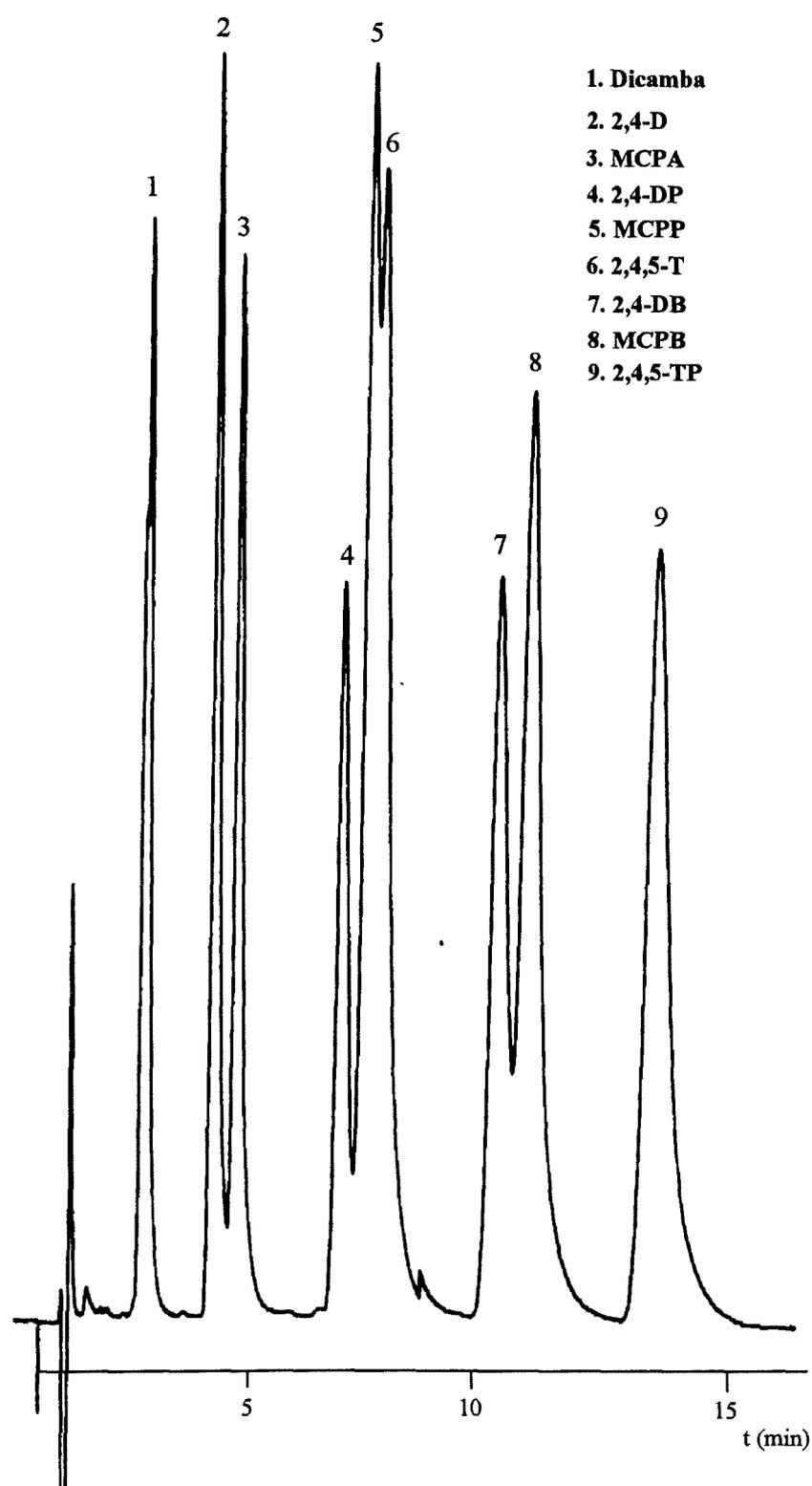


Figura 28. Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos (Mezcla III). Condiciones: fase móvil MeOH/H₂O (50:50) 0.1% ATF, pH 2.15; columna de fase reversa de 50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 μm; detección UV 228 nm.

Con objeto de reducir la aparición de colas en los picos se estudió la posibilidad de añadir una sal a la fase móvil, que en algunos casos ha dado un resultado positivo, aunque no bien explicado (Hogendoorn y van Zoonen, 1990). Se preparó una fase móvil MeOH/H₂O (50:50) 0.1% TFA, 0.05 M NaCl, pH 2.08 y se analizó en estas condiciones la Mezcla III, no observándose una mejora en la forma de los picos.

Un modo de rebajar la formación de colas en un cromatograma es aumentar la temperatura. Así, se realiza una serie de experiencias para estudiar el efecto de la temperatura, colocando la columna en el interior de una camisa metálica por la que circula agua de un baño termostático recirculante, de modo que es posible controlar la temperatura de trabajo. La fase móvil fue MeOH/H₂O (50:50) 0.1% TFA, pH 2.15 y la columna de fase reversa de 50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 µm. Las temperaturas ensayadas fueron 35, 45, 55 y 65°C, inyectándose 20 µl de la Mezcla III. Los valores de factor de capacidad obtenidos a cada temperatura se muestran en la **Tabla 29** y se representan en la **Figura 29**.

Tabla 29. Factores de capacidad de los herbicidas fenoxiácidos en función de la temperatura. Condiciones: fase móvil de pH 2.15 (ácido trifluoroacético); columna de fase reversa de 50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 µm.

	ln <i>k'</i>				
	20°C	35°C	45°C	55°C	65°C
<i>Dicamba</i>	1.34	1.19	1.10	0.94	0.81
<i>2,4-D</i>	1.93	1.76	1.65	1.46	1.32
<i>MCPA</i>	2.08	1.90	1.76	1.57	1.43
<i>2,4-DP</i>	2.55	2.37	2.22	2.03	1.88
<i>2,4,5-T</i>	2.69	2.50	2.34	2.15	2.00
<i>MCP</i>	2.65	2.45	2.29	2.10	1.95
<i>2,4-DB</i>	3.01	2.80	2.62	2.42	2.23
<i>MCPB</i>	3.08	2.86	2.68	2.48	2.29
<i>2,4,5-TP</i>	3.32	3.12	2.94	2.75	2.56

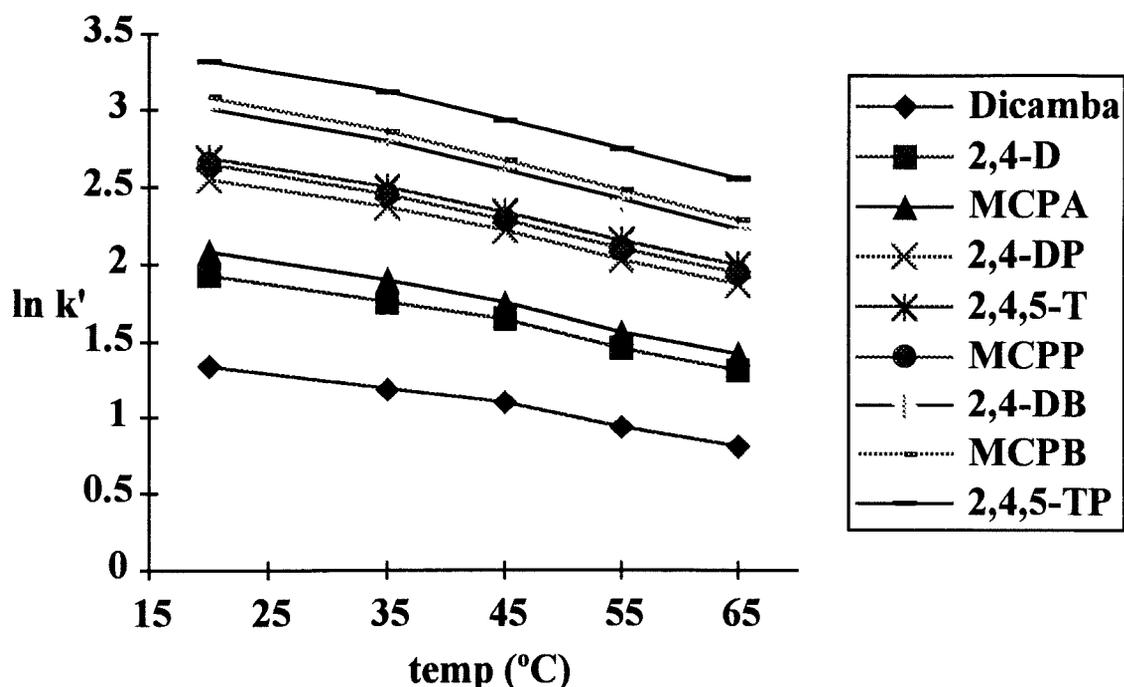


Figura 29. Diagrama de $\ln k'$ de los herbicidas fenoxiácidos frente a la temperatura. Condiciones: fase móvil de pH 2.15 (ácido trifluoroacético), columna de fase reversa de 50×4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de $3 \mu\text{m}$.

La representación de $\ln k'$ frente a la temperatura se ajusta a una ecuación de segundo orden del tipo

$$\ln k' = a + b \cdot T + c \cdot T^2$$

que permite predecir la retención de los herbicidas fenoxiácidos en función de la temperatura de la fase móvil. Los valores de los coeficientes a , b y c y el coeficiente de correlación se recogen en la **Tabla 30**.

Tabla 30. Coeficientes 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>a</i>	<i>b</i> ·10 ³	<i>c</i> ·10 ⁵	<i>R</i> ²
<i>Dicamba</i>	1.4702	-4.9350	-8.1232	0.997
<i>2,4-D</i>	2.0906	-6.2317	-8.8272	0.996
<i>MCPA</i>	2.2877	-8.8130	-6.9711	0.997
<i>2,4-DP</i>	2.7559	-8.5285	-7.8291	0.998
<i>2,4,5-T</i>	2.9231	-10.126	-6.4954	0.998
<i>MCPP</i>	2.9004	-11.232	-5.4229	0.998
<i>2,4-DB</i>	3.2464	-9.8415	-9.0555	0.999
<i>MCPB</i>	3.3337	-10.947	-7.9830	1.000
<i>2,4,5-TP</i>	3.5433	-9.1098	-9.3773	0.999

A la vista de los resultados, se escoge 45°C como temperatura de trabajo, pues permite una mejor resolución de MCPB y 2,4,5-T. La **Figura 30** muestra un cromatograma correspondiente a la Mezcla III obtenido a esta temperatura.

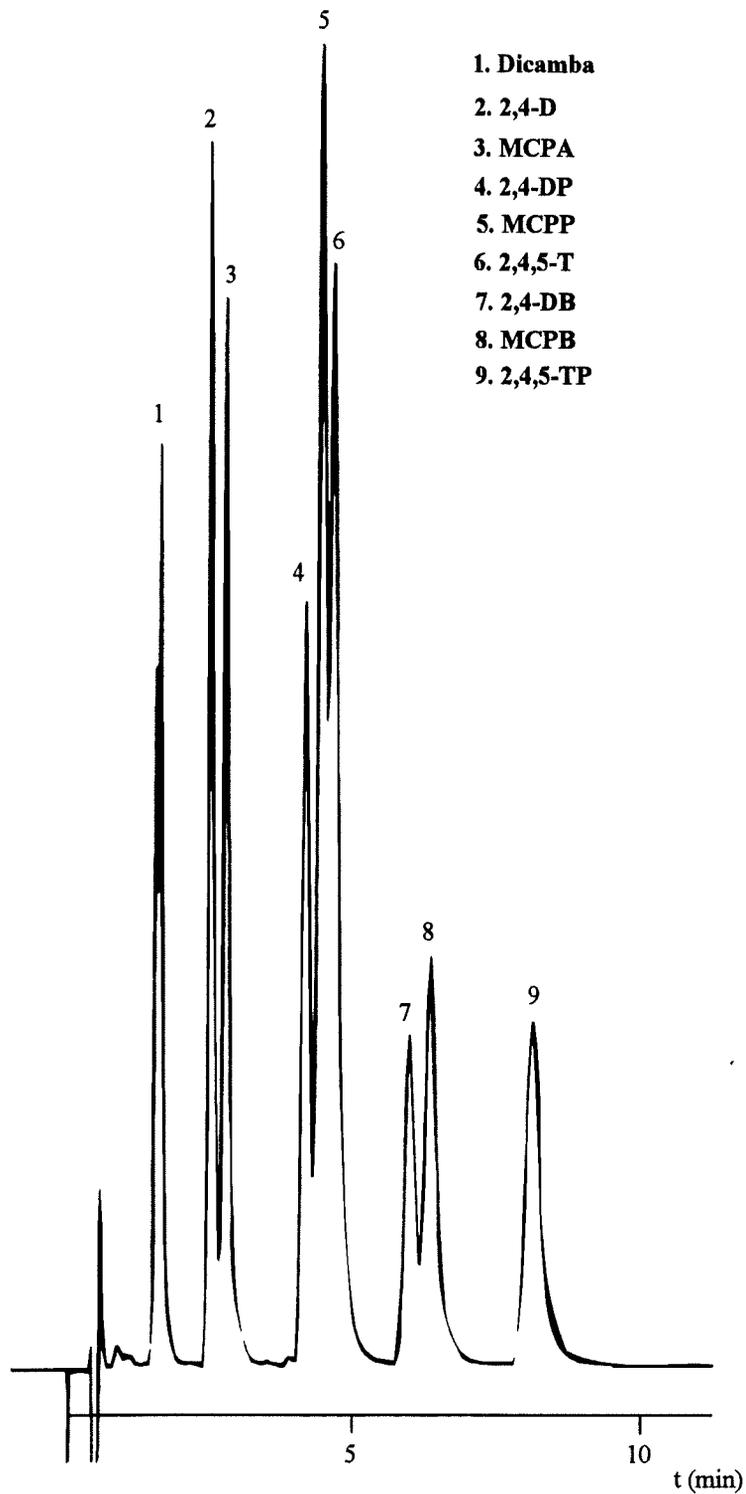


Figura 30. Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos (Mezcla III). Condiciones: fase móvil MeOH/H₂O (50:50) 0.1% ATF, pH 2.15; columna de fase reversa de 50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 μm; detección UV 228 nm; T 45°C.

En conclusión, se deduce que la columna Microspher C18 de 3 μm y 50 mm de longitud no llega a proporcionar suficiente resolución para los herbicidas estudiados.

Este hecho no es preocupante, ya que se pretende aplicar la técnica de columnas acopladas, en donde la resolución final es la suma de las dos columnas empleadas: la primera, donde se realiza la purificación en línea de los analitos, y la segunda, donde se completa la separación de los mismos, ya iniciada en la primera.

Se escoge un sistema formado por dos columnas iguales (Microsphere C18 de 3 μm y 50 mm de longitud), ya que una longitud global de 100 mm proporciona suficiente resolución de los herbicidas fenoxiácidos, mediante elución isocrática, tal como se observa en el cromatograma de la **Figura 31**.

Los analitos recorren, aparentemente, una columna de 100 mm, que se encuentra dividida en dos partes iguales, unidas por una interfase (*válvula de seis vías*) que permite su conexión o desconexión a voluntad del operador.

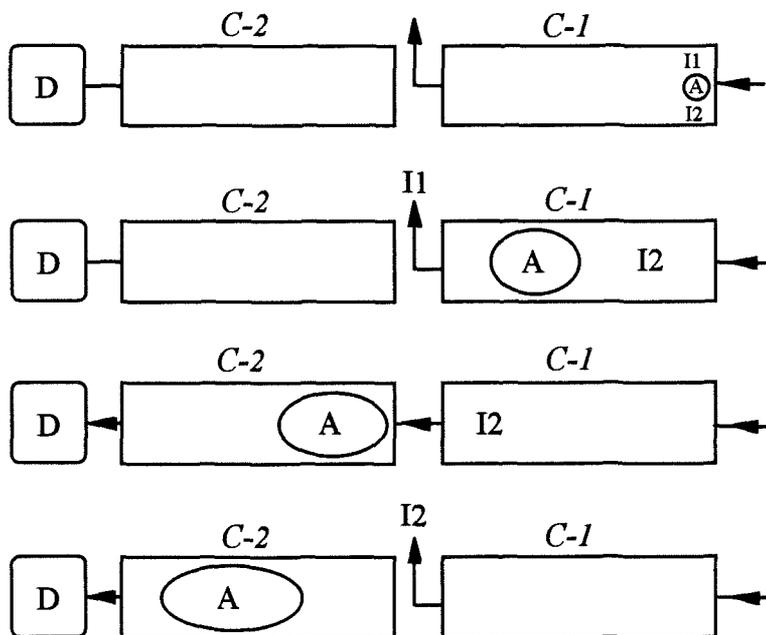


Figura 32. Representación esquemática secuencial del camino recorrido por los analitos durante la aplicación de la técnica de columnas acopladas.

C-1 y C-2, primera y segunda columnas separadoras; A, fracción de analitos; I1, interferentes de cabeza; I2, interferentes de cola; D, detector.

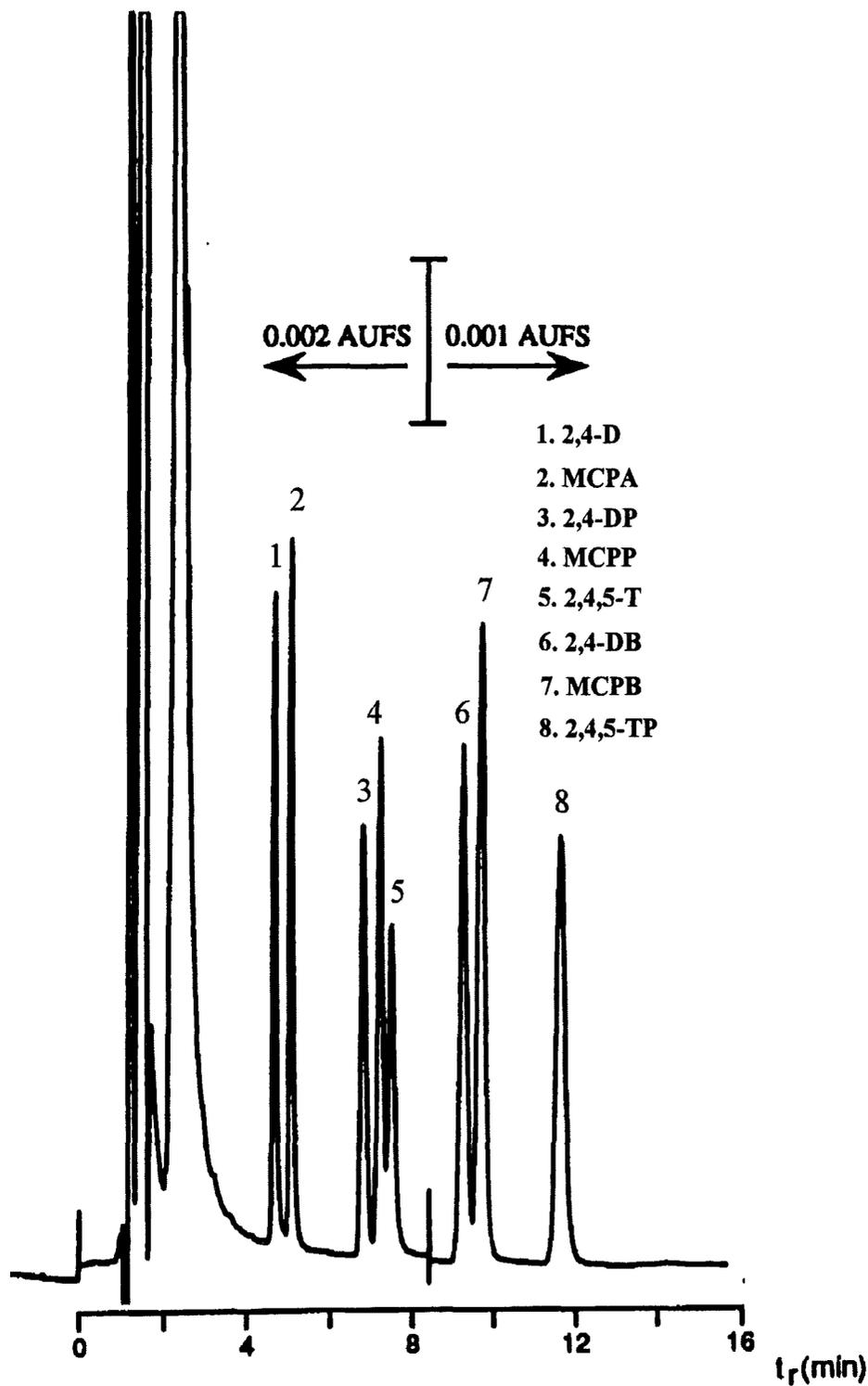
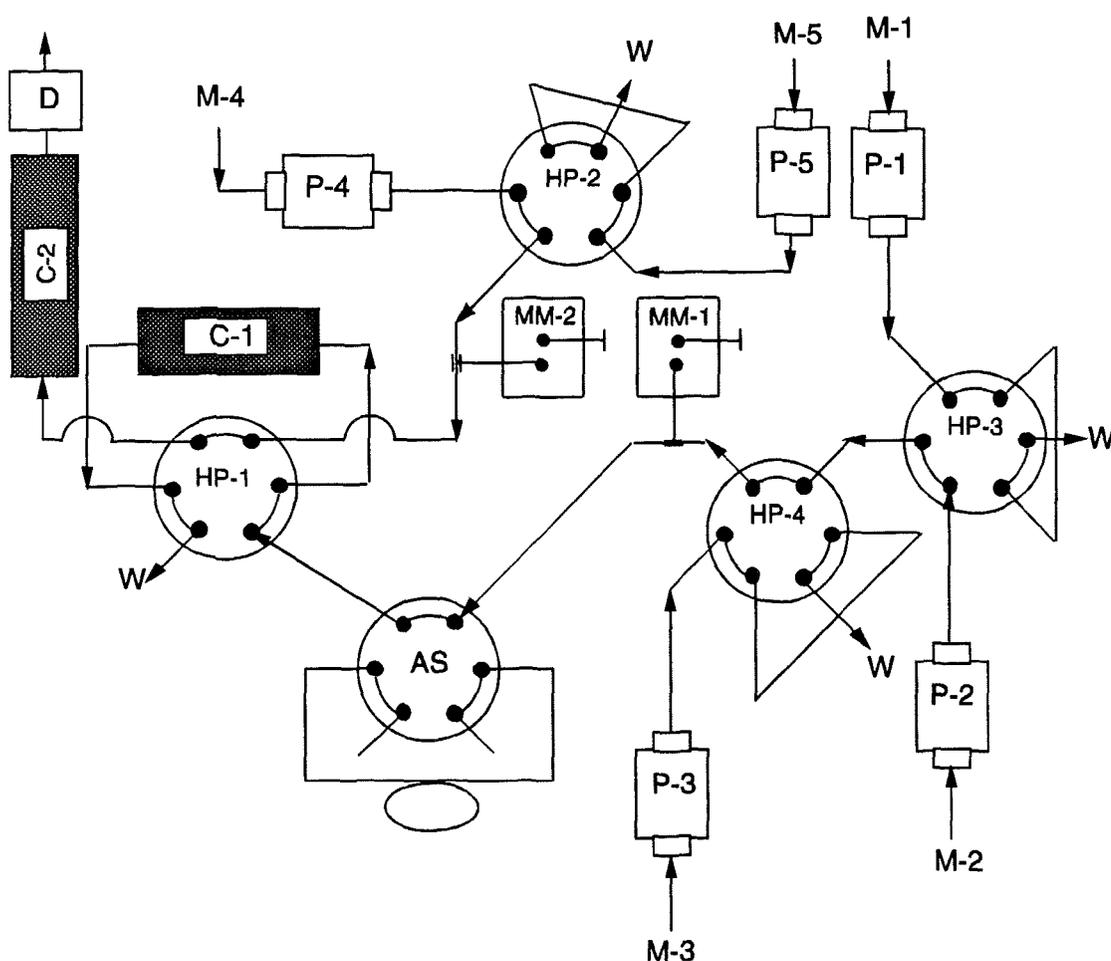


Figura 31. Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos al nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Condiciones: fase móvil MeOH/H₂O (60:40) 0.1% ATF, pH 2.15; columna de fase reversa de $100 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$ rellena con Microsphere C18 de $3 \mu\text{m}$; detección UV 228 nm; T 45°C.

b) Optimización de la técnica de columnas acopladas.

Una vez estudiado el comportamiento de los herbicidas fenoxiácidos sobre una columna de fase reversa de 50×4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de $3 \mu\text{m}$, pasamos a la optimización de la técnica de columnas acopladas para obtener un cromatograma global con una buena resolución.

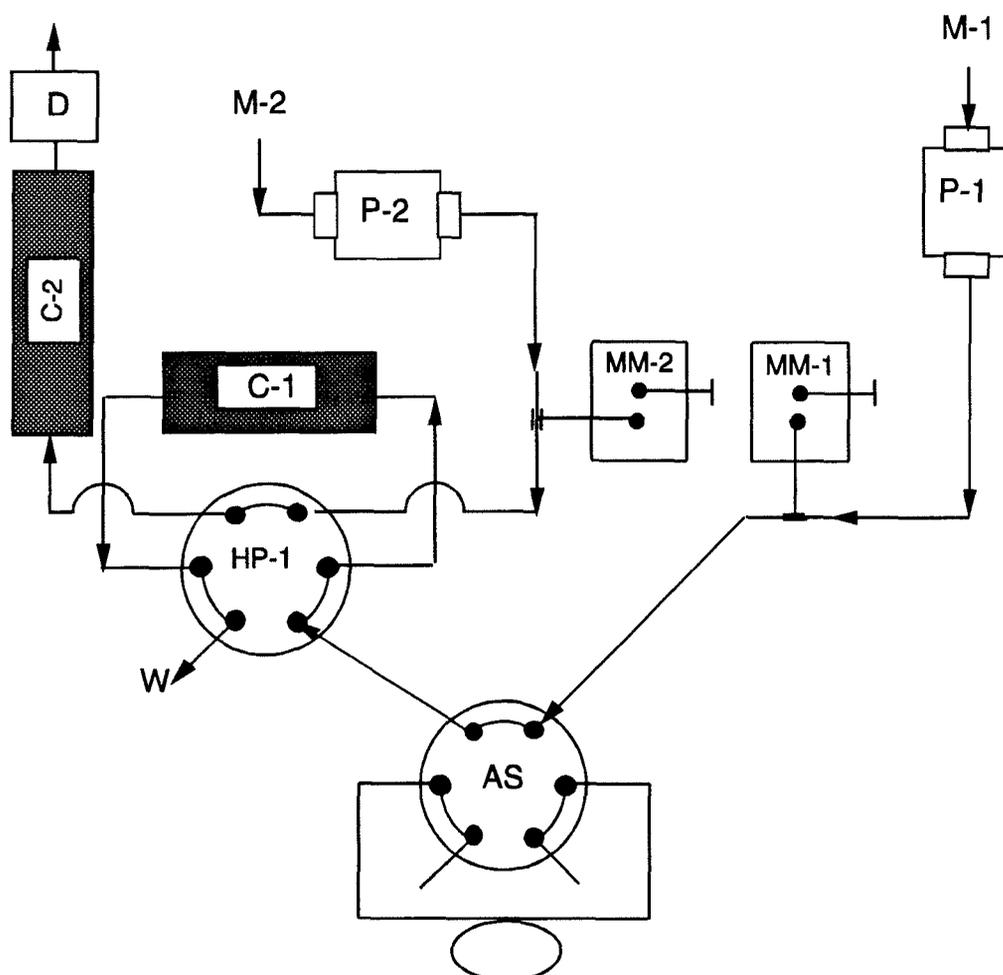
El esquema general del equipo completo utilizado para realizar la técnica de columnas acopladas se representa en la **Figura 33**, en donde se observan los diferentes módulos que lo integran: cinco bombas isocráticas de cromatografía líquida (P), un autoinyector (AS), dos columnas (C), dos módulos manométricos (MM), cuatro válvulas de seis vías (HP) y un detector (D).



W desecho.

Figura 33. Representación esquemática de un diseño experimental de cromatografía líquida con columnas acopladas que permite realizar elución con gradientes escalonados en ambas columnas.

Este equipo permite realizar diferentes gradientes, tanto en la etapa de purificación como en la de transferencia, todos ellos escalonados. Sin embargo, inicialmente, se parte de un sistema mucho más simple que sólo permite realizar elución isocrática (Figura 34).



- MM módulo manométrico.
- HP válvula de alta presión.
- AS válvula de inyección.
- P bomba isocrática CL.
- M fase móvil.
- W desecho.
- D detector UV.

Figura 34. Representación esquemática del equipo básico de cromatografía líquida con columnas acopladas

En este sistema se utiliza inicialmente como C-1 una columna de fase reversa de 50×4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de $3 \mu\text{m}$ y como C-2 otra idéntica de igual longitud.

Conociendo la relación entre el porcentaje de MeOH de la fase móvil y la retención de los herbicidas fenoxiácidos sobre Microspher C18 (**Figura 24**), se propone una composición inicial para M-1 y M-2 que permita llevar a cabo una purificación sobre C-1 y una separación completa final sobre C-2.

Inicialmente, se escogen composiciones de M-1 con contenidos bajos de MeOH (30-50%), que permiten un mayor volumen de purificación entre los posibles interferentes polares y los analitos. Este hecho implica la utilización de una fase móvil M-2 con elevada fuerza eluotrópica que permita transferir los analitos desde C-1 hacia C-2 con el menor volumen posible, y que al mismo tiempo consiga acelerar aquellos analitos que quedaron más retenidos en la primera columna durante la etapa de purificación, pero sin que lleguen finalmente a coeluir. Como fase móvil M-2, se estudiaron composiciones entre 60-65% de MeOH.

En todas las experiencias realizadas se observó que el uso de una columna C-2 de tan sólo 50 mm no fue suficiente para obtener una adecuada resolución para los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-T, en contra de lo que, en principio, cabía esperar dada la buena resolución de una columna de 100 mm (**Figura 31**). De este modo, la suma de las dos columnas de 50 mm no fue equivalente a una sola columna de 100 mm, pues al aplicar la técnica CL-CL se utilizan dos fases móviles distintas con objeto de efectuar la purificación de la muestra, lo que unido a la etapa de transferencia, hace que la resolución sea distinta a la del sistema isocrático ensayado en la columna de 100 mm. En consecuencia, se probó como columna C-2 una de 100 mm de longitud, que unida a la C-1 de 50 mm, permitiera aumentar la resolución para estos tres herbicidas.

Utilizando como fases móviles:

- M-1 = MeOH/H₂O 0.1% ATF (40:60)
- M-2 = MeOH/H₂O 0.1% ATF (65:35)

se obtuvieron los siguientes volúmenes de purificación y transferencia, conectando directamente la columna C-1 (50 × 4.6 mm d.i. rellena con Microsphere C18 de 3 µm) al detector UV, tal como se muestra en la **Figura 35**.

- Volumen de purificación = 3.0 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (40:60)
- Volumen de transferencia = 2.5 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (65:35)

En estas condiciones se efectuó el acoplamiento CL-CL, obteniéndose el cromatograma de la **Figura 36** para la mezcla de los ocho herbicidas fenoxiácidos y dicamba, a 0.5 µg·ml⁻¹.

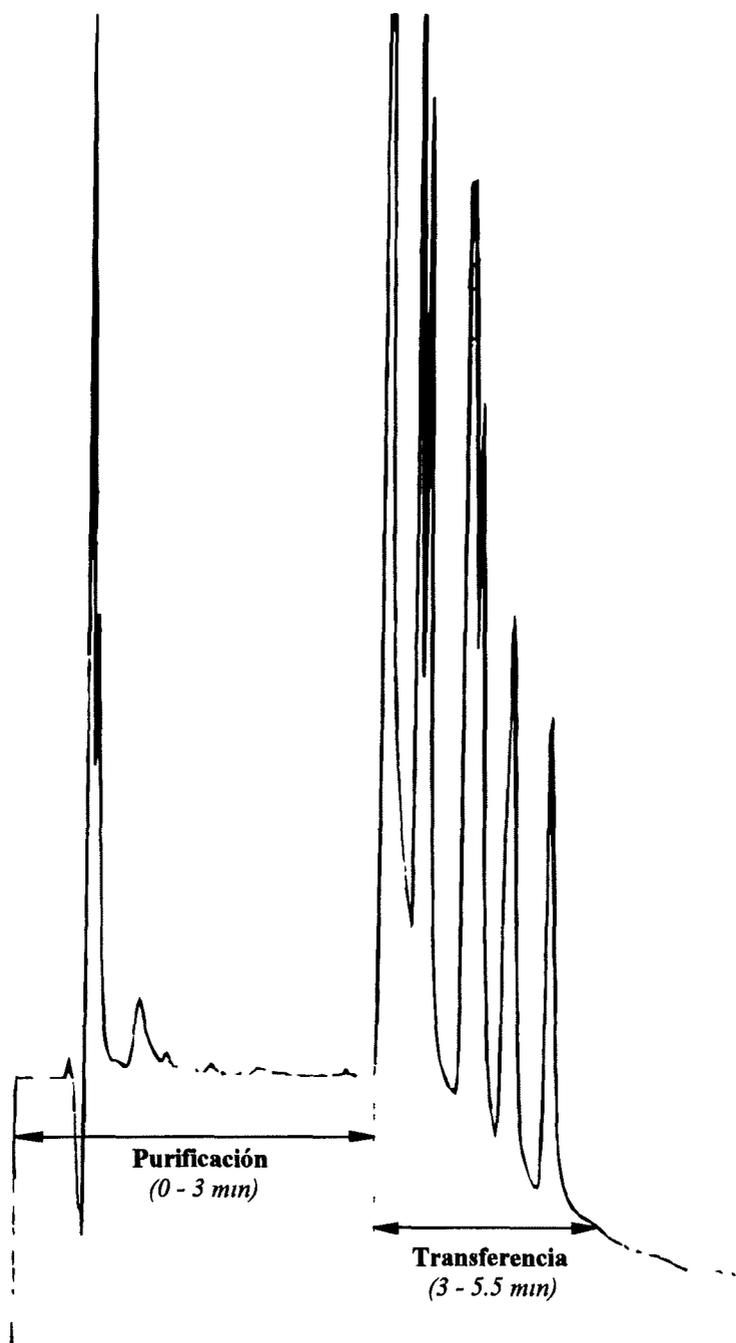


Figura 35. Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido con C-1 conectada directamente al detector.

0-3 min: 40% MeOH (purificación). 3-5.5 min: 65% MeOH (transferencia).

Condiciones: C-1 Microsphere C18, $50\times 4.6\text{mm}$, $3 \mu\text{m}$; volumen inyección, $100 \mu\text{l}$; 0.05 AUFS ; $T 45^\circ\text{C}$, detección UV (228 nm); flujo, $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

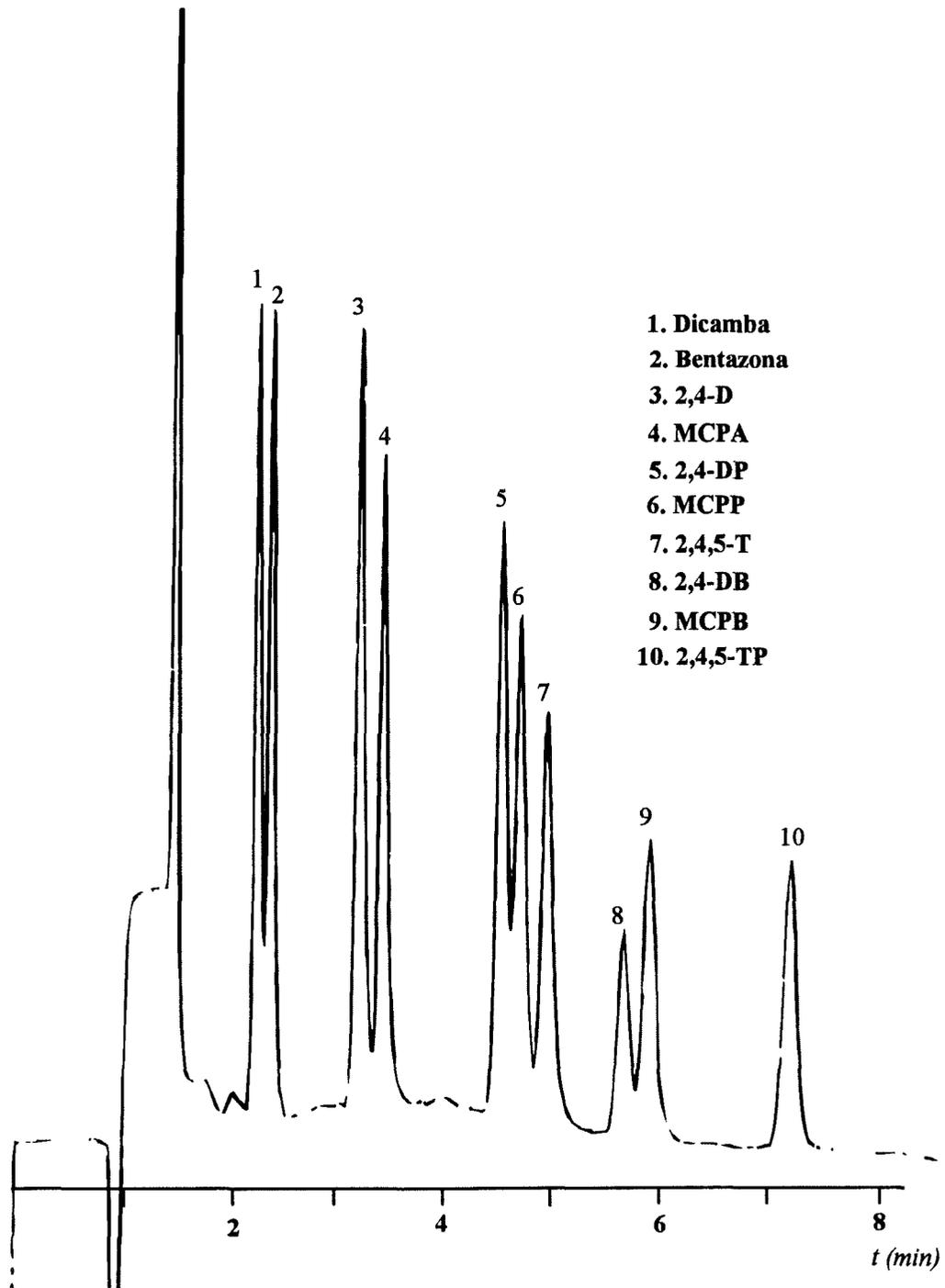


Figura 36. Cromatograma de una disolución patrón de herbicidas fenoxiácidos de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante acoplamiento CL-CL.

Purificación: 3 min: 40% MeOH. *Transferencia:* 2.5 min: 65% MeOH.

Condiciones: C-1, Microsphere C18, $50\times 4.6\text{mm}$, $3 \mu\text{m}$; C-2, Microsphere C18, $100\times 4.6\text{mm}$, $3 \mu\text{m}$; volumen inyección, $100 \mu\text{l}$; 0.05 AUFS; T 45°C , detección UV (228 nm); flujo, $1 \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$.

En consecuencia, se escogen como condiciones óptimas para el acoplamiento CL-CL las indicadas a continuación, que permiten obtener un cromatograma como el de la **Figura 36**:

- C-1 = 50 × 4.6 mm d.i., Microsphere C18 de 3 μm
- C-2 = 100 × 4.6 mm d.i., Microsphere C18 de 3 μm
- M-1 = MeOH/H₂O 0.1% ATF (40:60), Flujo 1 ml·min⁻¹
- M-2 = MeOH/H₂O 0.1% ATF (65:35), Flujo 1 ml·min⁻¹

- Volumen de purificación = 3.0 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (40:60)
- Volumen de transferencia = 2.5 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (65:35)

Por último, se indica el programa del autoinyector (*Gilson 233*) que permite llevar a cabo el control de las diferentes etapas que componen el acoplamiento CL-CL:

Use rack code 30/5	Especificación del código y posición de la bandeja
Dil.0 syr = 500 μL	Volumen de la jeringa del autoinyector
Inj. valve right	Definición de la válvula de inyección
1 INJECT 1	La fase móvil de purificación pasa por el loop
2 INJECT 0/	La fase móvil de transferencia no pasa por la C-1
3 RACK CODE 30/5	Especificación del código y posición de la bandeja
4 A1=0	
5 C=0	Contador de muestras
6 INPUT A0/87/1/1000	Se pide el volumen de muestra a tomar en μl
7 INPUT A3/83/1/60	Se pide el número de muestras a analizar
8 INPUT A8/25	Se pide el tiempo de análisis
9 FOR A=1/4	Se define el movimiento a lo largo de la bandeja
10 FOR B=1/15	
11 C=C+1	Contabilización de las muestras
12 IF C>A3	Comprobación de la última muestra
13 GO TO 44	
14 PRINT C/1	Se muestra en el display la muestra analizada
15 RINSE	Lavado de la aguja
16 DIS. 0/500/7	Indicación de la jeringa de que se dispone
17 TUBE A/B/5	Se conoce la posición del vial
18 HEIGHT	La aguja se sitúa encima del vial

19	ASPIR. 0/20/1	Se toma un poco de aire
20	HEIGHT 0	Introducción de la aguja hasta el fondo del vial
21	ASPIR. 0/A0+20/2	Se toma el volumen indicado más 20 µl
22	TUBE 0/0	Se lleva la aguja a la puerta de inyección
23	DIS. 0/10/1	Introducción de 10 µl para limpiar la conexión del inyector
24	INJECT 0	Se coloca el inyector (AS) en la posición de LOAD
25	DIS. 0/A0/2	Introducción del volumen de muestra deseado
26	WAIT	Contador de tiempo a cero
27	WAIT	Contador de tiempo a cero
28	INJECT 1	Inyección (AS en posición INJECT)
29	AUXIL 5/2	Se envía la señal de START al registrador
30	WAIT 300	Espera durante 3.00 min (PURIFICACION)
31	WAIT	Contador de tiempo a cero
32	INJECT 1/	SWITCH (HP-1 en posición INJECT).
33	AUXIL 7/2	Se envía la señal de START al integrador
34	AUXIL 5/2	Se envía la señal de START al registrador
35	WAIT 250	Espera durante 2.50 min (TRANSFERENCIA)
36	WAIT	Contador de tiempo a cero
37	INJECT 0/	SWITCH (HP-1 en posición LOAD), fin de transferencia.
38	WAIT	Contador de tiempo a cero
39	WAIT A8	Espera durante el tiempo de análisis deseado
40	WAIT	Contador de tiempo a cero
41	NEXT B	Se cierra el bucle de búsqueda de muestra
42	NEXT A	
43	HOME	Aguja en posición STANDBY

II.3.2. Características analíticas.

En este apartado se estudian las características analíticas del método para la determinación de herbicidas fenoxiácidos utilizando la técnica de columnas acopladas, en cuanto a linealidad, precisión y límite de detección.

Curvas de Calibrado.

Se estudia la linealidad del método inyectando 400 μl de diferentes mezclas de los herbicidas fenoxiácidos, entre 0.025 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Al inyectar un volumen de muestra diferente se deben comprobar los valores del volumen de purificación y transferencia, que en este caso sólo variaron ligeramente.

En la Figuras 37, 38 y 39 se representan las curvas de calibrado (altura de pico - concentración) para cada uno de los compuestos, observándose 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. Los datos del análisis de regresión realizado se indican en la Tabla 31.

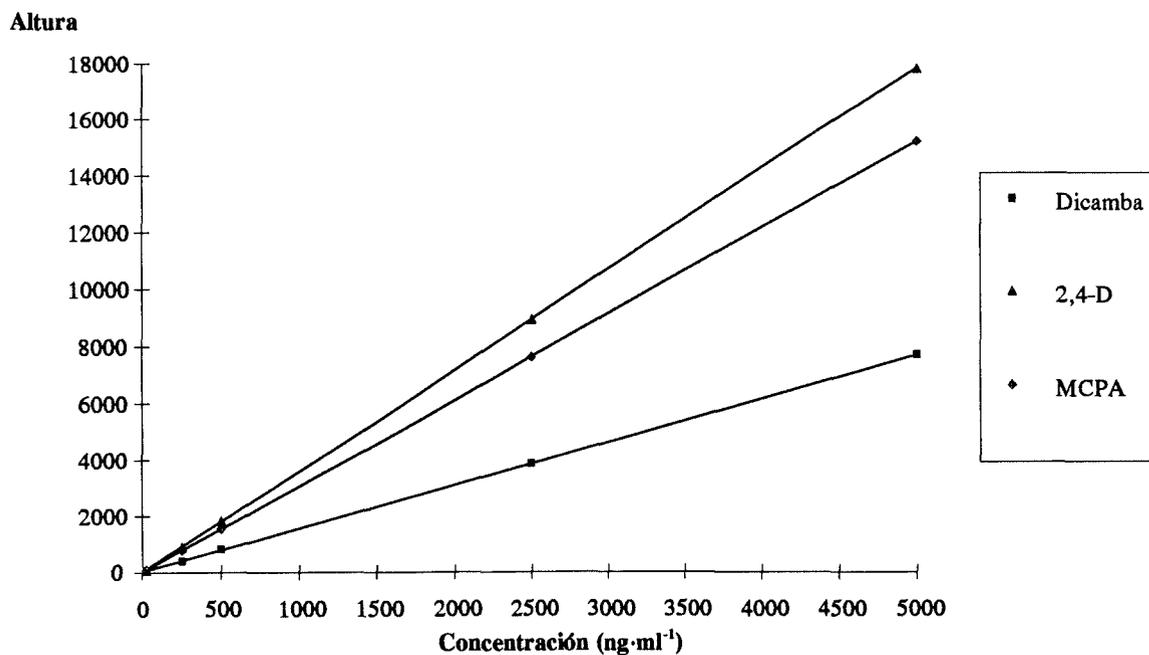


Figura 37. Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para Dicamba, 2,4-D y MCPA mediante acoplamiento CL-CL.

