



**UNIVERSITAT
JAUME I**

**Departament de Ciències Experimentals
Química Analítica**

**SIMPLIFICACIÓN DEL TRATAMIENTO DE
MUESTRA EN EL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE
HERBICIDAS EN AGUAS MEDIANTE APLICACIÓN
DE LAS TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS
ACOPLADAS LC-LC Y SPE-LC**

**CARMEN HIDALGO ORTIZ
TESIS DOCTORAL 1999**

RESUMEN

Las ventajas de la aplicación de las técnicas cromatográficas acopladas en el análisis de residuos de plaguicidas son bien conocidas en la actualidad en cuanto a las mejoras de sensibilidad y/o selectividad de los procedimientos de análisis desarrollados. Además, en el caso particular de muestras acuosas estas técnicas permiten la determinación de plaguicidas a niveles de sub-ppb, sin apenas tratamiento de la muestra y de manera completamente automatizada.

El objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral ha sido comparar dos técnicas cromatográficas acopladas utilizadas en Cromatografía Líquida (acoplamiento LC-LC y acoplamiento SPE-LC), mediante su aplicación al análisis de residuos de diferentes familias de herbicidas en muestras de agua.

El acoplamiento LC-LC con detección UV se ha utilizado para la determinación de residuos de bromacilo y diuron, de cuatro herbicidas triazínicos, y de atrazina junto a sus principales productos de transformación con límites de detección entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

El acoplamiento “*on-line*” SPE-LC-DAD se ha llevado a cabo mediante modificación de un equipo instrumental originalmente diseñado para llevar a cabo SPE “*off-line*” (el ASPEC XL), habiéndose desarrollado procedimientos de análisis completamente automatizados para la determinación de carbaril y su primer producto de transformación (1-naftol), bromacilo con cinco herbicidas ureicos, triazinas y TP's, y finalmente, seis herbicidas fenilcarbamatos.

Complementariamente al desarrollo de metodología analítica, se han llevado a cabo estudios de degradación de carbaril a 1-naftol, así como de desmedifam y fenmedifam.

Finalmente, se ha llevado a cabo un estudio comparativo de las dos modalidades de acoplamiento utilizadas en esta Tesis Doctoral, LC-LC y SPE-LC.

Los procedimientos desarrollados se han utilizado para realizar control de plaguicidas en aguas superficiales de la Comunidad Valenciana.

SUMMARY

The advantages of coupled chromatographic techniques applied to pesticide residue analysis are well known nowadays, regarding with improvements in sensitivity and/or selectivity of the procedures developed. In addition, in the case of water samples these techniques allow the determination of pesticides at sub-ppb levels, without significant sample handling.

The main scope of this Thesis is to compare two coupled chromatographic techniques used in Liquid Chromatography (LC-LC and SPE-LC) by means of their application in the residue analysis of different herbicide families in water samples.

The coupled column system LC-LC with UV detection, has been used in the determination of residues of bromacil and diuron, four triazine herbicides, and atrazine together with its major transformation products. In this way, three analytical procedures have been developed, all based on the direct injection of 2 ml of water sample in the LC-LC system, reaching detection limits between 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

On-line SPE coupled to LC, has been performed by using a sample processor designed for off-line SPE (ASPEC XL), in this way some completely automated procedures for the determination of carbaryl and its main transformation product (1-naphthol), bromacil and urea herbicides, triazine herbicides and TP's, and finally, six phenylcarbamate herbicides, have been developed.

Degradation studies of carbaryl to 1-naphthol, as well as desmedipham and phenmedipham, have been also included.

Some of the developed procedures have been used for the monitoring of pesticides in surface water samples from the Comunidad Valenciana and several compounds such as bromacil, diuron and some triazine herbicides (simazine, terbutylazine, terbutryn and terbumeton) have been detected.

Finally, a comparative study of LC-LC and on-line SPE-LC has been performed with regard to the main analytical parameters (sensitivity, selectivity,

sample throughput and multiresidual character) by means of the experimental results obtained from the analytical procedures developed.

RESUM

Els avantatges de l'aplicació de les tècniques cromatogràfiques acoblades en l'anàlisi de residus de plaguicides son ben coneguts en l'actualitat en quant a les millores de sensibilitat i/o selectivitat dels procediments d'anàlisi desenvolupats. A més, en el cas particular de mostres aquoses, aquestes tècniques permeten la determinació de plaguicides a nivells de sub-ppb sense quasi tractament de la mostra i de manera completament automatitzada.

L'objectiu principal de la present Tesi Doctoral ha estat comparar dos tècniques cromatogràfiques acoblades emprades en Cromatografia Líquida (acoblament LC-LC i acoblament SPE-LC), a partir de la seva aplicació a l'anàlisi de residus de diferents famílies d'herbicides en mostres d'aigua.

L'acoblament LC-LC amb detecció UV l'hem utilitzat per a la determinació de residus de bromacil i diuron, de quatre herbicides triazínics, i d'atrazina a més dels seus principals productes de transformació. Amb aquest objectiu, hem desenvolupat tres procediments analítics, ràpids i selectius, basats en la injecció directa de 2 ml de mostra aquosa en el sistema LC-LC, els quals han permès obtenir límits de detecció entre 0.1 i 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Mitjançant la incorporació d'una senzilla etapa prèvia de SPE "off-line" (en el cas de la determinació de triazines i TP's) s'han disminuït els límits de detecció a nivells inferiors a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, la qual cosa ha permès que els mètodes desenvolupats puguin aplicar-se a mostres d'aigües potables.

Per a dur a terme l'acoblament "on-line" SPE-LC-DAD hem modificat un equip instrumental originalment dissenyat per a realitzar SPE "off-line" (l'ASPEC XL). Utilitzant aquest equip hem desenvolupat procediments per a la determinació de carbaril i el seu principal producte de transformació (1-naftol), bromacil amb cinc herbicides ureics, triazines and TP's, i finalment, sis herbicides fenilcarbamats. Cal esmentar la completa automatització dels procediments desenvolupats així com les altes sensibilitats obtingudes mitjançant preconcentració de volums de mostra de l'ordre de 50-100 ml.

Complementàriament al desenvolupament de metodologia analítica, hem dut a terme estudis de degradació de carbaril a 1-naftol, així com de desmedifam i fenmedifam. En el cas dels fenilcarbamats hem detectat varis TP's i ha quedat pendent una futura elucidació estructural d'aquests compostos.

Els procediments desenvolupats els hem utilitzat per a realitzar un control de plaguicides en aigües superficials de la Comunitat Valenciana, on hem detectat diferents herbicides com bromacil, diuron i algunes triazines (simazina, terbutilazina, terbutrina i terbumeton).

Finalment, hem dut a terme un estudi comparatiu de les dos modalitats d'acoblament emprades en aquesta Tesi Doctoral, LC-LC i SPE-LC esmentant les característiques més rellevants de cadascuna d'elles (rapidesa, sensibilitat, selectivitat i major o menor caràcter multiresidual), fent ús de les dades experimentals obtingudes a partir dels mètodes desenvolupats per als diferents herbicides analitzats tant per LC-LC com per SPE-LC.

A mis padres

A Paco

Félix Hernández Hernández, Catedrático de Química Analítica, y Juan Vicente Sancho Llopis, Profesor Titular de Química Analítica, de la Universitat Jaume I de Castellón,

Certifican: que la Tesis Doctoral “*Simplificación del tratamiento de muestra en el análisis de residuos de herbicidas en aguas mediante aplicación de las técnicas cromatográficas acopladas LC-LC y SPE-LC*” ha sido desarrollada bajo su dirección, en el área de Química Analítica del Departament de Ciències Experimentals de la Universitat Jaume I de Castellón, por Doña Carmen Hidalgo Ortiz.

Lo que certificamos para los efectos oportunos en Castellón de la Plana, a 30 de Diciembre de mil novecientos noventa y ocho

Fdo. Dr. Félix Hernández Hernández

Fdo. Dr. Juan Vicente Sancho Llopis

Los trabajos desarrollados mediante la técnica LC-LC, se han llevado a cabo íntegramente en la Universitat Jaume I de Castellón, aprovechando la experiencia que los directores de la tesis adquirieron con anterioridad, en este campo, mediante diferentes estancias en el *Laboratory for Organic and analytical Chemistry del National Institute of Public Health and the Environment (RIVM)* de Holanda, así como varias estancias realizadas por investigadores holandeses del citado centro de investigación en la Universitat Jaume I.

La introducción a la técnica SPE-LC se produjo mediante una estancia realizada en el laboratorio de Química Analítica de la *Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de París*, llevada a cabo en Septiembre de 1995, en el marco del proyecto “*Human Capital and Mobility Programme*” de la Unión Europea sobre “*Hyphenated Analytical Chemistry for Environmental and Public Health Research in the EC*”. Los estudios posteriores se llevaron a cabo también en la Universitat Jaume I.

En primer lugar, quiero destacar el relevante papel ejercido por mis dos directores durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A Félix, agradecerle su apoyo y ayuda durante estos años, así como su gran labor desde el punto de vista de búsqueda de financiación, y a Juanvi, la transmisión de conocimientos en el día a día, agradeciéndole su paciencia ante el enorme esfuerzo que le ha supuesto.

También quiero agradecer el apoyo recibido por parte de mis compañeros de Química Analítica, María y Elena (con quienes he compartido las agradables temperaturas de los muestreos estivales), Paco, Ximo, Roque, Yolanda, Jose, Angel, Sonia, Susana, Feli, etc. quienes han estado a mi disposición ante cualquier contratiempo. Sin olvidarme de Toni, con quien, además, he disfrutado de agradables tertulias durante las comidas.

Quiero agradecer los ánimos y la disponibilidad de mis compañeros hidrogeólogos, Ignacio y Juan, así como el interés manifestado por otros miembros de la comunidad universitaria como Juandi, Pilar, Vicente, Eduardo, Víctor, Jose, Carlos, etc. y en especial quiero destacar el apoyo de M^a Carmen, con quien empecé en esta universidad.

Me gustaría agradecer la buena acogida que tuve en el grupo de la Dra. Hennion durante mi estancia en París, así como la atención y ayuda que me prestaron.

También me gustaría agradecer los ánimos de Elbert durante la última etapa de mi tesis, así como su preocupación, disponibilidad y paciencia para entender mi inglés y sus esfuerzos por comunicarse conmigo en castellano.

Igualmente quiero destacar el interés manifestado por parte de mis buenos amigos Blasi y Fortu, con quienes he compartido muy buenos momentos durante estos años.

Finalmente, quiero destacar el apoyo continuo e incondicional de toda mi familia, en especial de mis padres, hermanos, sobrinos y, por supuesto, de Paco (me refiero a mi Paco), quienes me han dado ánimos durante todos estos años, soportando junto a mi todas las dificultades surgidas.

ÍNDICE

Objetivos de la Tesis Doctoral. Plan de trabajo	1
CAPÍTULO 1. Introducción general	7
1.1. Problemática ambiental generada por el uso de plaguicidas. Contaminación de aguas	9
1.2. Selección de los herbicidas a estudiar	21
1.3. Problemática ambiental de los herbicidas seleccionados	28
1.3.1. Herbicidas ureicos	30
1.3.2. Herbicidas uracílicos	33
1.3.3. Herbicidas triazínicos	35
1.3.4. Herbicidas fenilcarbamatos	40
1.4. Problemática analítica de la determinación de residuos de herbicidas	43
1.4.1. Análisis de residuos de herbicidas ureicos. Antecedentes	50
1.4.2. Análisis de residuos de herbicidas uracílicos. Antecedentes	59
1.4.3. Análisis de residuos de herbicidas triazínicos. Antecedentes	61
1.4.4. Análisis de residuos de herbicidas fenilcarbamatos. Antecedentes	74
1.5. Técnicas cromatográficas acopladas	77
1.5.1. Cromatografía de Gases - Cromatografía de Gases (GC-GC)	79
1.5.2. Cromatografía Líquida - Cromatografía de Gases (LC-GC, SPE-GC)	80
1.5.3. Cromatografía Líquida - Cromatografía Líquida (LC-LC, SPE-LC)	87
1.6. Referencias	90
CAPÍTULO 2. Acoplamiento Cromatografía Líquida - Cromatografía Líquida (LC-LC)	99
2.1. Introducción	101
2.1.1. Etapas del análisis	102
2.1.2. Selección de las condiciones de acoplamiento	105

2.1.3.	Aplicación del acoplamiento LC-LC al análisis de residuos de plaguicidas	108
2.1.4.	Referencias	116
2.2.	Experimental. Aplicación del acoplamiento LC-LC al análisis de residuos de herbicidas seleccionados	118
•	Artículo científico “Direct determination of bromacil and diuron residues in environmental water samples by coupled-column liquid chromatography and large-volume injection” ...	129
•	Artículo científico “Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection”	141
•	Artículo científico “New method for the rapid determination of triazine herbicides and some of their main metabolites in water by using coupled-column liquid chromatography and large volume injection”	157
CAPÍTULO 3. Acoplamiento Extracción en Fase Sólida - Cromatografía Líquida (SPE-LC)		
3.1.	Introducción	183
3.1.1.	Etapas del análisis	185
3.1.2.	Parámetros de preconcentración	188
•	Tamaño de la precolumna	188
•	Selección de la fase adsorbente	188
•	Estimación del volumen de ruptura	192
3.1.3.	Cuantificación	196
3.1.4.	Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de plaguicidas	198
3.1.5.	Referencias	205
3.2.	Experimental	208
3.2.1.	Adaptación del equipo instrumental ASPEC XL	208
•	Artículo científico “Rapid determination of carbaryl and 1-naphthol at ppt levels in environmental water samples by automated on-line SPE-LC-DAD-FD”	213
3.2.2.	Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de herbicidas seleccionados	227
•	Artículo científico “On-line trace enrichment of polar herbicides in environmental waters by reversed-phase liquid chromatography-diode array detection”	237

• Artículo científico “Coupled-column liquid chromatography applied to the trace level determination of triazine herbicides and some of their metabolites in water samples”	257
• Artículo científico “Automated determination of phenylcarbamate herbicides in environmental waters by on-line trace enrichment and reversed-phase liquid chromatography-diode array detection”	279
CAPÍTULO 4. Estudio comparativo de los acoplamientos LC-LC / SPE-LC aplicados al análisis de residuos de plaguicidas	297
CAPÍTULO 5. Conclusiones	309
APÉNDICE	317
GLOSARIO	329

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema general de la vías de contaminación difusa por la aplicación de plaguicidas.....	15
Figura 2.	Derivados del uracilo.....	33
Figura 3.	Derivados de la triazina.....	35
Figura 4.	Productos de transformación de atrazina detectados en suelos tratados con el herbicida.....	36
Figura 5.	Representación esquemática de un sistema cromatográfico acoplado.....	78
Figura 6.	Diferentes mecanismos para la eliminación del disolvente en un sistema LC-GC.....	82
Figura 7.	Representación esquemática de la diferente forma de trabajo de la columna C-1 según se utilice como columna separadora (LC-GC, LC-LC) o enriquecedora (SPE-GC, SPE-LC).....	89
Figura 8.	Representación esquemática de un acoplamiento LC-LC.....	101
Figura 9.	Etapas de un procedimiento con acoplamiento LC-LC.....	104
Figura 10.	Representación esquemática del diseño necesario para la determinación experimental del volumen de purificación.....	107
Figura 11.	Representación esquemática del diseño necesario para la determinación experimental del volumen de transferencia.....	107
Figura 12.	Retención de bromacilo y diuron en una columna C ₁₈ (100 × 4.5 mm d.i., 3 μm) en función del contenido en MeOH.....	120
Figura 13.	Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector UV (223 nm) para una disolución patrón de herbicidas triazínicos de 200 μg·l ⁻¹	122
Figura 14.	Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector UV (277 nm) correspondientes a tres disoluciones de bromacilo de 400 μg·l ⁻¹ preparadas en diferentes muestras de agua.....	124
Figura 15.	Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector UV (277 nm) correspondientes a tres disoluciones de bromacilo de 400 μg·l ⁻¹ preparadas en diferentes muestras de agua tamponadas con mezcla K ₂ HPO ₄ / KH ₂ PO ₄	125
Figura 16.	Representación esquemática de un acoplamiento SPE-LC.....	185
Figura 17.	Etapas de un procedimiento con acoplamiento SPE-LC.....	187

Figura 18.	Curva de ruptura hipotética correspondiente a un analito cuya absorbancia a la longitud de onda de trabajo es A_0	193
Figura 19.	Variaciones en el volumen de ruptura para un analito preconcentrado en diferentes precolumnas	196
Figura 20.	ASPEC XL medioambiental.....	209
Figura 21.	Representación esquemática del equipo instrumental utilizado en el acoplamiento SPE-LC	210
Figura 22.	Cromatogramas SPE-LC correspondientes a la preconcentración de disoluciones patrón de bromacilo, metabenzotiazuron, clortoluron , diuron, linuron y cloroxuron	230
Figura 23.	Curvas de ruptura de varios compuestos.....	231
Figura 24.	Elución “ <i>on-line</i> ” de distintas disoluciones patrón de DIA	232
Figura 25.	(A) Curva de degradación del desmedifam en agua superficial. (B) Curva correspondiente al producto de transformación del desmedifam detectado a 236 nm.	233
Figura 26.	(A) Curva de degradación del fenmedifam en agua superficial. (B) y (C) Curvas correspondientes a los productos de transformación detectados a 236 nm.....	234
Figura 27.	Espectros de absorción del desmedifam y de su TP detectado (A) y del fenmedifam junto a sus dos TP’s detectados (B).....	235

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los plaguicidas en función de su índice GUS	18
Tabla 2.	Plaguicidas utilizados en Europa en cantidades mayores de 50 Tm/año considerados de movilidad alta o intermedia.....	19
Tabla 3.	Herbicidas de especial preocupación en áreas mediterráneas	20
Tabla 4.	Clasificación de herbicidas atendiendo a diferentes criterios	21
Tabla 5.	Herbicidas y productos de transformación seleccionados	24
Tabla 6.	Herbicidas y productos de transformación detectados en aguas subterráneas de la Unión Europea	29
Tabla 7.	Aplicaciones de los herbicidas ureicos seleccionados	32
Tabla 8.	Aplicaciones de los herbicidas uracílicos más utilizados.....	34
Tabla 9.	Aplicaciones de los herbicidas triazínicos seleccionados.....	39
Tabla 10.	Aplicaciones de los herbicidas fenilcarbamatos seleccionados	42
Tabla 11.	Kits de inmunoensayos disponibles en el mercado para algunos plaguicidas	45
Tabla 12.	Determinación de residuos de herbicidas ureicos en muestras de agua	57
Tabla 13.	Determinación de residuos de herbicidas triazínicos en muestras de agua	71
Tabla 14.	Determinación de residuos de plaguicidas por LC-LC.....	112
Tabla 15.	Coefficientes de regresión y coeficientes de correlación de la regresión parabólica entre el factor de capacidad y el porcentaje de modificador orgánico (MeOH o CH ₃ CN) de la fase móvil para los herbicidas estudiados	121
Tabla 16.	Influencia de la matriz de la muestra, con y sin presencia de tampón, en las condiciones de acoplamiento LC-LC del herbicida bromacilo	123
Tabla 17.	Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección de patrones (n=7) de bromacilo (1 µg·l ⁻¹) y diuron (0.5 µg·l ⁻¹)	126
Tabla 18.	Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección directa de patrones (n=7) de triazinas a 1 µg·l ⁻¹	126

Tabla 19. Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección directa de patrones (n=7) de atrazina y sus productos de transformación a $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	126
Tabla 20. Límites de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) experimentales (S/N=3) para los plaguicidas seleccionados, determinados mediante inyección directa de la muestra y mediante SPE “ <i>off-line</i> ” de 100 ml de muestra de agua, haciendo uso en ambos casos de la técnica LC-LC.....	127
Tabla 21. SPE “ <i>off-line</i> ” frente a SPE “ <i>on-line</i> ”. Ventajas e inconvenientes.....	184
Tabla 22. Diferentes fases adsorbentes utilizadas en SPE	191
Tabla 23. Precolumnas utilizadas para la preconcentración de diferentes herbicidas	228
Tabla 24. Comparación entre LC-LC y SPE-LC “ <i>on-line</i> ” en la determinación de residuos de triazinas y TP’s en muestras de agua....	300

OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL. PLAN DE TRABAJO

Atendiendo al creciente interés que en la actualidad presentan las técnicas cromatográficas acopladas en el campo del análisis medioambiental -debido a la simplificación del tratamiento de muestra que conllevan- el objetivo fundamental de la presente Tesis Doctoral consiste en estudiar el potencial de dos importantes modalidades de cromatografía líquida con columnas acopladas en el análisis de residuos de herbicidas. Para ello, se pretende evaluar las características analíticas más relevantes de cada una de ellas, así como las preferencias de uso ante un problema determinado.

En primer lugar, se plantea estudiar la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida (LC-LC) aplicada al análisis de residuos de los herbicidas bromacilo y diuron, cuatro herbicidas derivados de la triazina (simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrina), así como atrazina y sus principales productos de transformación en muestras de agua. En esta técnica se hace uso de dos columnas de alta resolución con el fin de conseguir separaciones que no podrían realizarse mediante una sola columna cromatográfica, pudiéndose obtener procedimientos analíticos muy rápidos, selectivos y de elevada sensibilidad, debido a la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra (del orden de varios mililitros).

A continuación, se pretende estudiar la extracción en fase sólida (SPE) acoplada a cromatografía líquida, o preconcentración “*on-line*”, aplicada al análisis de residuos de bromacilo junto con varios herbicidas ureicos, herbicidas triazínicos y algunos de sus productos de transformación y, finalmente, herbicidas fenilcarbamatos. En esta técnica es frecuente hacer uso de una columna enriquecedora de baja resolución acoplada a una columna analítica de alta resolución. De este modo, se consiguen desarrollar procedimientos analíticos muy sensibles y con un marcado carácter multiresidual.

Para alcanzar el objetivo general presentado en este trabajo se detallan a continuación los siguientes objetivos específicos:

- Desarrollo de un método de análisis de residuos de bromacilo y diuron en muestras de agua mediante acoplamiento LC-LC.
- Desarrollo de un método de análisis de residuos de herbicidas triazínicos en muestras de agua mediante acoplamiento LC-LC.
- Desarrollo de un método de análisis de residuos de atrazina y sus principales productos de transformación en muestras de agua mediante acoplamiento LC-LC.
- Puesta a punto de un equipo instrumental originalmente diseñado para realizar extracción en fase sólida (SPE) “*off-line*”, ASPEC XL medioambiental de Gilson, con el fin de que pueda ser utilizado para llevar a cabo SPE “*on-line*” de modo completamente automatizado. Para ello deberán introducirse modificaciones en cuanto a su configuración externa así como desarrollar programas de control mediante compilación de programas escritos en lenguaje Turbo Pascal que permitan controlar el equipo. Para la puesta a punto del acoplamiento SPE-LC se plantea desarrollar un procedimiento de análisis para un compuesto fácil de preconcentrar y que presente señal analítica en los dos detectores que se utilizarán en este trabajo, detector de barrido de diodos y detector de fluorescencia. Se selecciona el insecticida carbaril, y para completar el estudio se incluye también su producto de transformación más importante, 1-naftol.
- Desarrollo de un método analítico multiresidual que permita la determinación de bromacilo y de algunos herbicidas ureicos en muestras de agua mediante acoplamiento SPE-LC.
- Desarrollo de un método analítico multiresidual que permita la determinación de herbicidas triazínicos y algunos productos de transformación de interés, en muestras de agua mediante acoplamiento SPE-LC.

- Desarrollo de un método analítico multiresidual que permita la determinación de herbicidas fenilcarbamatos en muestras de agua mediante acoplamiento SPE-LC.
- Finalmente, en base a los resultados experimentales obtenidos mediante las dos técnicas acopladas estudiadas en esta Memoria, se efectúa un estudio comparativo entre ambas modalidades resaltando sus principales ventajas e inconvenientes, así como sus principales campos de aplicación, en el análisis de residuos de plaguicidas.

Para conseguir los objetivos anteriormente propuestos se detalla el Plan de Trabajo seguido en la presente Tesis Doctoral.

- Revisión bibliográfica sobre antecedentes y estado actual de la determinación de los herbicidas seleccionados en aguas.
- Revisión de las principales técnicas cromatográficas acopladas profundizando en la LC con columnas acopladas. Se revisan las características generales, así como los principales parámetros de acoplamiento y preconcentración.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos de bromacilo y diuron mediante acoplamiento LC-LC. Optimización de las condiciones de acoplamiento y determinación de las principales características analíticas del método desarrollado. Se completa la validación del mismo mediante experiencias de recuperación de diferentes muestras de agua fortificadas a varios niveles de concentración.
- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos de herbicidas triazínicos mediante acoplamiento LC-LC. Optimización de las condiciones de acoplamiento y determinación de las principales características analíticas del método desarrollado. Se completa la validación del mismo mediante experiencias de recuperación de diferentes muestras de agua fortificadas a varios niveles de concentración.

- Estudio de las condiciones cromatográficas óptimas para la determinación de residuos de atrazina y productos de transformación mediante acoplamiento LC-LC. Optimización de las condiciones de acoplamiento y determinación de las principales características analíticas del método desarrollado. Se completa la validación del mismo mediante experiencias de recuperación de diferentes muestras de agua fortificadas a varios niveles de concentración.
- Modificación del equipo comercial ASPEC XL en cuanto a *hardware* y *software* con objeto de poder utilizarlo en acoplamientos SPE-LC.
- Puesta a punto del equipo anteriormente mencionado, utilizando como plaguicida modelo carbaril, así como su producto de transformación 1-naftol.
- Estudio de las condiciones de preconcentración y acoplamiento SPE-LC para la determinación de residuos de bromacilo y herbicidas derivados de la urea en muestras de agua. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.
- Estudio de las condiciones de preconcentración y acoplamiento SPE-LC para la determinación de residuos de herbicidas triazínicos y algunos productos de transformación en muestras de agua. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.
- Estudio de las condiciones de preconcentración y acoplamiento SPE-LC para la determinación de residuos de herbicidas fenilcarbamatos en muestras de agua. Evaluación de las características analíticas y validación del procedimiento desarrollado.

El presente trabajo ha quedado reflejado en varios artículos científicos, que se han publicado en revistas de carácter internacional, incluidos en la parte experimental de esta Memoria.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los plaguicidas son sustancias utilizadas para matar, repeler o controlar plagas, en el sentido amplio de esta palabra, es decir, parásitos, animales o vegetales, que amenazan los cultivos agrícolas, la ganadería o la salud humana, excluyéndose a los medicamentos y productos farmacéuticos (Barberá, 1989). Desde la introducción en la década de los 30 de los primeros plaguicidas orgánicos de síntesis, el uso de este tipo de compuestos se ha generalizado, existiendo en la actualidad varios centenares de plaguicidas de diferente naturaleza química que se utilizan en Europa y USA con fines fundamentalmente agrícolas. Además de la agricultura, también es importante el uso de estos compuestos en la industria, con fines domésticos, en el control de hierbas en caminos, márgenes de vías férreas y carreteras, mantenimiento de instalaciones públicas y privadas (jardines, parques, campos de golf), etc.

1.1. Problemática ambiental generada por el uso de plaguicidas. Contaminación de aguas

Los beneficios derivados del uso de plaguicidas son bien conocidos, ya que su utilización en el sector agrícola ha supuesto toda una revolución, al permitir el incremento de la productividad hasta niveles insospechados hace tan sólo 50 años. En la actualidad, está claro que el control de determinadas especies es vital para el futuro de la agricultura, así como de la industria y de la salud pública.

Sin embargo, en contrapartida, el uso abusivo de estos compuestos ha planteado importantes problemas de contaminación medioambiental, habiéndose encontrado residuos de los mismos, así como de sus productos de transformación (TP's), en el aire, suelo, agua y en especies animales y vegetales. Cabe destacar que la estructura química de los plaguicidas, que es la que les confiere la capacidad tóxica contra las plagas, puede también afectar a otros seres vivos (incluido humanos) causándoles desórdenes en el organismo.

Un parámetro relevante es el elevado número de principios activos existentes en la actualidad y que se van desarrollando continuamente debido a la necesidad de

tratar nuevas plagas o como sustitutos de otras especies de mayor impacto ambiental. Estos compuestos, de características físico-químicas muy variadas, se pueden clasificar atendiendo a diferentes criterios. Una posibilidad consiste en diferenciar a los plaguicidas en función de su campo de aplicación, clasificándolos, a su vez, en función de su estructura química, que es el modo más interesante desde el punto de vista analítico. En el siguiente esquema se hace hincapié en los insecticidas, herbicidas y fungicidas, por tratarse de los grupos más importantes de compuestos utilizados como plaguicidas, destacándose algunos de ellos a modo de ejemplo (Ware, 1983; Kirkwood 1987).

1. Control de invertebrados

1.1. Insecticidas

1.1.1. Organoclorados

Derivados del 2,2-difeniletano (*DDT, dicofol*)

Derivados del ciclohexano (*lindano*)

Derivados ciclodiénicos (*aldrin, dieldrin, endrin, mirex, endosulfan*)

Policloroterpenos

1.1.2. Organofosforados

Derivados alifáticos (*malation, dimetoato, triclorfon*)

Derivados fenólicos (*paration*)

Derivados heterocíclicos (*clorpirifos*)

1.1.3. Organosulfurados (*tetradifon, fenson*)

1.1.4. Carbamatos (*carbaril, aldicarb, carbofuran*)

1.1.5. Formamidinas (*amitraz*)

1.1.6. Tiocianatos

1.1.7. Dinitrofenoles (*dinoseb*)

1.1.8. Organoestánnicos (*cihexatin*)

1.1.9. Insecticidas naturales (*nicotina*)

1.1.10. Piretroides sintéticos

1.1.11. Compuestos inorgánicos (*azufre*)

1.2. Molusquicidas

1.2.1. Carbamatos (*carbaril, metiocarb*)

1.2.2. Otros (*metaldehido, formetanato*)

1.3. Nematicidas

1.3.1. Hidrocarburos halogenados

1.3.2. Isotiocianatos (*metam sodio*)

1.3.3. Organofosforados (*fenamifos, forate*)

1.3.4. Carbamatos (*aldicarb, carbofuran*)

2. Control de vertebrados**2.1. Rodenticidas**

2.1.1. Derivados de la cumarina (*dicumarol*)

2.1.2. Derivados de las indandionas

2.1.3. Rodenticidas naturales (*estricnina*)

2.1.4. Organoclorados (*DDT, endrin*)

2.1.5. Fósforo y derivados inorgánicos

2.1.6. Organofosforados (*forazetim*)

2.2. Avicidas (*estricnina, endrin*)**2.3. Piscicidas**

2.3.1. Organoclorados (*endrin, endosulfan*)

2.4. Repelentes (*metiocarb, tiram, ziram, nicotina*)**3. Control de plantas****3.1. Herbicidas**

3.1.1. Herbicidas inorgánicos (*sulfato de cobre, ácido sulfúrico, clorato sódico, metaborato sódico*)

3.1.2. Ácidos haloalcanoicos (*ácido tricloroacético, dalapón, metil-clorfenprop*)

3.1.3. Ácidos fenoxialcanoicos

- Ácidos fenoxiacéticos (*2,4 D, MCPA*)

- Ácidos fenoxibutíricos (*MCPB, 2,4-DB*)
 - Ácidos fenoxipropiónicos (*fenoprop, mecoprop*)
- 3.1.4. Ácidos aromáticos (*TBA, dicamba*)
 - 3.1.5. Amidas (*naptalan, difenamida, butam*)
 - 3.1.6. Nitrilos (*diclobenilo, bromoxinilo, bromofenoxim*)
 - 3.1.7. Anilidas (*pentanoclor, propaclor*)
 - 3.1.8. Nitrofenoles (*DNOC, dinoseb, dinoterb*)
 - 3.1.9. Nitrofenil éteres (*nitrofen*)
 - 3.1.10. Nitroanilinas (*trifluralina, nitralina*)
 - 3.1.11. Carbamatos (*profam, clorprofam, desmedifam, fenmedifam*)
 - 3.1.12. Tiocarbamatos (*tiobencarb, molinato*)
 - 3.1.13. Derivados de la urea (*linuron, diuron, metabenzotiazuron, clortoluron*)
 - 3.1.14. Compuestos nitrogenados heterocíclicos
 - Triazinas (*atrazina, simazina*)
 - Piridinas (*diquat, paraquat*)
 - Piridazinas (*cloridazona, piridato*)
 - Pirimidinas o uracilos (*bromacilo, terbacilo*)
 - Otros (*aminotriazol, bentazona*)
 - 3.1.15. Compuestos organoarsenicales (*ácido metilarsénico, ácido cacodílico*)
 - 3.1.16. Organofosforados (*glifosato, glufosinato*)
 - 3.1.17. Sulfonilureas (*clorsulfuron, sulfometuron-metil*)
 - 3.1.18. Imidazolinonas (*AC 222, AC 293*)

3.2. Reguladores de crecimiento de plantas

3.3. Defoliantes y desecantes

4. Control de microorganismos

4.1. Fungicidas y bactericidas

- 4.1.1. Compuestos inorgánicos (*azufre, sales de cobre*)

- 4.1.2. Ditiocarbamatos (*tiram, manez, zineb*)
- 4.1.3. Tiazoles
- 4.1.4. Triazinas (*anilazina*)
- 4.1.5. Compuestos aromáticos (*hexaclorobenceno*)
- 4.1.6. Dicarboximidias (*captan*)
- 4.1.7. Dinitrofenoles (*dinocap*)
- 4.1.8. Quinonas (*cloranil*)
- 4.1.9. Organoestánicos

4.2. Algicidas

- 4.2.1. Compuestos inorgánicos (*sales de cloro*)
- 4.2.2. Derivados de cobre
- 4.2.3. Haluros de amonio cuaternario

4.3. Desinfectantes (fenoles, derivados halogenados, peróxidos, alcoholes, metales pesados, aldehidos, detergentes)

A la vista del esquema anterior se observa la gran cantidad de compuestos existentes en la actualidad, además de los que se van desarrollando continuamente para resolver nuevos problemas. Estos compuestos una vez aplicados pueden sufrir complejos procesos físico-químicos que determinan su acción sobre el medio circundante. Los principales factores que determinan estos efectos dependen del plaguicida aplicado así como del medio receptor.

Propiedades de los plaguicidas

Existen una serie de factores que determinan la interacción de los plaguicidas con el medio en que se encuentran.

- Persistencia del plaguicida, que es la capacidad del mismo de permanecer inalterado y se mide mediante su tiempo de vida media o tiempo transcurrido desde su aplicación hasta que su cantidad se ha reducido a la mitad.

- Capacidad de evaporación del plaguicida, que determina la posibilidad de que dicho compuesto se introduzca en la atmósfera, pudiendo llegar a recorrer largas distancias.
- Solubilidad del plaguicida en agua, que es una de las propiedades determinantes a la hora de evaluar la contaminación de acuíferos y aguas superficiales.

Todos estos factores vienen determinados por la estructura química del plaguicida, que, a su vez, es la que le confiere sus propiedades tóxicas contra las plagas, así como por agentes externos característicos del medio.

- Otros factores son el modo y dosis de aplicación de los plaguicidas, la técnica utilizada y las características del formulado.

Propiedades del medio receptor

- Propiedades individuales del suelo y la topología del terreno, principalmente en cuanto a contenido y tipo de arcillas, materia orgánica, contenido de metales, acidez, porosidad, permeabilidad, etc.
- Características del agua en cuanto a acidez, nivel freático, temperatura, velocidad, presencia de organismos biológicos, composición química de la misma, etc.
- Finalmente, la climatología del lugar, en cuanto a regímenes de lluvias, temperaturas, viento, etc., es otro factor a tener en cuenta.

En la **Figura 1** se muestra un esquema en el que se señalan las posibles vías de impacto ambiental, una vez aplicado el plaguicida.

De todos los posibles efectos adversos sobre el medio ambiente, la contaminación de las aguas es uno de los problemas que, en la actualidad, genera más preocupación, debido a los riesgos toxicológicos que conlleva. Además, la presencia de plaguicidas en aguas hace que disminuya la población de invertebrados acuáticos, que son fuente de alimento para muchos peces y aves acuáticas. Por otra parte, son asimilados por los peces y aves, causando una difusión muy amplia a través de las cadenas tróficas. De este modo, los plaguicidas pueden estar presentes en las aguas así como en muchos alimentos, tanto de origen vegetal como animal.

Como se observa en la **Figura 1** los plaguicidas pueden alcanzar tanto las aguas superficiales como las subterráneas, a través de diferentes vías de contaminación. De los factores decisivos, en cuanto a contaminación medioambiental, los más relevantes en el caso de las aguas son la solubilidad del plaguicida en este medio, su persistencia, el tipo de materiales geológicos, el tipo de suelo y las prácticas agrícolas. Las principales vías de contaminación de las aguas se resumen a continuación (Díaz *et al.*, 1989):

Aguas superficiales

- Arrastre de plaguicidas por el agua de lluvia después del tratamiento.
- Adsorción de los plaguicidas sobre las partículas del suelo.
- Flujos de aguas subterráneas contaminadas hacia los cursos de agua superficial.
- Aplicación de plaguicidas en balsas o canales de riego.
- Malas prácticas agrícolas, como por ejemplo la limpieza del equipo de tratamiento y de los tanques vacíos de aplicación sin las debidas precauciones.
- Afluentes contaminados procedentes de fábricas de plaguicidas y otras industrias que los utilizan.

- Desechos de balsas de desparasitación de ovinos o balsas de tratamientos de productos agrícolas.

Aguas subterráneas

- Transporte vertical de los plaguicidas por el agua a través de la zona no saturada.
- Malas prácticas agrícolas, como la utilización de plaguicidas en zonas cercanas a pozos o el desecho de restos de plaguicidas en sumideros o pozos.

Sin embargo, cabe destacar que las vías de contaminación de las aguas así como los procesos que intervienen, dependen de las condiciones locales y pueden variar de un lugar a otro. Así, en España hay que constatar una serie de factores que influyen en la contaminación de las aguas y que se indican a continuación.

En la agricultura de regadío, el uso de plaguicidas es más abundante que en la de secano. El riego provoca el lavado de productos que están en el suelo, pudiendo ser transportados a los ríos cercanos o a las aguas subterráneas.

La contaminación de acuíferos subsuperficiales tiene lugar en los casos en que el nivel freático se encuentra relativamente cercano a la superficie. Este tipo de contaminación es frecuente en las terrazas bajas de los ríos donde existe agricultura de regadío. Igualmente, cierto tipo de litologías que presentan acuíferos subterráneos, como pueden ser sedimentos de arenas y arcillas, zonas kársticas, etc., propician el transporte vertical de los productos desde el suelo hasta el agua.

El régimen de lluvias es otro agente que incide tanto en las posibilidades de contaminación de aguas subterráneas como superficiales, por procesos de infiltración o por escorrentía, respectivamente.

En el ámbito europeo, se presta especial atención a la contaminación de aguas subterráneas, debido fundamentalmente a que se utilizan en muchos casos para el abastecimiento humano, y a que una vez producida la contaminación se requiere mucho tiempo para la regeneración, especialmente en el caso de compuestos muy persistentes. Por ello, existe una legislación muy restrictiva en materia de plaguicidas en aguas potables, que limita a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ el contenido por plaguicida individual y productos relacionados y a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ la suma de compuestos (EEC, 1980). Este restrictivo nivel no atiende a consideraciones de toxicidad de los compuestos, sino al hecho de que estas sustancias no deben estar presentes en el agua de uso público.

Resulta interesante poder predecir la posibilidad de que un plaguicida contamine el agua subterránea. Aunque existen modelos complejos que hacen uso de información relativa al propio plaguicida y al medio que lo contiene, también hay algunos modelos sencillos que se basan en parámetros físico-químicos del propio plaguicida. Este es el caso del modelo propuesto por Gustafson (1989), que define el Índice de Ubicuidad en Agua Subterránea (*GUS*) a partir del tiempo de vida media del plaguicida ($T_{0.5}$) y del coeficiente de adsorción en suelos (K_{oc}).

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

A partir de este índice los plaguicidas se pueden clasificar atendiendo a su movilidad, tal y como se presenta en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Clasificación de los plaguicidas en función de su índice GUS

Índice GUS	Clasificación
<1.8	Baja movilidad
1.8-2.8	Movilidad media
>2.8	Alta movilidad

En la **Tabla 2** se muestran los plaguicidas utilizados en Dinamarca, Francia, Alemania, Reino Unido, Grecia, Holanda, Italia, España y Suecia (Fielding *et al.*, 1992) en cantidades mayores de 50 toneladas por año y que además están clasificados como de movilidad intermedia o alta, y que por lo tanto presentan, en principio, mayores posibilidades de contaminar los acuíferos.

Tabla 2. Plaguicidas utilizados en Europa en cantidades mayores de 50 Tm/año considerados de movilidad alta o intermedia.

<i>Ácido tricloroacético</i> ^h	<i>Dimetoato</i> ⁱ	Metamitron ^h
<i>Alacloro</i> ^h	Dinoseb ^h	<i>Metazaclor</i> ^h
Aldicarb ⁱ	Diuron ^h	Metiocarb ⁱ
Aminotriazol ^h	DNOC ^{i,h}	<i>Metolacloro</i> ^h
Atrazina ^h	EPTC ^h	Oxidemeton-metil ⁱ
<i>Benazolin</i> ^h	Etofumesato ^h	<i>Piretrinas</i> ⁱ
<i>Bentazon</i> ^h	Etoprofos ⁱ	<i>Procloraz</i> ^f
Bromofenoxim ^h	Fenamifos ⁿ	Profam ^h
Carbaril ⁱ	Fenmedifam ^h	Prometrina ^h
Carbendazima ^f	Fluroxypir ^h	<i>Propiconazol</i> ^f
Carbetamida ^h	Iprodiona ^f	Propizamida ^h
Cianazina ^h	<i>Isoproturon</i> ^h	Simazina ^h
<i>Cloridazona</i> ^h	Linuron ^h	Terbutilazina ^h
Clorpirifos ⁱ	<i>Maneb</i> ^f	Terbutrina ^h
Clortoluron ^h	<i>MCPA</i> ^h	Triadimenol ^f
<i>2,4-D</i> ^h	<i>MCPA</i> ^h	Triclorfon ⁱ
Dalapon ^h	Metabenzotiazuron ^h	Vinclozolin ^f
Diazinon ⁱ	<i>Metam-sodio</i> ^{f,i,n}	Ziram ^f
Diclobenil ^h		

h, herbicida; i, insecticida; f, fungicida; n, nematocida

En cursiva los plaguicidas utilizados en cantidad superior a 500 Tm/año

En negrita los plaguicidas estudiados en esta memoria

A la vista de la tabla anterior se observa que en la actualidad se está reduciendo el uso de plaguicidas organoclorados y organofosforados, los cuales han sido sustituidos por compuestos más polares como triazinas, clorofenoxiácidos, fenilureas, carbamatos y otros. También se observa que la mayoría de los plaguicidas utilizados en Europa en cantidades importantes son herbicidas.

En las últimas décadas los herbicidas han reemplazado o complementado a los métodos más o menos mecánicos que existían para controlar las malas hierbas en

países donde se practica una agricultura intensiva y altamente mecanizada. El uso de estos compuestos se ha generalizado porque son más eficaces y resultan más económicos que los métodos tradicionales; su incorporación ha permitido a los agricultores controlar las malas hierbas, tanto en presencia de cultivos como sin ellos, sin necesidad de recurrir a los tradicionales arados y movimiento de tierra y a la rotación de cultivos. Sin embargo, en contrapartida se ha generado un problema ambiental que hace años no existía.

En la **Tabla 3** se presenta una lista de herbicidas de especial interés para algunos países mediterráneos, como Francia, Italia, Grecia y España; en ella se recogen compuestos que presentan grandes probabilidades de contaminar estuarios y zonas acuáticas costeras. Esta lista ha sido elaborada atendiendo a consideraciones de uso, propiedades físico-químicas y persistencia de cada compuesto (Barceló, 1993).

Tabla 3. Herbicidas de especial preocupación en áreas mediterráneas.

Ácido tricloroacético	DNOC	Metolacoloro
Alacloro	EPTC	Metoxuron
Aminotriazol	Etalfluralina	Metribuzin
Atrazina	Etofumesato	Molinato
Bentazon	Fenmedifam	Napropamida
Bromoxinil	Flamprop-M-isopropil	Neburon
Butilato	Glifosato	Paraquat
Carbetamida	Isoproturon	Pendimetalin
Clortoluron	Linuron	Prometrina
2,4-D	MCPA	Simazina
Dialato	MCPD	Terbumeton
Diclobenil	Metabenzotiazuron	Terbutilazina
Diclofop-metil	Metamitron	Terbutrina
Dinoterb	Metazaclor	Triatato
Diquat	Metobromuron	Trifluralina
Diuron		

En negrita, herbicidas estudiados en este trabajo

1.2. Selección de los herbicidas a estudiar

Los herbicidas son productos destinados a destruir malas hierbas, dando a este término el sentido de “plantas adventicias” que entorpecen el libre desarrollo de los cultivos (Barberá, 1989).

Los daños que las malas hierbas pueden ejercer sobre los cultivos, tales como competir por los alimentos, desarrollo de plagas y enfermedades, dificultar las labores habituales de labranza, etc., son conocidos desde antiguo. El control de las mismas se venía realizando mediante escardas repetidas del terreno de manera más o menos automatizada, en función de la época y el país, o bien mediante la rotación de cultivos. El inicio de la lucha química contra plantas adventicias se inició a fines del siglo pasado, con la introducción del ácido sulfúrico en cultivos de cereales. A partir de aquí, el progreso ha sido continuo, se han empleado herbicidas inorgánicos, derivados del petróleo, compuestos nitrados (1932), productos hormonales (desde 1945) y, en las últimas décadas, se ha producido un desarrollo espectacular, dando entrada a una extensa serie de productos orgánicos de síntesis.

Además de la clasificación de los herbicidas atendiendo a su estructura química, que ya se ha presentado anteriormente, en la **Tabla 4** se resumen otras posibles clasificaciones atendiendo a diferentes criterios.

Tabla 4. Clasificación de herbicidas atendiendo a diferentes criterios.

<i>Criterio de clasificación</i>	<i>Herbicida</i>
Acción sobre las plantas	Total
	Selectivo
Modo de aplicación	De presiembra o preplantación
	De preemergencia
	De postemergencia
Acción sobre las malas hierbas	De contacto (sistémico)
	Residual
Sistema de aplicación	Total
	Dirigido
	Fraccionado o “ <i>splitting</i> ”

Se puede distinguir entre herbicidas *totales*, si destruyen toda la vegetación sin discriminación, o *selectivos* cuando destruyen las malas hierbas dejando indemnes a los cultivos. Por otro lado, se consideran *de presiembra* o *preplantación*, cuando se aplican antes de sembrar o plantar, tal y como su nombre indica; *de preemergencia*, si se emplean después de la siembra o al mismo tiempo, antes de que emerja el cultivo; y *de postemergencia*, si se usan sobre el cultivo ya emergido o implantado. También se distingue entre herbicidas *de contacto*, cuando se precisa el contacto directo con la mala hierba para destruirla, y *residuales* o de superficies, que se aplican al suelo, antes de nacer las hierbas o cuando están germinando. Dentro de los herbicidas de contacto, hay que destacar el papel de los herbicidas *sistémicos* que siendo absorbidos por la savia se desplazan y ejercen su acción en partes no tratadas directamente con el compuesto. Finalmente, dependiendo del sistema de aplicación, los herbicidas pueden ser *totales*, cuando tanto el cultivo como las malas hierbas son tratados con el compuesto; *dirigidos*, cuando se aplica solamente a la línea de cultivo; o *fraccionados*, cuando la dosis total de aplicación se fracciona en dos tratamientos aplicados con unos pocos días de diferencia.

Cabe destacar, que el desarrollo actual de los herbicidas se encamina a una selectividad específica, de modo que sean compuestos lo más seguros posible para el cultivo, requiriéndose a menudo el uso combinado de diferentes compuestos para destruir distintas plantas, lo cual puede dar idea del elevado número de herbicidas que existen. Además, la utilización constante de un mismo herbicida sobre un cultivo puede conducir, a la larga, a un cambio de la flora adventicia de modo que se desarrollan, más o menos lentamente, especies de malas hierbas que anteriormente no dominaban, pero que al eliminarse las plantas sensibles al herbicida, pueden empezar a tomar protagonismo, requiriéndose entonces un nuevo compuesto efectivo contra las mismas.

En este trabajo se han realizado estudios detallados, en cuanto a su determinación analítica en muestras de agua, de una serie de herbicidas representativos de familias de compuestos ampliamente utilizados en Europa

(**Tabla 2**), en España y, particularmente en la Comunidad Valenciana. Los compuestos seleccionados, así como la familia a la que pertenecen, se presentan en la **Tabla 5**, donde se recogen también algunas de sus propiedades físico-químicas, así como datos relativos a su toxicidad para mamíferos (LD_{50} para ratas) y para peces (LC_{50} para trucha).

Muchos de los compuestos seleccionados se incluyen en las **Tablas 2 y 3**, así como en la lista de productos cuyo control en aguas se considera prioritario en la Unión Europea (Directiva 76&464/EEC). Esta lista incluye, en la actualidad, 132 compuestos –en su mayoría contaminantes orgánicos- de los cuales 39 corresponden a plaguicidas (Barceló, 1993).

