

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>	
	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>
(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>	
	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>	<u>media</u>	<u>RSD (%)</u>
(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.

Límites de detección.

Se calculan a continuación los límites de detección empíricos (3 veces el ruido de fondo, $S/N=3$) obtenidos para glifosato y AMPA, analizados cada uno de ellos en sus respectivas condiciones óptimas.

En el caso del glifosato, el límite de detección se ha calculado a partir del cromatograma del patrón de $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (**Figura 92**), obteniéndose un valor de $0.6 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

Para el AMPA, se calcula a partir del cromatograma de un patrón de $0.4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ (**Figura 93**), obteniéndose un valor de $0.1 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$.

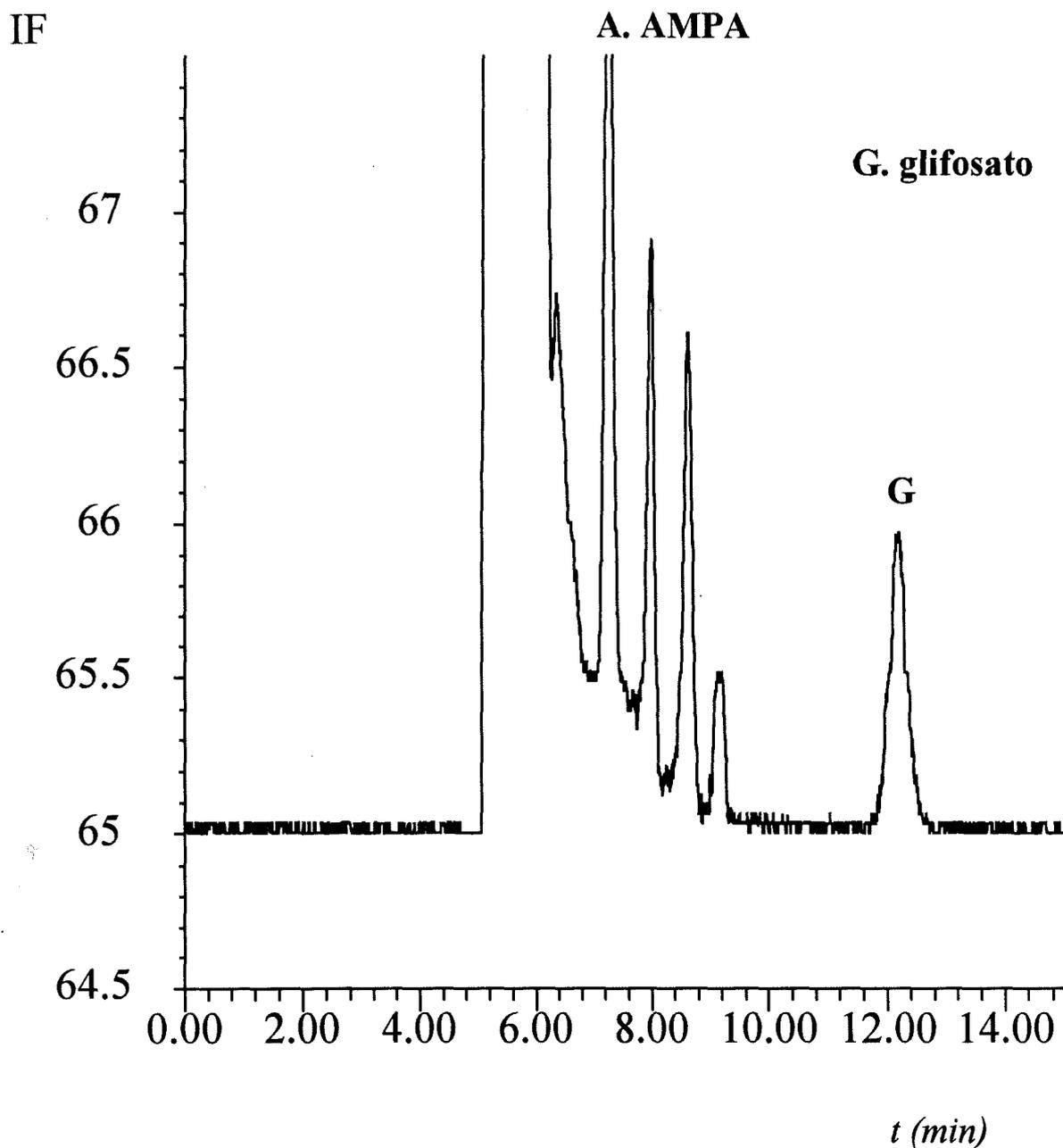


Figura 92. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato de $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

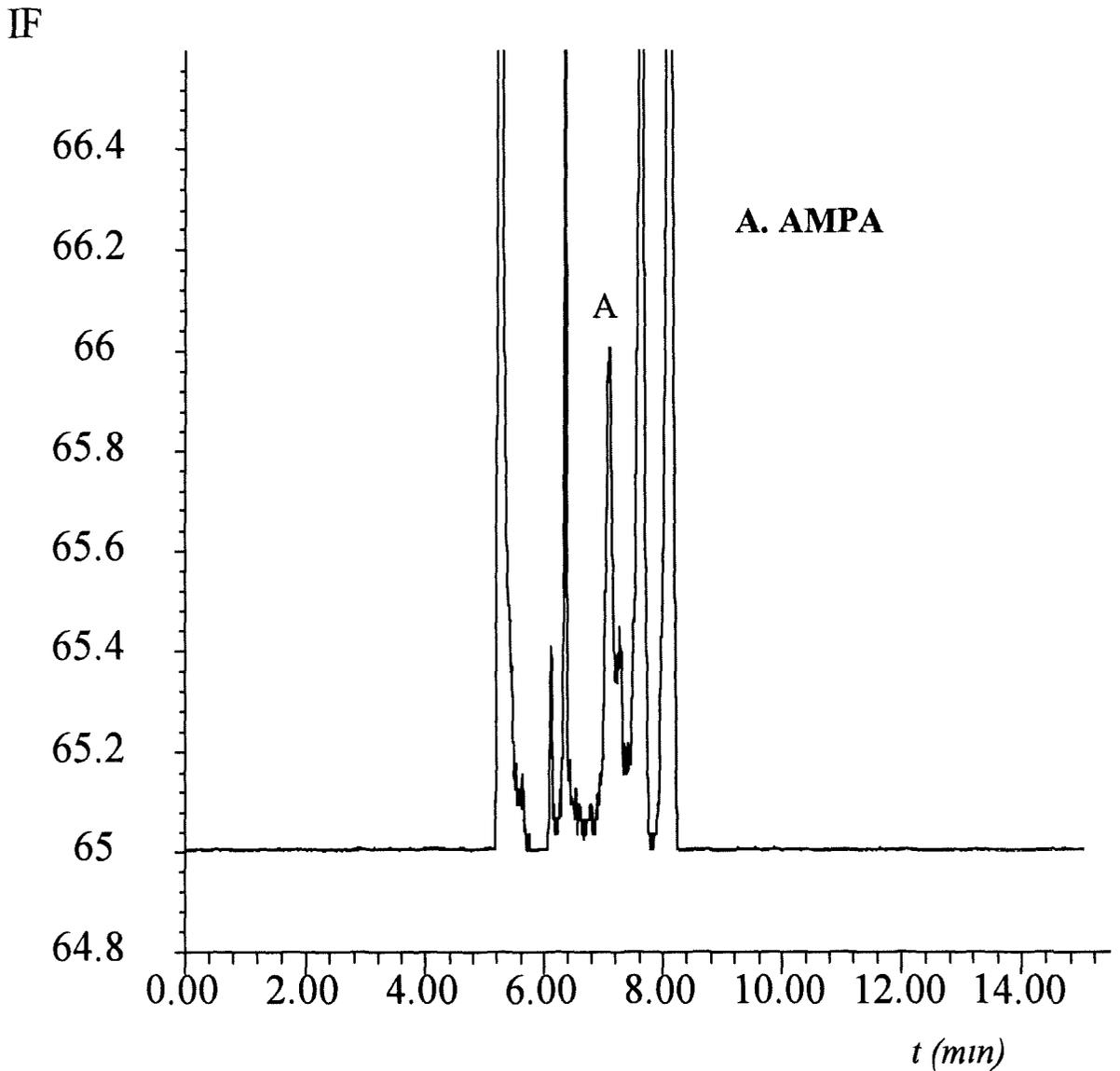


Figura 93. Cromatograma de una disolución patrón de AMPA de $0.4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.30 min. Transferencia: 0.19 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.4.3. Procedimiento recomendado para el análisis de residuos de glifosato.

Se ha comprobado que el pico del glifosato aumenta si se incrementa la concentración del reactivo FMOC en la reacción de derivatización. Este hecho podría explicarse por tratarse de una amina secundaria que requeriría concentraciones más altas de reactivo para formar el derivado fluorescente. El aumento de concentración de FMOC no produce, sin embargo, ningún efecto sobre la señal del AMPA (amina primaria). Utilizando una disolución de 1000 ppm, en lugar de la de 100 ppm, se obtiene un incremento en la señal de fluorescencia del glifosato de, aproximadamente, 20%.

El procedimiento finalmente recomendado para la determinación de residuos de glifosato en aguas se muestra en el esquema de la **Figura 94**. En dicho procedimiento, una vez realizada la reacción de derivatización, se efectúa una dilución por ocho de la disolución inyectada en el sistema CL-CL. Se inyectan 2 ml de dicha disolución diluida en el sistema cromatográfico, realizándose una purificación en línea durante 2.12 min con la fase móvil M-1. La fracción que contiene el glifosato se transfiere desde C-1 a C-2 con 280 μ l (0.28 min, esto es 17 segundos) de fase móvil M-2.