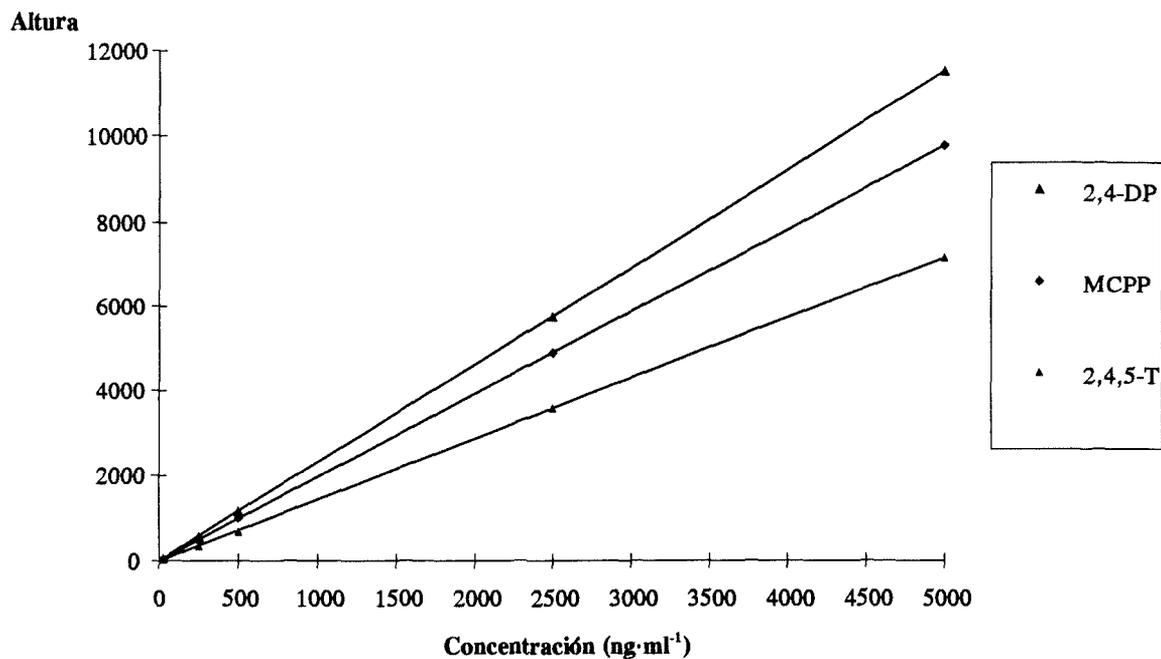


Figura 38. Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-T mediante acoplamiento CL-CL.

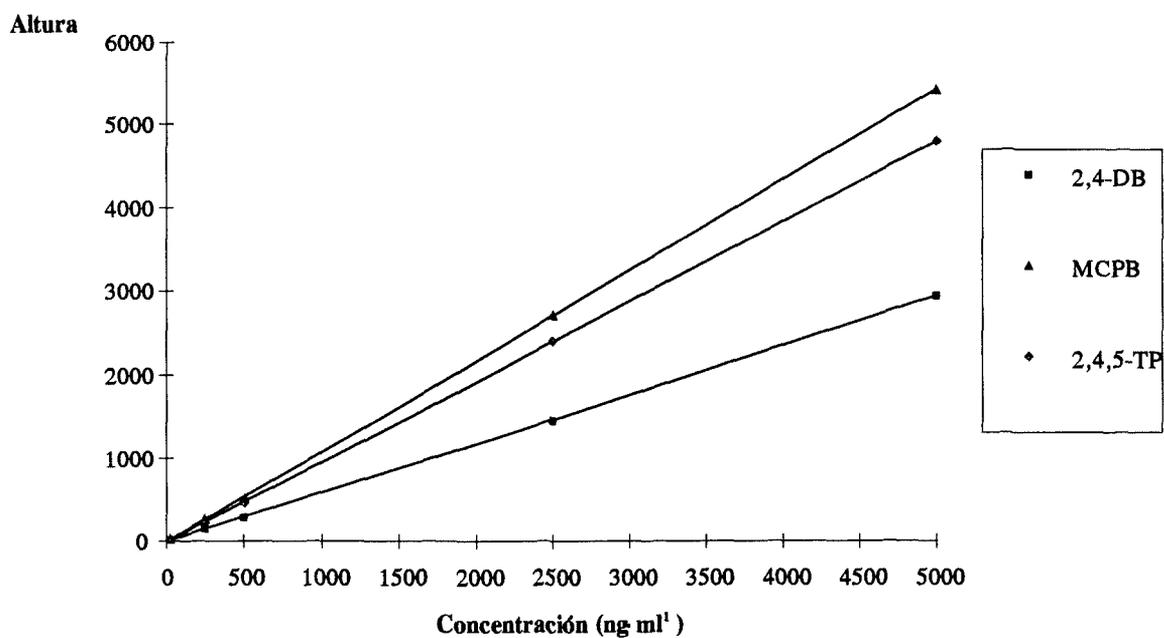


Figura 39. Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante acoplamiento CL-CL.

Tabla 31. Datos estadísticos ($p < 0.01$) para las curvas de calibrado (altura de pico) de los herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante acoplamiento CL-CL.

Herbicida	Ord. Orig.	Error Est. Ord. Orig.	Pendiente	Error Est. Pendiente	Error estándar	R	Nivel de Significación
<i>Dicamba</i>	19.74	13.11	1.53	0.0052	21.47	0.9999	1.15E-05
<i>2,4-D</i>	12.52	18.90	3.56	0.0075	30.96	0.9999	4.44E-06
<i>MCPA</i>	12.67	8.04	3.04	0.0032	13.18	0.9999	1.10E-06
<i>2,4-DP</i>	-5.60	5.91	2.31	0.0023	9.68	0.9999	1.03E-06
<i>MCPP</i>	1.15	5.78	1.96	0.0023	9.47	0.9999	1.38E-06
<i>2,4,5-T</i>	-17.91	11.56	1.44	0.0046	18.93	0.9999	1.02E-05
<i>2,4-DB</i>	-3.60	2.99	0.59	0.0012	4.91	0.9999	4.10E-06
<i>MCPB</i>	-12.99	10.74	1.09	0.0043	17.60	0.9999	1.54E-05
<i>2,4,5-TP</i>	-11.93	6.76	0.96	0.0027	11.07	0.9999	7.81E-06

Precisión

Para estudiar la repetibilidad del sistema cromatográfico utilizando la técnica de columnas acopladas se realizaron cinco inyecciones de 400 μl de una disolución que contenía 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de los diferentes herbicidas fenoxiácidos. En la **Tabla 32** se muestran los resultados para tiempos de retención, áreas y alturas de pico.

La precisión en los tiempos de retención es buena en todos los casos, lo que permite la correcta identificación de los herbicidas fenoxiácidos. En cuanto a la medida de área y altura de picos, la desviación estándar relativa (RSD) es algo mayor para la medida de alturas, aunque en ambos casos se obtienen precisiones lo suficientemente buenas. En principio, podría parecer más adecuado utilizar el área de pico para la cuantificación, pero existe la opinión generalizada de considerar la altura de pico como la magnitud que conduce a una mayor precisión y exactitud cuando se trata de análisis de trazas (Snyder *et al.*, 1988).

Tabla 32. 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 ($n = 7$).

	Tiempo de retención (min)		Área de pico		Altura de pico	
	Media	RSD(%)	Media	RSD(%)	Media	RSD(%)
<i>Dicamba</i>	4.22	1.6	5129	0.8	55.9	2.3
<i>2,4-D</i>	7.84	0.4	5894	1.3	121.2	1.9
<i>MCPA</i>	8.26	0.3	5329	0.3	105.6	2.3
<i>2,4-DP</i>	10.04	0.4	5143	0.7	76.7	2.1
<i>MCPD</i>	10.41	0.4	4811	0.7	65.7	2.5
<i>2,4,5-T</i>	10.63	0.3	3884	0.6	46.8	1.4
<i>2,4-DB</i>	12.24	0.5	1852	0.7	19.3	2.3
<i>MCPB</i>	12.60	0.4	3535	0.9	37.0	1.7
<i>2,4,5-TP</i>	14.45	0.4	3775	1.3	31.6	1.3

Límites de Detección.

Para el cálculo de los límites de detección en la inyección directa de patrones se siguieron los dos criterios, estadístico y empírico, ya indicados en el apartado II.2.2.

En la **Tabla 33** se muestran los valores de límites de detección obtenidos para los herbicidas fenoxiácidos y dicamba utilizando la técnica de columnas acopladas, aplicando los dos criterios anteriores. Se puede observar que los límites de detección empíricos son más bajos que los estadísticos, siendo inferiores a $5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ a excepción del 2,4-DB cuya señal es ligeramente inferior a la de los otros herbicidas.

Tabla 33. Límites de detección para la determinación de los herbicidas fenoxiácidos mediante acoplamiento CL-CL.

	Estadístico ^a		Empírico ^b
	L_D área (ng·ml ⁻¹)	L_D altura (ng·ml ⁻¹)	L_D (ng·ml ⁻¹)
Dicamba	7.4	21	2.1
2,4-D	13	17	1.2
MCPA	2.5	21	1.0
2,4-DP	6.0	20	1.7
MCPB	6.3	23	1.6
2,4,5-T	5.8	13	1.8
2,4-DB	6.9	21	6.4
MCPB	8.3	15	4.3
2,4,5-TP	12	12	3.1

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

^b Calculado a partir del cromatograma del patrón de 0.025 $\mu\text{g ml}^{-1}$

II.3.3. Extracción de los herbicidas fenoxiácidos y aplicación de la técnica de columnas acopladas.

Estudio de la etapa de extracción

• Inicialmente, se opta por estudiar la extracción de los herbicidas fenoxiácidos de muestras de agua utilizando la técnica de extracción en fase sólida, con un volumen de muestra pequeño (50 ml) y un cartucho de 100 mg, con objeto de conseguir un procedimiento rápido. Se escoge la EFS por las ventajas que presenta frente a la extracción líquido-líquido, con un menor consumo de disolventes, menor uso de material de laboratorio y mayor economía.

La optimización del proceso de extracción y purificación se lleva a cabo con una muestra de agua subterránea fortificada al nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. En principio, se estudian tan sólo cuatro herbicidas (*MCPA*, *MCPP*, *2,4-DB* y *2,4,5-TP*), escogidos de modo que abarcan todo el rango de polaridades (desde los más polares como *MCPA* hasta el menor *2,4,5-TP*). La muestra se acidifica con ATF a pH 2.15 (el pH debe ser menor de 2.5 para que los compuestos se encuentren en forma protonada y pueda haber retención en C18), y la elución del sistema de EFS se realiza con 1 ml de metanol. Se escoge este eluyente por ser un disolvente orgánico bastante polar, que cabe esperar será capaz de arrastrar a los herbicidas fenoxiácidos, pero intentando al mismo tiempo minimizar la elución de interferentes menos polares. El extracto se evapora a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo se disuelve en 1 ml de agua al 0.1% ATF. El proceso completo de EFS se describe en el siguiente esquema:

<i>Acondicionamiento:</i>	1 ml de MeOH 2 ml de H ₂ O 0.1% ATF (pH 2.15)
<i>Muestreo:</i>	50 ml de agua fortificada a $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (pH 2.15)
<i>Secado:</i>	10 min pasando aire (a vacío)
<i>Elución:</i>	1 ml de MeOH se evapora a sequedad con N ₂ se reconstituye en 1 ml de H ₂ O 0.1% ATF

En la **Tabla 34** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a recuperaciones para los compuestos estudiados. Los análisis se llevan a cabo por CL-CL.

Tabla 34. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la extracción en fase sólida sobre C18. Condiciones: 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$; 100 mg C18; elución con 1 ml metanol.

Herbicida	MCPA	MCP	2,4-DB	2,4,5-TP
Recuperación (%)	104.0	95.1	95.0	99.2

Las recuperaciones obtenidas son buenas, pero en el cromatograma (**Figura 40**) se observa que los picos aparecen sobre un pico ancho de interferente(s) que distorsiona la línea base, lo cual impediría cuantificar adecuadamente a concentraciones más bajas. Esta interferencia suele aparecer en muestras de aguas cuando se acidifican previamente y se considera, generalmente, debida a ácidos húmicos o fúlvicos (Nilvé *et al.*, 1989; Coquart y Hennion, 1993).

La eliminación de estos interferentes se puede llevar a cabo, bien modificando el sistema de extracción, o bien cambiando la composición de las fases móviles M-1 o M-2 al aplicar la técnica de columnas acopladas. En principio, se considera la posibilidad de realizar modificaciones sobre el sistema de extracción.

- En primer lugar, se realizan algunas experiencias aplicando la extracción líquido-líquido (ELL) a una muestra de agua subterránea fortificada al nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$. Se aplican dos procedimientos de ELL que implican la extracción en medio ácido(1) y la extracción por formación de pares iónicos (2):

1) 50 ml de agua + 1 ml de HCl conc.

Extracción con diclorometano (25 + 10 ml)

Evaporación del extracto en Kuderna -Danish hasta un volumen de 5 ml y a sequedad completa bajo corriente de nitrógeno

Disolución del residuo en 2 ml de H_2O 0.1% ATF

2) 50 ml de agua + 0.5 ml de fosfato de tetrabutilamonio (TBA) + 1 ml de tampón pH 7.5

Extracción con diclorometano (25 + 10 ml)

Evaporación del extracto en Kuderna -Danish hasta un volumen de 5 ml y a sequedad completa bajo corriente de nitrógeno.

Disolución del residuo en 2 ml de H_2O 0.1% ATF

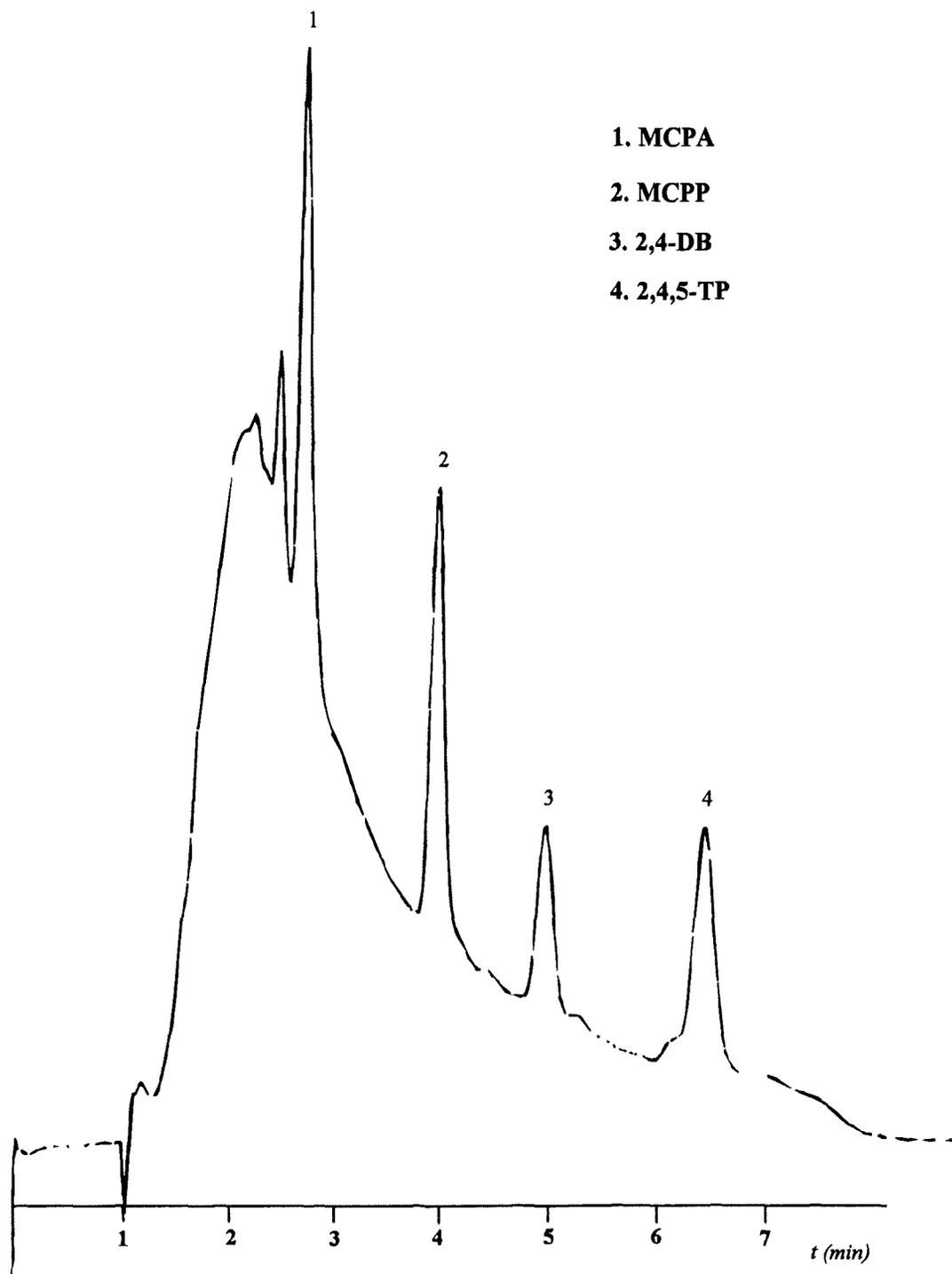


Figura 40. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18.

Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 1 ml metanol; C-1, $50\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; C-2, $100\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; detección UV 228 nm.

Tabla 35. 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). Condiciones: 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; extracción con diclorometano (25+10 ml).

Herbicida	Recuperación (%)	
	ELL (1)	ELL (2)
MCPA	56.5	40.0
MCPP	72.4	51.4
2,4-DB	102	97.7
2,4,5-TP	64.5	70.9

Los resultados obtenidos (**Tabla 35**) muestran que las recuperaciones utilizando ELL son menores en comparación con la EFS, aunque el interferente de fondo parece más reducido, sustituyéndose éste por un mayor número de picos interferentes en el cromatograma. Con objeto de mejorar las recuperaciones, se repite la experiencia a pH ácido, realizando tres extracciones con diclorometano (25, 10 y 10 ml). Los resultados se muestran en la **Tabla 36**. En la **Figura 41**, se muestra el cromatograma obtenido mediante ELL por triplicado.

Tabla 36. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la ELL con diclorometano en medio ácido. Influencia del número de extracciones. Condiciones: 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; extracción con diclorometano: 25+10 ml y 25+10+10 ml.

Herbicida	Recuperación (%)	
	dos extracciones	tres extracciones
MCPA	56.5	73.9
MCPP	72.4	86.7
2,4-DB	102	104
2,4,5-TP	64.5	77.0

Aunque las recuperaciones mejoran al aumentar el número de extracciones, son todavía inferiores a las obtenidas por EFS, por lo que se descarta la utilización de la ELL y se intenta mejorar el procedimiento de EFS con el fin de eliminar o disminuir las sustancias interferentes.

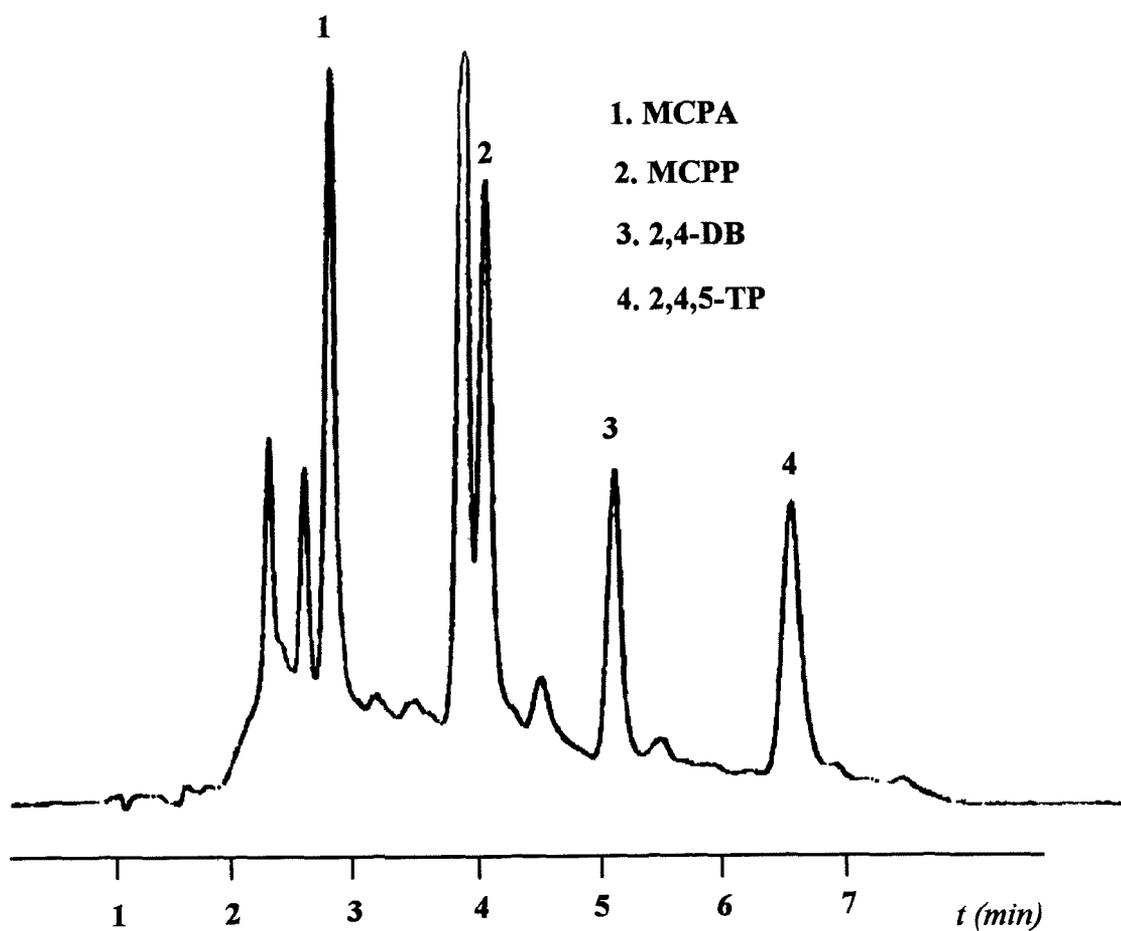


Figura 41. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por ELL.

Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $5 \mu\text{g l}^{-1}$; diclorometano, 25+10+10 ml; C-1, 50×4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100×4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Se intenta modificar el procedimiento de EFS descrito anteriormente actuando sobre la etapa de retención. En este sentido, se estudia el efecto del pH de la muestra sobre los interferentes y, por ende, sobre los analitos. Se realiza la EFS a diferentes pH, desde 2.15 hasta 7.8 (pH inicial de la muestra), ajustándose el pH con disolución de NaOH sobre una muestra previamente acidificada a pH 2.15 con ATF. Los resultados se muestran en la **Tabla 37**

Tabla 37. *Influencia del pH sobre la EFS de herbicidas fenoxiácidos. Condiciones: 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$; 100 mg C18; elución con 1 ml metanol.*

Herbicida	Recuperación (%)							
	2.15	2.8	3.0	3.2	3.6	4.0	5.0	7.8
MCPA	98.1	87.7	91.8	90.4	96.0	78.6	37.4	10.8
MCPP	96.0	89.5	89.5	87.6	96.4	92.8	72.5	29.1
2,4-DB	106.4	104.5	104.5	104.5	104.2	104.2	104.2	70.8
2,4,5-TP	98.7	95.1	95.1	96.8	100.0	96.9	91.2	63.6

Se observa que hasta pH 3.6 se obtienen recuperaciones aceptables para todos los herbicidas estudiados, mientras que a pH superiores empieza a disminuir su recuperación. En cualquier caso, el trabajar a un pH algo mayor no favorece la eliminación de los interferentes, ya que sigue apareciendo un pico ancho al principio del cromatograma incluso a pH 7.8, lo cual concuerda con las características de los ácidos húmicos.

A continuación, dado que no se han obtenido resultados satisfactorios modificando la etapa de retención, se estudian algunas modificaciones en la etapa de elución con objeto de eliminar el interferente.

Se toma una muestra de 50 ml de agua subterránea fortificada al nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ y acidificada a pH 3.5, y se realizan las siguientes eluciones:

- 1) elución con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de H_2O .
- 2) elución con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5.
- 3) elución con 50 μl de MeOH seguidos de 950 μl de tampón pH 7.5.
- 4) elución con 1000 μl de tampón pH 7.5.

En todos los casos, tras la elución, se acidifica con ATF a pH 2.3.

Tabla 38. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos de una muestra de 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y EFS C18. Estudio de la etapa de elución.

Herbicida	Recuperación (%)			
	EFS (1)	EFS (2)	EFS (3)	EFS (4)
MCPA	98.0	92.8	57.1	n.r.
MCPD	104	102	43.4	n.r.
2,4-DB	107	111	27.2	n.r.
2,4,5-TP	96.7	98.7	26.9	n.r.

EFS(1) elución con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de H_2O .

EFS(2) elución con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5.

EFS(3) elución con 50 μl de MeOH seguidos de 950 μl de tampón pH 7.5.

EFS(4) elución con 1000 μl de tampón pH 7.5.

n.r. no recuperado.

Los resultados obtenidos (Tabla 38) demuestran que es necesario el uso de al menos 100 μl de MeOH en el eluyente para poder mantener una recuperación cuantitativa. Sin embargo, esa pequeña cantidad de MeOH es suficiente también para arrastrar los interferentes, por lo que se debe establecer una situación de compromiso minimizando las interferencias y manteniendo buenas recuperaciones. Se realizan diferentes experiencias buscando otras condiciones más suaves de elución, modificando el contenido de metanol en el eluyente. En ninguna de estas experiencias se obtuvieron resultados satisfactorios ya que, aunque, en algún caso, las recuperaciones fueron cuantitativas, no se consiguió eliminar la banda de interferentes. Por ello, se realizaron dos nuevos experimentos con el fin de mejorar la selectividad del procedimiento de extracción:

- 1) Combinación ELL-EFS: se lava la muestra de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ con 25 ml de eter etílico (*eliminación en mayor o menor medida de interferentes*) y, posteriormente, se aplica el procedimiento de EFS eluyendo con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5.
- 2) EFS con formación de pares iónicos: se toman 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ previamente tratada con 1 ml de tetrahexilamonio (THA) 0.05 M y 1 ml de tampón pH 7.5. Posteriormente se aplica el procedimiento de EFS eluyendo con 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5.

Tabla 39. 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. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5.

Herbicida	Recuperación (%)	
	ELL-EFS C18	EFS (pares iónicos)
MCPA	92.8	83.9
MCPP	103	93.4
2,4-DB	98.6	101
2,4,5-TP	104	interf.

En la **Tabla 39** se indican las recuperaciones obtenidas, que son satisfactorias en todos los casos excepto para el 2,4,5-TP cuando se utiliza la EFS con formación de pares iónicos, ya que coeluye con un interferente. En cuanto a la eliminación de interferencias, el lavado con éter etílico no resultó efectivo (**Figura 42**), ya que sigue apareciendo el pico de interferente, lo cual parece indicar su naturaleza ácida. En el caso de la EFS con formación de pares iónicos, además de un tiempo de análisis elevado debido a la baja velocidad de flujo obtenida, tampoco se eliminan los interferentes, sino que, al contrario, aparecen nuevos picos que interfieren en la detección de algunos compuestos (2,4,5-TP).

Los resultados obtenidos en las experiencias realizadas hasta este punto demuestran la imposibilidad de conseguir en un único procedimiento de EFS la recuperación cuantitativa de los compuestos de interés y la eliminación del pico interferente. Por consiguiente, se decide fijar una etapa de extracción en fase sólida que asegure la recuperación cuantitativa de los herbicidas y, posteriormente, aplicar al extracto un procedimiento de purificación que elimine los interferentes. Para la etapa de EFS se escoge un pH de 2.15 y se sustituye el eluyente utilizado hasta ahora (metanol) por acetona, que tiene igual poder eluyente, pero es más fácil de evaporar. La elución con 500 μl de acetona asegura la recuperación cuantitativa de los herbicidas en comparación con los 100 μl de metanol utilizados hasta ahora en la etapa de elución.

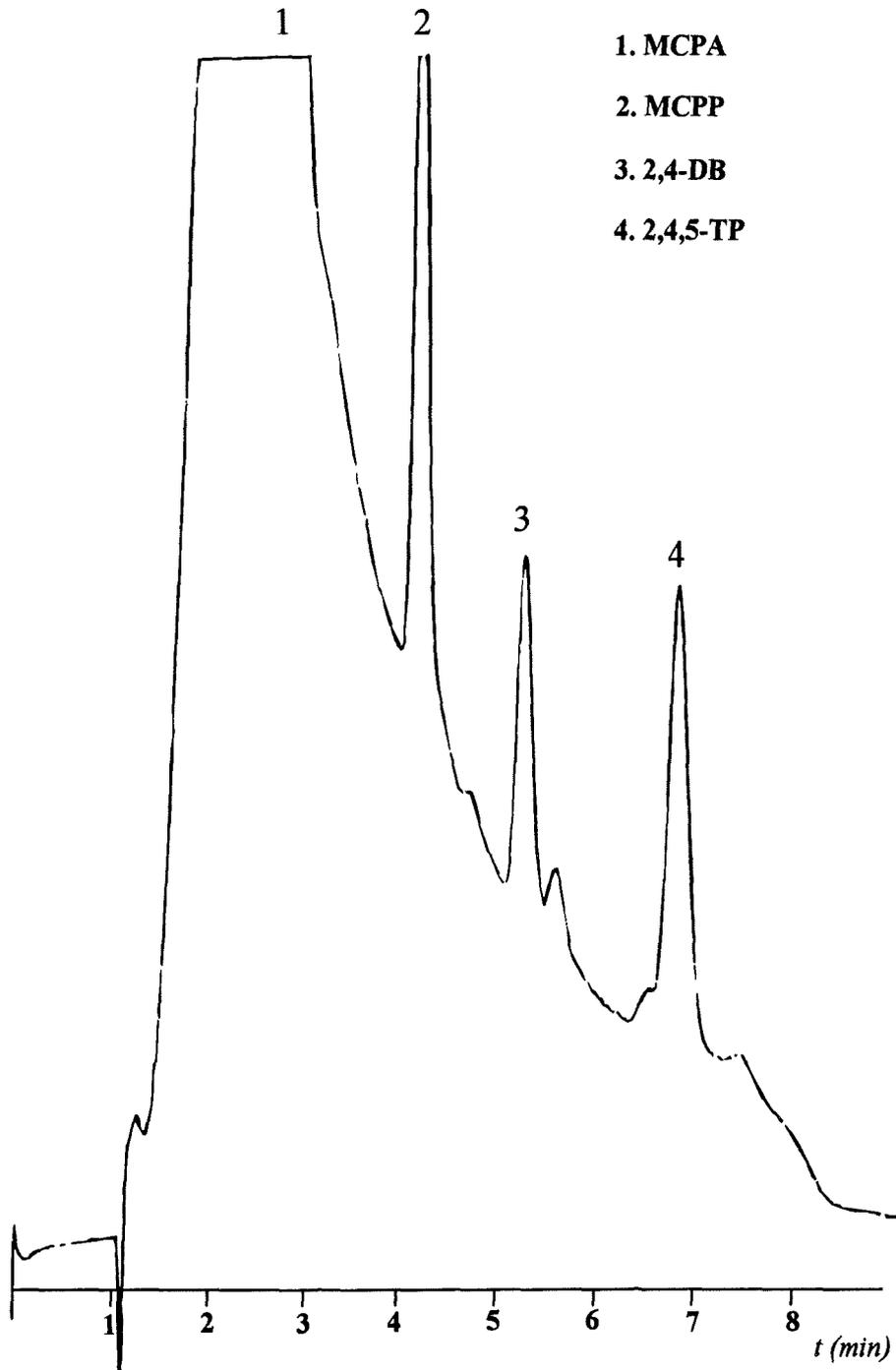


Figura 42. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido mediante lavado con eter etílico y posterior EFS C18.

Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $5 \mu\text{g l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 100 μl de MeOH seguidos de 900 μl de tampón pH 7.5; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Antes de pasar al estudio de la purificación, se indica el procedimiento finalmente escogido para la extracción en fase sólida sobre cartucho C18:

<i>Acondicionamiento:</i>	1 ml de MeOH 1 ml de acetona 1 ml de MeOH 2 ml de H ₂ O 0.1% ATF (pH 2.15)
<i>Muestreo:</i>	50 ml de agua fortificada a 5 µg·l ⁻¹ (pH 2.15).
<i>Secado:</i>	10 min pasando aire (a vacío).
<i>Elución:</i>	500 µl de acetona se evapora a sequedad con N ₂ se reconstituye en 1 ml de H ₂ O 0.1% ATF.

En la **Tabla 40** se muestran los resultados obtenidos en cuanto a recuperaciones para los compuestos estudiados. Los análisis se llevan a cabo por CL-CL.

Tabla 40. *Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua después de la extracción en fase sólida sobre C18. Condiciones: 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de 5 µg·l⁻¹; 100 mg C18; elución con 500 µl de acetona.*

Herbicida	MCPA	MCPP	2,4-DB	2,4,5-TP
Recuperación (%)	98.1	96.0	106	98.7

Estudio de la etapa de purificación.

Para la purificación de los extractos se estudia la aplicación de la cromatografía preparativa en columna, utilizando fases estacionarias de distinta polaridad con objeto de buscar una mayor selectividad para los herbicidas estudiados. Se han escogido como fases estacionarias silicagel y fase amino enlazada (aminopropilsilica).

En primer lugar, se estudió la purificación sobre silicagel de un extracto obtenido utilizando EFS en C18. El procedimiento completo es el siguiente: el cartucho de 100 mg de C18 se acondicionó con 1 ml de MeOH, 1 ml de acetona, 1 ml de MeOH y 2 ml de H₂O 0.1% TFA. A continuación, se pasaron 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de 0.5 y 5 µg·l⁻¹, así como un blanco de agua sin fortificar. La desorción se realizó con 500 µl de acetona, que se cargaron directamente sobre un cartucho relleno con 100 mg de silicagel, previamente acondicionado con 1 ml de acetona/metanol (50:50) y 1 ml de acetona. Posteriormente se lavó la columna con 500 µl de acetona y se eluyeron los analitos con 1 ml de acetona/metanol (75:25). El extracto se llevó a sequedad y se disolvió en 100 µl de MeOH + 900 µl de H₂O 0.1% ATF para su análisis por CL-CL

Tabla 41. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a 0.5 y 5 µg·l⁻¹; 100 mg C18; elución 500 µl de acetona; C-1, 50×4.6mm, Microsphere C18, 3 µm; C-2, 100×4.6mm, Microsphere C18, 3 µm; detección UV 228 nm; T 45°C.

Herbicida	Recuperación (%)	
	Agua subterránea (5 µg·l ⁻¹)	Agua subterránea (0.5 µg·l ⁻¹)
MCPA	87.9	88.1
MCPP	88.0	90.0
2,4-DB	73.3	68.2
2,4,5-TP	92.8	100

Los resultados obtenidos (Tabla 41) no son del todo satisfactorios, pero se obtiene una mejor selectividad respecto del interferente (Figura 43), que aunque no desaparece del todo, si que queda algo disminuido permitiendo el análisis a más bajas concentraciones.

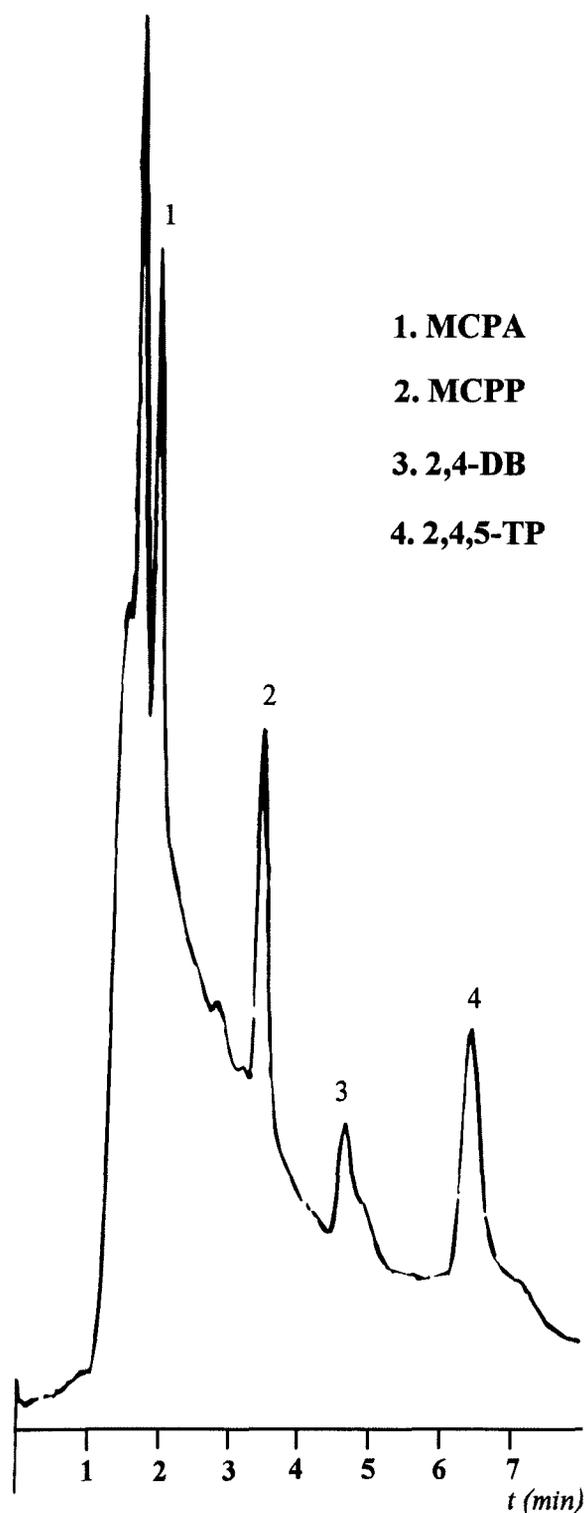


Figura 43. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel.

Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Parece necesario, por tanto, aumentar la selectividad de la etapa de purificación sobre silicagel. Para ello se estudia el efecto del disolvente en que se encuentra el extracto previamente a su paso sobre los cartuchos de silicagel. El extracto acetónico obtenido tras la EFS sobre C18 se lleva a sequedad bajo corriente de nitrógeno y el residuo se disuelve en 500 μl de diclorometano. A continuación, se lleva a cabo la purificación sobre el cartucho de silicagel, que se acondiciona previamente con 1 ml de MeOH/diclorometano (75:25) seguido de 1 ml de diclorometano. Después de cargar el cartucho con el extracto de la muestra, se efectúa un lavado con 500 μl de diclorometano. Finalmente, se eluye con 1 ml de MeOH/diclorometano (50:50). Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 42**.

Tabla 42. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, $50\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, $100\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Herbicida	Recuperación (%)
2,4-D	87.0
MCPA	86.8
2,4-DP	89.6
MCPP	89.2
2,4-DB	80.9
MCPB	93.8
2,4,5-TP	92.6

Las recuperaciones son buenas para todos los compuestos, pero la principal mejora en el método se produce en la eliminación del interferente, que aunque no es completa, sí es bastante eficaz (**Figura 44**). Esta mejora tiene lugar debido al cambio de selectividad que se produce al combinar un relleno completamente apolar (EFS en C18) y uno polar (purificación en silicagel), de manera que se extraen sólo aquellos compuestos que se encuentran dentro de una determinada zona de polaridad. Sin embargo, esta zona no es lo suficientemente estrecha, ya que todavía aparecen interferentes, incluso utilizando la técnica de columnas acopladas. Los interferentes que logran atravesar el sistema C18-silicagel no eluyen sobre una columna C18 de

forma muy distinta a los herbicidas fenoxiácidos, por lo que a pesar de la purificación en línea en el sistema de cromatografía líquida con columnas acopladas, la eliminación de interferentes no resulta completamente efectiva.

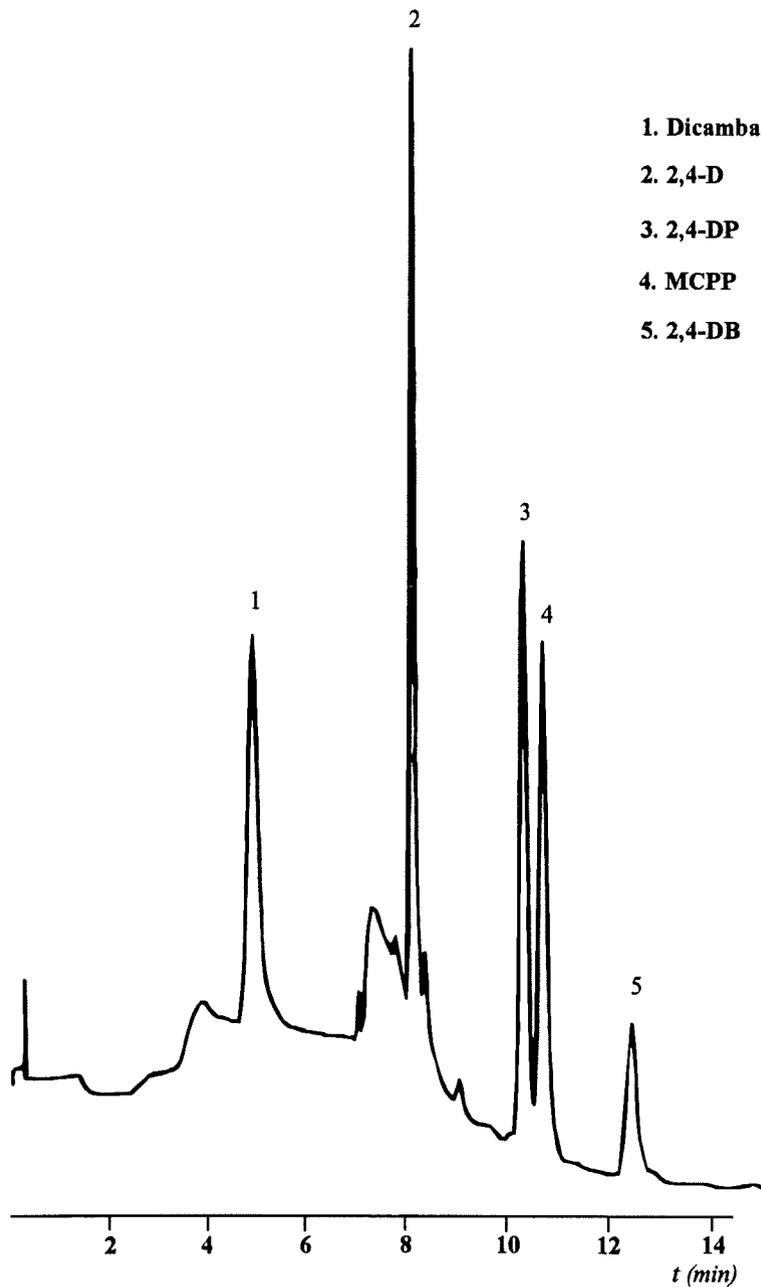


Figura 44. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano.

Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

El segundo sistema de purificación adicional a la EFS sobre C18 estudiado se basa en el uso de cartuchos con fase estacionaria aminopropilsilano.

Inicialmente, se estudió el comportamiento de patrones de herbicidas fenoxiácidos en el cartucho de 100 mg de fase amino, comprobándose la necesidad de acondicionar el mismo con disolución de HCl 0.01M para conseguir la activación del relleno. Se ensayaron también diferentes eluyentes (metanol, diclorometano, NaOH/metanol, ácido acético/metanol), obteniéndose resultados satisfactorios tan sólo con el eluyente ácido acético/metanol.

Con objeto de establecer la concentración óptima de ácido acético en el eluyente, se realizaron diferentes experiencias de elución, cargando con 1 ml de disolución acuosa patrón de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ el cartucho amino, previamente acondicionado con 1 ml de metanol y 2 ml de HCl 0.01M:

Tabla 43. Recuperaciones de patrones de herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante EFS NH_2 . Influencia de la concentración de HAc en el eluyente. Condiciones: 1 ml de disolución acuosa patrón 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$; cartucho 100 mg NH_2 .