Todos los compuestos presentados pueden determinarse, en principio, por Cromatografía Líquida con detección ultravioleta. Algunos de ellos, como el bromacilo o los derivados de la triazina (exceptuando la hidroxiatrazina), también pueden determinarse directamente, sin necesidad de derivatización, por cromatografía de gases. Por ello, esta técnica con detección por espectrometría de masas, se ha utilizado, en algunas ocasiones, para confirmar la presencia de analitos en muestras positivas y para comparar diferentes procedimientos de análisis.

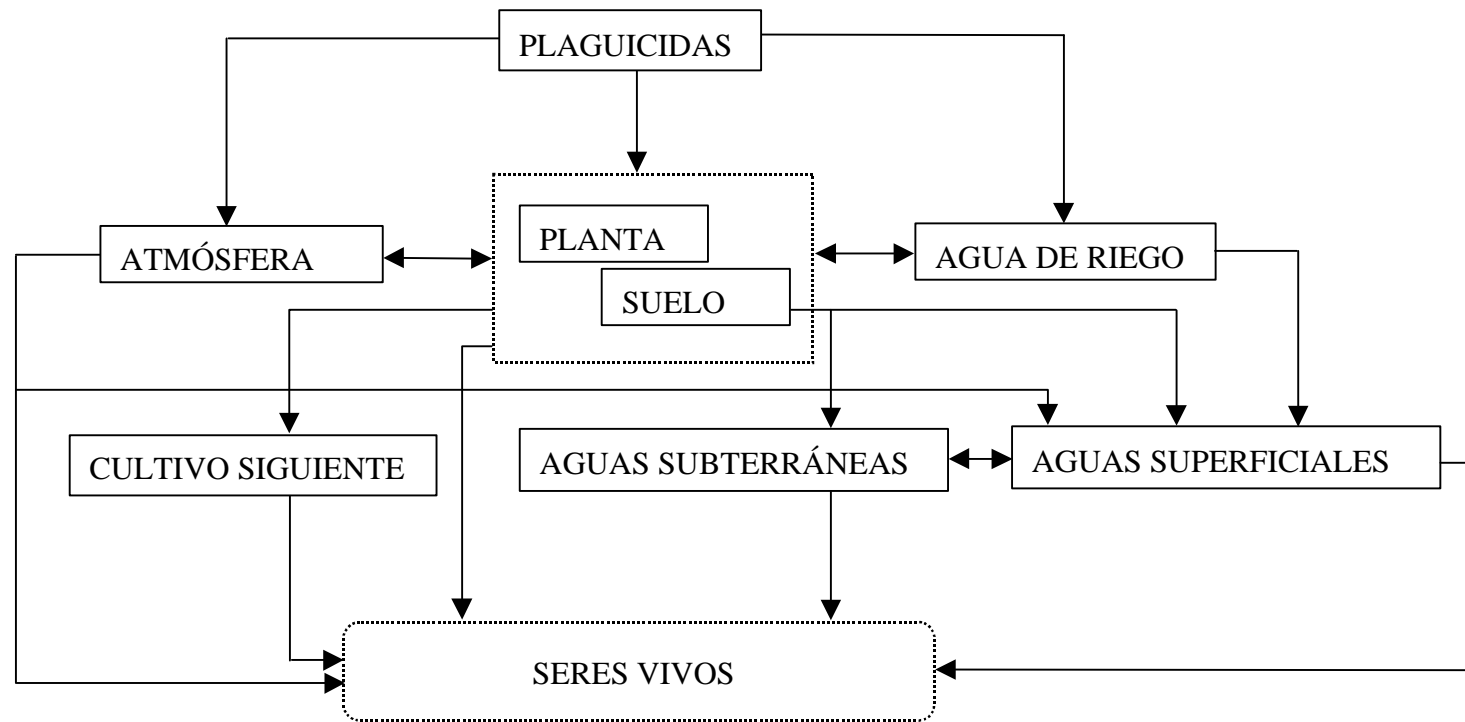
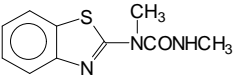
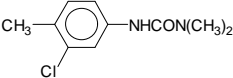
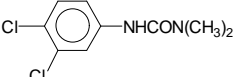
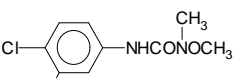
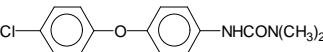
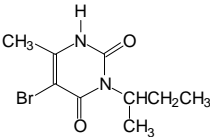


Figura 1. Esquema general de la vías de contaminación difusa por la aplicación de plaguicidas.

Tabla 5. Herbicidas y productos de transformación seleccionados.

Compuesto		Estructura química	S_{H_2O} ($mg \cdot l^{-1}$)	Índice GUS	I_{max} (nm)	Toxicidad LD_{50} ($mg \cdot Kg^{-1}$); LC_{50} ($mg \cdot l^{-1}$)
HERBICIDAS UREICOS						
Metabenzotiazuron	MOV MED		59	3.28	224, 271	LD_{50} : >2500 LC_{50} : 15.9
Clortoluron	MOV MED		70	3.74	211, 246	LD_{50} : >10000 LC_{50} : 20-35
Diuron	MOV MED		42	2.43	212, 253	LD_{50} : 3400 LC_{50} : 3-60
Linuron	UE MOV MED		81	3	211, 251	LD_{50} : 4000 LC_{50} : 16
Cloroxuron			4	1	250	LD_{50} : 3000 LC_{50} : >100
HERBICIDA DERIVADO DEL URACILO						
Bromacilo			815	4.4	212, 278	LD_{50} : 5200 LC_{50} : >75

UE: incluidos en la lista europea de productos prioritarios

MOV: incluidos en la **Tabla 2**, plaguicidas usados en Europa en grandes cantidades y clasificados de movilidad intermedia o alta

MED: incluidos en la **Tabla 3**, herbicidas de especial preocupación en el área Mediterránea

Tabla 5. Herbicidas y productos de transformación seleccionados (continuación).

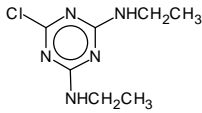
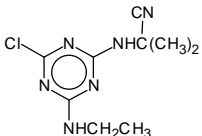
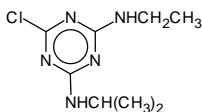
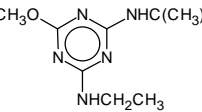
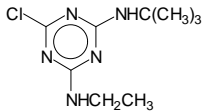
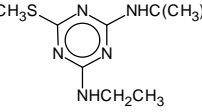
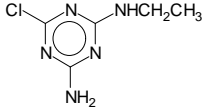
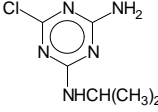
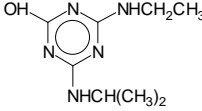
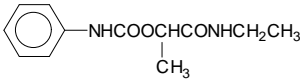
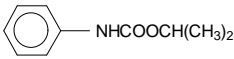
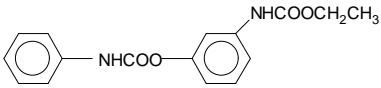
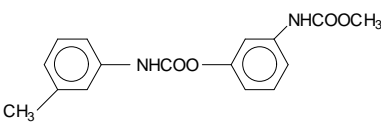
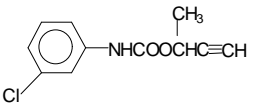
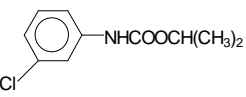
Compuesto		Estructura química	S_{H_2O} ($mg \cdot l^{-1}$)	Índice GUS	I_{max} (nm)	Toxicidad LD_{50} ($mg \cdot Kg^{-1}$); LC_{50} ($mg \cdot l^{-1}$)
HERBICIDAS TRIAZÍNICOS						
Simazina	UE MOV MED		5	3.43	224	LD_{50} : >5000 LC_{50} : >100
Cianazina	MOV		171	2.52	222	LD_{50} : 288 LC_{50} : 10-18
Atrazina	UE MOV MED		30	3.24	224	LD_{50} : 1180 LC_{50} : 0.2
Terbumetona	MED		130	-	220	LD_{50} : 483-657 LC_{50} : 14
Terbutilazina	MOV MED		8.5	3.11	224	LD_{50} : 2000 LC_{50} : 4.6
Terbutrina	MOV MED		25	2.15	226	LD_{50} : 2000 LC_{50} : 1.8-3

Tabla 5. Herbicidas y productos de transformación seleccionados (continuación).

<i>Compuesto</i>	<i>Estructura química</i>	<i>S_{H₂O}</i> (<i>mg·l⁻¹</i>)	<i>Índice GUS</i>	<i>I_{max}</i> (<i>nm</i>)	<i>Toxicidad</i> <i>LD₅₀</i> (<i>mg·Kg⁻¹</i>); <i>LC₅₀</i> (<i>mg·l⁻¹</i>)
PRODUCTOS DE DEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA					
Desisopropilatrazina (DIA)		>330	-	216	-
Desetilatrazina (DEA)		330	-	216	-
Hidroxiatrazina (HA)		6* 230**	-	220-238	-

pH*=13; *pH*=2

Tabla 5. Herbicidas y productos de transformación seleccionados (continuación).

Compuesto		Estructura química	S_{H_2O} ($mg \cdot l^{-1}$)	Índice GUS	I_{max} (nm)	Toxicidad LD_{50} ($mg \cdot Kg^{-1}$); LC_{50} ($mg \cdot l^{-1}$)
HERBICIDAS FENILCARBAMATOS						
Carbetamida	MOV		3500	2.05	194, 236	LD ₅₀ : 11000
	MED					
Profam	MOV		32	2.31	196, 236	LD ₅₀ : 5000
Desmedifam			7	1.2	200, 238	LD ₅₀ : 10250 LC ₅₀ : 1.7
Fenmedifam	MOV		6	1	202, 238	LD ₅₀ : > 8000 LC ₅₀ : 1.4-3
	MED					
Clorbufam			540	-	206, 240	LD ₅₀ : 2500
Clorprofam			89	2.05	208, 240	LD ₅₀ : 5000-7000

1.3. Problemática ambiental de los herbicidas seleccionados

Con anterioridad ya se han descrito los principales efectos sobre el medio ambiente asociados al uso de plaguicidas. En el caso de los herbicidas se debe destacar además, que se trata de compuestos especialmente problemáticos ya que se aplican directamente en el suelo y por lo tanto son más susceptibles de contaminar las aguas.

Los herbicidas, una vez aplicados, pueden sufrir diferentes procesos que determinan su comportamiento en el medio ambiente. A continuación, se destacan los procesos que de alguna manera pueden favorecer o disminuir la presencia de los herbicidas en las aguas (Hernández, 1993).

- Retención debida a la adsorción por el suelo. Este proceso viene determinado por las propiedades físico-químicas del herbicida y por la naturaleza de los suelos (contenido y tipo de arcillas, materia orgánica, pH, actividad microbiana, etc.) Esta retención puede disminuir o incluso llegar a evitar el transporte de los herbicidas hasta el agua.
- Transformación. Los herbicidas se transforman por vía química, fotoquímica o bioquímica, siendo esta última la más importante en los suelos, debido a la presencia de microorganismos.
- Transporte. Este proceso puede ser vertical a través de la zona no saturada, pudiendo ocasionar que el herbicida contamine el acuífero. También pueden producirse transportes de tipo lateral en el suelo o por escorrentía superficial debido al agua de lluvia o de riego, dependiendo principalmente del tiempo transcurrido entre la aplicación del compuesto y el periodo de lluvias o de riego. Otro mecanismo de transporte es la volatilización, que depende fundamentalmente de la presión de vapor del herbicida, así como de la temperatura y del viento.

En la **Tabla 6** se muestra un listado de herbicidas y productos de transformación detectados en aguas subterráneas de distintos países de la Unión Europea (Fielding *et al.*, 1992).

Tabla 6. Herbicidas y productos de transformación detectados en aguas subterráneas de la Unión Europea.

Alacloro	Diclorprop	Metazaclor
Aminotriazol	Difenzocuat	Metobromuron
Atrazina	Dinoseb	Metolacloro
Bentazon	Dinoterb	Metoxuron
Bentiocarb	Diuron	Metribuzin
Bromacilo	DNOC	Molinato
Bromoxinil	2,4-DP	Monolinuron
Carbetamida	Fluazifop	Prometrina
Clortoluron	Fluazifop-butil	Propaclor
Clopyralid	Hexazinona	Propanil
Cianazina	Ioxinil	Propazina
2,4-D	Isoproturon	Simazina
Dalapon	Lenacilo	2,4,5-T
DEA	Linuron	TCA
Desetildesisopropilatrazina	MCPA	Terbutilazina
Desetilterbutilazina	MCPB	Terbutrina
DIA	MCPP	2,4,5-TP
Dicamba	Metabenzotiazuron	Trialato
Diclobenil	Metamitron	Triclopyr

En negrita compuestos estudiados en este trabajo.

A la vista de la tabla anterior se observa que los herbicidas detectados pertenecen a diferentes familias químicas, destacándose la presencia de herbicidas fenoxiácidos, derivados ureicos y triazinas, por lo que se debería prestar especial atención a estos compuestos. Sin embargo, cabe destacar que tal vez se podrían haber detectado otros muchos compuestos en las aguas, pero la ausencia de metodología analítica suficientemente sensible y selectiva seguramente haya impedido la determinación de los mismos.

1.3.1. *Herbicidas ureicos*

Se trata de compuestos derivados de la urea:



en donde se sustituyen total o parcialmente los hidrógenos de los grupos $-\text{NH}_2$ por radicales orgánicos.

La acción preferente, para la mayoría de estos compuestos, es a través de las raíces, como herbicidas residuales, aunque algunos poseen acción de contacto que hace que puedan utilizarse sobre hierba emergida. Estos compuestos son fuertemente adsorbidos por suelos ricos en materia orgánica y arcillas, mientras que este efecto es menos notable en suelos arenosos, ligeros o sueltos, requiriéndose en los primeros dosis más altas de aplicación. Su modo de acción principal se basa en la inhibición de la reacción de Hill, que ocurre durante la fase lumínica de la fotosíntesis, una vez son absorbidos por las plantas a través de las raíces o las hojas. Además, se ha descrito que estos herbicidas pueden afectar a las síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos. La consecuencia inmediata es inhibir la emergencia y crecimiento de las plantas, produciéndose plantas cloróticas, necrosis de tejidos y muerte subsiguiente. Se ha comprobado que la acción de estos compuestos se intensifica en zonas húmedas, proximidades de ríos, arroyos, lugares sometidos a nieblas y rocíos, etc. Ello se debe al hecho de que para que estos herbicidas actúen deben de encontrarse disueltos en agua y la presencia de este medio favorece la reacción de desorción del compuesto retenido en el suelo.

Mediante experiencias realizadas en suelos estériles y no estériles, se ha observado que la degradación de estos herbicidas se produce principalmente debido a microorganismos, habiéndose identificado tanto bacterias como hongos, que son capaces de utilizarlos como fuente de carbono, produciendo en último término derivados aminados. La degradación de estos herbicidas se produce mediante reacciones de N-demetilación, proceso inicial que conlleva una importante reducción de la fitotoxicidad; N-demetoxilación, que se produce en compuestos metoxilados (clorobromuron, linuron o monolinuron); hidroxilación para formar derivados hidroxilados y, finalmente hidrólisis generándose un derivado de la

anilina o similar, que se ha descrito como el principal metabolito debido a la biotransformación y que resulta no tóxico para las plantas (Kikwood, 1987; Smith, 1988; Barberá, 1989). También se ha observado que la degradación microbiana es más fácil en los derivados más solubles que en los de menor solubilidad, habiéndose constatado la mayor persistencia de las especies menos solubles. Además de los anteriores mecanismos de transformación, también se ha constatado que son compuestos sensibles a la luz solar, y especialmente a la radiación ultravioleta (200-400 nm), que también puede ocasionar transformaciones en su estructura química. El transcurso de la degradación por fotólisis parece que se establece por etapas: la primera sería una demetilación parcial, que deviene en total, finalizando con la hidroxilación del núcleo fenólico. Se ha demostrado, así mismo, la diferencia de eficacia de los herbicidas ureicos en zonas sombreadas e iluminadas, siendo menor en el último caso (Barberá, 1989).

Existe una extensa gama de herbicidas pertenecientes a esta familia que resultan útiles para una gran variedad de aplicaciones. En la **Tabla 7** se recogen las principales aplicaciones de los herbicidas ureicos estudiados en este trabajo.

En relación con los riesgos de contaminación derivados del uso de estos herbicidas, cabe destacar que, en general, se trata de compuestos bastante retenidos por los suelos, de modo que sus efectos pueden durar desde pocos meses hasta varios años, según la solubilidad y la capacidad de transformación de cada compuesto, y por lo tanto, pueden afectar a nuevos cultivos sensibles a los mismos. Aunque, en principio, la importante retención de estos herbicidas por parte del suelo pueda disminuir el movimiento de los mismos hasta las aguas, hay que destacar que normalmente son efectivos en disolución, por lo cual se aplican importantes cantidades de agua, que podrían arrastrarlos hasta los acuíferos o cauces de aguas superficiales. Realmente, a partir de la **Tabla 5**, se observa que todos los herbicidas ureicos estudiados, a excepción del cloroxuron, se pueden clasificar como compuestos de alta movilidad a partir de su índice GUS, habiéndose encontrado residuos de algunos de estos herbicidas tanto en aguas subterráneas (**Tabla 6**), como en aguas superficiales (Hidalgo *et al.*, 1997).

1.3.2. Herbicidas uracílicos

Se trata de compuestos derivados de un núcleo diazínico, en concreto de la pirimidina, en la que dos de los carbonos se unen al oxígeno formando dos grupos cetónicos que caracterizan a los uracilos (**Figura 2**):

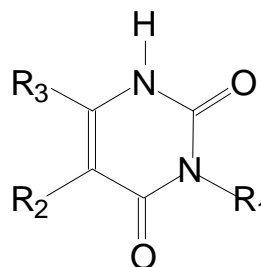


Figura 2. Derivados del uracilo. R_1 , R_2 y R_3 , son sustituyentes.

Estos compuestos son absorbidos por la raíz, alcanzando el xilema. Además de inhibir la fotosíntesis, también pueden afectar a la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Kirkwood, 1987).

Los herbicidas uracílicos poseen buena acción residual, siendo más limitada su acción por contacto. Se trata de compuestos bastante persistentes en el medio ambiente, aunque sufren degradación microbiana. También sufren fotólisis produciendo derivados de hidantoína. Su metabolismo en plantas y animales conduce a la hidroxilación del radical del carbono 6 (R_3).

En la **Tabla 8** se muestran las principales aplicaciones de los 3 herbicidas uracílicos más conocidos: bromacilo, terbacilo y lenacilo.

Respecto al impacto medioambiental que estos compuestos pueden ocasionar, cabe destacar la elevada solubilidad en agua de los herbicidas bromacilo y terbacilo (815 y $710 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente), lo que hace que estos compuestos sean poco adsorbidos por componentes del suelo y que puedan ser arrastrados por la lluvia o por el agua de riego a capas más profundas, no estando recomendado su uso en suelos arenosos o pedregosos, por su facilidad de percolación a través de los mismos.

1.3.3. Herbicidas triazínicos

Los compuestos triazínicos que más se han extendido por sus propiedades herbicidas, son los derivados simétricos, es decir aquellos que tienen el N en posiciones 1, 3 y 5, tal y como se muestra en la **Figura 3**, en la que R₁, R₂ y R₃ son sustituyentes:

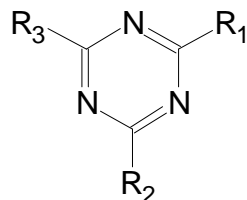


Figura 3. Derivados de la triazina. R₁, R₂ y R₃, son sustituyentes.

Aunque en estos compuestos el esqueleto fundamental siempre permanece idéntico, las distintas triazinas se distinguen entre sí por los sustituyentes (R₁, R₂, R₃), siendo uno de ellos el que les imparte características esenciales, y que se puede tratar de un átomo de Cl (clorotriazinas), un grupo CH₃O- (metoxitriazinas) o un grupo CH₃S- (tiometiltiazinas). En general, las clorotriazinas son las menos solubles en agua, y las metoxitriazinas las más solubles.

Estos compuestos son, en general, herbicidas residuales, que son captados por las raíces, aunque también pueden tener acción de contacto, siendo absorbidos por las hojas. Se trata de compuestos bastante persistentes, sobre todo en suelos áridos y con poco contenido en materia orgánica. La adsorción por el suelo desempeña un importante papel en la selectividad mecánica de los mismos y viene determinada, en primer lugar, por el contenido en materia orgánica del suelo, siguiéndole el porcentaje en arcillas.

El modo de actuar sobre las malas hierbas es similar al de las ureas, por inhibición de la reacción de Hill, generando síntomas cloróticos al inhibir la síntesis de clorofila o producir degradación de la misma.

Los principales productos de degradación encontrados en suelos tratados con triazinas son los derivados desalquilados y los productos de hidrólisis. La

degradación en el suelo es debida, fundamentalmente, a agentes microbianos, aunque se ha constatado la degradación por fotólisis con generación de productos hidroxilados. En la **Figura 4** se presentan los principales productos de transformación del herbicida atrazina obtenidos en experiencias de campo tras tratar suelos con este herbicida (Smith, 1988).

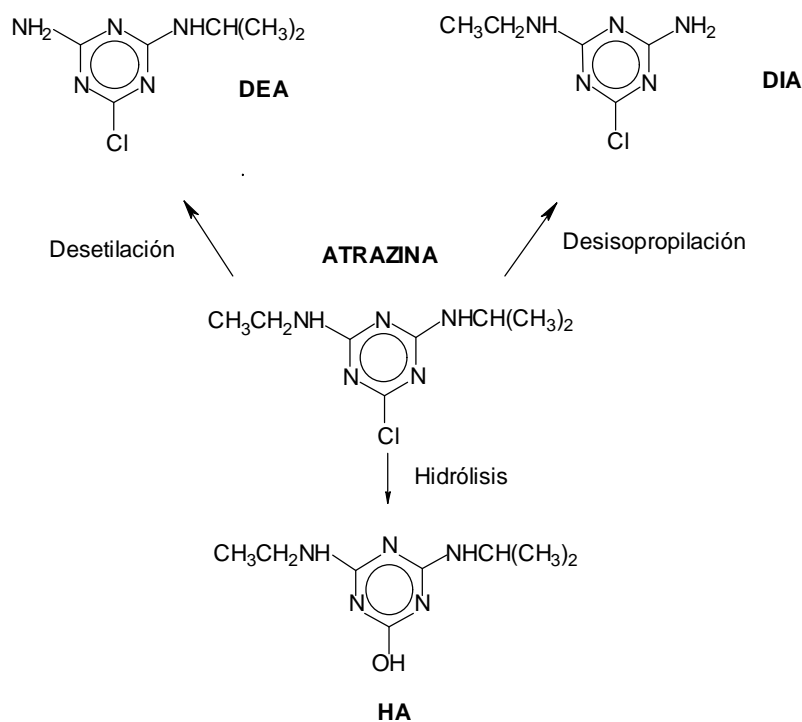


Figura 4. Productos de transformación de atrazina detectados en suelos tratados con el herbicida.

El metabolismo de las triazinas en los sistemas vegetales estriba fundamentalmente en la desalquilación de los grupos amino para originar aminotriazinas. Los derivados monoalquilo todavía presentan cierta actividad como herbicidas pero no así los compuestos completamente desalquilados. También se ha comprobado que las clorotriazinas pierden los átomos de cloro, sufriendo hidroxilación y posterior carboxilación, de modo que se forman compuestos más o menos polares que han perdido toda actividad herbicida.

La selectividad de estos compuestos depende de la capacidad por parte de las plantas de degradarlos hasta compuestos inocuos. Se ha comprobado que la capacidad de las plantas para resistir su acción está bastante extendida, no sólo en los cultivos sino también en las propias adventicias. Ello se debe a que se trata de herbicidas muy utilizados, fundamentalmente atrazina y simazina, que han propiciado el desarrollo de especies resistentes. Esta resistencia a estos dos herbicidas, hace además, que el uso de otras triazinas no sea eficaz debido a que el modo de actuación es idéntico para toda la familia.

En la **Tabla 9** se presentan las principales aplicaciones de los herbicidas triazínicos estudiados en este trabajo.

Esta familia de herbicidas es una de las más estudiadas, desde el punto de vista toxicológico y medioambiental. Tras haberse publicado que triazinas como atrazina, simazina y cianazina, causan cáncer de mama en hembras de rata, en 1994 la Agencia de Protección Medioambiental americana (EPA) publicó la posible relación entre la exposición a triazinas y el cáncer de mamas en mujeres. En el caso del herbicida cianazina también se han descrito mutaciones genéticas así como defectos de nacimiento en aves y conejos. Finalmente, debido a los constatados efectos tóxicos de esta última (cianazina), la EPA y Dupont Agrochemical Company decidieron en 1995 la eliminación por etapas de este herbicida, de modo que en 1999 deberán estar cancelados todos los registros de productos que contengan el herbicida, aunque los “stocks” existentes podrán ser usados hasta el año 2002.

Desde el punto de vista de la contaminación medioambiental, está bien documentada la presencia de herbicidas triazínicos en aguas superficiales (Hernández *et al.*, 1996), así como en las aguas subterráneas de muchos países, poniéndose de manifiesto ésta última en la **Tabla 6**, lo cual está de acuerdo con los elevados índices *GUS* que presentan estos compuestos (**Tabla 5**), así como con las grandes cantidades en que se usan (**Tabla 2**).

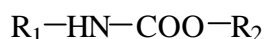
En el caso de USA, estudios realizados durante 1995 en 29 ciudades del estado de Lousiana demostraron que herbicidas triazínicos como atrazina y cianazina se encontraban frecuentemente en las aguas potables analizadas, a niveles que excedían los límites federales existentes para la salud, así como los niveles

recomendables según la EPA (3 y 9 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, para atrazina y cianazina, respectivamente) (http://www.ewg.org/pub/home/reports/Weed_Killer/Weed_Exec.html).

Junto a los herbicidas originales (“*parent compounds*”), también se han detectado en muestras de aguas algunos de sus productos de transformación (**Tabla 6**), destacando la presencia de los derivados de la atrazina (DEA y DIA).

1.3.4. *Herbicidas fenilcarbamatos*

Se trata de compuestos derivados del ácido carbámico:



en el cual R_1 es un radical arilo, con o sin sustituyentes, y R_2 es otro radical. Las estructuras químicas de los herbicidas fenilcarbamatos estudiados en este trabajo se muestran en la **Tabla 5**. Al estudiarse la influencia de la estructura molecular en la eficacia del herbicida, se comprobó que, en general, la prolongación de la cadena unida al oxígeno disminuye la actividad, y por ello, el radical éster es normalmente corto (Barberá, 1989). Respecto al H libre del grupo amino, se comprobó que su presencia no era imprescindible aunque su sustitución modificaba la actividad del herbicida.

La acción de estos compuestos se ejerce normalmente por su absorción a través de las raíces, pero no es éste su único camino de penetración, sino que todos ellos pueden ser absorbidos por las hojas, siempre que se trate de una planta muy joven. En algún caso, como ocurre con el fenmedifam, la absorción radicular es nula, y sólo actúa por contacto.

El modo de acción depende de cada compuesto, aunque un efecto común a casi todos es el bloqueo de la división celular, provocando la hipertrofia de raíces y produciendo la muerte de la planta. En muchos casos (clorprofam, fenmedifam) se produce un efecto sobre la reacción de Hill, interrumpiendo el ciclo de la fotosíntesis y el crecimiento de la planta, que deviene clorótica y mustia; finalmente, se seca y muere.

El metabolismo de estos compuestos en las plantas no está totalmente claro, pero en general puede decirse que se forman compuestos solubles y conjugados, que pueden proceder de la escisión hidrolítica del compuesto original. La selectividad vendría determinada por la mayor rapidez del metabolismo en las plantas resistentes y la mayor lentitud en las sensibles.

La persistencia en el suelo viene determinada por la degradación y a veces por la volatilidad, como es el caso del profam, que tiende a sublimar en cuanto la

temperatura ambiental aumenta ligeramente. Los derivados clorados como el clorprofam, conducen a la formación de cloroanilinas, que pasan luego a derivados acetilados (acetanilidas) y en otros casos, como el fenmedifam y desmedifam, se forman los correspondientes hidroxifenil-carbamatos.

En la **Tabla 10** se presentan las principales aplicaciones de los herbicidas fenilcarbamatos estudiados en este trabajo.

Algunos de estos compuestos, tales como carbetamida, fenmedifam y profam se encuentran recogidos en la **Tabla 2**, lo cual indica que se trata de herbicidas muy utilizados en Europa y con posibilidades de contaminar las aguas subterráneas. Sin embargo, sólo se ha detectado en aguas el herbicida carbetamida (**Tabla 6**), lo cual no excluye la posibilidad de que el resto de compuestos no esté contaminando las aguas, sino que más bien no se han podido detectar hasta el momento debido a la falta de metodología analítica para determinar este tipo de herbicidas a niveles traza.

Tabla 7. Aplicaciones de los herbicidas ureicos seleccionados.

<i>Compuesto</i>	<i>Nombre químico</i>	<i>Aplicaciones</i>
Metabenzotiazuron	1-(1,3-Benzotiazol-2-il)-1,3-dimetilurea	Pre- y post-emergente. Selectivo en trigo y cebada de invierno, alcachofa, patata y guisante. Es post-trasplante en haba y cebolla. Se usa también asociado a otros herbicidas
Clortoluron	3-(3-Cloro-p-tolil)-1,1-dimetilurea	Pre- y post-emergente. Selectivo en trigo y cebada de invierno. Persiste 3-5 meses. Se usa también en olivo, asociado a otros herbicidas como la terbutrina
Diuron	3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea	Pre-emergente. Selectivo en alfalfa, algodón, espárrago, lenteja, legumbres forrajeras, caña de azúcar, piña de América, cítricos, frutales con pepita, olivo, viñedo, con más de 4 años. No se debe usar en terrenos arenosos y se debe dejar pasar 2 años antes de plantar cultivos sensibles en suelo tratado. Se usa generalmente asociado a otros herbicidas como bromacilo y/o terbutrina, simazina, etc.
Linuron	3-(3,4-diclorofenil)-1-metoxi-1-metilurea	Pre- y post-emergente. Selectivo en patata, espárrago, girasol, haba, maíz, alcachofa, zanahoria, caña de azúcar y en post-trasplante de cebolla. No se debe usar en suelos arenosos ni muy ricos en materia orgánica. Acción residual de 3-4 meses. Se puede usar asociado a otros herbicidas como alacloro, cianazina, etc.
Cloroxuron	3-(4-(4-clorofenoxi) fenil)-1,1-dimetilurea	Pre-emergente. Selectivo en zanahoria, espárrago y algún otro cultivo y en post-trasplante en fresa y cebolla. Persiste 1-2 meses

Tabla 8. Aplicaciones de los herbicidas uracílicos más utilizados.

<i>Compuesto</i>	<i>Nombre químico</i>	<i>Aplicaciones</i>
Bromacilo	5-bromo-3- <i>sec</i> -butil-6-metiluracilo	Pre-emergente. Activo en gramíneas y varias dicotiledóneas. Selectivo en caña de azúcar y piña de América. Aplicable a cítricos mayores de 4 años de edad y a melocotoneros con más de 2 años. Se usa también en terrenos sin cultivo e industriales. No se debe utilizar en suelos arenosos o pedregosos. Persiste entre 6-8 meses aplicado en dosis normales, pero puede superar el año a dosis altas. Si se arranca el cultivo, se debe esperar 1-2 años para implantar otro. Se asocia a otros herbicidas, como diuron y terbutrina
Terbacilo	3- <i>tert</i> -butil-5-cloro-6-metiluracilo	Pre- y post-emergente. Activo sobre dicotiledóneas y varias gramíneas. Selectivo en caña de azúcar, alfalfa, menta y huertos de cítricos, manzano y melocotón. Precisa humedad para su acción. Si se levanta el cultivo, se debe esperar dos años para poner otro
Lenacilo	3-ciclohexil-1,5,6,7-tetrahidrociclopentapirimidina-2,4, (3H,5H)-diona	Pre-emergente y pre-siembra. Activo especialmente sobre dicotiledóneas. Selectivo en remolacha, espinaca, fresa, clavel, rosal. Son usuales asociaciones con otros herbicidas.

En negrita, herbicida estudiado en este trabajo

Tabla 9. Aplicaciones de los herbicidas triazínicos seleccionados.

<i>Compuesto</i>	<i>Nombre químico</i>	<i>Aplicaciones</i>
Simazina	6-cloro-N ² , N ⁴ -diethyl-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Pre- emergente. Acción sobre dicotiledóneas y gramíneas. Selectivo en maíz, alfalfa, haba, frambuesa, grosella, rosál, espárrago, banano, piña de América y caña de azúcar. Aplicable también a frutales con pepita, cítricos, olivo, avellano, viñedo, mayores de 4 años de edad. Deben transcurrir 6 meses antes de implantar cultivos sensibles. No se debe aplicar en suelos muy arenosos o ricos en materia orgánica. Se puede asociar a otros herbicidas tales como diuron y atrazina
Cianazina	2-(4-cloro-6-etilamino- 1,3,5-triazin-2-ilamino)-2-metilpropionitrilo	Pre- y post-emergente. Activo sobre varias dicotiledóneas y gramíneas. Selectivo en arroz, maíz (pre- o post-) y en pre-emergencia en guisante, haba, patata. Aplicable en espárrago. Se puede formular con otros herbicidas como atrazina y linuron.
Atrazina	6-cloro-N ² -etil-N ⁴ -isopropil-1,3,5-triazina-3,4-diamina	Pre-emergente. Con cierta acción de contacto. Actúa en dicotiledóneas y algunas gramíneas como Cynodon. Selectivo en maíz y sorgo. Aplicable también en avellano y manzano. Se debe dejar transcurrir 5 meses antes de implantar cultivos sensibles. No es aconsejable su aplicación en suelos muy arenosos. Son frecuentes asociaciones con otros herbicidas
Terbumeton	N ² -tert-butil-N ⁴ -etil-6-metoxi-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Pre- y post-emergente. Recomendado en el control de malas hierbas de hoja ancha y gramíneas. Se utiliza asociado a otros herbicidas como terbutilazina, atrazina, aminotriazol, etc.
Terbutilazina	N ² -tert-butil-6-cloro-N ⁴ -etil-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Como herbicida post-emergente es selectivo en cebada y trigo. Como pre-emergente se usa en haba, patata y sorgo. También se aplica en frutales con pepita, cítricos y viñedo, con más de 4 años edad. Se usa generalmente asociado a otros herbicidas
Terbutrina	N ² -tert-butil- N ⁴ -etil-6-metiltio-1,3,5-triazina-2,4-diamina	Como herbicida pre-y post-emergente es activo en dicotiledóneas y algunas gramíneas. Selectivo en cebada, trigo, maíz. Como pre-emergente en patata, girasol, guisante. También puede usarse en huertos de cítricos. Persiste 6 meses. No aplicar en suelos arenosos o propensos a encharcarse. Se usa mezclado con otros herbicidas

Tabla 10. Aplicaciones de los herbicidas fenilcarbamatos seleccionados.

<i>Compuesto</i>	<i>Nombre químico</i>	<i>Aplicaciones</i>
Carbetamida	R-1-(etilcarbamoil) etil carbanilato	Pre- y post- emergente. Acción por contacto, lenta. Selectivo en leguminosas (trébol, alfalfa, colza, lenteja, etc.) y en achicoria, girasol. Empleado también en frutales y viña. Activo sobre gramíneas, especialmente avena, y varias dicotiledóneas. Persiste alrededor de 2 meses
Profam	Isopropil carbanilato	Pre-siembra o pre-emerg. Tiene cierta acción residual. Selectivo en trébol, alfalfa, perejil, tomate. Persiste de 4 a 6 semanas. Se usa especialmente en zonas frías, solo o con Clorprofam
Desmedifam	Etil 3-fenil-carbamoiloxi carbanilato	Post-emergente. Selectivo en remolacha, distintas variedades de fresas y espinacas. Acción por contacto en dicotiledóneas jóvenes (2-4 hojas) y muy escasa o nula en gramíneas. Se usa junto a fenmedifam
Fenmedifam	Metil 3-(3-metil-carbaniloiloxi) carbanilato	Post-emergente. Selectivo en remolacha, distintas variedades de fresas y espinacas. Acción por contacto en dicotiledóneas jóvenes (2-4 hojas) y muy escasa o nula en gramíneas. Persiste de 6 a 8 semanas
Clorbufam	1-metilprop-2-inil 3-clorocarbanilato	Pre-emergente. Selectivo en puerros, cebollas y otros
Clorprofam	Isopropil 3-clorocarbanilato	Pre-siembra, pre-emergencia o después de trasplantes. Algo residual, con alguna acción por contacto y traslocativa en hierbas primerizas. Selectivo en alfalfa, cebolla, puerro, ajo, zanahoria, endibia, apio, perejil, haba, gladiolo, viveros de forestales y otros. Persiste unos 2 meses

1.4. Problemática analítica de la determinación de residuos de herbicidas

La gran variedad de herbicidas y el amplio uso que se hace de ellos plantea la necesidad de disponer de metodología analítica fiable, que informe sobre los niveles de residuos de estos compuestos en diferentes matrices, para poder evaluar los riesgos de contaminación existentes.

La determinación y cuantificación de estos compuestos, así como del resto de plaguicidas, es uno de los principales problemas que debe afrontar la disciplina analítica análisis de residuos de plaguicidas (PRA), ya que existen en la actualidad unos 700 principios activos diferentes además de sus productos de transformación.

Cabe destacar, así mismo, la restrictiva legislación comunitaria en materia de contaminación de las aguas potables por plaguicidas, que limita a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ el contenido de cada plaguicida o producto relacionado y a $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ la suma total de plaguicidas (EEC, 1980). Estos bajos niveles permitidos obligan a desarrollar métodos analíticos muy sensibles, que presenten límites de detección del orden de $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (idealmente de $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

La incorporación en los años 60 de la cromatografía de gases (GC) al PRA revolucionó este campo de trabajo, ya que fue posible separar un número importante de plaguicidas simultáneamente, desarrollándose de este modo los primeros métodos multiresiduales de análisis (MRMs). Posteriormente, en los años 70, se introdujo la GC capilar que, en la actualidad, con la incorporación de detectores muy sensibles y selectivos, como el de captura de electrones (ECD), el de nitrógeno-fósforo (NPD) o el detector fotométrico de llama (FPD), ha pasado a ser la principal técnica utilizada en este tipo de análisis.

Sin embargo, en la década de los 80 se empieza a potenciar el uso de la cromatografía líquida (LC) en columna en este campo y su aplicación se ha extendido considerablemente hasta nuestros días. Esta técnica es principalmente utilizada para la determinación de compuestos poco volátiles, polares y/o termolábiles, cuya

determinación por GC requiere de una o varias etapas previas de derivatización química. Ejemplos típicos son los herbicidas clorofenoxiácidos, las fenilureas y los carbamatos, compuestos que pueden ser eficientemente separados y analizados por LC con detección ultravioleta (UV). Posteriormente, con el desarrollo de detectores más selectivos como el de fluorescencia (FD) y el electroquímico se ha incrementado el campo de aplicación de esta técnica.

Más recientemente, el acoplamiento entre cromatografía (GC o LC) y espectrometría de masas (MS), ha permitido disponer de una herramienta confirmatoria básica en todo laboratorio de análisis de plaguicidas. Se puede por tanto concluir, que ambas técnicas, LC y GC, son en la actualidad imprescindibles y complementarias en el campo del PRA, permitiendo abarcar el análisis de un gran número de plaguicidas y de sus productos de transformación.

Cabe destacar, por otro lado, el desarrollo notable que en los últimos años han presentado las técnicas inmunológicas en el campo del PRA. Estas técnicas se basan en reacciones antígeno-anticuerpo, en las que los antígenos son los analitos de interés y los anticuerpos deben ser creados específicamente para cada compuesto o familia de compuestos. El desarrollo de una técnica de este tipo puede durar unos años, ya que deben introducirse los analitos de interés en el cuerpo de mamíferos vertebrados, como ovejas o conejos, en los que se produce una reacción inmunológica a partir de la cual se crean los correspondientes anticuerpos. Una vez estos anticuerpos son extraídos y aislados, ya se pueden utilizar para que los antígenos los reconozcan. En el caso de los plaguicidas, al tratarse de moléculas demasiado pequeñas, éstas deben acoplarse a grandes moléculas de proteínas portadoras, capaces de hacer que se desarrolle la respuesta inmunológica. Las principales ventajas de esta técnica radican en su elevada capacidad de análisis, relativamente bajo coste del material, poco tratamiento de la muestra y pequeño volumen de la misma utilizado. Existen kits comerciales útiles para la determinación de diversos plaguicidas mediante inmunoensayos (EIA), a niveles de concentración bastante bajos. Algunos de ellos,

que permiten determinar uno o varios de los herbicidas estudiados en este trabajo, se presentan a modo de ejemplo en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Kits de inmunoensayos disponibles en el mercado para algunos plaguicidas.

<i>Plaguicida</i>	<i>Comercializado</i>	<i>Rango de trabajo ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)</i>	<i>LOD ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)</i>	<i>Precisión entre lotes (%)</i>
Atrazina	J.T. Baker	0.015-1.0	0.015	7 (0.16 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
	Guildhay Antisera		0.0055	24 (0.043 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) 7 (0.24 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) 9 (0.85 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Atrazina y otras triazinas	J.T. Baker	0.05-5.0	0.046	5 (2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
	Millipore	0.1-2.0	0.1	
Carbaril	J.T. Baker	0.25-5.0	0.25	8 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Clortoluron	Millipore	6-250	6	
	Millipore	0.08-1.0	0.08	
Cianazina	J.T. Baker	0.04-3.0	0.035	10 (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Procimidona (+prometrina +propazina +simazina)	J.T. Baker	0.8-100	0.8	5 (20 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)
Diuron (y otras ureas)	Millipore	7-250	7	

Generalmente, el análisis de residuos de plaguicidas no se puede realizar de forma directa en la muestra, siendo necesarias una serie de etapas previas que se resumen a continuación:

- Toma de muestra

Esta etapa depende de la naturaleza de la muestra, que podrá ser normalmente sólida (suelos, alimentos) o acuosa. Se recomienda tomar la muestra en recipientes de vidrio para evitar que se produzca contaminación con trazas de compuestos orgánicos. Posteriormente, se lleva a cabo la extracción del plaguicida (preparación de la muestra), a no ser que la muestra tenga que ser almacenada, en cuyo caso se conserva en congelador a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$.

- Etapas de extracción/preconcentración

Los plaguicidas son extraídos de la muestra mediante disolventes más o menos polares en función de la polaridad de los compuestos estudiados. En el caso de muestras acuosas se puede recurrir a la técnica de extracción líquido-líquido (LLE) seguida de una etapa de evaporación del disolvente (preconcentración) o a la extracción en fase sólida (SPE). Actualmente se está prefiriendo la segunda técnica, debido fundamentalmente, a la posibilidad de llevar a cabo la preparación de la muestra “*in situ*”, al menor consumo de disolventes, a la posibilidad de realizar una preconcentración simultánea y a la mayor facilidad de automatización.

- Etapas de purificación (“*clean-up*”)

Dependiendo de la naturaleza de la muestra, esta etapa puede ser fundamental, ya que durante la extracción de los plaguicidas pueden coextraerse muchos otros compuestos que interfieren posteriormente en el análisis de los mismos. Se lleva a cabo, generalmente, mediante partición líquido-líquido o mediante cromatografía preparativa en columna.

- Etapa de preconcentración

A menudo, hay que incluir una etapa adicional de preconcentración debido a la necesidad de realizar cambios en el disolvente para hacerlo compatible con el sistema instrumental de análisis, o bien por la dilución realizada durante la etapa de purificación, con el fin de poder alcanzar límites de detección adecuados.

- Etapa de separación y detección

Una vez se han aislado los analitos, se tienen que separar para poder realizar una determinación cuantitativa de cada compuesto utilizando un sistema de detección adecuado, a partir del cual se traduce la señal analítica en cantidad de analito. Normalmente, se utiliza la GC o la LC con los sistemas de detección recomendables según el problema particular a resolver.

Las etapas de extracción, purificación y preconcentración constituyen lo que habitualmente se conoce como preparación de muestra que suele ser la parte más problemática del análisis y la causa de muchos errores analíticos. En muchos procedimientos descritos en bibliografía, la preparación de la muestra se lleva a cabo manualmente, resultando procedimientos muy tediosos, lentos y que conllevan mucha manipulación de muestra. Los efectos sobre la reproducibilidad y los riesgos de contaminación también son factores a tener en cuenta. Es por ello, que recientemente se ha intentado automatizar esta etapa en la medida de lo posible.

En el caso de muestras sólidas, la automatización de la etapa de extracción de los plaguicidas es muy difícil, a no ser que se utilicen instrumentos tipo “robot” muy sofisticados. En este tipo de muestras, los mayores esfuerzos se centran en la etapa de purificación, la cual supone una pre-separación de los analitos del resto de interferencias de la muestra; normalmente se lleva a cabo mediante técnicas cromatográficas de baja resolución, tales como LC preparativa en columna, SPE en cartuchos desechables o cromatografía de permeación en gel (GPC).

En el caso de muestras acuosas, el análisis de las mismas puede llevarse a cabo más fácilmente de manera automatizada. Existen en la actualidad sofisticados equipos de SPE que permiten realizar la extracción, preconcentración, y a veces, la purificación automáticamente.

En la última década se ha producido un desarrollo espectacular de las técnicas cromatográficas acopladas, en las que dos o más sistemas cromatográficos se acoplan mediante una interfase adecuada. Las ventajas fundamentales de estas técnicas son, para el caso de muestras sólidas, la automatización de las últimas etapas del análisis (purificación, concentración y determinación analítica), mientras que en muestras acuosas, se pueden llegar a desarrollar procedimientos de análisis totalmente automatizados; e incluso, en algunos casos, se puede analizar directamente la muestra acuosa sin necesidad de efectuar ningún tratamiento, tal como se verá en la parte experimental de la presente Memoria.

La incorporación de las técnicas cromatográficas acopladas al PRA ha permitido el desarrollo de métodos analíticos muy sensibles y, en algunos casos, muy selectivos, pudiendo determinarse plaguicidas a los bajos niveles de concentración legislados por la Unión Europea en aguas potables. En general, se da preferencia al desarrollo de MMRs de análisis ya que permiten determinar varios plaguicidas simultáneamente y resultan adecuados para llevar a cabo programas de control, en los que se tiene que determinar el mayor número posible de analitos en un elevado número de muestras. Sin embargo, en muchas ocasiones resulta necesario desarrollar métodos de análisis individuales (SRMs) destinados a analizar un único plaguicida incluyendo a veces a sus productos de transformación, lo cual suele ser frecuente en el caso de plaguicidas “difíciles” desde el punto de vista analítico.

En los últimos años se tiende, cada vez más, al uso de plaguicidas más polares y más fácilmente degradables con el fin de evitar los riesgos asociados al uso de plaguicidas tóxicos y no polares, como pueden ser los compuestos organoclorados y muchos de los organofosforados actuales. De este modo, está surgiendo una nueva

generación de plaguicidas -especialmente herbicidas- polares, muy solubles en agua, poco volátiles y fácilmente degradables en el medio ambiente. Sin embargo, muchos de estos compuestos y de sus TP's presentan bastante movilidad en suelos y tienen, por ello, mayores posibilidades de contaminar las aguas subterráneas.

El análisis de estos compuestos resulta muy problemático, especialmente a niveles de concentración por debajo de 1 ppb, pues su extracción en muestras acuosas es difícil y, en muchos casos, no presenta una buena respuesta frente a detectores de cromatografía convencionales. Es en este campo donde la LC tiene mayores aplicaciones, pues se trata de la técnica más adecuada para el análisis de compuestos polares, poco volátiles y térmicamente inestables.

Por otro lado, las técnicas cromatográficas acopladas basadas en cromatografía líquida, presentan, a priori, grandes posibilidades para el desarrollo de métodos rápidos, sensibles y selectivos que permitan el análisis de herbicidas polares y de sus productos de transformación.

1.4.1. Análisis de residuos de herbicidas ureicos. Antecedentes

Tras la etapa de preparación de la muestra, la determinación de los herbicidas ureicos se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante técnicas cromatográficas, GC o LC, utilizando sistemas de detección adecuados (Tekel' y Ková i ová, 1993; Liška y Slobodník, 1996). Más recientemente, con el acoplamiento de las técnicas cromatográficas a la espectrometría de masas, se han desarrollado aplicaciones en las que se aprovecha el poder de separación de las primeras y la selectividad inherente a la segunda. Cabe destacar también, el desarrollo que las técnicas de análisis inmunológico han tenido en el campo del PRA, y en particular aplicadas al análisis de esta familia de herbicidas.

Preparación de la muestra

Como es bien sabido, esta etapa del análisis es fundamental, ya que es la que suele introducir mayores errores. Las principales técnicas utilizadas en la preparación de muestra para la determinación de estos herbicidas se describen a continuación.

Extracción líquido-líquido

La LLE es una de las técnicas tradicionalmente utilizada para la extracción de plaguicidas en muestras acuosas. Cabe destacar, además, que esta técnica se utiliza frecuentemente en procedimientos multiresiduales de determinación de plaguicidas, en los que se analizan compuestos con diferentes propiedades físico-químicas. De este modo, Durand *et al.* (1992), determinaron linuron, clortoluron e isoproturon junto a herbicidas triazínicos (simazina, atrazina), clorofenoxiácidos (2,4-D, MCPA) y otros (molinato, bentazon, etc.) mediante LLE de un volumen de muestra comprendido entre 1-4 l con diclorometano (50-100 ml), evaporando posteriormente el extracto hasta sequedad separado en dos fracciones, las cuales se disolvían en acetato de etilo y metanol, respectivamente. Este procedimiento también fue aplicado por Molina *et*

al. (1995), que extrajeron 2.5 l de muestra acuosa con 2×100 ml de diclorometano, evaporando el residuo a sequedad y redisolviendo, posteriormente, en metanol.