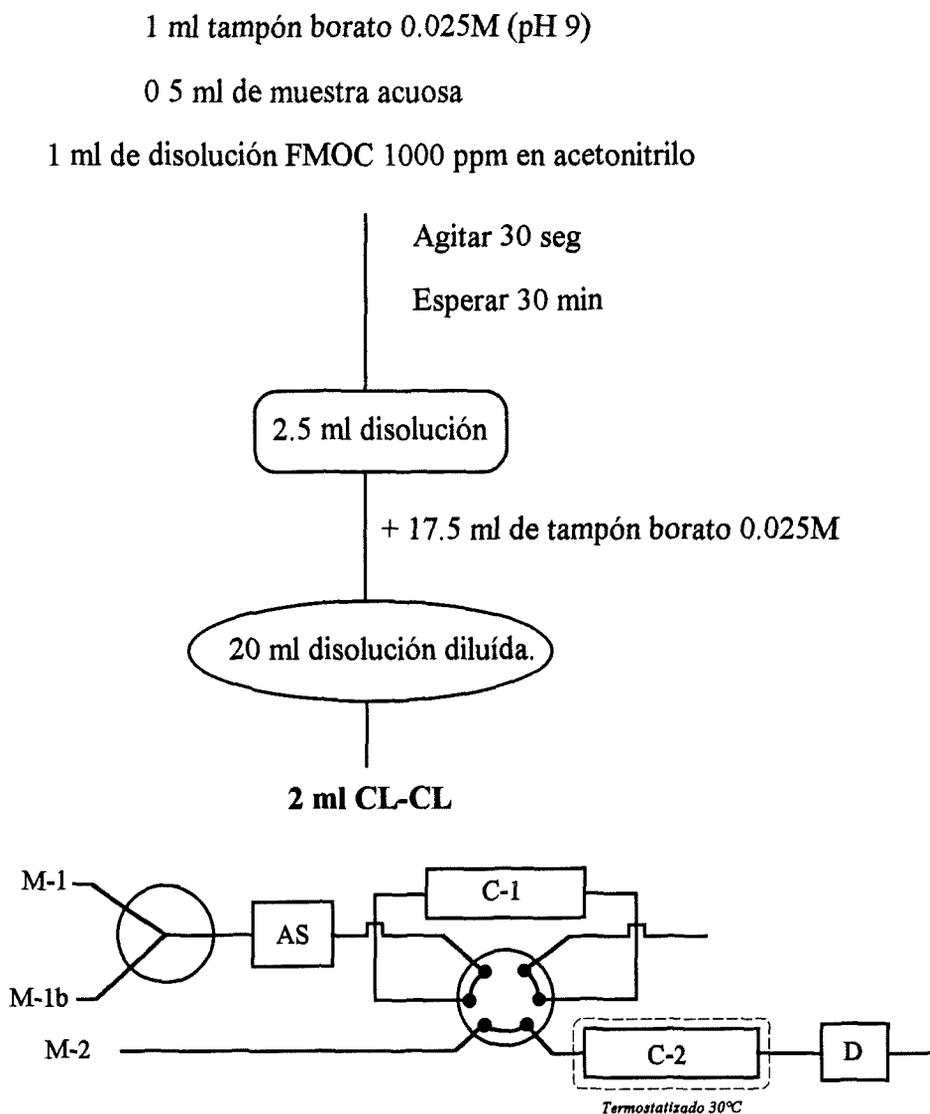
Aplicando exactamente las mismas condiciones de análisis, pero ampliando la transferencia hasta 0.41 min (25 s), es posible también analizar el AMPA, de modo que se pueden determinar conjuntamente residuos de glifosato y AMPA mediante un único procedimiento analítico. Sin embargo, las condiciones no son las óptimas para la determinación de AMPA, que se debería analizar más adecuadamente según se indica en el apartado siguiente.

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 antes de la siguiente inyección.

En la **Figura 95** se muestra el cromatograma de un patrón de glifosato de 4 ng·ml⁻¹ obtenido por aplicación del procedimiento recomendado.

Dicho procedimiento permite obtener un límite de detección aproximado de 0.6 ng·ml⁻¹ de glifosato. Se ha comprobado más adelante que con una ligera modificación en el procedimiento de derivatización, consistente en tomar un mayor volumen de muestra acuosa, se puede rebajar el límite de detección para el glifosato hasta 0.15 μ g·l⁻¹.

Si se incluye también el AMPA en el procedimiento, ampliando la transferencia a 0.41 min, el límite de detección obtenido para este metabolito es de aproximadamente 0.4 ng·ml⁻¹.



AS: Autoinyector con loop de inyección de 2000 μ l

C-1: Columna de 30 mm, C18 5 μ m

C-2: Columna analítica de 250 mm, Adsorbospher NH₂ 5 μ m.

M-1: Acetonitrilo/KH₂PO₄ 0.05M (35:65)

M-1b: Acetonitrilo

M-2: Acetonitrilo/KH₂PO₄ 0.05M (35:65)

D: Fluorescencia λ_{ex} 263 nm, λ_{em} 317 nm

tiempo de purificación: 2.12 min

tiempo de transferencia: 0.28 min (17 s)

Ampliando el tiempo de transferencia a 0.41 min (25 s), se pueden determinar también residuos de AMPA.

Figura 94. Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el glifosato en muestras de agua.

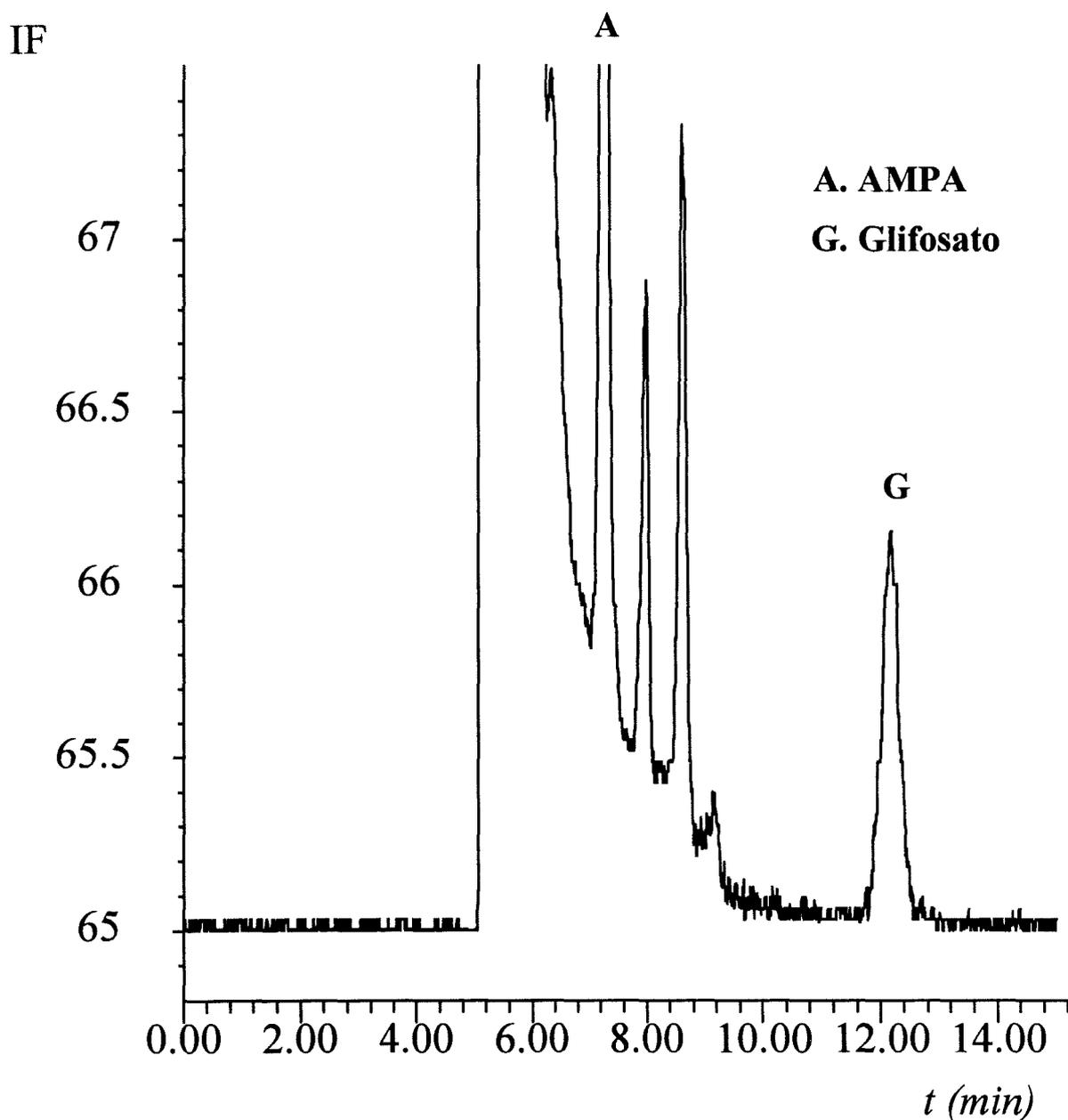


Figura 95. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato de $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.30 min. Transferencia: 0.41 min.

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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

Se ha inyectado una mezcla de patrones de los tres componentes estudiados: glufosinato, AMPA y glifosato en las condiciones de análisis de éste último, con el fin de comprobar si existe la posibilidad de analizar los tres compuestos conjuntamente.

En la **Figura 96** se muestra el cromatograma obtenido, pudiéndose observar que los tres herbicidas están suficientemente separados y que sería posible su análisis conjunto a niveles de residuos.