Herbicida	Recuperación (%)			
	1	2	3	4
2,4-D	58.6	62.5	75.9	65.4
MCPA	88.1	91.1	92.1	83.2
2,4-DP	76.6	95.8	74.3	65.9
MCPD	91.8	103.5	95.3	91.8
2,4-DB	121.2	121.2	106.1	97.0
MCPB	111.1	111.1	104.4	100.0
2,4,5-TP	65.0	97.5	97.5	87.5

1 elución con 2 ml de HAc 2M.

2 elución con 2 ml de HAc 2M/MeOH (50:50).

3 elución con 2 ml de HAc 3M/MeOH (50:50).

4 elución con 2 ml de HAc 4M/MeOH (50:50).

De los resultados obtenidos (Tabla 43) se deduce que la concentración de ácido acético 3 M parece la más adecuada para llevar a cabo la elución.

Se ha estudiado la influencia del contenido de metanol en el eluyente HAc 3M/MeOH sobre la elución de los herbicidas fenoxiácidos, así como la posibilidad de utilizar acetonitrilo en lugar de metanol.

Tabla 44. Recuperaciones de patrones de herbicidas fenoxiácidos obtenidas mediante EFS NH_2 . Influencia del contenido de metanol en el eluyente. Condiciones: 1 ml de disolución acuosa patrón $5 \mu\text{g ml}^{-1}$; cartucho 100 mg NH_2 ; concentración de HAc, 3M.

Herbicida	Recuperación (%)			
	1	2	3	4
2,4-D	72.3	81.7	86.4	40.4
MCPA	91.7	93.6	98.6	82.9
2,4-DP	84.7	96.4	97.7	42.4
MCPP	91.3	99.4	101	93.6
2,4-DB	104	100.	100	83.3
MCPB	101	103.	103	79.6
2,4,5-TP	97.6	98.8	97.5	79.2

1 elución con 2 ml de HAc 3M/MeOH (50:50).

2 elución con 2 ml de HAc 3M/MeOH (60:40).

3 elución con 2 ml de HAc 3M/MeOH (80:20).

4 elución con 2 ml de HAc 3M/ CH_3CN (50:50).

De los resultados obtenidos (Tabla 44) se concluye que el contenido de metanol en el eluyente no afecta de modo importante a la elución de los analitos, aunque parece deducirse que la disminución en el porcentaje de metanol favorece ligeramente la recuperación, por lo que se escoge la elución con HAc 3M/MeOH (80:20). En cuanto al uso de CH_3CN en lugar de MeOH, se obtienen, en general, peores recuperaciones para todos los compuestos.

Una vez establecido el comportamiento de patrones de herbicidas fenoxiácidos en un cartucho tipo amino, se estudia el efecto de la purificación sobre este tipo de cartuchos de un extracto de agua subterránea obtenido por EFS C18. Se han realizado experiencias comparando los procedimientos de EFS en C18 sin purificación adicional y aplicando una etapa de purificación por cromatografía preparativa en cartucho tanto con silicagel como con fase amino.

El procedimiento utilizado fue el siguiente: se toman 50 ml de agua subterránea fortificada a nivel de $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y se acidifican con ATF (pH 2.15), realizándose la EFS con C18 según el procedimiento establecido previamente. Los extractos acetónicos obtenidos se evaporan en Kuderna-Danish y se llevan a sequedad bajo corriente de nitrógeno. Los residuos se tratan del siguiente modo:

- redisolución directamente en $100 \mu\text{l}$ de MeOH + $900 \mu\text{l}$ de H_2O 0.1% ATF.
- redisolución en $500 \mu\text{l}$ de diclorometano y posterior purificación sobre silicagel; se eluye con 1 ml de MeOH/diclorometano (50:50); se evapora a sequedad y se disuelve finalmente en $100 \mu\text{l}$ de MeOH + $900 \mu\text{l}$ de H_2O 0.1% ATF.
- redisolución en 1 ml de H_2O y posterior purificación sobre cartucho amino; el cartucho se eluye con 2 ml de HAc 3M/MeOH (80:20).

En la **Tabla 45** se indican las recuperaciones obtenidas en cada caso para los compuestos estudiados. Se pueden considerar aceptables, aunque algo inferiores (en especial para dicamba), cuando se utilizan cartuchos amino.

Tabla 45. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua subterránea obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel o aminopropilsilano. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución $500 \mu\text{l}$ de acetona; C-1, $50\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; C-2, $100\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; detección UV 228 nm; T 45°C .

Herbicida	Recuperación (%)		
	EFS C18	EFS C18 + Silica	EFS C18 + Amino
Dicamba	94.5	94.5	7.9
2,4-D	99.4	99.4	85.6
MCPA	98.6	98.6	91.7
2,4-DP	97.7	99.1	87.7
MCPP	101	104	91.5
MCPB	125	125	108
2,4,5-TP	94.9	94.9	89.3

Antes de dar por finalizado este apartado, se ha estudiado la posibilidad de utilizar directamente la fase amino para la extracción de la muestra de agua a analizar, sustituyendo a la EFS en C18. Se realizaron experiencias a varios pH, no obteniéndose resultados satisfactorios al no producirse la retención de los herbicidas fenoxiácidos sobre la fase amino por presentar volúmenes de ruptura muy pequeños (las experiencias se realizaron con 50 ml de agua fortificada al nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

Finalmente, se escoge como mejor opción el procedimiento que consta de extracción en fase sólida sobre C18 y posterior purificación sobre silicagel. El procedimiento completo se indica en el siguiente apartado.

Aplicación del procedimiento de extracción en fase sólida-purificación a distintos tipos de aguas

Se ha aplicado el procedimiento de extracción en fase sólida sobre C18 y posterior purificación sobre silicagel a muestras de agua subterránea usada para abastecimiento urbano fortificadas a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. En la **Figura 45** se muestra un esquema general del procedimiento utilizado. La determinación de los herbicidas estudiados se realiza aplicando la técnica de columnas acopladas descrita anteriormente con una primera columna de 50 mm y una segunda columna de 100 mm. Los análisis se realizan por quintuplicado y efectuando la fortificación en experiencias separadas con dos mezclas diferentes de herbicidas: una de ellas conteniendo dicamba, 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB y otra conteniendo bentazona, MCPA, 2,4,5-T, MCPB y 2,4,5-TP.

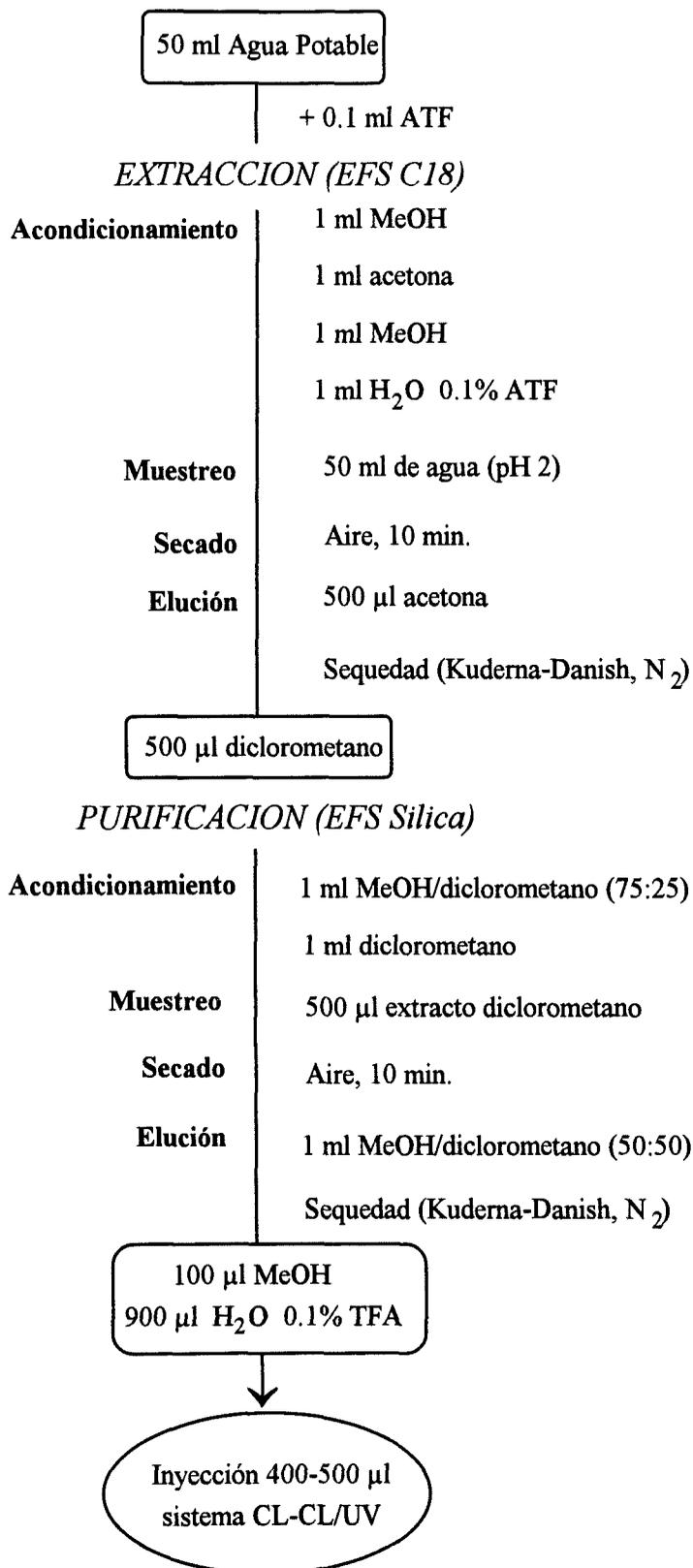


Figura 45. Esquema general del procedimiento de análisis de herbicidas fenoxiácidos en aguas mediante acoplamiento CL-CL. Condiciones: C-1, 50×4.6mm, Microsphere C18, 3 µm; C-2, 100×4.6mm, Microsphere C18, 3 µm; detección UV 228 nm; T 45°C.

Las recuperaciones obtenidas (Tabla 46) son buenas para todos los herbicidas fenoxiácidos estudiados, así como para dicamba, y los coeficientes de variación inferiores en todos los casos al 5%. La Figura 46 muestra dos cromatogramas correspondientes a una muestra de agua potable fortificada al nivel de 0.5 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Se observa a estas concentraciones bajas un cambio brusco de línea base cuando se produce la transferencia desde la columna C-1 a la C-2. Además, el aumento de fuerza eluotrópica comprime el pico de interferente que no ha sido totalmente eliminado tras la purificación con silicagel.

Tabla 46. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua potable obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a 5 y 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Herbicida	5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	
	Recuperación (%)	C.V. (%)	Recuperación (%)	C.V. (%)
Dicamba	83	2.5	82	4.7
2,4-D	93	2.3	91	2.9
MCPA	90	2.9	93	1.5
2,4-DP	95	2.8	92	3.4
MCPP	96	2.4	90	3.4
2,4,5-T	93	3.9	92	2.9
2,4-DB	96	2.3	93	4.4
MCPB	93	2.1	100	1.9
2,4,5-TP	96	2.5	103	4.6

C.V. Coeficiente de Variación, $n = 5$.

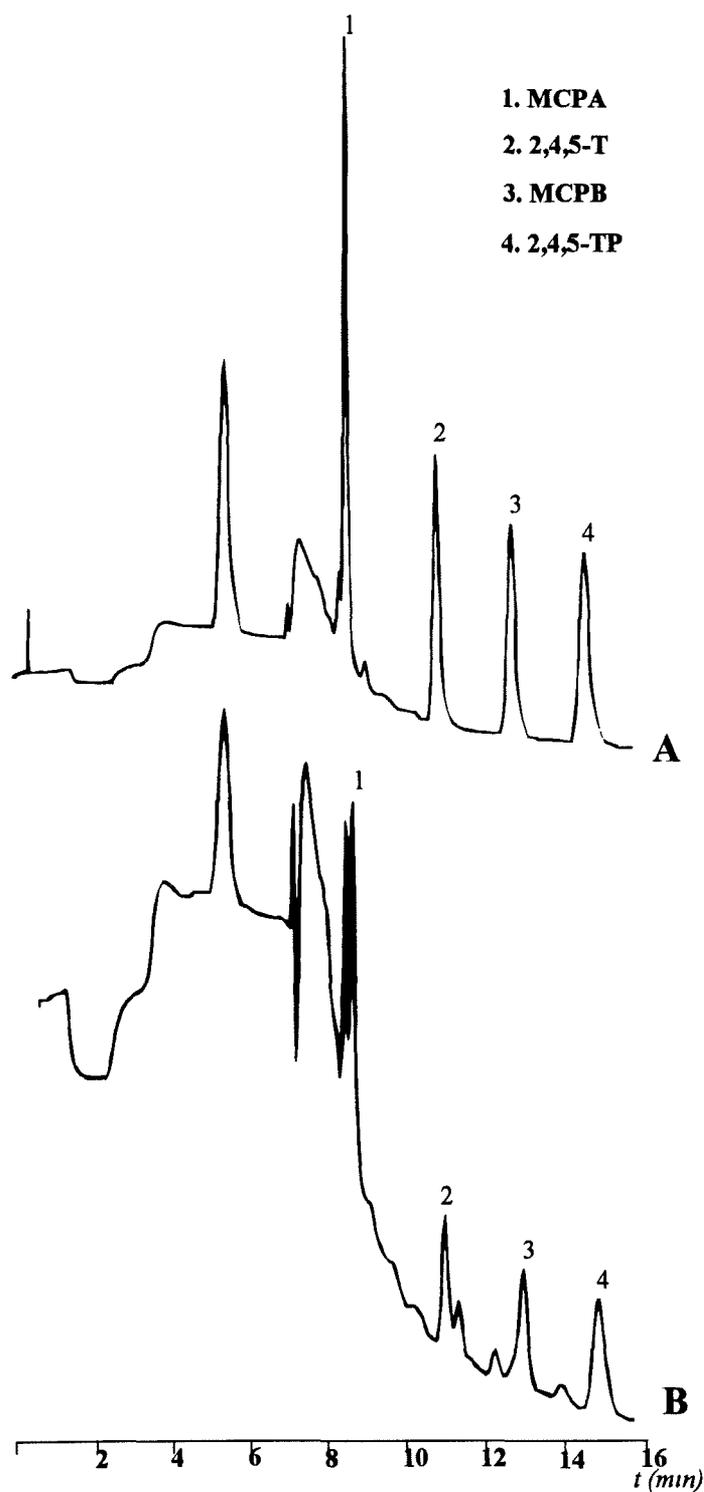


Figura 46. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua potable fortificada a nivel de (A) 5 y (B) $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, $50 \times 4.6 \text{ mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; C-2, $100 \times 4.6 \text{ mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; detección UV 228 nm; T 45°C .

A continuación, se aplica el procedimiento hasta ahora desarrollado a muestras de aguas subterráneas (fortificadas a 0.5 y 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y superficial (fortificada a 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

En la **Tabla 47** se indican las recuperaciones obtenidas. En cuanto al agua subterránea, las recuperaciones son buenas al nivel de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y algo inferiores al nivel de fortificación de 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Además, el cromatograma (**Figura 47**) muestra una gran distorsión de la línea base cuando se realiza la transferencia. Cabe señalar que en la muestra fortificada a 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se obtiene una recuperación mayor al 200% para el MCPA, lo que indica que esta muestra podría contener MCPA en niveles próximos a 0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$.

Tabla 47. Recuperaciones de herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua subterránea y superficial obtenidas mediante EFS C18 y posterior purificación del extracto sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra fortificada a 5 y 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Herbicida	Agua subterránea				Agua superficial	
	5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$		5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	
	Recuper. (%)	C.V. (%)	Recuper. (%)	C.V. (%)	Recuper. (%)	C.V. (%)
Dicamba	93	11	75	4.9	78	1.7
2,4-D	98	4.8	93	4.0	84	1.1
MCPA	100	3.8	233	7.8	88	1.5
2,4-DP	99	8.6	82	13	86	1.5
MCPP	98	9.0	75	18	85	1.0
2,4,5-T	87	4.0	60	3.9	86	1.8
2,4-DB	102	8.7	79	13	92	3.1
MCPB	98	3.3	100	6.1	88	1.4
2,4,5-TP	92	5.4	89	7.4	87	1.2

C.V. Coeficiente de Variación, $n = 5$.

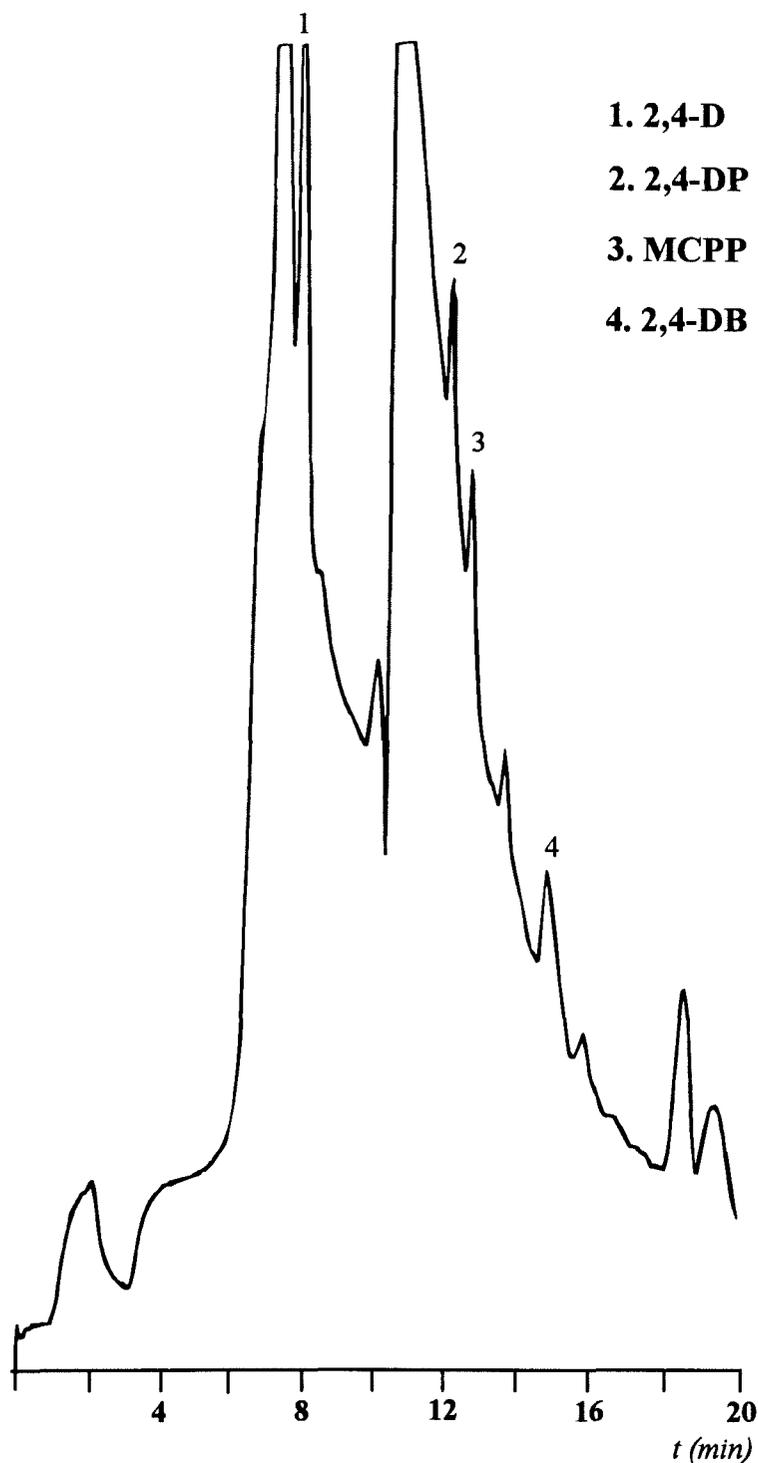


Figura 47. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea fortificada a nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

Por lo que respecta al agua superficial, las recuperaciones obtenidas pueden considerarse aceptables, aunque son algo bajas. Por otro lado, en el cromatograma se observa un gran pico de interferente que genera el agua superficial, imposibilitando el análisis a nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Figura 48).

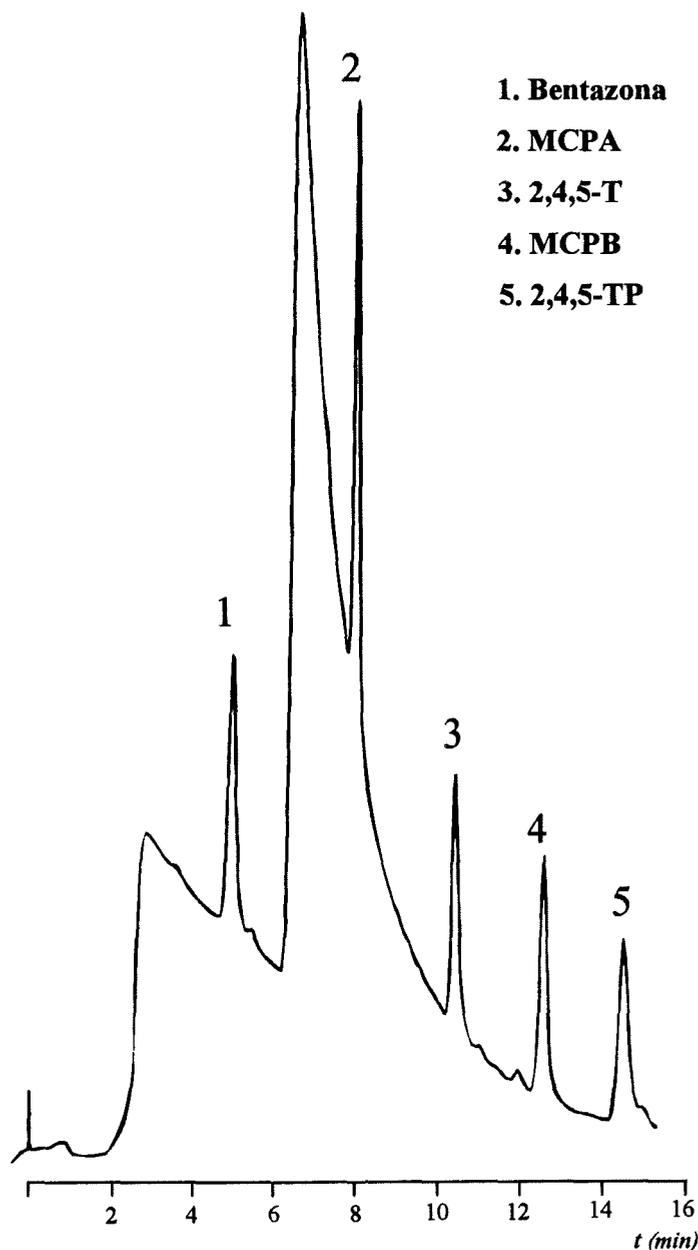


Figura 48. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

De los resultados obtenidos, se deduce que el procedimiento hasta ahora desarrollado, aunque proporciona resultados satisfactorios, presenta algunas deficiencias en el análisis de aguas subterráneas y superficiales a muy bajos niveles de concentración, ya que el interferente no eliminado en las etapas de extracción y purificación enmascara la determinación de 2,4-D y MCPA, principalmente. La purificación adicional que proporciona la utilización de las técnicas de columnas acopladas se muestra también insuficiente.

Por lo tanto, es necesario optimizar aún más el procedimiento para que se pueda aplicar a este tipo de muestras a concentraciones del orden de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Las posibilidades son dos:

- a) introducir alguna modificación en las etapas de extracción y purificación.
 - b) modificar el sistema de columnas acopladas para obtener una mejor purificación adicional.
- a) Se realizaron experiencias efectuando diferentes modificaciones en las etapas de extracción y purificación:
- Lavado del cartucho C18 de extracción con una mezcla MeOH/H₂O 0.1% ATF antes de la elución con acetona. Se ensayaron diferentes contenidos de metanol en la disolución de lavado produciéndose en todos los casos pérdidas de los analitos, mayores cuanto mayor era el contenido de metanol, por lo que se desechó la introducción de dicha etapa de lavado.
 - Disminución del contenido de metanol en el eluyente utilizado en la etapa de purificación sobre silicagel (MeOH/diclorometano, 50:50) con objeto de evitar la elución de los interferentes. Los resultados mostraron que era necesario un contenido mínimo del 50% de metanol para conseguir la elución de los analitos, por lo que no se consiguió ninguna mejora en el método.
 - Redisolución del extracto acetónico obtenido después de la EFS con C18 en una mezcla diclorometano/isooctano, de modo que el contenido de diclorometano sea el mínimo para disolver los analitos. Los resultados indican que es necesario, como mínimo, un 20% de diclorometano para la elución de los analitos. En estas condiciones no se elimina totalmente el interferente, pero sí que consigue reducir su presencia (**Figura 49**).

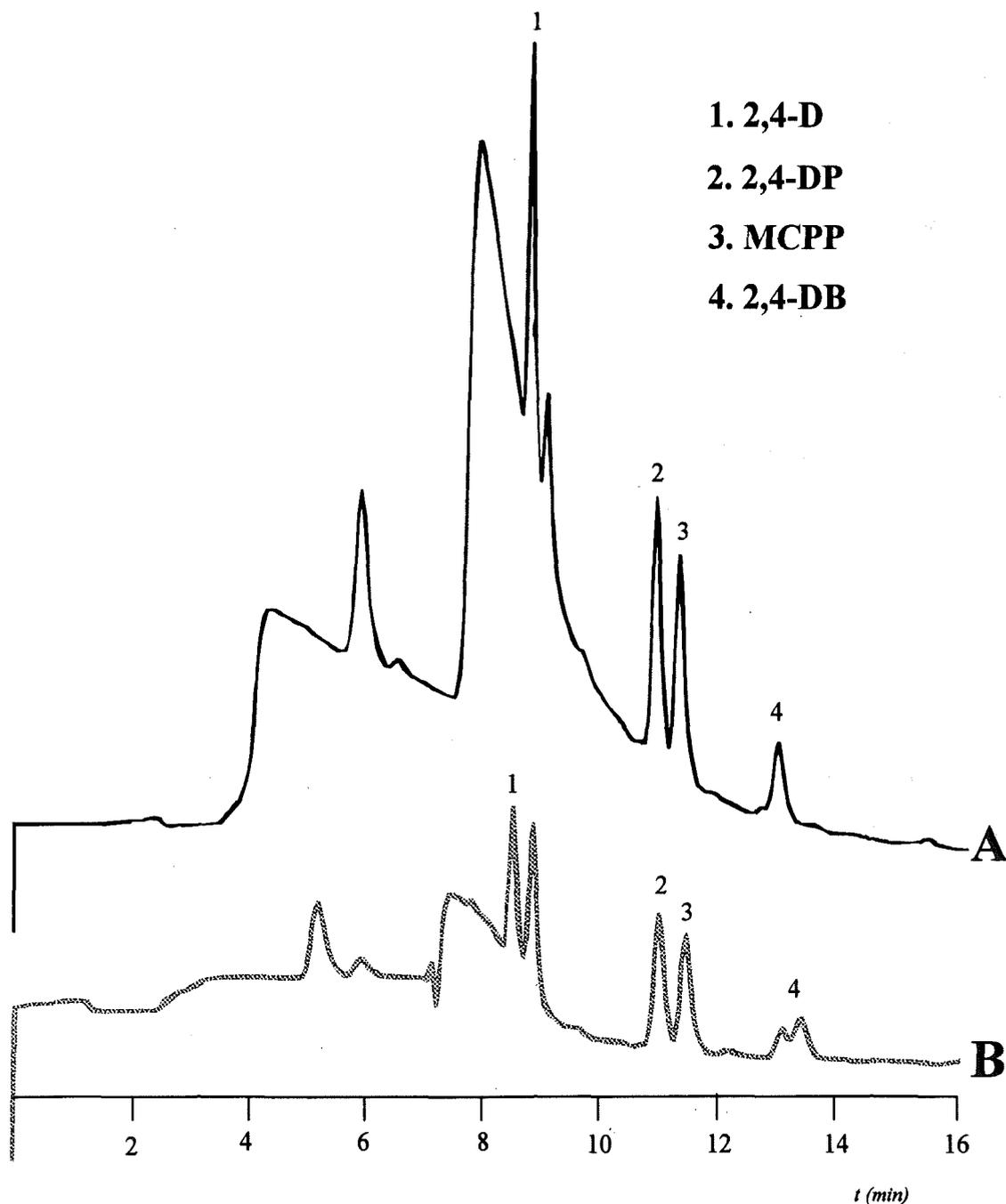


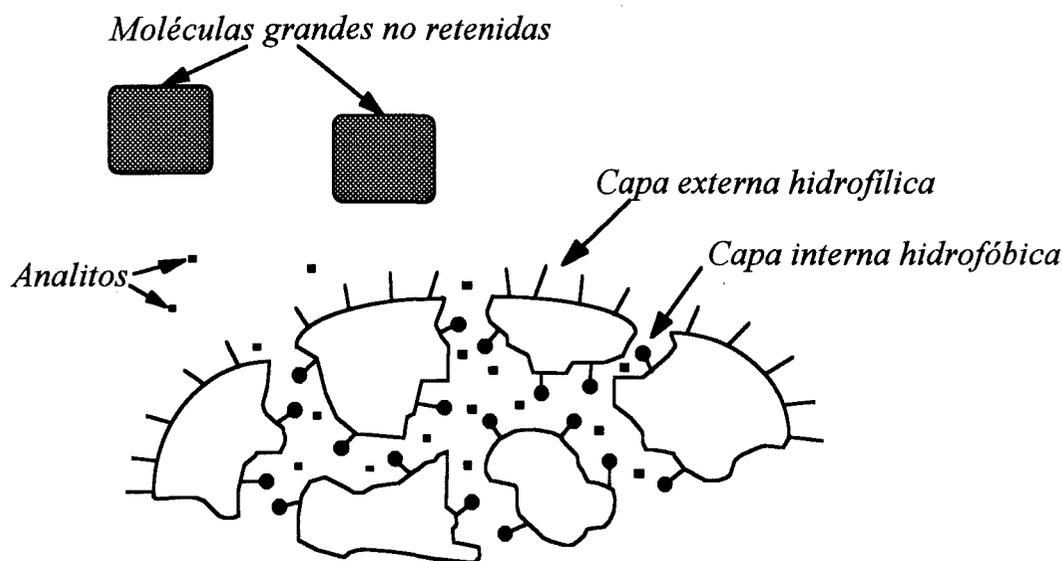
Figura 49. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de $5 \mu\text{g l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano (A) e isoctano (B). Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 50 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C.

b) En cuanto a la modificación del sistema de columnas acopladas, se puede mejorar introduciendo una nueva columna C-1 que mejore la purificación que proporciona la técnica de columnas acopladas.

Dadas las características de los interferentes, probablemente ácidos húmicos y fúlvicos, se probó la utilización como C-1 de columnas de 10 mm rellenas de fase reversa C₁, fase reversa C18 tipo B (*libres de restos de silanol*) y una fase de reciente comercialización denominada ISRP (*Internal Surface Reversed Phase*).

Tanto la columna rellena de C1 como la de C18 tipo B, no dieron buenos resultados.

En cuanto a la fase ISRP, se trata de una fase estacionaria que se diseñó originariamente para el análisis directo de fármacos, drogas y metabolitos en sueros, sin necesidad de eliminar la matriz proteica. La superficie interna de las partículas del soporte está recubierta por una fase reversa selectiva, formada por el tripéptido glicina-fenilalanina-fenilalanina, siendo la superficie externa hidrofílica (polar), tal como se muestra en el esquema siguiente,



Relleno: 5 μ m GFF II de Pinkerton

Capa externa: glicina (polar)

Capa interna: glicina-fenilalanina-fenilalanina (apolar)

La utilización de una primera columna de tan sólo 10 mm hace que la fuerza eluotrópica de la fase móvil M-1 se deba mantener lo más baja posible para permitir una mínima retención de los analitos, aunque utilizando esta fase especial también se aporta una retención adicional, que permite llevar a cabo una purificación eficaz de los interferentes

Utilizando como M-1 una fase móvil MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95) se puede aplicar un volumen de purificación de 1 ml, que permite eliminar en gran medida los interferentes del extracto obtenido tras EFS C18 y posterior purificación "off-line" sobre silicagel. La transferencia se realiza con tan sólo 0.5 ml de fase móvil M-2, que consiste en MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40) (**Figura 50**).

El pequeño volumen de purificación aplicado a la columna C-1 de tipo ISRP proporciona una eliminación eficaz de los interferentes, permitiendo el análisis de muestras de aguas potables, subterráneas y superficiales a niveles próximos a 0.1 µg·l⁻¹.

Como ejemplo, en la **Figura 51** se muestra el cromatograma obtenido para un extracto de una muestra de agua superficial fortificada a nivel de 2 µg·l⁻¹, analizado mediante cromatografía líquida con columnas acopladas en las condiciones descritas anteriormente.

Finalmente, se escogen como condiciones óptimas para el acoplamiento CL-CL en la determinación de los herbicidas fenoxiácidos, las siguientes:

- C-1 = 10 × 3 mm d.i., Pinkerton GFF II de 5 µm
- C-2 = 100 × 4.6 mm d.i., Microsphere C18 de 3 µm
- M-1 = MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95)
- M-2 = MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40)
- Flujo = 1 ml·min⁻¹

- Volumen de purificación = 1.0 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (5:95)
- Volumen de transferencia = 0.5 ml de MeOH/H₂O 0.1% ATF (60:40)

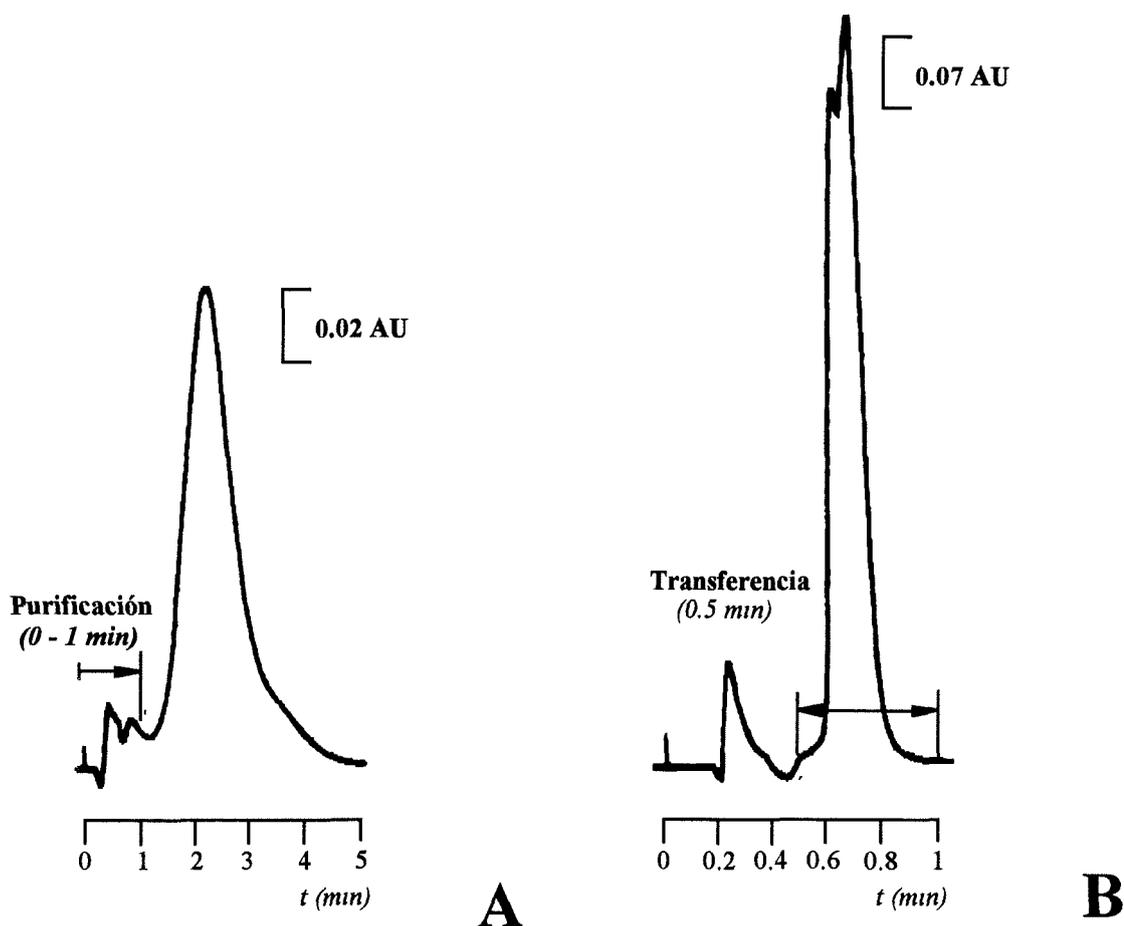


Figura 50. Cromatogramas obtenidos conectando directamente C-1 (ISRP, 10x3 mm, 5 μ m) al detector UV (228 nm) e inyectando 400 μ l de:

- disolución patrón de 2,4-D (analito más polar), para el cálculo del volumen de purificación, utilizando como fase móvil, M-1: MeOH/H₂O 0.1% ATF (5:95).
- disolución patrón mezcla de los ocho fenoxiácidos, para el cálculo del volumen de transferencia, utilizando como fase móvil, M-2: MeOH/H₂O 0.1% ATF (60:40).

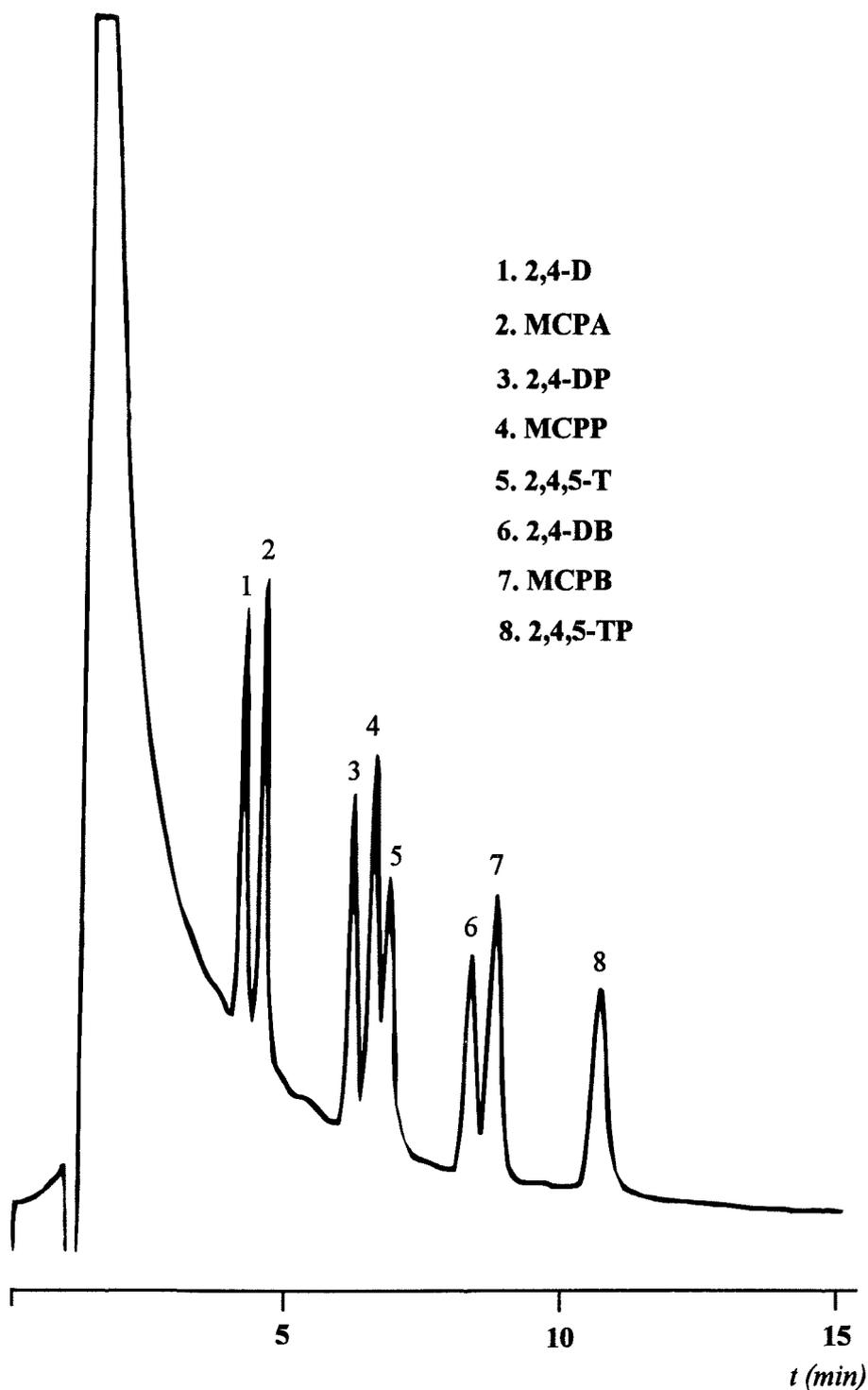


Figura 51. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel del extracto disuelto en diclorometano/isooctano (20:80). Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, $10\times 3\text{mm}$, ISRP, $5 \mu\text{m}$; C-2, $100\times 4.6\text{mm}$, Microsphere C18, $3 \mu\text{m}$; detección UV 228 nm; T 45°C ; M-1 MeOH/ H_2O 0.05% ATF (5:95); M-2 MeOH/ H_2O 0.05% ATF (60:40).

II.3.4. Procedimiento recomendado.

El procedimiento final recomendado para la determinación de herbicidas fenoxiácidos en aguas (**Figura 52 y 53**) consiste en la extracción de los herbicidas de la muestra de agua sobre cartucho de 100 mg C18, posterior purificación sobre cartucho de 100 mg de silicagel y análisis por CL-CL utilizando como C-1 la columna de 10 mm de ISRP, 5 μm y como C-2 la columna de 100 mm Microspher C18, 3 μm .

Las fases móviles se ajustan a un flujo de 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Se inyecta en C-1 una alícuota de 400 μl del extracto obtenido tras la purificación con silicagel. Después de realizar la purificación en línea del extracto con 1.0 ml de M-1 (*volumen de muestra incluido*), se activa la válvula de la interfase para acoplar C-1 con C-2 durante 30 segundos y transferir a C-2 la fracción que contiene los herbicidas fenoxiácidos (0.5 ml de M-2). Finalizada la transferencia, se realiza la separación de esta fracción en la columna C-2 mediante la fase móvil M-2. Simultáneamente se pasa durante 3 min la fase móvil M-1b (MeOH) para lavar la columna C-1.

La cuantificación de los herbicidas fenoxiácidos se lleva a cabo mediante calibración con estándar externo usando disoluciones de patrones en ATF 0.05%.