Más recientemente, Hatrík *et al.* (1994) han llevado a cabo la determinación de tres fenilureas (monolinuron, bromoanilina y linuron) y sus respectivas anilinas (4-cloroanilina, 4-bromoanilina y 3,4-dicloroanilina) mediante LLE de 50 ml de muestra (ajustada a pH 11) con 20 ml de mezcla benzeno:acetato de etilo (1:1, v/v), con posterior secado, evaporación hasta sequedad y redisolución final en 1 ml de metanol.

Extracción en fase sólida

Esta técnica es muy utilizada en la actualidad para la preconcentración de herbicidas ureicos en muestras de agua, tanto en su modalidad “*off-line*” (fuera del sistema cromatográfico) como “*on-line*” (incorporada a la línea de cromatografía). Existen algunos métodos centrados en la determinación de herbicidas ureicos así como métodos multiresiduales de plaguicidas que incluyen la determinación de alguno de estos compuestos, en los que se ha hecho uso de diferentes fases adsorbentes como C₁₈, tanto en cartuchos como discos (Scheltt, 1991; Bagueri *et al.*, 1992; Scharf *et al.*, 1992; Balinova, 1993; Karg, 1993; Samara *et al.*, 1994; Crespo *et al.*, 1994; Chiron *et al.*, 1994; Volmer y Levsen, 1994; Hatrík, *et al.*, 1994; Moore *et al.*, 1995; Sennert *et al.*, 1995), carbono grafitizado (Carbopack B) (Di Corcia y Marchetti, 1991), rellenos poliméricos, tipo PRP-1, PLRP-S, LiChrolut EN, etc. (Slobodník *et al.*, 1993; Pichon y Hennion., 1994; Crespo *et al.*, 1994; Marcé *et al.*, 1995; Papadopoulou y Patsias, 1996; Junker-Buchheit y Witzenbacher, 1996) y, más recientemente, rellenos a base de inmunoabsorbentes (Pichon *et al.*, 1995^a ; Pichon *et al.*, 1995^b; Pichon *et al.*, 1996).

Tras la etapa de SPE, los analitos son eluidos con los disolventes adecuados pudiéndose llevar a cabo, en el caso de preconcentración “*off-line*”, alguna etapa adicional de evaporación en la que se puede incluir cambio de disolvente, de modo que sea más adecuado para la etapa posterior de análisis.

Extracción sólido-líquido aplicada a la determinación de herbicidas ureicos

Es el método más utilizado para la extracción de estos herbicidas en matrices sólidas (suelos, productos vegetales, etc.). Se ha descrito la extracción de la muestra con metanol (Luchtefeld, 1987; Lagana *et al.*, 1994) y con diclorometano (Martínez Galera *et al.*, 1995), entre otros disolventes. Posteriormente, se llevan a cabo una o varias etapas de purificación del extracto mediante partición con hexano y diclorometano seguida de una o varias etapas de purificación en columna tipo Florisil (Luchtefeld, 1987) o, más recientemente, mediante SPE en cartuchos C₁₈ (Lagana *et al.*, 1994; Martínez Galera *et al.*, 1995) y Carboxypack B (Lagana *et al.*, 1994). Después de la etapa de purificación se suele llevar a cabo la evaporación de los extractos hasta volúmenes conocidos, utilizándose alícuotas de los mismos para la determinación analítica.

Determinación analítica

Determinación de herbicidas ureicos por GC

La determinación directa de estos herbicidas por GC presenta dificultades debido a la inestabilidad térmica de los mismos, que se descomponen para generar isocianatos y aminas alifáticas. La causa de esta ruptura ha sido achacada al hidrógeno del grupo amida, ya que la sustitución del mismo por un grupo metilo producía compuestos térmicamente estables (Büchert y Lokke, 1975). Aunque existen aplicaciones en las que se describe el análisis directo de fenilureas por GC (Deleu y Copin, 1980), posteriormente se ha indicado que probablemente se estuvieran determinando sus productos de pirólisis, los isocianatos correspondientes (Grob, 1981). Este autor (Grob, 1981) evaluó las posibilidades y limitaciones de la GC para el análisis de herbicidas fenilureas, comparando varias columnas y optimizando el análisis mediante esta técnica, diferenciando entre varios grupos de ureas según fueran o no más fáciles de determinar por GC. Los compuestos con un grupo metoxi en el átomo de nitrógeno (linuron, monolinuron) resultaron más estables y fáciles de

analizar. Por otra parte, herbicidas como el diuron, metoxuron y neburon fueron imposibles de determinar por GC en condiciones normales de trabajo.

Las dificultades que conlleva la determinación directa de esta familia de herbicidas por GC se solventa mediante la adición de etapas previas de derivatización. Se ha descrito, por ejemplo, la hidrólisis catalítica en sílica gel de herbicidas ureicos hasta la obtención de sus anilinas, que, posteriormente, se determinan por GC-ECD tras una etapa de derivatización con anhídrido heptafluorobutírico (HFBA) (De Kok *et al.*, 1984). Esta técnica permite determinar todas las anilinas de la muestra, incluidos los productos de transformación que pudieran estar presentes. Posteriormente, se ha llevado a cabo la derivatización directa de estos compuestos con HFBA, (Brinkman *et al.*, 1984; Karg, 1993) seguida del análisis por GC-ECD o GC-MS. Stan y Klaffenbach (1991) propusieron una derivatización con anhídrido acético, calentando 2 horas a 150 °C, con posterior determinación por GC-MS.

Determinación de herbicidas ureicos por LC

Para resolver los problemas derivados de la falta de estabilidad térmica de estos compuestos, es bien conocido que la LC es una técnica alternativa ya que no requiere del uso de altas temperaturas, pues la separación de los plaguicidas, una vez introducidos en el sistema cromatográfico, se lleva a cabo mediante una fase móvil adecuada. Los herbicidas ureicos han sido muy analizados mediante esta técnica en las últimas dos décadas, habiéndose descrito su separación tanto en columnas de fase normal como de fase inversa (Walters *et al.*, 1984; Schussler, 1989). La última opción ha sido, sin embargo, la más utilizada al permitir la utilización de fases móviles compatibles con muestras acuosas.

Respecto a los sistemas de detección, aunque estos compuestos pueden determinarse fácilmente aprovechando su absorbancia en el UV, se han desarrollado, sin embargo, aplicaciones en las que se conectan en serie más de un detector de manera que se incremente la selectividad del método. Schussler (1989) propuso la

utilización de un detector UV conectado en serie a uno electroquímico para la determinación de isoproturon, clortoluron y linuron después de llevar a cabo una LLE de agua potable y superficial. Los analitos fotolábiles eran detectados por el detector de fotoconductividad una vez abandonaban la celda del detector UV. Para trabajar de este modo se requería una fase móvil suficientemente polar que facilitara la formación de iones libres y la transferencia de carga eficiente en el proceso de fotoconductividad. Más recientemente, Hatrík *et al.* (1994) han llevado a cabo la determinación de algunas fenilureas y sus posibles productos de transformación, en muestras de agua, mediante LC con detección UV y electroquímica.

Zegers *et al.* (1995) intentaron mejorar la selectividad y sensibilidad de los métodos de análisis acoplando un detector típico de GC (ECD) a una columna de LC (25 cm × 0.32 mm d.i.) utilizando una interfase adecuada y una mezcla MeOH:H₂O (1:1) como fase móvil. Estos autores introducían etapas previas de derivatización química para incrementar la respuesta del detector.

También se ha recurrido a la modificación química de los analitos mediante reacciones de derivatización con el objetivo de obtener compuestos que generen mayor respuesta utilizando detectores convencionales en LC. Lantos *et al.* (1984) describieron el análisis de metoxuron y sus productos de degradación en muestras de agua mediante una etapa de hidrólisis y posterior derivatización pre-columna con cloruro de dansilo utilizando LC con FD. Otro método ha consistido en la introducción de una reacción de fotodegradación de los analitos post-columna y la posterior reacción con o-ftalaldehído (OPA) en presencia de mercaptoetanol (Luchtefeld, 1987) alcanzándose límites de detección entre 0.001-0.002 mg·Kg⁻¹, para seis fenilureas en ocho cultivos diferentes. La selectividad y sensibilidad inherente a la detección fluorescente resulta especialmente interesante en el caso de muestras complejas (alimentos, suelos, etc.) en las que se pueden coextraer muchas interferencias junto con los analitos.

También se han realizado intentos en el análisis de herbicidas ureicos aprovechando las ventajas complementarias de la GC y de la LC. De Kok *et al.* (1984) realizaron una primera separación de los analitos usando LC en fase normal y derivatizaron las fracciones resultantes con HFBA para poder llevar a cabo la detección por GC-ECD.

Sin embargo, más recientemente, el desarrollo de los modernos detectores UV y de barridos de diodos (DAD) ha permitido mejorar la sensibilidad de los procedimientos analíticos así como la selectividad de los mismos, al disponer de más información espectral (en el caso del DAD). Así, se han descrito numerosas aplicaciones, bastante recientes, basadas en LC-UV o LC-DAD (Di Corcia y Marchetti, 1991; Durand *et al.*, 1992; Balinova, 1993; Lagana *et al.*, 1994; Samara *et al.*, 1994; Gennaro *et al.*, 1995; Pichon *et al.*, 1995^a; Pichon *et al.*, 1995^b; Pichon *et al.*, 1996; etc.).

Además, con el desarrollo de interfases adecuadas para el acoplamiento LC-MS, se han descrito varios procedimientos que permiten la determinación selectiva de algunos de estos herbicidas, normalmente junto a otros compuestos, en métodos multiresiduales de análisis (Mattina, 1991; Bagueri *et al.*, 1992; Volmer y Levsen, 1994; Chiron *et al.*, 1994; Marcé *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 1995; Moore *et al.*, 1995; Sennert *et al.*, 1995; etc.).

Determinación de herbicidas ureicos mediante el uso de técnicas inmunológicas

En la actualidad ya existen algunos *kits* comerciales aplicables al campo del PRA (**Tabla 11**), que permiten la determinación de algunos herbicidas ureicos a niveles muy bajos de concentración (Niessner, 1993; Watts y Hegarty, 1995). Una aplicación de esta técnica ha sido el desarrollo de rellenos basados en inmunoabsorbentes que pueden utilizarse para SPE tanto “*off-line*” como “*on-line*”. Actualmente, ya se han descrito algunas aplicaciones en las que se ha llevado a cabo SPE “*on-line*” seguido de LC-DAD; para ello se utilizaron anticuerpos creados contra el clortoluron y el isoproturon que consiguieron retener 15 herbicidas ureicos,

los cuales posteriormente fueron separados por una columna analítica convencional (Pichon *et al.*, 1995^a; Pichon *et al.*, 1995^b; [Error!Vínculo no válido.](#)1996).

Atendiendo al interés que en la actualidad presenta el análisis de muestras acuosas, en la **Tabla 12** se resumen las características más relevantes, en cuanto a preparación de la muestra, técnica analítica empleada, así como parámetros de recuperación, de algunos métodos recientemente propuestos para la determinación de herbicidas ureicos o bien de MRMs que incluyen algún herbicida perteneciente a esta familia.

Se puede concluir que en el caso de muestras acuosas, al igual que en el resto de matrices, la técnica analítica preferida para el análisis de esta familia de compuestos ha sido la LC usando detección ultravioleta o por barrido de diodos y, en los últimos años, acoplada a la espectrometría de masas.

Métodos oficiales de análisis de herbicidas ureicos en aguas

A continuación, se presenta un método oficial de análisis descrito para la determinación de herbicidas ureicos (Barceló, 1993).

Método de análisis SCA

El método oficial propuesto en el Reino Unido, método SCA, para analizar carbamatos y ureas en aguas potables, se basa en una LLE de la muestra previamente acidificada (pH 3) con diclorometano. Después de evaporar y redissolver en metanol y acetonitrilo (500 µl), se inyectan 20 µl del extracto en el sistema de LC con detección UV.

Tabla 12. Determinación de residuos de herbicidas ureicos en muestras de agua.

<i>Analitos</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Método de detección</i>	<i>Datos de recuperación</i>	<i>Referencia</i>
Herbicidas fenilureas	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1-2 l de muestra en cartuchos GCB (Carbopack B), elución con 6 ml Cl ₂ CH ₂ : MeOH, purificación en cartucho intercambiador catiónico para eliminar las posibles anilinas	LC-UV	Fortifican a 0.03 y 3 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones satisfactorias, CV 0.7-8.9%	Di Corcia <i>et al.</i> , 1991
MRM para determinar herbicidas (linuron, clortoluron, isoproturon)	1-4 l muestra extraídos con 50-100 ml Cl ₂ CH ₂ , evaporación a sequedad, redisolución en MeOH	LC-DAD	Fortifican a 2.5 µg·l ⁻¹ ; Recuperaciones cuantitativas de las ureas estudiadas, CV 7-8%	Durand <i>et al.</i> , 1992
Determinación de 11 fenilureas	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra en cartuchos C ₁₈ , elución con 2 ml de acetona, evaporación a sequedad, redisolución en 1 ml de Cl ₂ CH ₂ . Adición de 100 µl de HFBA y 100 µl de piridina (catalizador), espera de 2 horas, eliminación del exceso de reactivo derivatizante mediante LC en silica gel, elución con 1 ml de Cl ₂ CH ₂	GC-MS	Fortifica a 0.5 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 60-100 %	Karg, 1993
MRM para la determinación de herbicidas (metoxuron, monolinuron, metobromuron, diuron, linuron)	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra ajustada a pH 2 en cartucho C ₁₈ , tras adicionar a la misma 10 g de NaCl. Elución con MeOH, evaporación a sequedad y redisolución en 0.25 ml de MeOH y 0.5 ml de tampón AcH:NaAc (pH 3.8)	LC-UV	Fortifica a 0.1 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 79-92%, CV 0.3-9.5%	Balinova, 1993
MRM para la determinación de herbicidas (metoxuron, diuron, linuron)	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra, en cartuchos C ₁₈ , elución con MeOH, evaporación hasta 0.5 ml y ajuste de volumen a 1 ml después de añadir 0.25 ml de tampón (KH ₂ PO ₄ , 0.001M pH 7)	LC-DAD	Fortifican 0.7-1.0 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 94-83%	Samara <i>et al.</i> , 1994

Tabla 12. Determinación de residuos de herbicidas ureicos en muestras de agua (continuación).

<i>Analitos</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Método de detección</i>	<i>Datos de recuperación</i>	<i>Referencia</i>
3 fenilureas (nonolinuron, metobromuron y linuron) y sus respectivas anilinas	LLE (ver texto) SPE “ <i>on-line</i> ” de 50 ml de muestra en cartucho C ₁₈ , elución con la fase móvil.	LC-UV	LLE: fortifican 10-50µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 60-94%, CV 3-10% SPE: fortifican 0.1-10µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 98-100%, CV 0.1-0.6%	Hatrík <i>et al.</i> , 1994
MRM para la determinación de plaguicidas incluyendo 11 herbicidas fenilureas	SPE “ <i>on-line</i> ” de 50 ml de muestra en cartucho C ₁₈ , elución con gradiente MeOH:H ₂ O	LC-TSP- MS	Fortifican, 0.2 y 2.4 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 13-106 %, CV 1-19 %.	Sennert <i>et al.</i> , 1995
MRM para la determinación de plaguicidas (monuron, fluometuron, diuron, linuron)	SPE “ <i>on-line</i> ” de 100 ml de muestra en cartucho PLRP-S. Elución con mezcla MeOH: NH ₄ Ac pH 5.0 (30:70, v/v)	LC-DAD- PB-MS	Fortifican a 1 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 82-92%, CV 2-5%	Marcé <i>et al.</i> , 1995
15 herbicidas ureicos	SPE “ <i>on-line</i> ” de 50 ml de muestra en cartuchos reellenos con antiisoproturon y anticlortoluron, elución con gradiente CH ₃ CN: tampón fosfato (pH 7)	LC-DAD	Fortifican a 0.5 µg·l ⁻¹ ; Antiisoproturon: recuperaciones hasta 98% Anticlortoluron: recuperaciones hasta 102 %	Pichon <i>et al.</i> , 1996
MRM para la determinación de plaguicidas incluyendo 8 herbicidas ureicos	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra utilizando cartuchos Lichrolut (RP-18 y EN), elución con 2 × 3 ml de MeOH:EtAc (1:1, v/v), evaporación y redisolución en 1 ml de CH ₃ CN: NH ₄ Ac (20:80, v/v), filtración con una membrana Anotop.	LC-UV	Fortifican a 0.2 µg·l ⁻¹ ; recuperaciones 96-121%, CV 0.7-3.8%	Junker-Buchheit <i>et al.</i> , 1996

1.4.2. Análisis de residuos de herbicidas uracílicos. Antecedentes

No existe apenas bibliografía específica dedicada a esta familia de compuestos, sino que normalmente se incluyen algunos herbicidas (bromacilo, lenacilo o terbacilo) en métodos multiresiduales de análisis en los que se hace uso tanto de GC como de LC.

Análisis por GC

Tuinstra *et al.* (1991) desarrollaron un método multiresidual y multimatriz en el que se analizaban 23 plaguicidas (entre ellos bromacilo) en productos agrícolas, mediante GC con detección por MS. Tras la etapa de extracción con acetona, llevaron a cabo una LLE con hexano y evaporaron hasta 5 ml, tras añadir 5 ml de mezcla ciclohexano:acetona purificaron por GPC seleccionando la fracción que contenía a los plaguicidas, la cual se introdujo en el sistema cromatográfico.

Stan y Heil (1991) desarrollaron un MRM para la determinación de plaguicidas (incluyendo bromacilo) en alimentos; tras extracción y purificación por partición líquido-líquido y GPC, los analitos se determinaron mediante GC con detectores ECD, NPD y FPD.

Wylie y Oguchi (1990) han propuesto un método para analizar 20 herbicidas, entre ellos terbacilo y bromacilo, por GC y detección mediante el uso de un plasma de helio y espectrometría de emisión atómica (GC-AED).

Se ha detectado bromacilo en programas de control de contaminación en muestras de agua superficial de la Comunidad Valenciana (Hernández *et al.*, 1996), usando para ello LLE de 500 ml de muestra con 2×50 ml de diclorometano; tras evaporación y cambio de disolvente a hexano, llegando a un volumen final de 0.5 ml, la determinación se ha llevado a cabo por GC-MSD.

Análisis por LC

También se han descrito aplicaciones en las que se hace uso de LC, ya que esta técnica permite la determinación de algunos de estos compuestos junto a otros herbicidas de aplicación conjunta y que, debido a su termolabilidad, no pueden determinarse directamente por GC. Este es el caso del bromacilo y diuron, que fueron determinados por Goewie y Hogendoorn (1987) en muestras de agua mediante cromatografía líquida con columnas acopladas, tras una etapa de LLE con diclorometano, evaporación y disolución final en metanol, proponiendo un límite de determinación de $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

También se han desarrollado métodos multiresiduales para la determinación de plaguicidas (incluyendo algún herbicida uracílico) basados en SPE tanto “*on-line*” como “*off-line*” seguidos de LC con detección UV, DAD, o por MS. Se han descrito diferentes métodos, como el propuesto por Di Corcia y Marchetti (1991), que permite la determinación de bromacilo junto a varios herbicidas fenoxiácidos, fenilureas, triazinas, etc. en muestras de agua tras una etapa previa de preconcentración de 2 l de muestra mediante SPE en cartuchos Carboxen B, y posterior análisis por LC con detección UV, proponiendo límites de detección para el bromacilo de $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Slobokník *et al.* (1993) desarrollaron un método multiresidual para la determinación de plaguicidas (incluyendo bromacilo) mediante preconcentración “*on-line*” de 100 ml de muestra acuosa en cartuchos poliméricos (PLRP-S). Volmer y Levsen (1994) han propuesto un método para determinar 95 plaguicidas, incluyendo bromacilo, en muestras de agua mediante preconcentración “*off-line*” de 1 l de muestra en cartuchos C₁₈.

Se han descrito también métodos de análisis individual (SRMs) para la determinación de bromacilo ya que, aunque no se trata de un plaguicida especialmente conflictivo desde el punto de vista de su análisis, sí que lo es desde el punto de vista de la contaminación, siendo muy útiles este tipo de métodos a la hora de realizar controles rápidos en áreas conflictivas. Un SRM para la determinación de

bromacilo en aguas y suelos ha sido descrito por James y Lauren (1995) y se basa en la preconcentración de 1 l de muestra acuosa en cartuchos o discos C₁₈ previamente a la determinación por LC con detección UV, proponiéndose límites de detección menores de 0.05 µg·l⁻¹ en el caso de aguas.

1.4.3. Análisis de residuos de herbicidas triazínicos. Antecedentes

El amplio uso que se hace de estos herbicidas, así como la persistencia constatada de algunos de ellos, como simazina y atrazina, han hecho que se trate de una de las familias de herbicidas más estudiadas, para la cual se han desarrollado una gran variedad de métodos de análisis. Algunos de ellos, de carácter multiresidual, son aplicables al análisis de residuos de los plaguicidas originales (“*parent compounds*”), y otros están enfocados al análisis de residuos de triazinas y algunos de sus productos de transformación.

Preparación de la muestra

Extracción líquido-líquido

Esta técnica es utilizada en el método propuesto por la agencia de protección medioambiental americana (EPA) para la determinación de plaguicidas que contienen átomos de nitrógeno y/o de fósforo (Barceló, 1993) y que se comenta más adelante.

La extracción de triazinas se lleva normalmente a cabo mediante agitación de un volumen conocido, y normalmente grande, de muestra (0.5-1 l) con disolventes orgánicos adecuados, tales como diclorometano (Durand *et al.*, 1992; Hernández *et al.*, 1996), que posteriormente es evaporado y concentrado hasta unos pocos ml. Es usual llevar a cabo un cambio de disolvente a otro que sea más compatible con el sistema utilizado para la posterior separación y determinación.

Se ha descrito la preconcentración de varios herbicidas triazínicos mediante LLE en un extractor de grandes volúmenes Goulden, en el que se procesaron

volúmenes de muestra comprendidos entre 10-120 l (Foster *et al.*, 1993), llevándose posteriormente a cabo una determinación por GC-MSD. Cabe destacar, sin embargo, que las recuperaciones variaron entre 34-89 % con desviaciones estándar entre (9-56 %). Por otra parte, también se han desarrollado aplicaciones basadas en micro extracción líquido-líquido (MLLE), en la que se hace uso de pequeños volúmenes, tanto de muestra como de disolventes orgánicos (Potter *et al.*, 1991; Beltran, *et al.*, 1997^a; Beltran *et al.*, 1997^b). Uno de los principales inconvenientes de la MLLE radica en que el tratamiento de poca cantidad de muestra supone una disminución notable de sensibilidad, comparado con la LLE convencional. Este problema se ha resuelto con la inyección de grandes volúmenes de extracto, de hasta 200 µl, en el sistema de GC-NPD, tal y como describen Beltran *et al.* (1997^a, 1997^b).

Extracción en fase sólida

La preconcentración de herbicidas triazínicos mediante SPE, tanto en discos como en cartuchos, se ha generalizado en los últimos años. Se trata de una técnica muy versátil y flexible, que puede ser utilizada en su modalidad “*off-line*” o en modo “*on-line*”. En ambas modalidades, una de las fases adsorbentes más utilizadas ha sido la C₁₈ (Scharf *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1993; Aga y Thurman, 1993; Vitali *et al.*, 1994; Nelieu *et al.*, 1994; Wells *et al.*, 1994; Zahradníková *et al.*, 1994; Psathaki *et al.*, 1994; Samara *et al.*, 1994; Färber *et al.*, 1994; Sabik *et al.*, 1995; Prosen *et al.*, 1995; Saez *et al.*, 1996; etc.). Además de la anterior fase estacionaria, se han usado también rellenos poliméricos, tipo PRP-1 y PLRP-S, debido a su mayor capacidad de retención, fundamentalmente en aplicaciones que hacen uso de preconcentración “*on-line*” (Slobodník *et al.*, 1993; Pichon *et al.*, 1994; Prosen *et al.*, 1995).

La SPE utilizando rellenos convencionales (C₁₈ o poliméricos) permite la preconcentración de herbicidas triazínicos en muestras acuosas; sin embargo, presenta problemas en el caso de productos de degradación muy polares, para los cuales se obtienen bajas recuperaciones. Cassada *et al.* (1994) realizaron experiencias

preconcentrando “*off-line*” 200, 400 y 800 ml de muestra acuosa en cartuchos C₁₈ y obtuvieron recuperaciones de alrededor del 100 % en todos los casos para la atrazina, mientras que para el DEA variaron del 89 % al 32 % y, en el caso del DIA, disminuyeron desde el 41 hasta el 13 %. Este efecto también fue constatado por Chiron *et al.* (1994), que investigaron el volumen de ruptura y recuperación de simazina, atrazina, DIA y DEA en una muestra acuosa fortificada a 0.3 ng·l⁻¹, tras preconcentrar “*on-line*” 50 y 150 ml tanto en discos Empore C₁₈ como en precolumnas PRP-1. Los volúmenes de ruptura fueron inferiores a 15 ml para DIA en ambos casos, y alrededor de 70 ml para DEA. En el caso de atrazina y simazina, los volúmenes estuvieron comprendidos entre 150-300 ml. La preconcentración de grandes volúmenes de muestra supuso, por lo tanto, una reducción significativa en la recuperación de DIA.

Para subsanar las bajas recuperaciones obtenidas en compuestos muy polares se han utilizado recientemente fases poliméricas con mayor superficie específica tales como el Lichrolut EN o el SDB-1 (Önnerfjord *et al.*, 1996; Guenu y Hennion, 1996), que retienen, en contrapartida, gran número de interferencias de matriz también muy polares, requiriéndose entonces el uso de detectores muy selectivos. Otros rellenos con elevada capacidad de retención son los derivados de carbono grafitizado PGC, GCB (Di Corcia *et al.*, 1993; Cai *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 1995; Berg *et al.*, 1995; Pichon *et al.*, 1995^c; Di Corcia *et al.*, 1997). Finalmente, también se ha recurrido a rellenos más selectivos, capaces de retener sólo los analitos de interés, tales como intercambiadores catiónicos (Coquart y Hennion, 1991; Sacchero *et al.*, 1994; Lerch y Donald, 1994; Sabik *et al.*, 1995) o inmunoabsorbentes (Pichon *et al.*, 1995^b; Pichon *et al.*, 1996)

Extracción sólido-líquido

Es el método más utilizado para la extracción de triazinas en suelos y productos vegetales. Consiste en la agitación de la muestra con un disolvente orgánico, como metanol (Karlagnis *et al.*, 1991; Pardue, 1995), diclorometano

(Cabras *et al.*, 1989), acetato de etilo (Holland *et al.*, 1995), acetona (Schewes *et al.*, 1993), o mezclas de disolventes como agua:acetonitrilo (Frank *et al.*, 1991), agua:metanol (Mills y Thurnan, 1992), diclorometano:acetato de etilo (Durand *et al.*, 1989). Posteriormente, se llevan a cabo una o varias etapas de purificación mediante partición líquido-líquido (Holland *et al.*, 1995), o en columna con rellenos tipo alúmina (Karlagnis *et al.*, 1991), Florisil (Durand *et al.*, 1989) o silica gel (Durand *et al.*, 1989; Schewes *et al.*, 1993). Finalmente, se procede al análisis, normalmente mediante cromatografía de gases.

Extracción con fluidos supercríticos

La extracción mediante fluidos supercríticos es una técnica de gran potencial para la extracción de analitos de matrices sólidas. Una de las principales ventajas de esta técnica radica en el uso de CO₂, que supone un coste relativamente bajo, disponibilidad de gas de elevada pureza, baja toxicidad y alta compatibilidad con los sistemas de detección. Además, cabe destacar la alta selectividad de la técnica en la extracción de los analitos en presencia de interferentes, que se consigue por la baja tensión superficial, baja viscosidad y la fuerza de extracción variable de los fluidos supercríticos.

El procedimiento de extracción de los analitos es bastante complejo y el elevado número de variables a considerar hace que, a menudo, se requieran numerosos experimentos para la optimización del mismo, resultando muy útil el empleo de técnicas quimiométricas. La extracción con fluidos supercríticos se ha utilizado con éxito para la determinación de herbicidas triazínicos en sedimentos y suelos (Cassada *et al.*, 1994; Steinheimer *et al.*, 1994; Van der Velde *et al.*, 1994).

Extracción con microondas

El uso de la extracción asistida por microondas en el campo del análisis medioambiental es una alternativa, cada vez más utilizada en los últimos años. En la actualidad, ya existen algunas aplicaciones dedicadas al análisis de residuos de atrazina y sus productos de degradación en suelos (Steinheimer, 1993; Molins *et al.*,

1996). Las principales ventajas de este procedimiento de extracción son: simplicidad de operación, reducción en el uso de disolventes, elevada velocidad de extracción y buenas recuperaciones. Todo ello hace pensar que el uso de esta técnica se incrementará en los próximos años dentro del campo del análisis de contaminantes orgánicos.

Microextracción en fase sólida (SPME)

La aplicación de la SPME a la determinación de herbicidas triazínicos en muestras de agua se ha descrito recientemente (Eisert y Levsen, 1995). En este trabajo, los herbicidas son adsorbidos en fibras de sílica recubiertas con polidimetilsiloxano. Después de un tiempo adecuado de adsorción, la jeringa (que contiene la fibra) es introducida en el puerto de inyección del GC, llevándose a cabo una rápida desorción de las triazinas que se separan en la columna cromatográfica y se detectan mediante NPD. Más recientemente, Hernández *et al.* (1998) han llevado a cabo la de determinación de 5 herbicidas triazínicos (atrazina, simazina, terbutilazina, terbumetona y terbutrina) junto a molinato y bromacilo, en aguas y suelos. Se lleva a cabo un estudio de diferentes fibras, haciéndose hincapié en las ventajas y limitaciones de cada una de ellas. Mediante esta técnica se ha conseguido determinar herbicidas triazínicos en diferentes muestras de aguas fortificadas a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Determinación analítica

Una vez extraídos los analitos de la matriz, debe llevarse a cabo el análisis de los mismos mediante la técnica adecuada. A este respecto se destaca el papel de las técnicas cromatográficas, tanto GC como LC, que han sido ampliamente empleadas para la determinación de herbicidas triazínicos.

Determinación por GC

Debido a la polaridad media de estos herbicidas así como a su suficiente volatilidad, su separación y análisis mediante GC no supone ningún problema, ya que pueden ser fácilmente cromatografiados sin necesidad de etapas previas de

derivatización, presentando, además, buena respuesta con el NPD debido a los grupos N de sus moléculas. La elevada sensibilidad y selectividad que presentan las triazinas justifica que este detector haya sido el preferido y el más tradicionalmente utilizado (Psathaki *et al.*, 1994; Sabik *et al.*, 1995; Eisert y Levsen, 1995; Beltran, *et al.*, 1997^a; Beltran *et al.*, 1997^b). También se han descrito algunas aplicaciones basadas en GC-ECD; sin embargo, suele tratarse de procedimientos multiresiduales en los que otros plaguicidas organoclorados se analizan junto a las triazinas (Mangani *et al.*, 1988; Scharf *et al.*, 1992; Wells *et al.*, 1994).

Cabe destacar además, el desarrollo que en la última década ha tenido el acoplamiento GC-MS, con la introducción de modernos detectores basados en cuadrupolos, triples cuadrupolos y trampas iónicas, los cuales resultan tan sensibles como los detectores convencionales de GC; además de aportar información estructural de la molécula, lo cual los convierte en la herramienta más fiable para la confirmación de muestras positivas. La GC-MS ha sido utilizada para confirmar triazinas, después del análisis con NPD (Durand y Barceló, 1993). Sin embargo, también se han descrito aplicaciones en las que se utiliza únicamente el detector de masas (Cai *et al.*, 1993; Meyer *et al.*, 1993; Psathaki *et al.*, 1994; Hernández *et al.*, 1998).

La GC resulta muy útil para la determinación de triazinas, aunque presenta serias limitaciones cuando se aplica a los derivados hidroxilados de las mismas, precisándose entonces etapas previas de derivatización, como describe Färber *et al.* (1994) que determinan 6 hidrox-triazinas mediante GC-MS derivatizando con diazometano.

Determinación por LC

A pesar de la posibilidad de determinar los herbicidas triazínicos directamente por GC, el uso de la LC se ha generalizado en los últimos años, debido principalmente a que se trata de compuestos que absorben intensamente en la región UV y que, por lo tanto, son susceptibles de ser detectados fácilmente por el detector

más generalizado en LC, permitiendo además la determinación simultánea de estos herbicidas junto a sus principales productos de degradación, ya se trate de compuestos desalquilados o hidroxilados (Berg *et al.*, 1995; Saez *et al.*, 1996; Önnérkjord *et al.*, 1996). También se han descrito aplicaciones en las que se analizan sólo los derivados hidroxilados de la atrazina en muestras de aguas mediante LC-UV (Lerch y Donald, 1994).

Cabe destacar, además, que los límites de detección de los métodos propuestos para la determinación de residuos de triazinas en el caso de muestras acuosas vienen determinados fundamentalmente por las etapas de extracción y preconcentración de la muestra (Tekel' y Kova i ová 1993). De este modo, cuando se utiliza SPE en la etapa de preparación, es normal la elución con disolventes compatibles con el sistema LC, lo cual permite que el acoplamiento “*on-line*” SPE-LC sea muy sencillo y que todo el tratamiento de la muestra se pueda llevar a cabo fácilmente de manera completamente automatizada. Se han descrito aplicaciones en las que se determinan herbicidas triazínicos mediante esta técnica (Pichon y Hennion, 1994; Önnérkjord *et al.*, 1996).

En los últimos años, se han desarrollado diferentes tipos de interfases que permiten el acoplamiento LC-MS, habiéndose potenciado el uso de esta técnica tanto para la confirmación de plaguicidas como para la determinación analítica, aunque normalmente se trata de MRMs que suelen incluir algunas triazinas (Bagueri *et al.*, 1993; Sennert *et al.*, 1995).

Determinación por técnicas inmunológicas

Existen kits comerciales que permiten la determinación de herbicidas triazínicos mediante reacciones antígeno-anticuerpo (**Tabla 11**). Se han realizado experiencias de validación de estas técnicas aplicadas a la determinación de s-triazinas comparando con GC y LC, habiéndose concluido que los inmunoensayos ofrecen similares parámetros de reproducibilidad y límites de detección comparables (Niessner, 1993).

Stangl *et al.* (1995) comprobaron que la adición de tensioactivos disminuye el efecto de la reactividad cruzada para la determinación de la atrazina, mejorando la selectividad del método.

También se ha aprovechado el potencial de las reacciones antígeno-anticuerpo junto con el de la técnica de SPE “*on-line*”, habiéndose desarrollado fases adsorbentes en las que se fijan anticuerpos capaces de retener a determinados herbicidas, así como a otros relacionados, aprovechando la reactividad cruzada entre compuestos con estructuras químicas similares. Thomas *et al.* (1994) y Pichon *et al.* (1995^b) hicieron uso de la antiatrazina para retener a este herbicida y a sus principales productos de transformación (DIA, DEA, HA). Recientemente, Pichon *et al.* (1996) han usado la antiatrazina y la antisimazina para conseguir la retención de varios herbicidas triazínicos, así como algunos productos de transformación.

En la **Tabla 13** se muestran algunos de los procedimientos analíticos, desarrollados recientemente, para la determinación de triazinas en muestras de agua, haciendo hincapié en la etapa de preparación de muestra e indicando las técnicas analíticas utilizadas.

Métodos oficiales de análisis de triazinas

Métodos EPA

A continuación, se describen los métodos oficiales de análisis propuestos por la EPA para la determinación de plaguicidas en aguas potables, en los cuales se incluyen algunos herbicidas triazínicos (Barceló, 1993; Barceló y Hennion, 1997).

- *Método EPA 505: Análisis de plaguicidas organoclorados y PCBs en aguas por microextracción y GC*

Las triazinas determinadas son atrazina y simazina. El procedimiento experimental consiste en la extracción de 5 ml de muestra acuosa, saturada con cloruro sódico, con 2 ml de hexano. Finalmente, 1-2 μl del extracto son introducidos en el sistema cromatográfico. La determinación se lleva a cabo por GC-ECD y la confirmación mediante el uso de una segunda columna capilar o por GC-MS. Los límites de detección mínimos (MDLs) son de 2.4 y 6.8 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, para atrazina y simazina, respectivamente.

- *Método EPA 507: Determinación de plaguicidas que contienen átomos de N y P en aguas mediante GC-NPD.*

Se trata de un método multiresidual que permite la determinación de 46 plaguicidas. El procedimiento experimental consiste en la extracción de 1 l de agua tamponada, a la que se le añade trifenilfosfato como patrón interno y 1,3-dimetil-2-nitrobenceno como “*surrogate*”, con diclorometano. Tras una etapa posterior de concentración mediante evaporación, se lleva a cabo un cambio de disolvente a metil terbutil éter (MTBE) y se concentra de nuevo. Finalmente, una alícuota de 2 μl del extracto es introducida en el sistema de GC-NPD. Los límites de detección de las triazinas estudiadas son 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (atrazina y simazina) y 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (prometrina y terbutrina).

- *Método EPA 525: Determinación de compuestos orgánicos en agua potable mediante SPE y GC-MS.*

La preparación de la muestra se basa en una etapa de SPE en discos Empore o cartuchos C₁₈ de 1 litro de muestra. Posteriormente, se lleva a cabo elución con diclorometano, llevando el extracto a un volumen final comprendido entre 0.5-1 ml. Los límites de detección obtenidos para las triazinas estudiadas son 0.14 µg·l⁻¹ (atrazina) y 0.12 µg·l⁻¹ (simazina).

Método de análisis SCA

El método oficial propuesto en el Reino Unido, método SCA, para analizar herbicidas triazínicos en aguas potables, consiste en una extracción de la muestra de agua (previamente alcalinizada con amoníaco) en diclorometano (100 y 50 ml), seguida de evaporación del extracto final y disolución en 2 ml de metanol. 5 µl del extracto se inyectan en el sistema de GC-NPD. Se han estimado límites de detección de 0.015 µg·l⁻¹ para atrazina, simazina, prometrina, propazina y terbutrina.

1.4.4. Análisis de residuos de herbicidas fenilcarbamatos. Antecedentes

Cabe destacar que de todos los procedimientos analíticos disponibles para la determinación de residuos de plaguicidas carbámicos, incluyendo herbicidas, insecticidas, acaricidas y fungicidas, sólo una pequeña proporción de los mismos está dedicada al análisis de herbicidas fenilcarbamatos.

Los herbicidas fenilcarbamatos más usados en la actualidad son carbetamida, fenmedifam, desmedifam, profam y clorprofam.

Análisis de herbicidas fenilcarbamatos mediante GC

La determinación de estos compuestos por GC es problemática requiriéndose etapas previas de derivatización. Se ha descrito la hidrólisis alcalina de algunos de estos compuestos y la posterior determinación de las anilinas generadas por GC-ECD (Dornseiffen y Verwaal, 1979). Este procedimiento se ha aplicado para la determinación de residuos de estos compuestos en diferentes cultivos, habiéndose conseguido límites de detección de $0.01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Borek *et al.* (1986) han descrito la determinación de fenmedifam en espinacas, mediante hidrólisis alcalina, generando m-toluidina, que se determina sin necesidad de derivatización por GC con detector de ionización de llama (FID), obteniéndose límites de detección de $0.03 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Más recientemente, Stan y Klaffenbach (1991) han propuesto un método que permite la determinación de carbamatos, incluyendo fenmedifam, y herbicidas ureicos mediante GC-MSD después de derivatizar con anhídrido acético. Sin embargo, cabe destacar que aunque se presentan cromatogramas de extractos de verduras fortificados, faltan experiencias de validación del procedimiento.

Análisis de herbicidas fenilcarbamatos mediante LC

El análisis de estos herbicidas por LC parece, en principio, más adecuado al tratarse de compuestos que se descomponen normalmente a las altas temperaturas usadas en cromatografía de gases.

Tatarkovi ová (1990) describe la determinación de residuos de fenmedifam y desmedifam en muestras de agua mediante LC-UV, mientras que Ghebbioni y Trevisan (1992) determinan fenmedifam en suelos mediante LC-DAD. Otros trabajos describen MMRs en muestras acuosas, que incluyen algunos fenilcarbamatos. Las muestras acuosas son inicialmente preconcentradas mediante SPE en modo “*off-line*” con fases adsorbentes tipo C₁₈ (Volmer y Levsen, 1994; Junker-Buchheit y Witzenbacher, 1996) y/o GCB (Di Corcia and Marchetti, 1991) y en modo “*on-line*” con fases C₁₈ y poliméricas PRP-1 y PLRP-S (Sennert *et al.*, 1995). Posteriormente, se lleva a cabo la determinación por LC con detección UV (Di Corcia and Marchetti, 1991; Junker-Buchheit y Witzenbacher, 1996) o mediante acoplamiento LC-MS (Volmer y Levsen, 1994; Sennert *et al.*, 1995).

A pesar de que existen algunos antecedentes, cabe hacer hincapié en que se trata de herbicidas que han sido poco estudiados hasta el momento, y que normalmente la metodología existente no está optimizada para los mismos. Así, un informe publicado por la EU en el que se estudia la contaminación de aguas subterráneas por plaguicidas en países europeos (Fielding *et al.*, 1992) cuestionaba la disponibilidad de métodos de análisis adecuados para la determinación de una serie de herbicidas, entre los que se incluían al profam y fenmedifam, cuya presencia cabría esperar en aguas subterráneas debido a su gran uso (**Tabla 2**) así como a sus propiedades físico-químicas (**Tabla 5**), pero que, sin embargo, no se habían detectado en ninguna de las muestras analizadas.

Métodos oficiales de análisis de herbicidas fenilcarbamatos

A continuación se presentan métodos oficiales en los que se determina algún herbicida fenilcarbamato (Barceló, 1993; Barceló y Hennion, 1997)

Métodos EPA

Existen métodos oficiales para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en muestras de agua, tales como carbaryl o carbofuran (*método 531.1*), basados en una derivatización postcolumna (después de llevar a cabo la separación por LC) con o-ftalaldehído (OPA) y 2-mercaptoetanol previa hidrólisis alcalina, para formar un derivado fluorescente. Sin embargo, cabe destacar la ausencia de métodos específicos para la determinación de herbicidas fenilcarbamatos.

Únicamente el método EPA 507, utilizado para la determinación de plaguicidas que contienen átomos de N y P en aguas mediante GC-NPD, ya descrito con anterioridad, incluye el clorprofam, con límites de detección de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Métodos SCA

El método descrito para la determinación de carbamatos incluye al profam. Se extrae 1 l de muestra, previamente acidificada a pH 3, con diclorometano (50+25 ml), tras una etapa de evaporación, la muestra se disuelve en 500 μl de acetonitrilo o metanol inyectándose 20 μl en el sistema de LC con detección UV (220 nm). El límite de detección estimado para el profam es de $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Tabla 13. Determinación de residuos de herbicidas triazínicos en muestras de agua.

<i>Analitos</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Método de detección</i>	<i>Datos de recuperación</i>	<i>Referencia</i>
MRM para la determinación de plaguicidas (atrazina y simazina)	1-4 l muestra extraídos con 50-100 ml Cl_2CH_2 , evaporación a sequedad, redisolución en EtAc o MeOH	GC-NPD GC-MS LC-DAD	Atrazina 100%, CV 9% Simazina 93%, CV 9%	Durand <i>et al.</i> , 1992
Atrazina, DEA, DIA	SPE “ <i>off-line</i> ” de 200-800 ml de muestra en cartuchos C_{18} , secado del cartucho, elución con AcEt y evaporación hasta 50 μl	GC-MS	Atrazina 95%, CV 8.3%; DEA 32-90%, CV 2-8%; DIA 12-41%, CV 0.8-2%	Cassada <i>et al.</i> , 1994
Triazinas (atrazina, propazina, simazina, terbutilazina, terbutrina) y dinitroanilinas	250 ml de muestra se preconcentran mediante SPE “ <i>off-line</i> ” en cartuchos C_{18} , elución con acetonitrilo (2 \times 1 ml), evaporación a sequedad, redisolución con acetonitrilo (0.5 ml)	LC-UV	Fortifican 0.16-1.3 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; recuperación 91-99%; CV 2-8%	Vitali <i>et al.</i> , 1994
Atrazina, simazina, propazina, terbutilazina, secbutilazina, desmetrina, simetrina, ametrina, prometrina, terbutrina, cianazina	SPME de 3 ml de muestra, en una fibra a base de poliacrilato (tiempo de exposición: 25 min) que se desorbe en el inyector del cromatógrafo de gases a 300 ° C	GC-NPD	-	Eisert <i>et al.</i> , 1994
Hidroxi-triazinas	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra en cartuchos C_{18} , elución con metanol y evaporación a 0.1-0.2 ml. Para HPLC, ajustan el volumen a 0.5 ml, para GC se añade agente derivatizante (diazometano), evaporan hasta 0.1-0.2 y añaden EtAc (0.5 ml)	LC-UV GC-MS	Fortifican 0.05-0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$; Recuperación 21-75% (LC) Recuperación 25-43% (GC)	Färber <i>et al.</i> , 1994

Tabla 13. Determinación de residuos de herbicidas triazínicos en muestras de agua (continuación).

<i>Analitos</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Método de detección</i>	<i>Datos de recuperación</i>	<i>Referencia</i>
Atrazina, DIA, DEA, HA, clorodiaminoatrazina (CDAT) Metolaclor (M)	LLE de 50 ml de muestra en diferentes extractantes (EtAc; Cl ₂ CH ₂ , AcEt/isopropanol, AcEt/hexano) SPE “ <i>off-line</i> ” de 25-250 ml de muestra en C ₁₈ (Atrazina, DIA, DEA, M) y SCX (HA, CDAT)	GC-NPD LC-UV	Recuperaciones SPE: 78-103 %, CV 5-10 %. Recuperaciones LLE: >80 %	Sabik <i>et al.</i> , 1995
Atrazina, simazina, terbutilazina, propazina, prometrina, DIA, HA, DEA, hidroxiprometrina	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra en cartuchos rellenos con GCB, secado, elución con metanol y mezcla diclorometano/metanol (80:20, v/v), evaporación hasta 0.25 ml, ajuste de volumen a 0.5 ml	LC-UV	Fortifican 0.05-0.015 µg·l ⁻¹ ; 82-108 %, CV 2-13 %	Berg <i>et al.</i> , 1995
Cianazina, simazina, atrazina, ametrina, terbutilazina, prometrina, dipropetrina	SPE “ <i>off-line</i> ” de 250 ml de muestra en cartuchos C ₁₈ , elución con AcEt (10 ml), evaporación a sequedad, redisolución con CH ₃ CN (0.5 ml) SPE “ <i>on-line</i> ”, en cartuchos PRP-1, de 200 ml de muestra	LC-UV LC-MS	Fortifican 1 µg·l ⁻¹ ; “ <i>off-line</i> ”: 86-128%, CV 6-21% “ <i>on-line</i> ”: 74-102%, CV 2-10%	Prosen <i>et al.</i> , 1995
MRM para la determinación de plaguicidas	SPE “ <i>on-line</i> ” en cartuchos C ₁₈ , eluyendo con gradiente MeOH:H ₂ O	LC-MS	Fortifican 2.4 µg·l ⁻¹ ; 26-102%, CV 1-8%	Sennert <i>et al.</i> , 1995

Tabla 13. Determinación de residuos de herbicidas triazínicos en muestras de agua (continuación).

<i>Analitos</i>	<i>Preparación de la muestra</i>	<i>Método de detección</i>	<i>Datos de recuperación</i>	<i>Referencia</i>
Hidroxi-triazinas	SPE “ <i>off-line</i> ” de 1 l de muestra en cartuchos C ₁₈ ,	LC-DAD	Fortifican 1 µg·l ⁻¹ ; 37-107%, CV 10-5%	Saez <i>et al.</i> , 1996
Triazinas y productos de transformación	SPE “ <i>on-line</i> ” en diferentes adsorbentes: RA (retención por exclusión de partículas), C ₁₈ , derivados del SDB, Lichrolut EN	LC-DAD	Fortifican 1.6 µg·l ⁻¹ , Lichrolut EN, 73-93%, CV 2-19%	Önnerfjord <i>et al.</i> , 1996
Hexazinona, simazina, cianazina, simetrina, atrazina, prometona, secbutilazina, propazina, terbutilazina, DIA, DEA, HA	SPE “ <i>off-line</i> ” en cartuchos rellenos con inmunoabsorbentes antiatrazina o antisimazina, elución con 5 ml de mezcla MeOH:H ₂ O (70:30) y posterior dilución hasta 200 ml, posteriormente se preconcentra “ <i>on-line</i> ” en cartuchos PLRP-S	LC-DAD	Fortifican 3 µg·l ⁻¹ ; - antiatrazina hasta 101% - antisimazina hasta 93%	Pichon <i>et al.</i> , 1996
Varias triazinas, DEA y metribuzin	MLLE de 1ml de muestra (10 % NaCl) con 1 ml de hexano, agitación mecánica (20 min), secado de la fase orgánica con Na ₂ SO ₄ . Inyección de 200 µl en el sistema de GC.	GC-NPD	Fortifican a 1 y 10 µg·l ⁻¹ ; 81-103% (excepto DEA, <10 %), CV 2-9%	Beltran <i>et al.</i> , 1997 ^a
Simazina, atrazina, terbutilazina, terbumeton, terbutrina, molinato, bromacilo	SPME de 3 ml de muestra (10 % NaCl), extracción durante 30 min., desorción durante 5 min a 240 °C	GC-MS	-	Hernández <i>et al.</i> , 1998

1.5. Técnicas cromatográficas acopladas

Las técnicas cromatográficas acopladas hacen uso de dos o más sistemas cromatográficos para conseguir separaciones no alcanzables mediante un único sistema. Mientras que en el primero se lleva a cabo la purificación y/o preconcentración de la muestra, de manera completamente automatizada, en el segundo se produce la separación de los analitos, una vez transferidos mediante una interfase adecuada.