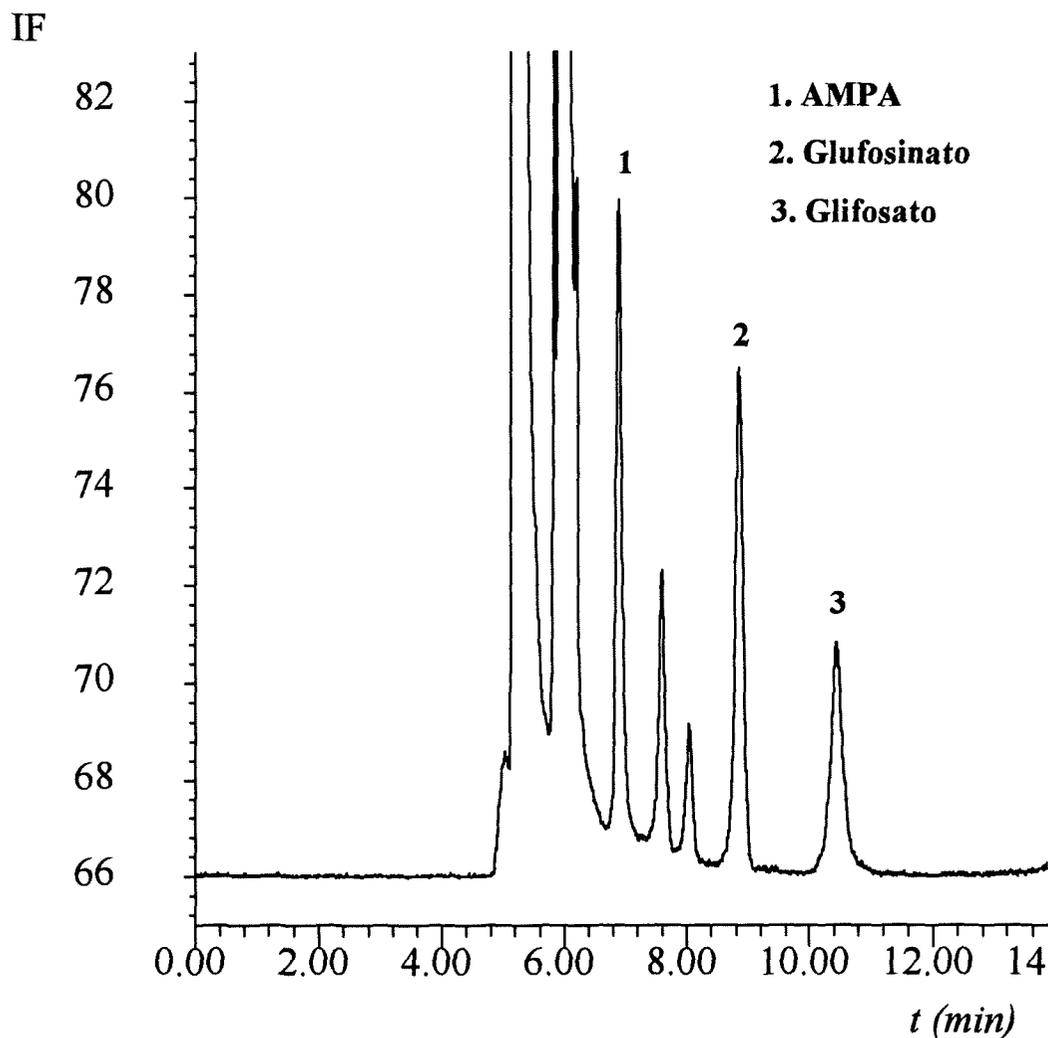


Figura 96. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de $40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.30 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.4.4. Procedimiento recomendado para el análisis de residuos de AMPA.

El procedimiento recomendado para la determinación de residuos del metabolito AMPA en muestras de agua se muestra en el esquema de la **Figura 97**. El procedimiento incluye la derivatización con FMOC, posterior dilución (x4) de la disolución obtenida, e inyección de 2 ml en el sistema CL-CL. La purificación en línea se realiza durante 2.30 min con la fase móvil M-1 y la fracción conteniendo AMPA se transfiere desde C-1 a C-2 con 190 μ l (0.19 min, esto es, 11 segundos) de fase móvil M-2.

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 antes de la siguiente inyección.

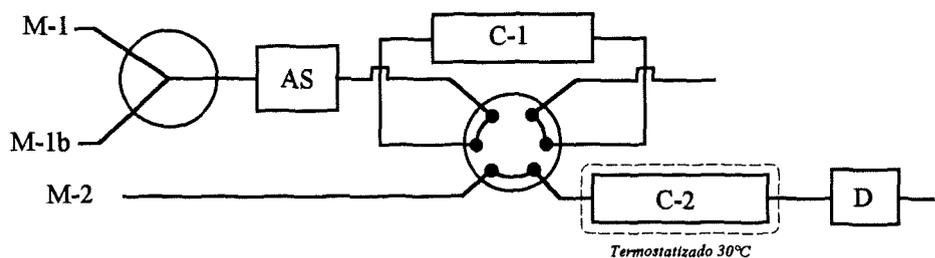
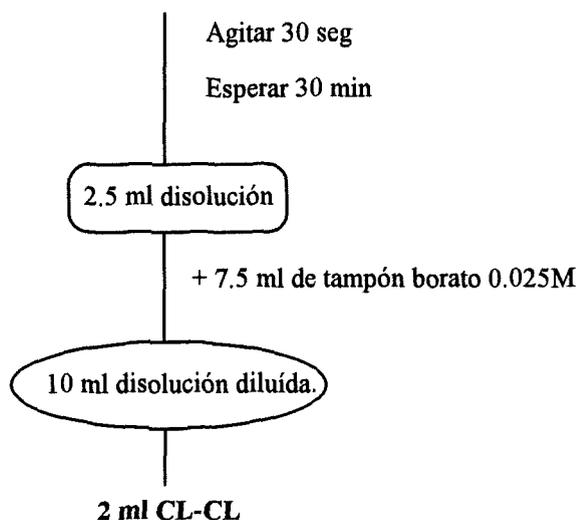
En la **Figura 98** se muestra un cromatograma de un patrón de 4 ng·ml⁻¹ obtenido por aplicación del procedimiento recomendado. Este procedimiento permite el análisis de AMPA hasta niveles de aproximadamente 0.1 ng·ml⁻¹.

En la **Figura 99** se muestra el cromatograma obtenido para una mezcla de glifosato, glufosinato y AMPA utilizando las condiciones óptimas de análisis de éste último, pudiendo observarse que los tres herbicidas están suficientemente separados y que sería posible su análisis conjunto a niveles de residuos.

1 ml tampón borato 0.025M (pH 9)

0.5 ml de muestra acuosa

1 ml de disolución FMOC 100 ppm en acetonitrilo



AS: Autoinyector con loop de inyección de 2000 μ l

C-1: Columna de 30 mm, C18 5 μ m

C-2: Columna analítica de 250 mm, Adsorbospher NH₂ 5 μ m.

M-1: Acetonitrilo/KH₂PO₄ 0.05M (35:65)

M-1b: Acetonitrilo

M-2: Acetonitrilo/KH₂PO₄ 0.05M (35:65)

D: Fluorescencia λ_{ex} 263 nm, λ_{em} 317 nm

tiempo de purificación: 2.30 min tiempo de transferencia: 0.19 min

Figura 97. Esquema del procedimiento recomendado de derivatización y posterior análisis mediante cromatografía líquida con columnas acopladas para el AMPA en muestras de agua.

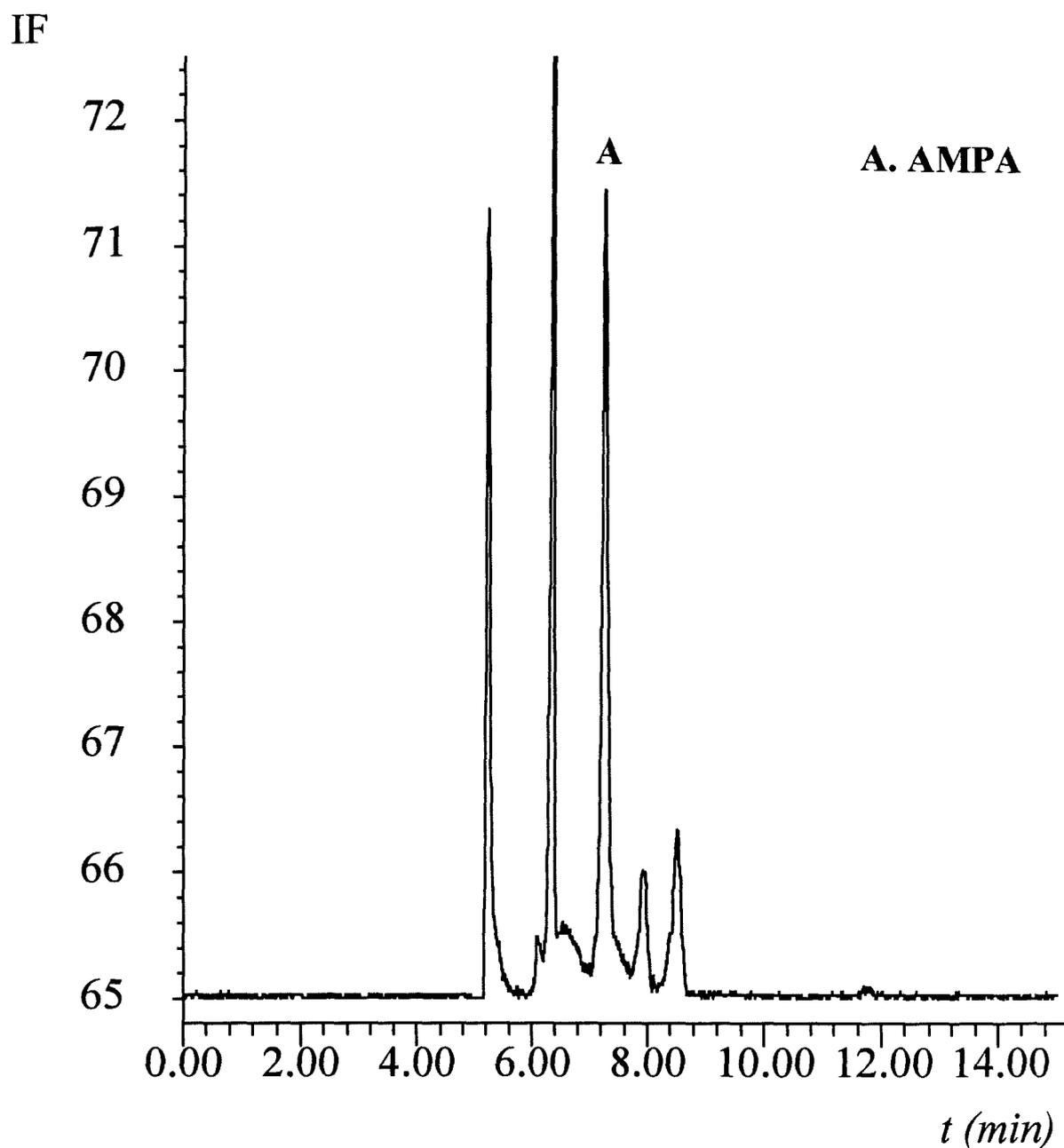


Figura 98. Cromatograma de una disolución patrón de AMPA de $4 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.30 min. Transferencia 0.19 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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