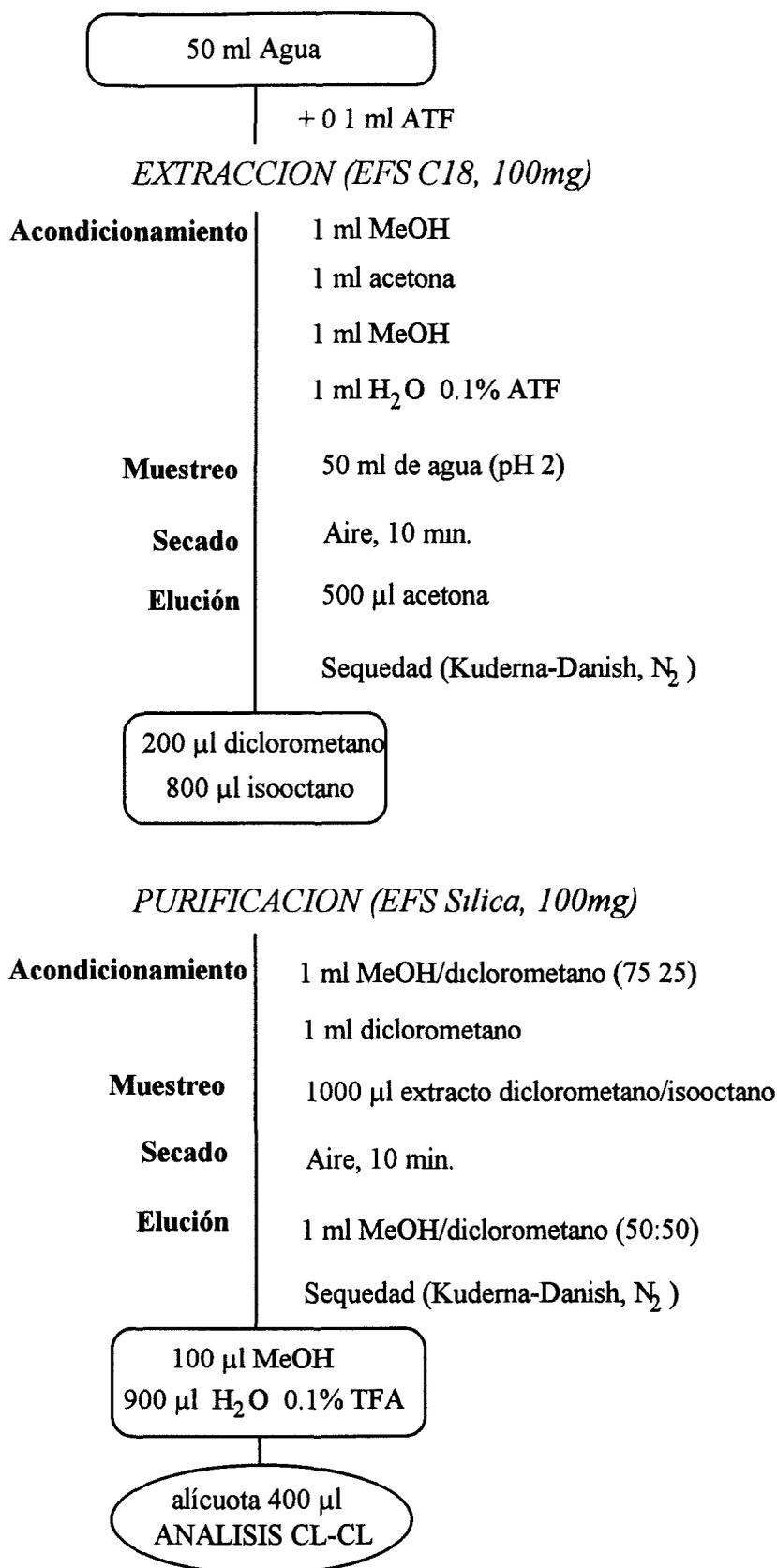
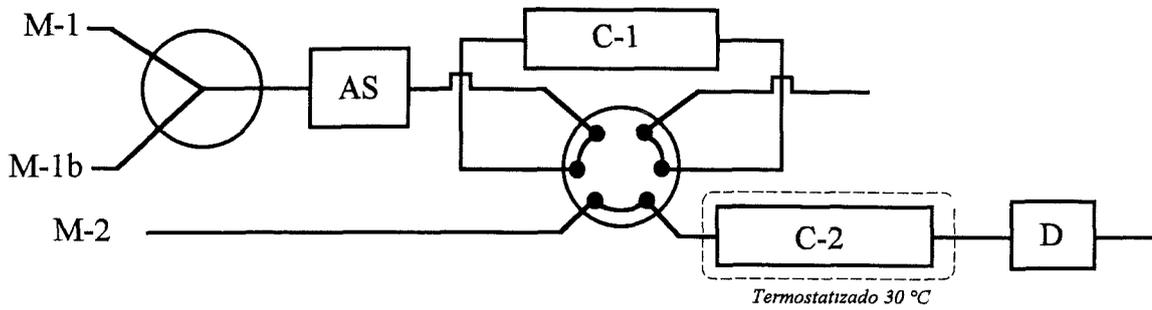


Figura 52. Esquema del procedimiento final recomendado para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas.



AS Autoinyector con loop de inyección de 400 μ l

C-1. Precolumna de ISRP, 10 mm, 5 μ m

C-2 Columna analítica de 100 mm, Microspher C18 3 μ m.

M-1 MeOH/ATF 0.05% (5:95)

M-1b MeOH

M-2 MeOH/ATF 0.05% (60:40)

D UV 228 nm

Figura 53. Esquema del diseño experimental de acoplamiento CL-CL para la determinación de residuos de herbicidas fenoxiácidos en muestras de aguas.

II.3.5. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras de aguas medioambientales.

Se aplica el procedimiento recomendado al análisis de diferentes muestras de aguas. Se analizan 5 réplicas de muestras de aguas de abastecimiento urbano, aguas subterráneas y aguas superficiales, fortificadas a 0.1, 0.5 y 2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, calculándose las recuperaciones y los coeficientes de variación que se muestran en la **Tabla 48**.

Tabla 48. Recuperación de los herbicidas fenoxiácidos en diferentes muestras de aguas fortificadas utilizando el procedimiento recomendado.

Herbicida	Agua potable		Agua superficial		Agua subterránea	
	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	R ^a (CV ^b)	R (CV)	R (CV)	R (CV)	R (CV)	R (CV)
2,4-D	90 (3.4)	93 (9.2)	101 (2.9)	97 (2.2)	87 (1.4)	79 (6.9)
MCPA	95 (3.6)	95 (7.7)	101 (1.1)	104 (2.2)	98 (8.2)	88 (9.7)
2,4-DP	99 (2.1)	100 (8.0)	102 (0.9)	103 (2.0)	112 (9.1)	95 (9.4)
MCPD	95 (2.9)	100 (5.3)	102 (2.2)	108 (2.1)	116 (10)	97 (7.9)
2,4,5-T	88 (2.9)	97 (9.0)	93 (2.3)	97 (2.9)	92 (3.7)	78 (8.0)
2,4-DB	101 (4.3)	99 (3.1)	102 (2.8)	97 (1.8)	89 (3.9)	93 (7.2)
MCPB	127 (3.2)	104 (4.5)	104 (2.0)	99 (2.0)	85 (6.5)	101 (7.0)
2,4,5-TP	99 (3.2)	98 (7.3)	96 (2.1)	98 (2.4)	94 (7.8)	93 (10)

^a R, recuperación en %.

^b CV, coeficiente de variación, en %, $n = 5$.

Como puede observarse, los resultados se pueden considerar excelentes, obteniéndose recuperaciones cuantitativas en todas las muestra y a a todos los niveles de concentración. Los coeficientes de variación son inferiores al 10%.

A la vista de los cromatogramas del agua superficial (**Figura 54**) y subterránea (**Figura 55**) fortificadas al nivel de 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, se observa que el límite de detección del procedimiento es inferior a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, lo cual permite cumplir la legislación vigente sobre residuos de pesticidas en muestras de aguas, según las directivas de la CEE.

En cuanto a la muestra de agua potable, el cromatograma correspondiente al nivel de fortificación 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (**Figura 56**) permite comprobar que, usando el procedimiento recomendado, se pueden alcanzar límites de detección del orden de 16-50 $\text{ng}\cdot\text{l}^{-1}$ (ppt), por debajo del límite máximo tolerado. Los límites de detección calculados para el procedimiento, como señal equivalente a tres veces el ruido de fondo del cromatograma correspondiente a la muestra fortificada a nivel de 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ se muestran en la **Tabla 49**.

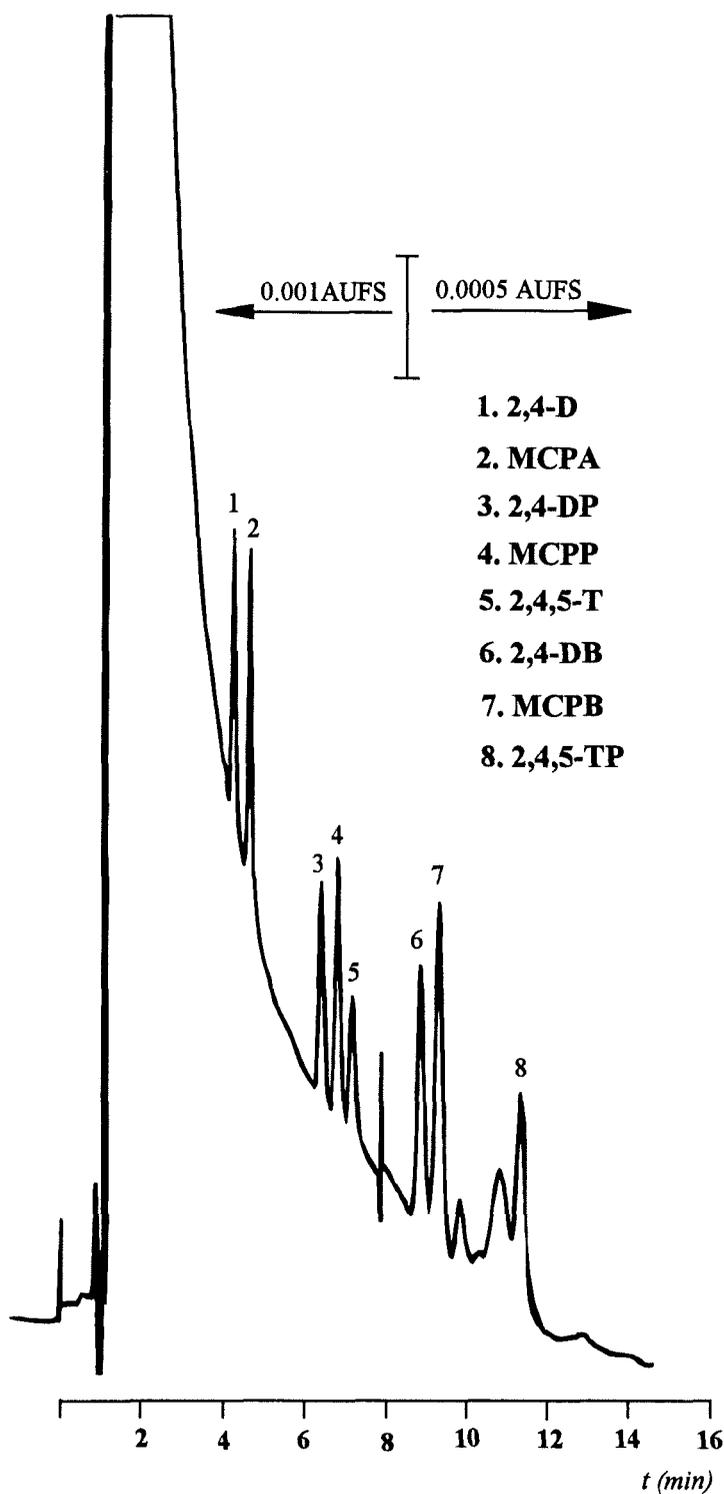


Figura 54. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 10 \times 3mm, ISRP, 5 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C; M-1 MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95); M-2 MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40).

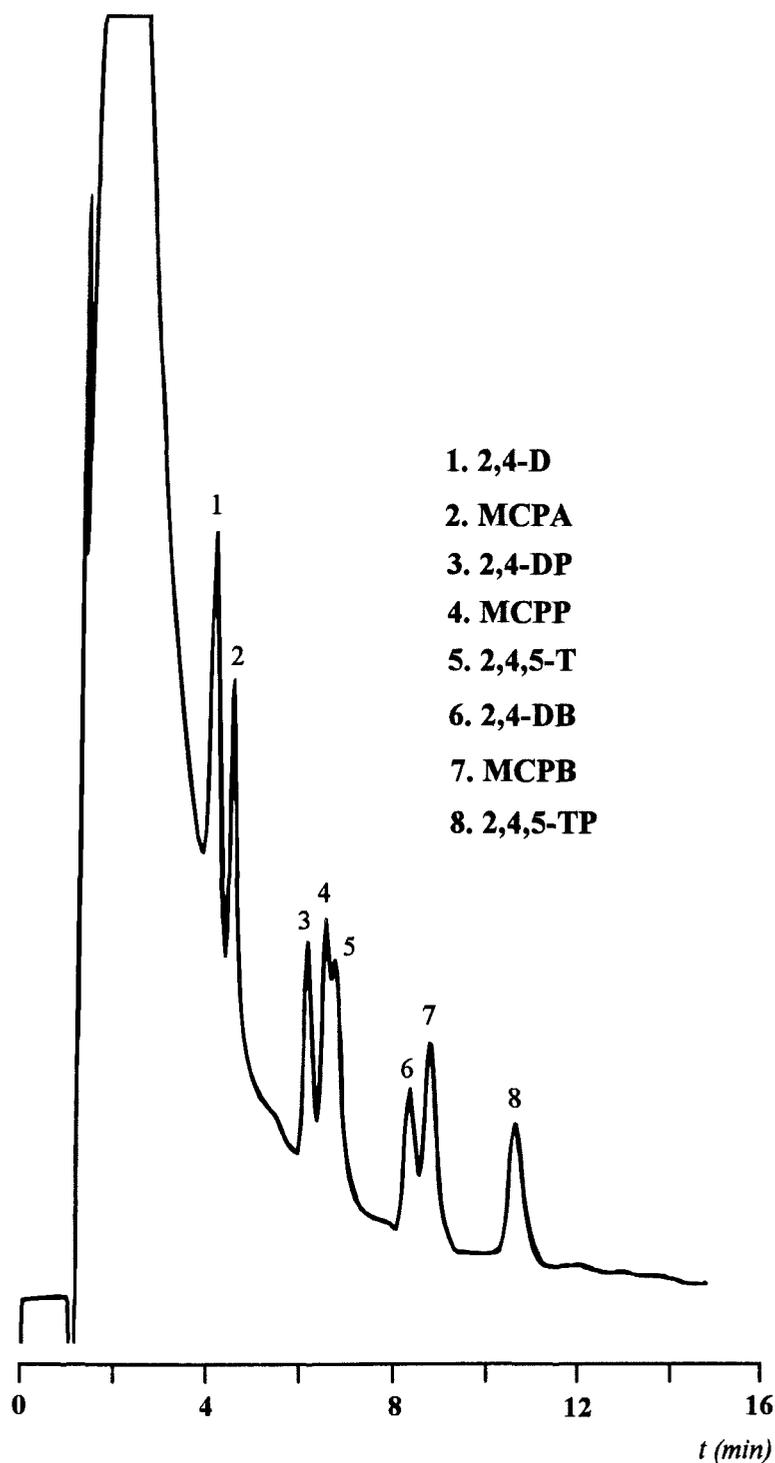


Figura 55. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua subterránea fortificada a nivel de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 10 \times 3mm, ISRP, 5 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C; M-1 MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95); M-2 MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40).

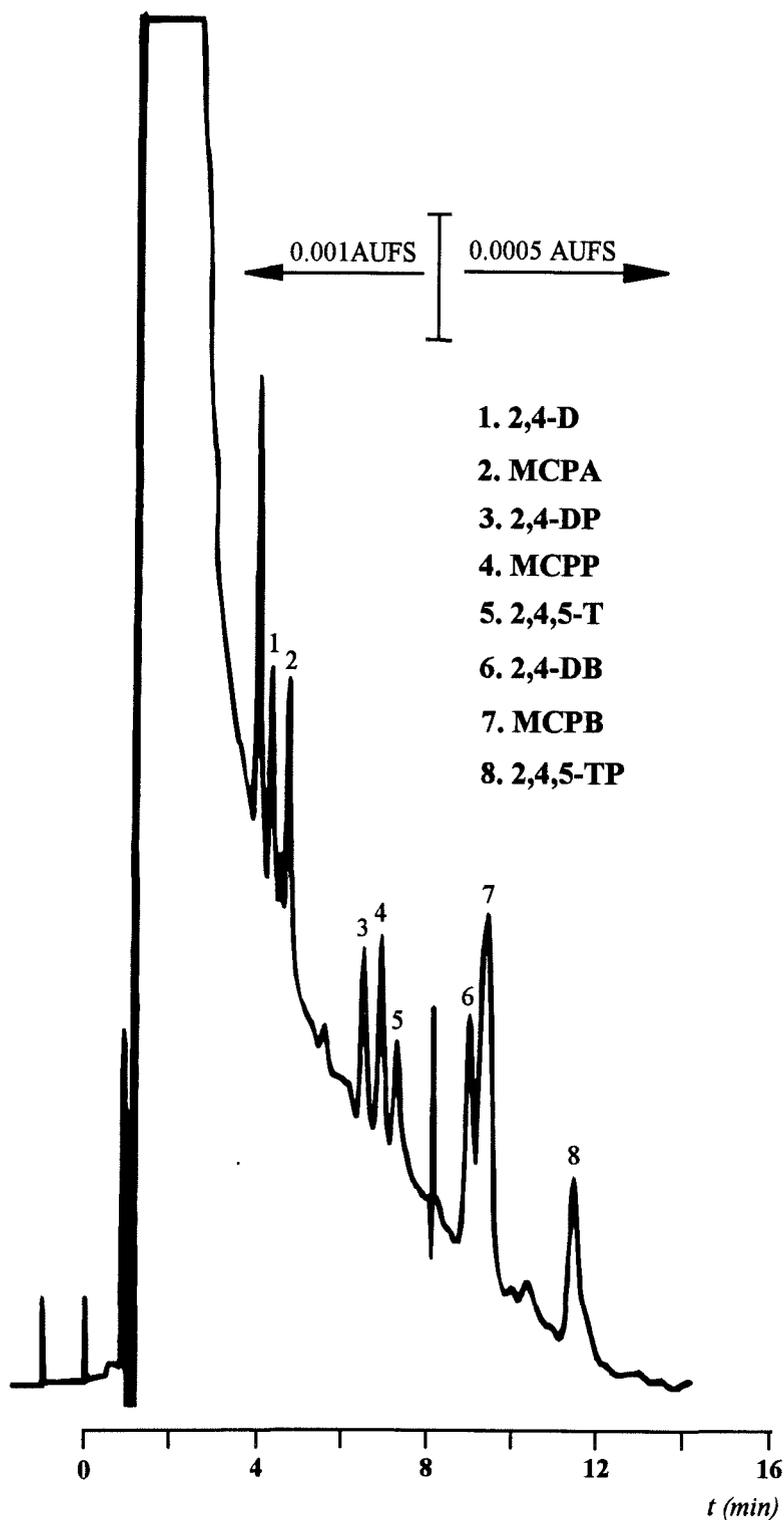


Figura 56. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua potable fortificada a nivel de $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 10 \times 3mm, ISRP, 5 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C; M-1 MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95); M-2 MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40).

Tabla 49. Límites de detección para los herbicidas fenoxiácidos obtenidos mediante el procedimiento recomendado en aguas potables.

Herbicida	LD (ng l ⁻¹)
2,4-D	19
MCPA	16
2,4-DP	25
MCPP	21
2,4,5-T	33
2,4-DB	36
MCPB	25
2,4,5-TP	50

II.3.6. Persistencia de los herbicidas clorofenoxiácidos en diferentes medios.

Se han realizado algunas experiencias adicionales sobre persistencia y estabilidad de los herbicidas fenoxiácidos en muestras de agua fortificada, así como en cartuchos de EFS C18

Persistencia en agua.

Se fortificó una muestra de agua potable a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ con cuatro herbicidas fenoxiácidos (MCPA, MCPP, 2,4-DB y 2,4,5-TP), almacenándola a temperatura ambiente (20°C) y en presencia de luz y analizándola a lo largo del tiempo. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 50**, observándose que, al cabo de cuatro meses, la concentración de MCPP y 2,4,5-TP se mantiene prácticamente constante, mientras que la de MCPA y, sobre todo 2,4-DB, disminuyen considerablemente. Además, la disminución en la concentración de MCPA tiene lugar a partir del tercer mes, mientras que la del 2,4-DB se inicia desde el principio. Los datos para MCPA y MCPP concuerdan con los obtenidos por Cavalier *et al.* (1991) para sus homólogos diclorados, 2,4-D y 2,4-DP, donde se observa que el 2,4-DP presenta un período inicial de estabilidad bastante largo (> 4 meses), siendo más corto para el 2,4-D (2-3 meses), a partir del cual empieza a degradarse con velocidad constante, aunque no muy elevada.

Tabla 50. Recuperación de varios herbicidas fenoxiácidos en una muestra de agua potable fortificada a nivel de $5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ a lo largo del tiempo.

Herbicida	0 días	66 días	95 días	117 días
MCPA	98.1	87.0	88.4	69.6
MCPP	96.0	89.7	89.2	88.9
2,4-DB	106	57.1	28.7	14.3
2,4,5-TP	98.7	98.5	95.5	90.0

Recuperación en %.

Estabilidad en cartuchos de EFS C18

Se estudió también la estabilidad de los herbicidas fenoxiácidos, una vez adsorbidos sobre el cartucho de EFS C18, con objeto de evaluar la posibilidad de realizar el muestreo "in situ" en el campo, trasladando únicamente los cartuchos al laboratorio

Se realizó la extracción por triplicado de 50 ml de agua superficial fortificada a nivel de $2.5 \mu\text{g l}^{-1}$ sobre cartuchos de EFS C18 de 100 mg y, una vez secos con aire, se guardaron a temperatura ambiente en oscuridad durante dos semanas. Pasado este tiempo se continuó con el procedimiento final recomendado, obteniéndose los resultados que se muestran en la **Tabla 51**

Tabla 51. *Persistencia de los herbicidas fenoxiácidos adsorbidos durante dos semanas sobre un cartucho de EFS C18.*

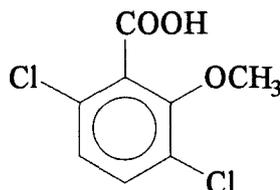
Herbicida	Recuperación (%)	C.V. (%)
2,4-D	89	5.4
MCPA	97	3.6
2,4-DP	96	2.6
MCPB	101	2.7
2,4,5-T	94	4.9
2,4-DB	101	0.9
MCPB	98	1.4
2,4,5-TP	92	0.6

C.V., coeficiente de variación ($n=3$).

Se comprueba que, al menos durante dos semanas, no se produce una disminución apreciable de los herbicidas fenoxiácidos adsorbidos sobre el cartucho de EFS C18, por lo que es posible el muestreo directo en el campo y el almacenamiento de los cartuchos para su posterior procesamiento en el laboratorio, con el consiguiente ahorro de espacio

II.4.- Determinación conjunta de residuos de herbicidas fenoxiácidos y dicamba por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.

El dicamba es un compuesto relacionado con los herbicidas fenoxiácidos, ya que, aunque no es propiamente dicho un clorofenoxiácido, se trata de un clorobenzoico. Se utiliza también como herbicida, presentando baja constante de acidez y varios átomos de cloro en su anillo aromático.



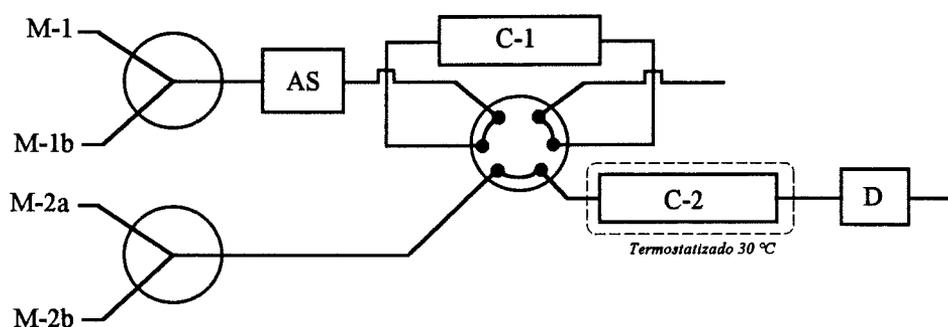
Se estudió la posibilidad de incluirlo en el análisis de los herbicidas fenoxiácidos siguiendo el procedimiento final recomendado (de hecho, en alguna de las experiencias anteriores ya aparece), pero no se obtenía una buena separación entre este compuesto, mucho más polar que el resto de analitos, y el pico de interferente al principio del cromatograma. Por lo tanto, se hace necesario aplicar una elución con gradiente para poder separar el dicamba de las interferencias durante la etapa de transferencia. Es decir, se realiza la etapa de purificación con la fase móvil M-1, pero se realiza la transferencia con un volumen de fase móvil M-2a, que se cambia en el momento adecuado, realizando un gradiente escalonado, a la fase móvil M-2b, de mayor fuerza eluotrópica, consiguiendo así una mayor selectividad para el analito más polar, dicamba.

La elución con gradiente lineal se puede aplicar para superar la gran diferencia de retención entre los analitos y, así, acelerar el análisis cromatográfico. Sin embargo, utilizando un sistema tamponado y detección UV no selectiva (228 nm), la línea base se verá ampliamente distorsionada durante la elución con gradiente lineal (Schussler, 1990, Coquart y Hennion, 1993). Según Hogendoorn y van Zoonen (1991) la elución con gradiente escalonado puede servir de alternativa al gradiente lineal para la adecuada separación de compuestos con grandes diferencias en su retención. Seleccionando un tiempo adecuado para el cambio de eluyente, se puede obtener una mejora de la línea base, aumentando la sensibilidad y reduciendo el tiempo de análisis.

Se ha ensayado la aplicación de elución con gradiente escalonado para la separación de dicamba y los herbicidas fenoxiácidos. Se realizaron diferentes experiencias sobre aguas fortificadas a diferentes niveles, comprobándose que el procedimiento aplicado permite

analizar dicamba conjuntamente con los herbicidas fenoxiácidos hasta niveles inferiores a $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. En la **Figura 57** se observa el cromatograma obtenido para una muestra de agua superficial fortificada a nivel de $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ilustrando el efecto de la elución con gradiente escalonado sobre el pico de interferente, con compresión del mismo y distorsión de la línea base. A pesar de ello, el procedimiento es todavía capaz de detectar residuos de todos los compuestos a los bajos niveles estudiados, permitiendo, además, el análisis de dicamba.

La extracción y purificación se realizan como en el procedimiento recomendado (EFS C18, urificación en silicagel). La técnica de columnas acopladas se aplica utilizando como M-1 MeOH/0.05% ATF (5:95) y como M-2 MeOH/0.05% ATF (50:50) durante la transferencia y los primeros 5.2 min después de la misma (M-2a) y MeOH/0.05% ATF (60:40) durante los 10 min siguientes (M-2b). En la **Figura 58** se muestra un esquema del diseño experimental utilizado.



AS: Autoinyector con loop de inyección de $400 \mu\text{l}$

C-1: Precolumna de ISRP, 10 mm, $5 \mu\text{m}$.

C-2: Columna analítica de 100 mm, Microspher C18 $3 \mu\text{m}$.

M-1: MeOH/ATF 0.05% (5:95)

M-1b: MeOH

M-2a: MeOH/ATF 0.05% (50:50)

M-2b: MeOH/ATF 0.05% (60:40)

D: UV 228 nm

Figura 58. Esquema del diseño experimental de acoplamiento CL-CL para la determinación conjunta de residuos de herbicidas fenoxiácidos y dicamba en muestras de aguas.

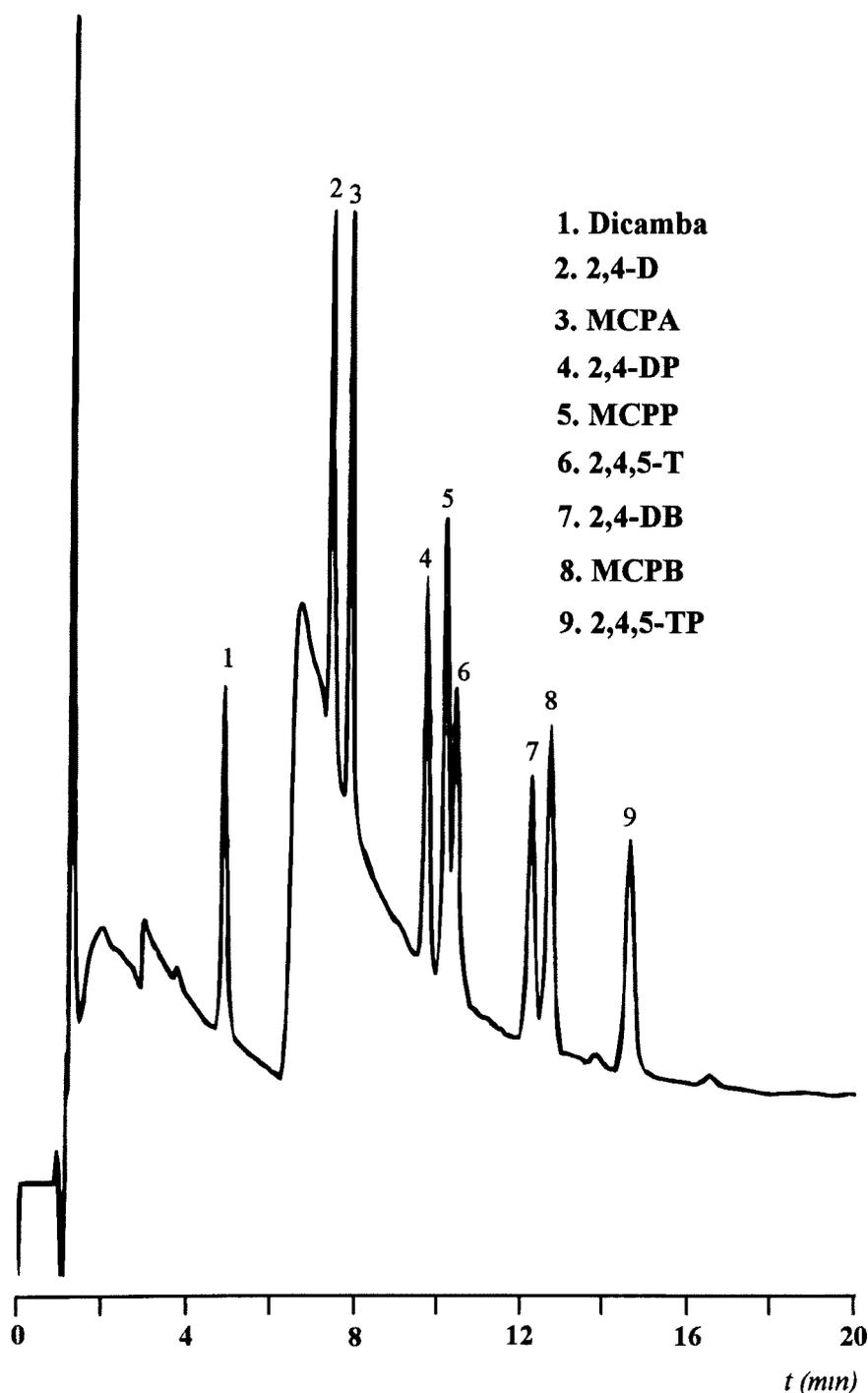


Figura 57. Cromatograma obtenido mediante acoplamiento CL-CL de un extracto de agua superficial fortificada a nivel de $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante EFS C18 y posterior purificación sobre silicagel. Condiciones: 50 ml de muestra; 100 mg C18; elución 500 μl de acetona; C-1, 10 \times 3mm, ISRP, 5 μm ; C-2, 100 \times 4.6mm, Microsphere C18, 3 μm ; detección UV 228 nm; T 45°C; M-1 MeOH/H₂O 0.05% ATF (5:95); M-2a MeOH/H₂O 0.05% ATF (50:50); M-2b MeOH/H₂O 0.05% ATF (60:40).

C. III. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed, A.W.; Mallet, V.N.; Bertrand, M.J. (1989), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 365
- Agemian, H.; Chau, A.S.Y (1977), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **60**, 1070.
- Åkerblom, M. (1985), *J. Chromatogr.*, **319**, 427.
- Alexander M.; Lustigman, B K. (1966), *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 410
- Allender, W.J (1989), *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 193.
- Barceló, D. (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 117.
- Bertrand, M.J.; Stefadinis, S., Sarrasin, B. (1986), *J. Chromatogr.*, **351**, 47.
- Bertrand, M.J.; Ahmed, A.W.; Sarrasin, B.; Mallet, V.N. (1987), *Anal. Chem.*, **59**, 1302
- Bogus, E.R.; Watschke, T.L.; Mumma, R.O. (1990), *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 142.
- Burström, H.; Sjöberg, B; Hansen, B A.M. (1955), *Acta Agric. Scand.*, **6**, 155.
- Cavalier, T.C.; Lavy, T.L., Mattice, J.D. (1991), *Ground Water*, **29**, 225.
- Chau, A.S.Y.; Terry, K. (1975), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **58**, 1294.
- Chau, A.S.Y.; Terry, K. (1976), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **59**, 633.
- Choudry, G.G. (1984), *Humic Substances*, Gordon and Breach Ed., New York.
- Cline, R.E.; Todd, G.D.; Ashley, D.L.; Grainger, J.; McCraw, J.M.; Alley, C.C.; Hill, R.H Jr. (1990), *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 167.
- Coquart, V.; Hennion, M.C. (1993), *Sci. Total Environ.*, **132**, 349.
- di Corcia, A.; Marchetti, M.; Samperi, R. (1989), *Anal. Chem.*, **61**, 1363.
- Cotterill, E.G. (1979), *J. Chromatogr.*, **171**, 478.
- Crosby, D.G.; Tutass, H.O. (1966), *J. Agric. Food Chem.*, **14**, 596.
- DFG (1992), *Phenoxyalkanoic acid herbicides*, Manual of Pesticide Residue Analysis, Vol II, pg 369, H.P. Thier y J. Kirchhoff Editores, VCH mbH, Weinheim, Alemania.
- EPA (1989), Método 515.1 Revisión 4.0, *Determination of chlorinated acids in water by gas chromatography with electron capture detector*. USEPA, Cincinnati, Ohio 45268.
- Farrán, A.; Cortina, J.L.; de Pablo, J.; Barceló, D. (1990), *Analytica Chimica Acta*, **234**, 119.
- Fertig, S N. (1964), *Weeds*, **12**, 147.
- Feung, C. J.; Hamilton, R.H.; Witham, F.H. (1971), *J. Agric. Food Chem.*, **19**, 435.

- Feung, C. J.; Hamilton, R.H.; Mumma, R.O. (1974), *J. Agric. Food Chem.*, **22**, 307.
- 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.
- Galston, A.W.; Davies, P.J. (1969), *Science*, **163**, 1288.
- Geerdink, R.B.; van Balkom, C.A.A.; Brouwer, H.J. (1989), *J. Chromatogr.*, **481**, 275.
- Glasser, J.A.; Foerst, D.L.; McKee, G.D.; Quave, S.A.; Budde, W.L. (1981), *J. Environ. Sci. Technol.*, **15**, 1426.
- Gurka, D.F.; Shore, F.L.; Pan, S. (1987), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 889.
- Hamann, R.; Kettrup, A. (1987), *Chemosphere*, **16**, 527.
- Hamann, R.; Meier, M.; Kettrup, A. (1989), *Fresenius J. Anal. Chem.*, **334**, 231.
- Hewlett Packard (1994), *Water Analysis - Organic Micropollutants*, pg. 209. R. Soniassy, P. Sandra, C. Schlett Editors.
- Hill, N.P.; McIntyre, A.E.; Perry, R.; Lester, J.N. (1983), *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **15**, 107.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P. (1991), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **55**, 1275.
- Hoke, S.H., Brueggemann, E.E.; Baxter, L.J.; Trybus, T. (1986), *J. Chromatogr.*, **357**, 429.
- Hopper, M.L. (1987), *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 265.
- Incorvia, M.J. (1991), *J. Chromatogr.*, **542**, 385.
- Jandera, P.; Svodova, L.; Kubát, J.; Schvantner, J.; Churáček, J. (1984), *J. Chromatogr.*, **292**, 71.
- Jiménez, N.C.; Atallah, Y.H.; Bade, T.R. (1989), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 840.
- Johnson, L.G. (1973), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **56**, 1503.
- Jönsson, J.A.; Mathiasson, L. (1992), *Trends in Anal. Chem.*, **11**, 106.
- Kawahara, F.K. (1968), *Anal. Chem.*, **40**, 1009.
- Lee, H.; Chau, A.S.Y. (1983), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1023.
- Lee, H.; Stokker, Y.D.; Chau, A.S.Y. (1986), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 557.

- Matolcsy, Gy.; Nádas, M.; Andriška, V. (1988), *Pesticide Chemistry*, Studies in Environmental Science Series, Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- McCall, P.J.; Vrona, S.A.; Kelley, S.S. (1981), *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 100.
- Mierzwa, S.; Witek, S. (1977), *J. Chromatogr.*, **136**, 105.
- Miller, J.C.; Miller, J.N. (1993), *Statistics for Analytical Chemistry*, 3ª edición, Analytical Chemistry Series, Ellis Horwood PTR Prentice Hall, London.
- Ministry of Welfare and Health (1988), *Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs*, 5ª edición, pg. 71. P.A. Greve, Editor.
- Morrissey, M.A.; Hill, H.H. Jr. (1989), *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 529.
- Muir, D.C.G. (1985), *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 518.
- Ngan, F.; Ikesaki, T. (1991), *J. Chromatogr.*, **537**, 385.
- Nilvé, G.; Audunsson, G.; Jönsson, J.A. (1989), *J. Chromatogr.*, **471**, 151.
- Pesticide Manual (1991), *The Pesticide Manual*, 9ª edición, C.W. Worthing & R.J. Hance Editores, British Crop Protection Council, Farnham.
- Roseboom, H.; Herbold, H.A.; Berkhoff, C.J. (1982), *J. Chromatogr.*, **249**, 323.
- de Ruiter, C.; Minnaard, W.A.; Lingeman, H.; Kirk, E.M.; Brinkman, U.A.Th.; Otten, R.R. (1991), *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **43**, 79.
- Schüssler, W. (1990), *Chromatographia*, **29**, 24.
- Smith, A.E. (1972), *Weed Res.*, **12**, 364.
- Smith, A.E.; Hayden, B.J. (1980), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **25**, 369.
- Smith, A.E.; Hayden, B.J. (1981), *Weed Res.*, **21**, 179.
- Smith, A.E. (1985), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **34**, 150.
- Smith, A.E. (1989), "Transformations in Soil" en *Environmental Chemistry of Herbicides*, Vol I, R. Grover, Editor, CRC Press, Inc., pg 188.
- Smith, A.E.; Aubin, A.J. (1991), *J. Environ. Quality*, **20**, 436.
- Snyder, L.R.; Glaych, J.L.; Kirkland, J.J. (1988) "*Practical HPLC Method Development*". Wiley-Interscience, New York.
- Somasundaram, L.; Coats, J.R.; Rache, K.D.; Stahr, H.M. (1990), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 254.

- Suzuki, T., Watanabe, S. (1991), *J. Chromatogr.*, **541**, 359.
- Synerholm, M.E.; Zimmermann, P.W. (1947), *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, **14**, 369.
- Tsukioka, T.; Murakami, T. (1989), *J. Chromatogr.*, **469**, 351.
- Wang, W.; Huang, S. (1989), *J. Chromatogr.*, **483**, 121.
- Wells M.J.M.; Michael, J.L. (1987), *Anal. Chem.*, **59**, 1739.
- Yip, G. (1962), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **45**, 366.

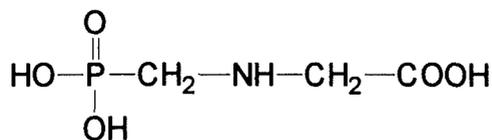
**D.- ANALISIS DE RESIDUOS DE LOS HERBICIDAS GLIFOSATO Y
GLUFOSINATO**



D. I.- INTRODUCCION

I.1. Características generales.

Entre los diferentes herbicidas derivados fosfóricos, no cabe duda de que es el glifosato el más conocido y estudiado, presentando un modo de acción distinto al de los demás.



Glifosato

Nombre IUPAC: N-(fosfonometil)glicina.

El glifosato, lanzado al mercado en 1971 por Monsanto, es de carácter ácido, empleándose en forma de sal amina, especialmente, de isopropilamina, soluble en agua. Su actividad por contacto se extiende a un gran número de malas hierbas, tanto mono como dicotiledóneas. Aplicado al suelo, no tiene acción herbicida significativa. Aunque no es un herbicida selectivo, ha encontrado aplicación en cultivos arbóreos (frutales, cítricos, olivo, vid) en aplicación dirigida y, también, en otros cultivos cuando se emplean sistemas selectivos de aplicación que eviten daños al mismo.

La absorción del producto por las hojas y partes verdes de la planta es muy rápida, por lo que las lluvias que ocurran 6-8 horas después del tratamiento afectan poco al efecto herbicida. La aplicación del glifosato, dada su condición de herbicida de contacto (post-emergente), requiere que las adventicias estén presentes en el campo y con metabolismo activo. El glifosato se trasloca tanto por el xilema como por el floema, siguiendo el camino preponderante de la savia. En general, los tratamientos próximos a floración y fructificación de las adventicias dan mejores resultados que los muy adelantados o muy tardíos (Barberá, 1989).

El modo de acción del glifosato se debe a la inhibición que produce en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, que constituye un proceso relativamente largo y complicado el cual se esquematiza en la **Figura 59**.

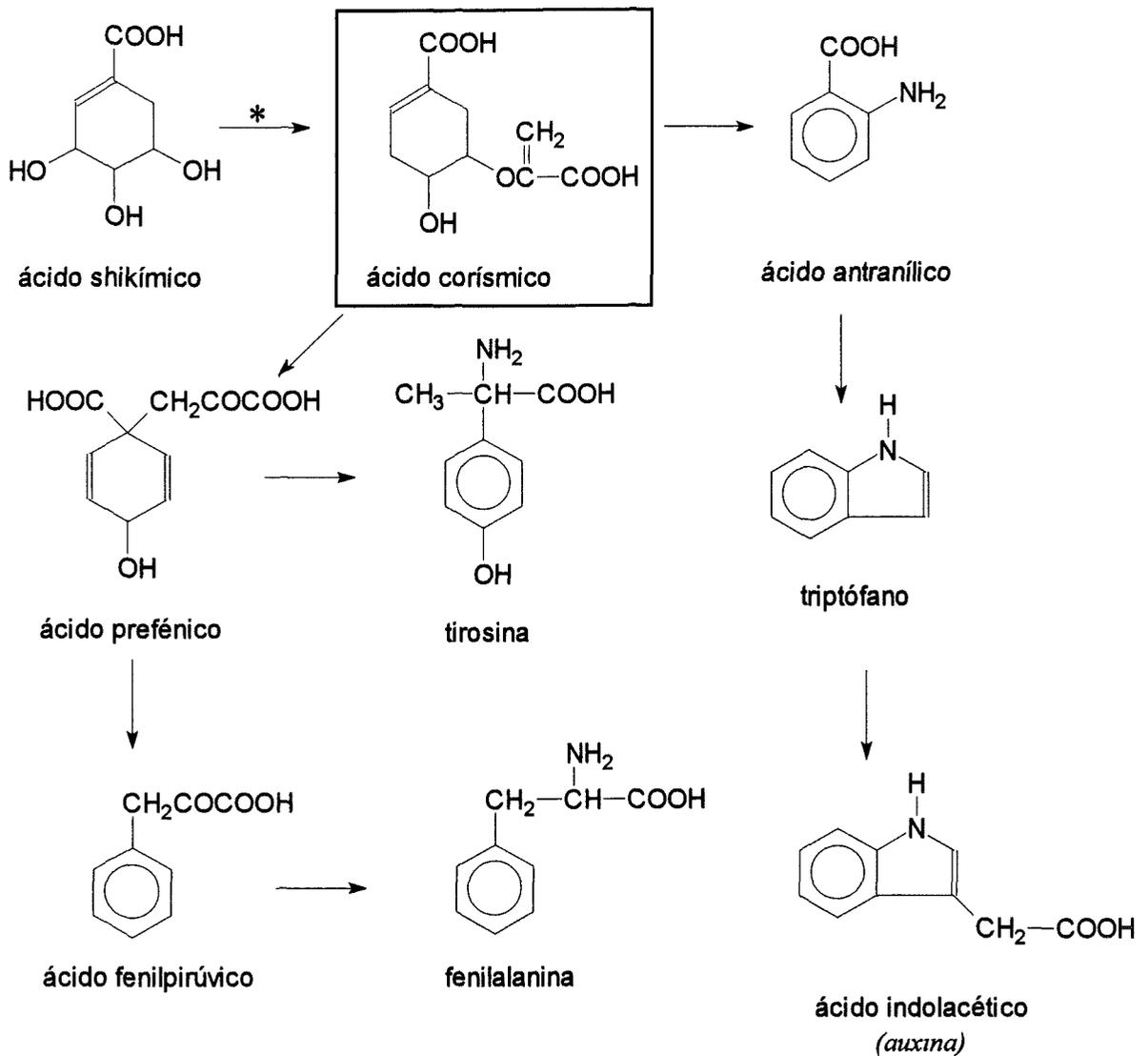
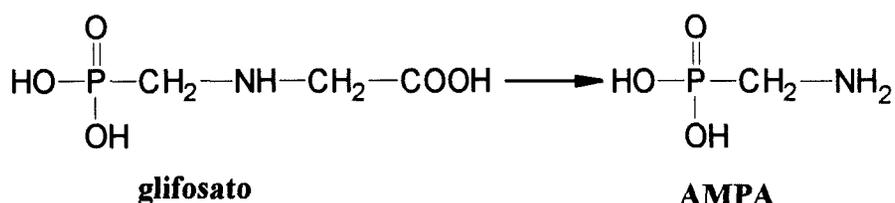


Figura 59. Biosíntesis de aminoácidos aromáticos. Modo de acción del herbicida glifosato.

En una primera etapa se obtiene el ácido shikímico, que origina posteriormente ácido corísmico. Este puede seguir dos caminos: por un lado formar el ácido antranílico y, seguidamente, triptófano y ácido indolacético o auxina; por otro, producir el ácido prefénico, que conduce a los aminoácidos naturales, tirosina y fenilalanina. Así, el ácido corísmico se convierte en el compuesto clave para la obtención de los aminoácidos aromáticos. El glifosato actúa inhibiendo la formación de este ácido, lo que se traduce en una acumulación del ácido shikímico y una reducción de los niveles de corísmico, tirosina, fenilalanina y ácido indolacético.

Entre otros caminos paralelos propuestos para su acción, cabe mencionar la inhibición de la formación de clorofila, aunque ello depende de la especie vegetal de que se trate, así como de otras circunstancias diversas. Esta acción se debe a la inhibición de la formación del ácido δ -amino-levulínico, necesario para la síntesis de porfobilinógeno y de protoporfirinas. Aunque esta acción ha sido comprobada, no se considera como la mayor responsable de su acción herbicida, sino como una acción paralela, pero no decisiva.