Estas técnicas se encuentran entre las más sensibles y selectivas disponibles actualmente para la determinación de residuos de plaguicidas en muestras medioambientales. Las más utilizadas en este campo son la cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida y la cromatografía líquida acoplada a cromatografía de gases. Sin embargo, existen diversas modalidades en función de que en la primera columna se lleve a cabo preconcentración (SPE) o separación entre interferentes y analitos (LC), pudiendo distinguirse diferentes modos de acoplamiento: SPE-LC, LC-LC, SPE-GC y LC-GC.

En este apartado únicamente se van a comentar aspectos generales de interés sobre cada una de estas técnicas, efectuando la revisión bibliográfica sobre antecedentes existentes en PRA fundamentalmente de las técnicas basadas en LC en el Capítulo 2 (Apartado 2.1.3.: Aplicación del acoplamiento LC-LC al análisis de residuos de plaguicidas) y en el Capítulo 3 (Apartado 3.1.4.: Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de plaguicidas)

En los procedimientos con columnas acopladas se pueden distinguir varias etapas:

- Introducción de un volumen de muestra relativamente grande en la columna del primer sistema, produciéndose, de este modo, una mejora notable de la sensibilidad global de los procedimientos analíticos.
- Retención de los analitos (“*on-line trace enrichment*”) en una columna de baja resolución, o bien, separación de los analitos e interferentes de la muestra en una columna analítica de alta resolución. En este último caso se consigue

una mejora notable de la selectividad de los procedimientos analíticos, al eliminarse la mayor parte de los interferentes.

- Transferencia de los analitos desde el primer hasta el segundo sistema cromatográfico, mediante una interfase adecuada. En esta etapa debe utilizarse un mecanismo de focalización para evitar el ensanchamiento de los picos. En el caso del acoplamiento LC-GC, se lleva a cabo un enfriamiento o “cold trapping”, mientras que en el caso del acoplamiento LC-LC se utilizan gradientes escalonados.
- Separación de los analitos en el segundo sistema cromatográfico, seguida de la detección y procesamiento de la señal analítica.

Además de la mejora en selectividad y sensibilidad, las técnicas cromatográficas acopladas permiten integrar la preparación de muestra, la separación y la detección en un único sistema cromatográfico, ofreciendo un alto grado de automatización para el procedimiento analítico global. En la **Figura 5** se presenta un esquema básico de una técnica cromatográfica acoplada en la que se hace uso de dos columnas de alta resolución.

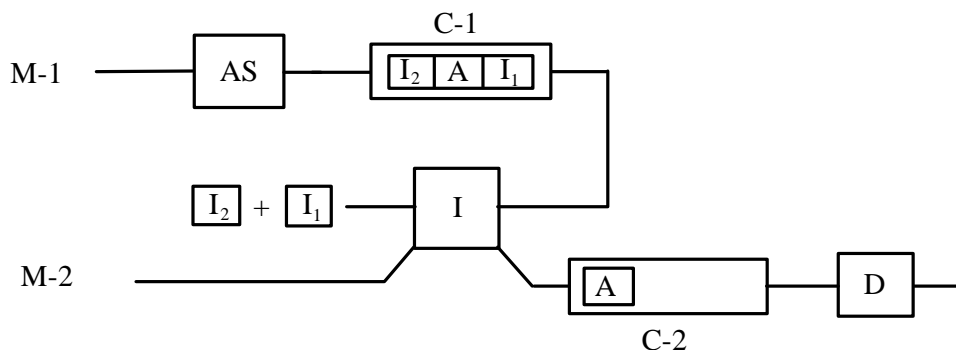


Figura 5. Representación esquemática de un sistema cromatográfico acoplado. *M-1 y M-2, fases móviles; AS, sistema de inyección o autoinyector; C-1 y C-2, primera y segunda columna; I, interfase; I₁ e I₂, interferentes de la muestra; A, fracción de analitos; D, sistema de detección.*

Un concepto de interés cuando se estudian las técnicas cromatográficas acopladas es el de técnicas multidimensionales (MD), que se refiere, fundamentalmente, al acoplamiento de dos sistemas de diferente selectividad dando lugar a lo que se conoce como separaciones ortogonales. De este modo, se consiguen métodos muy selectivos pero, en contrapartida, se requiere el uso de interfases de acoplamiento bastante complejas. Además, en determinadas aplicaciones, la resolución conseguida en la primera columna puede perderse parcial o totalmente en la segunda.

A continuación se comentan brevemente las principales técnicas cromatográficas acopladas.

1.5.1. Cromatografía de Gases-Cromatografía de Gases (GC-GC)

Este acoplamiento se basa, fundamentalmente, en la transferencia de los analitos desde una columna de GC a otra columna, también de GC, normalmente de diferente polaridad. Esta técnica resultó muy efectiva en sus orígenes para mejorar los análisis basados en GC (Deans, 1968), acortando de manera considerable los tiempos de análisis; más tarde, con el desarrollo de las columnas de alta eficacia se mejoró notablemente la resolución de las diferentes fracciones transferidas (Schomburg *et al.*, 1975; Bertsch, 1978; Schomburg, 1985).

Sin embargo, actualmente las separaciones por GC se llevan a cabo generalmente en columnas capilares de muy alta eficacia y con tiempos de análisis relativamente cortos, de modo que se puede conseguir resolver un elevado número de componentes en un único sistema de GC. Por ello, el acoplamiento GC-GC no es muy utilizado en el campo del PRA, no existiendo apenas aplicaciones, a excepción de algunos trabajos, como el propuesto por Stan y Heil (1991), que presentan un MRM para determinar residuos de plaguicidas en muestras biológicas mediante GC multidimensional, haciendo uso de dos columnas de GC acopladas y utilizando tres detectores: FID (detector de ionización de llama), ECD y NPD.

En general, el acoplamiento GC-GC ha quedado relegado a otro tipo de aplicaciones. Se ha descrito, por ejemplo, la determinación de microcontaminantes orgánicos polares derivados de la gasolina (cetonas, alcoholes, nitrilos, etc.) junto a hidrocarburos aromáticos (Schomburg, 1985; Schomburg, 1987). También se ha descrito la separación de bifenilos policlorados (PCBs), mediante GC-GC, consiguiéndose una adecuada resolución de todas las especies, incluso en el caso de isómeros (Schomburg, 1995). Uno de los campos en los que más se ha utilizado esta técnica, y donde más futuro presenta, ha sido en la separación de especies ópticamente activas, usando columnas capilares de alta eficacia rellenas con fases estacionarias quirales capaces de formar diastereoisómeros con analitos polares (Chinghai *et al.*, 1983; Schomburg, 1984).

1.5.2. Cromatografía Líquida-Cromatografía de Gases (LC-GC, SPE-GC)

LC-GC

El acoplamiento LC-GC, que se introdujo hace casi dos décadas (Majors, 1980), se ha convertido en una técnica bastante utilizada para la determinación de contaminantes en una gran variedad de matrices. Con este tipo de acoplamiento se consigue desarrollar una técnica multidimensional de alta eficacia, al combinarse dos mecanismos diferentes de separación. En la columna de LC se lleva a cabo la primera separación de los analitos e interferentes, de manera que sólo las fracciones de la muestra que contienen a los analitos son transferidas hasta la columna de GC, donde se lleva a cabo la separación final cromatográfica previamente a la detección de los mismos.

Una de las principales dificultades inherentes a la técnica es la necesidad de transferir volúmenes considerablemente grandes desde la columna del sistema de LC hasta el sistema de GC, para lo cual se han desarrollado interfases adecuadas. Las fracciones de interés pueden transferirse directamente mediante una interfase tipo “*on-column*” o mediante una interfase de vaporización con temperatura programada

(PTV), requiriéndose, en ambos casos, flujos de trabajo bajos en el sistema de LC. Otra posibilidad consiste en las interfases tipo “loop”, que permiten el uso de flujos elevados durante la etapa de LC; posteriormente, la fracción de muestra se introduce en el sistema de GC por medio del gas portador. A continuación, se describen las principales características de estas modalidades de trabajo (López *et al*, 1998).

Interfase tipo on-column

En este caso un capilar utilizado como línea de transferencia introduce la muestra en la precolumna, a través del sistema de inyección en columna mientras que el gas portador sigue fluyendo desde detrás del punto de introducción. La introducción de grandes volúmenes de muestra en el sistema de GC es posible debido a la instalación de una precolumna acoplada a la columna analítica. Durante la etapa de introducción del disolvente (fase móvil del sistema de LC) en el que se encuentran los analitos, la temperatura del horno del cromatógrafo es, en general, inferior al punto de ebullición de dicho disolvente.

Desde el punto de vista práctico, la evaporación del disolvente se expresa como velocidad de evaporación y depende de una serie de variables experimentales entre las que destacan temperatura, flujo de gas portador y naturaleza del disolvente utilizado. La velocidad de evaporación del disolvente juega un papel fundamental ya que determina la velocidad de introducción de la muestra en el sistema cromatográfico.

Existen dos posibilidades de trabajo:

- Evaporación total del disolvente (FCSE), que consiste en trabajar con una velocidad de evaporación del disolvente (V_e) superior a la velocidad de introducción del mismo (V_i). Esta posibilidad de trabajo es muy sencilla, pero tiene como limitación fundamental que no se debe utilizar con analitos volátiles, ya que éstos se pierden con los vapores del disolvente.

- Evaporación parcial del disolvente (PCSE), que consiste en trabajar con una velocidad de evaporación del disolvente (V_e) inferior a la velocidad de introducción del mismo (V_i); de este modo, se garantiza la presencia de una película de disolvente

en la precolumna, que se conoce como zona inundada (“*retention gap*”) y que permite el análisis de compuestos volátiles pudiéndose, además, realizar el análisis simultáneo de compuestos que presentan diferencias notables de volatilidad en función del tamaño de la zona inundada.

La eliminación del disolvente, una vez evaporado, puede llevarse a cabo mediante saturación del gas portador con el vapor del disolvente (“*vapor discharge*”), donde los analitos volátiles se concentran en la fase líquida del disolvente (“*solvent trapping*”), mientras que los menos volátiles se depositan en la columna. Otra posibilidad consiste en la interrupción del flujo de gas portador, que es reemplazado completamente por vapor de disolvente (“*overflow*”). La **Figura 6**, muestra esquemáticamente ambos modos de eliminación del disolvente para una interfase tipo “*on-column*”.

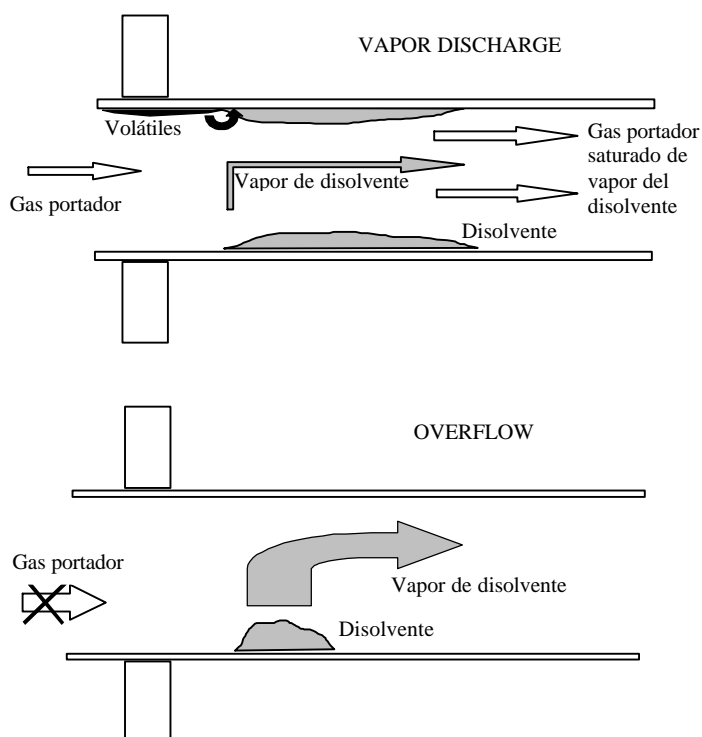


Figura 6. Diferentes mecanismos para la eliminación del disolvente en un sistema LC-GC.

Interfase PTV

La introducción de grandes volúmenes de muestra en este inyector se basa en la eliminación selectiva del disolvente en la cámara de vaporización, mientras que los componentes de la muestra que presentan mucha menor volatilidad, se concentran en el “*liner*”. Se ha comprobado que la utilización de “*liners*” rellenos con fases adsorbentes minimiza las pérdidas de los analitos más volátiles. Finalmente, una vez el disolvente se ha eliminado, los analitos se transfieren hasta la columna analítica en modo “*splitless*” calentando balísticamente el inyector mediante un programa de temperatura adecuado.

La diferencia fundamental con respecto a los inyectores convencionales radica en la posibilidad de calentar y enfriar la cámara de vaporización rápidamente y de manera controlada. Uno de los parámetros más importantes a optimizar es la velocidad de introducción de la muestra, que debe ser similar o ligeramente inferior a la de eliminación del disolvente (Staniewski *et al.*, 1992). En este sentido, si la velocidad de introducción fuera mucho mayor el disolvente se acumularía en el “*liner*” y se producirían pérdidas de los analitos por el dispositivo de salida de los vapores; por el contrario, si la velocidad de introducción fuera demasiado baja se producirían pérdidas de los analitos más volátiles, al no existir zona inundada.

Interfase tipo loop

Se basa en la incorporación de un “*loop*” a la salida de la columna del sistema de LC mediante una válvula adecuada. La fracción de los analitos se acumula en el “*loop*” y posteriormente se transfiere al sistema de GC mediante actuación de la válvula, de modo que el propio gas portador introduce la muestra en el sistema de GC. La principal ventaja de este dispositivo radica en que permite la utilización de elevadas velocidades de flujo durante la etapa de pre-separación y purificación en el sistema de LC; sin embargo, todo el disolvente es evaporado durante la etapa de transferencia (FCSE) por lo que se generan pérdidas en el caso de los analitos más volátiles, que se eliminan junto a los vapores de disolvente. Este efecto se ha minimizado mediante adición de una pequeña cantidad de otro disolvente con un

punto de ebullición mayor (co-disolvente) y que pueda generar una pequeña zona inundada en el “*retention gap*” capaz de retener a los analitos más volátiles (“*co-solvent trapping*”). El principal parámetro que se debe controlar en este dispositivo es la temperatura de transferencia, ya que si ésta es demasiado baja el líquido entraría en la columna del sistema de GC.

Cuando se lleva a cabo el acoplamiento LC-GC los principales problemas aparecen al utilizar LC en fase inversa, ya que debe eliminarse el elevado contenido de agua en la fase móvil antes de la entrada a la columna de cromatografía de gases. Por ello la gran mayoría de aplicaciones se han basado en separaciones en fase normal.

Una de las primeras aplicaciones del acoplamiento LC-GC en el campo del PRA consistió en la determinación de atrazina en sorgo (Majors, 1980); en este caso, se transfirió sólo un pequeño volumen de muestra (2 µl), ya que se utilizó un inyector convencional de GC. Posteriormente, se describió la determinación de dicamba en hojas de tabaco (Häkkinen *et al.*, 1989); tras una etapa de extracción previa de la muestra y metilación con diazometano, se introdujeron 10 µl del extracto en el sistema de LC y la fracción de interés se transfirió al sistema de GC mediante una interfase tipo “*loop*” de 250 µl y FCSE. Barcarolo, en 1990, describió la determinación de varios plaguicidas organoclorados en matrices grasas mediante LC-GC, utilizando una interfase tipo “*on-column*”, GC-ECD y con FCSE. Rietveld y Quirijns (1994) determinaron el fungicida fenarimol en productos vegetales mediante LC-GC utilizando una interfase tipo “*loop*” con FCSE. Más recientemente, se ha descrito la determinación de plaguicidas organofosforados en aceite de oliva mediante esta técnica, usando columnas de cromatografía de permeación en gel (GPC) y una interfase tipo “*loop*”. La fase móvil utilizada ha consistido en una mezcla de acetato de etilo:ciclohexano con un 6 % de n-decano, este último añadido como co-disolvente para minimizar las pérdidas de los analitos más polares (Vreuls *et al.*, 1996). Otra aplicación reciente ha consistido en la determinación de insecticidas organoclorados en leche de vaca (van der Hoff *et al.*, 1997) mediante

LC en una columna en fase normal y posterior transferencia utilizando una interfase “*on-column*” y PCSE.

El mayor potencial del acoplamiento LC-GC reside principalmente en su gran selectividad; sin embargo, este parámetro no siempre es favorable para el desarrollo de MRMs, por lo que a veces se prefiere acoplar sistemas de LC con menor poder de resolución a un sistema de GC con elevada capacidad de separación, con el consiguiente aumento de sensibilidad, tal y como se describe en el apartado siguiente.

SPE-GC

En esta técnica se utiliza un elevado volumen de muestra, normalmente acuosa (10-100 ml), el cual se bombea hasta una pequeña precolumna que retiene a los analitos de interés junto a los posibles interferentes de la muestra. Antes de llevar a cabo la desorción y posterior transferencia a la columna de GC, que es donde se llevará a cabo la separación cromatográfica, se debe de introducir una etapa de secado de la precolumna para evitar que se transfieran pequeñas cantidades de fase acuosa al cromatógrafo de gases. Durante la etapa de desorción, se transfieren generalmente grandes volúmenes de eluyente, por lo que se requiere el uso de alguna de las interfases comentadas en el apartado anterior.

Una de las primeras aplicaciones de esta técnica consistió en la determinación de una serie de plaguicidas clorados y PCBs en muestras de agua superficial (Noroozian *et al.*, 1987). Estos autores utilizaron una válvula de 4 vías y una microprecolumna de 4 mm × 1 mm d.i., después de la carga de la muestra y el secado, que se llevó a cabo con nitrógeno, los analitos se desorbieron con hexano usando PCSE. El método se utilizó para la determinación de los analitos en aguas superficiales mediante preconcentración de 1 ml de muestra, alcanzándose límites de detección del orden de 1 ng·l⁻¹.

Posteriormente, se describió el uso de eluyentes más polares, como el propanol, que permitían la desorción de analitos más polares Sin embargo, se necesitaban volúmenes demasiado elevados de este eluyente (150 µl) para desorber

los analitos más apolares y ello impedía el uso de equipos convencionales de GC. Finalmente, se describió el uso de acetato de etilo como eluyente, con el que se consigue un buen compromiso para la elución de analitos polares y apolares en precolumnas de tamaño considerable, 10×2 mm d.i. (Vreuls *et al.*, 1990).

Debido al problema que supone la introducción de parte de la muestra acuosa directamente en el cromatógrafo de gases, una de las etapas en las que se ha hecho más hincapié en los acoplamientos SPE-GC ha sido el proceso de secado. Los procedimientos más utilizados son purga con nitrógeno, o bien, retención de las trazas de agua pasando los analitos desorbidos por cartuchos rellenos con fases desecantes, como sílica o sulfato sódico. Picó *et al.* (1994), llevaron a cabo la determinación de plaguicidas organofosforados, organosulfurados y triazinas en diferentes muestras de agua (potable y superficial) a niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mediante preconcentración de 10 ml de muestra en una precolumna PLRP-S (10×2 mm d.i.). Después de la elución con acetato de etilo, el eluyente se pasó por una columna de sílica para llevar a cabo el secado y, posteriormente, se introdujo en el sistema de GC. La detección se llevó a cabo mediante FID, NPD o FPD.

Noij y van der Kooi (1995) describen la determinación de 31 plaguicidas mediante SPE “*on-line*” en una precolumna polimérica (PLRP-S), llevando a cabo un secado con corriente de nitrógeno previo a la introducción en el sistema de GC, utilizando una interfase tipo “*loop*” y añadiendo n-decano como co-disolvente.

Recientemente, se han descrito aplicaciones en las que se ha hecho uso del acoplamiento SPE-GC utilizando detectores más selectivos como el MSD o el de emisión atómica (AED). Los acoplamientos SPE-GC-NPD y SPE-GC-MS se han aplicado para la determinación de atrazina y simazina en aguas superficiales a niveles de $\text{sub-}\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Bulterman *et al.*, 1993). SPE-GC-AED se ha utilizado, mediante preconcentración de volúmenes de muestra comprendidos entre 50-100 ml, para la determinación de 11 plaguicidas organofosforados obteniéndose límites de detección entre $0.1\text{-}0.01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Hankemeier *et al.*, 1995).

1.5.3. Cromatografía Líquida-Cromatografía Líquida (LC-LC, SPE-LC)

LC-LC

En este acoplamiento, la muestra es introducida en una columna analítica de LC donde se lleva a cabo la primera separación cromatográfica, en la cual los analitos se separan de los principales interferentes. Posteriormente, la fracción que contiene los analitos se transfiere de modo selectivo, a través de una interfase adecuada, hasta la segunda columna de LC, en la que se lleva a cabo la separación final de los mismos. Esta técnica permite la integración de la preparación de la muestra y la purificación de la misma en el procedimiento cromatográfico global. Una ventaja con respecto a la LC-GC es la mayor facilidad para trabajar con muestras acuosas, siendo de sobra conocida su compatibilidad con las columnas de LC en fase inversa.

A pesar de la mejora de selectividad inherente a los sistemas multidimensionales del tipo LC-LC, la aplicación de esta técnica al PRA no ha sido muy extensa, debido principalmente al requerimiento de interfases complejas que permitan solucionar la incompatibilidad de los disolventes utilizados por cada sistema. Una posibilidad más sencilla de trabajo es el acoplamiento de dos sistemas que utilicen mecanismos de separación con similares selectividades. De este modo, aún asumiendo que la selectividad global del método será menor que en el caso de separaciones ortogonales, en contrapartida, en lo que se refiere a resolución entre los distintos analitos, se puede alcanzar una buena separación en la primera columna sin riesgo de que se produzcan efectos contrarios en la segunda. Además, la interfase requerida en este caso es una simple válvula de alta presión de 6 vías.

Una de las primeras aplicaciones de esta técnica en el campo del PRA data de 1976; en esta época Dolphin *et al.* propusieron un sistema LC-LC en fase normal para la purificación “*on-line*” de pesticidas organoclorados en extractos lácteos.

El acoplamiento LC-LC es una técnica muy adecuada para la determinación selectiva de un número limitado de analitos presentes en matrices más o menos

complejas. El aislamiento de la fracción apropiada en la primera columna y su transferencia a la segunda proporciona la selectividad requerida en el análisis de trazas. Por otro lado, se puede aumentar la sensibilidad de la técnica mediante inyección de grandes volúmenes de muestra (hasta varios ml), lo cual no resulta factible en sistemas de LC convencionales.

En la actualidad, se han descrito algunas aplicaciones de esta técnica para la determinación de residuos de plaguicidas en diferentes matrices. Estos trabajos se comentan en el Capítulo 2 (apartado 2.1.3.) de la presente Tesis Doctoral.

SPE-LC

Otra modalidad de acoplamiento en cromatografía líquida consiste en la utilización de una pequeña columna enriquecedora para retener a los analitos, previamente a la separación analítica en la segunda columna de LC. Como ya se ha descrito anteriormente en el acoplamiento SPE-GC, la primera columna no tiene que pre-separar analitos del resto de compuestos de la matriz, sino sólo retenerlos, idealmente en cabeza de columna. Las diferencias entre el uso de una primera columna separadora o enriquecedora se representan esquemáticamente en la **Figura 7**.

La incorporación del acoplamiento SPE-LC al análisis de muestras acuosas a finales de los años 70 y principios de los 80 (van Vliet *et al.*, 1979; de Jong, 1980; Roth *et al.*, 1981) produjo un amplio desarrollo de estas técnicas (“*column switching*”) principalmente en el campo del análisis biomédico, al permitir la automatización del análisis de la muestra, incluyendo la etapa de preconcentración. Para este tipo de muestras se suele conseguir la sensibilidad deseada con la inyección directa de unos cientos de μl . Sin embargo, para el análisis de contaminantes en muestras acuosas a nivel de sub-ppb, se requiere el procesamiento de volúmenes de muestra mayores (50-500 ml), para lo cual se han incorporado bombas de HPLC.

En la actualidad, se ha producido un importante desarrollo de metodología analítica basada en el acoplamiento SPE-LC para el análisis de residuos de

plaguicidas en muestras acuosas, por las ventajas que supone disponer de métodos completamente automatizados, desde la etapa de preparación de la muestra hasta la de medida, aplicables a la determinación simultánea de un elevado número de analitos, con muy buenos niveles de sensibilidad.

Las aplicaciones más recientes en PRA se comentan en el Capítulo 3 (Apartado 3.1.4.) de este trabajo, haciendo hincapié en las tendencias actuales hacia la utilización de fases adsorbentes más selectivas y con mayor capacidad de retención. También se destaca el interés por el acoplamiento con sistemas de detección más selectivos.

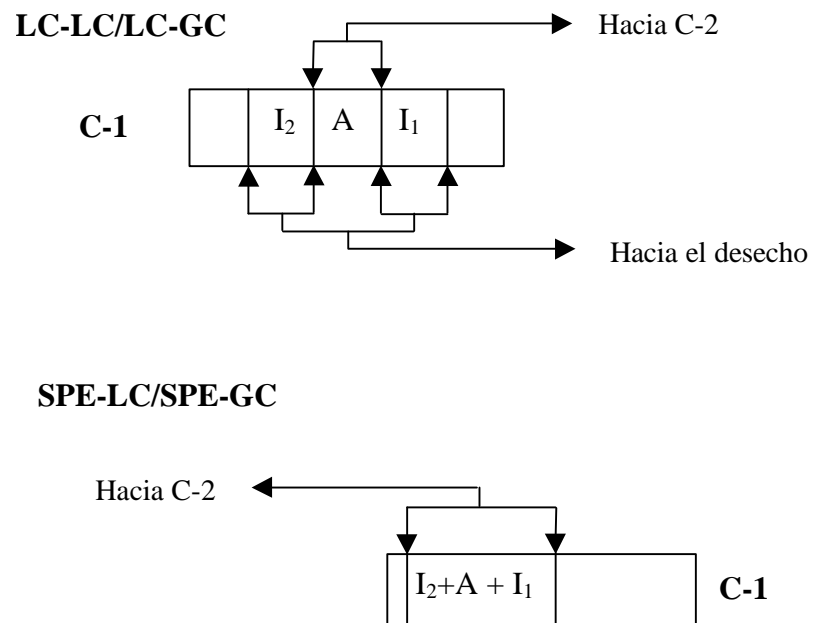


Figura 7. Representación esquemática de la diferente forma de trabajo de la columna C-1 según se utilice como columna separadora (LC-GC, LC-LC) o enriquecedora (SPE-GC, SPE-LC).

A, fracción de analitos; I_1 e I_2 , interferentes de cabeza y cola, respectivamente.

1.6. Referencias

- Aga, D. S.; Thurman, E. M., (1993), *Anal. Chem.*, **65**, 2894.
- Bagheri, H.; Brouwer, E.R.; Ghijsen, R.T.; Brinkman, U.A.Th., (1992), *Analisis*, **20**, 475.
- Bagheri, H.; Brouwer, E.R.; Ghijsen, R.T.; Brinkman, U.A.Th., (1993), *J. Chromatogr.*, **647**, 121.
- Balinova, A., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 203.
- Barberá, C., (1989), *Pesticidas agrícolas*, Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Barcarolo, R., (1990), *J. High Resolution Chromatogr.*, **13**, 465.
- Barceló, D., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 117.
- Barceló, D.; Hennion, M.-C., (1997), “Trace determination of pesticides and their degradation products in water”, Elsevier Science B.V., The Netherlands.
- Beltran, J.; López, F.J.; Forcada, M.; Hernández, F., (1997^a), *Chromatographia*, **44**, 274.
- Beltran, J.; López, F.J.; Forcada, M.; Hernández, F., (1997^b), *Anal. Chim. Acta*, **356**, 125.
- Berg, M.; Müller, S.R.; Schwarzenbach, R.P., (1995), *Anal. Chem.*, **67**, 1860.
- Bertsch, W., (1978), *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **187**, 289 en Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Borek, V.; ehánková, V.; Babi ka, L.; Hubá ek, J., (1986), *Agrochémia (Bratislava)*, **26**, 118 en Tekel´ J., Kova i ová, J., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 291.
- Brinkman, U.A.Th.; De Kok, A.; Geerdink, R.B., (1984), *J. Chromatogr.*, **283**, 113.
- Büchert, A; Lokke, H, (1975), *J. Chromatogr.*, **115**, 682.
- Bulterman, A.-J.; Vreuls, J.J.; Ghijsen, R.T.; Brinkman, U.A.Th., (1993), *J. High Resolut. Chromatogr.*, **16**, 397 in Brouwer, E.R.; Kofman, S.; Brinkman, U.A.Th., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 167.

- Cabras, P.; Spanedda, L.; Pellecchia, M.; Gennari, M., (1989), *J. Chromatogr.*, **472**, 411.
- Cai, Z.; Ramanujam, V.M.S.; Giblin, D.E.; Gross, M.L.; Spalding, R.F., (1993), *Anal. Chem.*, **65**, 21.
- Cai, Z.; Ramanujam, V.M.S.; Gross, M.L.; Monson, S.J.; Cassada, D.A.; Spalding, R.F., (1994), *Anal. Chem.*, **66**, 4202.
- Cai, Z.; Gross, M.L.; Spalding, R.F., (1995), *Anal. Chim. Acta*, **304**, 67.
- Cassada, D.A.; Spalding, R.F.; Cai, Z.; Gross, M.L., (1994), *Anal. Chim. Acta*, **287**, 7.
- Coquart, V.; Hennion, M.-C., (1991), *J. Chromatogr.*, **585**, 67.
- Crespo, C.; Marcé, R.M.; Borrull, F., (1994), *J. Chromatogr. A*, **670**, 135.
- Chinghai, W.; Frank, H.; Guancha, W.; Liangmo, Z.; Bayer, E.; Peichang, L., (1983), *J. Chromatogr.*, **262**, 352.
- Chiron, S.; Dupas, S.; Scribe, P.; Barceló, D., (1994), *J. Chromatogr. A*, **665**, 295.
- De Jong, G.J., (1980), *J. Chromatogr.*, **183**, 203.
- De Kok, A.; Vos, Y.J.; Van Garderen, C.; De Jong, T.; Van Opstal, M.; Frei, R.W.; Geerdink, R.B.; Brinkman, U.A.Th., (1984), *J. Chromatogr.*, **288**, 71.
- Deans, D.R., (1968), *Chromatographia*, **1**, 18.
- Deleu, R.; Copin, A., (1980), *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **3**, 299 in Liška, I.; Slobodník, J., (1996), *J. Chromatogr. A*, **733**, 235.
- Di Corcia, A.; Marchetti, M., (1991), *Anal. Chem.*, **63**, 580.
- Di Corcia, A.; Samperi, R.; Marcomini, A.; Stelluto, S., (1993), *Anal. Chem.*, **65**, 907.
- Di Corcia, A.; Crescenzi, C.; Guerriero, E.; Samperi, R., (1997), *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1658.
- Díaz, M.C.; Garrido, S.; Hidalgo, R., (1989), *Contaminación agraria difusa*, Centro de Publicaciones, Secretaría General Técnica, Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo, Madrid.

- Dolphin, R.J.; Willmott, F.W.; Mills, A.D.; Hoogeevee, L.P.J., (1976), *J. Chromatogr.*, **122**, 259.
- Dornseiffen, J. W.; Verwaal, W., (1979), *Medec. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent*, **44**, 867 en Tekel', J.; Kovačičová, J., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 291.
- Durand, G.; Forteza, R.; Barceló, D., (1989), *Chromatographia*, **28**, 597.
- Durand, G.; Bouvot, V.; Barceló, D., (1992), *J. Chromatogr.* **607**, 319.
- Durand, G.; Barceló, D., (1993), *Talanta*, **40**, 1665
- EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, 30 de Agosto de 1980, Bruselas.
- Eisert, R.; Levsen, K, (1995), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 555.
- Färber, H.; Nick, K.; Schöler, H.F., (1994), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **350**, 145.
- Fielding, M.; Barceló, D.; Helweg, A.; Galassi, S.; Torstensson, L.; van Zoonen, P.; Wolter, R.; Ageletti, G., (1992), en *Pesticide in Ground and Drinking Water (Water Pollution Research Report, 27)*, Commission of the European Communities, Bruselas, pp. 1-136.
- Foster, G.D.; Gates, P.M.; Foreman, W.T.; McKenzie, S.W.; Rinella, F.A., (1993), *Environ. Sci. Technol.*, **27**, 1911.
- Frank, R; Clegg, B. S.; Patni, N. K., (1991), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **21**, 41.
- Gennaro, M. C.; Abrigo, C.; Giacosa, D.; Rigotti, L.; Liberatori, A., (1995), *J. Chromatogr. A*, **718**, 81.
- Goewie C. E., Hogendoorn E. A., (1987), *J. Chromatogr.*, **410**, 211.
- Grob, K (Jr), (1981), *J. Chromatogr.*, **208**, 217.
- Guebbioni, C.; Trevisan, M., (1992), *Pestic. Sci.*, **34**, 105 en Tekel', J.; Kovačičová, J., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 291
- Guenu, S.; Hennion, M.-C., (1996), *J. Chromatogr., A*, **737**, 15.
- Gustafson, D.I., (1989), *Environmental Toxicology and Chemistry*, **8**, 339.

- Häkkinen, V.M.A.; Grob, K.; Bürki, C., (1989), *J. Chromatogr.*, **473**, 353.
- Hankemeier, Th; Louter, A.J.H.; Rinkema, F.D.; Brinkman, U.A.Th., (1995), *Chomatographia*, **40**, 119 en Brinkman, U.A.Th., (1996), *Analisis Magazine*, **24**, M12.
- Hatrík, Š.; Lehotay, J.; Tekel', J., (1994), *J. High Resolut. Chromatogr.*, **17**, 756.
- Hernández, F., (1993), "Análisis de Residuos de Plaguicidas" en "La Zona no saturada y la Contaminación de las Aguas Subterráneas", L. Candela, M. Varela (Editores), CIMNI, Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona.
- Hernández, F.; Serrano, R.; Miralles, M.C.; Font, N., (1996), *Chromatographia*, **42**, 151.
- Hernández, F.; Beltran J.; López, F.; Gaspar J.V., (1998), *Anal. Chem.* enviado.
- Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Hernández, F., (1997), *Química Analítica*, **16**, S259.
- Holland, D.C.; Munns, R.K.; Roybal, J. E.; Hurlbut, J. A.; Long, A.R., (1995), *J. AOAC Intern.*, **78**, 1067.
- James, T.K.; Lauren, D., (1995), *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 684.
- Junker-Buchheit, A.; Witzemberger, M., (1996), *J. Chromatogr. A*, **737**, 67.
- Karg, F.P.M., (1993), *J. Chromatogr.*, **634**, 87.
- Karlaganis, G; Von Arx, R; Among, H.V.; Camenzind, R, (1991), *J. Chromatogr.*, **549**, 229.
- Kirkwood, R.C., (1987), "Herbicides and plant growth regulators" en "Herbicides", D.H. Hutson and T.R. Roberts, Jonh Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore.
- Lagana, A.; Marino, A.; Fago, G.; Martinez, BP, (1994), *Analisis*, **22**, 63.
- Lantos, J.; Brinkman, U.A.Th., Frei, R.W., (1984), *J. Chromatogr.*, **292**, 117.
- Lerch, R.N.; Donald, W.W., (1994), *J. Agric. Food Chem.*, **42**, 922.
- Liška, I.; Slobodník, J., (1996), *J. Chromatogr. A*, **733**, 235.

- López, F.; Beltran, J.; Hernández, F.; Forcada, M., (1998) “Inyección de grandes volúmenes en cromatografía de gases capilar. Aplicación a la determinación de residuos de plaguicidas en muestras de agua” en “Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos”. pp.: 223-237.
- Luchtefeld, R. G., (1987), *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 740.
- Majors, R., (1980), *J. Chromatogr. Sci.*, **18**, 571.
- Mangani, F.; Crescentini, G.; Palma, P.; Bruner, F., (1988), *J. Chromatogr.*, **452**, 527.
- Marcé, R.M.; Prosen, H.; Crespo, C.; Calull, M.; Borrull, F.; Brinkman, U.A.Th., (1995), *J. Chromatogr. A*, **696**, 63.
- Martínez-Galera, M.; Martínez Vidal, J.L; Garrido Frenich, A.; Parrilla Vázquez, P., (1995), *J. AOAC Int.*, **78**, 423.
- Mattina, M.J.I., (1991), *J. Chromatogr.*, **549**, 237.
- Meyer, M. T.; Mills, M.S.; Thurman, E. M., (1993), *J. Chromatogr.*, **629**, 55.
- Mills, M. S.; Thurman, E. M., (1992), *Anal. Chem.*, **64**, 1985.
- Mol, H.G.J.; Janssen, H.-G.M.; Cramers, C.A.; Vreuls, J.J.; Brinkamn, U.A.Th., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 277.
- Molina, C.; Durand, G.; Barceló, D., (1995), *J. Chromatogr. A*, **712**, 113.
- Molins, C.; Hogendoorn, E.A.; Heusinkveld, H.A.G.; van Harten, D.C.; van Zoonen, P.; Baumann, R.A., (1996), *Chromatographia*; **43**, 527.
- Moore, K.M.; Jones, S. R.; James, C., (1995), *Wat. Res.*, **29**, 1225.
- Nélieu, S.; Stobiecki, M.; Sadoun, F.; Virelizier, H.; Kerhoas, L.; Einhorn, J., (1994), *Analisis*, **22**, 70.
- Niessner, R., (1993), *Anal. Methods Instrum.*, **1**, 134.
- Noij, T.H.M.; van der Kooi, M.M.E., (1995), *J. High Resolut. Chromatogr.*, **18**, 535.
- Noroozian, E.; Maris, F.A.; Nielen, M.W.F.; Frei, R.W.; de Jong, G.J.; Brinkman, U.A.Th., (1987), *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun*, **10**, 17 en Mol, H.G.J.; Janssen, H.-G.M.; Cramers, C.A.; Vreuls, J.J.; Brinkman U.A.Th., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 277.

- Önerfjord, P.; Barceló, D.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G., (1996), *J. Chromatogr. A*, **737**, 35.
- Papadopoulou-Mourkidou, E.; Patsias, J., (1996), *J. Chromatogr. A*, **726**, 99.
- Pardue, J.R., (1995), *J. AOAC Int.*, **78**, 856.
- Pichon, V. ; Hennion, M.-C., (1994), *J. Chromatogr. A*, **665**, 269.
- Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.-C., (1995^a), *Anal. Chim. Acta*, **311**, 429.
- Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.-C.; Daniel, R.; Martel, A.; Le Goffic, F.; Abian, J.; Barceló, D., (1995^b), *Anal. Chem.*, **67**, 2451.
- Pichon, V.; Chen, L.; Guenu, S.; Hennion, M.-C., (1995^c), *J. Chromatogr. A*, **711**, 257.
- Pichon, V.; Chen, L.; Durand, N.; Le Goffic, F.; Hennion, M.-C., (1996), *J. Chromatogr. A*, **725**, 107.
- Picó, Y.; Louter, A.J.H.; Vreuls, J.J.; Brinkman, U.A.T., (1994), *Analyst*, **119**, 2025
- Potter, T.L.; Carpenter, T.; Putnam, R.; Reddy, K.; Clark, J.M., (1991), *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 2184.
- Prosen, H.; Zupan i -Kralj, L.; Marsel, J., (1995), *J. Chromatogr. A*, **704**, 121.
- Psathaki, M.; Manoussaridou, E.; Stephanou, E.G., (1994), *J. Chromatogr. A*, **667**, 241.
- Rietveld, R; Quirijns, J., (1994), *J. Chromatogr. A*, **683**, 151.
- Roth, W.; Beschke, K.; Jauch, R.; Zimmer, A.; Koss, F.W., (1981), *J. Chromatogr.*, **222**, 13.
- Sabik, H.; Cooper, S.; Lafrance, P.; Fournier, J., (1995), *Talanta*, **42**, 717.
- Sacchero, G.; Sarzanini, C.; Mentasti, E., (1994), *J. Chromatogr. A*, **671**, 151.
- Saez, A.; Gómez de Barreda, D.; Gamon, M.; Garcia de la Cuadra, J.; Lorenzo, E.; Peris, C., (1996), *J. Chromatogr. A*, **721**, 107.

- Samara, C.; Lintelmann, J.; Kettrup, A., (1994), *Fresenius Envir. Bull.*, **3**, 534.
- Scharf, J.; Wiesiollek, R.; Bächmann, K., (1992), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **342**, 813.
- Schewes, R.; Maidl, F.X.; Fischbech, G.; von Gleissenthall, J.L.; Süss, A., (1993), *J. Chromatogr.*, **641**, 89.
- Schlett, C., (1991), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 344.
- Schomburg, G.; Husmann, H.; Weeke, F., (1975), *J. Chromatogr.*, **112**, 205 en Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Schomburg, G.; Husmann, H.; Hübinger, E.; König, W.A., (1984), *J High Resolution Chromatogr. Chromatogr. Commun*, **7**, 404 en Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Schomburg, G., (1985), "Sample Introduction in Capillary Gas Chromatography" P. Sandra (Editor), Hüthig, Heidelberg, **1**, p. 235 en Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Schomburg, G., (1987), *LC-GC*, **5**, 304 en Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Schomburg, G., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 309.
- Schussler, W., (1989), *Chromatographia*, **27**, 431, in Liška, I.; Slobodník, (1996), *J. Chromatogr. A*, **733**, 235.
- Sennert, S.; Volmer, D.; Levsen, K; Wunsch, G., (1995) *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 642.
- Slobodník, J.; Groenewegen, M.G.M.; Brouwer, E.R.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th., (1993), *J. Chromatogr.*, **642**, 359.
- Smith, A.E., (1988), "Environmental Chemistry of Herbicides", R. Grover (Editores), CRC Press, Inc., Florida.
- Stan, H. -J.; Klaffenbach, P., (1991), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 151.
- Stan, H.-J; Heil, S., (1991), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 34.
- Stangl, G.; Weller, M.G.; Niessner, R, (1995), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 301.

- Staniewski, J.; Jansen, H.-G.; Cramers, C.A.; Rijks, J.A., (1992), *J. Microcol. Sep.*, **4**, 331.
- Steinheimer, T. R., (1993), *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 588.
- Steinheimer, T. R.; Pfeiffer, R. L.; Scoggin, K. D., (1994), *Anal. Chem.*, **66**, 645.
- Tatarkovi ová, V, (1990), *Collect. Czech. Chem. Commun*, **55**, 2146 en Tekel' J., Kova i ová, J., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 291
- Tekel', J.; Kova i ová, J., (1993), *J. Chromatogr.*, **643**, 291.
- Thomas, D.H.; Beck-Westemeyer, M.; Hage, D.S., (1994), *Anal. Chem.*, **66**, 3823.
- Tuinstra, L.G.M.T.; Roos, A.H.; Matser, A.M.; Traag, W.A.; Van Rhijn, J.A., (1991), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 384.
- Van der Hoff, G.R.; Baumann, R.A.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th., (1997), *J. High Resolut. Chromatogr.*, **20**, 222.
- Van der Velde, E. G.; Ramlal, M. R.; Van Beuzekom, A. C.; Hoogerbrugge, R., (1994), *J. Chromatogr. A*, **683**, 125.
- Van Vliet, H.P.M.; Bootsman, Th.C.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th., (1979), *J. Chromatogr.*, **185**, 483.
- Vitali, P.; Venturini, E.; Bonora, C.; Calori, R.; Raffaelli, R., (1994), *J. Chromatogr. A*, **660**, 219.
- Volmer, D.; Levsen, K., (1994), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **5**, 665.
- Vreuls, J.J.; Cuppen, W.J.G.M.; de Jong, G.J.; Brinkman, U.A.Th., (1990), *J. High Resolut. Chromatogr.*, **13**, 157.
- Vreuls, J.J.; Swen, R.J.J.; Goudriaan, V.P.; Kerkhoff, M.A.T.; Jongenotter, G.A.; Brinkman U.A.Th., (1996), *J. Chromatogr. A*, **750**, 275.
- Walters, S. M.; Westerby, B.C.; Gilvydis, D.M., (1984), *J. Chromatogr.*, **317**, 533.
- Ware, G.W., (1983), *Pesticides. Theory and Application*, W.H. Freeman and Company, San Francisco.

- Watts, C.D.; Hegarty, B., (1995), *Pure & Appl. Chem.*, **67**, 1533.
- Wells, M.J.M.; Riemer, D.D.; Wells-Knecht, M. C., (1994), *J. Chromatogr. A*, **659**, 337.
- Wylie, P.L.; Oguchi, R., (1990), *J. Chromatogr.*, **517**, 131.
- Zahradníková, H.; Šimek, P.; Hořicová, P.; Tiska, J., (1994), *J. Chromatogr. A*, **688**, 383.
- Zegers, B.N.; De Brouwer, J.F.C.; Poppema, A.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th., (1995), *Anal. Chim. Acta*, **304**, 47.

ACOPLAMIENTO CROMATOGRFÍA LÍQUIDA-CROMATOGRFÍA LÍQUIDA

2.1. Introducción

Los fundamentos del acoplamiento LC-LC ya han sido descritos con anterioridad, siendo uno de los aspectos más favorables la posibilidad de integrar la preparación de la muestra y la purificación de la misma en el procedimiento cromatográfico de manera totalmente automatizada, tal y como se esquematiza en la **Figura 8**, en la cual se presenta un esquema básico de acoplamiento LC-LC.

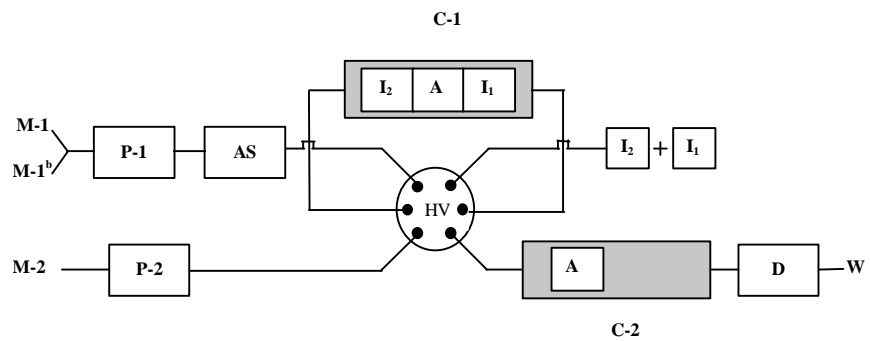


Figura 8. Representación esquemática de un acoplamiento LC-LC. C-1 y C-2, primera y segunda columna separadora; AS, autoinyector; I_1 e I_2 , interferentes de la muestra de cabeza y de cola, respectivamente; A, fracción de analito; M-1, fase móvil para la purificación en C-1; M-1^b, fase móvil para la eliminación de los interferentes más retenidos en C-1; M-2, fase móvil de C-2; P-1 y P-2, bombas de LC; HV, válvula de alta presión; D, detector; W, desecho.

Un aspecto a destacar de esta técnica es la mejora en selectividad de los procedimientos propuestos. A este respecto, cabe destacar que la primera columna (C1) ejerce un papel relevante, ya que debe permitir la separación eficaz de los analitos e interferentes de la muestra. Las primeras aplicaciones de la técnica de columnas acopladas (“*column switching*”) en el PRA hacían uso de pequeñas precolumnas, con el objeto de preconcentrar muestras acuosas evitando las extracciones manuales (Goewie *et al.*, 1981, 1984). Posteriormente, Hogendoorn y Goewie (1988) plantean el uso de precolumnas más largas con el objetivo de

aumentar su poder de separación y, de este modo, poder llevar a cabo una purificación de la muestra, desarrollándose las primeras aplicaciones del acoplamiento LC-LC.

Otro aspecto interesante de la técnica radica en la posibilidad de aumentar el volumen de muestra en función de la fuerza eluotrópica del disolvente utilizado y de la retención de los analitos en la primera columna. Así, en el caso particular de muestras acuosas se pueden introducir volúmenes de hasta varios ml (en función de los analitos) directamente en el sistema cromatográfico, con las correspondientes mejoras en cuanto a sensibilidad, en comparación con sistemas convencionales de LC.

2.1.1. Etapas del análisis

En todo método analítico basado en el acoplamiento LC-LC se pueden distinguir una serie de etapas que se esquematizan en la **Figura 9**, y que se comentan a continuación:

1. Inyección de la muestra (Figura 9 A)

Durante esta etapa la muestra o el extracto de la misma se introduce en el equipo, mediante un autoinyector o inyector manual, llenándose el correspondiente “loop”. Mientras tanto, la fase móvil M-1 circula a través de la columna C-1 y la fase móvil M-2 lo hace a través de la columna C-2.