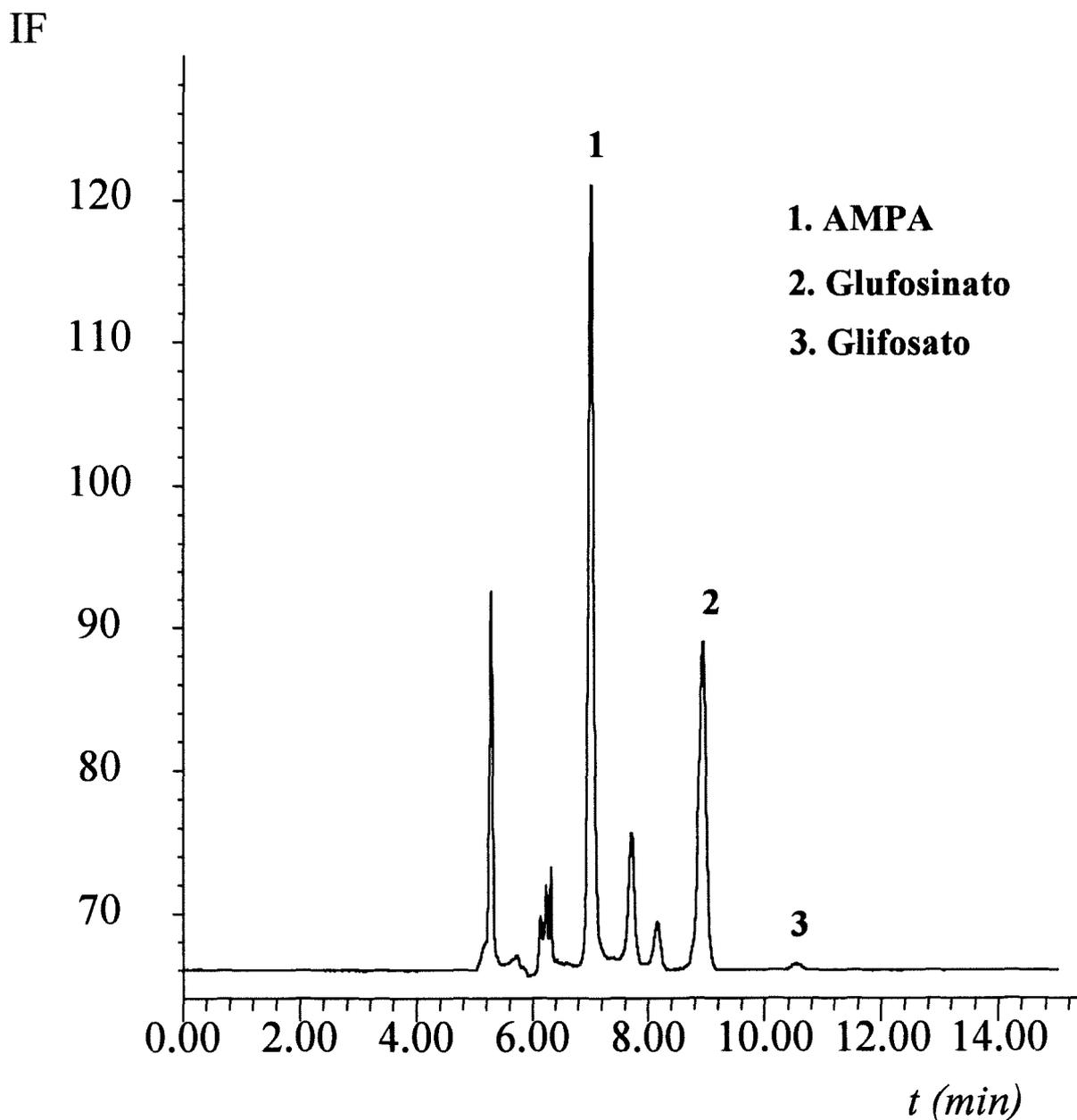


Figura 99. Cromatograma de una disolución patrón de glifosato, glufosinato y AMPA de $40 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ obtenido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas.

Purificación: 2.30 min. Transferencia: 0.19 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.4.5. Aplicación del procedimiento recomendado a muestras medioambientales.

Análisis de aguas.

Los procedimientos recomendados se han aplicado al análisis de muestras de aguas superficiales tomadas en el cauce del Río Mijares y en una zona húmeda denominada El Clot de la Mare de Déu (Borriana), fortificadas con glifosato y AMPA a distintos niveles de concentración. En la **Tabla 66** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 66. Recuperaciones de glifosato y AMPA en aguas superficiales analizadas mediante la aplicación de los procedimientos recomendados ($n = 5$).

Herbicida	Procedimiento	Río Mijares		El Clot
		4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
		R ^a (RSD) ^b	R (RSD)	R (RSD)
AMPA (dx4)	II.4.4.	102 (0.5)	95 (11)	99 (1.5)
AMPA (dx8)	II.4.3.	102 (1.2)	-	104 (4.5)
Glifosato (dx8)	II.4.3.	103 (1.4)	107 ^c (4.2)	92 (8.5)

^a Recuperación en %.

^b Desviación estándar relativa en %.

^c Resultados obtenidos después de modificar la reacción de derivatización con FMOC.

Las recuperaciones pueden considerarse altamente satisfactorias, así como las desviaciones del procedimiento obtenidas al nivel de fortificación de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Para el análisis de AMPA a la concentración de 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, se aplicó el procedimiento óptimo para este metabolito (Apartado II.4.4.), obteniendo una recuperación del 95%, con desviaciones del 11%, que pueden considerarse normales para estos bajos niveles de concentración. En la **Figura 100** se muestra el cromatograma correspondiente al agua superficial del Río Mijares fortificada a 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

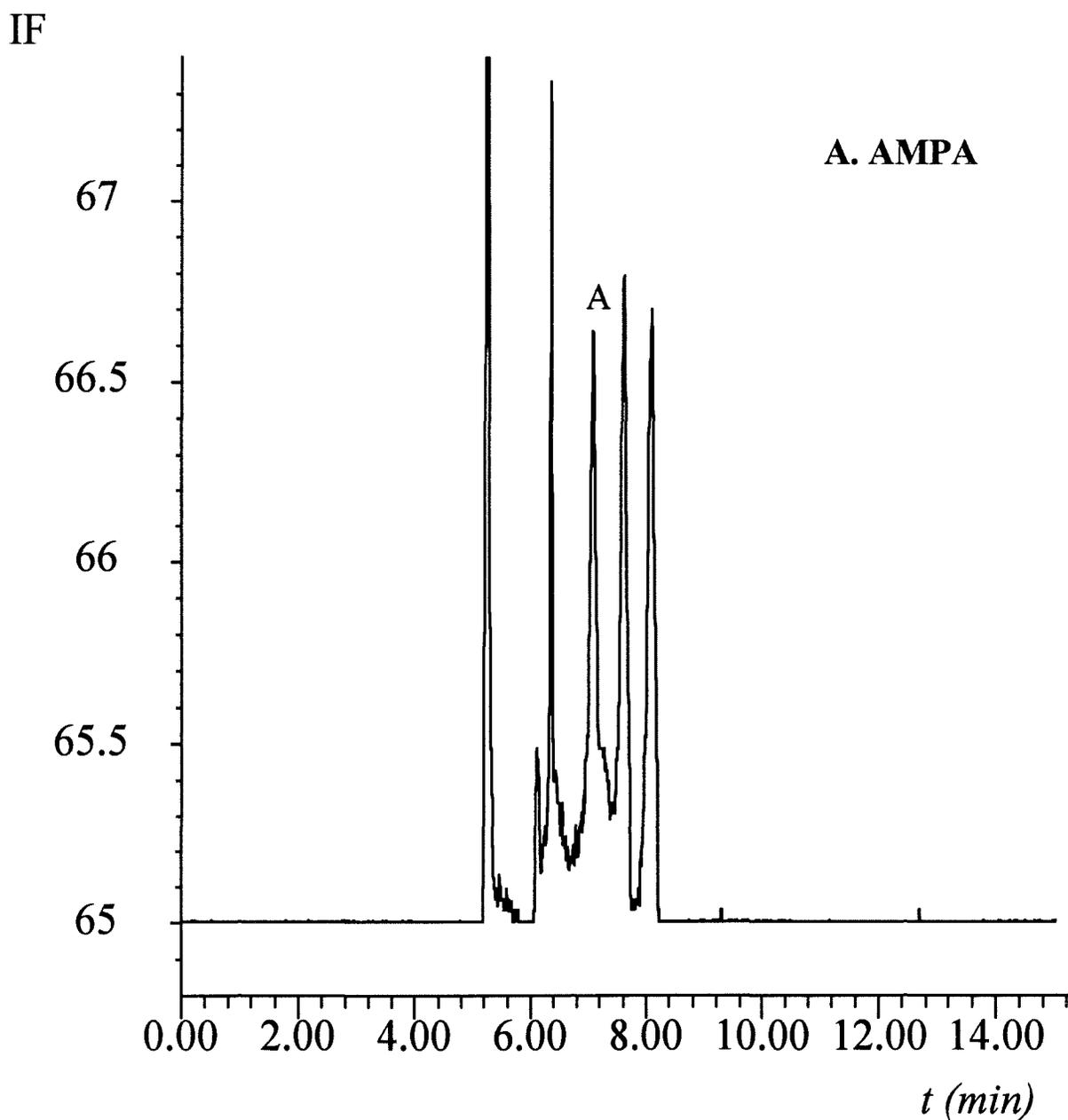


Figura 100. Cromatograma de un agua superficial (Río Mijares) fortificada con AMPA al nivel de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante acoplamiento CL-CL.