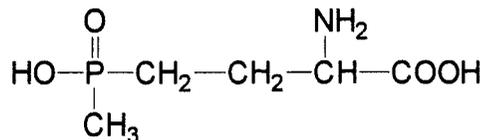
En su metabolismo, el glifosato se degrada biológicamente para producir como metabolito principal el ácido aminometilfosfónico (AMPA), lo cual ha sido comprobado bajo condiciones de laboratorio en suelo no estériles y húmedos (Nomura y Hilton, 1977; Torstenson y Aamisepp, 1977; Rueppel, 1977). Este último continúa degradándose a productos todavía no identificados.



Aplicado al suelo, se inactiva y es fuertemente adsorbido por arcillas y materia orgánica (Hance, 1976; Spann y Hargreaves, 1994), pero la causa principal de su desaparición en el suelo es la presencia de distintos microorganismos que lo degradan con bastante facilidad.

El glifosato puede prepararse según el método de Moeritzer e Irani (1969) por la reacción del ácido ortofosfórico con formaldehído y glicina en presencia de ácido sulfúrico. Se han patentado varios procesos para su preparación; por ejemplo, Smith (1972) utiliza ácido N-(fosfonometil)iminodiacético, que se hidroliza por un ácido fuerte, generando glifosato con muy buen rendimiento, y, como subproductos, formaldehido, ácido glicólico y otros productos de descomposición.

Afín al glifosato, es el glufosinato que, en forma de sal amónica, muy soluble en agua, ha sido introducido en el mercado por Hoescht en 1981. Su acción parece ser distinta a la del glifosato, ya que inhibe la fotosíntesis por acumulación de iones amonio, pero se comporta como herbicida no selectivo, eficaz tanto contra mono como dicotiledóneas, es decir, con un espectro de acción muy parecido al del glifosato. Desde un punto de vista fisiológico es interesante ya que sólo se trasloca en el interior de las hojas.



Glufosinato

Nombre IUPAC: 4-(hidroxi(metil)fosfinoil)-DL-homoalanina.

En la **Tabla 52** se resumen algunas de las características más importantes de estos dos herbicidas. Se observa la elevada solubilidad en agua que presentan, siendo el glufosinato aproximadamente mil veces más soluble que el glifosato. Ambos presentan toxicidades muy bajas, inferiores a las de los herbicidas fenoxiácidos estudiados en el capítulo anterior.

En cuanto al carácter ácido-base, Sprankle (1975) muestra las diferentes especies ácido-base del glifosato,

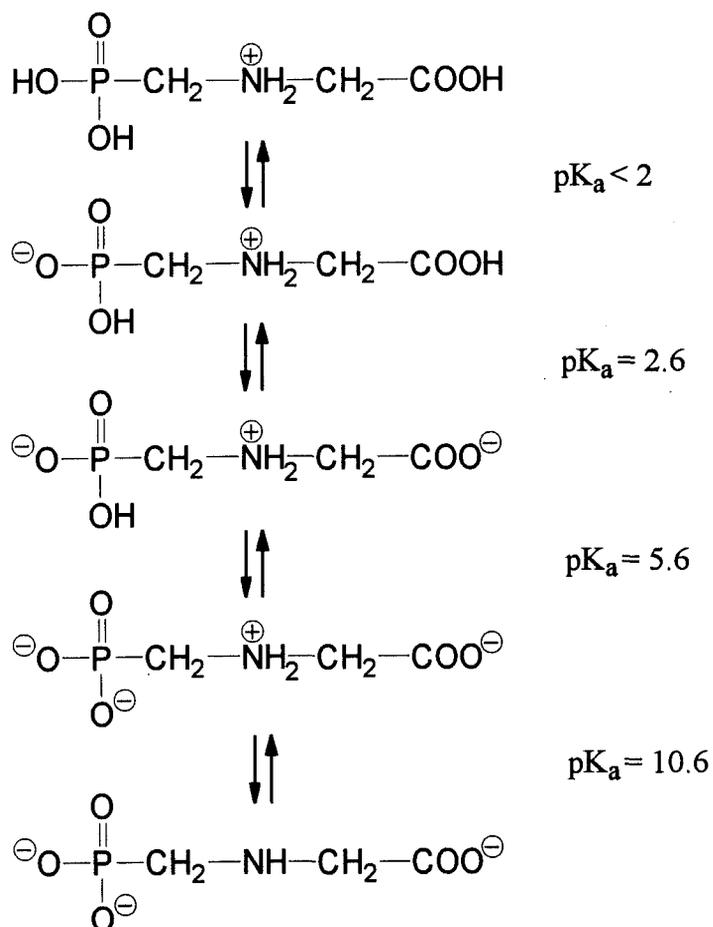


Tabla 52. Características físico-químicas más importantes de los herbicidas glifosato y glufosinato (Pesticide Manual, 1991).

Nombre	Estructura Química Nomenclatura (IUPAC)	Sol. en H ₂ O (g l ⁻¹)	Formulados	Toxicidad
Glifosato	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{COOH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$ <p><i>N</i>-(fosfonometil)glicina</p>	12	sal isopropilamina <i>Roundup Ultrabax, Sting</i> <i>SE, Stirrup, Spasor,</i> <i>Fusta y Rival</i> (Monsanto) <i>Herbalex ULV y Sable</i> (Aragonesas)	LD ₅₀ (mg/kg) 5600 LC ₅₀ (mg/l) 86
Glufosinato	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{HO}-\text{P}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \quad \\ \text{CH}_3 \quad \text{NH}_2 \end{array}$ <p>4-(hidroxi(metil)fosfinoil)-DL-homoalanina.</p>	1400	sal amónica <i>Finale</i> (Argos)	LD ₅₀ (mg/kg) 2000 LC ₅₀ (mg/l) 320

I.2. Glifosato y glufosinato en el medio ambiente.

En primer lugar, cabe indicar que en comparación con los herbicidas fenoxiácidos, tratados en el capítulo anterior, hay pocos datos disponibles para estos herbicidas. En cuanto al glufosinato no se han encontrado referencias bibliográficas sobre su presencia y comportamiento en el medio ambiente. El glifosato ha sido más estudiado, pero a pesar de ello no existen datos suficientes para evaluar su impacto sobre el medio ambiente.

Por ejemplo, el glifosato aparece en la **Tabla 1** al ser considerado como un compuesto que se utiliza en grandes cantidades y que presenta una movilidad intermedia o alta. Sin embargo, no se ha encontrado en aguas subterráneas según indican Fielding *et al.* (1992) probablemente debido a la no disponibilidad de un método analítico adecuado. Además, también se ha cuestionado la validez en la predicción de su movilidad.

Por lo que respecta a la movilidad de este herbicida 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. En la bibliografía se encuentran valores de $T_{0.5}$ de 38 días, mientras que el valor de K_{oc} es $98 \text{ ml}\cdot\text{g}^{-1}$ (Fielding *et al.*, 1992), lo que genera un índice GUS de 3.17, clasificándose de movilidad alta. Este valor obtenido para el índice GUS no es representativo del comportamiento del glifosato en el suelo, ya que se sabe que no se adsorbe a la materia orgánica, sino a los componentes inorgánicos del suelo, por lo que los valores de K_{oc} obtenidos para el glifosato pueden variar enormemente en función de la composición del mismo, especialmente en cuanto al contenido de arcillas.

En la **Tabla 53** se muestran los valores de índice GUS calculados a partir de los valores de K_{oc} para distintos tipos de suelos, obtenidos por nuestro grupo de trabajo así como a partir de la bibliografía, utilizando el valor de $T_{0.5}$ de 38 días.

Como se puede observar, el índice GUS presenta variaciones tan grandes para el glifosato que las predicciones que se puedan realizar con este modelo no parecen acertadas. El índice GUS parece más adecuado para predecir la movilidad de aquellos pesticidas cuya adsorción sobre el suelo sea principalmente debida a la materia orgánica presente en el mismo, y no para compuestos iónicos cuya adsorción es preferencial sobre los componentes inorgánicos del suelo, fundamentalmente arcillas, y está influenciada por la presencia de cationes inorgánicos como Al^{3+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , etc. con los que puede formar especies complejas (Sprinkle *et al.*, 1975; Hance, 1976; Nomura y Hilton, 1977; Glass, 1984, 1987; McConnel y Hossner, 1985).

Tabla 53. Valores del índice GUS para el glifosato en diferentes suelos.

Suelo	pH	K _d	OC (%)	K _{oc}	GUS	Referencia
1	8.18	25	0.70	3571	0.71	Hernández, 1994
2	6.31	60	0.1	60000	-1.23	Hernández, 1994
3	5.56	149	0.89	16741	-0.35	Beltran y Gerritse, 1994
4	5.54	4888	0.13	3760000	-4.07	Beltran y Gerritse, 1994
5	3.35	1.4	2.89	48.4	3.66	Beltran y Gerritse, 1994
6	3.34	0.7	0.29	241.4	2.55	Beltran y Gerritse, 1994
7	3.26	0.7	0.36	194.4	2.70	Beltran y Gerritse, 1994
8	7.5	76	1.56	4871	0.49	Glass, 1987
9	5.8	56	1.64	3415	0.74	Glass, 1987
10	5.6	33	1.24	2661	0.91	Glass, 1987

1. IRTA, Cabrils, Barcelona (0-30 cm).

2. IRTA, Cabrils, Barcelona (70-100 cm).

3. Nangara-1, Perth, Australia (0-5 cm).

4. Nangara-1, Perth, Australia (120-140 cm).

5. Nangara-2, Perth, Australia (0-20 cm).

6. Nangara-2, Perth, Australia (120 cm).

7. Nangara-2, Perth, Australia (200 cm).

8. Texas, EEUU.

9. Ohio, EEUU.

10. Marieland, EEUU.

Por lo que respecta a la no disponibilidad de un método analítico adecuado para la determinación de residuos de glifosato a nivel de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, hay que comentar que el procedimiento descrito en la actualidad resulta muy laborioso para conseguir un límite de detección del orden de $0.08 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ya que se debe concentrar mediante evaporación 1 litro de muestra de agua hasta 20 ml y realizar posteriormente una purificación sobre columna de

intercambio iónico, para finalmente volver a concentrar el extracto obtenido mediante evaporación hasta 5 ml (HMSO, 1985). Como se observa, el procedimiento descrito no parece muy apropiado para realizar programas de control, donde se deben procesar un número elevado de muestras. Hasta que no se disponga de un método rápido, sensible y selectivo para la determinación de glifosato en aguas, difícilmente podrá ser considerado en los programas de vigilancia de la contaminación de las aguas.

I.3. Análisis de residuos de los herbicidas glifosato y glufosinato. Antecedentes.

A continuación, se presenta la información que aparece en la bibliografía sobre el análisis de residuos de estos herbicidas en diferentes tipos de muestras. En todos los casos los trabajos son bastante recientes debido a que la comercialización de estos productos no se realizó hasta 1970-1980 y, además, la mayoría corresponden al análisis del glifosato así como a su metabolito principal, el ácido aminometilfosfónico (AMPA). Por lo que respecta al herbicida glufosinato, no se ha encontrado en la bibliografía ningún trabajo que realice una determinación de residuos de este compuesto en muestras medioambientales, a excepción del propuesto por el fabricante (Hoescht), recogido en un manual de residuos de pesticidas alemán (DFG, 1992b).

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

Tipos de Muestras.

a) Productos vegetales. Sólo se pueden estudiar sobre plantas de interés (espárragos, fresas, kiwis, etc.) que hayan sufrido una exposición involuntaria al herbicida.

En la **Tabla 54** se resume la información más relevante obtenida de la bibliografía.

Los procedimientos descritos utilizan una extracción con $H_2O/CHCl_3$ (Roseboom y Berkhoff, 1982; Moye *et al.*, 1983; Seiber *et al.*, 1984, Tuinstra y Kienhuis, 1987, Wigfield y Lanouette, 1991) o sólo H_2O (Guinivan *et al.*, 1982; DFG, 1992b), aunque también se ha utilizado una mezcla HCl 0.1M/ $CHCl_3$ (Cowell *et al.*, 1986; BioRad, 1990, DFG, 1992a) e incluso sólo HCl 0.25M a reflujo de $100^\circ C$ (Archer y Stokes, 1984).

Tras la extracción inicial, se aplican generalmente dos etapas de purificación: la primera, generalmente, sobre una resina de intercambio catiónico (Roseboom y Berkhoff, 1982; Moye *et al.*, 1983; Archer y Stokes, 1984; Cowell *et al.*, 1986, BioRad, 1990; Wigfield y Lanouette, 1991; DFG, 1992a), por la que se pasa el extracto ácido obtenido, eluyéndose con HCl de concentración elevada o simplemente con un volumen elevado de agua; la segunda, sobre una resina de intercambio aniónico, por la que se pasa el extracto obtenido anteriormente. Si éste es ácido se recoge directamente, mientras que si es neutro o se basifica previamente se deben eluir los analitos con disolución ácida. En algunos casos, también se ha utilizado la cromatografía de permeación de gel (GPC) como técnica de purificación (Guinivan *et al.*, 1982; Seiber *et al.*, 1984).

Tabla 54. Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en productos vegetales.

Compuesto analizado	Extracción	Purificación	Análisis	Referencia
glifosato AMPA	15 g muestra + 100 ml H ₂ O + 50 ml CHCl ₃	Intercambio catiónico	HPLC/FD derivatización pre-columna FMOC	Roseboom y Berkhoff, 1982
glifosato AMPA	25 g muestra + 2x100 ml H ₂ O	GPC + Intercambio catiónico	CG/ECD derivatización precolumna con 2-cloroetanol y anhídrido heptafluorobutírico.	Guinivan <i>et al.</i> , 1982
glifosato AMPA	25 g muestra + 50 ml H ₂ O + 25 ml CHCl ₃	Intercambio catiónico	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	Moye <i>et al.</i> , 1983
glifosato	15 g muestra + 3x45 ml HCl 0.25M. Reflujo, 100 °C, 15min	Intercambio catiónico + Intercambio aniónico	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	Archer y Stokes, 1984
glifosato	20 g muestra + 100 ml H ₂ O + 30 ml CHCl ₃	Intercambio aniónico + GPC Purificación silicagel	CG/FPD derivatización precolumna con anhídrido trifluoroacético y diazometano	Seiber <i>et al.</i> , 1984
glifosato AMPA	30 g muestra + 150 ml HCl 0.1M + 50 ml CHCl ₃	Intercambio catiónico + Intercambio aniónico	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	Cowell <i>et al.</i> , 1986 BioRad, 1990 DFG, 1992a

Compuesto analizado	Extracción	Purificación	Análisis	Referencia
glifosato	10 g muestra + 100 ml H ₂ O + 50 ml CHCl ₃		PC-CL/FD derivatización post-columna OPA/ME	Tuinstra y Kienhuis, 1987
glifosato AMPA	12 g muestra + 150 ml H ₂ O + 50 ml CHCl ₃	Intercambio catiónico + Intercambio aniónico	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	Wigfield y Lanouette, 1991
glufosinato	25 g muestra + 200 ml H ₂ O	Intercambio aniónico Purificación silicagel	CG/FPD derivatización con trimetilortoacetato	DFG, 1992b

Finalmente, siempre hay que llevar a cabo una etapa de concentración para compensar todas las diluciones realizadas en las etapas de purificación. Simplemente se concentra el volumen del extracto obtenido en rotavapor a una temperatura muy suave, entre 40 y 60°C.

b) Suelos. El análisis de los herbicidas glifosato y glufosinato, como el de otro tipo de herbicidas, en suelos tiene su interés principal en que la gran mayoría del producto aplicado en el campo incide directamente sobre el mismo contaminándolo. La movilidad y persistencia del herbicida en este medio determinarán el tiempo de permanencia en el suelo y las posibilidades de contaminación del agua superficial y subterránea de las zonas próximas a los puntos de aplicación.

Para el análisis de residuos de glifosato y glufosinato en muestras de suelos se han propuesto diferentes procedimientos, basados en la agitación de la muestra de suelo con algún disolvente capaz de extraer los herbicidas del mismo. Esta agitación y las condiciones en que se lleva a cabo determinan la necesidad de realizar una purificación adicional previa a la inyección en el sistema cromatográfico, típicamente de cromatografía líquida.

En la **Tabla 55** se resume la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica realizada sobre el análisis de los herbicidas glifosato y glufosinato en muestras de suelo.

Como se observa en la **Tabla 55**, se han utilizado diferentes medios para la extracción del glifosato, generalmente disoluciones básicas como amoníaco (Thompson *et al.*, 1989; DFG, 1992a), etilendiamina (Lundgren, 1986; Eberbach y Douglas, 1991) ó hidróxidos alcalinos (Glass, 1983; Miles y Moye, 1988; Aubin y Smith, 1992; Spann y Hargreaves, 1994), seguida de la purificación del extracto mediante intercambio iónico, tanto catiónico como aniónico, y posterior concentración por evaporación en rotavapor.

Cabe destacar el uso de agua para la extracción del glufosinato en muestras de suelo, lo cual podría explicarse por la elevada solubilidad del glufosinato, aproximadamente 1400 g·l⁻¹, siendo uno de los pesticidas más solubles en agua.

Tabla 55. Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en suelos.

Compuesto analizado	Extracción	Purificación	Análisis	Referencia
glifosato	30 g suelo + 50 ml NaOH 0.1M (60 min)	Intercambio catiónico	HPLC/FD derivatización pre-columna FMOC	Glass, 1983
glifosato AMPA	3.5 g suelo + 30 ml etilendiamina 0.1M	Intercambio aniónico	HPLC/UV derivatización pre-columna 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno	Lundgren, 1986
glifosato	2 g suelo + 3x10 ml KOH 0.1M		HPLC/FD derivatización pre-columna FMOC	Miles y Moye, 1988
glifosato AMPA	25 g suelo + 3x100 ml KH ₂ PO ₄ 0.1M		HPLC/FD derivatización pre-columna FMOC	Miles y Moye, 1988
glifosato AMPA	5 g suelo + 3x150 ml NH ₃	Intercambio aniónico + Intercambio catiónico	HPLC/UV derivatización post-columna ninhidrina	Thompson <i>et al.</i> , 1989
glifosato AMPA	3.5 g suelo + 30 ml etilendiamina 0.1M	Intercambio aniónico + Intercambio catiónico	CG/ECD derivatización con trifluoetanol + anhídrido trifluoroacético.	Eberbach y Douglas, 1991
glifosato	5 g suelo + 12.5 ml NaOH 0.1M (60 min)		Técnicas radioquímicas	Aubin y Smith, 1992

Compuesto analizado	Extracción	Purificación	Análisis	Referencia
glifosato AMPA	25 g suelo + 3x150 ml NH ₄ OH.	Intercambio catiónico + Intercambio aniónico	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	DFG, 1992a
glifosato	20 g suelo + 2x150 ml KOH 0.1M (16h)	Intercambio catiónico	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	Spann y Hargreaves, 1994
glufosinato	25 g muestra + 200 ml H ₂ O (30 min)	Intercambio aniónico Purificación silicagel	CG/FPD derivatización con trimetilortoacetato	DFG, 1992b

Como ya se ha indicado anteriormente, el glifosato se adsorbe fuertemente, a través del grupo fosfónico, a los minerales arcillosos (Sprankle *et al.*, 1975; Hance, 1976). Aunque se han descrito varios procedimientos de extracción, las recuperaciones son bajas y oscilan considerablemente según el tipo de suelo estudiado, disminuyendo cuando el contenido de arcillas aumenta (Glass, 1983), estando también influenciadas por el pH y la naturaleza del catión de la arcilla (McConnell y Hossner, 1986; Glass, 1987). Miles y Moye (1988) llegaron a la conclusión de que la extracción del glifosato mejora al aumentar el pH y la fuerza iónica del extractante. También se han estudiado como extractantes disoluciones de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 ya que, como se ha comentado, el fosfato puede competir con el glifosato por puntos activos de la superficie del suelo (Aubin y Smith, 1992). Por último, cabe comentar que los estudios de recuperación se realizan en todos los casos a niveles entre 0.5 y 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, concentraciones muy superiores a las esperadas en las muestras de suelo.

c) **Aguas.** Una matriz importante para la que se han desarrollado varios procedimientos de análisis de residuos de estos herbicidas es el agua, incluyendo agua potable, superficial, subterránea, etc. Ya se ha mencionado anteriormente que, debido a la elevada polaridad y solubilidad de estos herbicidas, son objeto de preocupación por las posibilidades de contaminación de las aguas.

En la **Tabla 56** se resume la información obtenida a partir de la revisión bibliográfica realizada.

Para la determinación de glifosato y glufosinato en aguas, en muchos casos, se lleva a cabo una purificación de la muestra mediante intercambio catiónico y aniónico (HMSO, 1985; Cowell *et al.*, 1986; Wigfield y Lanouette, 1990; DFG, 1992a, 1992b). En ocasiones, basta simplemente con concentrar la muestra mediante evaporación (Miles *et al.*, 1986; Oppenhuizen y Cowell, 1991) o, sencillamente, realizar una inyección directa de la muestra en el sistema cromatográfico (Winfield *et al.*, 1990).

Tabla 56. Análisis de residuos de glifosato y glufosinato en aguas.

Compuesto analizado	Tratamiento de la muestra	Fortificación Rec. (%)	Análisis	Referencia
glifosato	1000 ml agua Rotavapor, $V_f = 20$ ml Intercambio catiónico Rotavapor 50°C , $V_f = 5$ ml	$1-10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (73-75)	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	HMSO, 1985
glifosato AMPA	100 ml agua + 1 ml K_2HPO_4 0.1M Rotavapor 50°C , $V_f = 5$ ml	$10 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (111)	HPLC/FD derivatización pre- columna FMOC	Miles <i>et al.</i> , 1986
glifosato AMPA	100 ml agua a pH 2.0 intercambio catiónico + intercambio aniónico Rotavapor 50°C , $V_f = 2$ ml	$50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (83-87)	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	Cowell <i>et al.</i> , 1986
glifosato		$25-2500 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (96-103)	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	Winfield <i>et al.</i> , 1990
glifosato AMPA	250 ml agua, lavado con 100 ml diclorometano EFS aniónica, elución con 10 ml citrato 0.2M	$6 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (84.6)	HPLC/FD derivatización post- columna OPA/ME	Wigfield y Lanouette, 1990

Compuesto analizado	Tratamiento de la muestra	Fortificación Rec. (%)	Análisis	Referencia
glifosato AMPA	250 ml agua + 10 ml HCl Rotavapor 50°C, V _f = 3 ml	0.5 µg·l ⁻¹ (120 ± 20)	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	Oppenhuizen y Cowell, 1991
glifosato AMPA	2000 ml agua a pH 2.0 intercambio catiónico + intercambio aniónico Rotavapor 50°C, V _f = 5 ml	0.1-2500 µg·l ⁻¹ (77-138)	HPLC/FD derivatización post-columna OPA/ME	DFG, 1992a
glufosinato	1000 ml agua intercambio catiónico + intercambio aniónico Elución 70 ml fórmico Rotavapor 60°C, V _f = 1.5 ml	LOD 0.05 µg·l ⁻¹	CG/FPD derivatización con trimetilortoacetato	DFG, 1992b

Como se puede observar a partir de la **Tabla 56**, casi todos los trabajos utilizan cromatografía líquida, a excepción de la determinación de glufosinato, que se realiza mediante cromatografía de gases. El glifosato se ha determinado, generalmente, mediante derivatización postcolumna con OPA/ME y detección fluorescente. Este método de análisis presenta un límite de detección, por inyección directa de 200 μl de muestra de agua, del orden de 6-9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Winfield *et al.*, 1990), suficiente para estos autores americanos que desarrollan métodos que cumplan con la legislación dictada por la EPA, menos estricta que la Directiva comunitaria en cuanto a niveles máximos permitidos en aguas potables.

Si se desean alcanzar menores límites de detección, se debe realizar una etapa de concentración que, debido a la elevada solubilidad en agua de estos herbicidas y al ser compuestos ionizables, generalmente se realiza mediante evaporación en rotavapor a temperaturas suaves, entre 20° y 60°C. Esta etapa aumenta considerablemente el tiempo de análisis, ya que los volúmenes de muestra de agua que se deben concentrar son bastante elevados para disminuir los límites de detección (100 - 1000 ml). Además, al utilizar derivatización postcolumna, la separación cromatográfica del glifosato y AMPA se realiza mediante columna de intercambio iónico, por lo que generalmente se debe realizar una purificación de la muestra utilizando cromatografía preparativa en columna con resinas de intercambio, que genera fracciones de elevado volumen (20 - 100 ml) que hay que volver a concentrar por evaporación, lo que incrementa todavía más el tiempo de análisis. Por todo ello, los procedimientos son largos y tediosos, con poca capacidad de análisis, y no muy adecuados para realizar programas de control de contaminación.

Entre los procedimientos descritos, tan sólo se alcanzan límites de detección inferiores a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en dos de ellos (HMSO, 1985; DFG, 1992a), pero para ello toman 1000 y 2000 ml de muestra, respectivamente. Además, las recuperaciones que obtienen a estos niveles no son totalmente cuantitativas (73 y 77%, respectivamente). Oppenhuizen y Cowell (1991) obtienen recuperaciones para glifosato en muestras de agua fortificadas a 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de 124% con un RSD de 50%, mientras que para el AMPA la recuperación es del 202% y la RSD del 162%. Otros autores, que realizan estudios de recuperación a niveles más elevados (6 - 50 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), presentan recuperaciones para glifosato entre 84.6 - 111% con RSD entre 6 - 12% y para AMPA entre 80 - 88.4% con RSD entre 8 - 16%. Por lo tanto, no existen métodos rápidos y sensibles, con elevada capacidad de análisis, para la determinación de residuos de glifosato y AMPA en muestras de aguas.

Respecto a la determinación de residuos de glufosinato, quizás debido a su posterior comercialización y su todavía no tan extensa aplicación en comparación con el glifosato, la información sobre metodologías analíticas es pobre respecto a la existente para glifosato.

Por ejemplo, manuales oficiales de análisis de residuos de pesticidas (Pesticide Manual, 1991; Greve, 1988) indican sólo el método suministrado por el fabricante (Hoescht, 1983). Una modificación de este método (Sochor *et al.*, 1988) se ha incluido en manuales oficiales alemanes (DFG, 1992a).

El procedimiento consiste en pasar un litro de muestra de agua sin acidificar por dos columnas de intercambio iónico conectadas en serie, de modo que el eluato del intercambiador catiónico fluya directamente sobre la columna de intercambio aniónico, a un flujo entre 5-10 ml/min. Se lavan ambas columnas con 100 ml de agua, descartándose todos los eluatos. El glufosinato se eluye de la columna de intercambio aniónico con 70 ml de ácido fórmico (1:10), recogiéndolos en un matraz de fondo redondo, llevándose hasta sequedad a 60°C. Se añaden 10 ml de acetato de etilo y se evapora a sequedad para eliminar trazas de agua. El residuo se suspende en 2 ml de ácido acético glacial y se añaden 8 ml de trimetil ortoacetato, dejándose a reflujo durante 4 h. Posteriormente, se añaden 15 ml de tolueno y se evapora a sequedad para eliminar restos de acético y agente derivatizante. Finalmente, el residuo se disuelve en acetato de metilo/tolueno (7:3) y se purifica mediante cromatografía preparativa sobre silicagel, eluyéndose con 5 ml de acetato de metilo/metanol (1:1). Los 5 ml de eluato se evaporan hasta casi sequedad bajo corriente de nitrógeno y se llevan a un volumen final de 1.5 ml en acetato de metilo/metanol (1:1), inyectándose 5 μ l en el CG/FPD.

Como se puede observar, el procedimiento descrito para la determinación de residuos de glufosinato en aguas, aunque presenta un límite de detección de 0.05 μ g·l⁻¹, es extremadamente largo y tedioso, con muy baja capacidad de análisis. Hacen falta métodos de similar sensibilidad, pero mucho más selectivos y rápidos, con la elevada capacidad de análisis necesaria para realizar estudios de control de contaminación.

Técnicas de análisis.

La técnica más utilizada para la determinación de residuos de los herbicidas glifosato y glufosinato es la cromatografía, tanto de gases como de líquidos. Para la primera, se deben desarrollar reacciones de derivatización de los herbicidas previas a su inyección en un cromatógrafo de gases, debido a su baja volatilidad y alta termolabilidad. En el caso de utilizar cromatografía líquida, no es necesario realizar dicha prederivatización y los compuestos se pueden inyectar directamente en el cromatógrafo si se utiliza derivatización postcolumna.

Así pues, se pueden distinguir dos tendencias: la cromatografía de gases, menos idónea, y la cromatografía líquida, más actual, que ofrece las ventajas de alta flexibilidad, versatilidad y rapidez.

a) Cromatografía de gases. El primer paso para la utilización de la cromatografía de gases en el análisis de residuos de glifosato y glufosinato es la etapa de prederivatización de los analitos. Para ello se han propuesto una variedad de agentes derivatizantes, dirigidos a la obtención de derivados fluorados (muy sensibles al detector ECD) para el glifosato, mientras que para el glufosinato sólo está descrita una derivatización con ortoacetato.

Para llevar a cabo la derivatización del glifosato, así como su principal metabolito AMPA, se han utilizado reactivos que aportan flúor, como el anhídrido trifluoroacético (Seiber *et al.*, 1984; Eberbach y Douglas, 1991) o el anhídrido heptafluorobutírico (Guinivan *et al.*, 1982), junto con agentes alquilantes como $\text{BCl}_3/\text{CH}_2\text{ClCH}_2\text{OH}$ (Guinivan *et al.*, 1982), diazometano (Seiber *et al.*, 1984) y trifluoroetanol (Eberbach y Douglas, 1991).

La derivatización del glufosinato se ha efectuado con trimetilortoacetato (DFG, 1992b) en medio acético a reflujo durante 4h, realizándose una purificación posterior sobre silicagel.

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 (Guinivan *et al.*, 1982; Eberbach y Douglas, 1991). También se han realizado intentos con otros detectores como el FPD en modo P (Seiber *et al.*, 1984; DFG, 1992b), basándose en la presencia del átomo de fósforo del grupo fosfónico en la molécula de los herbicidas.

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, bien de la muestra o bien del extracto correspondiente, en el sistema cromatográfico sin necesidad de derivatización previa, ya que ésta se puede realizar de modo automático, tanto en precolumna como postcolumna. La derivatización en cromatografía líquida es necesaria para aumentar la respuesta del analito al sistema de detección, ya que su señal utilizando detección UV convencional es muy pobre. Generalmente, se realizan reacciones que generen derivados fluorescentes, ya que el detector de fluorescencia es más sensible y selectivo que el UV, aunque también existen reacciones de derivatización que generan derivados con fuertes grupos cromóforos.

b.1) Derivatización postcolumna. Debido a su carácter ácido-base, el glifosato se puede cromatografiar sobre una columna de intercambio catiónico fuerte, tipo Aminex A-27 ó A-9 (Moye *et al.*, 1983; Archer y Stokes, 1984; HMSO, 1985; Cowell *et al.*, 1986; Tuinstra y Kienhuis, 1987; Thompson *et al.*, 1989; BioRad, 1990; Winfield *et al.*, 1990; Wigfield y Lanouette, 1990, 1991; Oppenhuizen y Cowell, 1991; DFG, 1992a; Spann y Hargreaves, 1994) con una fase móvil con tampón fosfato a pH próximo a 2. En este caso, una vez efectuada la separación, se debe derivatizar el analito en postcolumna, siendo la reacción más utilizada la de ortoftalaldehído-2-mercaptoetanol (OPA/2-ME). Para ello, se requiere una hidrólisis previa del herbicida glifosato con hipoclorito cálcico para obtener una amina primaria que reacciona con el OPA/2-ME para generar un isoindol sustituido altamente fluorescente.

En la **Figura 60** se muestra un esquema del instrumental implicado en la derivatización postcolumna del glifosato con OPA/2-ME. Se deben optimizar los flujos de hipoclorito y reactivo OPA, así como la longitud de los reactores y su temperatura. Los valores medios de flujo oscilan entre 0.3-0.5 ml·min⁻¹, mientras que el volumen del reactor oscila alrededor de 1 ml y su temperatura es de 38°C.

El isoindol obtenido se determina mediante detección por fluorescencia, con una $\lambda_{\text{ex}}=230$ nm y $\lambda_{\text{em}}=418$ nm (Archer y Stokes, 1984; Wigfield y Lanouette, 1990, 1991) ó una $\lambda_{\text{ex}} = 340-360$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 440-455$ nm (Moye *et al.*, 1983; HMSO, 1985; Cowell *et al.*, 1986; Tuinstra y Kienhuis, 1987; BioRad, 1990; Winfield *et al.*, 1990; Oppenhuizen y Cowell, 1991; DFG, 1992a; Spann y Hargreaves, 1994)

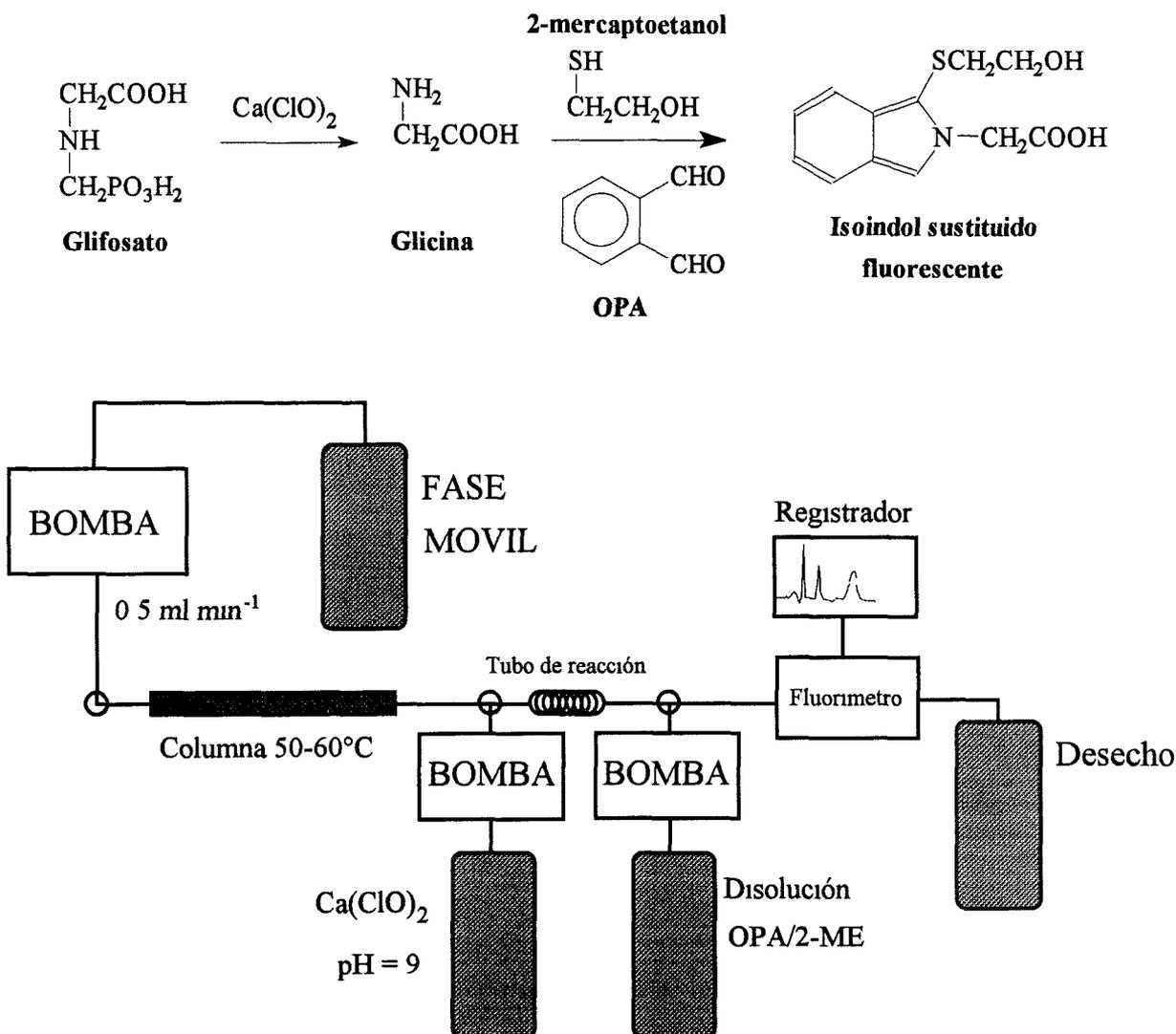


Figura 60. Reacción de derivatización postcolumna del glifosato mediante el reactivo OPA/2-ME y representación esquemática del equipo usado para la determinación de glifosato y AMPA.

También se han utilizado otras reacciones en postcolumna, además de la OPA/2-ME, como la reacción con ninhidrina (Yemm y Cocking, 1955), para formar, en un sólo paso, un derivado coloreado a una temperatura de 100°C que se detecta por UV/Vis a 570 nm (Thompson *et al.*, 1989).

b.2) Derivatización precolumna. El único trabajo descrito para el análisis del glufosinato por cromatografía líquida se debe a Fiedler *et al.* (1986) y lo determina junto con el antibiótico Glufo-Ala-Ala, basándose en la derivatización automática en precolumna con OPA/2-ME y separación mediante cromatografía líquida "microbore" con gradiente metanol/acetato sódico 0.1M y detección UV a 338 nm. Este trabajo se encuentra más dirigido al análisis en muestras biológicas que en medioambientales, ya que el glufosinato, además de su acción herbicida, también presenta acción antibiótica, denominándose entonces como fosfotricin, siendo activo contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como frente a los hongos. El fosfotricin se transporta al interior de la célula de la bacteria en forma del tripéptido fosfotricil-alanil-alanina, donde se libera el ácido libre, que produce una potente inhibición sobre la glutamina sintetasa.

En la búsqueda bibliográfica no se ha encontrado ningún trabajo sobre análisis de glufosinato en matrices medioambientales por cromatografía líquida.

Por lo que respecta al glifosato, se han utilizado diferentes reactivos derivatizantes, todos ellos en modo off-line, ya que los aductos formados presentan buena estabilidad y no es necesario llevar a cabo la reacción de derivatización en modo on-line. Los reactivos utilizados han sido: 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) (Moye y Boning, 1979; Roseboom y Berkhoff, 1982; Glass, 1983; Miles *et al.*, 1986; Miles y Moye 1988), 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno (Lundgren, 1986), fenilisotiocianato (PITC) (Powell *et al.*, 1990) y cloruro de tosilo (Kawai *et al.*, 1991).

De todos ellos, el reactivo más utilizado ha sido, sin duda, el FMOC que reacciona a temperatura ambiente tanto con aminas primarias (al igual que OPA/2-ME) como con secundarias, por lo que presenta la ventaja de no necesitar una hidrólisis previa para la determinación del glifosato (amina secundaria). La reacción se lleva a cabo en medio tamponado borato, con tiempos de reacción entre 20-30 min (**Figura 61**). La única desventaja aparente consiste en la propia fluorescencia del reactivo, por lo que se debe eliminar mediante extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico, como éter etílico o acetato de etilo, antes de la inyección del derivado fluorescente obtenido en el sistema cromatográfico.

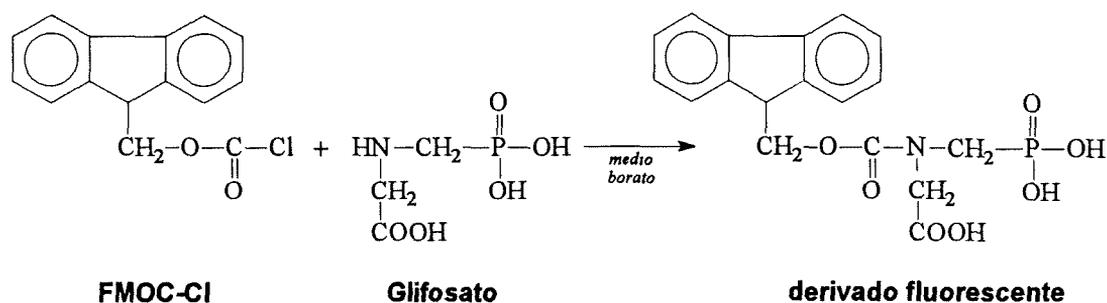


Figura 61. Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y el Fmoc.

La separación de los derivados formados se lleva cabo, generalmente, mediante una columna de intercambio aniónico débil (tipo amino) (Roseboom y Berkhoff, 1982; Glass, 1983; Miles *et al.*, 1986; Miles y Moye, 1988), aunque también se ha utilizado fase reversa C18 (Schuster y Gratzfeld-Hüsgen, 1992). En ambos casos, la fase móvil consiste en una mezcla tampón fosfato/acetonitrilo, donde juega un papel importante el pH y concentración del tampón. La detección se realiza mediante fluorescencia, con una $\lambda_{\text{ex}} = 254\text{-}270$ nm y $\lambda_{\text{em}} = 314$ nm, aunque también se podría detectar mediante UV a 263 nm, con la consiguiente pérdida de sensibilidad.

Los otros reactivos utilizados permiten obtener derivados sensibles al detector UV-Vis. La reacción con PITC es ampliamente conocida, ya que también se utiliza para determinar aminoácidos en diferentes muestras, y se basa en la formación de feniltiocarbamil derivados, detectables con UV a 254 nm (**Figura 62**). Se ha utilizado un montaje diseñado inicialmente para el análisis de aminoácidos (Waters Pico Tag™) adaptado para la determinación de glifosato (Powell *et al.*, 1990).

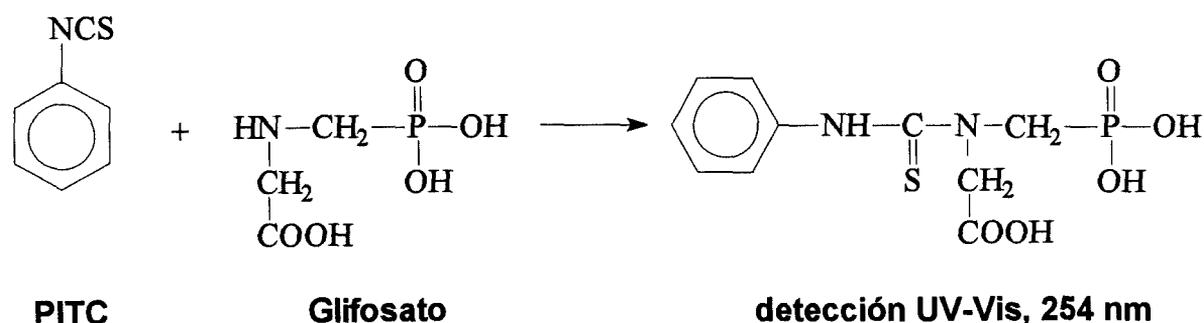


Figura 62. Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y PITC.

Otra reacción conocida utiliza el 1-fluoro-2,4-dinitrobenzénico, que reacciona con las aminas en medio borato y en la oscuridad formando un derivado que se cromatografía en fase reversa con pares iónicos, detectándose con UV-Vis a 405 nm (Lundgren, 1986) (Figura 63).

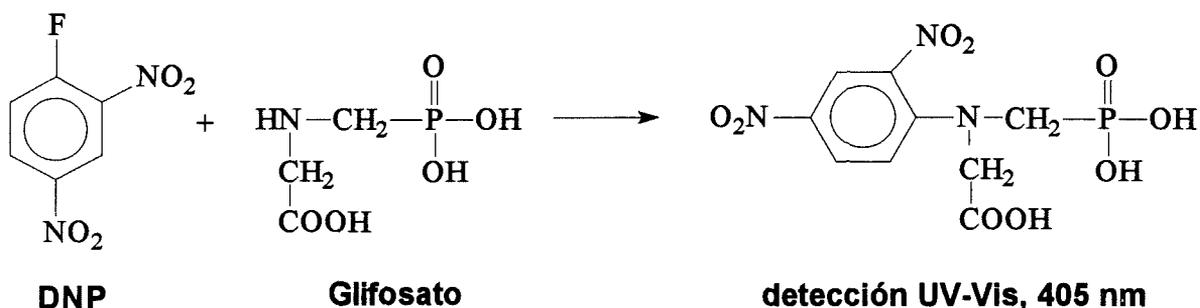


Figura 63. Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y DNP.

Por último, también se ha estudiado la posibilidad de obtener un derivado tosilado del glifosato; la reacción se lleva a cabo en medio fosfato (pH 11) y a 50°C en 5 min. La separación se realiza en fase reversa C18 con supresión iónica (pH 2.3) y detección UV a 240 nm (Figura 64).