2. Purificación (Figura 9 B)

Una vez se ha cargado la muestra en el “loop”, se activa la válvula del autoinyector, de modo que la fase móvil M-1 la empuja hasta la columna C-1, donde se lleva a cabo la primera separación cromatográfica. Mientras los interferentes menos retenidos (I_1) van al desecho, los analitos y los interferentes más retenidos se van desplazando a lo largo de C-1. Cuando el primer analito empieza a eluir de la columna C-1, se activa la válvula HV, que actúa como interfase entre los dos sistemas de LC, finalizando la etapa de purificación y comenzando la de transferencia.

Para que la purificación sea efectiva se requiere que el volumen de purificación sea, idealmente, por lo menos dos veces el volumen muerto de la columna, lo cual en la práctica supone que el analito menos retenido presente un factor de capacidad (k') mayor de 1.

3. Transferencia (Figura 9 C)

Una vez activada la válvula HV, la fase móvil M-2 pasa a través de la columna C-1 y eluye la fracción de muestra que contiene los analitos hasta la columna C-2. Cuando el analito más retenido ya ha sido transferido, se activa de nuevo la válvula HV, finalizando la etapa de transferencia.

La elución de los analitos por M-2 suele llevarse a cabo en el mismo sentido que el de carga (“*forward-flush*”), ya que la elución en sentido contrario (“*backflush*”) presenta serias desventajas; en el caso de los analitos menos retenidos produciría ensanchamientos considerables de banda, mientras que en el caso de los más retenidos disminuiría la separación obtenida con anterioridad; por otra parte, los interferentes más retenidos también se introducirían en C-2.

4. Análisis y lavado (Figura 9 D)

Los analitos transferidos a la columna analítica C-2 son separados mediante la fase móvil M-2, mientras que, simultáneamente, la columna C-1 se lava mediante una fase móvil con suficiente fuerza eluotrópica para eliminar los interferentes más retenidos (I_2). En el caso de tener que utilizar una fase móvil con mayor poder de elución que M-1 (M-1^b), la columna debe de ser acondicionada posteriormente con M-1, antes de proceder a la siguiente inyección.

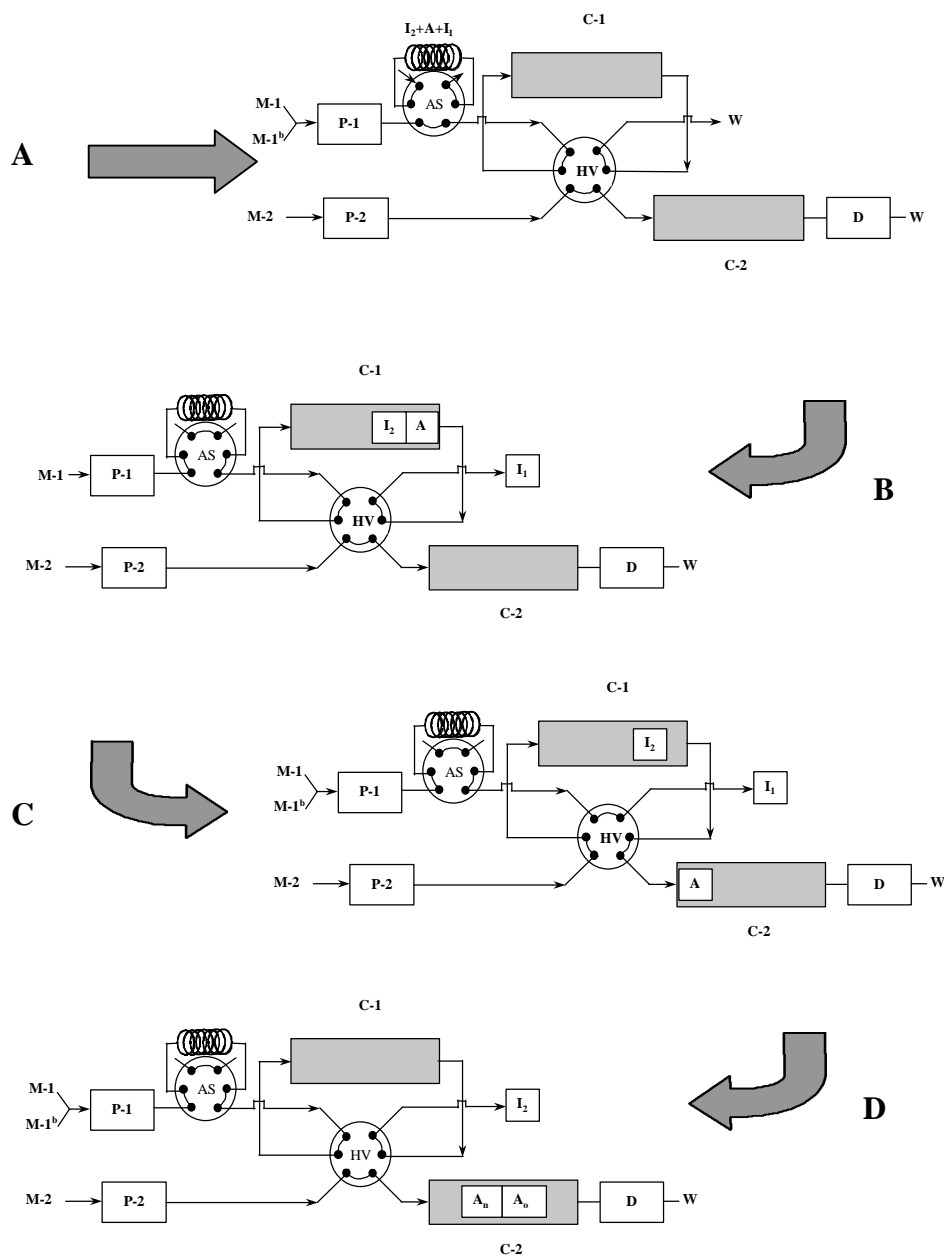


Figura 9. Etapas de un procedimiento con acoplamiento LC-LC.

(A) Inyección (B) Purificación (C) Transferencia (D) Análisis

C-1 y C-2, primera y segunda columna separadoras; AS, autoinyector o inyector manual; A, fracción de analito; A_n , A_o , analitos de la muestra; I_1 e I_2 , interferentes de cabeza y cola, respectivamente; P-1 y P-2, bombas de LC; M-1, fase móvil para la purificación en C-1; M-1^b, fase móvil eluyente fuerte; M-2, fase móvil de C-2; HV, válvula de alta presión de 6 vías; D, detector; W, desecho.

2.1.2. Selección de las condiciones de acoplamiento

Los parámetros más relevantes a la hora de diseñar un procedimiento de análisis basado en LC-LC son la selección de la columna C-1 y la optimización de la fuerza eluotrópica de la fase móvil utilizada durante la purificación (M-1) (Hogendoorn *et al.*, 1991^a).

Selección de la columna C-1

La selección de la primera columna separadora es fundamental, como ya se ha comentado con anterioridad. Se ha comprobado que columnas de 15×3.2 mm d.i. rellenas con fase estacionaria C₁₈, son adecuadas para el análisis de plaguicidas moderadamente polares. Con la fase móvil adecuada la eficacia de estas columnas es suficiente para separar la mayoría de los interferentes de los analitos. Obviamente, las dimensiones de la columna C-1 pueden incrementarse en función de la polaridad de los compuestos de interés.

A partir de los estudios existentes en el campo del PRA mediante LC-LC se puede concluir que el uso de (pre)columnas separadoras (C-1) suficientemente largas, en combinación con procedimientos de preconcentración “*off-line*”, da lugar al desarrollo de métodos de análisis suficientemente sensibles y considerablemente selectivos.

Selección de M-1

La fuerza eluotrópica de esta fase móvil es fundamental en todo procedimiento basado en LC-LC para llevar a cabo una correcta purificación de la muestra. A este respecto, se debe llegar a una situación de compromiso, ya que, por una parte, la fuerza eluotrópica de M-1 debe de ser lo suficientemente baja para que en el caso de muestras acuosas se puedan inyectar grandes volúmenes de muestra de hasta varios ml, sin apreciable ensanchamientos de bandas de los analitos y, por otra parte, la fuerza eluotrópica debe de ser suficiente para que se consiga una buena resolución entre los interferentes y los analitos, tal y como se ha demostrado en varias aplicaciones anteriores (Goewie y Hogendoorn, 1985, 1987^a, 1987^b).

Una vez seleccionada la columna C-1 y fase móvil M-1, se tienen que optimizar las condiciones de acoplamiento, en cuanto a volumen de purificación y volumen de transferencia.

Optimización del volumen de purificación

La determinación de este parámetro se lleva a cabo fácilmente, conectando directamente la columna C-1 al sistema de detección utilizado, tal y como se muestra en la **Figura 10**, e inyectando el analito menos retenido (A_o), el cual es conducido a través de C-1 con un determinado volumen de fase móvil M-1. El tiempo transcurrido desde que se activa la válvula de inyección hasta que empieza a eluir el analito menos retenido de C-1 es el tiempo de purificación, y el volumen de fase móvil M-1 requerido corresponde al volumen de purificación. En el momento en que A_o empiece a eluir de C-1 se debe iniciar la transferencia selectiva de los analitos a C-2 usando la fase móvil M-2.

Optimización del volumen de transferencia

Se determina conectando C-1 al detector e inyectando el analito más retenido (A_n). Después de actuar la fase móvil M-1 durante el tiempo de purificación (**Figura 10**), se activa la válvula HV (**Figura 11**) y se eluye el analito A_n con un determinado volumen de M-2 que corresponde al volumen de transferencia. El tiempo transcurrido desde que termina la purificación hasta que eluye todo A_n es el tiempo de transferencia.

Es deseable que la fracción de muestra transferida durante este periodo de tiempo sea lo más pequeña posible para minimizar el ensanchamiento de bandas y para que se elimine el mayor número posible de especies interferentes. Esta es una de las principales limitaciones para el desarrollo de MRMs mediante LC-LC, ya que en estos métodos deben procesarse analitos con diferentes retenciones en C-1, requiriéndose, por lo tanto, volúmenes de transferencia elevados.

Tanto el volumen de purificación como el de transferencia deben de chequearse periódicamente con el fin de comprobar si se mantienen las condiciones de acoplamiento y evitar, de este modo, pérdidas del analito menos retenido (A_o), al

mismo tiempo que se comprueba que se lleva a cabo la transferencia completa del analito más retenido (A_n).

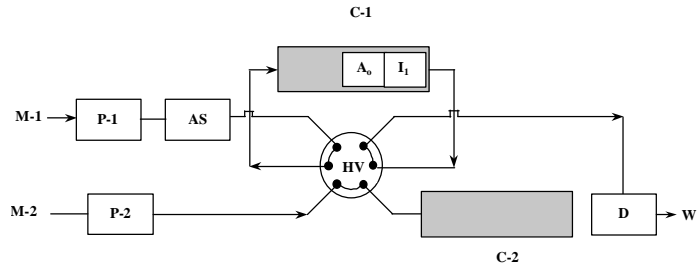


Figura 10. Representación esquemática del diseño necesario para la determinación experimental del volumen de purificación.

C-1 y C-2, primera y segunda columna separadora; AS, autoinyector; A_o , analito menos retenido en C-1; M-1, fase móvil utilizada para la purificación en C-1; I_1 , interferente menos retenido; P-1 y P-2, bombas de LC; M-2, fase móvil de C-2; HV, válvula de alta presión; D, detector; W, desecho.

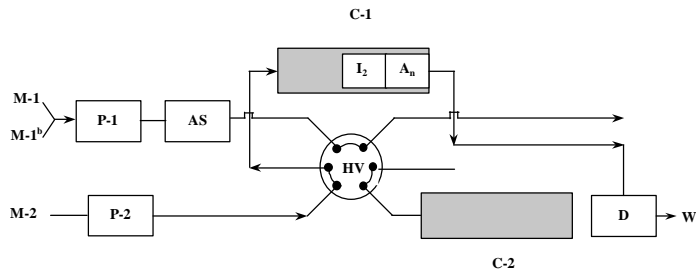


Figura 11. Representación esquemática del diseño necesario para la determinación experimental del volumen de transferencia.

C-1 y C-2, primera y segunda columna separadora; AS, autoinyector; I_2 , interferente más retenido; A_n , analito más retenido en C-1; P-1 y P-2, bombas de LC; M-1, fase móvil utilizada para la purificación en C-1; M-1^b, fase móvil eluyente fuerte para la eliminación de I_2 ; M-2, fase móvil de C-2; HV, válvula de alta presión; D, detector; W, desecho.

2.1.3. Aplicación del acoplamiento LC-LC al análisis de residuos de plaguicidas

El acoplamiento LC-LC no ha sido muy utilizado en el campo del PRA, en comparación con otras modalidades de acoplamiento, a pesar de la selectividad y sensibilidad inherentes a esta técnica, tal y como muestran las aplicaciones que a continuación se comentan.

Desde los primeros trabajos basados en esta técnica (Goewie y Hogendoorn, 1987^a, 1987^b) hasta nuestros días, se han descrito diversas aplicaciones para el análisis de plaguicidas, de polaridades medias o altas, en diferentes matrices (alimentos, suelos, aguas, etc.) (**Tabla 14**).

Cabe destacar que la mayoría de los procedimientos propuestos se han centrado en el análisis de uno o unos pocos analitos seleccionados, de modo que se llevan a cabo transferencias ajustadas de los mismos usando un pequeño volumen de fase móvil, siendo éstas las condiciones ideales para aprovechar la selectividad de la técnica, como ya se ha indicado anteriormente. Si a esto se le une la posibilidad de introducir grandes volúmenes de muestra, en el caso de matrices acuosas, los procedimientos desarrollados resultan además bastante sensibles.

Cabe destacar la aplicación de esta metodología para la determinación de compuestos especialmente problemáticos desde el punto de vista analítico como el cloroalilalcohol (CAAL), metabolito del fumigante del suelo 1,3-dicloropropeno (Hogendoorn *et al.*, 1990) utilizando como C-1 una columna C₁₈ de 50 × 3 mm d.i. y como C-2 una columna C₁₈ de 100 × 4.6 mm d.i. También se ha determinado con éxito la etilentiourea (ETU), metabolito polar que se forma por degradación de los etilendisitiocarbamatos (Hogendoorn *et al.*, 1991^b), obteniéndose directamente un límite de detección de 1 µg·l⁻¹, sin efectuar ningún tipo de preconcentración y usando dos columnas C₁₈ de 150 × 4.6 mm d.i. como C-1 y como C-2.

Más recientemente, se han determinado los herbicidas fosfónicos glufosinato, y glifosato, así como el principal producto de transformación de este último, el ácido amimometilfosfónico (AMPA), en diferentes matrices (Sancho *et al.*, 1994, 1996^a,

1996^b). Previamente a la determinación de los anteriores compuestos mediante LC-LC con detección fluorescente, se efectúa una reacción de derivatización química precolumna con 9-fluorenilmetilcloroformiato (FMOC) para obtener los correspondientes derivados fluorescentes. Esta reacción se produce en presencia de un 40 % de modificador orgánico (acetonitrilo), que al ser introducido en C-1 (usando grandes volúmenes, del orden de 2-3 ml) produce ensanchamiento de los picos de los analitos, requiriéndose una etapa de dilución $\times 8$ (en el caso del glifosato) y $\times 4$ (en el caso del glufosinato y del AMPA) que se lleva a cabo con tampón borato. La determinación conjunta de los tres compuestos en muestras de agua es posible ampliando el tiempo de transferencia desde C-1 (C₁₈ de 30 \times 4 mm d.i.) hasta C₂ (NH₂ de 250 \times 4.6 mm d.i.) obteniéndose límites de detección del orden de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Sancho *et al.*, 1996^a). Para la determinación por separado de los tres compuestos se pusieron a punto métodos individuales efectuando las diluciones previas más adecuadas para cada uno de ellos y con transferencia ajustada de cada especie, mejorándose los parámetros de sensibilidad y alcanzándose límites de detección del orden de 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (Sancho *et al.*, 1994, 1996^a). La técnica LC-LC también se aplicó con éxito para el análisis de glifosato y AMPA en suelos (Sancho *et al.*, 1996^b), alcanzándose límites de detección del orden de 5-50 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, en función del tipo de suelo analizado. Más recientemente, se ha llevado a cabo la determinación de residuos del herbicida glifosato en productos vegetales (olivas y tomateras) (Hernández *et al.*, 1999) mediante un procedimiento de derivatización de los extractos acuosos similar al utilizado para aguas y extractos de suelos, alcanzándose límites de detección del orden de 0.02 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

En el caso de analitos que presentan coeficientes de retención suficientemente altos ($k' > 50$) y coeficientes de absortividad molar altos ($\epsilon > 20000$) a longitudes de onda bastante selectivas ($\lambda > 220$ nm) se pueden desarrollar SRMs de análisis bastante rápidos, sensibles y selectivos. Este es el caso de la determinación de bentazon e isoproturon en muestras de agua (Hogendoorn y van Zoonen, 1992; Hogendoorn *et al.*, 1993).

Otra posibilidad, incorporada en algunas aplicaciones cuando la determinación de los analitos no se puede llevar en condiciones tan favorables como las anteriores, ha sido la adición de etapas de enriquecimiento “*off-line*” (evaporación, LLE, SPE) previamente a la determinación por LC-LC, de forma que se consigue mejorar la sensibilidad global de los procedimientos (Goewie y Hogendoorn, 1987^b; Hogendoorn y Goewie, 1989; Hogendoorn y van Zoonen, 1990; Baumann *et al.*, 1991; Hogendoorn *et al.*, 1991^b; Hogendoorn *et al.*, 1992; Sancho *et al.*, 1993).

Aunque, como se ha indicado con anterioridad, la utilización del acoplamiento LC-LC no es muy compatible con el desarrollo de MRMs de análisis, Hogendoorn y van Zoonen (1990) describieron la determinación de 9 plaguicidas (Benazolin, Bentazon, Bromoxinil, Cloridazona, Desmedifam, Ioxinil, Metoxuron, Metabenzotiazuron) en cereales mediante LC-LC, haciendo uso de una columna C-1 C₁₈ de 50 × 3 mm d.i. y de una columna C-2 también C₁₈ de 100 × 3 mm de d.i. En este caso se prescindió de parte de la selectividad de la técnica al trabajar con volúmenes de transferencia muy elevados, que permitieron sin embargo eliminar los interferentes poco retenidos, que son los que normalmente predominan en muestras medioambientales (Hogendoorn y van Zoonen, 1995).

Posteriormente, Sancho *et al.* (1993) describieron la determinación multiresidual de 8 herbicidas clorofenoxiácidos mediante LC-LC, llevando a cabo, en este caso, la transferencia de todas las especies con sólo 0.5 ml de fase móvil M-2 desde una primera columna de tipo RAM (“*Restricted Access Media*”) con relleno ISRP (“*Internal Surface Reversed Phase*”) hasta una columna C-2 C₁₈ convencional. En la actualidad, se ha demostrado que el uso de columnas RAM es muy útil para el análisis de herbicidas ácidos en aguas con elevados contenidos de ácidos fúlvicos y húmicos, ya que se lleva a cabo una exclusión de los componentes de la muestra en función de su tamaño, además de producirse interacciones adicionales de tipo fase inversa o intercambio iónico (Hogendoorn *et al.*, 1998).

Se puede concluir, por tanto, que el acoplamiento LC-LC resulta muy útil en el campo del PRA, para la determinación selectiva y sensible de especies polares en

diferentes matrices. Sin embargo, cabe resaltar que ha sido poco utilizado en este campo, a pesar de las notables ventajas que esta técnica aporta y que se ponen de manifiesto en los trabajos presentados hasta el momento. Posiblemente, las mayores dificultades de manejo, el desconocimiento de la técnica, la necesidad de tener que optimizar un mayor número de variables, así como la mayor complejidad instrumental en comparación con la LC convencional, sean la causa de las escasas aplicaciones de esta modalidad de acoplamiento.

2.1.4. Referencias

- Baumann, R.A.; Dijkman, E.; Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1991), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **56**, 941.
- Goewie, C.E.; Brinkman, U.A.Th.; Frei, R.W., (1981), *Anal. Chem.*, **53**, 2072.
- Goewie, C.E.; Kwakman, P.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th.; Maasfeld, W.; Seshadri, T.; Kettrup, A., (1984), *J. Chromatogr.*, **284**, 73.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A., (1985), *J. Sci. Total Environ.*, **47**, 349.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A., (1987^a), *J. Chromatogr.*, **410**, 211.
- Goewie, C.E.; Hogendoorn, E.A., (1987^b), *J. Chromatogr.*, **404**, 352.
- Hernández, F; Sancho, J.V.; Hidalgo, C., (1999), *Chromatographia*, enviado.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E., (1988), “*Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs*”, 5^a edición. Greve, P.A. editor, SDU Publishers, La Haya, Países Bajos, parte II, p.158.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E., (1989), *J. Chromatogr.*, **475**, 432.
- Hogendoorn, E.A.; De Jong, A.P.J.M.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.T., (1990), *J. Chromatogr.*, **511**, 243.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1990), *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent*, **55**, 1275.
- Hogendoorn, E.A.; Goewie, C.E.; van Zoonen, P., (1991^a), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 348.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P.; Brinkman, U.A.Th., (1991^b), *Chromatographia*, **31**, 285.
- Hogendoorn, E.A.; Verschraagen, C.; Brinkman, U.A.Th.; van Zoonen, P., (1992), *Anal. Chim. Acta*, **268**, 215.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1992), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **343**, 73.
- Hogendoorn, E.A.; Brinkman, U.A.Th.; van Zoonen, P., (1993), *J. Chromatogr.*, **644**, 307.
- Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1995), *J. Chromatogr. A*, **703**, 149.

- Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E.; Baumann, B.; Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Hernández, F., (1998) *Anal. Chem.*, en prensa.
- Sancho, J.V.; Hernández, F.; Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1993), *Anal. Chim. Acta*, **283**, 287.
- Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F.; Hogendoorn, E.A.; van Zoonen, P., (1994), *J. Chromatogr. A*, **678**, 59.
- Sancho, J.V.; Hernández, F.; López, F.J.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E.; van Zoonen, P., (1996^a), *J. Chromatogr. A*, **737**, 75.
- Sancho, J.V.; Hidalgo, C.; Hernández, F.; López, F.J.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E., (1996^b), *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **62**, 53.

Tabla 14. Determinación de residuos de plaguicidas por LC-LC.

<i>Analitos</i>	<i>Matriz</i>	<i>Detección (nm)</i>	<i>Volumen Inyectado (μl)</i>	<i>C-1 C-2</i>	<i>Purificación con M-1 Transferencia con M-2</i>	<i>LOD (ppb)</i>	<i>Ref</i>
Propoxur	Alimentos	FD 340/455	1000	15×3.2 mm RP-18, 7μm	M-1: 3.2 ml CH ₃ CN 5 %	0.5	Goewie y Hogendoorn, 1987 ^a
Carbofuran		FD 340/455		150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	M-2: 0.35 ml CH ₃ CN 35 %	0.5	
Carbaril		FD 340/455				0.5	
Bendiocarb		FD 340/455				0.5	
Tiofanox		FD 340/455				0.5	
Bromacilo	Agua de pozo	UV 254	100	15×3.2 mm RP-18, 7μm	M-1: 2.5 ml MeOH 10 %	0.2	Goewie y Hogendoorn, 1987 ^b
Diuron		UV 254		150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	M-2: 0.5 ml MeOH 65 %	0.01	
3,4-Dicloroanilina		UV 254				0.02	
Iprodiona	Zanahoria, hinojo y cebolla	UV 229	150	15×3.2 mm RP-18, 7μm	M-1: a) 2 ml CH ₃ CN 20 %;	50	Hogendoorn y Goewie, 1988
Vinclozolin		UV 229		150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	b) 0.5 ml CH ₃ CN 30 %;	50	
Procimidona		UV 229			c) 0.2 ml CH ₃ CN 40 %	50	
					M-2: 0.18 ml CH ₃ CN 50 %		
Bentazon	Agua potable, superficial y de lluvia	UV 229	100	15×3.2 mm RP-18, 7μm 150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	M-1: 2.5 ml MeOH 5% en tampon (pH 2.5) M-2: 0.5 ml MeOH 35 % en tampon (pH 2.7)	0.01	Hogendoorn y Goewie, 1989
Bentazon	Maíz y guisantes	UV 229	100	15×3.2 mm RP-18, 7μm	M-1: 4 ml MeOH 5% en tampon (pH 2.5)	20	Hogendoorn y Goewie, 1989
6-Hidroxi-bentazon		UV 229		150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	M-2: 0.5 ml MeOH 35 %	20	
8- Hidroxi-bentazon		UV 229				20	
Cianazina		UV 229				20	

Tabla 14. Determinación de residuos de plaguicidas por LC-LC (continuación).

<i>Analitos</i>	<i>Matriz</i>	<i>Detección (nm)</i>	<i>Volumen Inyectado (μl)</i>	<i>C-1 C-2</i>	<i>Purificación con M-1 Transferencia con M-2</i>	<i>LOD (ppb)</i>	<i>Ref</i>
Benazolin	Cereales	UV 217	50	50×3 mm C ₁₈ , 5 μm	M-1: 1.5 ml MeOH 25% en tampon (pH 2.7) M-2: 8.8 ml MeOH 35 %, 3.7 ml MeOH 45 % en tampon (pH 2.9)	50	Hogendoorn y van Zoonen, 1990
Bentazon		UV 217		100×3 mm C ₁₈ , 5 μm		50	
Bromoxinil		UV 217				50	
Cloridazona		UV 229				50	
Desmedifam		UV 233				50	
Fenfuram		UV 258				50	
Ioxinil		UV 233				50	
Metabenzotiazuron		UV 217				50	
Metoxuron		UV 240				50	
Cloroalilalcohol (CAAL)		Agua subterránea		UV 205		200	
			100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μm	0.01 0.02			
Tiram	Manzana	UV 280	50	50×4.6 mm C ₁₈ , 3 μm	M-1: 1.9 ml CH ₃ CN 40% en tampon (pH 5) M-2: 0.6 ml CH ₃ CN 70% en tampon (pH 5)	10	Baumann <i>et al.</i> , 1991
				100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μm			
DNOC	Suelo	UV 365	75	15×3.2 mm RP-18, 7μm	M-1: 1.1 ml MeOH 23% en tampon (pH 2.9) M-2: 0.8 ml MeOH 60 % en tampon (pH 2.9)	10	Hogendoorn <i>et al.</i> , 1991 ^a
Dinoseb		UV 365		50×4.6 mm C ₁₈ , 3 μm		10	
Dinoterb		UV 365				10	
Étilentiourea (ETU)	Aguas	UV 233	200	150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm	M-1: 2.6 ml CH ₃ CN 1% y NH ₃ 0.2% M-2: 0.44 CH ₃ CN 1% y NH ₃ 0.2%	1	Hogendoorn <i>et al.</i> , 1991 ^b
				150×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm		0.1	

Tabla 14. Determinación de residuos de plaguicidas por LC-LC (continuación).

Analitos	Matriz	Detección (nm)	Volumen Inyectado (μl)	C-1 C-2	Purificación con M-1 Transferencia con M-2	LOD (ppb)	Ref
Metilisotiocianato (MITC)	Aguas	UV 237	770	50×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m 100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m	M-1: 1.7 ml CH ₃ CN 40% M-2: 0.4 ml CH ₃ CN 50%	1 0.1	Hogendoorn <i>et al.</i> , 1992
Bentazon	Aguas	UV 220	2000	50×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m 100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m	M-1: 4.7 ml MeOH 50% en tampón fosfato M-2: 0.5 ml MeOH 60 % en tampón fosfato	0.1	Hogendoorn y van Zoonen, 1992
Isoproturon	Aguas	UV 244	4000	50×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m 100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m	M-1: 5.85 ml CH ₃ CN 47.5% M-2: 0.4 ml CH ₃ CN 47.5%	0.1	Hogendoorn <i>et al.</i> , 1993
2,4-D; MCPA; 2,4- DP; MCPP; 2,4,5- T; 2,4-DB; MCPB y 2,4,5-TP	Aguas	UV 228	400	10×3 mm GFF, 5 μ m 100×4.6 mm C ₁₈ , 3 μ m	M-1: 1 ml MeOH 5% en TFA 0.05 % M-2: 0.5 ml MeOH 50% en TFA 0.05 %	0.1	Sancho <i>et al.</i> , 1993
Glufosinato	Aguas	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μ m 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μ m	M-1: 2.3 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.3 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	0.25	Sancho <i>et al.</i> , 1994
Glufosinato Glifosato AMPA	Aguas	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μ m 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μ m	M-1: 2.21 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.53 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	1	Sancho <i>et al.</i> , 1996 ^a
Glifosato	Aguas	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μ m 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μ m	M-1: 2.21 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.28 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	0.25	Sancho <i>et al.</i> , 1996 ^a

Tabla 14. Determinación de residuos de plaguicidas por LC-LC (continuación).

<i>Analitos</i>	<i>Matriz</i>	<i>Detección (nm)</i>	<i>Volumen Inyectado (μl)</i>	<i>C-1 C-2</i>	<i>Purificación con M-1 Transferencia con M-2</i>	<i>LOD (ppb)</i>	<i>Ref</i>
AMPA	Aguas	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μm	M-1: 2.55 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.18 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	0.25	Sancho <i>et al.</i> , 1996 ^a
Glifosato AMPA	Suelos	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μm	M-1: 2.12 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.41 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	10-100	Sancho <i>et al.</i> , 1996 ^b
Glifosato	Olivas y tomateras	FD 263/317	2000	30×4.6 mm C ₁₈ , 5 μm 250×4.6 mm NH ₂ , 5 μm	M-1: 2.2 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5) M-2: 0.3 ml CH ₃ CN 35% en tampón (pH 5.5)	10	Hernández <i>et al.</i> , 1999

2.2. Experimental. Aplicación del acoplamiento LC-LC al análisis de residuos de herbicidas seleccionados

Atendiendo al potencial que presenta el acoplamiento LC-LC dentro del campo del PRA, así como a las ventajas de esta técnica, citadas en el apartado anterior, se han desarrollado tres métodos analíticos rápidos, sensibles y selectivos que permiten la determinación de algunos de los herbicidas seleccionados en aguas mediante LC-LC con inyección de grandes volúmenes de muestra.

Los herbicidas estudiados han sido bromacilo y diuron, cuatro triazinas, y tres productos de transformación de atrazina (DIA, DEA, HA). La determinación conjunta de bromacilo y diuron se planteó debido a la amplia aplicación de ambos herbicidas en la Comunidad Valenciana, como componentes del formulado Krovar I comercializado por Du Pont. En relación a las triazinas, se seleccionaron aquellas que se habían detectado más frecuentemente en aguas superficiales de la Comunidad Valenciana, según los estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio, en los cuales también se había encontrado algún producto de transformación de la atrazina.

Con la utilización de la técnica de columnas acopladas LC-LC para la determinación de residuos de los herbicidas citados se pretende un doble objetivo:

- en primer lugar, desarrollar métodos de análisis selectivos, pese a utilizar sistemas de detección convencionales, al eliminar, de manera completamente automatizada, la mayor parte de los interferentes de la muestra
- desarrollar métodos de análisis sensibles, al poder introducir grandes volúmenes de muestra en la primera columna cromatográfica (C-1)

El sistema de columnas acopladas utilizado en todos los casos estudiados consiste en una primera columna (C-1) de pequeñas dimensiones (30×4 mm d.i.) rellena con fase reversa C_{18} y en una segunda columna (C-2) de mayor longitud ($100/125 \times 4.5$ mm d.i.) rellena con la misma fase, de modo que aunque no se recurre a separaciones ortogonales se aprovecha el poder de separación de ambas columnas.

El grado de selectividad y sensibilidad que se puede alcanzar con un procedimiento LC-LC depende del volumen de muestra que se puede inyectar en la primera columna y transferir a la segunda sin producir un ensanchamiento de bandas excesivo de los analitos.

Las etapas a seguir para la optimización de los procedimientos analíticos desarrollados en este capítulo se presentan a continuación.

En primer lugar, se obtienen las longitudes de onda máximas de absorción de cada analito mediante los correspondientes espectros de absorción; a partir de los cuales se estiman los coeficientes de extinción molares () utilizando la ley de Lambert-Beer:

$$e = \frac{A}{cb}$$

donde A es la absorbancia del plaguicida a la longitud de onda seleccionada, c es la concentración molar del mismo y b es la anchura de la cubeta.

A continuación, se estudia el comportamiento cromatográfico de los analitos en C-2. Para estas experiencias se utilizan volúmenes de muestra habituales en LC (100 μ l) y se estudia la influencia del modificador orgánico (MeOH o CH₃CN) en la separación de los analitos. Con los resultados obtenidos se pueden estimar los correspondientes factores de capacidad (k'), a partir de la expresión:

$$k' = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

donde t_r es el tiempo de retención de cada analito y t_0 es el tiempo correspondiente al volumen muerto de la columna. A modo de ejemplo, en la **Figura 12** se presentan los factores de retención obtenidos para bromacilo y diuron en función del contenido de modificador orgánico. Se observa que al aumentar el contenido de modificador orgánico disminuye la resolución de los picos, de modo que con un 75 % de MeOH ambos analitos coeluyen.

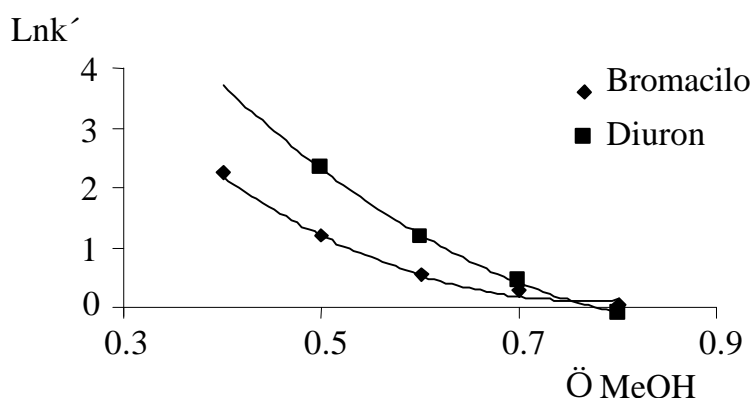


Figura 12. Retención de bromacilo y diuron en una columna C_{18} (100×4.5 mm d.i., $3 \mu\text{m}$) en función del contenido en MeOH.

Las curvas representadas en la **Figura 12** se pueden ajustar a ecuaciones de segundo grado, según la expresión:

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

En la **Tabla 15** se recogen los coeficientes a , b y c junto con los coeficientes de correlación para los herbicidas estudiados en este capítulo. Cabe destacar que los valores del coeficiente a corresponden al $\ln k'$ para 100 % de fase acuosa.

Cuando se introducen grandes volúmenes 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 de la disolución de la muestra, en nuestro caso agua, es decisiva a la hora de conseguir que los analitos se retengan, idealmente en cabeza de columna, durante la etapa de inyección.

Uno de los parámetros a optimizar, una vez estudiada la retención en la columna analítica C-2, es el máximo volumen de muestra que puede ser inyectado en C-1 utilizando la fase móvil M-1 adecuada. Para ello, se van introduciendo volúmenes crecientes de disoluciones patron ($100 \mu\text{l}$, $250 \mu\text{l}$, $1000 \mu\text{l}$, $2000 \mu\text{l}$), de

modo que la cantidad de analito sea siempre la misma, y se selecciona el mayor volumen de muestra que permita la transferencia ajustada de los mismos sin excesivos ensanchamientos de banda.

Tabla 15. Coeficientes de regresión y coeficientes de correlación de la regresión parabólica entre el factor de capacidad y el porcentaje de modificador orgánico (MeOH o CH₃CN) de la fase móvil para los herbicidas estudiados.

<i>Plaguicidas</i>	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>R</i> ²
<i>Bromacilo</i> ¹	8.9602	-0.2264	0.0014	0.991
<i>Diuron</i> ¹	12.316	-0.275	0.0015	0.999
<i>Simazina</i> ²	3.7010	-8.6545	4.825	0.999
<i>Atrazina</i> ²	5.069	-14.565	9.3679	0.998
<i>Terbutilazina</i> ²	6.9722	-15.342	8.825	1.000
<i>Terbutrina</i> ²	10.283	-23.357	14.103	1.000
<i>DIA</i> ³	3.2880	-0.1598	0.017	0.999
<i>HA</i> ³	5.2126	-0.2478	0.0026	0.999
<i>DEA</i> ³	5.2797	-0.2418	0.0026	0.999

¹ Rango de MeOH ensayado: 0.4-0.8; ² Rango de CH₃CN ensayado: 0.4-0.7; ³ Rango de CH₃CN ensayado: 0.1-0.4

Una vez seleccionado el volumen de muestra, se optimizan las condiciones de purificación y acoplamiento. Con este fin, la columna C-1 se conecta directamente al sistema de detección tal y como se describe en el apartado 2.1.2 de esta memoria. A modo de ejemplo, en la **Figura 13** se presenta el cromatograma utilizado para la optimización del tiempo de purificación y de transferencia en el caso particular de los herbicidas triazínicos estudiados en este trabajo. A la vista de esta figura, se observa que los analitos no están completamente resueltos en C-1; esto es lógico debido al pequeño tamaño de la columna C-1, ya que lo que realmente se pretende en esta columna es la pre-separación de los interferentes de la muestra. La verdadera separación de los analitos se llevará a cabo en la columna C-2. Cabe destacar que la compresión de los picos durante la etapa de transferencia depende de la fuerza eluotrópica de las fases móviles M-1 y M-2, las cuales se optimizan para evitar posibles ensanchamientos de banda. Los tiempos de purificación y transferencia de los analitos seleccionados se comprueban semanalmente, siendo normalmente bastante reproducibles.

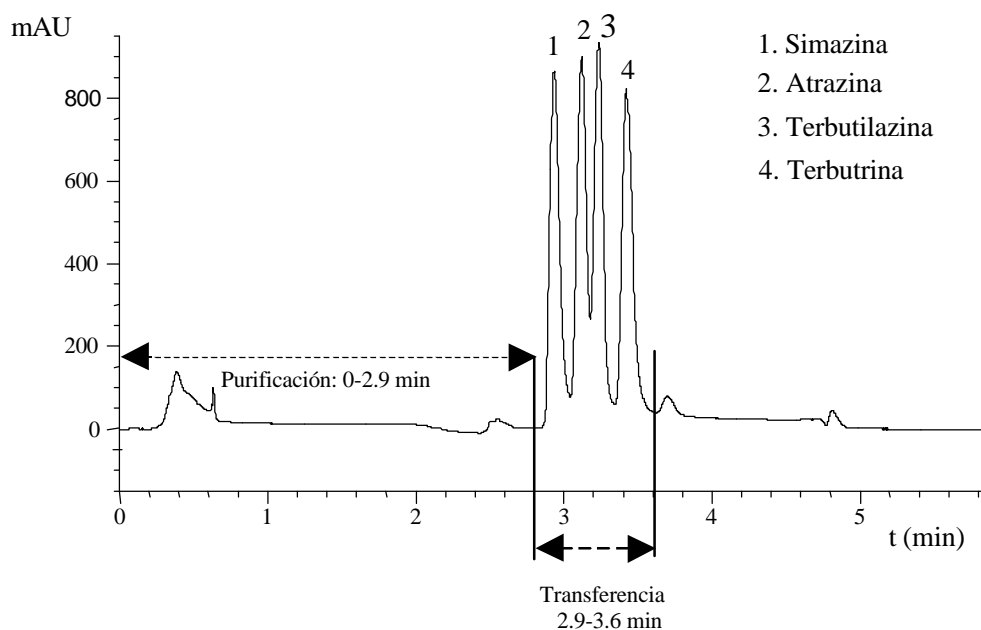


Figura 13. Cromatograma registrado con C-1 conectada al detector UV (223 nm) para una disolución patrón de herbicidas triazínicos de $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Volumen inyectado, 2 ml; C-1, columna C_{18} de 30×4 mm d.i., $5 \mu\text{m}$; M-1 (utilizada para la purificación), $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 40:60 v/v; M-2 (utilizada para la transferencia), $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ 70:30 v/v.

En el caso particular del bromacilo, se comprobó que los tiempos de purificación y transferencia dependían de la matriz de la muestra acuosa, tal y como se muestra en el trabajo experimental que se presenta en este capítulo. Este hecho hacía necesario comprobar las condiciones de acoplamiento para cada muestra. Sin embargo, este efecto se solventó posteriormente adicionando a las muestras una disolución de tampón fosfato, $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (pH 7), de concentración final en muestra 0.1 M. En la **Tabla 16** se recogen los tiempos de purificación y transferencia para la determinación de bromacilo y diuron en diferentes muestras de agua antes y después de tamponar.

En las **Figuras 14** y **15** se presentan los cromatogramas obtenidos conectando C-1 al detector UV e inyectando disoluciones de bromacilo preparadas en diferentes muestras de agua sin tamponar y tamponadas, respectivamente.

Tabla 16. Influencia de la matriz de la muestra, con y sin presencia de tampón, en las condiciones de acoplamiento LC-LC del herbicida bromacilo.

Muestra	<i>t</i> (purificación) min		<i>t</i> (transferencia) min	
	Muestra sin tamponar	Muestra tamponada*	Muestra sin tamponar	Muestra Tamponada*
Agua HPLC	5.64	4.7	1.26	0.9
Agua potable	3.74	4.65	2.86	0.9
Agua superficial	5.00	4.7	0.90	0.9

* Muestras tamponadas con K_2HPO_4/KH_2PO_4

También se tuvo que recurrir a tamponar la muestra para la determinación de atrazina y sus productos de transformación (DIA, DEA, HA), en particular para la correcta compresión de pico de la HA. En este caso se utilizó muestra tamponada con NH_4Ac hasta una concentración 1 M. La determinación de estos compuestos por LC-LC resultó bastante problemática debido a la diferente retención en C-1 entre los productos de transformación y el herbicida original. Este problema se solventó, sin embargo, abriendo suficientemente la ventana de transferencia (4.2 min) y utilizando un gradiente CH_3CN/H_2O como fase móvil M-2 durante la etapa de transferencia. A pesar de que éstas no son las condiciones ideales para aprovechar la selectividad inherente al acoplamiento LC-LC, tal y como ocurre cuando se llevan a cabo transferencias ajustadas de los analitos, el método permitió eliminar los interferentes menos retenidos de las muestras y determinar 4 analitos conjuntamente en diferentes muestras de agua.

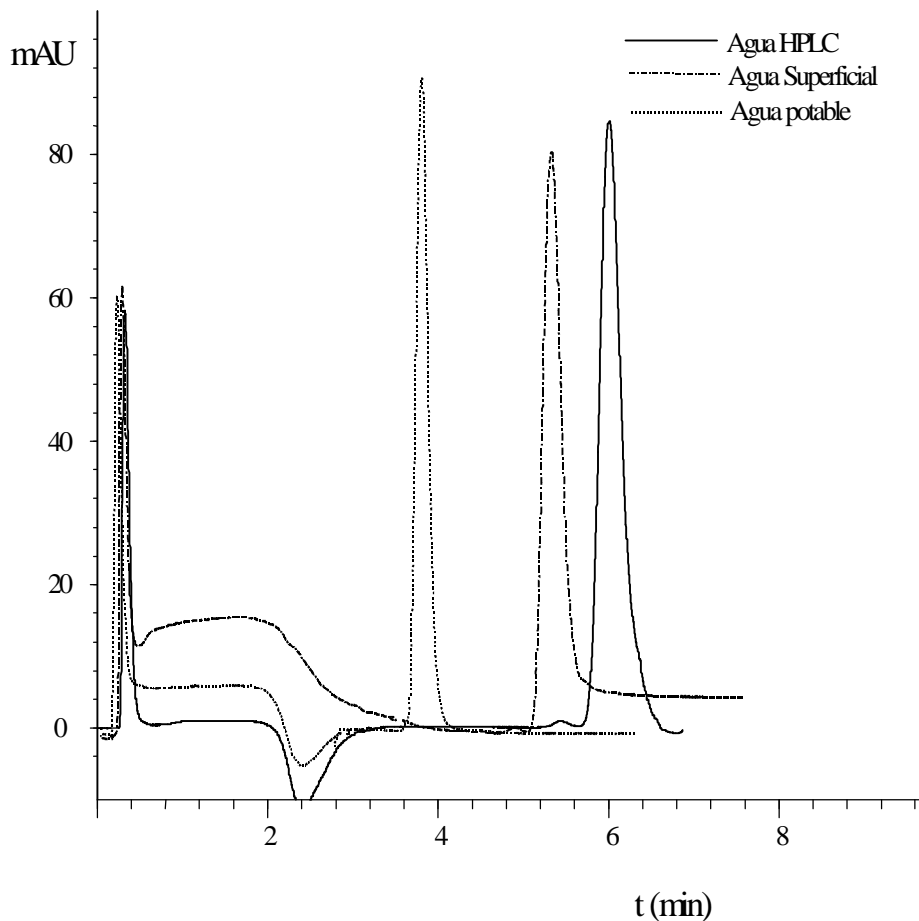


Figura 14. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector UV (277 nm) correspondientes a tres disoluciones de bromacilo de $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ preparadas en diferentes muestras de agua. Volumen inyectado, 2 ml; C-1, 30 \times 4 mm d.i. C_{18} 5 μm ; M-1, MeOH:H₂O 30:70 v/v.

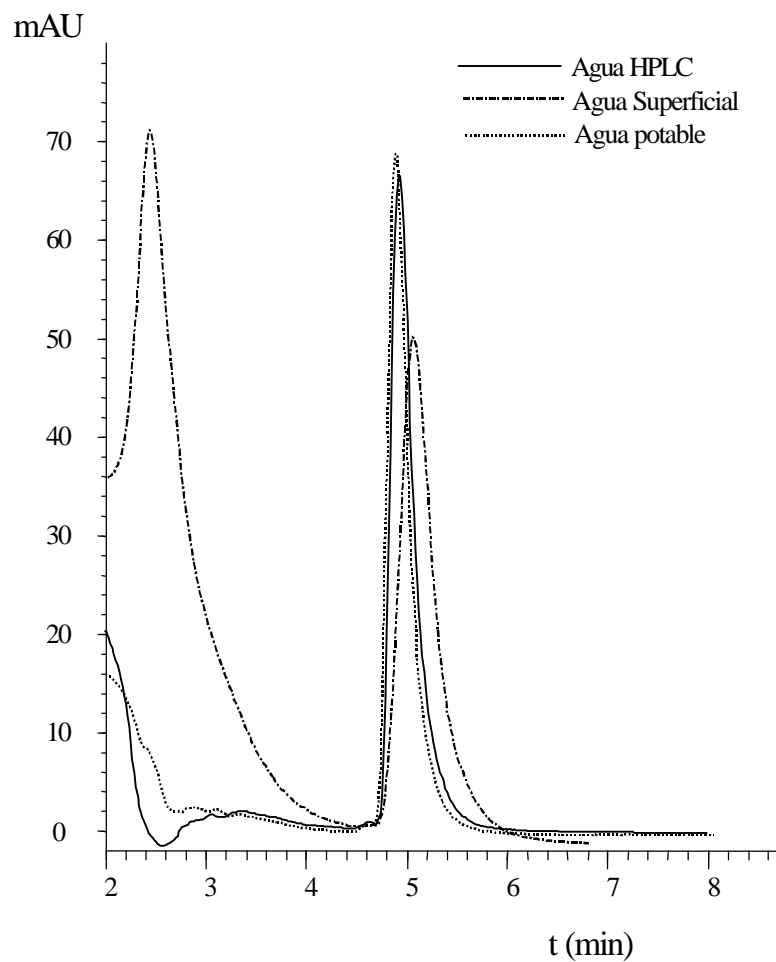


Figura 15. Cromatogramas registrados con C-1 conectada al detector UV (277 nm) correspondientes a tres disoluciones de bromacilo de $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ preparadas en diferentes muestras de agua tamponadas con mezcla $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$.

Volumen inyectado, 2 ml; C-1, 30 ´ 4 mm d.i. C_{18} 5 μm ; M-1, MeOH:H₂O 30:70 v/v.

Tras la optimización de las condiciones de purificación y transferencia se lleva a cabo finalmente el acoplamiento de las dos columnas. Durante esta etapa se puede finalizar la optimización de la fase móvil M-2, de modo que permita mejorar la forma de los picos de los analitos en C-2.

A continuación, se pasa a estudiar los parámetros analíticos de los métodos desarrollados en cuanto a repetibilidad (7 inyecciones de una misma disolución patrón) y reproducibilidad (inyección de la misma disolución durante 7 días diferentes), así como linealidad en un intervalo determinado de concentración. A continuación, se presentan algunos resultados de los estudios de repetibilidad y reproducibilidad para la inyección de patrones (**Tabla 17-19**).

Tabla 17. Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección de patrones (n=7) de bromacilo ($1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) y diuron ($0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$).