Purificación: 2.30 min. Transferencia 0.19 min.

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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

Para el análisis de glifosato al nivel de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ fue necesario modificar el procedimiento, con el fin de rebajar el límite de detección hasta niveles próximos a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Como ya se ha comentado anteriormente, se debe mantener un contenido de acetonitrilo en la mezcla de reacción próximo al 40% para obtener un rendimiento aceptable en la reacción de derivatización con FMOC. Manteniendo constante el volumen de disolución de reactivo derivatizante (1 ml de disolución acetonitrilo), se aumentó el volumen de muestra de agua y se disminuyó el de borato aumentando su concentración, de modo que la mezcla final tuviera concentraciones de acetonitrilo y borato similares a las utilizadas en el procedimiento recomendado.

El procedimiento final de derivatización precolumna recomendado para el glifosato se muestra en la **Figura 101**. La utilización de 1.5 ml de muestra, en lugar de los 0.5 ml tomados inicialmente, permite aumentar la sensibilidad del procedimiento por un factor de aproximadamente tres veces. El límite de detección para el glifosato, aplicando el nuevo procedimiento de análisis, se rebaja a $0.15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, valor que se obtiene a partir del cromatograma de un agua superficial fortificada al nivel de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (**Figura 102**).

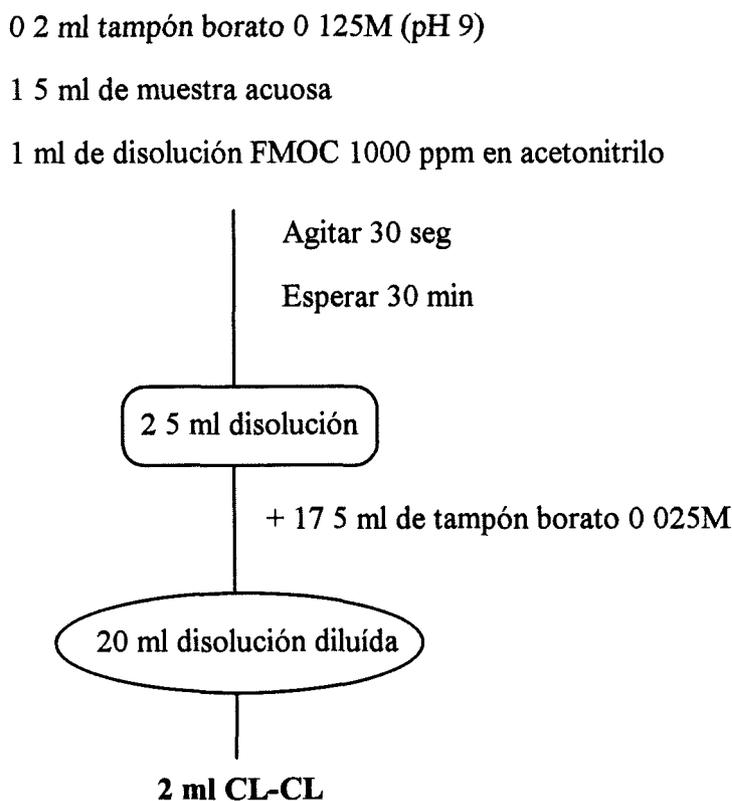


Figura 101. Esquema del procedimiento final de derivatización precolumna para el glifosato en muestras de agua.

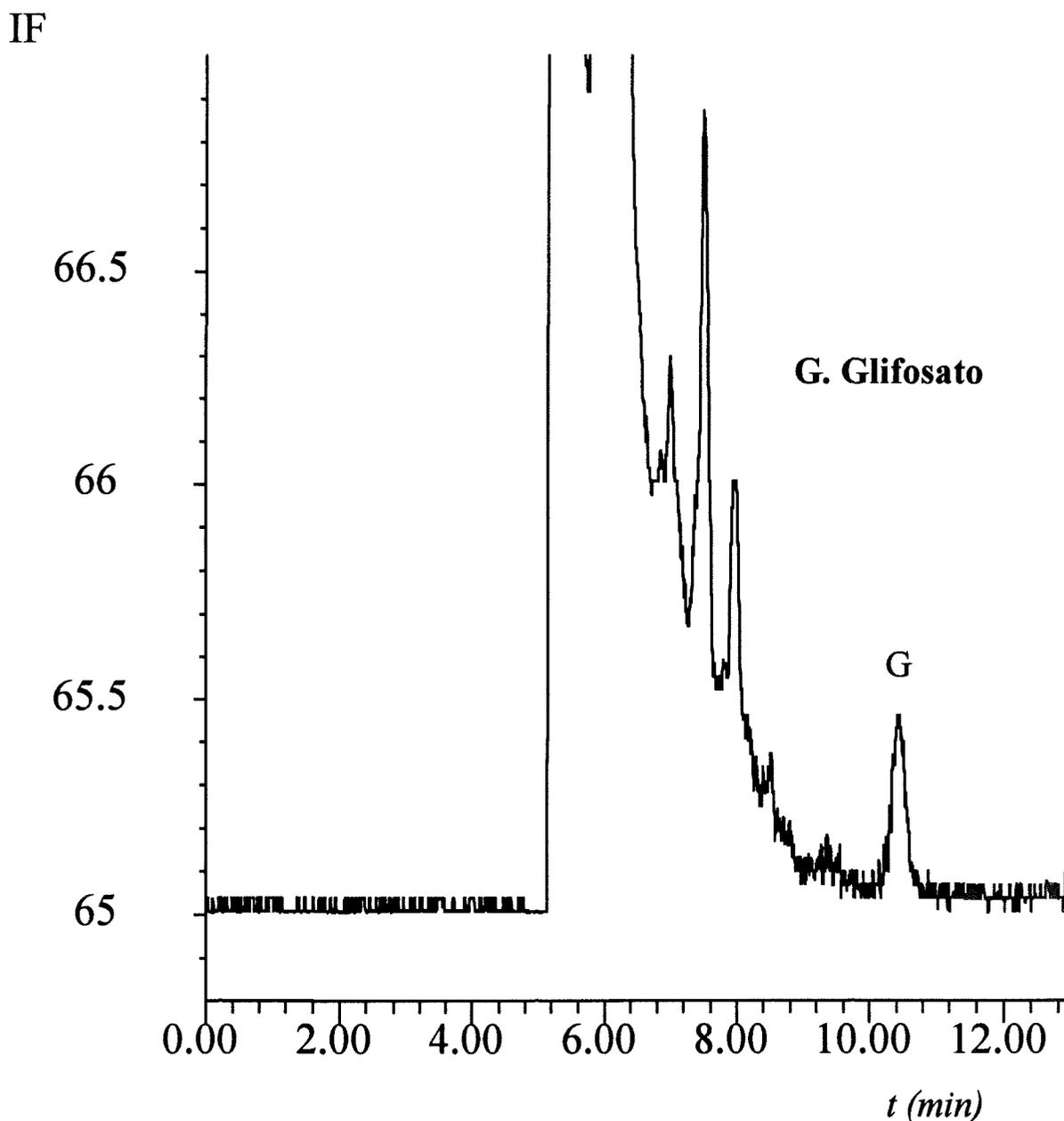


Figura 102. Cromatograma de un agua superficial (Río Mijares) fortificada con glifosato al nivel de $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ obtenido mediante acoplamiento CL-CL.

Purificación: 2.30 min. Transferencia 0.41 min.

Condiciones: prederivatización con FMOC (Figura 98); 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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

En la muestra de agua tomada en el Clot de la Mare de Déu, se comprobó la existencia de glifosato ($2.7 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y de AMPA ($0.75 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). Las recuperaciones que aparecen en la **Tabla 66** se obtuvieron restando los cromatogramas de la muestra sin fortificar.

En la **Figura 103** se muestran los cromatogramas de las dos aguas analizadas, tanto sin fortificar como fortificadas al nivel de $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, pudiendo comprobarse la presencia de glifosato y AMPA en la muestra del Clot de la Mare de Déu.