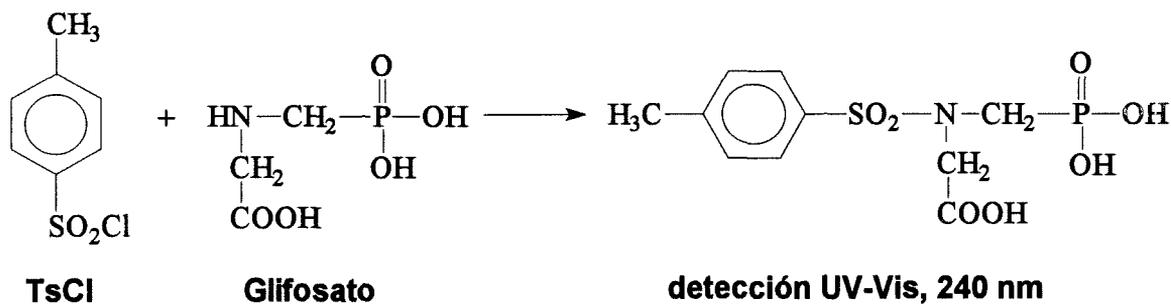


Figura 64. Reacción de derivatización precolumna entre el glifosato y el cloruro de tosilo.

A continuación, se comentan otros reactivos derivatizantes utilizados en modo precolumna para la determinación de aminoácidos, y que podrían tener aplicación para la

detección de glifosato, glufosinato y AMPA en muestras medioambientales. El más utilizado es OPA/2-ME (Lindroth y Mopper, 1979; Hill *et al.*, 1979; Umagat *et al.*, 1982; Jones y Gilligan, 1983; Einarsson *et al.*, 1983; Krishnamuti *et al.*, 1984; Godel *et al.*, 1984; Einarsson, 1985; Fiedler y Plaga, 1987; Fürst *et al.*, 1990), cuya principal desventaja radica en que sólo presenta respuesta a aminas primarias y que el tiempo de reacción es crítico ya que los aductos que se forman no son muy estables. Para solventar este problema se ha propuesto una reacción, primero con OPA/2-ME y posteriormente con FMOC, para derivatizar tanto los aminoácidos primarios como los secundarios. La detección por fluorescencia no es problemática, ya que cada derivado presenta espectros de emisión diferentes (para FMOC $\lambda_{em} = 315$ nm, mientras que para OPA 450 nm) (Einarsson, 1985).

También se ha propuesto un reactivo similar a la OPA, que sólo reacciona con aminas primarias, y que usa como nucleófilo CN^- en lugar de 2-mercaptoetanol. Se trata del naftenildialdehído (NDA) usado por Koning *et al.* (1990) para el análisis de aminoácidos y pequeños péptidos en muestras de fluido cerebroespinal formándose un derivado fluorescente.

Finalmente, como conclusión, cabe indicar que las dos técnicas más utilizadas para el análisis de residuos de estos compuestos se basan en:

- cromatografía líquida con derivatización postcolumna con OPA/2-ME.
- cromatografía líquida con derivatización precolumna con FMOC.

La primera de ellas presenta la ventaja de que el agente derivatizante no es fluorescente, mientras que la segunda utiliza un agente fluorescente que se debe eliminar antes de su llegada al sistema de detección. Esta eliminación se realiza tradicionalmente de modo "off-line" mediante extracción líquido-líquido, aunque sería mucho más rápido el método si se pudiera eliminar de modo "on-line" con el sistema cromatográfico.

Por otro lado, el reactivo OPA/2-ME presenta la desventaja de no reaccionar con aminas secundarias, por lo que se debe ampliar todavía más el montaje experimental para incluir una etapa previa de hidrólisis a la reacción de derivatización. Además, como se inyecta el analito directamente sin derivatizar, se deben utilizar columnas de intercambio catiónico, mucho más caras que las de fase enlazada, y que proporcionan picos cromatográficos anchos que se deben sumar a la difusión proporcionada por todo el montaje de hidrólisis y reacción post-columna.

D. II.- EXPERIMENTAL

II.1. Reactivos, Material y Aparatos.

Reactivos

- Agua calidad HPLC (Mod. Nanopure II, *Barnstead*).
- Disolventes orgánicos calidad HPLC: metanol, acetonitrilo (*Scharlau*).
- Disolventes orgánicos, calidad para análisis de residuos: metanol, acetona, acetato de etilo, diclorometano, hexano (*Scharlau*).
- Acido clorhídrico, ácido ortofosfórico, hidróxido sódico, hidróxido potásico, calidad para análisis (*Merck, Panreac*).
- Tetraborato disódico decahidrato, dihidrogenofosfato potásico, calidad para análisis (*Merck*).
- 9-fluorenilmetil cloroformiato (Fmoc), calidad para análisis (*Merck*).
- Patrones de glifosato y glufosinato (*Riedel de Haën*) y de ácido aminometilfosfónico (AMPA) (*Allrich*). Disoluciones stock de 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$, preparadas disolviendo 25 mg en 50 ml de agua HPLC, conservadas en congelador a -18°C . Las posteriores disoluciones de trabajo se preparan por dilución con agua HPLC, conservándose en frigorífico a 4°C . Las disoluciones de trabajo se renuevan quincenalmente.

Material

- Material volumétrico clase A (probetas, pipetas, matraces aforados, etc.).
- Material de vidrio (pipetas Pasteur, erlenmeyers, etc.).
- Micropipetas de volúmenes entre 10 y 1000 μl (*Brand*).
- Equipo de filtración de Millipore provisto de filtros de 0.45 μm de tamaño de poro y diámetro de 47 mm.
- Columnas HPLC:
 - Spherisorb ODS-2, 120 \times 4,6 mm d.i., 3 μm (*Scharlau*).
 - Microspher C18, 100 \times 4,6 mm d.i., 3 μm (*Chrompack*).
 - Spherisorb ODS-2, 30 \times 4,6 mm d.i., 3 μm (*Scharlau*).
 - Nucleosil C18, 30 \times 4,6 mm d.i., 5 μm (*Scharlau*).
 - Spherisorb ODS-2, 125 \times 4 mm d.i., 5 μm (*Hewlett Packard*).
 - Spherisorb ODS-2, 250 \times 4 mm d.i., 5 μm (*Hewlett Packard*).
 - Adsorbosphere NH_2 , 250 \times 4,6 mm d.i., 5 μm (*Alltech*).

Aparatos.

- pHmetro (*Crison*).
- Cromatógrafo líquido compuesto por dos bombas isocráticas *LKB 2150* y controlador *LKB 2152*.
- Cromatógrafo líquido *HP 1050* compuesto por una bomba cuaternaria, autoinyector y detector ultravioleta-visible de longitud de onda variable (*Hewlett Packard*).
- Integrador *HP 3396A* (*Hewlett Packard*).
- Detector de fluorescencia *HP 1046A* con convertidor analógico-digital (ADC) *HP 35900* (*Hewlett Packard*).
- Rotavapor (*Büchi*)
- Baño de ultrasonidos (*Selecta*).
- Frigoríficos y congeladores.

II.2. Determinación de residuos de glifosato y glufosinato por Cromatografía Líquida.

La determinación de glifosato (amina secundaria) y glufosinato (amina primaria) por Cromatografía Líquida requiere aplicar una etapa de derivatización química en el procedimiento de análisis. Puede optarse por una derivatización precolumna con un reactivo capaz de formar derivados con ambos (FMOC, PITC, etc.), o postcolumna con hidrólisis previa del glifosato con ClO^- y posterior reacción con OPA/2-ME.

Debido a la mayor sencillez experimental de la derivatización precolumna se ha escogido esta opción, utilizando como reactivo derivatizante FMOC, que reacciona con los dos herbicidas y permite además la detección por fluorescencia, la cual aporta una mayor selectividad y sensibilidad que la detección UV/Vis.

El procedimiento utilizado para la reacción de derivatización se basa en los trabajos de Miles *et al.* (1986) y Miles y Moye (1988), y se muestra en la **Figura 65**.

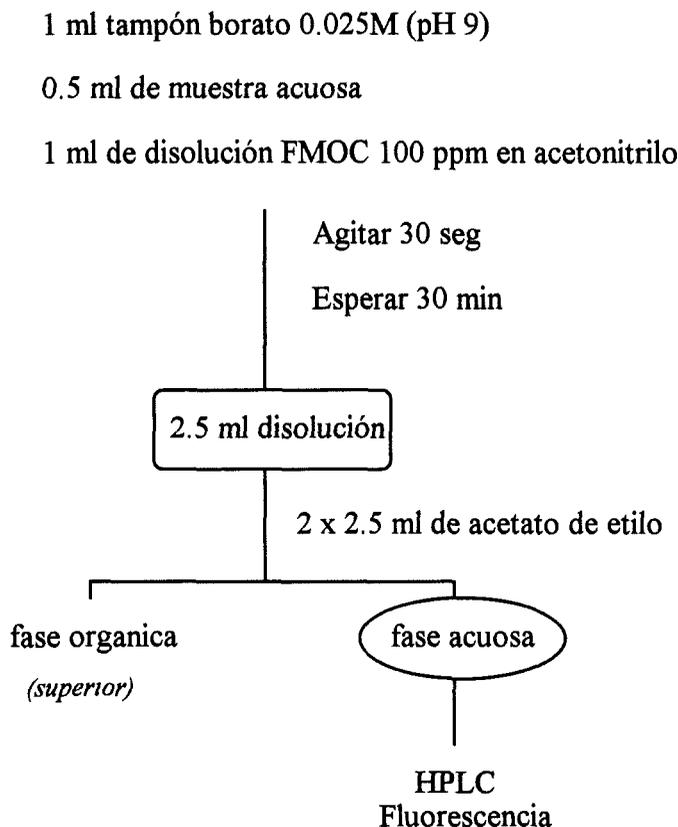


Figura 65. Procedimiento de derivatización precolumna con FMOC para el análisis de glifosato y glufosinato en muestras de agua (eliminación del exceso de reactivo por ELL).

La eliminación del exceso de reactivo derivatizante es fundamental ya que el propio FMOC es fluorescente y puede interferir en la detección posterior de los analitos. Además, si la separación se realiza en una columna con fase aminopropilsilica, es imprescindible la eliminación total del reactivo, ya que es específico de aminas y produce un deterioro inmediato de la fase estacionaria y una pérdida de retención y resolución. En el caso de utilizar una columna de fase reversa C18, aunque no es estrictamente necesaria la eliminación del exceso de FMOC, sí que es aconsejable debido a la diferente polaridad entre analitos, muy polares, y reactivo, lo que obligaría a una elución con gradiente y una etapa posterior de lavado de la columna, previa a la siguiente inyección. Con la eliminación del exceso de reactivo se posibilita una elución isocrática que resulta siempre más sencilla.

Esta eliminación se puede conseguir mediante una extracción líquido-líquido con un disolvente orgánico que arrastre el exceso de FMOC y mantenga los derivados en la fase acuosa. Se han realizado experiencias con varios disolventes (hexano, diclorometano, acetato de etilo), obteniéndose los mejores resultados con acetato de etilo, aunque con una única extracción no se elimina totalmente dicho exceso. Se estudió el número de extracciones necesarias para eliminar el exceso de FMOC, manteniendo constante la relación volumen muestra / volumen extractante (1:1). Los resultados indican que son suficientes dos extracciones para la eliminación cuantitativa del reactivo sin reaccionar.

En cuanto al tipo de columna para realizar la separación cromatográfica, la más ampliamente utilizada para estos compuestos es la de intercambio aniónico débil, tipo amino (Roseboom y Berkhoff, 1982; Glass, 1983; Miles *et al.*, 1986; Miles y Moye, 1988), aunque también se ha utilizado la de fase reversa C18 (Schuster y Gratzfeld-Hüsgen, 1992). Para este estudio, se ha escogido la columna tipo amino por ser la más usada.

Por lo que respecta a la detección, se escoge como $\lambda_{ex} = 263$ nm en base al trabajo de Miles *et al.* (1986), optimizándose la λ_{em} , que presenta un máximo a 317 nm.

II.2.1. Optimización de condiciones cromatográficas.

El estudio se lleva a cabo con una columna de fase amino de 250×4.6 mm d.i. y un tamaño de partícula de $5 \mu\text{m}$ de *Alltech*, utilizando inicialmente la fase móvil propuesta por Miles *et al.* (1986), que consiste en una mezcla de KH_2PO_4 0.05M (pH = 6) y acetonitrilo. El pH de la fase móvil se ajusta con disolución de KOH 2M.

La optimización de las condiciones cromatográficas se realiza con una disolución patrón de glufosinato, glifosato y su principal metabolito AMPA de concentración $2 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La derivatización en precolumna se lleva a cabo según el procedimiento indicado anteriormente (**Figura 65**), inyectándose $20 \mu\text{l}$ del extracto acuoso final.

En primer lugar, se estudia la influencia del contenido de modificador orgánico en la fase móvil, ensayándose entre 25 y 45% de acetonitrilo. No se contempló la posibilidad de cambiar de modificador ya que, según Miles *et al.* (1986), el uso de metanol no mejora el cromatograma. Los mejores resultados se obtuvieron para un 35% de acetonitrilo ya que, con contenidos menores los tiempos de retención eran demasiado elevados, mientras que con mayores la elución era muy rápida.

A continuación, se estudia el efecto del pH de la fase móvil manteniendo constante el contenido de acetonitrilo (35%). El pH del tampón fosfato se varió entre 3 y 7, ajustándolo con disolución de KOH 2M y HCl 1M (el pH inicial del tampón es aproximadamente 4.5). En la **Figura 66** se representan los tiempos de retención obtenidos para glifosato, glufosinato y AMPA frente al pH de la fase móvil.

Se observa que el tiempo de retención del AMPA no se ve afectado de modo importante por el pH, disminuyendo ligeramente a medida que aumenta éste. En cuanto al glifosato y glufosinato, muestran un comportamiento análogo, con un tiempo de retención máximo a pH 4. Para valores de pH inferiores y superiores el tiempo de retención disminuye drásticamente. Se escoge como pH óptimo 5.5, al cual los picos cromatográficos están totalmente resueltos con un tiempo de análisis razonable.

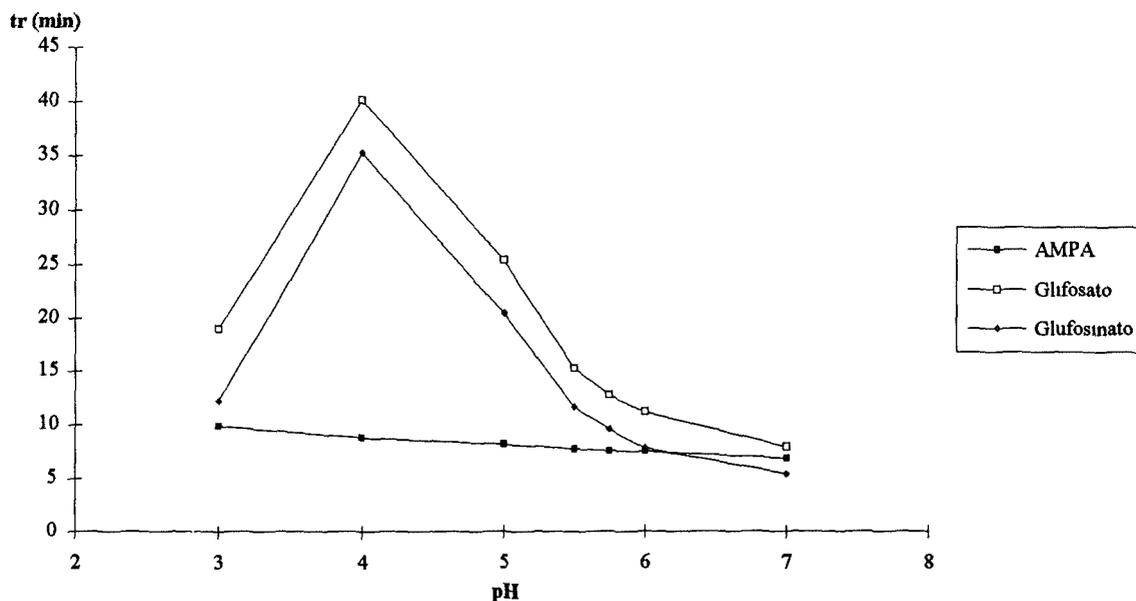


Figura 66. Variación del tiempo de retención en función del pH de la fase móvil para glufosinato, glifosato y AMPA. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH_2 , (250×4.6mm, 5 μm); fase móvil KH_2PO_4 0.05M/ CH_3CN (65:35); detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

El siguiente parámetro a optimizar es la concentración del tampón fosfato. Manteniendo constantes el pH 5.5 y un 35% de acetonitrilo, se han ensayado las siguientes concentraciones de KH_2PO_4 : 0.05, 0.025, 0.010, 0.005M. No se han estudiado concentraciones mayores por ser perjudiciales para el sistema de bombeo. En la **Figura 67** se representan los tiempos de retención de glifosato, glufosinato y AMPA frente a la concentración de KH_2PO_4 .

Se observa que a medida que disminuye la concentración de KH_2PO_4 aumenta la retención, de manera más acusada para glifosato y glufosinato, escogiéndose como concentración óptima la máxima ensayada (0.05M) que proporciona buena resolución con tiempos de análisis más cortos. Este valor coincide con el óptimo encontrado por Miles *et al.* (1986), aunque este autor utiliza un pH para la fase móvil de 6.

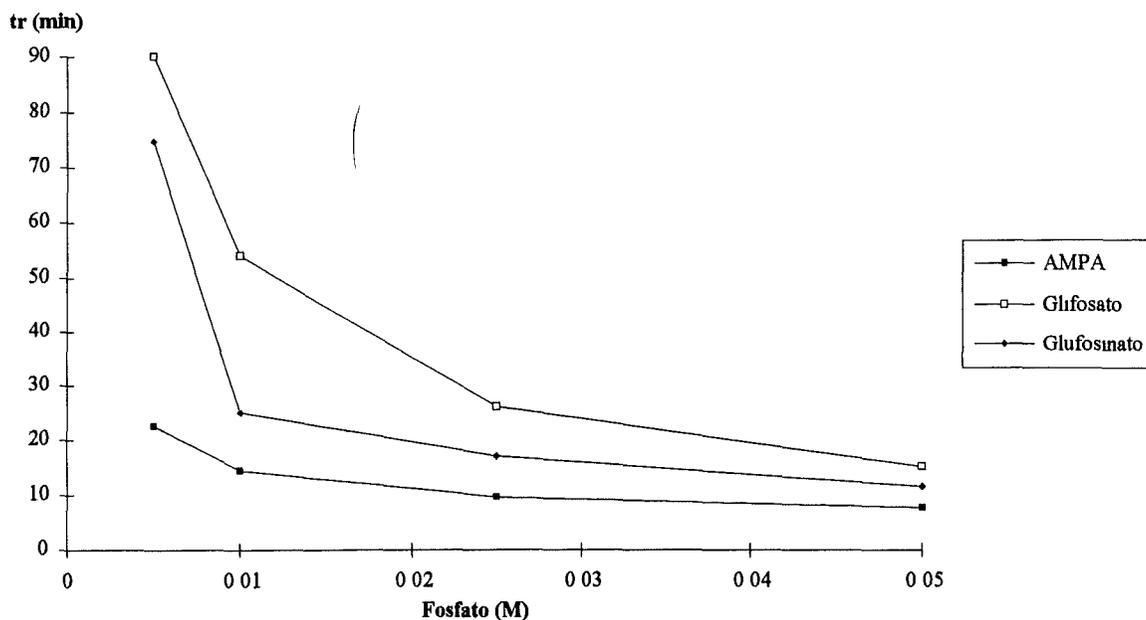


Figura 67. Variación del tiempo de retención en función de la concentración de tampón fosfato de la fase móvil para glufosinato, glifosato y AMPA. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH_2 , (250×4.6mm, 5 μm); fase móvil KH_2PO_4 0.05M/ CH_3CN (65:35); detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

Así pues, la fase móvil escogida para la separación de glifosato, glufosinato y AMPA en la columna amino es la siguiente:

65% KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5 ajustado con KOH 2M)

35% acetonitrilo

flujo 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

En la **Figura 68** se muestra un cromatograma correspondiente a una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de 30 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido utilizando esta fase móvil y el procedimiento de derivatización indicado en el apartado anterior. Los picos adicionales que aparecen son debidos a la reacción de derivatización, ya que también están presentes en muestras blanco.

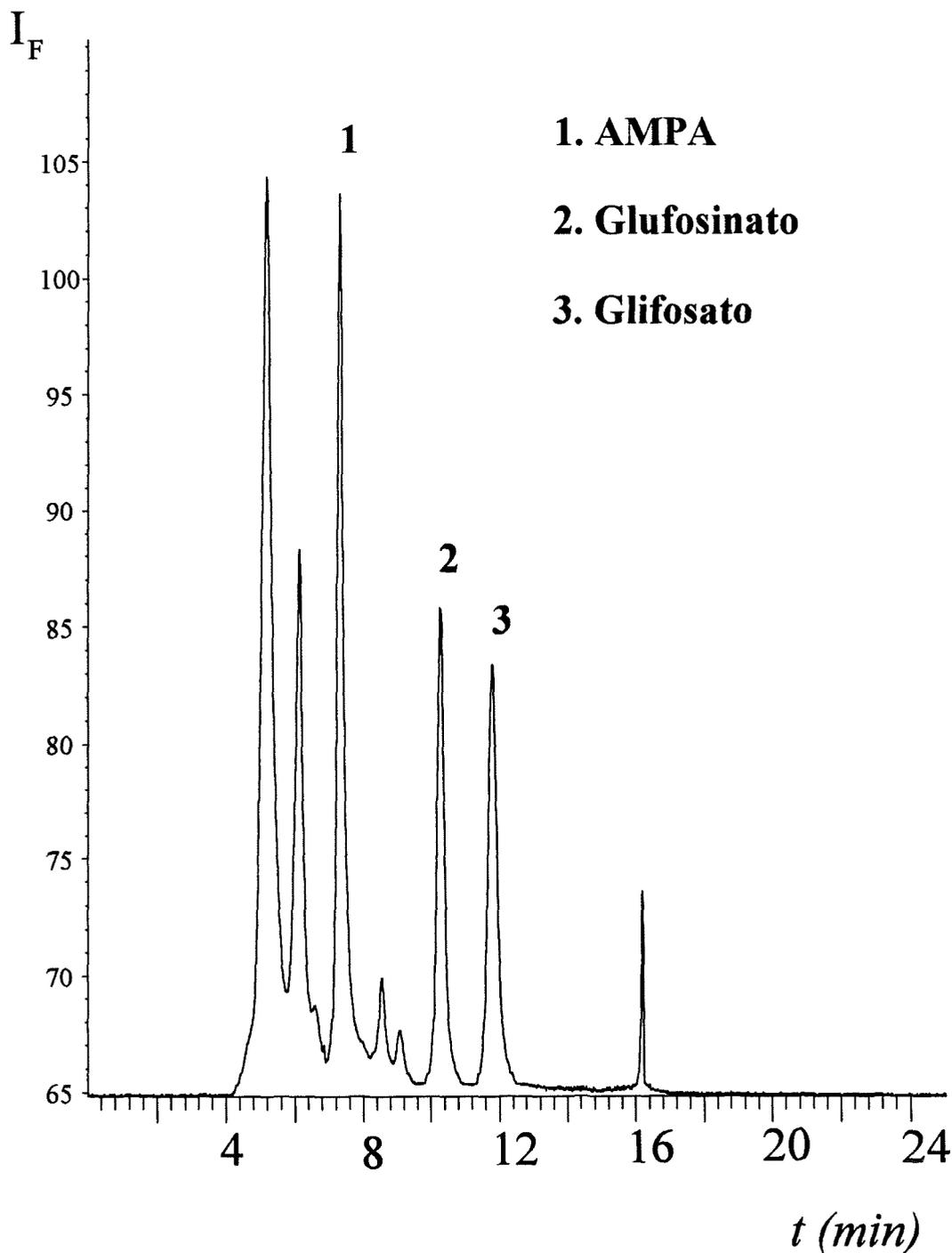


Figura 68. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de $30 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH_2 , ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05 M ($\text{pH } 5.5$)/ CH_3CN ($65:35$); volumen de inyección $100 \mu\text{l}$; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

II.2.2. Características analíticas.

Se han estudiado las características analíticas del método en cuanto a linealidad, límite de detección y repetibilidad.

Curva de calibrado.

Se obtienen los cromatogramas correspondientes a disoluciones patrón de glifosato, glufosinato y AMPA entre $28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $9 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, utilizando un volumen de inyección de $100 \mu\text{l}$. Las curvas de calibrado obtenidas cuantificando con área de pico se muestran en la **Figura 69**, mientras que las obtenidas mediante altura de pico aparecen en la **Figura 70**.

En la **Tabla 57** se indican los datos del análisis de regresión realizado, observándose que el método es lineal en el intervalo estudiado para todos los compuestos. La detección del metabolito AMPA es más sensible que la de glifosato y glufosinato, los cuales presentan sensibilidades semejantes.

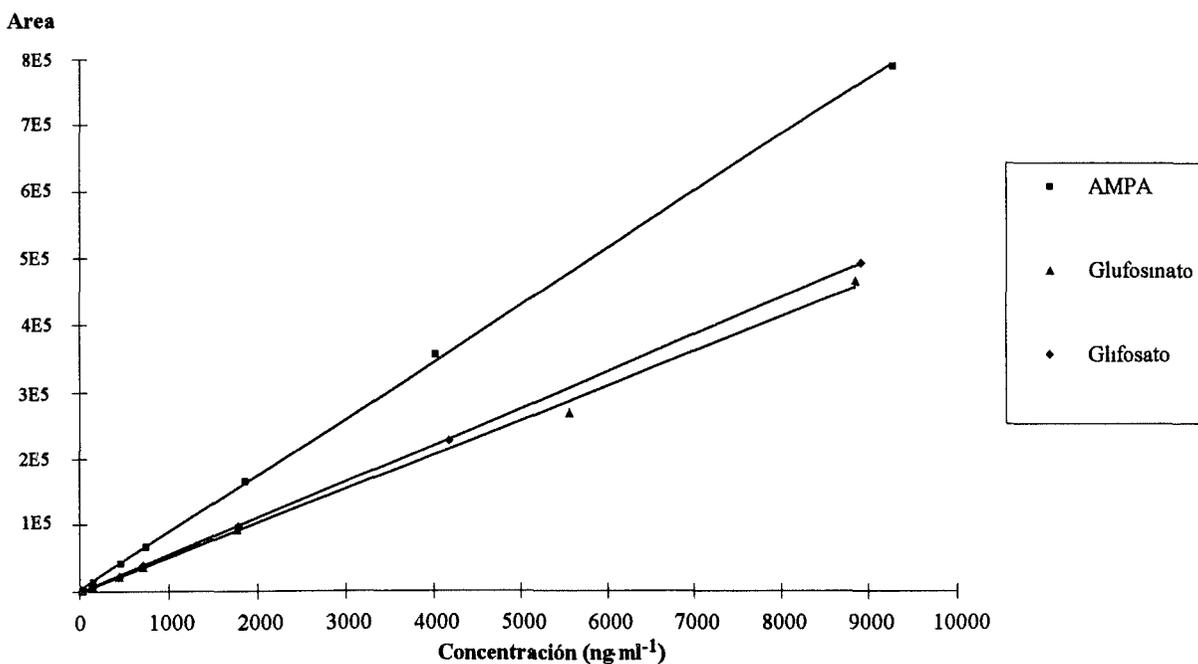


Figura 69. Curvas de calibrado obtenidas en área de pico para glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH_2 , ($250\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección $100 \mu\text{l}$; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

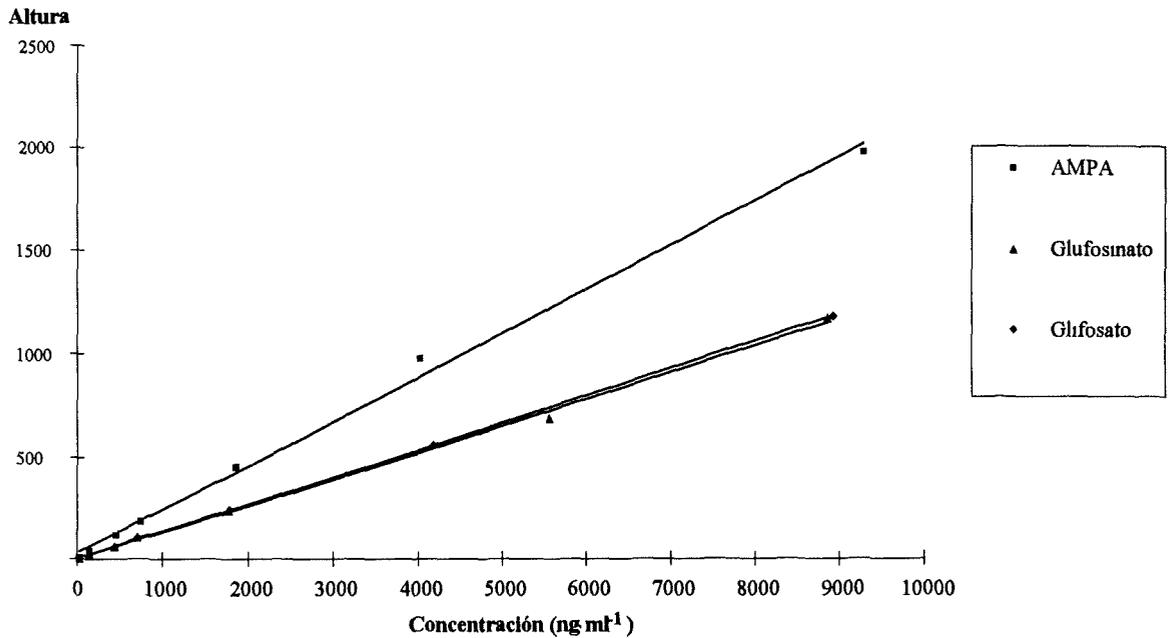


Figura 70. Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH₂, (250×4.6mm, 5 μm); fase móvil KH₂PO₄ 0.05M (pH 5.5)/CH₃CN (65:35); volumen de inyección 100 μl; detección por fluorescencia con λ_{ex} = 263 nm y λ_{em} = 317 nm.

Tabla 57. Datos estadísticos ($p < 0.01$) para las curvas de calibrado de glifosato, glufosinato y AMPA obtenidas mediante cromatografía líquida.

	Glifosato		Glufosinato		AMPA	
	Area	Altura	Area	Altura	Area	Altura
Ordenada Origen	-141.98	2.708	-194.3	0.963	323.8	28.54
Error Estándar Ordenada Origen	62.09	1.927	419.4	9.09	274.8	22.93
Pendiente	5.529	0.132	5.175	0.129	8.527	0.214
Error Estándar Pendiente	0.016	0.0005	0.104	0.002	0.070	0.0059
Error Estándar	130.20	4.042	868.8	18.85	578.54	48.27
R	0.9999	0.9999	0.9989	0.9992	0.9998	0.9981
Nivel Significación	4.2E-12	1.6E-11	6.3E-8	3.0E-8	7.3E-10	2.9E-7

Repetibilidad.

Se estudia la repetibilidad tanto del sistema cromatográfico, como del procedimiento completo incluyendo la derivatización previa.

Para el estudio de la repetibilidad del sistema cromatográfico se realizan 10 inyecciones de dos disoluciones patrón de concentraciones $0.14 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $1.8 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. La cuantificación se realiza midiendo áreas y alturas de pico, obteniéndose desviaciones estándar relativas muy bajas (**Tabla 58**).

Tabla 58. *Repetibilidad del sistema cromatográfico para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida (n=10).*

Herbicida	0.14 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$		1.8 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	
	Area (RSD ^a)	Altura (RSD)	Area (RSD)	Altura (RSD)
AMPA	1232 (2.0)	34.2 (1.9)	16178 (0.6)	462.5 (0.8)
Glufosinato	596 (0.7)	17.3 (1.8)	8587 (0.6)	218.8 (0.8)
Glifosato	655 (0.6)	17.6 (1.3)	10085 (0.5)	230.6 (0.7)

^a Desviación estándar relativa en %.

En cuanto al estudio de la repetibilidad del procedimiento completo, se realizan 7 derivatizaciones para una mezcla patrón de $28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se calcula la desviación estándar relativa en cuanto a tiempo de retención, área y altura de pico (**Tabla 59**), obteniéndose en todos los casos resultados muy satisfactorios.

Tabla 59. *Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato, glufosinato y AMPA mediante cromatografía líquida. (mezcla patrón de $28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) (n=7).*

Herbicida	t_r (min)		Area		Altura	
	media	RSD (%)	media	RSD (%)	media	RSD (%)
AMPA	7.02	0.08	234	2.1	6.25	4.8
Glufosinato	9.60	0.08	114	2.8	2.82	1.3
Glifosato	10.61	0.18	138	1.9	2.87	0.9

Límites de detección.

Los límites de detección empíricos se obtienen a partir del cromatograma de una mezcla patrón de $14 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, utilizando un volumen de inyección de $200 \mu\text{l}$ (Figura 71). También se han calculado los límites de detección estadísticos utilizando las desviaciones estándar obtenidas para el procedimiento global (patrón $28 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los valores obtenidos se muestran en la **Tabla 60**.

Tabla 60. Límites de detección para la determinación de glifosato, glufosinato y AMPA por cromatografía líquida.

Herbicida	Estadístico ^a		Empírico ^b
	L_D área ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	L_D altura ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)	L_D ($\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)
AMPA	2.2	5.0	0.4
Glufosinato	2.9	1.3	0.9
Glifosato	2.0	0.9	1.0

^a $LDE = t_{n-1,99\%} S_{patr} (\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1})$, donde $t_{n-1,99\%} = 3.71$ ($n=7$)

^b obtenido a partir del cromatograma de la mezcla patrón de $14 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$

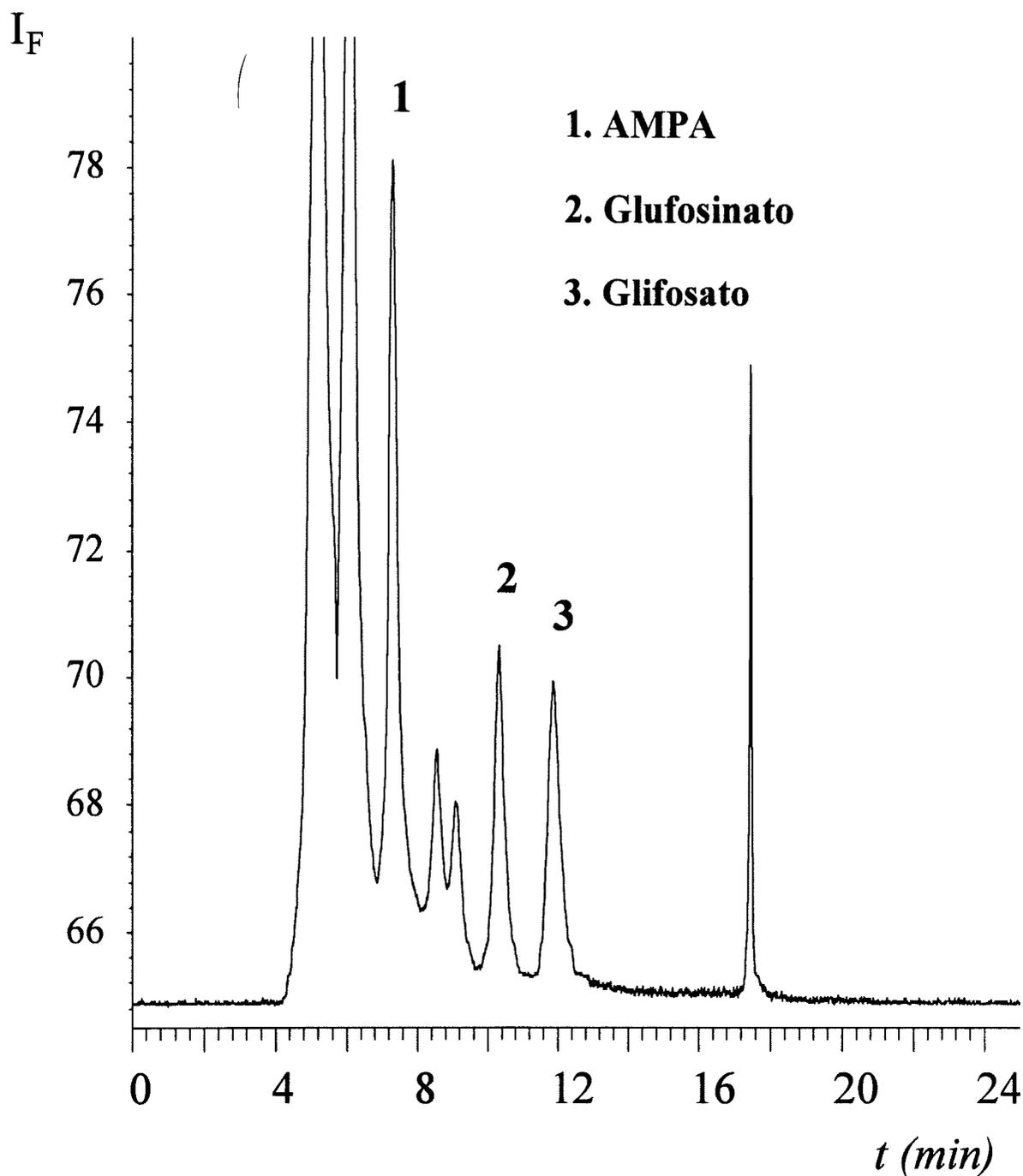


Figura 71. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de $14 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna Adsorbosphere NH_2 , (250 \times 4.6 mm, 5 μm); fase móvil KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección 200 μl ; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

II.3. Determinación de residuos de glufosinato por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.

Con la utilización de la técnica de columnas acopladas para la determinación de glufosinato se persigue un doble objetivo:

- aumento de la selectividad al eliminar, de modo automatizado, tanto el exceso de reactivo fluorescente FMOC como otros posibles interferentes menos polares
- aumento de la sensibilidad al poder inyectar grandes volúmenes de muestra, de hasta varios mililitros

Además, la eliminación del exceso de FMOC mediante la etapa de purificación en línea, supone una disminución importante en el tiempo de análisis, ya que se evita la extracción líquido-líquido "off-line" con acetato de etilo.

II.3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas.

La separación entre el derivado fluorescente del glufosinato y el exceso de FMOC se basa en el diferente comportamiento que presentan estos compuestos sobre una columna rellena de fase reversa C18 (Schuster y Gratzfeld-Hüsgen, 1992). El derivado del glufosinato es un compuesto lo suficientemente polar como para eluir como compuesto no retenido, mientras que el FMOC presenta una ligera retención en este medio.

Así, el sistema de columnas acopladas estudiado consistirá en una primera columna (C-1) rellena de fase reversa C18, cuyo objetivo es separar mediante purificación en línea el derivado del glufosinato del exceso de FMOC, y una segunda columna (C-2) de intercambio iónico con relleno tipo amino, similar a la utilizada en el apartado II.2.

Para minimizar las distorsiones de la línea base durante la etapa de transferencia en la técnica de columnas acopladas, se elige para C-1 una fase móvil idéntica a la que se utilizará para C-2. Las condiciones de partida se muestran a continuación:

C-1:	30 x 4.6 mm d.i., Spherisorb ODS2, 5 μ m
C-2:	250 x 4.6 mm d.i., Adsorbosphere NH ₂ , 5 μ m.
M-1 = M-2:	KH ₂ PO ₄ 0.05M (pH 5.5)/CH ₃ CN (65:35)
Flujos:	1 ml·min ⁻¹

El grado de selectividad y sensibilidad que se puede alcanzar con un procedimiento de acoplamiento CL-CL depende del volumen de muestra que pueda ser inyectado en la primera columna y transferido a la segunda sin producir un ensanchamiento de bandas excesivo del analito (Hogendoorn *et al.*, 1991, 1992; Hogendoorn, 1993). En estos procedimientos hay dos procesos cruciales:

- La elución del analito en la columna C-1 que, en este caso, vendrá determinada por su retención sobre relleno C18
- La compresión de picos previa a la transferencia, que dependerá de la fuerza eluotrópica de las fases móviles

Cuando se utilizan grandes volúmenes de inyección de muestra, la elución sobre C-1 puede considerarse como un gradiente escalonado, en el cual el disolvente de la muestra actúa como primera fase móvil. Por consiguiente, la fuerza eluotrópica (*porcentaje de acetonitrilo en nuestro caso*) de la disolución de muestra será un parámetro determinante. El objetivo es que el analito, arrastrado inicialmente por la disolución de la muestra, quede retenido lo más posible en C-1 (e incluso frenado completamente) durante la inyección, para, a continuación, ser eluido lo más rápidamente posible por la fase móvil M-1 y transferido a la segunda columna, evitando de este modo el ensanchamiento del pico. Para ello, el porcentaje de acetonitrilo en la disolución de la muestra se debe mantener lo más bajo posible, mientras que en la fase móvil M-1 se usará un 35% de acetonitrilo.

Por otro lado, la reacción de derivatización entre glufosinato y FMOC debe llevarse a cabo en un medio que contenga al menos un 40% de acetonitrilo para que sea cuantitativa. En este sentido, se efectuaron diversas experiencias variando el volumen de disolución de FMOC añadido (en acetonitrilo), comprobándose que la reacción no se producía con suficiente extensión para concentraciones menores del 40%. Además, si se disminuye el contenido en acetonitrilo se produce la precipitación del reactivo derivatizante. Por ello, el extracto que se inyecta en la columna C-1 contiene un 40% de acetonitrilo (0.5 ml de muestra acuosa + 1 ml de tampón acuoso borato + 1 ml de acetonitrilo). En estas condiciones se ha comprobado que se puede inyectar un volumen de muestra máximo de 50 μ l, ya que para volúmenes mayores tiene lugar un excesivo ensanchamiento de bandas del analito (*pérdida de sensibilidad*) y, además, no se separan completamente el glufosinato del exceso de reactivo.

Resulta necesario, por tanto, disminuir el contenido de acetonitrilo en la disolución, lo cual se puede conseguir por dilución. Se han realizado experiencias diluyendo diez veces, tanto con tampón borato como con agua, e inyectando un volumen de 500 μ l. Con esta dilución el extracto contiene un 4% de acetonitrilo. Los mejores resultados, en cuanto

al aspecto del pico cromatográfico, se obtienen cuando la dilución se realiza con tampón borato, en lugar de con agua.

A continuación, manteniendo constante la dilución del extracto (1:10), se ha estudiado el volumen de inyección máximo posible. Se ensayaron los siguientes volúmenes: 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0 y 4.0 ml. De los cromatogramas obtenidos se deduce que, en todos los casos, se produce buena resolución entre glufosinato y FMOC, pero la respuesta (altura de pico) es lineal tan sólo hasta un volumen de inyección de 2 ml. Por tanto, se escoge como volumen óptimo de inyección 2 ml.

Una vez fijado el volumen máximo de inyección en 2 ml, se estudia la influencia del contenido de acetonitrilo en la muestra para así establecer la dilución mínima necesaria que permita obtener un buen pico cromatográfico. A los 2.5 ml iniciales de la disolución acetonitrilo-agua (40:60) se les añade 0, 1, 3 y 5 ml de tampón borato, obteniendo contenidos finales de acetonitrilo de 40, 28.6, 18.2 y 13.3%, respectivamente. De los resultados obtenidos se deduce que es necesario diluir hasta que el porcentaje de acetonitrilo sea aproximadamente del 15% para que la columna C-1 presente suficiente retención sobre el exceso de FMOC. De este modo, el disolvente de la muestra actúa como primera fase móvil (13.3% de acetonitrilo) produciendo una compresión total del analito (no elución), mientras que con la fase móvil M-1 (35% de acetonitrilo) el glufosinato eluye como un compuesto no retenido, bien resuelto del FMOC, que eluye más tarde.

Así, el procedimiento desarrollado para el tratamiento de la muestra acuosa incluye una primera etapa de derivatización con FMOC y posterior dilución ($\times 3$) de la disolución obtenida con 5 ml de tampón borato, de modo que el contenido final de acetonitrilo es del 13.3%. En la **Figura 72** se muestra dicho procedimiento.

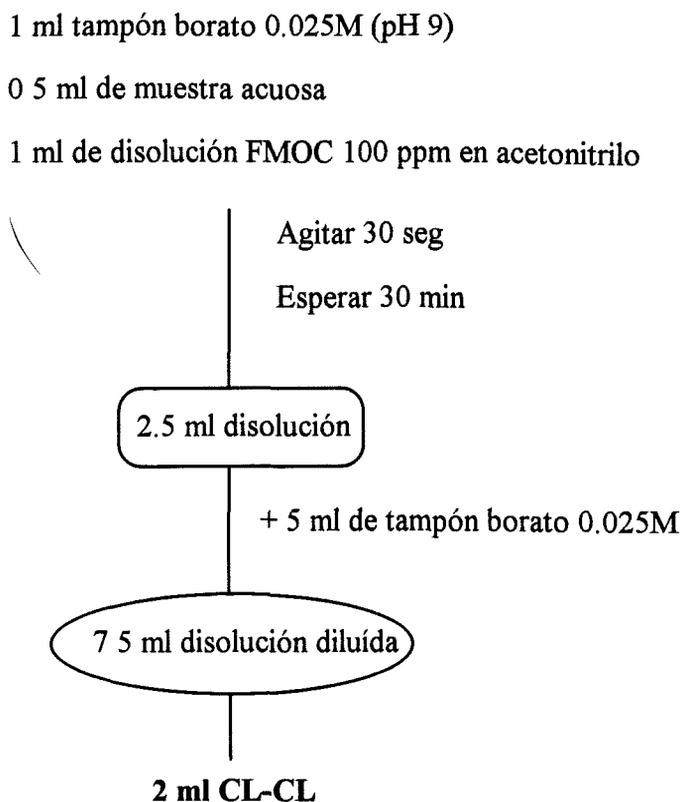


Figura 72. Esquema del procedimiento de derivatización del glufosinato, con posterior dilución usando disolución tampón de borato.