<i>Herbicidas</i>	<i>Repetibilidad</i>		<i>Reproducibilidad</i>	
	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Bromacilo</i>	5	2	6	4
<i>Diuron</i>	10	1	11	3

Tabla 18. Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección de patrones (n=7) de triazinas a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

<i>Herbicidas</i>	<i>Repetibilidad</i>		<i>Reproducibilidad</i>	
	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>
<i>Simazina</i>	21	1	20.7	0.6
<i>Atrazina</i>	19	3	18	2
<i>Terbutilazina</i>	19	2	21	5
<i>Terbutrina</i>	18	3	15	6

Tabla 19. Repetibilidad y reproducibilidad del método desarrollado para la inyección de patrones (n=7) de atrazina y sus productos de transformación a $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

<i>Herbicidas</i>	<i>Repetibilidad</i>		<i>Reproducibilidad</i>	
	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>	<i>Área media</i>	<i>CV (%)</i>
<i>DIA</i>	49	3	51	3
<i>HA</i>	71	3	67	3
<i>DEA</i>	46	5	46	6
<i>Atrazina</i>	78	4	72	3

Una vez desarrollado cada método y obtenidas las características analíticas, la validación del método de análisis se completa mediante determinación de los analitos en diferentes muestras de agua fortificadas a varios niveles de concentración, estimándose a partir de las mismas los límites de detección alcanzables experimentalmente como el cociente señal/ruido. 3. En la **Tabla 20** se presentan los límites de detección directos obtenidos para los analitos seleccionados. Se observa que la LC-LC con LVI de muestra permite la determinación directa de plaguicidas a niveles inferiores a $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, alcanzándose en ocasiones límites de detección del orden de $0.1\text{-}0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Sin embargo, si se requiriera la determinación a niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, tal como exige la actual legislación para aguas potables, entonces sería necesaria una preconcentración previa, tal como se ha efectuado en el caso de las triazinas y de sus productos de transformación. Las experiencias de preconcentración se han llevado a cabo mediante SPE en cartuchos C_{18} (triazinas y TP's) o SCX (atrazina y TP's).

Tabla 20. Límites de detección ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) experimentales ($S/N=3$) para los plaguicidas seleccionados, determinados mediante inyección directa de la muestra y mediante SPE "off-line" de 100 ml de muestra de agua, haciendo uso en ambos casos de la técnica LC-LC.

<i>Herbicidas</i>	<i>LOD¹</i>	<i>LOD²</i>
<i>Bromacilo</i>	0.1-0.2	-
<i>Diuron</i>	0.1	-
<i>Simazina</i>	0.1	0.02
<i>Atrazina</i>	0.2	0.02
<i>Terbutilazina</i>	0.2	0.02
<i>Terbutrina</i>	0.2	0.03
<i>DIA</i>	0.4	0.1
<i>HA</i>	0.5	0.1
<i>DEA</i>	0.5	0.1
<i>Atrazina</i>	0.2	0.1

¹, Límites de detección directos obtenidos mediante LC-LC tras inyección de 2 ml de muestra

², Límites de detección después de preconcentrar 100 ml de muestra

Los artículos científicos que se adjuntan presentan los resultados obtenidos mediante la técnica LC-LC aplicada al análisis de residuos de los herbicidas seleccionados en aguas. En éstos, se describen las características más relevantes de los métodos propuestos, así como los procedimientos recomendados y datos relativos a la validación de los mismos. También se plantean las posibilidades de aplicación a programas de control de plaguicidas, presentándose los resultados de muestras reales en las que se han detectado algunos de los herbicidas estudiados.

Los trabajos presentados en este capítulo son:

- *“Direct determination of bromacil and diuron residues in environmental water samples by coupled-column liquid chromatography and large-volume injection”*,
Journal of Chromatography A, **761**, 322-326 (1997)
- *“Trace determination of triazine herbicides by means of coupled-column liquid chromatography and large volume injection”*
Analytica Chimica Acta, **338**, 223-229 (1997)
- *“New method for the rapid determination of triazine herbicides and some of their main metabolites in water by using coupled-column liquid chromatography and large volume injection”*
Journal of Chromatography A, **778**, 171-181 (1997)

DIRECT DETERMINATION OF BROMACIL AND DIURON RESIDUES IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY AND LARGE-VOLUME INJECTION

J.V. Sancho*, C. Hidalgo and F. Hernández

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O. Box 224, 12080 Castellón, Spain

Received 28 May 1996; revised 25 September 1996; accepted 27 September 1996

Abstract

A rapid procedure for the determination of two herbicides in environmental water samples is described. The method makes use of the potential of coupled-column liquid chromatography for the trace determination of polar compounds by direct large-volume injection of aqueous samples. With direct injection of 2000- μ l samples, detection limits down to 0.1 μ g/l and an analysis time about 10 min can be achieved, rendering an overall procedure with a throughput of 50 samples per day. Drinking and surface water samples spiked at levels between 0.2 and 1 μ g/l yielded average recoveries between 83-107 % (n=5) with relative standard deviations between 3-8%. The calibration graphs are linear over at least three orders of magnitude.

Keywords: Water analysis; Pesticides; Environmental analysis; Large-volume injections; Bromacil; Diuron; Pesticides

1. Introduction

Reversed-phase column liquid chromatography (RPLC) can be used to determine small amounts of polar organic compounds in environmental water samples. An important advantage of RPLC in conjunction with aqueous samples is that the low eluotropic strength of water samples allows the injection of large sample volumes [1].

In recent papers, RPLC column-switching with ultraviolet or fluorescence detection using two separation columns was used for the sensitive and selective determination of polar analytes in environmental samples [2-5] in less than 15 min, which makes this technique very attractive for screening purposes. Relevant aspects of column-switching optimization for the determination of moderately polar pesticides have been reviewed [6,7].

Bromacil and diuron, the active ingredients in the commercial herbicide Krovar, marketed by DuPont, are widely used in the Castellón area for weed control in citrus orchards. Residues of the former have been found recently in surface water samples from a wet area nearby which is within a pesticide monitoring program [8]. Both compounds can be analysed either by gas chromatography (GC) or liquid chromatography (LC), but the later approach easily allows the simultaneous determination of the analytes without additional pre-derivatization steps. Therefore the development of an LC procedure will be very useful for fast screening in monitoring programs.

RPLC has been used for the determination of diuron, among other phenylureas [9-17] as well as for the multiresidual analysis of polar herbicides, including bromacil and diuron [18-22] in environmental water samples, but herbicides usually applied in weed control have not been focused on. Bromacil and diuron have been analysed by RPLC following a column-switching procedure [23] by performing an off-line liquid-liquid extraction of 1 l water sample and subsequent concentration by a Kuderna-Danish evaporator, which makes the overall procedure long and

tedious. Therefore, the availability of a large volume injection LC-LC procedure makes screening of these analytes more sensitive, more selective and faster.

In this paper, the suitability of large-volume injection coupled-column LC technique was investigated for the rapid determination of residues of bromacil and diuron in environmental water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Bromacil and diuron (content >99%) were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Methanol and acetonitrile, both HPLC-grade, were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA).

Stock standard solutions (ca. 400 µg/ml) of bromacil and diuron were prepared in methanol. Meanwhile, mixed diluted standards were prepared with HPLC-grade water. MeOH-water (30:70) was used as the first (M-1) mobile phase and MeOH-water (65:35) as the second (M-2) mobile phase.

2.2. Equipment

The modular LC system consisted of a Model 1050 sampler (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), a manual injector which, equipped with a 2.0-ml loop, was used to perform large-volume injections (LVI), a Model 1050 gradient LC pump, (Hewlett-Packard), a Model C6W six-port switching valve driven by a WE-II actuator from Valco (VIGI, Schenk, Switzerland) and time controlled by the sampler, a Model 2150 isocratic LC pump from LKB (Bromma, Sweden), a Model 1050 ultraviolet detector (Hewlett-Packard) set at 277 nm and 250 nm (time programmed), a 30 × 4.6 mm I.D. first separation column (C-1) packed with 5-µm

Spherisorb ODS-2 from Scharlau Science and a 100 × 4.6 mm I.D. second separation column (C-2) packed with 3- μ m Microsphere C₁₈ from Chrompack (Middleburg, Netherlands). C-2 was kept at 30°C in the column heater of the Model 1050 pump.

Recordings of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a Hewlett-Packard HPLC Chem Station (software version G1034A). A MicropH 2001 pH meter and Pipetmans (200-, 1000- and 5000- μ l) were obtained from Crison Instruments (Barcelona, Spain) and Gilson, respectively.

Recordings of spectra were performed with a spectrophotometer Model UV-240 from Shimadzu.

2.3. Procedure

The mobile phases were set at a flow-rate of 1 ml/min. 2 ml of the water sample, prefiltered for surface waters, was injected onto C-1. After clean-up with a certain volume of M-1 (injection volume included), C-1 was switched on-line with C-2 for a short time to transfer the fraction containing bromacil and diuron to C-2. After transferring, C-1 was rinsed and conditioned with M-1 while the analytes were separated on C-2 with M-2. Quantification of analytes was done by external calibration with standard solutions in water.

The clean-up and transfer times were matrix-dependent for bromacil, so the clean-up and transfer times were slightly different, as shown in **Table 1**.

Table 1. LC-LC coupling conditions for bromacil and diuron in different water matrices

	Clean-up volume M-1 (ml)	Transfer volume M-2 (ml)
HPLC water	5.64	1.26
Drinking water	3.74	2.86
Surface water	5.00	0.90

3. Results and discussion

The UV spectra of both analytes were recorded in order to evaluate their maxima wavelength and UV response. In the case of diuron, $\lambda_{\text{max}} = 250 \text{ nm}$ and $\epsilon = 22144 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, and for bromacil, $\lambda_{\text{max}} = 277 \text{ nm}$ and $\epsilon = 7885 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

As discussed in earlier work [4], the attainable sensitivity and selectivity of a coupled-column procedure will depend on how much sample can be injected on the first column and transferred to the second column without excessive band broadening of the analytes. Two processes are important, the elution of the analytes during injection and the peak compression prior to transfer. Applying large-volume injections (LVI), elution on C-1 must be considered as a step gradient elution in which the same volume acts as the first mobile phase. An important advantage of working with aqueous samples is that the low eluotropic strength of water samples allows the injection of large sample volumes.

Earlier studies [1-3,7] have shown that successful coupled-column LC analysis of highly polar organic compounds in aqueous samples can be carried out, even with low retention on C_{18} bonded silica, non-selective UV detection wavelength or low molar extinction coefficient. Better results are expected for analytes for which the stated parameters are more favourable, as for bromacil and diuron (**Table 2**), showing selective detection wavelengths, high molar extinction coefficients and high k' values in pure aqueous solutions, allowing large volume injection without additional band broadening.

Therefore, the volume injection was studied injecting 400 and 200 ng for bromacil and diuron respectively, on C-1 (30 mm long, packed with 5- μm C_{18}) with a mobile phase MeOH-water (40:60, v/v). The volumes studied range from 100 to 4000 μl , showing the possibility of performing LVI with good peak shape (width and asymmetry) even up to 4.0-ml injection.

Selecting a sample volume of 2.0 ml, as a compromise between required sensitivity and speed of analysis, the mobile phase compositions were optimized for both M-1 and M-2, in order to obtain the best performance in sensitivity and selectivity. Mobile phase compositions (M-1) ranging between 30-40% MeOH and M-2 between 60-65% MeOH were assayed. Finally, 30% MeOH and 65% MeOH were chosen as M-1 and M-2, respectively.

When attempting to apply this procedure to drinking and surface water samples spiked with bromacil and diuron, the procedure failed in the determination of the more polar herbicide, bromacil. After disregarding degradation or wavelength maximal shift, we concluded that the problem was a wrong “heart-cutting” due to matrix interferences. Bromacil was affected by the water matrix, changing slightly its retention on C-1, but enough for completely losing it with the proposed procedure developed with standard solutions. Therefore, there are several approaches to solve this problem, by avoiding sample handling in order to speed up analysis, different coupling conditions were established depending on water sample source, yielding a robust procedure, as after three months of daily use the cleanup and transfer volumes remained constant.

The response of bromacil and diuron was linear for standard solutions as well as for spiked drinking and surface water samples, with concentrations between 0.5 and 400 $\mu\text{g/l}$ ($r > 0.9996$, $n = 6$). The described procedure (see Section 2) was validated by analysing various types of water samples spiked with bromacil and diuron. The recoveries at several levels are given in **Table 3**. The performance of the procedure is illustrated in **Fig. 1** and **Fig. 2**, which show the LC-LC analysis of drinking and surface water samples spiked at 0.2-0.4 $\mu\text{g/l}$, respectively, obtaining limits of detection ($S/N=3$) for both bromacil and diuron below 0.1 $\mu\text{g/l}$, which meet the requirements of the EU Drinking Water Directive [24].

Table 3. Recoveries and relative standard deviations (%) for bromacil and diuron in different water samples spiked at two levels (n=5)

	Bromacil		Diuron	
	1 µg/l	0.4 µg/l	0.5 µg/l	0.2 µg/l
Drinking water	107 (8)	88 (8)	86 (3)	96 (8)
Surface water	102 (6)	103 (8)	107 (3)	99 (7)

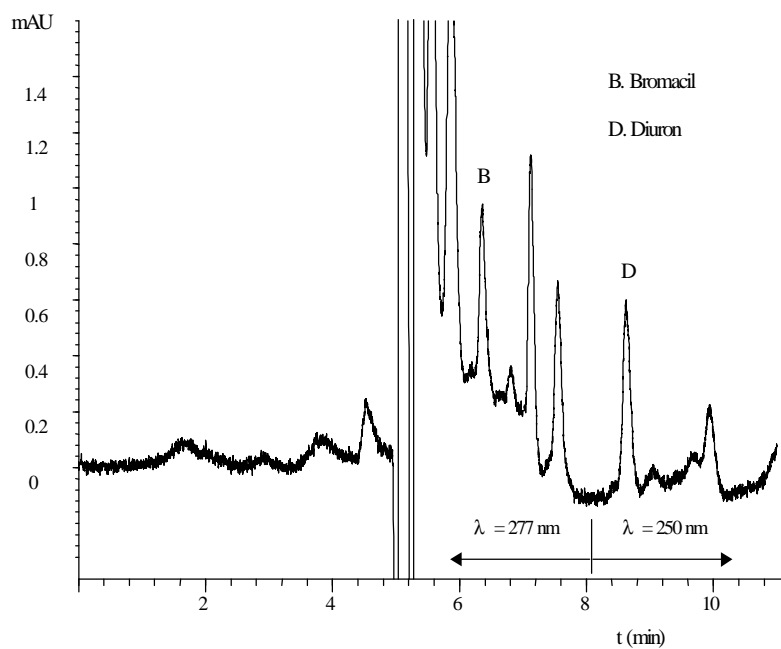


Fig. 1. LC-LC chromatogram of a drinking water sample spiked with bromacil (0.4 mg/l) and diuron (0.2 mg/l). Clean-up time 3.74 min, transfer time 2.86 min.

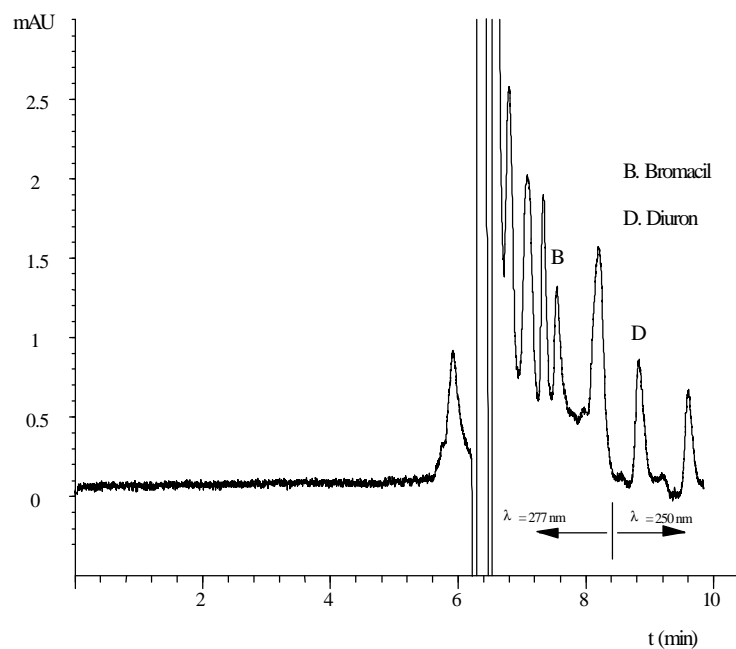


Fig. 2. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked with bromacil (0.4 mg/l) and diuron (0.2 mg/l). Clean-up time 5.00 min, transfer time 0.90 min.

The developed coupled-column procedure with direct injection of the sample is capable of assaying bromacil and diuron down to a level of 0.1 $\mu\text{g/l}$ in environmental water samples with a total analysis time of less than 10 min, yielding a high sample throughput of about 50 samples per day. Therefore, LVI-LC-LC is an useful technique for the fast trace analysis of polar herbicides in aqueous environmental samples. The procedure will be applied to real water samples; for such samples, additional confirmation of positive samples will be sought. The results will be published.

4. Conclusions

A sensitive and selective, coupled-column RPLC method was developed for the trace-level determination of bromacil and diuron in drinking and surface water samples. The high molar extinction coefficients combined with the relatively high injection volume and C₁₈ retention, provides sufficient sensitivity, while the application of small transfer volumes yields the required selectivity. The method has a high sample throughput, which makes it useful for screening purposes in environmental water samples at a level of 0.1 µg/l.

Acknowledgments

The scientific collaboration of Dr. E.A. Hogendoorn is greatly acknowledged.

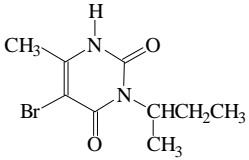
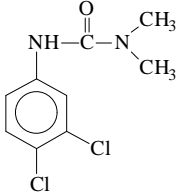
References

- [1] E.A. Hogendoorn, C. Verschraagen, P. van Zoonen and U.A.Th. Brinkman, *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 205.
- [2] E.A. Hogendoorn, A.P.J.M de Jong, P. van Zoonen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 511 (1990) 243.
- [3] E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen and U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, 31 (1991) 285.
- [4] J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, E.A. Hogendoorn and P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 678 (1994) 59.
- [5] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn and E. Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53.
- [6] E.A. Hogendoorn, C.E. Goewie and P. van Zoonen, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 348.

- [7] E.A. Hogendoorn and P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 149.
- [8] F. Hernández, R. Serrano, M.C. Miralles and N. Font, *Chromatographia*, 42 (1996) 151.
- [9] T.D. Behymer, T.A. Bellar and W.L. Budde, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 1686.
- [10] A. Di Corcia and M. Marchetti, *J. Chromatogr.*, 541 (1991) 365.
- [11] M.J. Incorvia Mattina, *J. Chromatogr.*, 549 (1991) 237.
- [12] H. Bagheri, E.R. Brouwer, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, *Analisis*, 20 (1992) 475.
- [13] H. Bagheri, E.R. Brouwer, R.T. Ghijsen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 647 (1993) 121
- [14] A. Balinova, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 203.
- [15] A. Lagana, A. Marino, G. Fago, B.P. Martínez, *Analisis*, 22 (1994) 63.
- [16] P. Parrilla, J.M. Martínez-Vidal, M. Martínez-Galera and A.G. Frenich, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 633.
- [17] R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 696 (1995) 63
- [18] C. Schlett, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 344.
- [19] J.M. Huen, R. Gillard, A.G. Mayer, B. Baltensperger and H. Kern, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 606.
- [20] J. Slobodnik, M.G.M. Groenewegen, E.R. Brouwer, H. Lingeman and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 642 (1993) 359
- [21] W.A. Minnard, J. Slobodnik, J.J. Vreuls, K.P. Hupe and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 696 (1995) 333.
- [22] S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen, and Wünsch, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 642.

- [23] C.E. Goewie and E.A. Hogendoorn, *J. Chromatogr.*, 410 (1987) 211.
- [24] 80/778/EEC, Council directive of 15th July 1980 relating to the quality of water for human consumption, European Commission, *Official Journal* L229/11-29, August 30th 1980.

Table 2. Properties of polar compounds analyzed by LVI-LC-LC with UV detection

Compound	Formula	$S_{\text{H}_2\text{O}}$ (g/l)	k'	λ (nm)	ϵ (l mol ⁻¹ cm ⁻¹)	Sample Vol (μ l)	LOD (μ g/l)
Bromacil		0.815	88	277	8000	2000	0.1
Diuron		0.042	> 100	250	22000	2000	0.1

TRACE DETERMINATION OF TRIAZINE HERBICIDES BY MEANS OF COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY AND LARGE VOLUME INJECTION

C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O. Box 224, 12080 Castellón, Spain.

Received 12 June 1996; revised 26 September 1996; accepted 29 September 1996

Abstract

Coupled-column liquid chromatography (LC-LC) with ultraviolet detection was used for the trace-level determination of simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn in environmental water samples. A sample volume of 2 ml was directly injected in the chromatographic system, using two reversed-phase C₁₈ coupled columns. The mobile phases consisted of two mixtures CH₃CN/H₂O, one with 40% of acetonitrile (M-1) and one with 70% (M-2). As a result, a rapid procedure with detection limits down to 0.1 µg·l⁻¹ was developed. The method was validated by means of recovery experiments. Drinking and surface water samples were spiked at 4 and 0.4 µg·l⁻¹ yielding average recoveries between 86-104 % (*n*=5) with coefficients of variation between 1-6%. The overall procedure allowed a sample throughput of up to 60 samples per day. Surface water samples from a wet area of Castellón (Spain) were analyzed by means of the proposed LC-LC procedure, thus simazine, terbuthylazine and terbutryn were detected at sub-µg·l⁻¹ levels. Lower detection limits, between 0.02-0.05 µg·l⁻¹, were reached by preconcentration of 100 ml of water samples on C₁₈ bonded phase solid phase extraction (SPE) cartridges. Drinking water samples spiked at 0.1 µg·l⁻¹ were preconcentrated and analyzed by LC-LC yielding average recoveries between 84-103% (*n*=3) with coefficients of variation between 2-5%.

Keywords: Liquid chromatography; Triazines; Simazine; Atrazine; Terbutylazine; Terbutryn; Coupled column LC (LC-LC); Large volume injection (LVI); Waters; Pesticide residue analysis.

1. Introduction

Triazines are well known herbicides which have been extensively applied in agriculture during the last few decades. Atrazine has been classified as a possible human carcinogen [1] and has been banned in some European countries [2,3]; however, it is still one of the most widely used herbicides in agriculture and its residues are frequently found in environmental samples together with other triazine residues [4-8].

The four triazine compounds studied in this work, simazine, atrazine, terbutylazine and terbutryn are citrus-selected herbicides widely used in the Comunidad Valenciana (Eastern Spain) and recommended alone or in commercial mixtures in Spanish orchards. Their residues have been detected in Comunidad Valenciana surface waters analyzed within a monitoring program during 1993-1994 [9].

According to the European Community regulations, the maximum amount allowed for single pesticides in drinking water is $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and for the sum of pesticides is $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ including toxic transformation products [10], so analytical methods with detection limits down to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ are required for pesticide monitoring in drinking water.

Common analytical methods proposed for the determination of triazine herbicides in water samples have used gas chromatography (GC) with nitrogen-phosphorus detector (NPD), electron capture detector (ECD) or mass spectrometry detection (MSD) [4, 11-15] and liquid chromatography (LC) in combination with ultraviolet (UV) or MSD [5-7,14,16-29]. Most of them are quite sensitive

multiresidual methods for several pesticides including some triazine compounds but obviously not focused on them. Finally, a few enzyme-linked immunosorbent methods have also been reported recently [30-32].

LC is usually the technique of choice for the determination of polar herbicides, and coupled to ultraviolet detection it is very suitable in the case of triazine residues due to their strong absorbance between 220-240 nm [33]. Generally, reported methods based on LC and UV detection require preconcentration steps of the water samples in order to improve their sensitivity. Liquid-liquid extraction has been used [4,9] but on- or off-line SPE using cartridges or membrane disks has been usually preferred due to its well documented advantages [34]. However, large volumes of sample (250-2000 ml) are normally preconcentrated [16-19,22-25] and evaporation steps are often necessary resulting in time-consuming methods with low sample throughput.

The aim of this work was to develop an alternative LC procedure for the trace-level determination of some triazine herbicides in environmental water samples more suitable for monitoring programmes.

Previous works have demonstrated that coupled-column reversed phase (RP) LC joined to large-volume injections is an adequate technique for the rapid, sensitive and selective determination of polar pollutants in environmental samples [35-38]. **Fig. 1** shows a schematic presentation of an LC-LC system. One of the most relevant aspects of this technique is the separation power of the first column C-1, which allows an automated sample clean-up (enhancement of selectivity) simultaneously with an enhancement of the overall sensitivity of the method due to the relatively large volume injected [39,40].

This paper presents an LC-LC method for the rapid, sensitive and selective determination of four triazine herbicides in environmental water samples using two C₁₈ coupled columns and large volume injection.

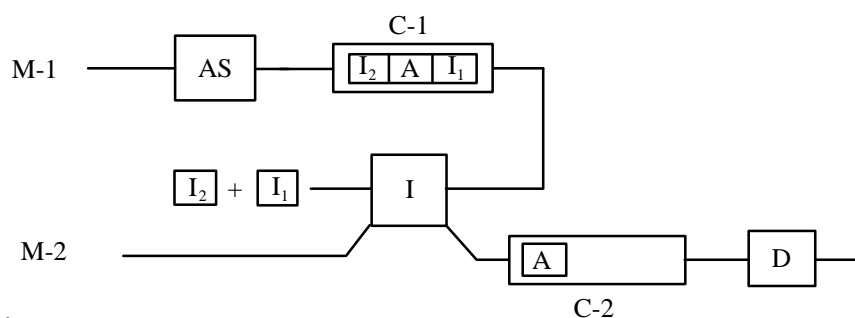


Fig. 1. Schematic representation of a coupled chromatographic system. *M-1* and *M-2* are mobile phase supplies, *AS* is the autosampler or injection device, *C-1* and *C-2* are the first and second separation column, respectively; *I* is the interface, *I₁* and *I₂* are sample interferences, *A* represents the analytes of interest and *D* is the UV detector.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). LC-grade methanol and acetonitrile, as well as acetone for pesticide residue analysis were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA).

Stock standard solutions of atrazine, terbuthylazine and terbutryn ($400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) were prepared in acetonitrile, meanwhile stock standard solution of simazine ($200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was prepared in methanol. These solutions were stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Diluted standard mixtures were prepared in LC water and stored at $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

A mixture $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (40:60 v/v) was used as the first mobile phase (*M-1*) and $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (70:30 v/v) as the second one (*M-2*).

Disposable 3 ml SPE cartridges containing 500 mg of C_{18} bonded phase were obtained from Varian (Harbor City, USA). C_{18} cartridges were preconditioned sequentially with 5-6 ml of methanol, acetone and LC water.

2.2. Equipment

The modular LC system consisted of a Model 1050 sampler (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), a manual injector of which, equipped with a 2.0 ml loop, was used to perform large-volume injections, a Model 1050 gradient LC pump (Hewlett-Packard), a model C6W six-port switching valve driven by a WE-II actuator from Valco (VIGI, Schenkon, Switzerland) and time-controlled by the sampler, a Model 2150 isocratic LC pump from LKB (Bromma, Sweden), a Model 1050 ultraviolet detector (Hewlett-Packard) set at 223 nm, a 30 × 4 mm i.d. first separation column (C-1) packed with 5 µm Spherisorb ODS-2 (Scharlau Science) and a 100 × 4.6 mm i.d. second separation column (C-2) packed with 3 µm Microsphere C₁₈ from Chrompack (Middelburg, The Netherlands).

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a Hewlett-Packard LC Chem Station (software version G1034A). Pipetmans (200, 1000 and 5000 µl) were obtained from Gilson.

Recording of spectra was performed with a UV-visible spectrophotometer UV-240 from Shimadzu (Kyoto, Japan). A Vac-Elut system from Varian (Harbor City, USA) was used to perform SPE.

2.3. Procedure

2.3.1. LC-LC analysis

A water sample volume of 2 ml was directly injected in the chromatographic system, introduced into C-1 by mobile phase M-1 set at 1 ml·min⁻¹. After a clean-up volume of 2.90 ml (injection volume included) the six-port switching valve was activated and a small fraction of sample (700 µl) was transferred from the C-1 column to the C-2 by means of mobile phase M-2 set also at 1 ml·min⁻¹. When the transfer was finished, the switching valve was activated again and the analytes were separated on C-2 using M-2, meanwhile C-1 was rinsed and conditioned with M-1.

Quantitation of analytes was done by external calibration with standard solutions in LC-grade water.

2.3.2. SPE experiences

100 ml of water sample was percolated through a preconditioned 500 mg C₁₈ cartridge at a flow rate of 5 ml·min⁻¹ and dried by passing air for 10 min. After elution with 2 ml of acetone, the eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen on a water bath at 45 °C and redissolved in 5 ml of LC-water. An aliquot of 2 ml was finally injected in the LC-LC system.

3. Results and discussion

The UV response as well as the maximum wavelength were evaluated from the UV spectra of the analytes. Firstly, retention on C₁₈ was studied using C-2 and capacity factors (k') for different mobile phases with an acetonitrile content ranging from 40 to 70 % were obtained. The results are shown in **Fig. 2**. It has been previously reported that relatively high C₁₈ retention combined with high molar extinction coefficients provides sufficient sensitivity in coupled-column RPLC with direct sample injection [39]. The RPLC-UV characteristics of the analytes are given in **Table 1**, which shows favourable retention as well as UV properties for the four analytes. So, this technique seems to be suitable for the determination of residues of the selected herbicides.

It is known that introduction of large volumes of sample combined with an appropriate peak-focusing during the analytes transfer from C-1 to C-2 produces an important enhancement of sensitivity in LC-LC. Furthermore, optimal selectivity is obtained with minimum transfer volumes as well as pre-separation of analytes and interferences on C-1 [39,40]. Different sample volumes (100-2000 µl) were assayed injecting standard mixtures of the analytes (400 ng) on C-1 with a mobile phase

consisting of CH₃CN/H₂O (40/60 v/v). 2.00 ml was selected as the more suitable sample volume because appropriate peak shapes were still obtained.

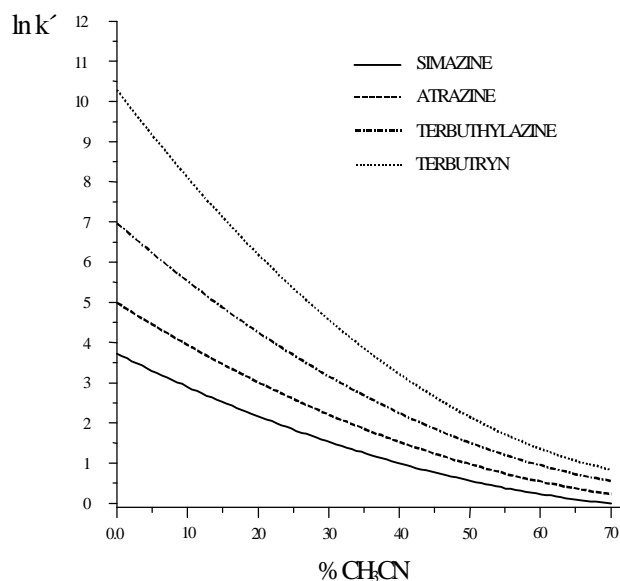


Fig. 2. Retention of triazine herbicides on a C₁₈ column vs. mobile phase composition plot. The retention is expressed in terms of capacity factor k' . Where $k' = (t_r - t_0)/t_0$. The values of t_r and t_0 represent the analyte retention time and the void time of the column, respectively.

Table 1. RPLC-UV characteristics of triazine herbicides.

Compound	k^a	(nm)	(10E4 l·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Simazine	41	223	3.67
Atrazine	>100	223	4.16
Terbuthylazine	>100	224	3.87
Terbutryn	>100	224	4.33

^a C₁₈ capacity factor using a 100 % aqueous mobile phase

In order to achieve some peak compression on C-2, a 100 × 4.6 mm I.D. column packed with 3 μm Microspher C₁₈ was selected as C-2, and mobile phases M-1 and M-2 were optimized. Compositions of acetonitrile of the range 30-40 % acetonitrile for M-1 and 40-70 % for M-2 were assayed. Finally, mobile phases 40 % and 70 % of CH₃CN were chosen as M-1 and M-2, respectively. With these mobile

phases a clean-up volume of 2.90 ml (sample injection included) and a transfer volume of 700 μl were estimated connecting C-1 with the UV detector. A chromatogram of a $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ standard solution obtained with the later chromatographic conditions is shown in **Fig. 3**. The response linearity was studied for standard solutions with concentrations 1-200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (**Table 2**), the highest sensitivity was obtained for simazine and the lowest for terbutryn.

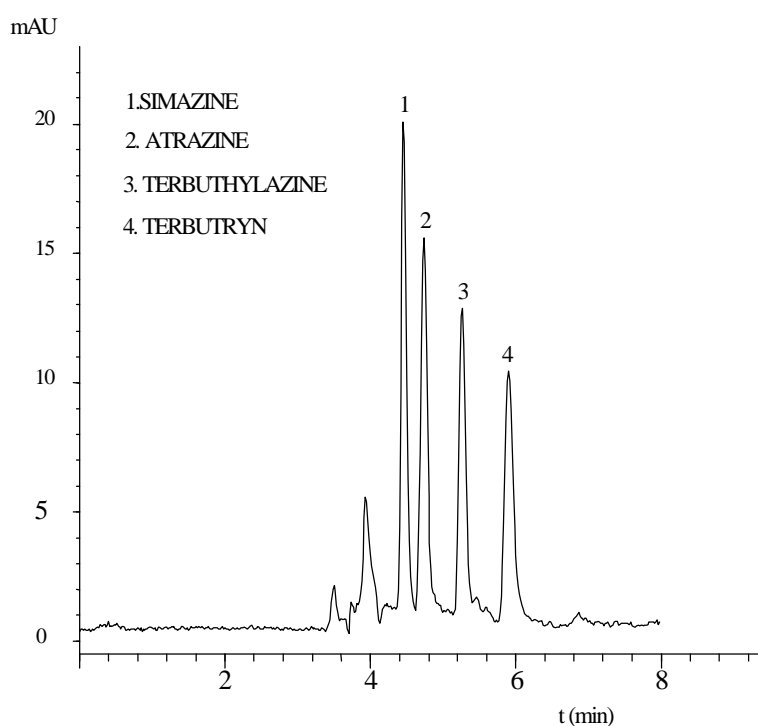


Fig. 3. LC-LC chromatogram of a $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ standard mixture solution at 223 nm. Volume injected 2 ml, clean-up time 2.90 min, transfer time 0.7 min. Blank subtracted.

Table 2. Calibration curves (1-200 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) for simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn in LC water samples

	Simazine	Atrazine	Terbuthylazine	Terbutryn
Standard error ^a	15.83	8.83	10.15	1.536
R	0.9992	0.9994	0.9992	0.9999
Intercept	10.73	6.925	6.183	-1.220
(SD ^b)Intercept	6.81	3.801	4.370	0.661
Slope	5.149	3.541	3.493	2.923
(SD)Slope	0.087	0.048	0.055	0.008

^a Standard deviation of residuals; ^b Standard deviation

The performance of the developed procedure was assessed in drinking and surface water samples spiked at two pesticide levels. The results, given in **Table 3**, are acceptable with regard to both recovery and reproducibility. A chromatogram of surface water sample spiked at $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and analyzed with the proposed procedure is shown in **Fig. 4**, yielding limits of detection about $0.1\text{-}0.15 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Table 3. Recoveries and coefficients of variation (%) for triazine herbicides in different water samples spiked at two levels (n=5)

Compound	Drinking water		Surface water	
	$4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
Simazine	102 (1)	95 (1)	103 (2)	102 (6)
Atrazine	98 (1)	87 (4)	96 (1)	96 (6)
Terbuthylazine	103 (2)	103 (4)	103 (4)	86 (6)
Terbutryn	104 (1)	96 (3)	96 (3)	96 (6)

Surface water samples from a wet area of Burriana (Castellón, Spain) called *Clot de la Mare de Deu* were analyzed by means of the developed procedure as pesticide residues have been found recently within a monitoring program [9]. Residues of three herbicides were detected (**Fig. 5**) at concentrations $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (simazine and terbuthylazine) and $0.9 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (terbutryn). Coefficients of variation (n=5) were found to be 1 % (terbutryn), 5 % (terbuthylazine) and 7 % (simazine).

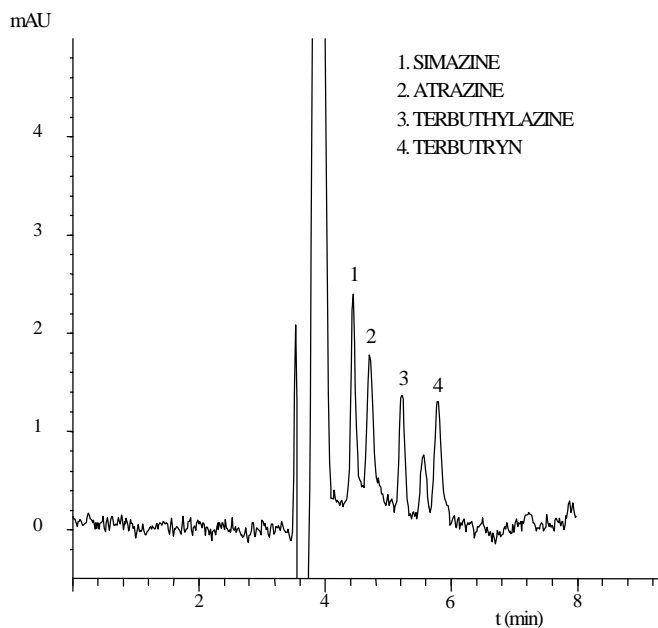


Fig. 4. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked at $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ with triazine herbicides registered at 223 nm. Volume of sample injected 2 ml, clean-up time 2.90 min, transfer time 0.7 min. Blank subtracted.

The recommended procedure was rapid, with a total analysis time of only 7 min without sample handling (except a prefiltering step in case of very dirty waters). In the same way, it was also greatly selective due to the accurately adjusted small transfer volume applied ($700 \mu\text{l}$) and finally, it was quite sensitive because of the large volumes of sample injected (2.00 ml) without additional band broadening. With regard to the robustness of the method, the two C_{18} columns maintained their performance during the time of experiments and readjustments of column-switching conditions (clean-up and transfer time) were not necessary, even five months later. Therefore, a robust, rapid, selective and sensitive method useful for monitoring programs was developed.

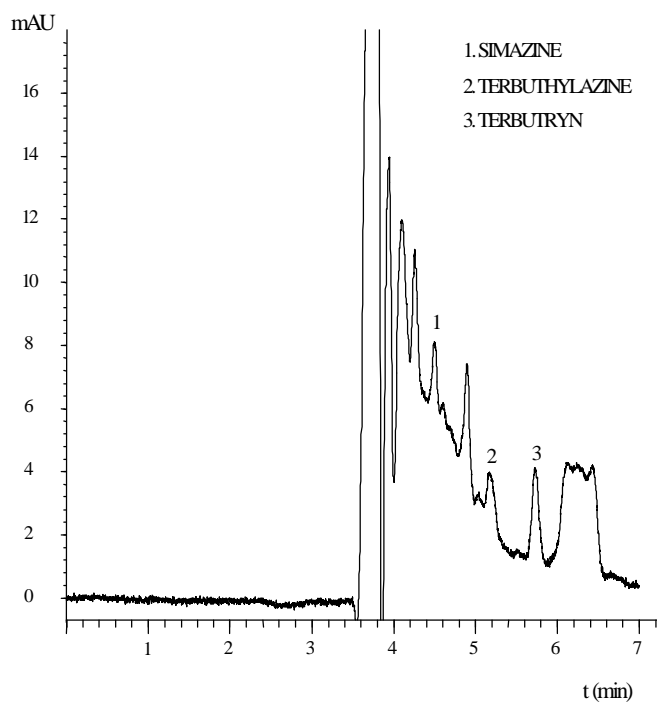


Fig. 5. LC-LC chromatogram of a real surface water sample. Volume of sample injected 2 ml, clean-up time 2.90 min, transfer time 0.7 min.

However, according to the EEC regulations for pesticide residues in drinking water [10], analytical methods with detection limits down to $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ are required in order to determine pesticides at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [41]. Thus, a more sensitive procedure was developed simply by adding a fast preconcentration step on C_{18} bonded phase cartridges previously to the LVI-LC-LC analysis, using only 100 ml of water sample.

Drinking water samples spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ were preconcentrated and analysed by means of the LC-LC proposed procedure. The results, given in **Table 4**, are satisfactory regarding both recovery and reproducibility. The performance of the SPE-LVI-LC-LC procedure is shown in **Fig. 6** for a drinking water sample spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ yielding limits of detection between 0.02 - $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Table 4. Recoveries and coefficients of variation for triazine herbicides in drinking water samples (100 ml) spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and preconcentrated on SPE cartridges ($n=3$)

Compound	Recoveries (%)	CV (%)
Simazine	96	4
Atrazine	89	5
Terbutylazine	103	2
Terbutryn	84	5

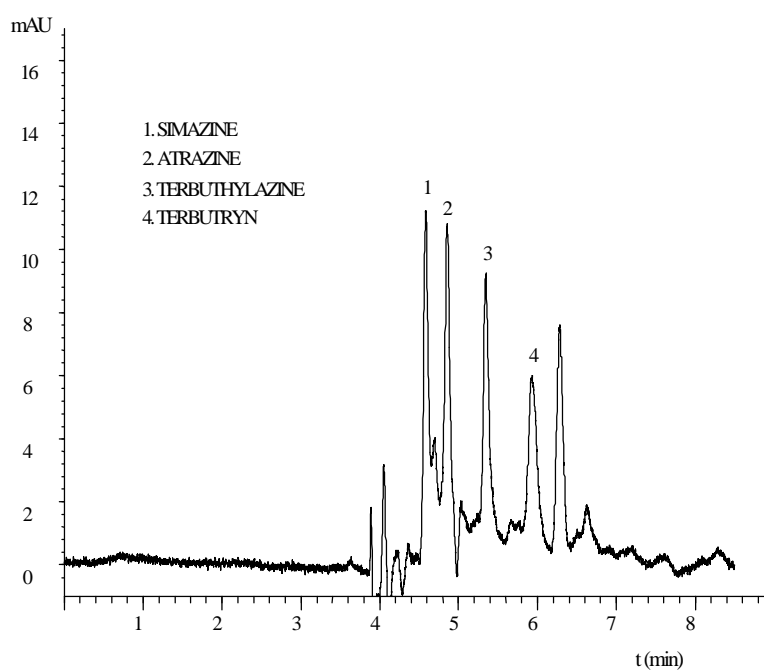


Fig. 6. LC-LC chromatogram of a drinking water sample spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ previously preconcentrated on C_{18} cartridges. Volume of extract injected 2 ml, clean-up time 2.90 min, transfer time 0.7 min. Blank subtracted.

4. Conclusions

The combination of coupled-column LC with direct large volume injection allowed the development of a rapid, selective and sensitive procedure for the trace-level determination of simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn in environmental water samples. The high sample throughput of the overall procedure, 60 samples per day, makes it suitable for monitoring programs compared with other proposed procedures which are excessively time-consuming. The developed procedure, with detection limits around 0.1-0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, has been applied to the rapid trace-level determination of the analytes in real surface water samples. Finally, the limit of detection can be lowered down to 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ by means of a simple preconcentration step.

References

- [1] U.S. Environmental Protection Agency, Drinking Water Health Advisory: Pesticides, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [2] Italian Health Ministry, O.M. 705/475, Rome, 1991.
- [3] H. Färber, K. Nick and H.F. Schöler, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 145.
- [4] G. Durand, V. Bouvot and D. Barceló, *J. Chromatogr.*, 607 (1992) 319.
- [5] H. Bagheri, E.R. Brouwer, R.T. Ghijssen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 647 (1993) 121.
- [6] V. Pichon and M-C. Hennion, *J. Chromatogr. A*, 665 (1994) 269.
- [7] M. Berg, S.R. Müller and R.P. Schwarzenbach, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 1860.
- [8] C. Skark and N. Zullei-Seibert, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 58 (1995) 387.

- [9] F. Hernández, R. Serrano, M.C. Miralles and N. Font, *Chromatographia*, 42 (1996) 151.
- [10] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, 1980.
- [11] Z. Cai, V.M.S. Ramanujam, D.E. Giblin, M.L. Gross and R.F. Spalding, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 21.
- [12] M. Psathaki, E. Manoussaridou and E.G. Stephanou, *J Chromatogr. A*, 667 (1994) 241.
- [13] C. Crespo, R.M. Marcé and F. Borrull, *J. Chromatogr. A*, 670 (1994) 135.
- [14] R. Eisert, K. Levsen and G. Wünsch, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 58 (1995) 103.
- [15] T.A. Albanis and D.G. Hela, *J. Chromatogr. A*, 707 (1995) 283.
- [16] C. Schlett, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 344.
- [17] D. Barceló, G. Durand, V. Bouvot and M. Nielen, *Environ. Sci. Technol.*, 27 (1993) 271.
- [18] A. Balinova, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 203.
- [19] A. Di Corcia, R. Samperi, A. Marcomini and S. Stelluto, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 907.
- [20] J. Slobodnik, M.G.M. Groenewegen, E.R. Brouwer, H. Lingeman and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 642 (1993) 359.
- [21] J. Lintelmann, C. Mengel and A. Kettrup, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 346 (1993) 752.
- [22] J.M. Huen, R. Gillard, A.G. Mayer, B. Baltensperger and H. Kern, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 348 (1994) 606.

- [23] C. Samara, J. Lintelmann and A. Kettrup, *Fresenius Envir. Bull.* 3 (1994) 534.
- [24] J. Schülein, D. Martens, P. Spitzauer and A. Kettrup, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 352 (1995) 565.
- [25] P. Vitali, E. Venturini, C. Bonora, R. Calori and R. Raffaelli, *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 219.
- [26] G. Sacchero, C. Sarzanini and E. Mentasti, *J. Chromatogr. A*, 671 (1994) 151.
- [27] R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull and U.A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A*, 696 (1995) 63.
- [28] S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen and G. Wünsch, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 642.
- [29] H. Prosen, L. Zupancic-Kralj and J. Marsel, *J. Chromatogr. A*, 704 (1995) 121.
- [30] L. Weil, R.J. Schneider, O. Schäfer, P. Ulrich, M. Weller, T. Ruppert and R. Nie ner, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 468.
- [31] D.S. Aga and E.M. Thurman, *Anal. Chem.*, 65 (1993) 2894.
- [32] G. Stangl, M.G. Weller and R. Nie ner, *Fresenius' J. Anal. Chem.*, 351 (1995) 301.
- [33] J. Tekel' and J. Kova i ová, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 291.
- [34] D. Barceló, *Analyst*, 116 (1991) 681.
- [35] E.A. Hogendoorn, A.P.J.M. de Jong, P. van Zoonen and U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, 511 (1990) 243.
- [36] E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen and U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia*, 31 (1991) 285.

- [37] J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, E.A. Hogendoorn and P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 678 (1994) 59.
- [38] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn and E. Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 62 (1996) 53.
- [39] P.van Zoonen, E.A. Hogendoorn, G.R. van der Hoff and R.A. Baumann, *Trend in Anal. Chem.*, 11 (1992) 11.
- [40] E.A. Hogendoorn and P. van Zoonen, *J Chromatogr. A*, 703 (1995) 149.
- [41] D. Barceló, *J. Chromatogr.*, 643 (1993) 117.

NEW METHOD FOR THE RAPID DETERMINATION OF TRIAZINE HERBICIDES AND SOME OF THEIR MAIN METABOLITES IN WATER BY USING COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY AND LARGE VOLUME INJECTION

F. Hernández*, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F.J. López

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

The "Separation Techniques, 1996" prize was awarded to this paper in the 8th JAI, Barcelona, Spain (1996).

Abstract

Coupled-column liquid chromatography with ultraviolet detection was applied to the trace-level determination of simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn, as well as the main atrazine metabolites, deisopropylatrazine, deethylatrazine and hydroxyatrazine, in environmental water samples rendering a very sensitive and rapid method which does not require any preconcentration step of the water sample. A sample volume of 2 ml, previously buffered with ammonium acetate for the determination of metabolites, was directly injected in the chromatographic system using two reversed-phase C₁₈ coupled columns. Detection limits between 0.1 and 0.5 µg·l⁻¹ were directly reached for both the parent pesticides and the polar metabolites.

All these compounds were successfully recovered from different environmental waters. Drinking and surface water samples were spiked at different concentration levels (1-20 µg·l⁻¹) yielding average recoveries between 86 and 104 % (*n*=5) with coefficients of variation between 1 and 7 %. If necessary, lower detection limits, between 0.02 and 0.1 µg·l⁻¹, were easily reached by preconcentration of 100 ml of water samples using SPE cartridges. Recovery experiments were performed on

drinking water samples spiked at 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ yielding average recoveries between 84 and 103 % with coefficients of variation between 1 and 6 %. © 1997 Elsevier Science B.V.

Keywords: Column switching; Water analysis; Large-volume injections; Pesticides; Triazines.

1. Introduction

Triazines are pre- and post- emergent herbicides which have been widely applied for crop protection during the last decades. Their residues have been frequently detected in environmental waters [1-5], usually at levels higher than European Community concentration limits for drinking water, which restrict the maximum amount allowed for single pesticides to 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and for the sum of pesticides to 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [6].

Atrazine, one of the most used triazine herbicides, has been banned in recent years in European countries like Italy and Germany [7,8]. Some information about the riskiness of this herbicide as a human carcinogen has been reported by the US Environmental Protection Agency [9]. Atrazine degrades slowly, once applied in soil, over a period of weeks to months [10]. By means of microbiological transformations its dealkylated metabolites, such as deisopropylatrazine (DIA) and deethylatrazine (DEA) are obtained; these two metabolites have also been found in surface and ground water [11, 12]. However, chemical hydrolysis is considered to be the predominant degradation pathway of atrazine in the environment [4], hydroxyatrazine (HA) being the major abiotic degradation product in water and soil [13].