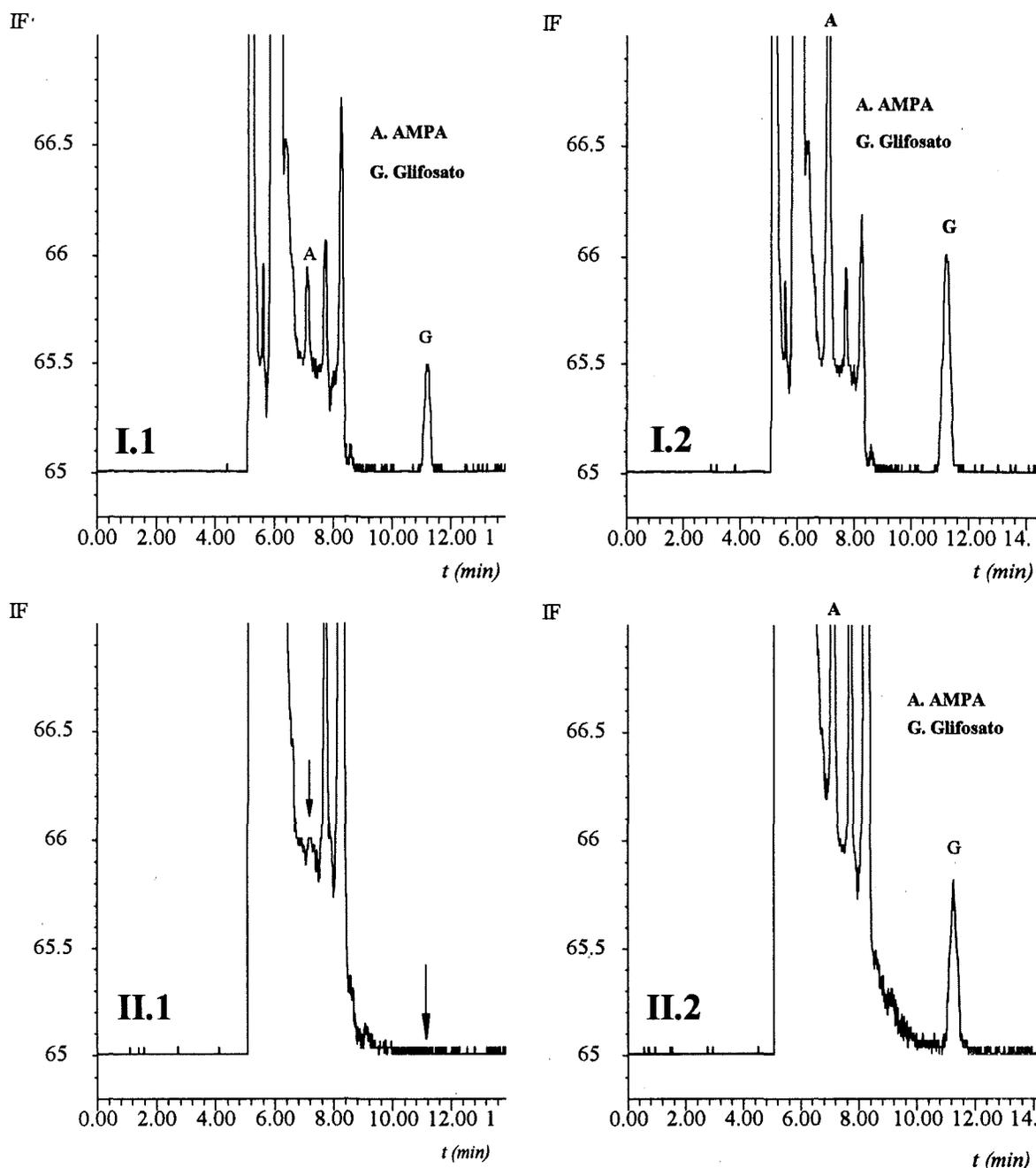


Figura 103. Cromatogramas de dos aguas superficiales (I) El Clot de la Mare de Déu (II) Río Mijares obtenidos mediante acoplamiento CL-CL. 1 Muestras sin fortificar. 2 Muestras fortificadas a $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Purificación: 2.30 min. Transferencia 0.41 min.

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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T=30^\circ\text{C}$.

Análisis de suelos

Tal como se ha indicado en el capítulo de Antecedentes, la extracción de estos compuestos en muestras de suelo es muy problemática, con grandes variaciones en las recuperaciones en función del tipo de suelo (fundamentalmente dependiendo del contenido de materia orgánica y arcillas). De todos los reactivos ensayados, parece ser el hidróxido potásico el que proporciona mejores resultados.

El objetivo de este apartado no es el estudio de la etapa de extracción, sino la aplicación del acoplamiento CL-CL a extractos de suelos con el fin de comprobar el potencial de la técnica para este tipo de muestras.

Se estudiaron cuatro tipos diferentes de suelos, tomados en zonas con amplia tradición en el uso de glifosato para el control de malas hierbas:

- T10 (0-10 cm): suelo procedente de un campo de cultivo de la Isla de Tenerife, con alto contenido de materia orgánica.
- GC10 (0-10 cm): suelo procedente de un campo de cultivo de la Isla de Gran Canaria, con alto contenido de materia orgánica.
- GC30 (30 cm): suelo procedente de un campo de cultivo de la Isla de Gran Canaria.
- M50 (0-50 cm): suelo procedente de un campo de cultivo del Maresme (Barcelona), más arcilloso.

El procedimiento utilizado es el siguiente: se pesan 5 g de suelo y se realiza la extracción con 10 ml de disolución de KOH 0.6 M durante 30 min con agitación mecánica. Tras centrifugar durante 15 min a 3500 rpm, se toma una alícuota de 1 ml del sobrenadante, se fortifica con glifosato y AMPA a 400 y 40 ng·g⁻¹ y se neutraliza con HCl; si se produce precipitación, se realiza un filtrado del extracto neutralizado. A continuación, se aplica el procedimiento recomendado para glifosato (**Figura 94**), tomando 0.5 ml del filtrado obtenido. En la **Tabla 67** se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 67. *Recuperaciones de glifosato y AMPA en extractos de suelos analizados mediante la aplicación del procedimiento recomendado para glifosato.*

	<i>T-10</i>	<i>GC-10</i>	<i>GC-30</i>	<i>Mataró-50</i>	
	40 ng·g ⁻¹	40 ng·g ⁻¹	40 ng·g ⁻¹	400 ng·g ⁻¹	40 ng·g ⁻¹
Herbicida	<i>R^a</i>	<i>R^a</i>	<i>R^a</i>	<i>R</i>	<i>R</i>
<i>AMPA</i>	int. ^b	91	101	93	104
<i>Glifosato</i>	101	96	132	108	72

^a *Recuperación en %, con substracción del blanco.*

^b *Interferencias.*

Para los suelos de Mataró se obtuvieron buenas recuperaciones mientras que para los suelos de Tenerife y Gran Canaria se tuvo que restar el blanco (extracto de suelo sin fortificar) ya que, de otro modo, se obtenían recuperaciones muy superiores al 100%. Ello fue debido a la presencia de residuos de AMPA y glifosato en las muestras, con valores entre 17 - 72 ng·g⁻¹.

En la **Figura 104** se muestran los cromatogramas obtenidos para un extracto de suelo de T-10 y GC-30, sin fortificar y fortificados a 40 ng·g⁻¹ con glifosato, comprobándose la presencia de este herbicida en la muestra de suelo de Tenerife (concentración encontrada: 72 ng·g⁻¹).

En la **Figura 105** se muestra el cromatograma obtenido para un extracto de suelo de Mataró fortificado a 40 ng·g⁻¹ con glifosato, del cual se deduce un límite de detección para este herbicida de 6.5 ng·g⁻¹, límite muy inferior a los encontrados en la bibliografía, siempre superiores a 50 ng·g⁻¹.

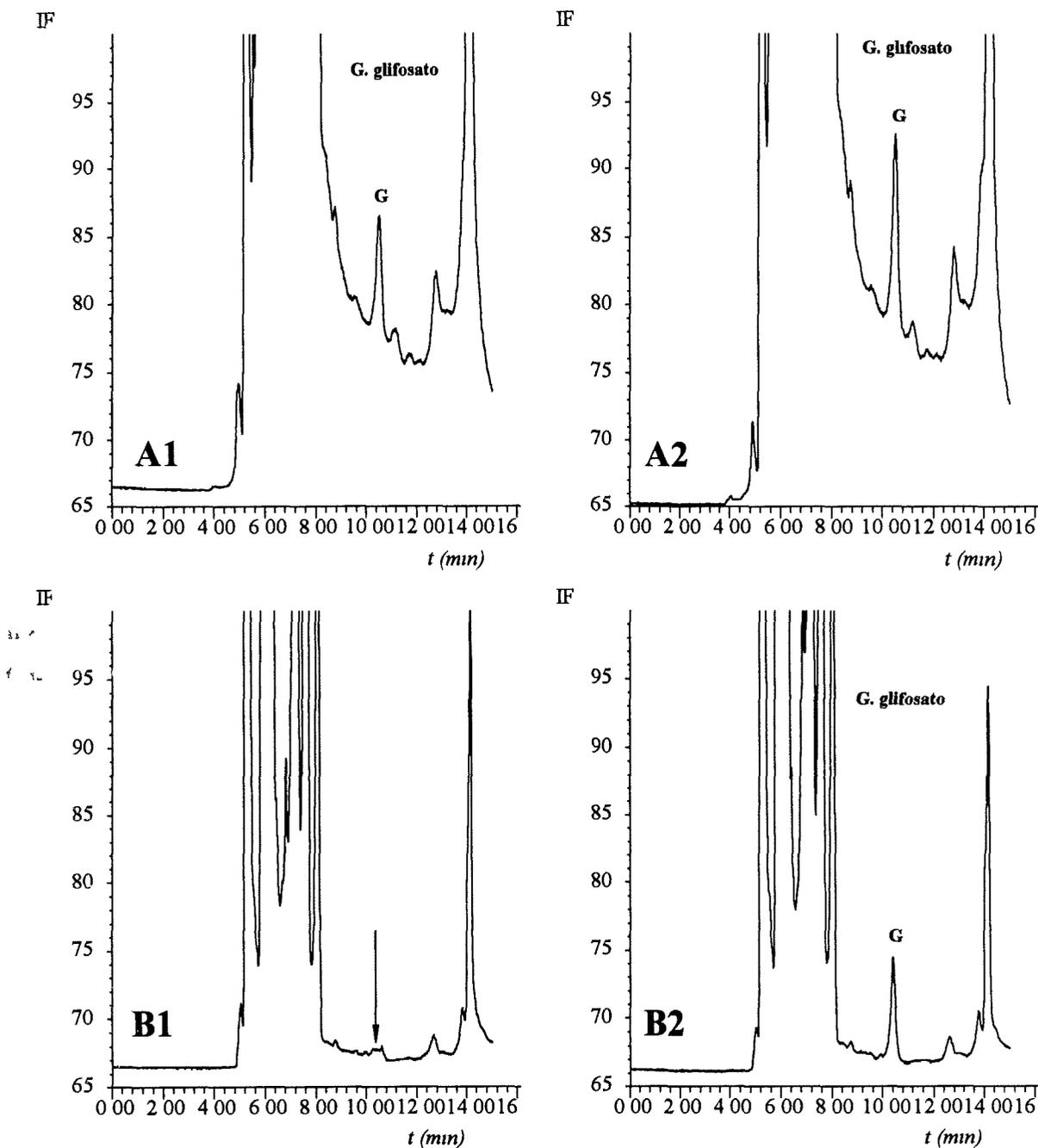


Figura 104. Cromatogramas de dos extractos de suelos (A) T-10 (B) GC-30 obtenidos mediante acoplamiento CL-CL. 1 Muestras sin fortificar. 2 Muestras fortificadas a $40 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$.