El efecto de la dilución de la muestra sobre el comportamiento del analito y del exceso de reactivo en la columna C-1 se observa en la **Figura 73**, donde se muestran dos cromatogramas correspondientes a la inyección de: (A) 330 μl de la muestra sin diluir procedente de un agua fortificada a nivel de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y (B) 1.0 ml de la misma muestra diluida previamente tres veces con tampón borato. En ambos casos, la cantidad de glufosinato inyectada es la misma, pero con contenidos diferentes de acetonitrilo (40 y 13.3% para los cromatogramas A y B, respectivamente). Se observa claramente que la dilución de la muestra evita la aparición de cola en el pico y, por tanto, mejora la sensibilidad y selectividad.

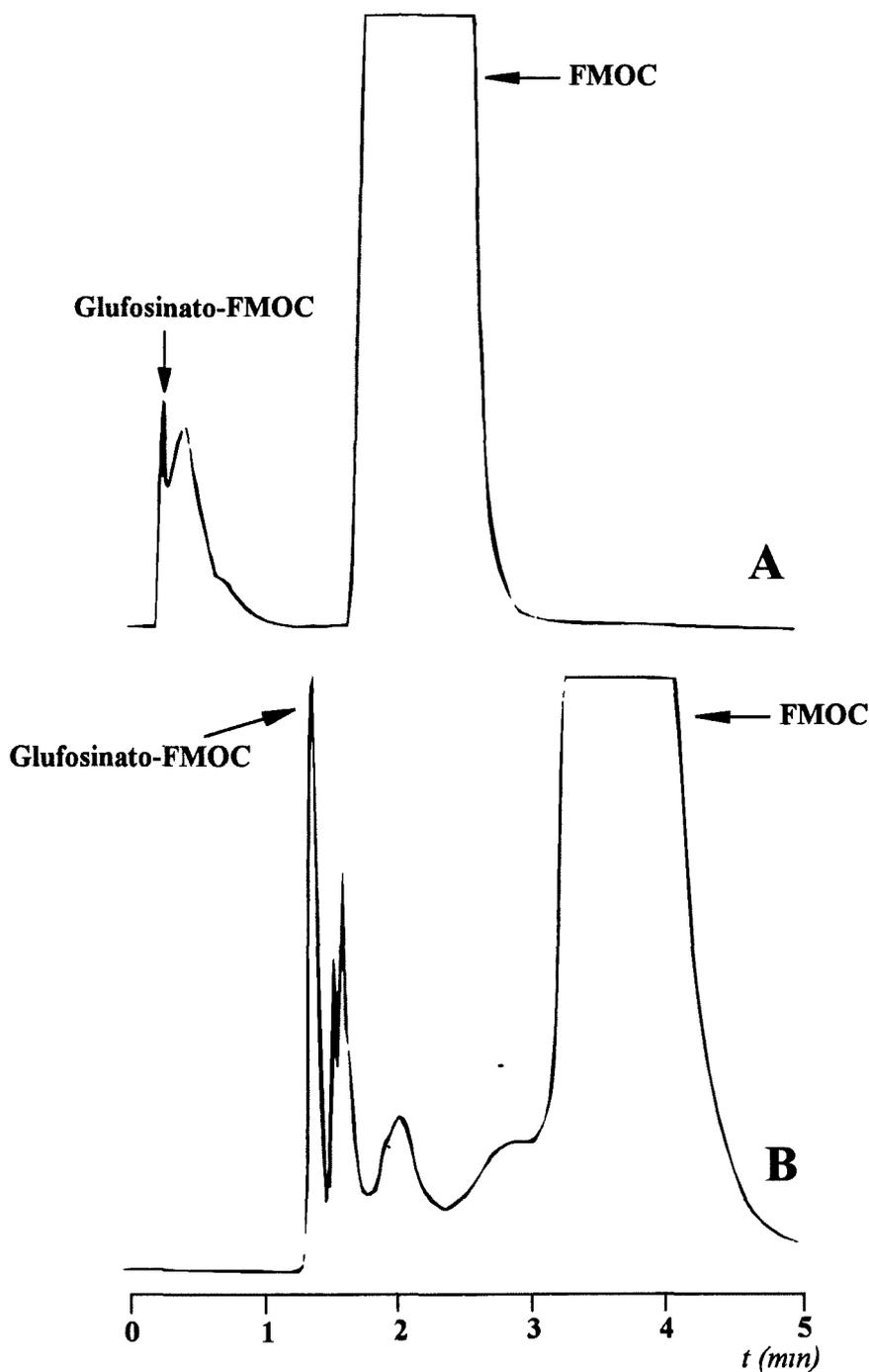


Figura 73. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia para una muestra de agua fortificada con glufosinato a nivel de $100 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenida tras derivatización con FMOC. (A) Inyección de $330 \mu\text{l}$ de disolución sin diluir (B) Inyección de 1 ml de disolución diluida tres veces con tampón borato.

Condiciones: prederivatización con FMOC, columna C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05M ($\text{pH } 5.5$)/ CH_3CN ($65:35$); volumen de inyección 330 y $1000 \mu\text{l}$; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

Con estas condiciones, se establece el tiempo de purificación y el tiempo de transferencia, que resultan ser (Figura 74)

— tiempo de purificación: 2.30 min

— tiempo de transferencia: 0.33 min (20 s), equivalente a 330 μ l.

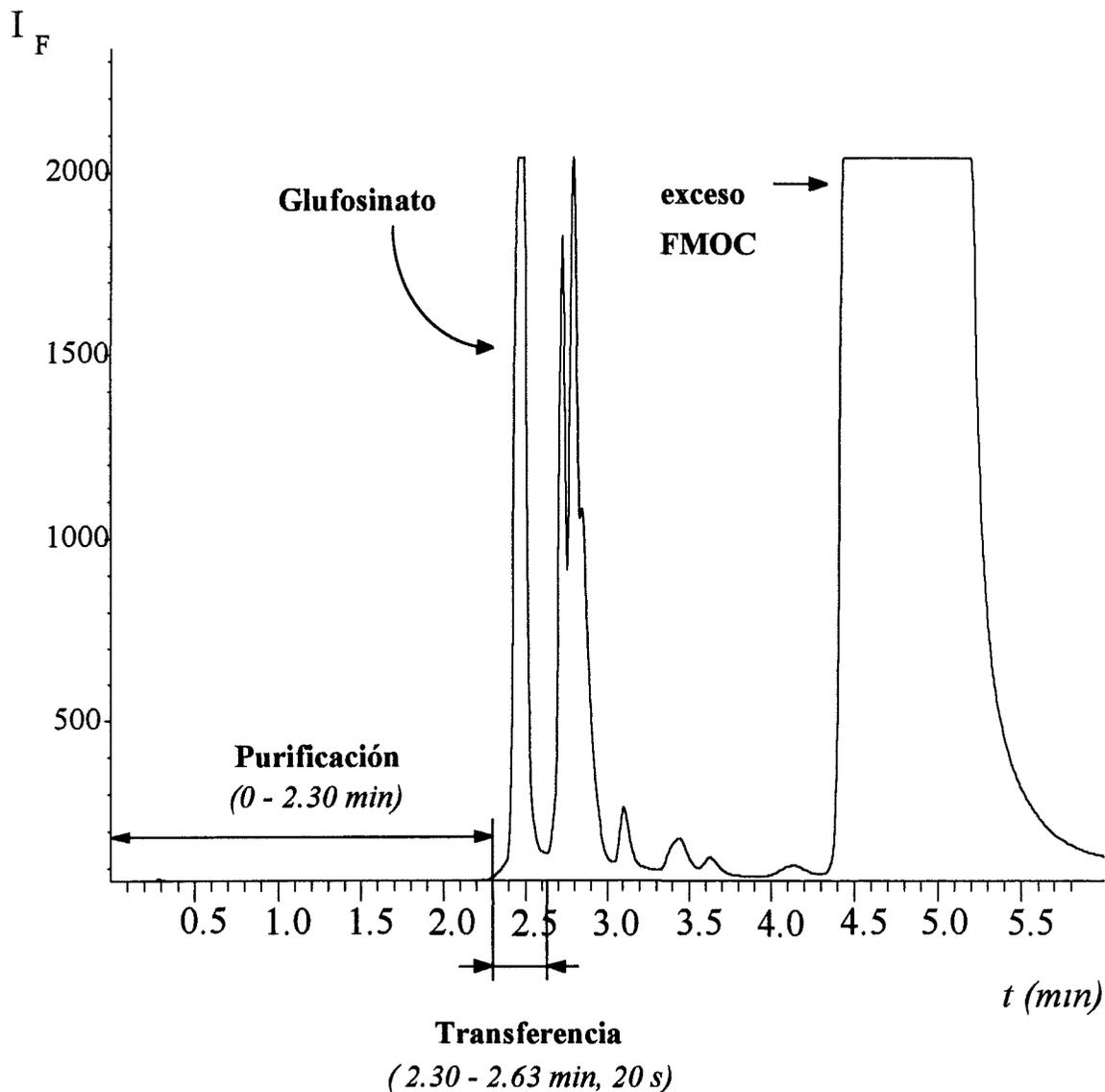


Figura 74. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de glufosinato a nivel de $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenidos tras derivatización con FMOC y dilución por tres con tampón borato. Condiciones: prederivatización con FMOC; columna C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$.

Una vez estudiado el comportamiento del glufosinato en la columna C-1 (fase reversa C-18), cabe destacar el hecho de que la aplicación de la técnica de columnas acopladas al análisis de este compuesto resulta novedosa. Se trata de un caso en el que el analito no presenta retención sobre esta columna, por lo que la verdadera etapa de purificación no tiene lugar durante los primeros 2.30 minutos, sino que empieza una vez finalizada la transferencia. No existen interferentes más polares que el glufosinato que eluyan de la columna C-1 antes que él. A la vista de la bibliografía consultada se puede afirmar que es la primera aplicación CL-CL en la que se realiza primero la transferencia y después la purificación, ya que esta técnica se venía aplicando a compuestos lo suficientemente poco polares como para presentar una retención sobre la columna de fase reversa C18 y permitir una etapa de purificación más o menos amplia antes y después de la transferencia (por ejemplo, los herbicidas fenoxiácidos estudiados en el capítulo anterior o muchos de los compuestos estudiados por Hogendoorn y Goewie.

Finalmente, aplicando ya el sistema de CL-CL se intenta mejorar la separación cromatográfica comprimiendo más el pico con objeto de obtener mayor señal y así disminuir el límite de detección del procedimiento. Se estudian los siguientes parámetros:

- a) pH de la fase móvil M-1. Se realizan experiencias ajustando la fase móvil M-1 a pH 4 (frente al pH 5.5 que se venía utilizando), ya que a este pH la columna amino (C-2) presenta una máxima retención frente al analito (**Figura 66**). El objetivo de esta experiencia es conseguir una compresión adicional del pico del glufosinato en el momento que entra en la columna C-2 (M-2 a pH 5.5), con lo que se podría aumentar la sensibilidad del método. Sin embargo, los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, ya que el volumen de transferencia es tan pequeño (300 μ l), que el efecto de la compresión adicional no es apreciable al final de la columna C-2 de 250 mm.
- b) Concentración del tampón fosfato en la fase móvil M-2. Manteniendo el pH a 5.5, se aumenta la concentración de KH_2PO_4 a 0.1M, ya que el tiempo de retención del glufosinato en la columna amino depende de la concentración del tampón fosfato en la fase móvil (**Figura 67**), de modo que a mayor concentración cabe esperar un menor tiempo de permanencia del analito en la columna, y por tanto menor difusión y mayor altura de pico. Se inyectaron patrones de 1 a 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, obteniéndose en todos los casos entre un 20-25% de incremento en la altura de pico (**Figura 75**). Se decide, por ello, trabajar con una concentración de tampón fosfato en M-2 de 0.1M.

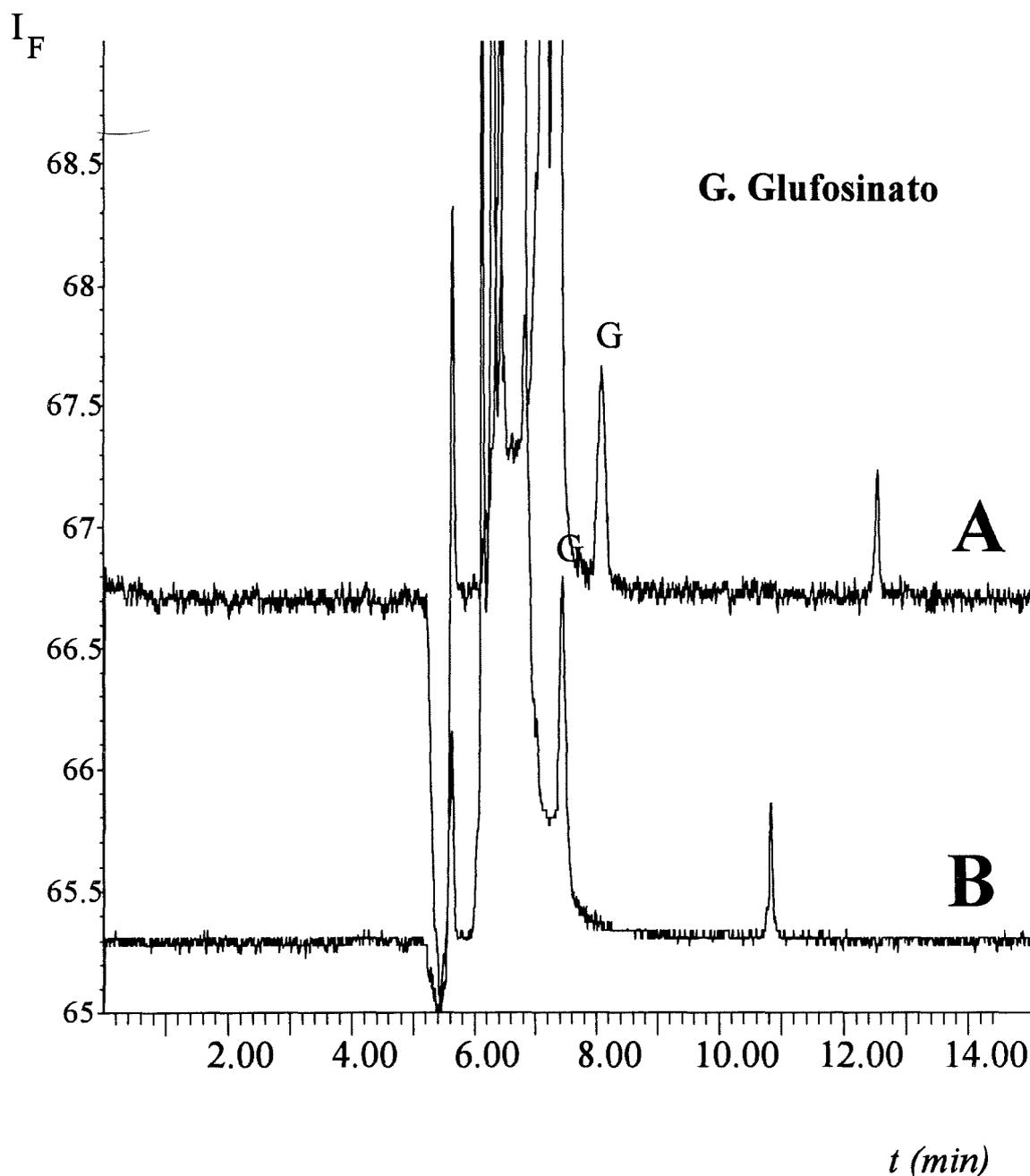


Figura 75. Cromatogramas de una disolución patrón de glufosinato de $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenidos mediante CL-CL. (A) M-2: KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35), (B) M-2: KH_2PO_4 0.1M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35).

Condiciones: prederivatización con FMOc; C-1 Spherisorb C18 (30×4.6mm, 5 μm); C-2 Adsorbosphere NH_2 (250×4.6mm, 5 μm); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; T 30°C

c) Temperatura de C-2. Se realizaron experiencias a 30 y 50°C con patrones entre 1-10 ng·ml⁻¹, no observándose una mejora al aumentar la temperatura. Se decide trabajar a 30°C y termostatar con objeto de disponer de temperatura controlada.

Más adelante (**Figura 80**) se muestra el cromatograma CL-CL para un patrón de 10 ng·ml⁻¹, obtenido en las condiciones óptimas establecidas y siguiendo el procedimiento recomendado de análisis.

II.3.2. Características analíticas.

Se estudian las características analíticas del método en cuanto a linealidad, repetibilidad y límite de detección.

Curva de calibrado

Se obtienen los cromatogramas correspondientes a disoluciones patrón de glufosinato entre 1 y 100 ng·ml⁻¹, utilizando un volumen de inyección de 2 ml. Las curvas de calibrado obtenidas, cuantificando con altura de pico se muestran en la **Figura 76**, mientras que las obtenidas mediante área de pico aparecen en la **Figura 77**.

En la **Tabla 61** se indican los datos del análisis de regresión realizado, observándose que el método es lineal en el intervalo estudiado para todos los compuestos.

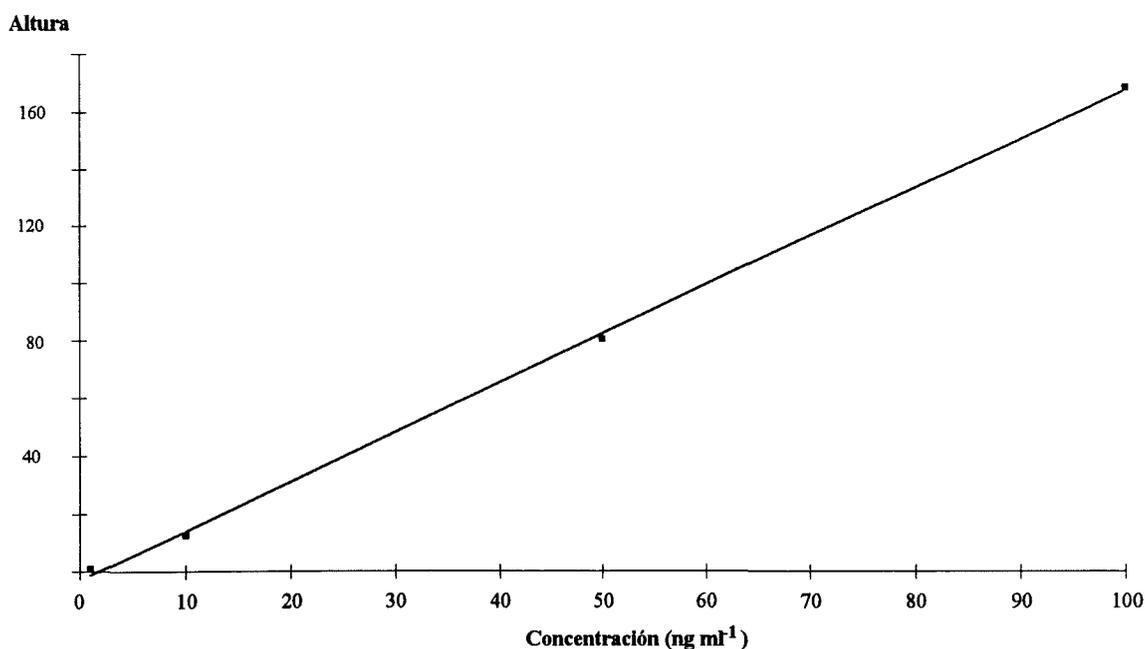


Figura 76. Curva de calibrado obtenida en altura de pico para glufosinato mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 (30×4.6mm, 5 μm); C-2 Adsorbosphere NH₂ (250×4.6mm, 5 μm); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con λ_{ex} = 263 nm y λ_{em} = 317 nm; T 30°C

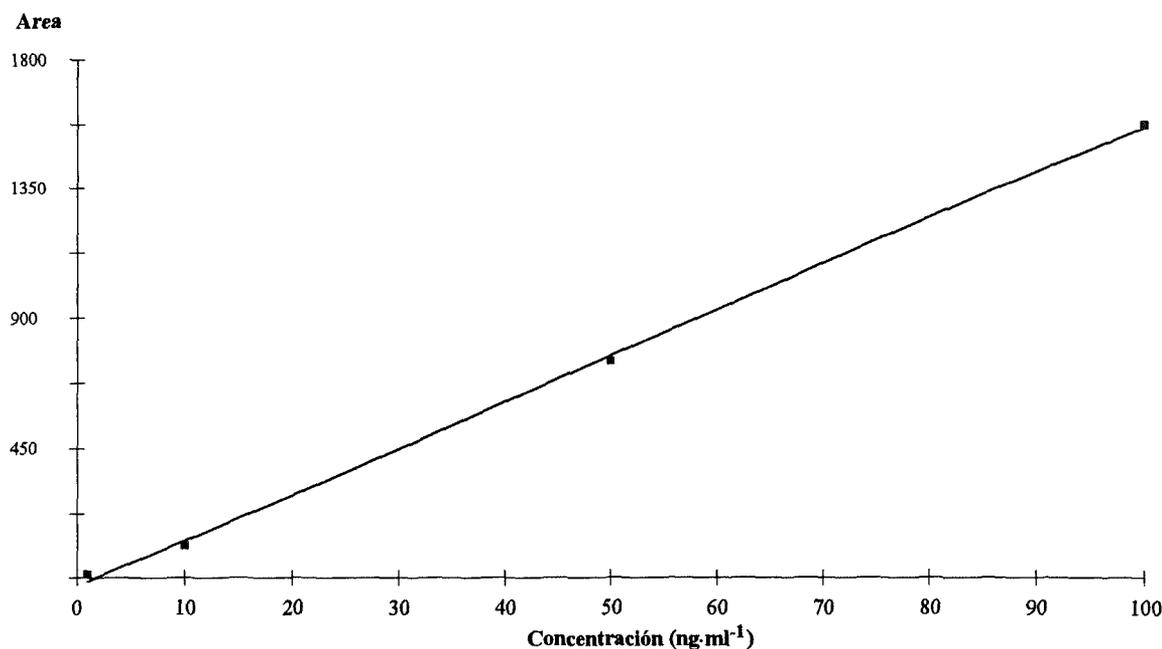


Figura 77. Curva de calibrado obtenida en área de pico para glufosinato mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 (30×4.6mm, 5 μm); C-2 Adsorbosphere NH₂ (250×4.6mm, 5 μm); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{ex} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$; T 30°C

Tabla 61. Datos estadísticos ($p < 0.01$) para las curvas de calibrado de glufosinato obtenidas mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

	Glufosinato	
	Área	Altura
Ordenada Origen	-26.33	-2.958
Error Estándar Ordenada Origen	16.47	1.711
Pendiente	14.21	1.706
Error Estándar Pendiente	0.293	0.0305
Error Estándar	22.958	2.385
R	0.9996	0.9997
Nivel Significación	4.3E-4	3 2E-4

Repetibilidad.

En cuanto al estudio de la repetibilidad del procedimiento completo, se realizan 7 derivatizaciones para una mezcla patrón de $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ y se calcula la desviación estándar relativa en cuanto a altura de pico, obteniéndose un valor de 3.8%.

Límite de detección.

Se calcula a continuación el límite de detección empírico (3 veces el ruido de fondo, $S/N=3$) a partir del cromatograma del patrón de $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 78) con un volumen de inyección de 2.0 ml, obteniéndose un valor de $0.16 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

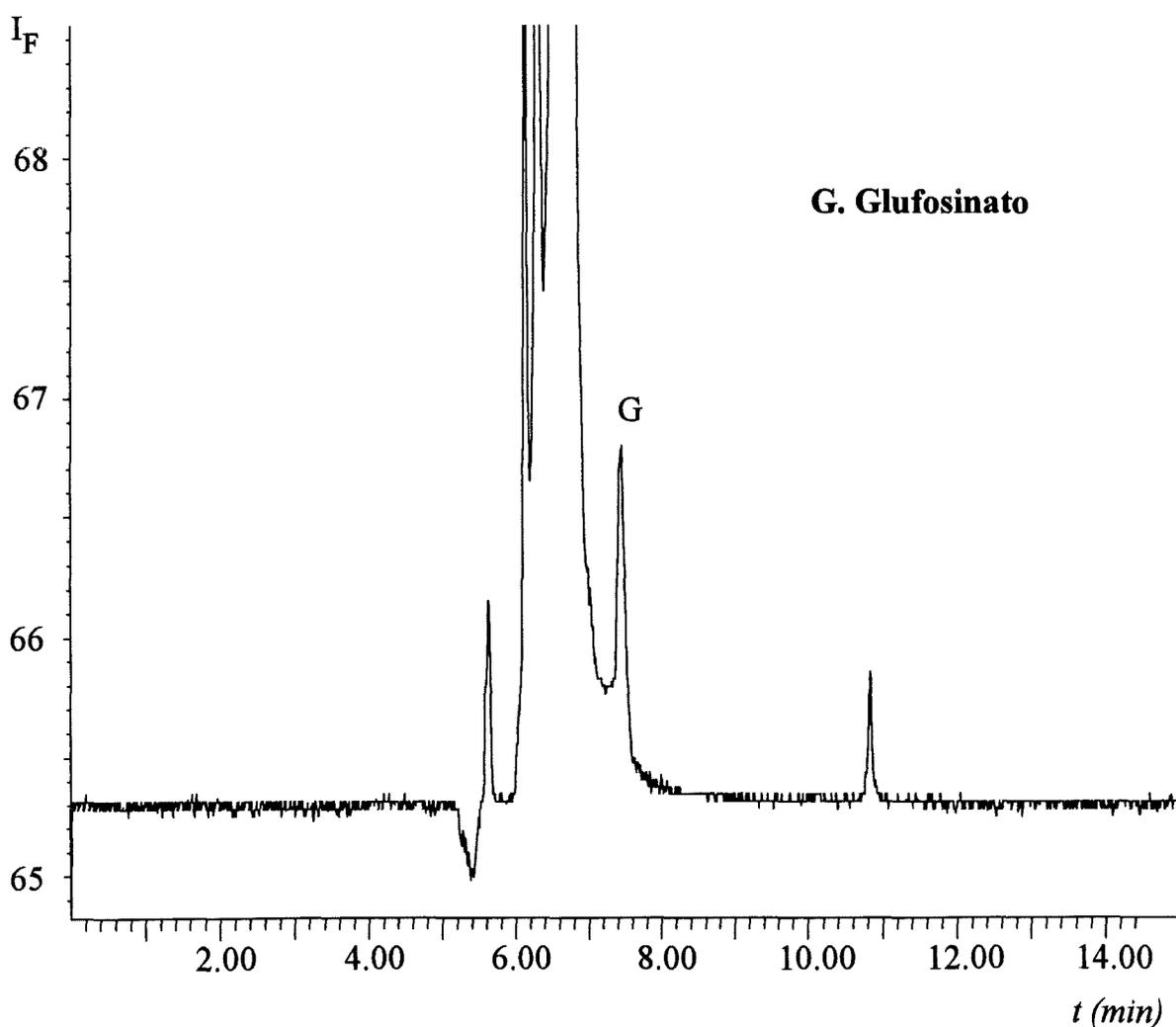


Figura 78. Cromatograma de una disolución patrón de glufosinato de $1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante CL-CL. Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{ex} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$; $T 30^\circ\text{C}$

II.3.3. Procedimiento recomendado.

El procedimiento recomendado para la determinación de residuos del herbicida glufosinato en muestras de agua se muestra en el esquema de la **Figura 79**:

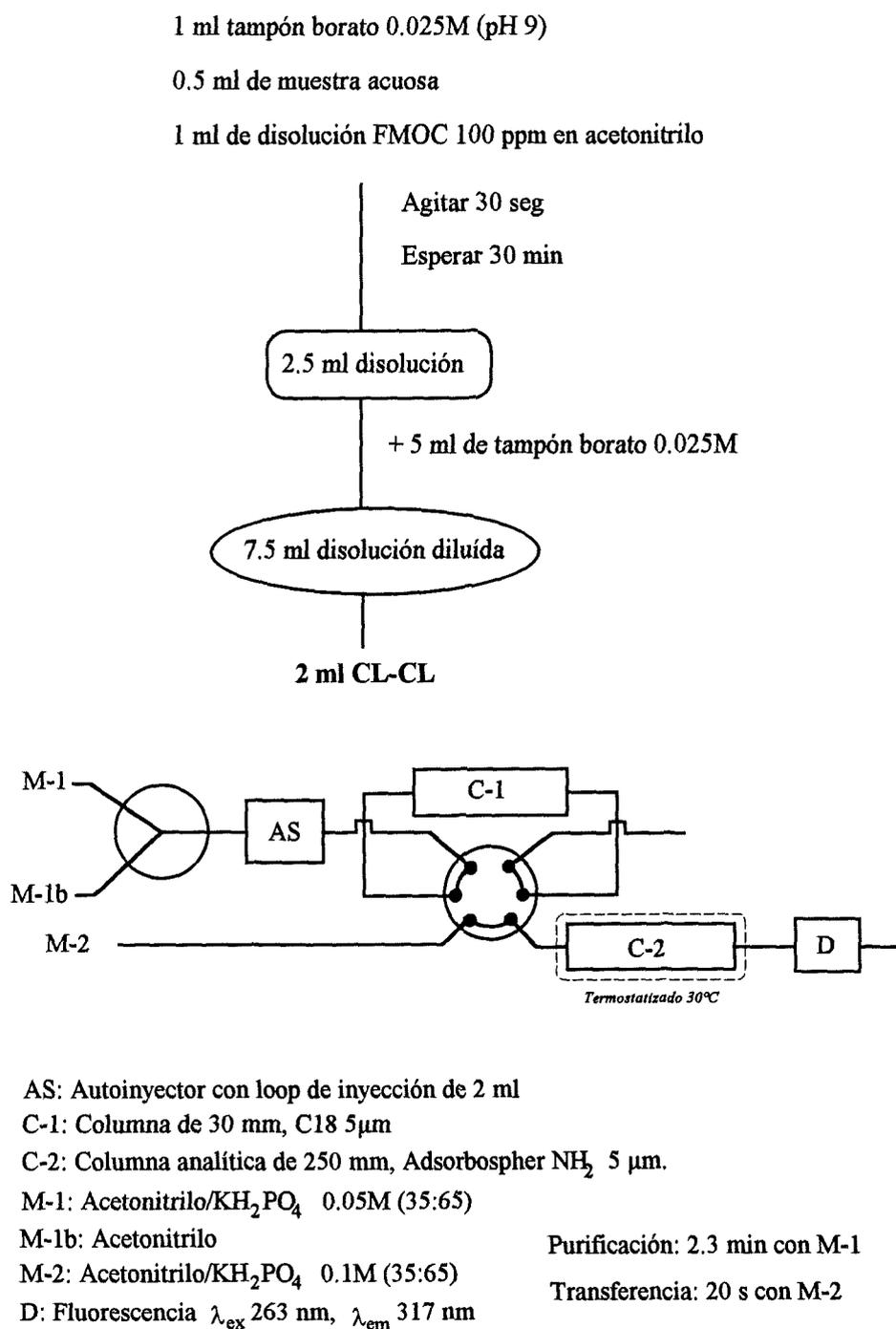


Figura 79. Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el glufosinato en muestras de agua.

Después de la derivatización con FMOC y posterior dilución con tampón borato, se inyectan 2 ml de la disolución diluída en el sistema de cromatografía líquida con columnas acopladas, realizándose una purificación en línea durante 2.30 min con la fase móvil M-1 (KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35)), y transfiriendo la fracción que contiene el glufosinato desde C-1 hacia C-2 con 330 μl (20 s) de fase móvil M-2 (KH_2PO_4 0.1M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35)).

Mientras se realiza la separación en la columna C-2, se efectúa un lavado de la columna C-1 con acetonitrilo (M-1b) para eliminar el exceso de FMOC más rápidamente, reacondicionando posteriormente la columna C-1 con la fase móvil M-1.

En la **Figura 80** se muestra el cromatograma obtenido para una disolución patrón de glufosinato de 10 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ utilizando el procedimiento recomendado de derivatización y cromatografía líquida con columnas acopladas.

Aplicando este procedimiento, se pueden determinar directamente niveles tan bajos de glufosinato como 0.16 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$, lo cual resulta de gran interés y relevancia debido a la ausencia de métodos rápidos y sensibles para determinar residuos de este herbicida.

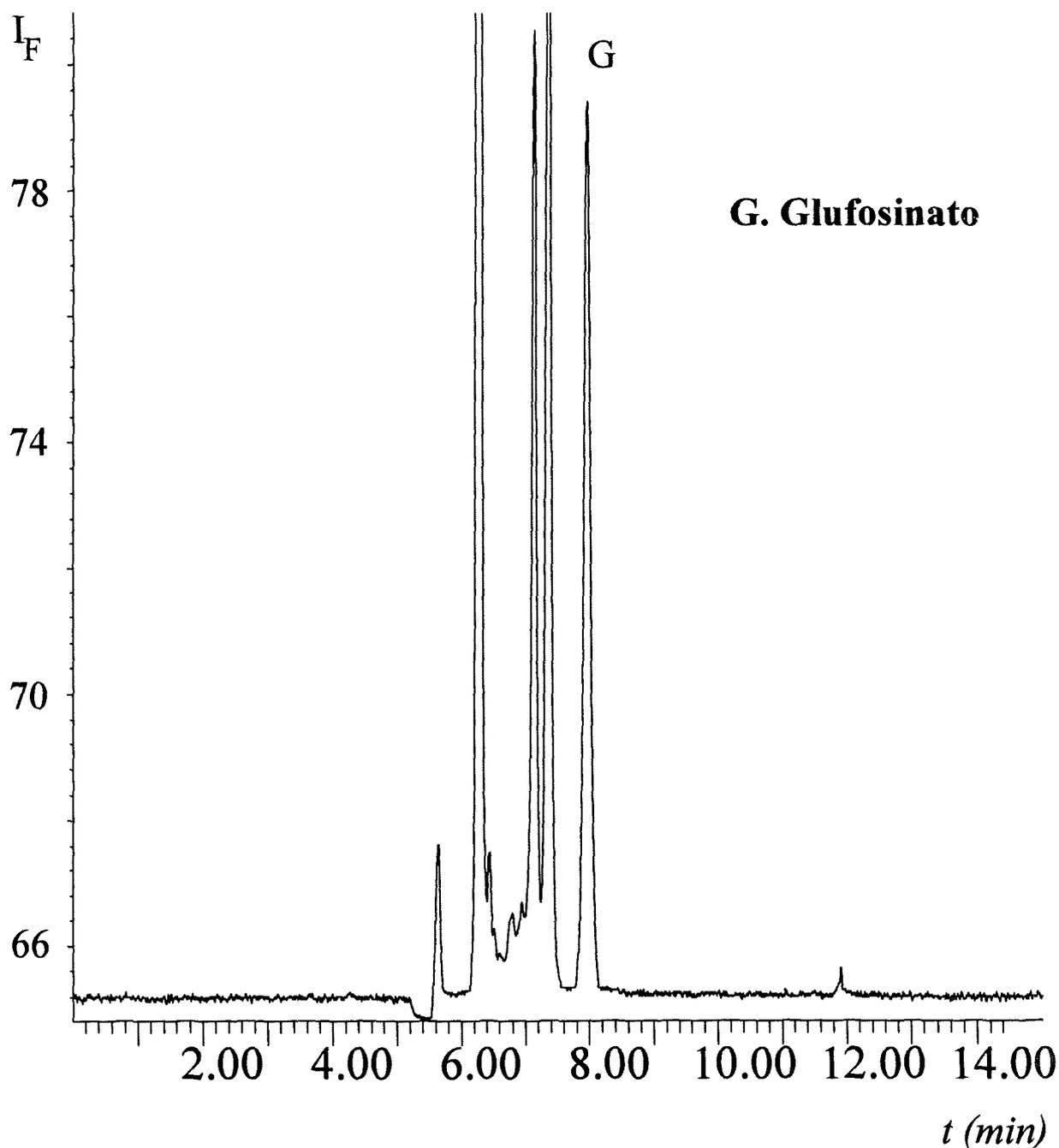


Figura 80. Cromatograma de una disolución patrón de glufosinato de $10 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante CL-CL. Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2 ml ; detección por fluorescencia con $\lambda_{ex} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$; $T 30^\circ\text{C}$

II.3.4. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras de aguas medioambientales.

El procedimiento recomendado se validó analizando diferentes tipos de muestras de agua fortificadas con glufosinato a distintos niveles de concentración. En la **Tabla 62** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 62. Recuperaciones de glufosinato en aguas analizadas mediante la aplicación del procedimiento recomendado.

	Nivel de Fortificación	Recuperación	RSD
	($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)	(%)	(%)
Agua Superficial ^a	5	100	2.1
	0.5	95	2.0
	0.25	118	11
Aguas medioambientales ^b	1	97	10
Agua subterránea ^c	0.1	78*	12*

^a $n = 5$

^b $n=6$, Tres muestras de agua fortificadas todas ellas al nivel de $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ y analizadas en diferentes días: superficial ($n = 2$), subterránea ($n = 2$), potable ($n = 2$).

^c $n = 5$

* Valores obtenidos tras preconcentración por cinco de una muestra de agua.

En la **Figura 81** se muestra el cromatograma obtenido para una muestra de agua superficial fortificada a nivel de $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

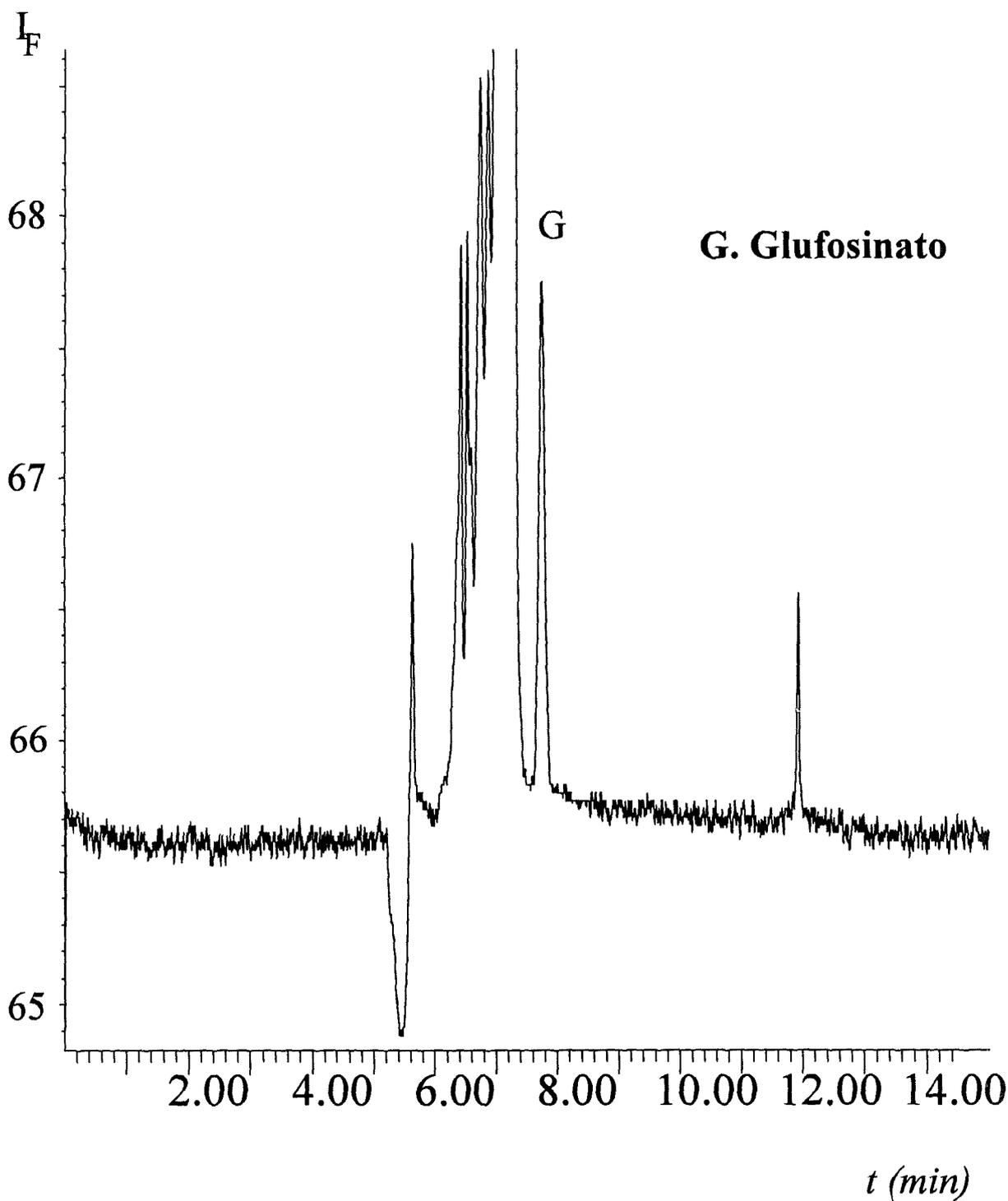


Figura 81. Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato al nivel de $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante el procedimiento recomendado y acoplamiento CL-CL. Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{ex} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$; $T 30^\circ\text{C}$.

Debido a la buena reproducibilidad del perfil cromatográfico, el límite de detección en la muestra de agua se puede considerar inferior a $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ($S/N=3$). La **Figura 82** muestra el cromatograma correspondiente a una muestra de agua superficial fortificada a $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ después de restar el cromatograma del blanco. Esta sustracción fue posible realizarla debido a la buena estabilidad del sistema cromatográfico, que permite obtener unos cromatogramas suficientemente reproducibles.

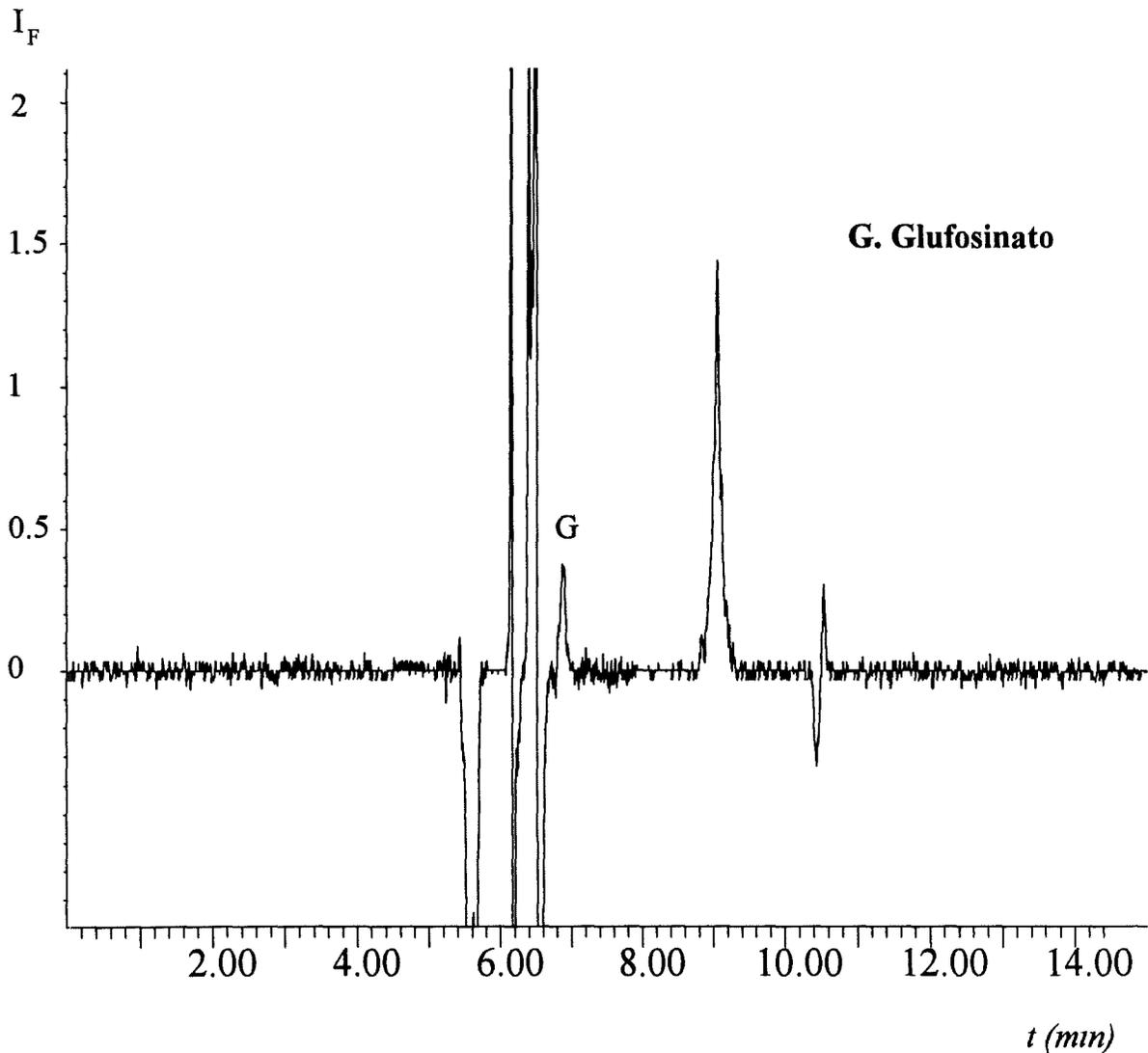


Figura 82. Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato al nivel de $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante el procedimiento recomendado y cromatografía líquida con columnas acopladas. Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30 \times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250 \times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T 30^\circ\text{C}$. (Cromatograma obtenido tras la sustracción del blanco).