Due to the large amount of these herbicides applied worldwide, numerous analytical methods have been reported until now. Most of the conventional methods proposed for the determination of triazine herbicides and/or some of their metabolites

have used GC with detection methods like MS, electron-capture detection or nitrogen-phosphorus detection [1,8,10,14-17]. In these methods, a preconcentration step with organic solvents or by solid phase extraction (SPE) is necessary in order to make the aqueous sample compatible with the chromatographic system, as well as to improve their global sensitivity yielding lower detection limits. However, they do not allow direct determination of the hydroxy metabolites, and a previous derivatization step, i.e., methylation with diazomethane [8], has to be applied. Therefore, HPLC with UV or MS detection has been usually preferred and numerous methods which generally include on- or off-line preconcentration steps have been proposed [2,3,5,8,10,13,18-25]. In recent years some enzyme-linked immunosorbent methods have also been developed [26-28].

Methods which include off-line preconcentration steps usually add one or more evaporation steps which increase considerably the total analysis time resulting in time-consuming methods, generally not suitable in monitoring programmes, where a large number of samples have to be analyzed. With regard to methods which include on-line preconcentration of analytes, they are in general quite sensitive and highly automated but still very time consuming, mainly when large amounts of sample are preconcentrated.

Coupled chromatographic techniques are amongst the most sensitive and selective techniques available for the trace-level determination of pollutants in environmental samples. Particularly, coupled-column reversed-phase (RP) LC (LC-LC) has been used in previous works for the determination of pesticide residues in different samples [29-33]. This technique now seems to be one of the most powerful and adequate approaches for the analysis of polar pesticides, especially their very polar transformation products, such as atrazine metabolites.

Fig. 1 shows a schematic representation of an LC-LC system. This technique involves two or more chromatographic separations and several steps: after the injection of a relatively large volume of sample on the first column (C-1) an

automated clean-up is performed with a certain volume of the first mobile phase (M-1), in this way the more polar interferences (I_1) are removed (**Fig. 1a**). Before the first analyte starts to elute from C-1 the switching valve is activated and the fraction containing the analytes (A) is transferred to the second column (C-2) by means of the second mobile phase (M-2) (**Fig. 1b**). Finally, the analytes are separated on C-2, while the first column is washed with M-1 or any other stronger mobile phase to eliminate the less polar interferences (I_2) (**Figure 1c**).

The main characteristics of column-switching optimization for the determination of moderate polar pesticides have been reviewed [34,35]. The introduction of a large volume of an aqueous sample is crucial for the enhancement of sensitivity, however the amount injected depends on the retention of the analytes on C-1 which can be estimated by means of the capacity factors (k') using 100% aqueous mobile phase. Furthermore, the application of a small transfer volume from C-1 to C-2 enhances the selectivity of the method. For both injected volume and transfer time, the polarity of analytes is the main parameter to be taken into account.

The main objective of this work is the development of a new method based on the use of two coupled LC columns which allows the rapid, sensitive and selective determination in environmental water samples of four triazine herbicides frequently detected in Castellón surface waters [1] as well as the most important atrazine metabolites. In a previous work [33] we have proposed an LC-LC method for the analysis of trace levels of the four parent herbicides (simazine, atrazine, terbuthylazine and terbuthryn). In the present paper we have enlarged the scope of the method in order to be able to analyze the main atrazine metabolites as well. The determination of the most polar metabolites (mainly DIA and DEA) is of great interest from an environmental point of view, due to their higher leaching potential which increases the risk of groundwater contamination.

Due to polarity differences between triazine herbicides and metabolites, two different approaches have been developed in order to achieve both the maximum

selectivity and sensitivity. The first approach was applied to the parent compounds (simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn) while the second one was applied to atrazine and its main metabolites (DIA, DEA and HA).

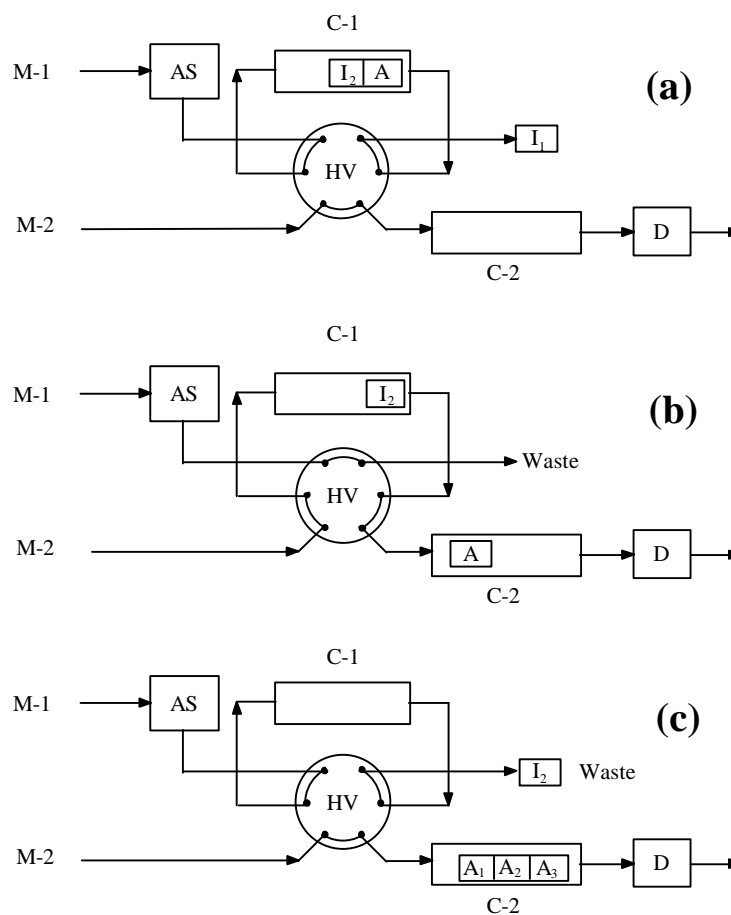


Fig. 1. Schematic representation of a coupled chromatographic system. *M-1* and *M-2* are mobile phase supplies; *AS* is the autosampler or injection-device; *C-1* and *C-2* are the first and the second separation columns, respectively; *HV* is the six-port high-pressure valve; *I*₁ and *I*₂ are sample interferences, *A* (*A*₁, *A*₂, *A*₃) represents the analytes of interest and *D* is the UV detector. (a) clean-up; (b) transfer; (c) analysis.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Simazine, atrazine, terbuthylazine, terbutryn, deethylatrazine, deisopropylatrazine and hydroxyatrazine were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). HPLC-grade methanol and acetonitrile, as well as acetone for pesticide residue analysis, were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA). Analytical-reagent grade ammonium acetate and hydrochloric acid (37%) were bought from Panreac (Barcelona, Spain). Potassium hydroxide of analytical-reagent grade was purchased from Merk (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of atrazine, terbuthylazine, terbutryn (all $400 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$), deisopropylatrazine and deethylatrazine ($200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) were prepared in acetonitrile, stock standard solution of simazine ($200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was prepared in methanol, and stock standard solution of hydroxyatrazine ($100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) was prepared in HPLC-grade water by dropwise addition of reagent grade hydrochloric acid. These solutions were stored at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Diluted standard mixtures were prepared in HPLC water (triazine herbicides) and in $1 \text{ M NH}_4\text{Ac}$ (atrazine and metabolites). These mixtures were stored at 4°C .

Disposable 3-ml C_{18} and cation-exchange (propylbenzene sulfonic acid, SCX) SPE cartridges containing 500 mg of sorbent were obtained from Varian (Harbor City, USA).

2.2. Equipment

The modular LC system consisted of a Model 1050 sampler (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany), a manual injector of which, equipped with a 2.0-ml loop, was used to perform large-volume injections (LVI), a Model 1050 gradient LC pump (Hewlett-Packard), a model C6W six-port switching valve driven by a WE-II

actuator from Valco (VIGI, Schenk, Switzerland) and time-controlled by the sampler, a Model 2150 isocratic LC pump from LKB (Bromma, Sweden) and a Model 1050 ultraviolet detector (Hewlett-Packard). For the LC columns, a 30 × 4-mm I.D. with 5- μ m Spherisorb ODS-2 (Scharlau Science) was chosen as first separation column (C-1) and a 125 × 4-mm I.D. column packed with 5- μ m Spherisorb ODS-2 (Scharlau Science) as second separation column (C-2). Alternatively, a 100 × 4.6-mm I.D. column packed with 3- μ m Microsphere C₁₈ from Crompack (Middelburg, The Netherlands) was also used as C-2.

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a Hewlett-Packard HPLC ChemStation (software version G1034A). Pipetmans (200, 1000 and 5000 μ l) were obtained from Gilson.

Recording of spectra were performed with an UV-visible spectrophotometer UV-240 from Shimadzu (Kyoto, Japan).

A Vac-Elut system from Varian was used to perform SPE.

2.3. Chromatographic conditions

Mobile phases M-1 and M-2 used for the determination of triazine herbicides consisted of acetonitrile-water (40:60, v/v) and acetonitrile-water (70:30, v/v) respectively, set at a flow rate of 1 ml·min⁻¹. A wavelength of 223 nm was chosen to monitor the analytes.

For atrazine and metabolites, acetonitrile-water (20:80, v/v) was used as M-1, while M-2 consisted of an acetonitrile-water gradient (see **Table 1**). Mobile phases were also set at 1 ml·min⁻¹ and analytes were monitored at 220 nm.

2.4. Procedure

2.4.1. LC-LC analysis

Two ml of water samples containing triazine herbicides were directly injected into the chromatographic system. As stated previously [33], after a short clean-up on

C-1 with 2.9 ml of M-1 (injection volume included), C-1 was switched on-line with C-2 for 0.7 min to transfer the fraction containing the analytes to C-2. After transferring, C-1 was rinsed and conditioned with M-1 and the analytes were separated on C-2 with M-2.

For atrazine and its metabolites, the injected sample volume (2 ml) was previously buffered at 1 M with ammonium acetate, then a clean-up volume of 2.6 ml and a transfer time of 4.2 min were required as coupling conditions for the LC-LC determination.

Table 1. Mobile phase gradient (M-2) used for the determination of atrazine and its metabolites

<i>time (min)</i>	<i>Acetonitrile (%)</i>	<i>HPLC water (%)</i>
0	20	80
3.5	20	80
7	35	65
11	90	10
12	20	80

2.4.2. SPE experiences

The enrichment of triazine herbicides was performed on C₁₈-bonded-phase cartridges preconditioned sequentially with 6 ml of methanol, acetone and HPLC water. A water sample volume of 100 ml was percolated at a flow-rate of 5 ml·min⁻¹ and air-dried for 10 min. After elution with 2 ml of acetone, the eluate was evaporated to dryness under a gentle stream of nitrogen on a water bath at 45 °C and redissolved in 5 ml of HPLC water [33].

For atrazine and its metabolites, two different sorbents, C₁₈ and SCX, were assayed. In the case of C₁₈ cartridges, 100 ml of water sample containing 0.8 g of NH₄Ac (final buffer concentration 0.1 M), were percolated through a preconditioned cartridge with 6 ml of methanol, acetone and 0.1 M NH₄Ac. Elution was performed sequentially with 5 ml of 1 M NH₄Ac-acetone (80:20 v/v) and 1 ml of acetone. After evaporation of acetone, the final volume was adjusted to 5 ml with 1 M NH₄Ac.

On the other hand, SCX cartridges were conditioned with 6 ml of methanol, acetone and acidified HPLC water (pH 1). The water samples (100 ml) were also acidified at pH 1 and percolated through the cartridge. The analytes were eluted with 5 ml of a mixture of 1 M NH₄Ac-acetone (80:20, v/v); after acetone evaporation, the final volume was also adjusted to 5 ml with 1M NH₄Ac.

Finally, 2 ml of concentrated extracts were injected into the LC-LC system.

3. Results and discussion

Sensitivity and selectivity of methods depend largely on the RPLC-UV properties of analytes. Therefore, the UV spectra of the compounds were recorded to evaluate their maximum wavelengths as well as their UV response (**Table 2**). Then, the retention on C₁₈ was studied, since it influences both the maximum injection volume and the potential for separation between analytes and interferences. Capacity factors for different mobile phases with an acetonitrile content ranging from 10 to 70% were obtained. The results are shown in **Fig. 2**. In general, analytes showed high C₁₈ retention in pure water, with capacity factors larger than 50 (except for DIA, $k' = 27$). It has been reported that these values are large enough to allow an acceptable separation between the analytes of interest and the more polar sample interferences on short columns [34].

Large volume injection (LVI) was also possible due to the relatively high retention of analytes on C₁₈ columns. Different sample volumes were assayed (from 100 to 4000 μ l) injecting standard mixtures of the analytes on C-1 (30 mm long, packed with 5 μ m C₁₈). A sample volume of 2 ml was selected as optimum as a compromise between sensitivity and speed of analysis.

Table 2. Properties of triazine compounds analysed by LVI-LC-LC with UV detection

Compound	Formula	S_{H_2O} ($mg \cdot l^{-1}$)	I_{max} (nm)	ϵ ($10E4 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)
Simazine		5	223	3.67
Terbutylazine		8.5	224	3.87
Terbutryn		25	224	4.33
Atrazine		30	223	4.16
DIA		>330	214	2.73
HA		6* 230**	240	2.64
DEA		330	214	3.10

* $pH=13$; ** $pH=2$

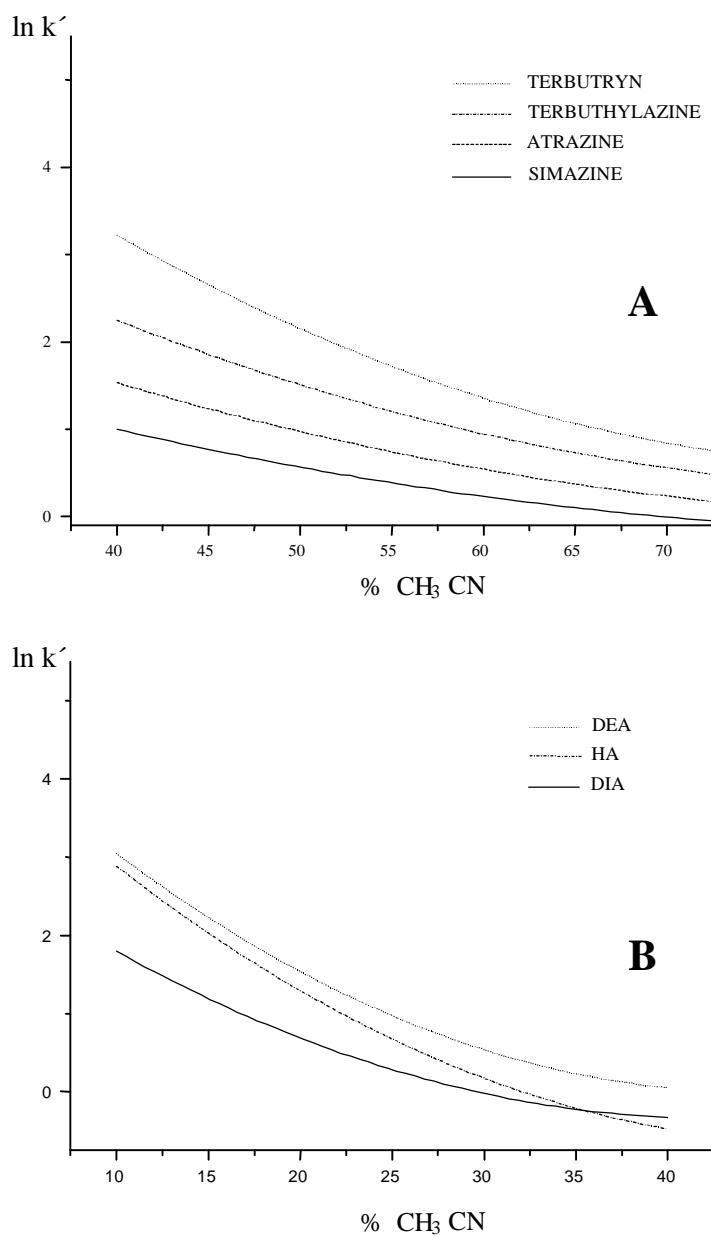


Fig. 2. Retention of triazine herbicides (A) and metabolites (B) on a C_{18} column vs. mobile phase composition plot. The retention is expressed in terms of capacity factor, k' . Where $k' = (t_r - t_0)/t_0$. The values of t_r and t_0 represent the analyte retention time and the void time of the column, respectively.

As stated before, two different approaches were applied due to polarity differences between analytes: the first approach allows the rapid determination of the four triazine herbicides [33]. To summarize, it can be emphasized that using two reversed-phase C₁₈ columns (C-1 and C-2) and two mobile phases, acetonitrile-water (40:60, v/v; M-1; 70:30, v/v; M-2), a rapid procedure for the analysis of simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn is proposed, yielding limits of detection of about 0.1-0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Recoveries for drinking and surface water samples, both at 4 and 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, ranged between 86 and 104% ($n=5$) with coefficients of variation between 1 and 6%.

As an example, a chromatogram of a surface water sample spiked at 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ is shown in **Fig. 3**.

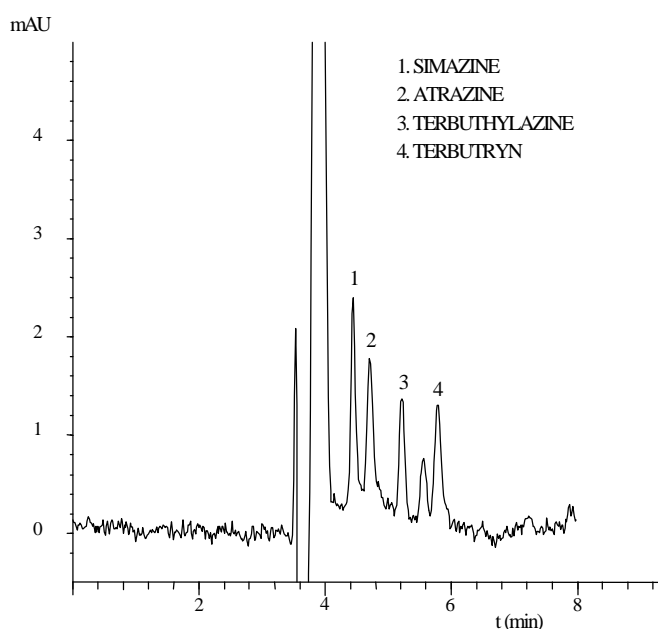


Fig. 3. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked at 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ with triazine herbicides registered at 223 nm. Volume of sample injected, 2 ml; clean-up time, 2.90 min; transfer time, 0.7 min. Blank subtracted.

The second approach allows the rapid determination of atrazine and its main metabolites. In this case, compositions ranging between 15 and 25% of acetonitrile

for M-1, and different linear gradient elutions for M-2 were assayed. Finally, the following optimum conditions were chosen: acetonitrile-water (20:80, v/v) for M-1; and the acetonitrile-water gradient shown in **Table 1** for M-2.

It has been reported that the use of neutral buffered mobile phases improved the HA peak shape [24]. This statement has been proved in our case, but in order to preserve the LC pumps from high concentrations of salts, and also to improve the pre-separation on C-1, buffering the water samples before injection was attempted. Two different buffers, KH_2PO_4 and NH_4Ac , with compositions ranging between 0.1 and 1 M were assayed. Finally, NH_4Ac was selected in order to avoid the precipitate that phosphate produced in real water samples. The influence of the NH_4Ac concentration is shown in **Fig. 4** and demonstrates the effect of buffer concentration on resolution between HA and DEA. In order to achieve maximal resolution and better peak shape, a buffer concentration of 1 M was selected.

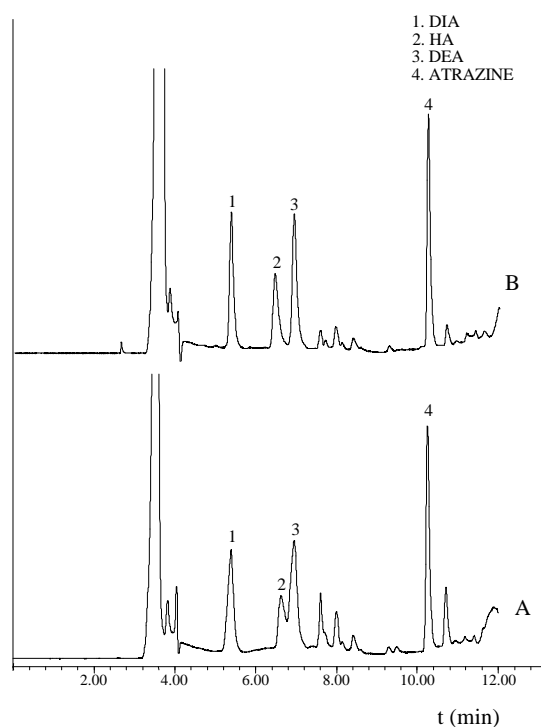


Fig. 4. LC-LC chromatograms of a $40\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ standard mixture solution at 220 nm with different concentration of NH_4Ac . (A) 0.1 M; (B) 1 M. Volume injected, 2 ml; clean-up time, 2.60 min; transfer time, 4.2 min.

Using the proposed mobile phases and the selected buffer, a clean-up volume of 2.60 ml (sample injection included) and a transfer volume of 4.2 ml were estimated by simply connecting the first column (C-1) to the UV detector and injecting the most and least polar analytes, DIA and atrazine, (**Fig. 5**).

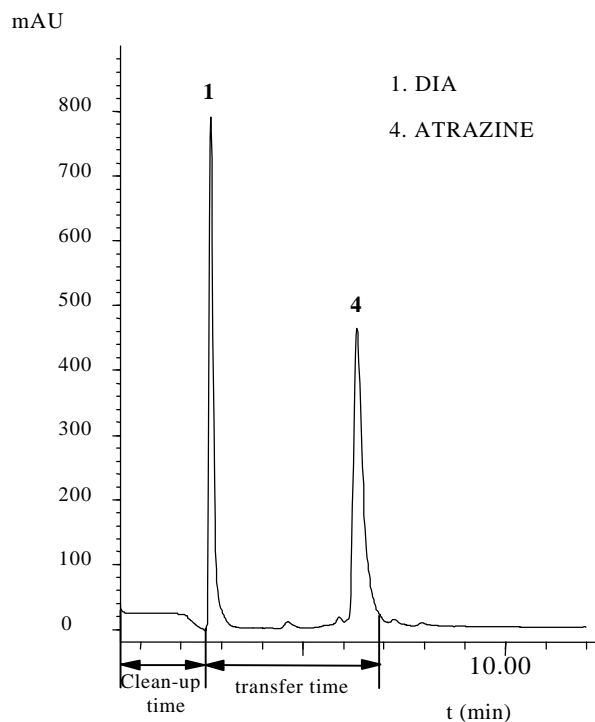


Fig. 5. LC chromatogram of a standard mixture of DIA and atrazine at $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ recorded with C-1 ($30 \times 4.6 \text{ mm I.D.}$, $5\text{-}\mu\text{m Spherisorb ODS-2}$) connected to the UV detector set at 220 nm . Volume injected, 2 ml ; clean-up time, 2.60 min ; transfer time, 4.2 min .

Although the wide polarity range between atrazine and its metabolites involves a large transfer volume leading to an expected decrease in selectivity, this does not imply serious problems in the analysis of environmental water samples by RPLC-LC, in which the major sources of interference are usually the more polar compounds [35]. Besides, the separation power of C-1 offers the possibility of removing the large excess of early-eluting polar interference contributing to the enhancement of selectivity in the analysis of polar analytes like DIA, in contrast to the results shown

in a few recently reported methods based on LC with UV detection, which do not allow selective determination of this compound at low concentration levels since it appears in the wide peak of preconcentrated early-eluting interferences [2,18].

The performance of the method is illustrated in **Fig. 6**, which shows a standard mixture of atrazine and its metabolites at $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The response linearity was studied for standard solutions with concentrations between 1 and $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (**Table 3**).

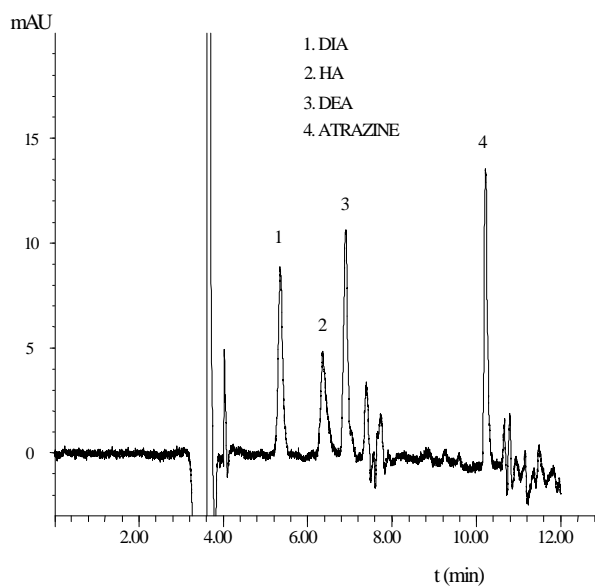


Fig. 6. LC-IC chromatogram of a $4\text{-}\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ standard mixture solution at 220 nm. Volume injected, 2 ml; clean-up time, 2.60 min; transfer time, 4.2 min. Blank subtracted.

The method was validated by means of recovery experiments with different aqueous matrices. Drinking and surface water samples spiked at several levels were analysed using the developed procedure. Recoveries as well as coefficients of variation are given in **Table 4**, where it can be seen that both were satisfactory, with values ranging from 86 to 103%, and from 1 to 7%, respectively. A chromatogram of a surface water sample spiked at $2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ is shown in **Fig. 7**. Experimental detection limits ($S/N=3$) between $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (atrazine) and $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (HA) were obtained for these compounds.

Table 3. Calibration curves ($1\text{-}200\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) for atrazine, DIA, HA and DEA in HPLC water samples

	Atrazine	DIA	HA	DEA
S.E.	5.291	7.566	4.500	6.350
R	0.9998	0.9993	0.9992	0.9992
Intercept	-0.716	7.470	-0.312	7.101
(S.D.)Intercept	2.949	4.217	2.508	3.540
Slope	2.870	2.365	1.295	1.843
(S.D.)Slope	0.030	0.044	0.026	0.037

S.E., standard error; S.D., standard deviation.

Table 4. Recoveries and coefficients of variation for atrazine and its metabolites in different water samples spiked at three levels ($n=5$)

Compound	Drinking water			Surface water		
	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$4\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$20\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$1\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$4\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	$20\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
DIA	99 (6)	102 (2)	102 (2)	96 (3)	103 (2)	100(1)
HA	98 (7)	101 (5)	89 (2)	104 (7)	102 (6)	97(4)
DEA	87 (7)	86 (2)	97 (1)	103 (5)	97 (2)	99 (2)
Atrazine	92 (6)	103 (1)	101 (2)	103 (2)	102 (2)	100 (2)

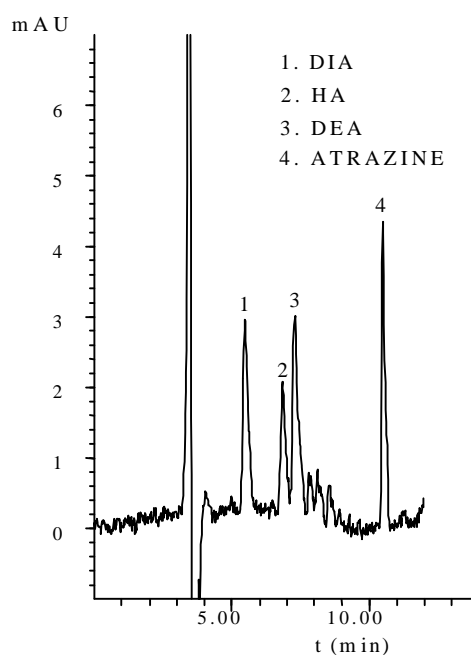


Fig. 7. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked at $2\ \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ with atrazine and metabolites registered at 220 nm. Volume of sample injected, 2 ml; clean-up time, 2.60 min; transfer time, 4.2 min. Blank subtracted.

The developed coupled-column procedures were significantly rapid, with sample throughputs higher than 60 (for triazine herbicides) and 30 (for atrazine and its metabolites) samples per day due to the short analysis time and the low sample handling. They were also greatly sensitive because of the direct injection of 2 ml of sample, and quite selective since early-eluting interferences were removed. With regards to the robustness of the method, the C₁₈ columns maintained their performance during more than 6 months and re-adjustments of column-switching conditions (clean-up and transfer time) were not necessary. Thus, very rapid, sensitive, selective and robust methods useful for screening purposes in monitoring programs were developed.

Comparing these procedures with methods reported until now, it is relevant to emphasise that small sample volumes are used (2 ml), against the large amounts of sample involved (up to 2000 ml) when on-line or off-line SPE techniques are used. SPE combined with HPLC is currently one of the main techniques used in residue analysis, due to its good sensitivity, in spite of the time required for sample preconcentration. Thus, detection limits down to 0.1 µg·l⁻¹ have been proposed for triazine and some of their metabolites in recent papers, although unfortunately the chromatograms of real water samples spiked at this low level of concentration are not always presented [8,10,13,16,17,19,21].

According to the EEC regulations for pesticide residues in drinking water, analytical methods with detection limits lower than 0.1 µg·l⁻¹ are required. Thus, more sensitive procedures have been developed in this paper adding a preconcentration step using a water sample of only 100 ml on SPE bonded phase cartridges previous to the LVI-LC-LC analysis.

This SPE procedure was optimized for triazine herbicides previously [33] and applied to drinking water samples spiked at 0.1 µg·l⁻¹ yielding recoveries between 84 and 96%, with coefficients of variation between 2 and 5 % (*n*=3). The performance of

this procedure is illustrated in **Fig. 8**, which shows a drinking water sample spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, preconcentrated on C_{18} cartridges, and analysed by LVI-LC-LC.

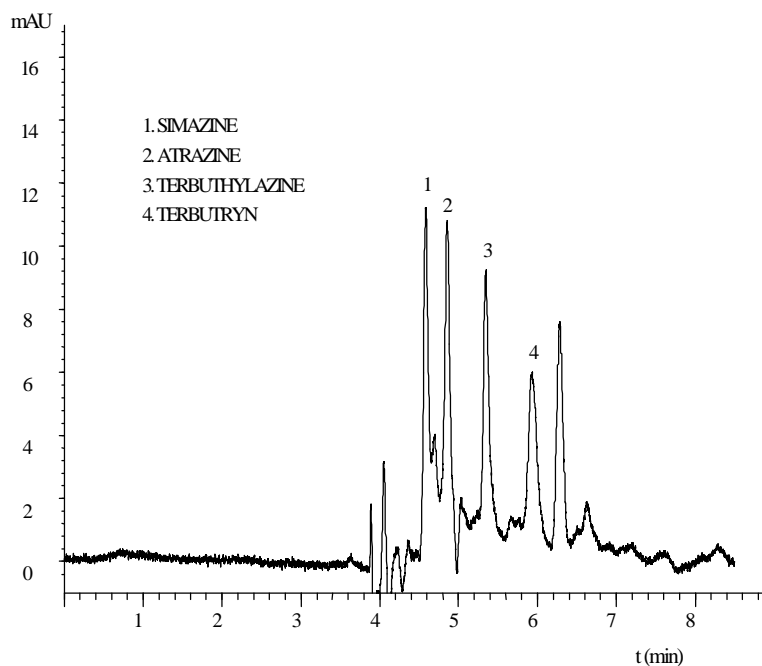


Fig. 8. LC-LC chromatogram of a drinking water sample spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, previously preconcentrated on a C_{18} cartridge, registered at 223 nm. Volume of extract injected, 2 ml; clean-up time, 2.90 min; transfer time, 0.7 min. Blank subtracted.

For atrazine and its main metabolites, two different sorbents were assayed: a non-polar bonded-phase C_{18} and a strong cation exchanger, SCX. Several drinking water samples were spiked at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and analysed by the proposed SPE-LVI-LC-LC procedure (**Table 5**) yielding satisfactory results regarding both recovery and reproducibility in the case of the C_{18} material, although a two-step elution was required in order to recover atrazine completely. With regard to the SCX sorbent, results were satisfactory for all the compounds except HA, which was not recovered although different eluent solvents were assayed consisting of mixtures of 1M NH_4Ac -

acetone with buffer pH ranging between 7 and 11 and percentage of organic modifier between 0 and 30%.

Table 5. Recoveries and coefficients of variation for atrazine and its metabolites in drinking water samples (100 ml) spiked at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and preconcentrated by means of SPE ($n=5$)

	SCX	C ₁₈
DIA	93 (2)	99 (2)
DEA	102 (1)	98 (5)
HA	nr	98 (6)
Atrazine	103 (3)	103 (2)

nr, not recovered

The chromatograms of two samples preconcentrated on C₁₈ and on SCX cartridges are shown in **Fig. 9** and, as can be seen, significant differences in the background of the chromatogram were also found between the two sorbents. With C₁₈ cartridges, recoveries were acceptable even for the more polar metabolite (DIA), in contrast to the unsuccessful results reported in recent papers [19,23]. In relation to this, it is relevant to emphasise that LVI-LC-LC methods are quite sensitive and, consequently, they do not require preconcentration of large sample volumes, so breakthrough of polar analytes is more easily avoided and the analysis time reduced.

In this way, limits of detection down to $0.02\text{-}0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ were reached for all the analytes. In comparison to previous procedures involving solid phase extraction, a considerable gain in reliability and sample throughput was obtained.

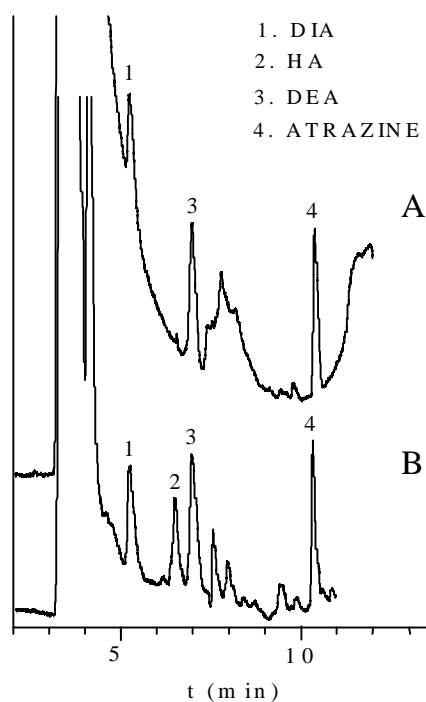


Fig. 9. LC-LC chromatograms ($\lambda=220$ nm) of a drinking water sample spiked at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ previously preconcentrated on SCX (A) and C_{18} (B) SPE cartridges. Volume of extract injected, 2 ml; clean-up time, 2.60 min; transfer time, 4.2 min

4. Conclusions

The combination of coupled-column LC with large-volume injection allowed the development of rapid, sensitive and selective procedures for the trace-level determination of triazine compounds, as well as some of the most important atrazine metabolites in environmental water samples. In comparison to previous works, the proposed procedures are robust and rapid, large sample volumes and preconcentration steps are not required and sample throughput is estimated in more than 30 samples per day. All these characteristics make the methods very suitable for monitoring programs, where a high number of samples must be analyzed. The selectivity of the

procedures are also important since they allow automated removal of early-eluting interferences. The procedures were also quite sensitive due to the direct injection of up to 2 ml of the aqueous sample, yielding detection limits between 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ which can be decreased down to 0.02-0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ by adding a rapid preconcentration step of 100 ml of water sample on C_{18} SPE cartridges before the chromatographic determination by LVI-LC-LC.

References

- [1] F. Hernández, R. Serrano, M.C. Miralles, N. Font, *Chromatographia* 42 (1996) 151.
- [2] V. Pichon, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 665 (1994) 269.
- [3] H. Bagheri, E.R. Brouwer, R.T. Ghijsen, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr.* 647 (1993) 121.
- [4] Z. Cai, V.M.S. Ramanujam, M.L. Gross, S.J. Monson, D.A. Cassada, R.F. Spalding, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4202.
- [5] M. Berg, S.R. Müller, R.P. Schwarzenbach, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1860.
- [6] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, 1980.
- [7] Italian Health Ministry, O.M. 705/475, Rome, 1991.
- [8] H. Färber, K. Nick, H.F. Schöler, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 145.
- [9] U.S. Environmental Protection Agency, *Drinking Water Health Advisory: Pesticides*, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [10] H. Sabik, S. Cooper, P. Lafrance, J. Fournier, *Talanta* 42 (1995) 717.
- [11] E.M. Thurman, D.A. Goolsby, M.T. Meyer, D.W. Koplín, *Environ. Sci. Technol.* 25 (1991) 1794.

- [12] W.E. Periera, C.E. Rostad, *Environ. Sci. Technol.* 24 (1990) 1400.
- [13] R.N. Lerch, W.W. Donald, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 922.
- [14] M. Psathaki, E. Manoussaridou, E.G. Stephanou, *J Chromatogr. A* 667 (1994) 241.
- [15] C. Crespo, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 670 (1994) 135.
- [16] R. Eisert, K. Levsin, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 555.
- [17] D.A. Cassada, R.F. Spalding, Z. Cai, M.L. Gross, *Anal. Chim. Acta* 287 (1994) 7.
- [18] J. Lintelmann, C. Mengel, A. Kettrup, *Fresenius J. Anal. Chem.* 346 (1993) 752.
- [19] C. Samara, J. Lintelmann, A. Kettrup, *Fresenius Environ. Bull.* 3 (1994) 534.
- [20] P. Vitali, E. Venturini, C. Bonora, R. Calori, R. Raffaelli, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 219.
- [21] G. Sacchero, C. Sarzanini, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A* 671 (1994) 151.
- [22] H. Prosen, L. Zupancic-Kralj, J. Marsel, *J. Chromatogr. A* 704 (1995) 121.
- [23] S. Nélieu, M. Stobiecki, F. Sadoun, H. Virelizier, L. Kerhoas, J. Einhorn, *Analisis* 22 (1994) 70.
- [24] R. Schewes, F. X. Maidl, G. Fischbeck, J. Lepschy von Gleissenthall, A. Süß, *J. Chromatogr.* 641 (1993) 89.
- [25] A. Saez, D. Gómez de Barreda, M. Gamon, J. Garcia de la Cuadra, E. Lorenzo, C. Peris, *J. Chromatogr. A* 721 (1996) 107.
- [26] L. Weil, R.J. Schneider, O. Schäfer, P. Ulrich, M. Weller, T. Ruppert, R. Nießner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 468.
- [27] G. Stangl, M.G. Weller, R. Nießner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 301.

- [28] D. H. Thomas, M. Beck-Westermeyer, D. S. Hage, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3823.
- [29] J.V. Sancho, F.J. López, F. Hernández, E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 678 (1994) 59.
- [30] E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia* 31 (1991) 285.
- [31] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, F.J. López, E.A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62 (1996) 53.
- [32] J.V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 761 (1997) 322.
- [33] C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta.* 338 (1997) 223.
- [34] P.van Zoonen, E.A. Hogendoorn, G.R. van der Hoff, R.A. Baumann, *Trends in Anal. Chem.*, 11 (1992) 11.
- [35] E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 149.

ACOPLAMIENTO EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA-CROMATOGRFÍA LÍQUIDA

3.1. Introducción

La extracción en fase sólida (SPE) es una técnica de preparación de muestra que resulta muy adecuada para el tratamiento de muestras acuosas. Los plaguicidas son atrapados por una fase adsorbente adecuada que se encuentra empaquetada en columnas de extracción, a través de las cuales se hace pasar la muestra acuosa.

La SPE puede utilizarse en su modalidad “*off-line*”, de manera que la preparación de la muestra se lleva a cabo completamente separada del análisis cromatográfico, o bien de modo “*on-line*”, mediante conexión directa de la precolumna enriquecedora al sistema cromatográfico (acoplamiento SPE-LC u “*on-line trace enrichment*” acoplado a LC). En el primer caso, se utilizan cartuchos desechables, a través de los cuales se pasa la muestra. Los analitos retenidos son posteriormente eluidos con el disolvente adecuado, y, habitualmente, se introduce alguna etapa de evaporación previamente a la determinación cromatográfica. En la SPE “*on-line*” la muestra se introduce en el sistema mediante un bomba preconcentradora y los analitos retenidos se transfieren directamente a la columna analítica, siendo ésta una de las principales ventajas de la técnica ya que procesando menores volúmenes de muestra se pueden obtener sensibilidades similares a las alcanzadas con la modalidad “*off-line*”. Además, la manipulación de la muestra es mínima pudiéndose esperar resultados más precisos y menores errores analíticos. En la **Tabla 21** se presentan las ventajas e inconvenientes de ambas formas de trabajo, según un estudio llevado a cabo por Liska (1993).

En la **Figura 16** se muestra un esquema básico de acoplamiento SPE-LC. Se observa que el montaje experimental requerido es relativamente sencillo, ya que la precolumna enriquecedora C-1 se coloca en la posición del “*loop*” de inyección de una válvula de alta presión HV. Se utilizan dos bombas de LC, una para preconcentrar y la otra, que transporta la fase móvil M, para llevar a cabo la transferencia desde C-1 hasta C-2, así como la posterior separación cromatográfica en la columna analítica C-2.

Tabla 21. SPE “off-line” frente a SPE “on-line”. Ventajas e inconvenientes.

	VENTAJAS	INCONVENIENTES
SPE “off-line”	<ul style="list-style-type: none"> - Simplicidad instrumental - Flexibilidad operacional (hay muchos parámetros para optimizar y ajustar a las necesidades) - Buena aplicación como técnica de “screening” - Amplia utilización para purificación de la muestra en una o varias etapas con posibilidad de separación de los analitos en fracciones - Posibilidad de utilizar varias técnicas de separación y/o detección simultáneamente - Reduce el uso de disolventes con respecto a LLE 	<ul style="list-style-type: none"> - Requerimiento de muchas etapas manuales, automatizables sólo con sistemas tipo robots - Mayor variabilidad en cuanto a reproducibilidad y menor exactitud y precisión de los resultados - Utilización de cartuchos desechables relativamente caros
SPE “on-line”	<ul style="list-style-type: none"> - Minimización de las etapas de preparación de la muestra y de las etapas manuales - Facilidad de automatización de todo el proceso de análisis - Elevada capacidad de análisis (rapidez) - Muy útil en programas de control - Posibilidad de acoplamiento con diferentes técnicas de separación (GC o LC) - Reduce el uso de disolventes respecto a SPE “off-line” - Posibilidad de utilizar cartuchos no desechables 	<ul style="list-style-type: none"> - Poca selectividad (transferencia conjunta de analitos e interferentes) - Personal cualificado - Posibilidad de obturación de las precolumnas cuando se procesan elevados volúmenes de muestra - Posibilidad de efectos de memoria - Poca flexibilidad, en cuanto al disolvente eluyente que debe de permitir la posterior separación de los analitos

Cabe destacar que la selectividad del método vendrá determinada por la fase adsorbente de la columna C-1 y por el detector D utilizado, ya que, en principio, todos los componentes de la muestra preconcentrados en C-1 y que se eluyen con la fase móvil M durante el tiempo de transferencia se introducen en C-2.

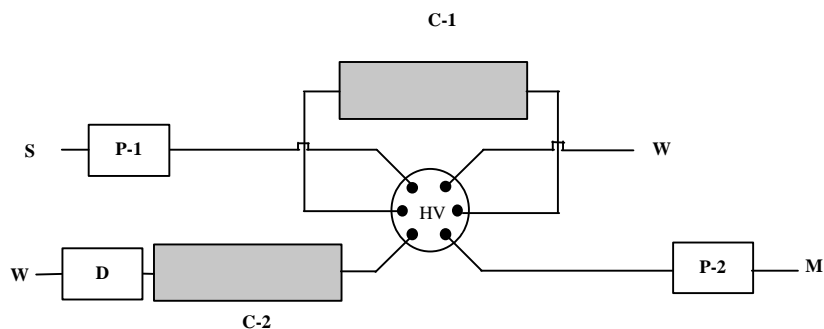


Figura 16. Representación esquemática de un acoplamiento SPE-LC. C-1, columna enriquecedora; P-1, bomba de LC enriquecedora; S, muestra; C-2, columna separadora; P-2, bomba de LC; M, fase móvil; HV, válvula de alta presión; D, detector; W, desecho.

3.1.1. Etapas del análisis.

En todo método analítico basado en el acoplamiento SPE-LC se pueden distinguir una serie de etapas que se esquematizan en la **Figura 17**, y que se comentan a continuación:

1. Acondicionamiento de la precolumna enriquecedora C-1 (Figura 17A)

El acondicionamiento de la precolumna enriquecedora C-1 se lleva a cabo con disolventes adecuados (C_1 , C_2 , C_3) que se introducen mediante la bomba P-1. Los disolventes más utilizados en esta etapa son metanol y/o acetonitrilo, seguidos de agua de calidad HPLC.

2. Carga de la muestra en C-1 (Figura 17A)

Una vez acondicionada la precolumna, un volumen conocido de la muestra S_1 se introduce en la precolumna C-1 mediante la bomba P-1, mientras la fase móvil M circula a través de la columna analítica (C-2).

3. Etapa de transferencia

Cuando finaliza la etapa de preconcentración se activa la válvula HV, de manera que los compuestos preconcentrados son transportados desde C-1 hasta C-2 con la fase móvil adecuada M. La transferencia de estos compuestos puede llevarse a cabo en la misma dirección de la carga de la muestra ("*forward-flush*"), aunque es más frecuente realizarla en contracorriente ("*backflush*") (Figura 17B), ya que los analitos preconcentrados y retenidos, idealmente en cabeza de columna, se transfieren de este modo con menor ensanchamiento de bandas.

4. Separación cromatográfica y detección (Figura 17C)

Transcurrido el tiempo necesario para que eluyan todos los analitos desde C-1 hasta C-2 se vuelve a activar la válvula HV, de modo que se pueda empezar a procesar la siguiente muestra (S_2), tras acondicionar nuevamente la precolumna C-1, mientras en la columna C-2 se lleva a cabo la separación cromatográfica y los analitos separados pasan al detector.

La posibilidad de que se produzca superposición entre la etapa de separación cromatográfica y la de preconcentración de la siguiente muestra es interesante ya que permite disminuir de manera considerable el tiempo de proceso de cada muestra y, por lo tanto, el tiempo global de análisis del método.

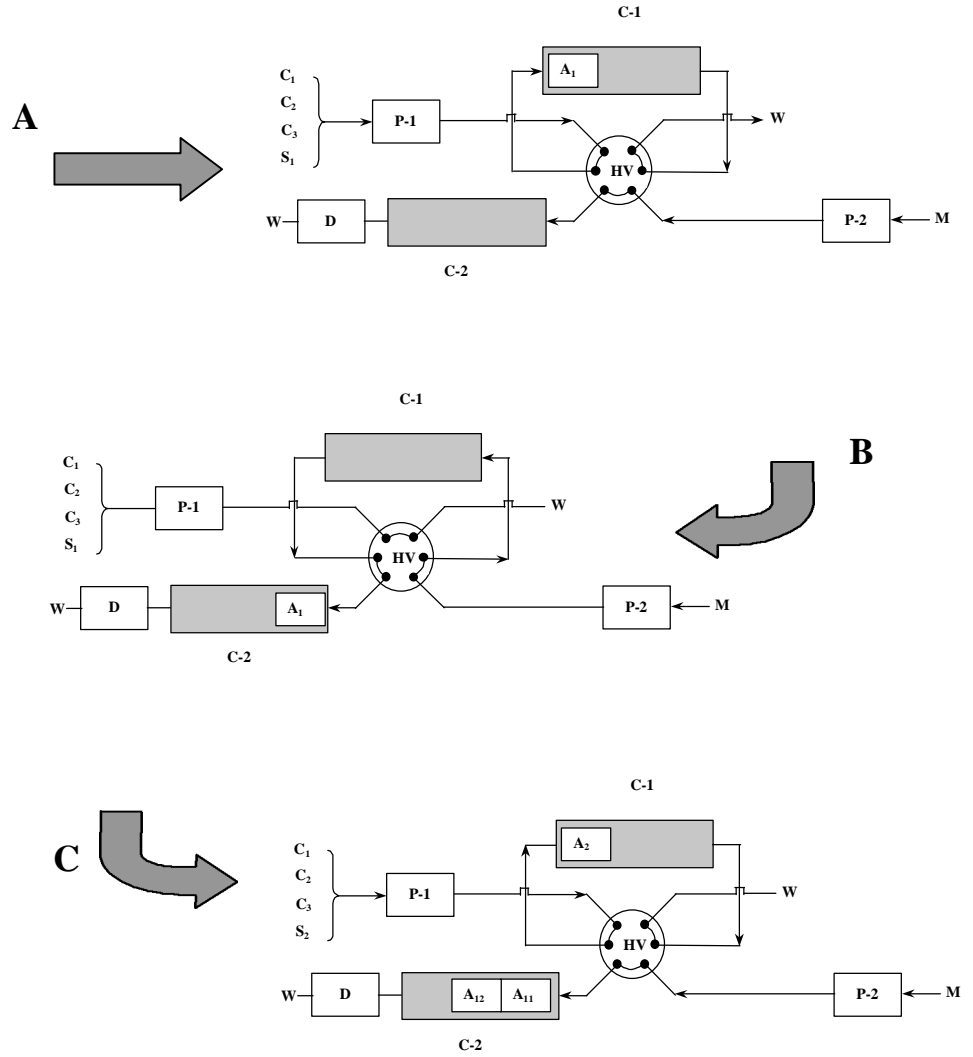


Figura 17. Etapas de un procedimiento con acoplamiento SPE-LC. (A) acondicionamiento y carga de la muestra (B) Transferencia (C) Separación cromatográfica y detección. C-1, precolumna enriquecedora; C_1 , C_2 y C_3 , disolventes acondicionadores de C-1; S_1 y S_2 , muestras; A_1 , analitos de la muestra S_1 (A_{11} , A_{12}); A_2 , analitos de la muestra S_2 ; C-2, columna separadora; P-1, bomba enriquecedora de LC; P-2, bomba de LC; M, fase móvil para la separación; HV, válvula de alta presión de 6 vías; D, detector; W, desecho.