Purificación: 2.30 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 $\lambda_{\text{em}} = 317 \text{ nm}$; $T = 30^\circ\text{C}$.

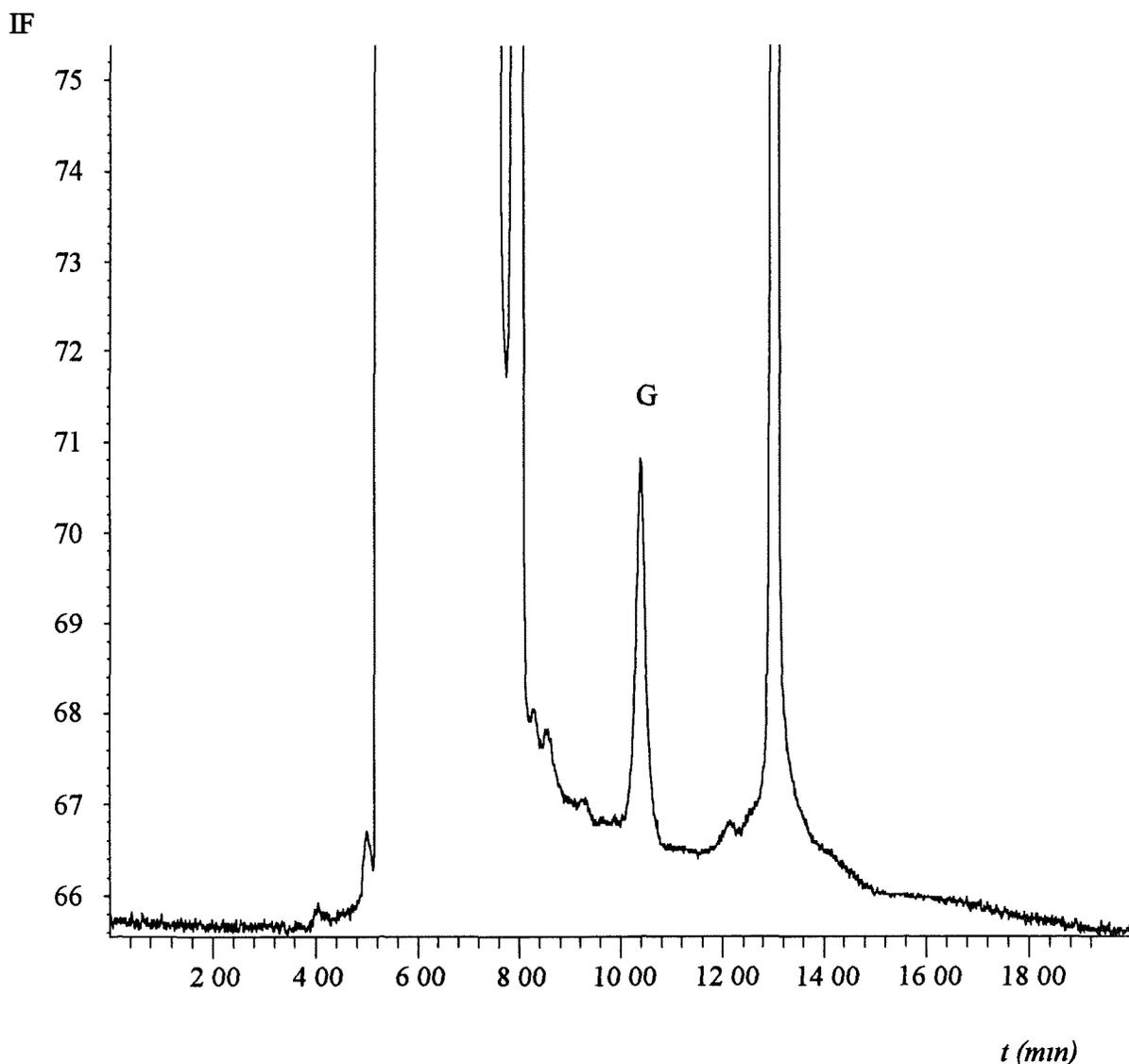


Figura 105. Cromatograma de un extracto de suelo fortificado con glifosato al nivel de 40 ng·g⁻¹ obtenido mediante acoplamiento CL-CL.

Purificación: 2.30 min. Transferencia 0.41 min.

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 $\lambda_{ex} = 263$ nm y $\lambda_{em} = 317$ nm; T=30°C.

En conclusión, se han desarrollado procedimientos de análisis que permiten tanto la determinación individual de residuos de glifosato y de AMPA como la determinación conjunta de ambos. Se trata de métodos con elevada capacidad de análisis (aproximadamente 50 muestras diarias), gracias a la eliminación "on-line" del exceso de reactivo FMOC y al corto tiempo de análisis al utilizar la técnica de columnas acopladas. Además, son procedimientos robustos, ya que, a lo largo de los experimentos realizados, la columna C18 (C-1) mantuvo su resolución y no fue necesario el reajuste de las condiciones de purificación y de transferencia. Sin embargo, la columna amino (C-2), como ya se observó anteriormente para glufosinato, sufrió una pérdida gradual de eficiencia, sólo advertible tras dos meses de uso continuado, lo que provocó una disminución de los tiempos de retención (especialmente para el glifosato).

El método propuesto supone un medio rápido, sensible y selectivo de analizar residuos de glifosato, junto con su principal metabolito AMPA, en muestras de aguas a niveles del orden de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Además, se ha explorado la posibilidad de aplicar el procedimiento CL-CL a extractos de suelos con resultados muy satisfactorios, obteniéndose un límite de detección de $6.5 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$, muy inferior a los habitualmente propuestos en la bibliografía consultada, siempre superiores a $50 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$.

D. III. BIBLIOGRAFIA

- Archer, T.E.; Stokes, J.D. (1984), *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 586.
- Aubin, A.J.; Smith, A.E. (1992), *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1163.
- Barberá, C. (1989), *Pesticidas Agrícolas*, 4ª edición, Ed. Omega, Barcelona.
- Beltran, J.; Gerritse, R. (1994), Comunicación Personal.
- BioRad (1990), Bulletin 1591
- Cowell, J.E.; Kunstman, J.L.; Nord, P.J.; Steinmetz, J.R.; Wilson, G.R. (1986), *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 955.
- DFG (1992a), *Glyphosate*, Manual of Pesticide Residue Analysis, Vol II, pg 229, H P Thier y J Kirchhoff Editores, VCH mbH, Weinheim, Alemania
- DFG (1992b), *Glufosinate*, Manual of Pesticide Residue Analysis, Vol II, pg 217, H P Thier y J Kirchhoff Editores, VCH mbH, Weinheim, Alemania
- Eberbach, P.L.; Douglas, L.A. (1991), *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1776.
- Einarsson, S.; Josefsson, B.; Langerkvist, S. (1983), *J. Chromatogr.*, **282**, 609.
- Einarsson, S. (1985), *J. Chromatogr.*, **348**, 213.
- Fiedler, H.P.; Plaga, A.; Schuster, R. (1986), *J. Chromatogr.*, **353**, 201.
- Fiedler, H.P.; Plaga, A. (1987), *J. Chromatogr.*, **386**, 229.
- 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
- Fürst, P.; Pollack, L.; Graser, T.A.; Godel, H.; Stehle, P. (1990), *J. Chromatogr.*, **499**, 557.
- Glass, R.L. (1983), *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 280.
- Glass, R.L. (1984), *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 1249.
- Glass, R.L. (1987), *J. Agric. Food Chem.*, **35**, 497.
- Godel, H.; Graser, T.; Földi, P.; Pfaender, P.; Fürst, P. (1984), *J. Chromatogr.*, **297**, 49.
- Greve, P.A. (1988), *Analytical Methods for Residues of Pesticides in Foodstuffs, Part III*, SDU, The Hague, 5ª edición.
- Guinivan, R.A.; Thompson, N.P.; Wheeler, W.B. (1982), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**, 35.