Se estudió la posibilidad de reducir el límite de detección a valores inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ mediante una simple concentración de la muestra acuosa en rotavapor previamente a la reacción de derivatización.

Se llevaron a cabo varias experiencias concentrando una muestra de agua entre 5 y 50 veces. Una reducción de volumen de cinco veces por medio de rotavapor a 50°C fue suficiente para determinar glufosinato en muestras de agua a niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. La **Figura 83** corresponde al cromatograma de una muestra de agua superficial fortificada a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ concentrada cinco veces por evaporación.

En resumen, se puede concluir que el método propuesto presenta una elevada capacidad de análisis (*al menos 50 muestras por día*) debido al corto tiempo de análisis al utilizar la técnica de columnas acopladas. Además, es un método robusto, ya que durante el tiempo que duraron las experiencias (*tres meses de uso diario*), la columna C18 (C-1) mantuvo su resolución y el reajuste de la condiciones de purificación y transferencia no fué necesario. La columna amino (C-2) sufrió una pérdida gradual de eficiencia, sólo advertible tras dos meses de uso continuado.

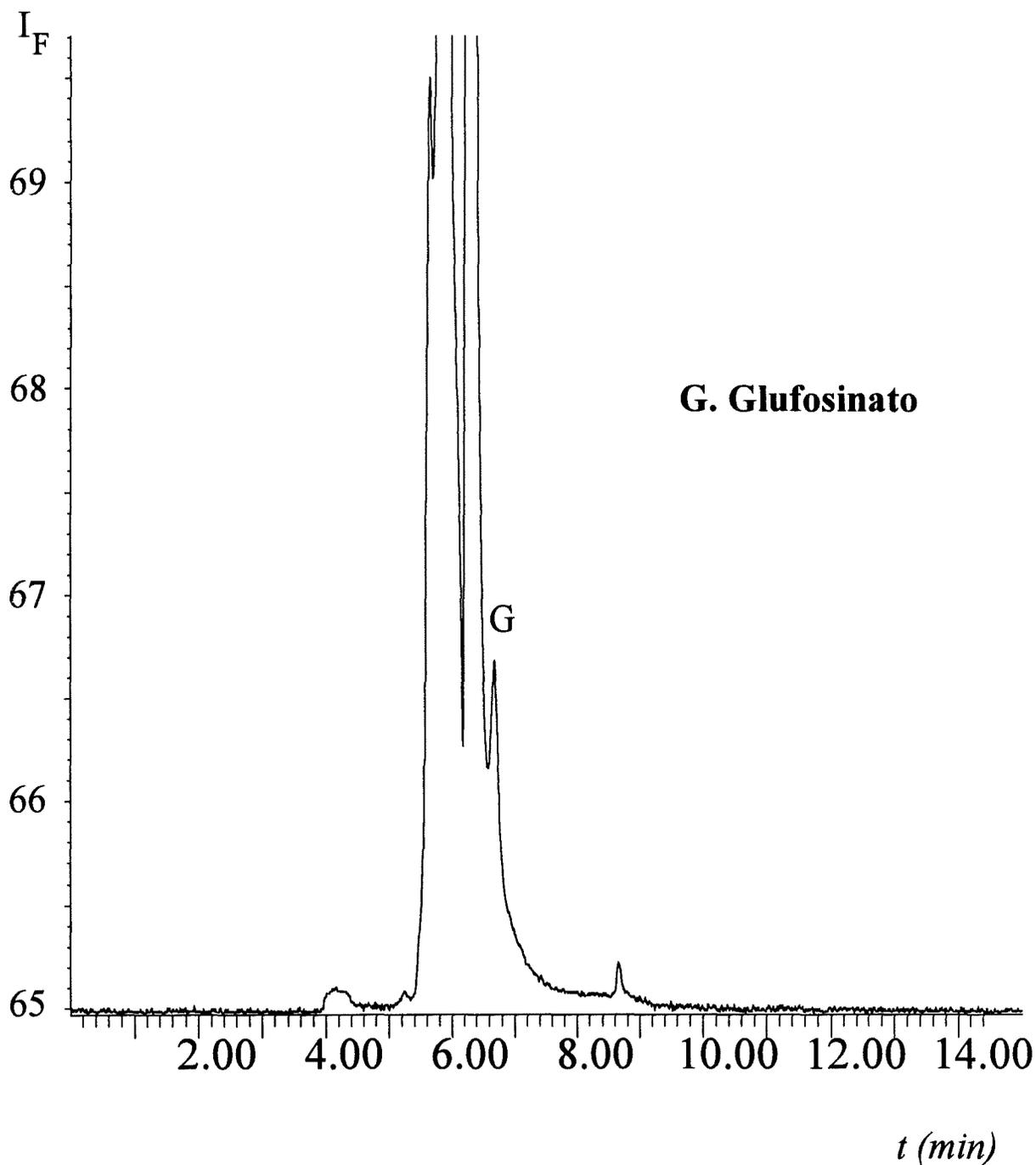


Figura 83. Cromatograma de un agua superficial fortificada con glufosinato a nivel de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante el procedimiento recomendado y cromatografía líquida con columnas acopladas. Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30 \times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250 \times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2ml ; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{nm}$; $T 30^\circ\text{C}$. (La muestra, previamente, se concentró cinco veces por evaporación).

II.4. Determinación de residuos de glifosato y AMPA por Cromatografía Líquida utilizando la técnica de columnas acopladas.

Una vez desarrollado un procedimiento para el análisis de residuos de glufosinato por CL-CL, se considera en este apartado la posibilidad de aplicar esta técnica para la determinación de glifosato y AMPA. De este modo, se persiguen los mismos objetivos que en el apartado anterior; es decir, el aumento de selectividad al eliminar, de modo automatizado, tanto el exceso de reactivo fluorescente FMOC como otros posibles interferentes, así como el aumento de sensibilidad al poder inyectar grandes volúmenes de muestra.

El plan de trabajo desarrollado es similar al del glufosinato, por lo que en alguno de los experimentos ensayados se indicarán únicamente los aspectos diferenciados que se han encontrado.

II.4.1. Optimización de condiciones cromatográficas.

Las condiciones iniciales se toman del apartado anterior, y se basan en el uso de una primera columna de fase reversa C18 y una segunda columna de tipo amino:

C-1: 30 x 4.6 mm d.i., Spherisorb ODS2, 5 μ m

C-2 250 x 4.6 mm d i, Adsorbosphere NH₂, 5 μ m

M-1 = M-2: KH₂PO₄ 0.05M (pH 5.5)/CH₃CN (65:35); flujo: 1 ml·min⁻¹.

Como ya se ha comentado previamente, el grado de selectividad y sensibilidad que se puede alcanzar con un procedimiento de acoplamiento CL-CL depende del volumen de muestra que pueda ser inyectado en la primera columna y transferido a la segunda sin producir un ensanchamiento de bandas excesivo del analito.

El porcentaje de acetonitrilo en la disolución de la muestra vuelve a ser, de nuevo, un factor de extrema importancia para conseguir la adecuada compresión de los picos. Para ello, se debe mantener lo más bajo posible en la disolución de la muestra inyectada en el sistema CL-CL.

Se ha fijado el volumen de inyección y se ha estudiado la influencia del contenido de acetonitrilo en la muestra para así establecer la dilución mínima necesaria que permita obtener un buen pico cromatográfico. Se han realizado experiencias por separado para

glifosato y AMPA. A los 2.5 ml iniciales de la disolución acetonitrilo-agua (40:60) (0.5 ml de muestra acuosa + 1 ml tampón borato + 1 ml de FMOC en acetonitrilo), se les añade 0, 2.5, 5, 7.5, 10 y 17.5 ml de tampón borato, resultando contenidos finales de acetonitrilo de 40, 20, 13.3, 10, 8 y 5%, respectivamente, diluyendo, por tanto, dos, tres, cuatro, cinco y ocho veces. De los cromatogramas obtenidos se deduce que para el AMPA la experiencia que proporciona un mejor equilibrio entre la pérdida de sensibilidad por dilución y el aumento de la misma por compresión del pico, es la correspondiente a un contenido del 10% de acetonitrilo en la disolución final de muestra, equivalente a una dilución por cuatro (**Figura 84**).

Sin embargo, para el glifosato, es necesaria una dilución de ocho veces (5% acetonitrilo), para que se produzca una compresión apreciable, ya que es un analito que se retiene menos que el AMPA en columna de fase reversa C18 (**Figura 85**).

De este modo, el disolvente de la muestra actúa como primera fase móvil (5 o 10% de acetonitrilo) produciendo una compresión total del analito (no elución) en la columna C-1, mientras que al pasar la fase móvil M-1 (35% de acetonitrilo) el glifosato y el AMPA eluyen rápidamente como compuestos no retenidos, bien resueltos del FMOC, que eluye posteriormente.

Comparando las **Figuras 84** y **85** se puede observar que la sensibilidad en la determinación de AMPA es considerablemente mayor que para glifosato, ya que la señal de fluorescencia es bastante más alta para AMPA. Además, para el análisis de AMPA se requiere una dilución por cuatro de la disolución de la muestra inyectada, mientras que para glifosato se debe efectuar una dilución por ocho, con la consiguiente pérdida adicional de sensibilidad.

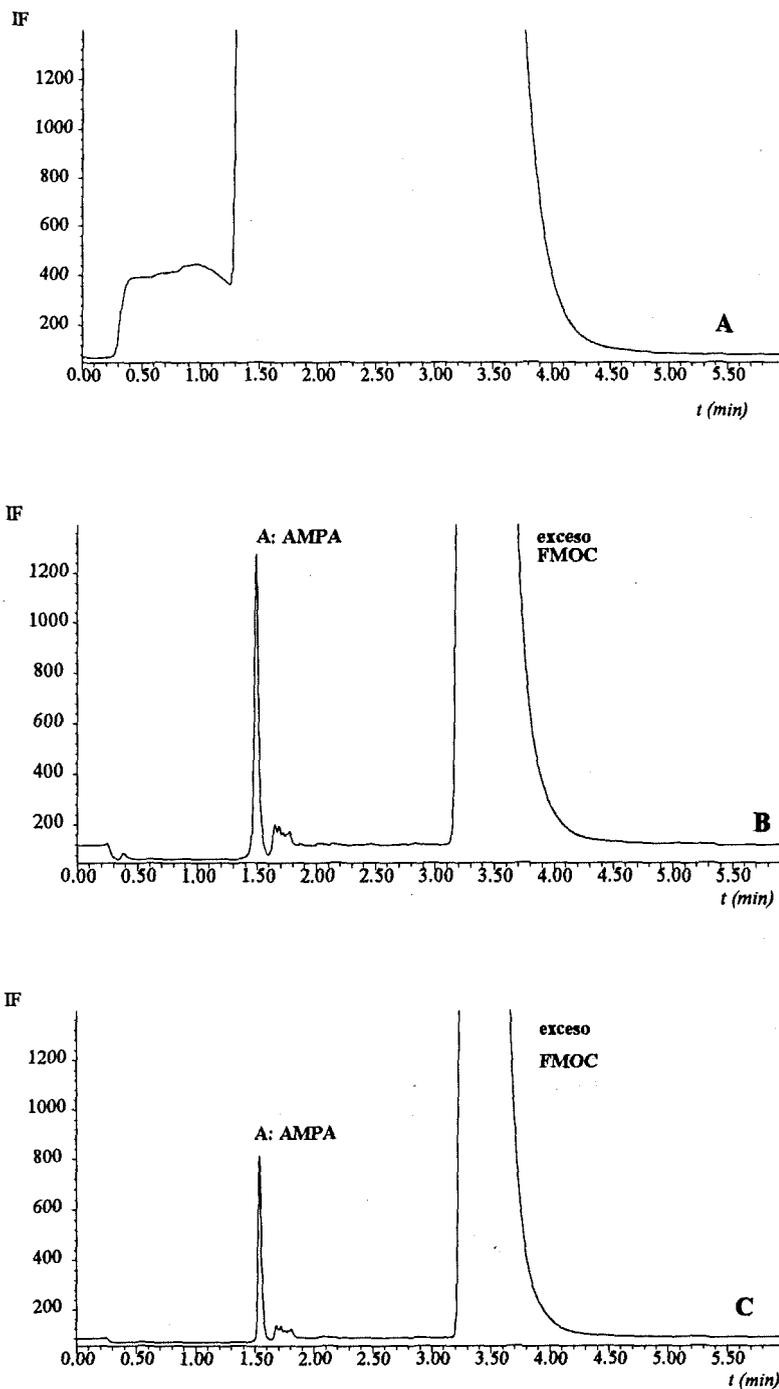


Figura 84. Efecto de la dilución posterior a la reacción de derivatización con FMOCC para un patrón de AMPA de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia: (A) sin diluir (40% acetonitrilo), (B) dilución por cuatro (10% acetonitrilo) y (C) dilución por ocho (5% de acetonitrilo).

Condiciones: prederivatización con FMOCC; columna C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección $1100 \mu\text{l}$; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

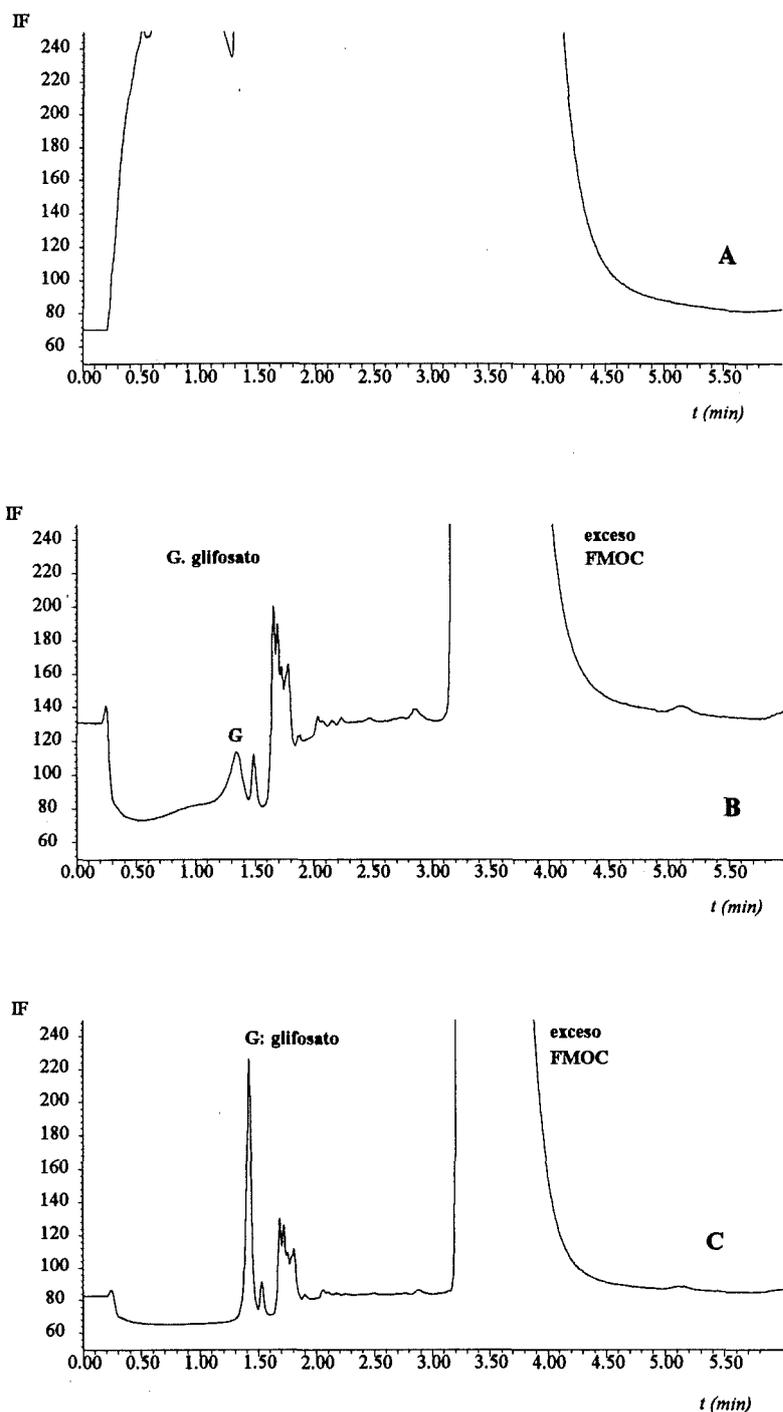


Figura 85. Efecto de la dilución posterior a la reacción de derivatización con FMOC para un patrón de glifosato de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector de fluorescencia: (A) sin diluir (40% acetonitrilo), (B) dilución por cuatro (10% acetonitrilo) y (C) dilución por ocho (5% de acetonitrilo).

Condiciones: prederivatización con FMOC; columna C18 ($30 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05 M ($\text{pH } 5.5$)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección $1100 \mu\text{l}$; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T = 30^\circ\text{C}$

En conclusión, el procedimiento propuesto para el tratamiento de la muestra acuosa incluye una primera etapa de derivatización con FMOC y una posterior dilución (x4) de la disolución con 7.5 ml de tampón borato, de modo que el contenido final de acetonitrilo es del 10%, en el caso del AMPA.

Para el glifosato, la dilución se lleva a cabo con 17.5 ml de borato (5% acetonitrilo final).

En la **Figura 86** se muestra un esquema del procedimiento aplicado para el tratamiento de la muestra, previamente a la inyección en el sistema de columnas acopladas.

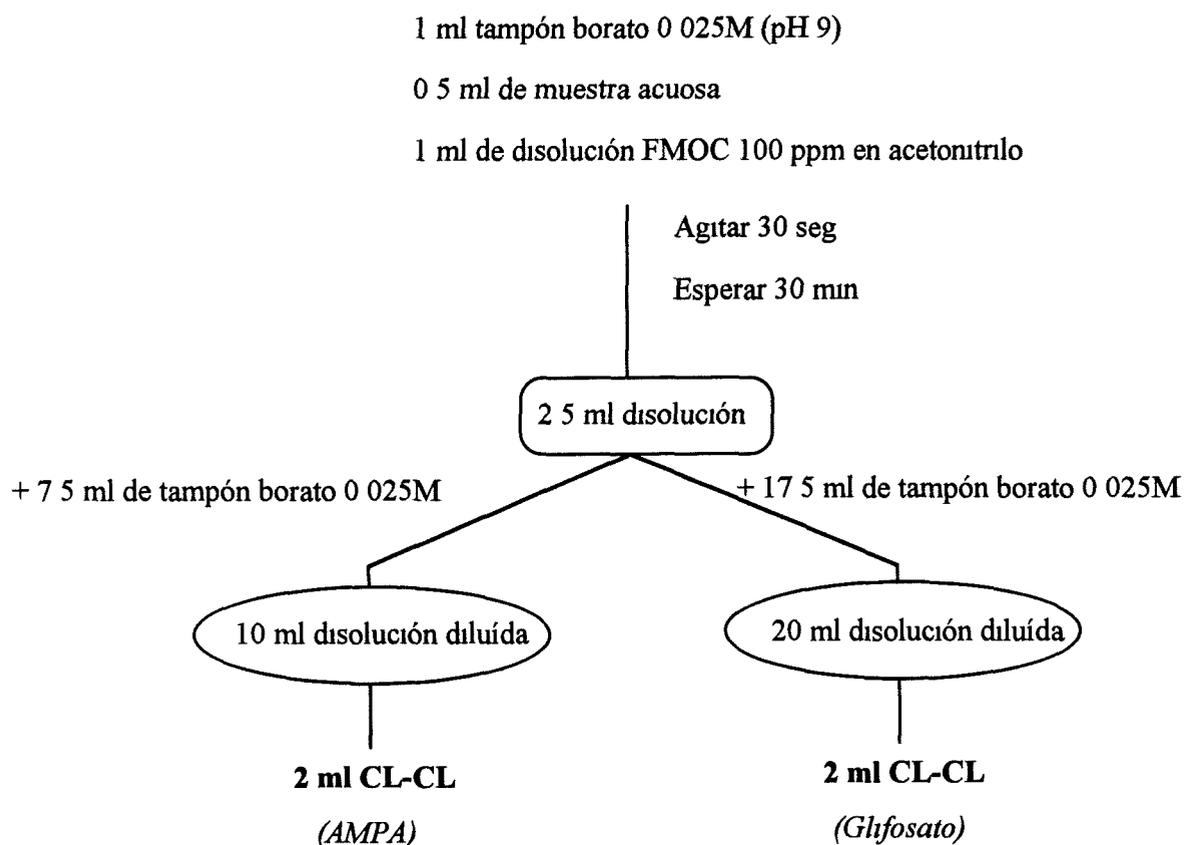


Figura 86. Esquema del procedimiento de derivatización del glifosato y AMPA, con posterior dilución usando disolución tampón de borato.

En estas condiciones, se han establecido los tiempos de purificación y de transferencia, tal como se puede observar en las Figuras 87 y 88.

Herbicida	Tiempo purificación (min)	Tiempo transferencia (min)
Glifosato	2.12	0.28
AMPA	2.30	0.19

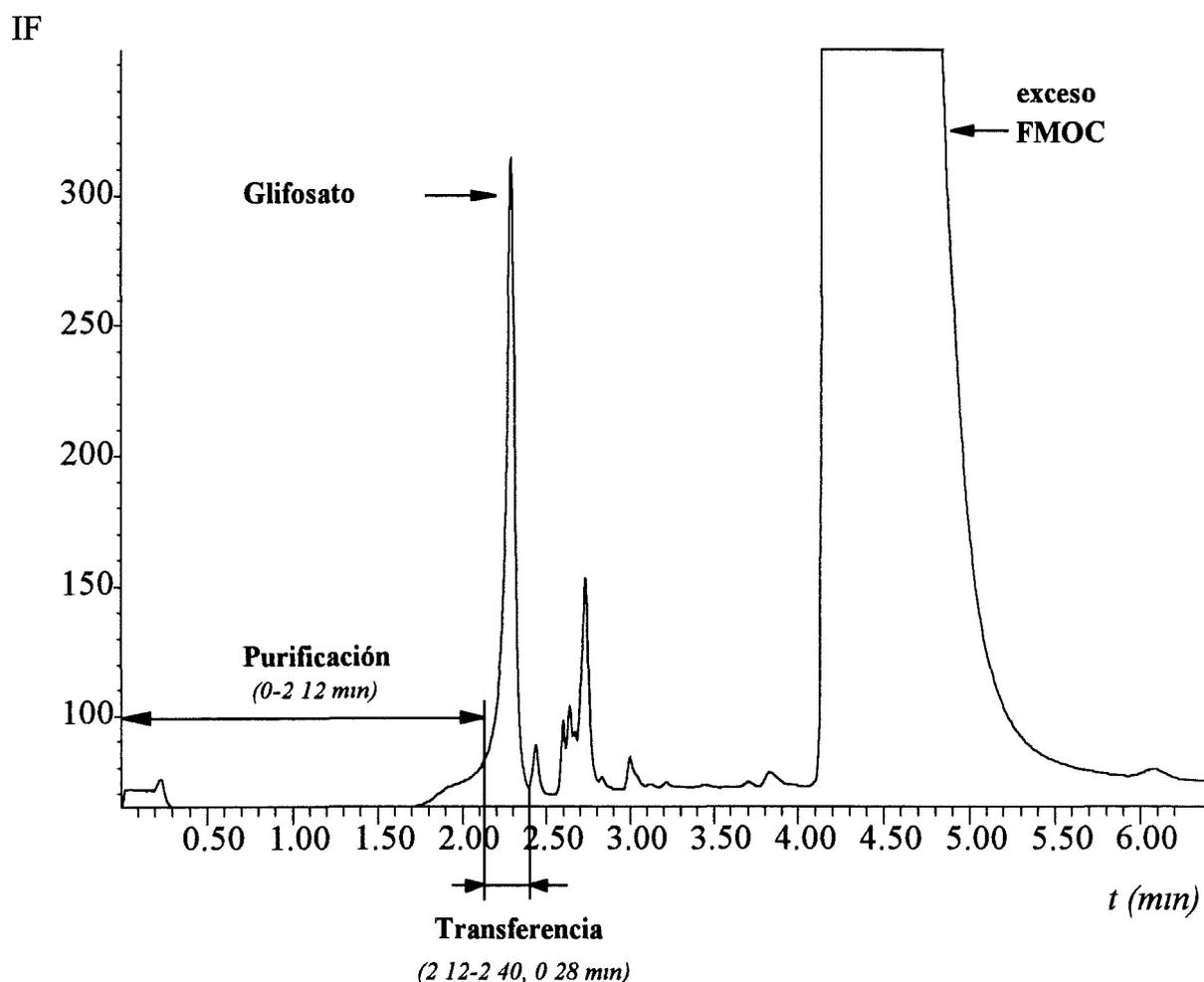


Figura 87. Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de glifosato ($0.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) obtenido tras derivatización con FMOC y posterior dilución por ocho con tampón borato.

Condiciones: prederivatización con FMOC; columna C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05M (pH 5.5)/ CH_3CN (65:35); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$

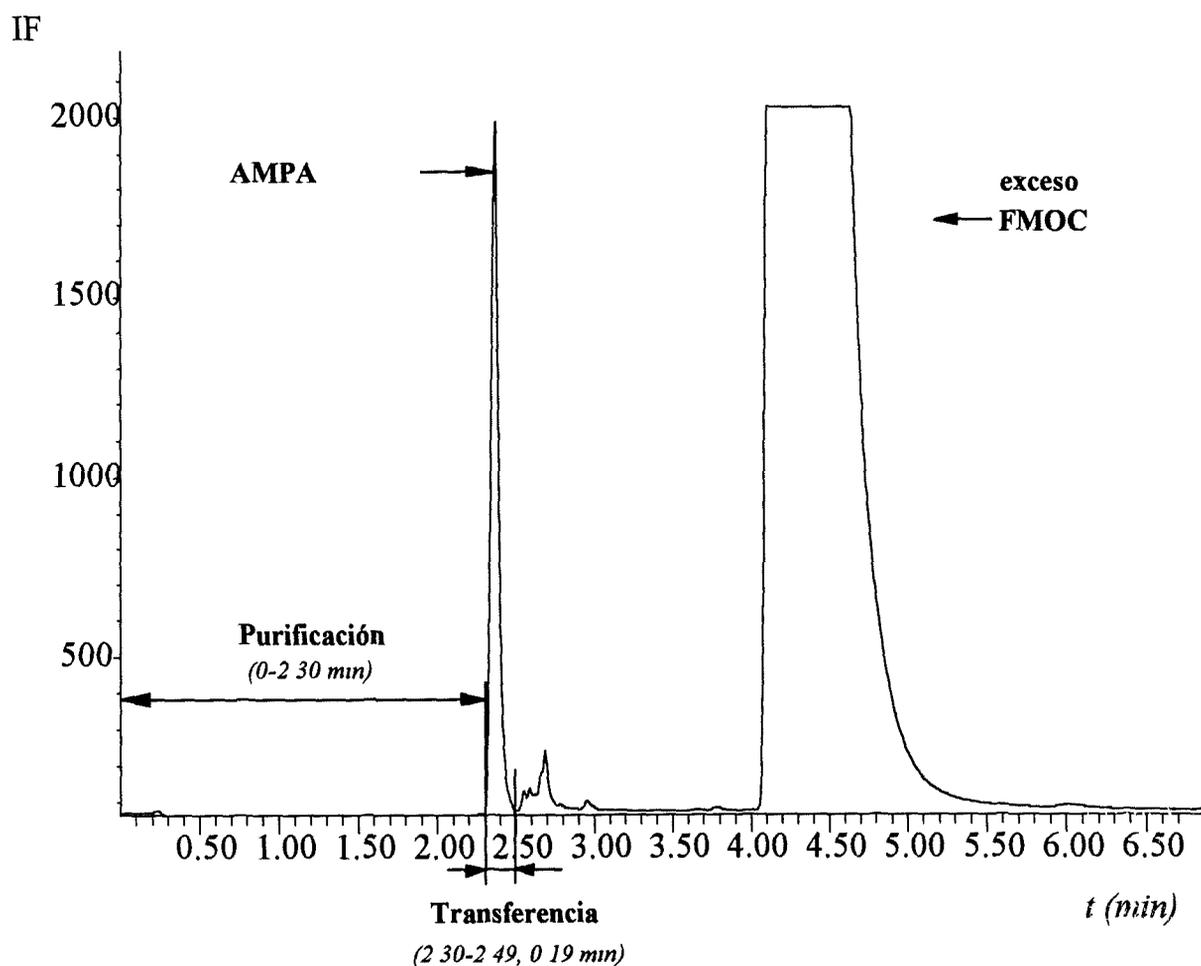


Figura 88. Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector de fluorescencia para un patrón de AMPA ($0.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) obtenido tras derivatización con FMOC y posterior dilución por cuatro con tampón borato.

Condiciones: prederivatización con FMOC; columna C18 ($30 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); fase móvil KH_2PO_4 0.05 M ($\text{pH } 5.5$)/ CH_3CN ($65:35$); volumen de inyección 2 ml ; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T = 30^\circ\text{C}$

De las experiencias efectuadas, se deduce que es de gran importancia controlar el contenido de acetonitrilo en la disolución de la muestra, pues afecta en gran medida a la forma de los picos en la columna C-1 y, por tanto, a la posterior transferencia de los analitos a la columna C-2. Ello obliga a diluir la disolución inyectada en el sistema cromatográfico con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Sin embargo, esta dilución también tiene un efecto beneficioso (además de mejorar la forma de los picos), como es la dilución de los posibles interferentes de la muestra, con lo que disminuyen los efectos de matriz, mejorando la forma de los cromatogramas de muestras reales, como se verá posteriormente.

Se puede observar, así mismo, la similitud en el comportamiento de los derivados fluorescentes de glifosato, AMPA y glufosinato sobre la columna C-1 de fase reversa. A partir de los cromatogramas obtenidos, se puede comprobar que la verdadera etapa de purificación no corresponde a los primeros 2.1-2.3 min (como ocurre en las aplicaciones hasta ahora desarrolladas para análisis de pesticidas por CL-CL), sino que, realmente, la purificación se inicia a partir de los 2.50 min. Como ya se ha comentado en el apartado anterior dedicado a glufosinato, ello es debido a la escasa o nula retención de los analitos sobre la primera columna C18, como consecuencia de su carácter polar.

Por otro lado, cabe la posibilidad de efectuar la transferencia de glifosato (purificación 2.12 min; transferencia 0.28 min), AMPA (purificación 2.30 min; transferencia 0.19 min), o bien de ambos simultáneamente efectuando la transferencia de glifosato, pero ampliando ligeramente el tiempo para incluir también al AMPA (purificación 2.12 min; transferencia 0.41 min). Este aumento del tiempo de transferencia no influye negativamente en la determinación de glifosato.

En la **Figura 89** se muestra el cromatograma CL-CL para una mezcla de glifosato y AMPA ($40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$), obtenido según el procedimiento de análisis de glifosato (dilución previa a la inyección de ocho veces), pero ampliando ligeramente el tiempo de transferencia para incluir también al AMPA.

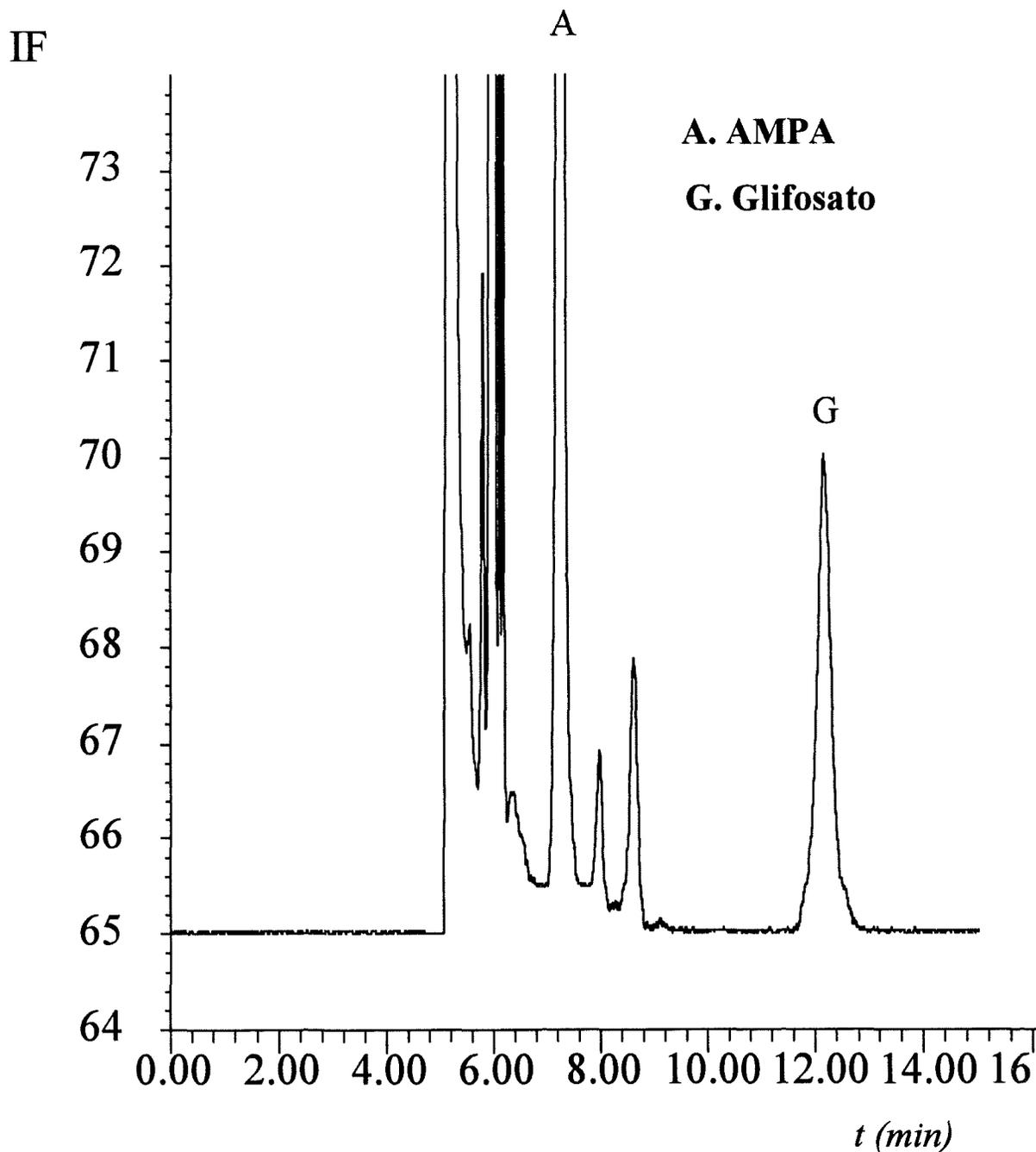


Figura 89. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato y AMPA de $40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.12 min. Transferencia: 0.41 min.

Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 ($30\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); C-2 Adsorbosphere NH_2 ($250\times 4.6\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{\text{ex}} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$

II.4.2. Características analíticas.

A continuación, se estudian las características analíticas del procedimiento CL-CL en cuanto a linealidad, repetibilidad y límite de detección.

Curvas de calibrado

Se obtienen los cromatogramas correspondientes a disoluciones patrón de glifosato y AMPA entre 4 y 400 ng·ml⁻¹, utilizando un volumen de inyección de 2 ml. Cada mezcla de patrones se ha inyectado en las condiciones óptimas para el análisis de AMPA (1), lo que supone una dilución previa a la inyección de 4 veces y la transferencia selectiva de AMPA desde C-1 a C-2, y también en las condiciones de análisis para glifosato (2 y 3), con una dilución de ocho veces y ampliando la transferencia hasta 0.41 min para incluir también al AMPA. Las curvas de calibrado obtenidas, cuantificando con área de pico, se muestran en la **Figura 90**, mientras que las obtenidas mediante altura de pico aparecen en la **Figura 91**.

En la **Tabla 63** se indican los datos del análisis de regresión realizado, observándose que el método es lineal en el intervalo estudiado para todos los compuestos.

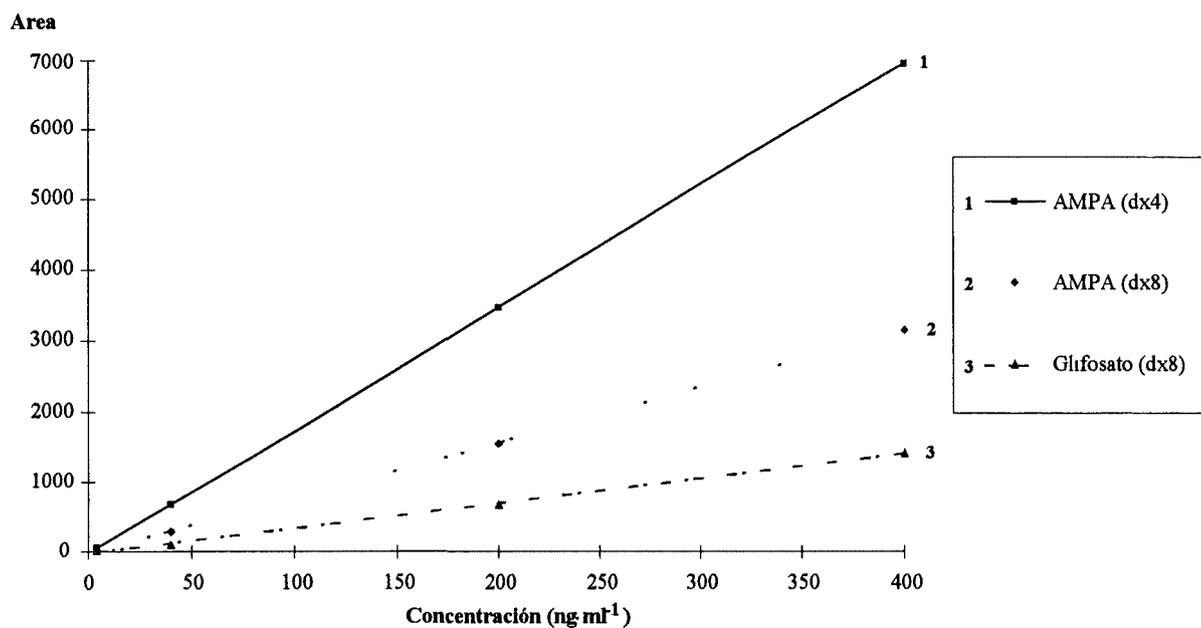


Figura 90. Curvas de calibrado obtenidas en área de pico para glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

1) Purificación: 2.30 min. Transferencia: 0.19 min (AMPA).

2,3) Purificación: 2.12 min. Transferencia: 0.41 min (glifosato)

Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 (30×4.6mm, 5 μm); C-2 Adsorbosphere NH₂ (250×4.6mm, 5 μm); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con λ_{ex} = 263 nm y λ_{em} = 317 nm; T=30°C

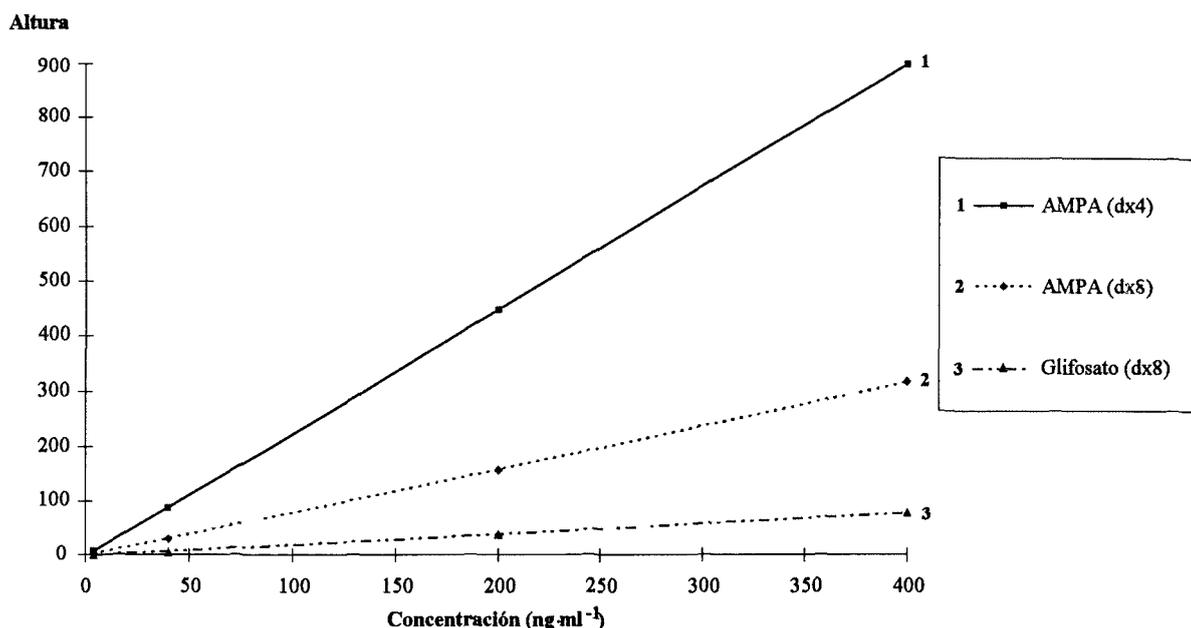


Figura 91. Curvas de calibrado obtenidas en altura de pico para glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

1) Purificación: 2.30 min. Transferencia: 0.19 min (AMPA).

2,3) Purificación: 2.12 min. Transferencia: 0.41 min (glifosato)

Condiciones: prederivatización con FMOC; C-1 Spherisorb C18 (30×4.6mm, 5 μm); C-2 Adsorbosphere NH₂ (250×4.6mm, 5 μm); volumen de inyección 2 ml; detección por fluorescencia con $\lambda_{ex} = 263 \text{ nm}$ y $\lambda_{em} = 317 \text{ nm}$; T=30°C.

Tabla 63. Datos estadísticos ($p < 0.01$) para las curvas de calibrado de glifosato y AMPA obtenidas mediante cromatografía líquida con columnas acopladas

	(1) AMPA (dx4)		(2) AMPA (dx8)		(3) Glifosato (dx8)	
	Area	Altura	Area	Altura	Area	Altura
Ordenada Origen	-17.49	-2.83	-16.27	-1.61	-21.99	-1.49
Error Estándar	274.8	0.32	12.37	1.00	21.99	1.15
Ordenada Origen						
Pendiente	17.42	2.256	7.904	0.798	3.583	0.197
Error Estándar	0.070	0.0014	0.055	0.004	0.096	0.005
Pendiente						
Error Estándar	4.03	0.442	17.25	1.39	30.13	1.65
R	0.9999	0.9981	0.9999	0.9999	0.9993	0.9993
Nivel	7.3E-10	2.9E-7	4.8E-5	3.1E-5	7.2E-4	6.8E-4
Significación						

(1) (2) (3): Ver pies de Figuras 90 y 91.

Repetibilidad.

Se ha estudiado la repetibilidad del procedimiento completo incluyendo la derivatización previa con FMOC y el posterior análisis por CL-CL.

Se realizan 7 derivatizaciones para dos disoluciones patrón conteniendo glifosato y AMPA en concentraciones 200 (Tabla 64) y 4 ng·ml⁻¹ (Tabla 65), calculándose la desviación estándar relativa en cuanto a tiempo de retención, área y altura de pico, obteniéndose en todos los casos resultados satisfactorios.

Tabla 64. Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas (mezcla patrón de 200 ng·ml⁻¹) (n=7).

Herbicida	<u>t_r (min)</u>		<u>Area</u>		<u>Altura</u>	
	media	RSD (%)	media	RSD (%)	media	RSD (%)
(1) AMPA (dx4)	7.26	0.09	3452	0.2	452	0.2
(2) AMPA (dx8)	7.17	0.14	1339	7.0	137	8.0
(3) Glifosato (dx8)	11.63	0.16	657	0.5	38.3	0.5

(1) (2) (3): Ver pies de Figuras 90 y 91.

Tabla 65. Repetibilidad del procedimiento para el análisis de glifosato y AMPA mediante cromatografía líquida con columnas acopladas (mezcla patrón de 4 ng·ml⁻¹) (n=7).

Herbicida	<u>t_r (min)</u>		<u>Area</u>		<u>Altura</u>	
	media	RSD (%)	media	RSD (%)	media	RSD (%)
(1) AMPA (dx4)	7.25	0.08	55.7	3.9	6.6	3.1
(2) AMPA (dx8)	7.20	0.06	19.8	6.0	1.8	3.8
(3) Glifosato (dx8)	11.44	0.05	16.25	6.6	0.69	3.8

(1) (2) (3): Ver pies de Figuras 90 y 91.