- Hance, R.J. (1976), *Pest. Sci.*, **7**, 363.
- Hernández, F. (1994), *Contractors Meeting on Environmental Analysis of Pesticides and their Conversion Products in the Aquatic Environment*, Barcelona, Junio 1994.
- Hill, D.W.; Walters, F.H.; Wilson, T.D.; Stuart, J.D. (1979), *Anal. Chem.*, **51**, 1338.
- Hoescht (1983), *Report Hoe 039866*, Hoescht, Frankfurt.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., Brinkman, U.A.Th. (1991), *Chromatographia*, **31**, 285.
- Hogendoorn, E.A.; Verschraagen, C; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th. (1992), *Anal. Chim. Acta*, **268**, 205.
- Hogendoorn, E.A. (1993), *Strategies in Method Development for the Determination of Polar Pesticides with Coupled-Column Liquid Chromatography*. Tesis Doctoral.
- HMSO (1985), Her Majesty's Stationery Office, Methods for the Examination of Waters and Associated Materials, *The Determination of Glyphosate in River Water*, pG. 37-42.
- Jones, B.N.; Gilligan, J.P. (1983), *J. Chromatogr.*, **266**, 471.
- Kawai, S.; Uno, B.; Tomita, M. (1991), *J. Chromatogr.*, **540**, 411.
- Koning, H.; Wolf, H.; Venema, K.; Korf, J. (1990), *J. Chromatogr.*, **533**, 171.
- Krinshnamurti, C.R.; Heindze, A.M.; Galzy, G. (1984), *J. Chromatogr.*, **315**, 321.
- Lindroth, P.; Mopper, K. (1979), *Anal. Chem.*, **51**, 1667.
- Lundgren, L.N. (1986), *J. Agric. Food Chem.*, **34**, 535.
- McConnell, J.S.; Hossner, L.R. (1985), *J. Agric. Food Chem.*, **33**, 1075.
- Miles, C.J.; Wallace, L.R.; Moye, H.A. (1986), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**, 458.
- Miles, C.J.; Moye, H.A. (1988), *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 486.
- Moeritzer, K.; Irani, R. (1969), *J. Org. Chem.*, **31**, 1603.
- Mopper, K.; Delmas, D. (1984), *Anal. Chem.*, **56**, 2557.
- Moye, H.A.; Boning, A.J.Jr. (1979), *Anal. Lett.*, **12**, 25.
- Moye, H.A.; Miles, C.J.; Scherer, S.J. (1983), *J. Agric. Food Chem.*, **31**, 69.
- Moye, H.A.; Deyrup, C.L. (1984), *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 192.
- Nomura, N.S.; Hilton, H.W. (1977), *Weed. Res.*, **17**, 113.
- Oppenhuizen, M.E.; Cowell, J.E. (1991), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 317.

- Pesticide Manual (1991), *The Pesticide Manual*, 9ª edición, C.W. Worthing & R.J. Hance Editores, British Crop Protection Council, Farnham.
- Powell, H.A.; Kerby, N.W.; Rowell, P. (1990), *J. Chromatogr.*, **502**, 201.
- Putnam, A.R. (1976), *Weed Sci.*, **24**, 425.
- Roseboom, H.; Berkhoff, C.J. (1982), *Analytica Chimica Acta*, **135**, 373.
- Roth, M. (1971), *Anal. Chem.*, **43**, 880.
- Rueppel, M.L. (1977), *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 517.
- Scholze, H. (1985), *J. Chromatogr.*, **350**, 453.
- Seiber, J.N.; McChesney, M.M.; Kon, R.; Leavitt, R.A. (1984), *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 681.
- Smith, L.R. (1972), US. Pat. 3 799 758, Monsanto Co.
- Sochor, H.; Eichelmann, Ch; Schuld, G. (1988), *Report No. AL 66/88-0*, Hoescht, Frankfurt.
- Spann, K.P.; Hargreaves, P.A. (1994), *Pestic. Sci.*, **40**, 41.
- Sprangler, P. (1978), *Weed Sci.*, **26**, 673.
- Sprankle, P; Meggit, W.F.; Penner, D. (1975), *Weed Sci.*, **23**, 224.
- Schuster, R.; Gratzfeld-Hüsgen, A. (1992), *Application Note No. 12-5091-3621E*, Hewlett Packard, Avondale.
- Thompson, D.G.; Cowell, J.E.; Daniels, R.J.; Staznik, B.; McDonald, L.M. (1989), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **72**, 355.
- Torstenson, N.T.L.; Aamisepp, A. (1977), *Weed Res.*, **17**, 209.
- Tuinstra, L.G.M.Th.; Kienhuis, P.G.M. (1987), *Chromatographia*, **24**, 696.
- Umagat, H.; Kucera, P; Wen, L.F. (1982), *J. Chromatogr.*, **239**, 463.
- Wigfield, Y.Y.; Lanouette, M. (1990), *Analytica Chimica Acta*, **233**, 311.
- Wigfield, Y.Y.; Lanouette, M. (1991), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 1317.
- Winfield, T.W.; Bashe, W.J.; Baker, T.V. (1990), U.S. Environmental Protection Agency, Method 547. Cincinnati, Ohio 45268.
- Yemm, E.W.; Cocking, E.C. (1955), *Analyst*, **80**, 209.

E.- CONCLUSIONES

- Las técnicas cromatográficas acopladas hacen uso de dos o más columnas con objeto de conseguir separaciones que no serían posibles con un único sistema cromatográfico. En estas técnicas se efectúa la preseparación de los componentes de la muestra en una primera columna cromatográfica y, posteriormente, una fracción muy pequeña de la muestra, conteniendo los analitos, se transfiere "on-line" a la segunda columna, en la que tiene lugar la separación de los mismos.

Las ventajas más importantes del acoplamiento CL-CL son la mejora de selectividad, aumento de sensibilidad — con la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra — y la capacidad de automatización, lo que hace que esta técnica tenga gran futuro en análisis de residuos de pesticidas.

- De la revisión bibliográfica efectuada, se deduce que la mayoría de los métodos existentes para el análisis de residuos de herbicidas fenoxiácidos utilizan extracción líquido-líquido y determinación por cromatografía de gases con derivatización previa. Se trata de procedimientos laboriosos, con poca capacidad de análisis, y que utilizan gran cantidad de disolventes orgánicos y agentes derivatizantes tóxicos. Además, apenas existen trabajos en los que se determinen conjuntamente todos los herbicidas fenoxiácidos a niveles próximos a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, especialmente utilizando extracción en fase sólida.

Cabe resaltar el interés en analizar estos compuestos a nivel de residuos debido a su movilidad en suelos, pudiendo llegar a contaminar las aguas subterráneas. Por ello, los herbicidas 2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-T, MCPA y MCPP están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Comunidad Económica Europea.

- Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de residuos de ocho herbicidas fenoxiácidos basado en la extracción y posterior purificación, ambas en fase sólida, y análisis por acoplamiento CL-CL con detección UV. Este procedimiento permite la determinación de estos compuestos a niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ en distintos tipos de aguas.

La combinación de la extracción en fase sólida y el acoplamiento CL-CL aporta numerosas ventajas: menor tiempo de análisis, menor manipulación de la muestra — sin necesidad de derivatización previa —, extracción simultánea de varias muestras, menor uso de disolventes orgánicos, elevada selectividad e incremento de sensibilidad, al poder inyectar grandes volúmenes de muestra.

El procedimiento propuesto se puede ampliar, incluyendo el herbicida dicamba, con una ligera modificación en las condiciones cromatográficas.

- No se han encontrado en la bibliografía procedimientos para el análisis de residuos de glufosinato, a excepción del propuesto por el fabricante (Hoescht), basado en la determinación por cromatografía de gases previa derivatización con trimetilortoacetato. Aunque presenta un buen límite de detección, es extremadamente largo y tedioso, con una duración total estimada en unas 7 horas. Por ello, se requieren métodos de sensibilidad análoga, pero mucho más selectivos y rápidos, con la elevada capacidad de análisis necesaria para realizar estudios de control de contaminación.
- Se ha desarrollado un procedimiento para el análisis de residuos de glufosinato en muestras de agua basado en la prederivatización con FMOC y determinación por CL-CL con detección fluorescente. Se trata del primer procedimiento que utiliza la cromatografía líquida para la determinación de este herbicida. Mediante la inyección directa de 2 ml de muestra, se puede conseguir un límite de detección de $0.16 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, con una alta capacidad de análisis (al menos de 50 muestras por día) debido al corto tiempo de análisis al utilizar la técnica de columnas acopladas. Mediante una simple concentración de la muestra en rotavapor se puede rebajar fácilmente el límite de detección por debajo de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.
- La mayoría de los métodos propuestos para el análisis de residuos de glifosato y AMPA se basan en la utilización de la cromatografía líquida con derivatización postcolumna usando el reactivo OPA, lo que obliga a incluir una etapa de hidrólisis previa a la derivatización ya que este reactivo no reacciona con aminos secundarios (glifosato). El montaje experimental necesario para aplicar estos procedimientos es complejo, lo que, unido al uso de columnas de intercambio catiónico, da lugar a la obtención de picos cromatográficos anchos. Además, para alcanzar límites de detección próximos a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ es necesaria una etapa de concentración de la muestra.

La utilización del reactivo FMOC permite efectuar una derivatización en precolumna con lo que se simplifica considerablemente el diseño instrumental. Este reactivo presenta la ventaja de reaccionar tanto con aminos primarios como secundarios aunque

su carácter fluorescente exige su eliminación previa a la inyección en el sistema cromatográfico.

- Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de residuos de glifosato y AMPA en muestras de agua basado en la prederivatización con FMOC y análisis por CL-CL con detección fluorescente. La eliminación del exceso de FMOC se lleva a cabo de modo automatizado, con lo que se simplifica el procedimiento y se acorta considerablemente el tiempo de análisis.

Se han propuesto métodos para la determinación individual de residuos de glifosato y de AMPA, así como para la determinación conjunta de ambos. Mediante la inyección de 2 ml de muestra se pueden conseguir límites de detección de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ para los dos compuestos

Modificando ligeramente los tiempos de transferencia y purificación, se puede conseguir un método conjunto para el análisis de glifosato, glufosinato y AMPA en muestras acuosas.

El procedimiento propuesto para el análisis conjunto de glifosato y AMPA también se ha aplicado satisfactoriamente a extractos de suelos con lo que se demuestra el potencial del acoplamiento CL-CL para este tipo de muestras.

- Todos los métodos propuestos en esta Memoria para el análisis de residuos de glifosato, glufosinato y AMPA se caracterizan por su sencillez, rapidez, buena selectividad y alta sensibilidad. Se ha demostrado su aplicabilidad a distintos tipos de aguas, obteniendo en todos los casos recuperaciones y precisiones satisfactorias. Además, son métodos robustos ya que, a lo largo de las experiencias realizadas, la columna C-1 (C18) mantuvo su resolución, no siendo necesario reajustar las condiciones de purificación y transferencia. La columna C-2 (amino), aunque sufrió una pérdida gradual de eficiencia, sólo fue notoria tras dos meses de uso continuado.