3.1.2. *Parámetros de preconcentración*

Los principales parámetros a tener en cuenta en todo procedimiento de acoplamiento SPE-LC, además del tamaño de la precolumna utilizada, son la elección de la fase adsorbente y la determinación de los volúmenes de ruptura (Pichon y Hennion, 1994).

Tamaño de la precolumna

Uno de los principales inconvenientes inherentes al acoplamiento de dos columnas es la posibilidad de ensanchamiento de bandas durante la etapa de transferencia. En este sentido, se ha descrito que existe una relación entre el volumen óptimo de una precolumna y el volumen y número de platos de la columna analítica (Nondek y Chvalovsky, 1983,1984), de modo que por ejemplo para una columna analítica de 15×0.46 cm d.i., se requeriría una precolumna de 1 cm de longitud como máximo. Más recientemente, Hennion y Scribe (1993) han comprobado que es necesaria la utilización de precolumnas pequeñas en el caso de eluciones con fases móviles isocráticas, ya que cuando se utilizan gradientes con acetonitrilo o metanol el aumento del porcentaje de modificador orgánico durante la separación analítica puede comprimir los picos de los analitos, pudiéndose utilizar, de este modo, precolumnas de mayor tamaño.

Sin embargo, en el caso de analitos poco retenidos, el aumento del tamaño de la columna, y, por lo tanto, de la cantidad de fase adsorbente, no siempre permite trabajar con volúmenes de muestra más altos sin que se llegue a producir ruptura de los analitos, y por ello, a menudo, debe de recurrirse a seleccionar otras fases adsorbentes con el fin de preconcentrar volúmenes de muestra suficientemente altos que permitan alcanzar los límites de detección deseados.

Selección de la fase adsorbente

En todo proceso de SPE o de preconcentración “*on-line*” se debe seleccionar la fase adsorbente adecuada, la cual depende tanto del volumen de muestra que se tiene que procesar para obtener límites de detección adecuados como de la naturaleza de los analitos.

Idealmente, el relleno seleccionado para C-1 debe de presentar una elevada retención sobre los analitos durante la etapa de muestreo. Además, debe tener una elevada capacidad de carga, lo cual supone utilizar partículas con tamaños algo mayores (10-15 μm) a los habituales en columnas separadoras. Finalmente, tienen que presentar una retención inapreciable durante la etapa de desorción o transferencia de los analitos, para minimizar el ensanchamiento de bandas durante la elución desde C-1 hasta C-2.

En la **Tabla 22** se presentan las principales fases estacionarias utilizadas en SPE, tanto “*off-line*” como “*on-line*”. En esta tabla se destacan los principales mecanismos de separación, pudiendo producirse: a) cromatografía en fase inversa, usando sílice enlazada, fases poliméricas o fases a base de carbón grafitizado; b) intercambio iónico, usando intercambiadores en base sílica o polimérica; c) intercambio de ligando; d) reacciones antígeno-anticuerpo, mediante el uso de inmunoabsorbentes; e) exclusión por tamaños junto a mecanismos de fase inversa o de intercambio catiónico, en el caso de columnas RAM. Se incluye, además, la naturaleza del disolvente eluyente, así como algunas características de los analitos.

Una de las posibles causas de pérdidas de analitos durante la etapa de preconcentración es la sobrecarga de la capacidad de la columna enriquecedora. Dicha capacidad viene determinada por el tipo de relleno utilizado, por la cantidad del mismo, así como por la naturaleza del analito preconcentrado. Sin embargo, cabe destacar que normalmente la concentración de contaminantes orgánicos en muestras de agua subterránea, potable o superficial es del orden de los $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, y a estos bajos niveles no suele producirse sobrecarga (Hennion y Scribe, 1993). En el caso de analitos muy polares, los volúmenes de ruptura en fases estacionarias convencionales (C-18, PRP-1, PLRP-S) suelen ser bastante bajos imposibilitando la determinación de estos compuestos a las bajas concentraciones deseadas con buenos parámetros de recuperación; por ello, las últimas tendencias se centran en el uso de nuevas fases estacionarias con mayor superficie específica, normalmente fases poliméricas como SDB-1 (alrededor de 1000 m^2/g), Lichrolut-EN (alrededor de 1200 m^2/g), etc. También se ha potenciado el uso de fases estacionarias a base de

carbón grafitizado para la retención de analitos polares, fundamentalmente en modo “*off-line*” (Di Corcia *et al.*, 1997^a; Di Corcia *et al.*, 1997^b; Crescenci *et al.*, 1997); aunque también se han empleado con éxito en procedimientos de SPE “*on-line*” (Slobodník *et al.*, 1996^a, Ibañez *et al.*, 1997), tal y como se comenta más adelante en el apartado 3.1.4. “Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de plaguicidas”.

Respecto al acoplamiento de las dos columnas, se ha descrito que la fase adsorbente debería de ser, idealmente, la misma que la utilizada en la columna analítica. También se ha indicado a menudo, que la retención de los analitos en la precolumna C-1 debería de ser, idealmente, similar o menor que en la columna C-2 (Hennion y Scribe, 1993). Esto supondría, por ejemplo, que la combinación entre rellenos poliméricos con columnas analíticas tipo C₁₈ debería evitarse y, por lo tanto, también deberían utilizarse columnas poliméricas para la etapa de la separación cromatográfica, las cuales resultan menos eficaces. Sin embargo, en muchos casos la combinación de columnas con fases adsorbentes diferentes es inevitable en el desarrollo de procedimientos analíticos basados en acoplamiento SPE-LC, y los posibles problemas de ensanchamiento de bandas pueden ser minimizados o solventados por completo mediante la aplicación de gradientes adecuados en la fase móvil.

Finalmente, cabe hacer hincapié en que la selectividad de la técnica, para compuestos específicos, se puede mejorar durante la etapa de preconcentración, al acoplar varias columnas con diferentes fases en serie y/o utilizar columnas más selectivas como resinas de intercambio iónico, rellenos cargados con metales o fases cargadas con anticuerpos (inmunoadsorbentes).

Estimación del volumen de ruptura

A medida que la muestra acuosa se preconcentra, los analitos más retenidos quedan en cabeza de columna mientras que los menos retenidos pueden desplazarse poco a poco a través de la precolumna enriquecedora, pudiendo llegar a ser eluidos por la propia muestra, a pesar de la poca fuerza eluotrópica del agua. En el momento en que los analitos empiezan a eluir de la primera columna se produce la ruptura de los mismos y el volumen de muestra preconcentrado hasta ese instante, se conoce como volumen de ruptura.

El volumen de ruptura de un analito se puede estimar conectando la columna enriquecedora C-1 directamente al detector y haciendo pasar la muestra acuosa a través de la misma, de modo que, en el momento en que el analito empieza a eluir comienza a obtenerse la señal analítica, la cual va en aumento a medida que va eluyendo más analito, hasta que llega un momento en que la concentración de analito introducido es igual que la que sale de C-1, siendo en este instante la señal analítica constante. En la **Figura 18** se representa la curva que idealmente se obtendría para la preconcentración de un compuesto orgánico que presentara una absorbancia A_0 a una determinada longitud de onda. El volumen de muestra V_b , definido como el que presenta un 1 % de A_0 , corresponde al volumen de ruptura del analito (“*breakthrough volume*”); el volumen V_r , para el que la respuesta del detector es un 50 % de A_0 , es el volumen de retención del analito en agua; finalmente, cuando se preconcentra un volumen de muestra V_m , para el cual la absorbancia es el 99 % de A_0 , el eluato tendrá la misma composición que la muestra original.

En análisis de trazas debe maximizarse en muchas ocasiones la cantidad de analito extraída de la muestra y que posteriormente llega al detector, lo cual se consigue teóricamente para un volumen de muestra correspondiente a V_m (área rayada de la **Figura 18**). La preconcentración de volúmenes de muestra mayores de V_m no incrementaría la cantidad extraída.

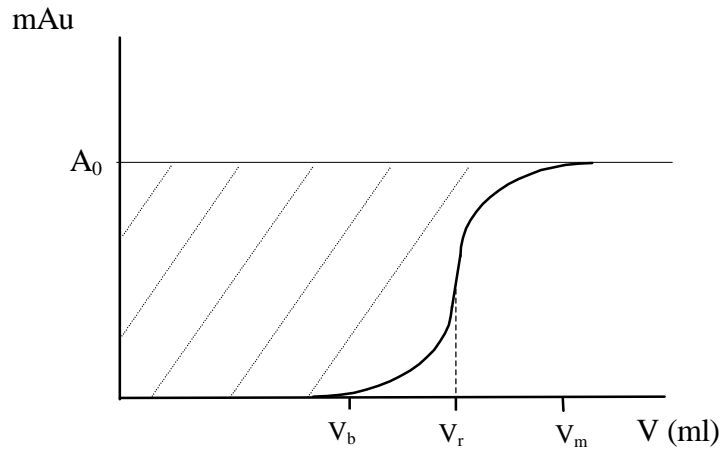


Figura 18. Curva de ruptura hipotética correspondiente a un analito cuya absorbancia a la longitud de onda de trabajo es A_0 .

V_b , volumen de ruptura; V_r , volumen de retención; V_m , volumen que corresponde a un 99 % de la absorbancia inicial. El área rayada corresponde a la máxima cantidad de analito que puede preconcentrarse en la columna estudiada.

El volumen de ruptura V_b es uno de los parámetros más críticos en todo procedimiento de acoplamiento SPE-LC ya que este parámetro indica el volumen de muestra que puede ser manejado eficazmente en el proceso de preconcentración. Conociendo el nivel de concentración límite que se quiere determinar y el límite de detección absoluto de la detección cromatográfica se puede calcular fácilmente el volumen mínimo de muestra que tiene que preconcentrarse, suponiendo que no hay ruptura de los analitos.

Aunque el volumen de ruptura puede medirse a partir de las curvas de ruptura tal y como se ha descrito anteriormente, este método es demasiado costoso en cuanto a tiempo y sólo se puede llevar a cabo con sistemas “on-line” mediante la preconcentración de cada analito por separado.

El volumen de ruptura también se puede estimar como una primera aproximación a partir del volumen de retención (V_r) del analito en agua (Hennion y Scribe, 1993). Como la obtención de este parámetro de manera empírica puede resultar larga y tediosa, en función de la retención de los analitos en C-1, también se puede calcular de manera bastante fiable conociendo los valores de retención del analito para diferentes porcentajes de disolvente orgánico en la fase móvil y estimando el correspondiente coeficiente de retención k' en agua pura mediante extrapolación. Este parámetro se relaciona con el volumen de retención mediante la expresión:

$$k' = \frac{V_r - V_0}{V_0}$$

donde V_0 es el volumen muerto de la precolumna.

Otro procedimiento, en este caso bastante rápido, para estimar el volumen de ruptura es el descrito por Subra *et al.* (1988), mediante el cual se puede determinar este parámetro para varios analitos de manera simultánea mediante un sistema de preconcentración “*on-line*”. El procedimiento consiste en preconcentrar en la precolumna C-1 un pequeño volumen de patrón (V_i), de concentración conocida (C_i) y registrar el cromatograma correspondiente a la elución “*on-line*” de los analitos, midiéndose el área correspondiente a cada compuesto (A_i). Previa comprobación de que no se produce ruptura de los mismos (comparando con el cromatograma correspondiente a la inyección directa de un patrón que contenga la misma cantidad de cada analito), se incrementa el volumen de muestra preconcentrada (V_p) a la vez que se disminuye la concentración de la misma (C_p), de modo que se tenga siempre la misma cantidad de cada analito:

$$C_i \times V_i = C_p \times V_p$$

Mientras no se produzca ruptura de ningún compuesto las áreas de los picos registrados (A_p) permanecen constantes, de manera que se cumple:

$$\text{para } V_p < V_b \quad \frac{A_p}{A_i} = 1$$

Sin embargo, cuando se produce ruptura de algún analito, la cantidad del mismo extraída decrece y el área del pico también, con lo cual ya no se cumple la igualdad anterior.

De este modo, se pueden determinar los volúmenes de ruptura de varios analitos simultáneamente mediante unas pocas experiencias de preconcentración.

Lógicamente, el volumen de ruptura estimado para un analito vendrá determinado por el tipo de fase adsorbente utilizada así como por las dimensiones de la precolumna. En la **Figura 19** se presentan las curvas experimentales obtenidas a partir de las experiencias anteriores para un analito de interés en tres precolumnas diferentes, dos de ellas rellenas con fase C_{18} y la tercera con fase polimérica PRP-1. Se puede observar que el analito presenta un volumen de ruptura muy pequeño en el caso de la columna C_{18} de 5.8 mm, el cual aumenta de manera significativa en el caso de la columna C_{18} de 3 cm, debido fundamentalmente a la mayor cantidad de fase adsorbente. En el caso del relleno polimérico (PRP-1), se observa que el volumen de ruptura es comparable o ligeramente inferior al de la columna C_{18} de mayor tamaño. Sin embargo, cuando se procesan volúmenes de muestra del orden de 200 ml, las recuperaciones en la columna polimérica son significativamente mejores.

A la vista de la anterior figura, se puede comprender que cuando las recuperaciones de un analito son demasiado bajas impidiendo alcanzar bajos límites de detección, la única solución es incrementar el volumen de ruptura del analito en agua, lo cual solo se puede conseguir incrementando la cantidad de fase adsorbente o eligiendo otro relleno para el cual el analito presente mayor retención.

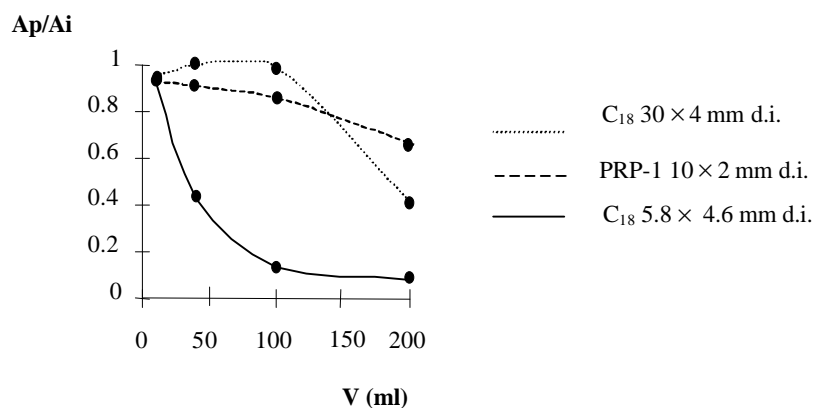


Figura 19. Variaciones en el volumen de ruptura para un analito preconcentrado en diferentes precolumnas.

3.1.3. Cuantificación

Como se puede comprobar a partir de la **Figura 18**, sólo se pueden obtener recuperaciones del 100 % cuando el volumen preconcentrado (V_p) sea menor o igual al volumen de ruptura (V_b).

De este modo, en SPE se pueden obtener valores de recuperación próximos al 100% cuando se trabaja con volúmenes de muestra por debajo de V_b ; sin embargo, se tiene que comprobar que en estas condiciones se alcanzan los niveles de detección deseados. Aunque se asume que es mejor trabajar con recuperaciones del 100 %, en el caso de análisis de trazas de compuestos orgánicos, a veces es más importante que la cantidad de analito que llega al detector sea la máxima posible, aun cuando se utilicen volúmenes de muestra superiores al volumen de ruptura. Ello supone trabajar con volúmenes del orden de V_m (**Figura 18**), fundamentalmente cuando volúmenes de muestra inferiores a V_b no permiten alcanzar los límites de detección deseados (Subra *et al.*, 1988). También es usual trabajar en estas condiciones cuando se desarrollan MRMs en los que se determinan varios analitos simultáneamente con diferentes retenciones en C-1, ya que a menudo es difícil ajustar las condiciones para que no exista ruptura de ninguno de los analitos y que a la vez se consiga la sensibilidad deseada.

En el caso de que las recuperaciones sean del orden del 100 %, la cuantificación de los analitos se puede llevar a cabo mediante comparación con patrones introducidos en el sistema directamente a través de un “loop” de inyección. Sin embargo, algunos autores no recomiendan este método, ya que según comentan, puede existir cierta imprecisión con respecto al volumen del “loop” de inyección, siendo la calibración del mismo una operación bastante delicada (Hennion y Scribe, 1993). Además, debido al acoplamiento de ambas columnas en el sistema SPE-LC, podrían producirse ensanchamientos de bandas no subsanables con los gradientes de fase móvil.

Otro modo más aceptado para la cuantificación es mediante patrones o muestras fortificadas que se someten al mismo proceso de preconcentración y posterior determinación cromatográfica que las muestras problema (Hennion y Scribe, 1993). Estas son también las mejores condiciones cuando se trabaja con recuperaciones por debajo del 100 % para algún analito, ya que de este modo la magnitud de recuperación obtenida no es relevante al cuantificarse con un patrón tratado igual que la muestra, siempre y cuando la reproducibilidad del método sea adecuada.

3.1.4. Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de plaguicidas

Al contrario que la técnica LC-LC, el acoplamiento SPE-LC ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento directo de muestras acuosas desde su introducción a finales de la década de los 70 y principios de los 80 (van Vliet *et al.*, 1979; de Jong, 1980; Roth *et al.*, 1981). Esta técnica ha permitido el desarrollo de diferentes métodos multiresiduales para el análisis de plaguicidas en muestras de agua de diferente procedencia (subterránea, superficial, potable, etc.).

Las primeras aplicaciones se centraron en el uso de precolumnas rellenas con fase reversa C₁₈, que como ya se ha indicado en la **Tabla 22** permitían la preconcentración satisfactoria de plaguicidas apolares y moderadamente polares. Sin embargo, su aplicación es muy limitada en el caso de analitos más polares, para los cuales se introdujeron fases adsorbentes con mayor capacidad de retención, tales como rellenos poliméricos derivados del poliestireno divinilbenceno (PLRP-s, PRP-1). En estas aplicaciones se utilizaban montajes instrumentales a base de bombas y válvulas de alta y baja presión, de manera que se podían llevar a cabo preconcentraciones más o menos automatizadas (Goewie *et al.*, 1984^a; Goewie *et al.*, 1984^b; Hennion *et al.*, 1991; Coquart y Hennion, 1991^a; Coquart y Hennion, 1991^b; Coquart y Hennion, 1992).

Posteriormente, se desarrollaron equipos instrumentales especialmente diseñados para llevar a cabo esta modalidad de acoplamiento, tales como el OSP-2 de Merk o el PROSPEKT de Spark Holland (The Netherlands). Cabe destacar, por ejemplo, el método multiresidual completamente automatizado para la determinación de residuos de plaguicidas por LC desarrollado por Slobodník *et al.* (1993). Estos autores introducen el sistema SAMOS (“*System for Automated Measurement of Organic Micropollutants in Surface Water*”), haciendo uso de un procesador de muestras PROSPEKT y de precolumnas poliméricas desechables PLRP-S (10 × 2 mm d.i.). El procedimiento propuesto lo validan con muestras de agua superficial fortificadas a niveles de 1 µg·l⁻¹ con 27 plaguicidas pertenecientes a diferentes familias químicas (ureas, uracilos, triazinas, compuestos

organofosforados, etc.). Es igualmente destacable el trabajo llevado a cabo por Hiemstra y De Kok (1994), para la determinación de plaguicidas N-metilcarbamatos en aguas mediante preconcentración “*on-line*”. Estos autores utilizaron tanto el equipo OSP-2 como el PROSPEKT, y tres tipos diferentes de precolumnas, dos con fase estacionaria C₁₈ y una con fase PLRP-S. La determinación se llevó a cabo mediante detección fluorescente, tras una etapa de derivatización post-columna con ortoftalaldehído, previa hidrólisis de los analitos una vez preconcentrados y separados, alcanzándose límites de detección entre 30-50 ng·l⁻¹ en aguas superficiales.

Pichon y Hennion, (1994) llevaron a cabo la determinación de carbaril, varias triazinas, fenilureas y plaguicidas organofosforados en muestras de agua mediante preconcentración de 150 ml de agua superficial en precolumnas PLRP-S (10 × 2 mm d.i.) utilizando un PROSPEKT y detección por barrido de diodos, presentando muestras fortificadas a niveles de 0.3 µg·l⁻¹. Posteriormente, Norberg *et al.*, (1995) propusieron un método multiresidual para la determinación de plaguicidas organofosforados en muestras de agua superficial, mediante preconcentración en una precolumna PLRP-S (10 × 2 mm d.i.) y detección por DAD, obteniéndose valores de recuperación en agua superficial fortificada a 1 µg·l⁻¹, entre 95-121 %, exceptuando el caso de los analitos más polares, como el monocrotofos (11 %) y el vamidotion (70 %).

Cabe destacar de nuevo, los esfuerzos realizados en la preconcentración de analitos polares en cuanto a utilización de fases estacionarias con mayores capacidades de retención. Se han llevado a cabo intentos de utilizar fases estacionarias a base de carbón grafitizado para llevar a cabo preconcentración “*on-line*”. Slobodník *et al.* 1996^a estudiaron la SPE de tres insecticidas metilcarbamatos (propoxur, carbaril y metiocarb) y la posterior determinación por LC-UV. Para ello llevaron a cabo experiencias de preconcentración “*off-line*” utilizando tanto discos Empore de carbón (EACD) como cartuchos Envi-Carb de carbón grafitizado; así como experiencias de preconcentración “*on-line*” utilizando precolumnas de 10 × 2 mm d.i., rellenas con fase estacionaria Envicarb, discos EACD y precolumnas

rellenas con carbón grafitizado CPP-50. Centrándonos en las experiencias llevadas a cabo mediante SPE "on-line", los autores destacan la poca utilidad de las precolumnas rellenas con Envi-carb, que no aguantaron las presiones de trabajo. En el caso de los discos utilizados, todos los picos presentaban grandes colas, debido probablemente a las enormes retenciones de los mismos, finalmente la forma de los picos mejoró de manera considerable en el caso del relleno CPP-50, incluso en el caso de analitos bastante apolares como son el propoxur, carbaril y metiocarb.

Dentro de la línea de obtener mayor retención de analitos polares, Guenu y Hennion (1996) utilizaron precolumnas de 8×2 mm d.i. rellenas con fase polimérica PS-DVB ($1000 \text{ m}^2/\text{g}$ de superficie específica), las cuales debido al pobre acoplamiento que presentaban con columnas analíticas C_{18} se acoplaron a columnas analíticas Hypercarb (250×4.6 mm d.i.) rellenas con carbón grafitizado poroso. Volúmenes de muestras de 100 ml fortificados con DIA y con plaguicidas polares pertenecientes a diferentes familias químicas (clopiraldid, oxamilo, dicamba, monocrotofos, picloram, bentazon, fenuron y otros) a niveles de 0.1, 0.2 y $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, en el caso de agua HPLC, potable y superficial, respectivamente, se preconcentraron y determinaron mediante LC-DAD. Para todos los analitos se obtuvieron recuperaciones cuantitativas comprendidas entre 94-100 %. En esta misma línea de trabajo, Masqué *et al.* (1998) han presentado un estudio reciente sobre utilización de diferentes fases estacionarias para la retención de compuestos polares. En este trabajo, comparan tres fases diferentes, una a base de carbón, Carbopack B (Supelco); una fase polimérica funcionalizada, Bond Elut PPL (Varian) y una resina polimérica, HYSphere-1 (Spark Holland), las cuales se utilizan para la preconcentración de oxamilo, metomilo, fenol, bentazon, simazina, MCPA y atrazina. Estos autores señalan las ventajas de la fase polimérica HYSphere-1, para la cual se obtuvieron mejores parámetros de recuperación de los analitos. Esta fase estacionaria, presenta tamaños de partícula 25 veces más pequeños que la Bond Elut PPL, lo que incrementa el área superficial de la misma, pudiendo presentar más interacciones con los analitos.

Además del uso de cartuchos o precolumnas, se ha descrito la utilización de discos de SPE tal y como se indicaba en el trabajo de Slobodník *et al.* (1996^a), mencionado anteriormente. La utilización de este dispositivo de SPE presenta como principal ventaja la posibilidad de trabajar con elevados flujos de muestra durante la etapa de preconcentración. Las fases utilizadas en los mismos son similares a las de las precolumnas y normalmente se colocan en soportes especiales que permiten acoplar varios discos de extracción para aumentar, de este modo, los volúmenes de ruptura. Chiron y Barceló (1993) llevaron a cabo la determinación de varios insecticidas metilcarbamatos (aldicarb, carbofuran y carbaril) junto a algunos de sus productos de transformación mediante SPE “*on-line*” utilizando discos Empore C₁₈. Tras preconcentrar 10 ml de muestra realizaron una reacción de derivatización post-columna para formar los derivados fluorescentes. Con este procedimiento se determinaron los analitos a niveles de 0.01 µg·l⁻¹ en muestras de agua.

Recientemente, se ha descrito un nuevo diseño de precolumna para llevar a cabo SPE “*on-line*” que consiste en una precolumna de dimensiones 10 × 4.6 mm d.i. que se llena con una espiral de material de disco Empore C₁₈ (Martín-Esteban *et al.*, 1996). Este dispositivo se ha utilizado para preconcentrar simazina, cianazina, atrazina, propanilo, linuron, fenamifos, DIA, DEA e HA en diferentes muestras de agua (subterránea, potable y de mar), obteniéndose volúmenes de ruptura similares a los obtenidos mediante precolumnas PRP-1 y PLRP-S de similares dimensiones. Estos autores comprobaron que la adición de un 10 % de NaCl a la muestra incrementaba el volumen de ruptura de algunos de los analitos estudiados de manera considerable. Mediante preconcentración de 60 ml de muestra obtuvieron límites de detección entre 0.01-0.2 µg·l⁻¹.

Como es bien sabido, las columnas analíticas más utilizadas como C-2 después de la etapa de preconcentración en C-1, suelen ser de tipo C₁₈, debido fundamentalmente a que pueden separar compuestos con un rango amplio de polaridad, así como alcanzar rápidamente el equilibrio después de cambios en la composición de la fase móvil, además de presentar bastante estabilidad mecánica, larga duración y buena reproducibilidad entre lotes (Barceló y Hennion, 1997). Sin

embargo, hay que destacar algunos trabajos en los que debido a las características de los analitos y/o de la columna enriquecedora utilizada como C-1 se han utilizado otras fases estacionarias en C-2. Así, en el trabajo anteriormente descrito de Guenu y Hennion (1996), la precolumna polimérica PS-DVB tuvo que acoplarse a una columna analítica a base de carbón, debido a que se requirieron similares retenciones en C-1 y C-2 para que el acoplamiento de ambas columnas, y por tanto, la forma de los picos de los analitos, resultaran adecuados. Dupas *et al.* (1996) presentaron un trabajo en el que determinaban 21 plaguicidas pertenecientes a diferentes familias químicas, utilizando en el caso de los analitos más polares precolumnas a base de carbón grafitizado poroso (PGC) que acoplaban a una columna analítica Hypercarb rellena con la misma fase estacionaria (PGC). Ibañez *et al.* (1997) llevaron a cabo la determinación de varios herbicidas derivados piridílicos (diquat, paraquat y difenzoquat) mediante preconcentración de 50 ml de muestra acuosa en una precolumna rellena con fase GCP que se acopló a una columna analítica Hypercarb también a base de GCP, obteniendo límites de detección inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Los problemas de selectividad inherentes a la técnica SPE-LC son bien conocidos, ya que durante la etapa de preconcentración de los analitos se pueden preconcentrar también muchos interferentes de la muestra; además, la utilización de fases adsorbentes con mucha capacidad de retención magnifica este problema cuando se utilizan sistemas de detección convencionales en LC (UV o DAD). Una posibilidad para mejorar la selectividad ha sido la inclusión de recursos quimiométricos, tales como el análisis de multicomponentes (MCA), posteriormente a la determinación por SPE-LC-DAD. Esta última posibilidad fue aplicada por Huen *et al.* (1994) para determinar varios plaguicidas pertenecientes a diferentes familias químicas, con límites de detección de hasta $0.01 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, en una única determinación cromatográfica, ya que el MCA permitió cuantificar compuestos coeluidos que no se podían resolver por LC en las condiciones de trabajo. Otra aplicación es la presentada por Lacorte *et al.* (1995), que utilizaron el análisis multivariante para determinar alaclor y metolaclor en muestras de agua, al coeluir ambos analitos después de intentar determinarlos por SPE-LC-DAD. Tras la preconcentración de

100 ml de muestra de agua en cartuchos poliméricos PLRP-S, y posterior determinación por LC-DAD, se aplicaron cálculos quimiométricos que permitieron la resolución de ambos analitos y la determinación de los mismos tanto en muestras de agua LC como en muestras de agua superficial fortificadas a $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Otra posibilidad para mejorar la selectividad de la técnica ha consistido en el empleo de fases estacionarias selectivas, tal y como se comentaba en el apartado 3.1.2. (Parámetros de preconcentración) de esta Memoria. En este sentido, cabe destacar la posibilidad de acoplar dos precolumnas, de modo que, en la primera se lleva a cabo retención de un elevado número de compuestos orgánicos (analitos e interferentes) mientras que en la segunda se produce la captura selectiva de los analitos, los cuales son finalmente transferidos a la columna analítica, donde se lleva a cabo la separación cromatográfica. Dentro de esta línea se enmarca el trabajo que presentaron Coquart y Hennion (1991^b) para la determinación de 4 triazinas en aguas (simazina, atrazina, propazina y terbutilazina). Los analitos eran inicialmente retenidos en una columna polimérica desde la cual se transferían con la fase móvil adecuada hasta la columna intercambiadora catiónica, de donde eran finalmente eluidos hasta la columna analítica C_{18} . Posteriormente, Vera-Avila *et al.* (1996) presentaron la determinación de 6 herbicidas clorofenoxiácidos mediante preconcentración de 75 ml de muestra en una pequeña columna polimérica (20×2 mm d.i.) y posterior transferencia a una columna intercambiadora aniónica de la cual los analitos retenidos eran transferidos hasta la columna analítica C_{18} .

Otro tipo de fases estacionarias recientemente desarrolladas han sido los inmunoabsorbentes, que pueden reconocer y atrapar los analitos para los cuales se han desarrollado los anticuerpos así como otros analitos de la misma familia debido a la similitud de estructuras químicas, tal y como ya se ha comentado en el Capítulo 1 (apartado 1.4.) de esta Memoria. Thomas *et al.* (1994) llevaron a cabo la determinación de atrazina en muestras de agua mediante inyección de 250 μl de muestra en una precolumna (6.35×2.1 mm d.i.) que contenía el anticuerpo inmovilizado capaz de reconocer al herbicida. Inmediatamente después, el analito se eluía “*on-line*” hasta una columna C_{18} . Mediante esta técnica obtuvieron un límite de

detección del orden de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Posteriormente, Pichon *et al.* (1995^a, 1995^b y 1996) llevaron a cabo la determinación de herbicidas fenilureas y triazínicos en aguas utilizando precolumnas en las que se inmovilizaron anticuerpos para el isoproturon y la atrazina. La separación analítica se llevó a cabo en todos los casos mediante una columna C_{18} convencional ($250 \times 4.6 \text{ mm d.i.}$) alcanzándose límites de detección de hasta $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, sin etapas previas de purificación. Más detalles sobre este trabajo se presentan en el Capítulo 1 de la presente Memoria (apartado 1.4.).

Cabe destacar, la importancia de la utilización de sistemas de detección selectivos de masas acoplados a los sistemas de SPE-LC, en cuanto a mejora de selectividad. Existen bastantes aplicaciones basadas en SPE-LC-MS, en las que se han hecho uso de diferentes interfases. Las interfases más utilizadas hasta mitad de la presente década han sido la “*termospray*” (TSP) y la de haz de partículas (PB, “*Particle Beam*”), existiendo bastantes aplicaciones de ambas en el campo del PRA, fundamentalmente para la determinación de fenilureas, carbamatos, ácidos clorofenoxiácidos, triazinas y compuestos pertenecientes a algunas otras familias químicas mediante SPE-LC-MS (Bagheri *et al.*, 1993; Chiron *et al.*, 1994; Marce *et al.*, 1995; Sennert *et al.*, 1995; Slobodník *et al.*, 1996^b; Aguilar *et al.*, 1996; Aguilar *et al.*, 1998). La interfase PB, presentaba bastantes ventajas frente a la TSP, debido fundamentalmente a la posibilidad de operar tanto en condiciones de ionización química (positiva o negativa), como ionización por impacto electrónico (EI), permitiendo de esta forma obtener información estructural de los analitos a partir del espectro de masas obtenido. Frente a ésta, la interfase TSP resultaba más compatible con las fases móviles utilizadas en LC y en algunos casos ofrecía mayor sensibilidad, en contrapartida, presentaba falta de información estructural de los analitos.

Otra serie de interfases de desarrollo más reciente, son las interfases a presión atmosférica (API), que comparadas con las anteriores presentan mayor robustez y sensibilidad, debido a lo cual su aplicación se ha extendido en los últimos años. Dentro de estas cabe destacar la “*electrospray*” (ESP), y la de más reciente aplicación en el campo del PRA, la interfase de ionización química a presión

atmosférica (APCI, “*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*”). Existen aplicaciones bastante recientes en el campo del PRA en las que se hace uso de SPE “*on-line*” seguido de LC-MS mediante interfases API (Molina *et al.*, 1995; Chiron *et al.*, 1995; Ferrer *et al.*, 1997; Aguilar *et al.*, 1998). Otra aplicación reciente es la presentada por Hogenboom *et al.* (1998), que llevaron a cabo la determinación de varios herbicidas triazínicos a niveles entre 0.1-1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ mediante SPE “*on-line*” utilizando 4 ml de muestra y posterior determinación por LC-MS o LC-MS-MS. Estos autores utilizaron una única columna de 20 \times 4 mm d.i. para preconcentrar y llevar a cabo la separación cromatográfica, aprovechando la elevada sensibilidad y selectividad de la detección por masas utilizando una interfase APCI.

3.1.5. Referencias

- Aguilar, C.; Borrull, F.; Marce, R.M., (1996), *Chromatographia*, **43**, 592.
- Aguilar, C.; Ferrer, I.; Borrull, F.; Marce, R.M.; Barcelo, D., (1998), *J. Chromatogr. A.*, **794**, 147.
- Bagheri, H.; Brouwer, E.R.; Ghijssen, R.T.; Brinkman, U.A.Th., (1993), *J. Chromatogr.*, **647**, 121.
- Barceló, D.; Hennion, M.-C., “*Trace determination of pesticides and their degradation products in water*”, 1997, Elsevier Science B.V., The Netherlands.
- Chiron, S.; Barceló, D., (1993), *J. Chromatogr.*, **645**, 125.
- Chiron, S.; Dupas, S.; Scribe, P.; Barceló, D., (1994), *J. Chromatogr. A*, **665**, 295.
- Chiron S.; Papilloud, S.; Haerdi, W.; Barceló, D., (1995), *Anal. Chem.*, **67**, 1637.
- Coquart, V.; Hennion, M.-C., (1991^a), *J. Chromatogr.*, **553**, 329.
- Coquart, V.; Hennion, M.-C., (1991^b), *J. Chromatogr.*, **585**, 67.
- Coquart, V.; Hennion, M.-C., (1992), *J. Chromatogr.*, **600**, 195.
- Crescenzi, C.; Di Corcia, A.; Guerriero, E.; Samperi, R., (1997), *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 479.
- Di Corcia, A.; Crescenzi, C.; Guerriero, E.; Samperi, R., (1997^a), *Environ. Sci. Technol.*, **31**, 1658.

- Di Corcia, A.; Crescenzi, C.; Samperi, R.; Scappaticcio, L., (1997^b), *Anal. Chem.*, **69**, 2819.
- Dupas, S.; Guenu, S.; Pichon, V.; Montiel, A.; Welte, B.; Hennion, M.C., (1996), *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, **65**, 53.
- Ferrer, I.; Hennion, M.C.; Barcelo, D., (1997), *Anal. Chem.*, **69**, 4508.
- Goewie, C.E.; Kwakman, P.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th.; Maasfeld, W.; Seshadri, T.; Kettrup, A., (1984^a), *J. Chromatogr.*, **284**, 73.
- Goewie, C.E.; Nielen, M.W.F.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th., (1984^b), *J. Chromatogr.*, **301**, 325.
- Guenu, S.; Hennion, M.-C., (1996), *J. Chromatogr. A*, **737**, 15.
- Hennion, M.-C.; Subra, P.; Coquart, V.; Rosset, R., (1991), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **339**, 488.
- Hennion, M.-C.; Scribe, P., (1993), "Sample handling strategies for the analysis of organic compounds from environmental water samples" en "Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance", D. Barceló (Editor), Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam.
- Hiemstra, M.; De Kok, A., (1994), *J. Chromatogr. A*, 1994, **667**, 155.
- Hogenboom, A.C.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.T., (1998), *J. Chromatogr. A*, **794**, 201.
- Huen, J.M.; Gillard, R.; Mayer, A.G.; Baltensperger, B.; Kern, H., (1994), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **348**, 606.
- Ibañez, -M; Picó, -Y; Mañes, J, (1997), *Chromatographia*, **45**, 402.
- De Jong, G.J., (1980), *J. Chromatogr.*, **183**, 203.
- Lacorte, S.; Barceló, D.; Tauler, R., (1995), *J. Chromatogr. A*, **697**, 345.
- Liska, I, (1993), *J. Chromatogr. A*, **655**, 163.
- Marcé, R.M.; Prosen, H.; Crespo, C.; Calull, M.; Borrull, F.; Brinkman, U.A.Th., (1995), *J. Chromatogr. A*, **696**, 63.
- Martín-Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C., (1996), *J. Chromatogr. A*, **752**, 291.
- Masqué, N.; Marcé, R.M.; Borrull, F.,(1998), *J. Chromatogr. A*, **793**, 257.

- Molina, C.; Durand, G.; Barceló, D., (1995), *J. Chromatogr. A*, **712**, 113.
- Nondek, L.; Chvalovsky, V., (1983), *J. Chromatogr.*, **268**, 395.
- Norberg, J.; Slobodník, J.; Vreuls, R.J.J.; Brinkman, U.A.T., (1995), *Anal. Methods Instrum.*, **2**, 266.
- Pichon, V. ; Hennion, M.-C., (1994), *J. Chromatogr. A*, **665**, 269.
- Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.-C., (1995^a), *Anal. Chim. Acta*, 311, 429.
- Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.-C.; Daniel, R.; Martel, A.; Le Goffic, F.; Abian, J.; Barceló, D., (1995^b), *Anal. Chem.*, 67, 2451.
- Pichon, V.; Chen, L.; Durand, N.; Le Goffic, F.; Hennion, M.-C., (1996), *J. Chromatogr. A*, 725, 107.
- Roth, W.; Beschke, K; Jauch, R.; Zimmer, A.; Koss, F.W., (1981), *J. Chromatogr.*, **222**, 13.
- Sennert, S.; Volmer, D.; Levsen, K.; Wunsch, G., (1995), *Fresenius' J. Anal. Chem.*, **351**, 642.
- Slobodník, J.; Groenewegen, M.G.M.; Brouwer, E.R.; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th., (1993), *J. Chromatogr.*, **642**, 359.
- Slobodník, J.; Öztezkizan, Ö; Lingeman, H.; Brinkman, U.A.Th., (1996^a), *J. Chromatogr. A*, **750**, 227.
- Slobodník, J.; Hogenboom, A.C.; Vreuls, J.J.; Rontreè, J.A.; van Baar, B.L.M.; Niessen, W.M.A.; Brinkman, U.A.Th., (1996^b), *J. Chromatogr. A*, **741**, 59.
- Subra, P.; Hennion, M.-C.; Rosset, R.; Frei, R.W., (1988), *J. Chromatogr.*, **456**, 121.
- Thomas, D.H.; Beck-Westermeyer, M.; Hage, D.S., (1994), *Anal. Chem.*, **66**, 3823.
- Van Vliet, H.P.M.; Bootsman, Th.C.; Frei, R.W.; Brinkman, U.A.Th., (1979), *J. Chromatogr.*, **185**, 483.
- Vera-Avila, L.E.; Padilla, P.C.; Hernández, M.G.; Meraz, J.L.L., (1996), *J. Chromatogr. A*, **731**, 115.

Tabla 22. Diferentes fases adsorbentes utilizadas en SPE.

<i>Fase adsorbente</i>	<i>Mecanismo de separación</i>	<i>Eluyente</i>	<i>Naturaleza del analito</i>	<i>Compuestos</i>
Silice enlazada	fase inversa	Disoluciones a base de agua y disolvente orgánico	de no-polar a débilmente polar	PAHs, PCBs, plaguicidas organofosforados y organoclorados, herbicidas moderadamente o poco polares
Polímeros de estirenodivinil-benceno	fase inversa	Disoluciones a base de agua y disolvente orgánico	compuestos aromáticos desde no-polares hasta polaridad media	fenoles, clorofenoles, cloroanilinas, herbicidas de polaridad media
Carbón grafitizado	fase inversa	Disoluciones a base de agua y disolvente orgánico	de no polar hasta relativamente polar	alcoholes, nitrofenoles, herbicidas relativamente polares
Intercambiadores iónicos en base sílica o polimérica	Intercambio iónico	agua (con ajuste de pH)	compuestos catiónicos y/o aniónicos	fenoles y amino fenoles, anilina y derivados polares, ácidos sulfónicos,
Adsorbentes cargados con metales	Intercambio de ligando	Solución acuosa complejante	con propiedades de complejación de metales	derivados de la anilina, ácidos carboxílicos
Inmunoadsorbentes	reacciones antígeno-anticuerpo	Solución acuosa (ajuste pH, adición sales/modificadores orgánicos)	propiedades afines al anticuerpo	determinación herbicidas (triazinas, fenilureas, etc.)
Fases de columnas RAM (soportes a base de sílica enlazada o poliméricos)	Exclusión por tamaños y otros (fase inversa, intercambio iónico)	Disoluciones a base de agua y disolvente orgánico	Moléculas pequeñas capaces de superar las barreras físicas y/o químicas	Compuestos varios (drogas, pesticidas etc.) junto a interferentes con elevados tamaños de partícula

3.2. Experimental

Previamente al desarrollo de metodología analítica mediante acoplamiento SPE-LC, se tuvo que modificar el equipo instrumental disponible, un procesador de muestra ASPEC XL medioambiental de Gilson (Villiers-le-Bel, France), para que se pudiera llevar a cabo esta modalidad de acoplamiento de manera completamente automatizada.

3.2.1. Adaptación del equipo instrumental ASPEC XL

El procesador de muestra ASPEC XL (“Automatic Sample Processing System using Extraction Columns”) es un equipo automático desarrollado por Gilson para llevar a cabo de forma rápida y eficaz la preparación de muestra (purificación y/o concentración), utilizando cartuchos desechables de SPE con diferentes capacidades (1, 4, 6 y 8 ml) (**Figura 20**). En caso necesario este equipo puede llevar a cabo la inyección del extracto de la muestra preconcentrada en un sistema de HPLC en línea. En definitiva, se trata de un equipo inicialmente diseñado para llevar a cabo SPE “*off-line*” de manera completamente automatizada.

Aprovechando la versatilidad del ASPEC, se planteó su utilización para llevar a cabo preconcentración “*on-line*”, requiriéndose para este fin importantes modificaciones en cuanto a hardware y software. En la **Figura 21** se presenta un esquema del equipo instrumental finalmente utilizado en nuestro laboratorio.

En cuanto a las modificaciones de hardware introducidas, se agrega una válvula de 8 vías de baja presión (LP), modelo 817 de Gilson, que permite seleccionar indistintamente cada uno de los canales de disolventes acondicionadores (C) o de muestra (S). También se incorpora una bomba de HPLC (P-1) para llevar a cabo el acondicionamiento de la precolumna enriquecedora y la posterior carga de la muestra en la misma. De las dos válvulas de alta presión suministradas con el equipo, la primera (HV-1) permite en su posición de “*inject*” purgar los diferentes canales seleccionados mediante la válvula LP, mientras que en la posición de “*load*” se lleva a cabo el acondicionamiento de la precolumna (C-1) o la carga de la

muestra. De este modo, durante el procesamiento de cada muestra no se hace uso del puerto de inyección (IP) y sólo es necesario este dispositivo cuando se llevan a cabo inyecciones directas de un determinado volumen de disolución patrón, que viene determinado por el "loop" de inyección que se colocaría en la posición ocupada por la precolumna C-1 en la segunda válvula de 6 vías (HV-2). Para llevar a cabo la etapa de preconcentración, una vez purgados los canales (C o S), los disolventes o la muestra son transferidos a la precolumna (C-1). También se incorpora otra bomba de HPLC (P-2) que se encarga de llevar a cabo la transferencia de los analitos desde la precolumna hasta la columna analítica C-2, donde tiene lugar la posterior separación de los mismos, pasando finalmente al sistema de detección (D) adecuado.

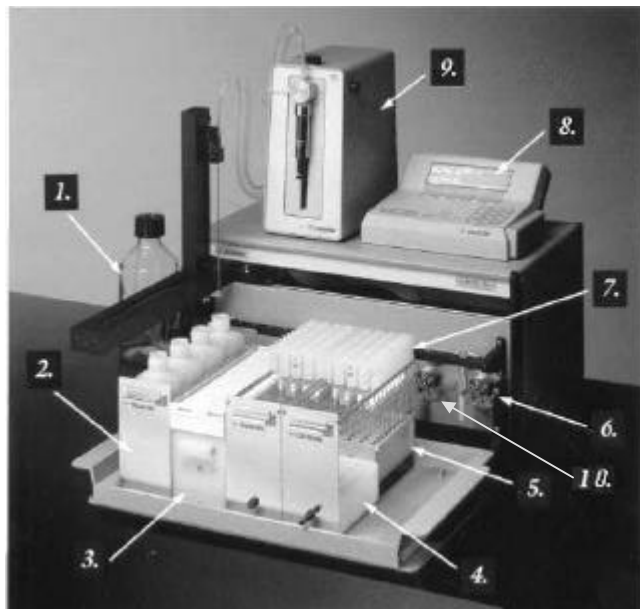


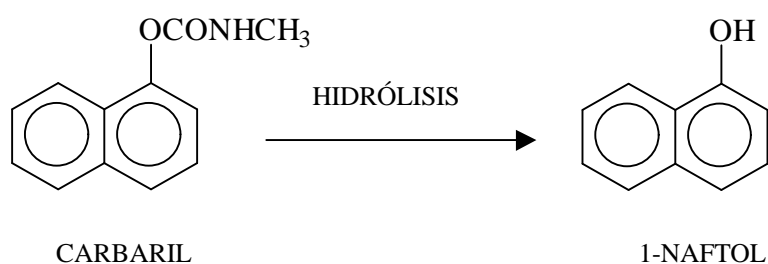
Figura 20. ASPEC XL medioambiental.

1, Recipiente para disolvente; 2, Rack de disolventes; 3, Rack de muestras; 4, Cubeta de drenaje; 5, Rack de colectores; 6, Válvula de inyección; 7, Rack de los cartuchos de SPE; 8, Mini-ordenador o keypad; 9, Bomba de baja presión o diluidor; 10, Válvula de alta presión.

Las modificaciones en cuanto a software consistieron en el desarrollo de programas informáticos, utilizando Turbo Pascal como lenguaje de programación, que tomaran control directo de todos los módulos del ASPEC. Una vez escritos, éstos programas, se compilaban, dando lugar a archivos ejecutables desde el pequeño ordenador (“*intelligent keypad*”) suministrado junto con el procesador de muestra, que no eran modificables desde este último módulo. Algunos de los programas desarrollados y utilizados en este trabajo se presentan en el **Apéndice** incorporado en esta Memoria.

Una vez solventadas las principales dificultades en cuanto a hardware y software, se llevó a cabo un estudio para evaluar las posibilidades del equipo en cuanto al acoplamiento SPE-LC, seleccionándose un compuesto, en principio, fácil de preconcentrar y con buena respuesta analítica. Dentro de nuestro campo de trabajo se escogió el carbaril, insecticida de la familia de los metilcarbamatos, ampliamente utilizado en numerosos cultivos. El interés por analizar esta familia de insecticidas es bien conocido, ya que se trata de compuestos que se introdujeron en la agricultura para sustituir a los persistentes insecticidas organoclorados, debido a su mayor facilidad de degradación y menor persistencia en el medio ambiente. En particular, el carbaril ha resultado muy útil debido a su poca toxicidad en mamíferos, aunque no ocurra lo mismo en el caso de organismos acuáticos (moluscos y algunas especies de peces), para los cuales éste insecticida así como su primer producto de transformación por hidrólisis (el 1-naftol) resultan bastante tóxicos.

De este modo, parece interesante que todo procedimiento de análisis de residuos de carbaril incluya también al producto de transformación. Por ello, se ha desarrollado un procedimiento muy sencillo y rápido para la determinación de ambas especies en muestras de agua por acoplamiento SPE-LC, utilizando tanto detección fluorescente como por barrido de diodos, aprovechando la elevada sensibilidad y selectividad del primer detector así como el potencial identificativo del segundo. Finalmente, se lleva a cabo un estudio de degradación del carbaril en medio acuoso, comprobándose la aparición del producto de transformación 1-naftol. A continuación, se muestran las estructuras químicas de ambos compuestos:



Seguidamente se presenta el trabajo experimental desarrollado, destacándose el poco volumen de muestra requerido (10 ml) y la buena sensibilidad alcanzada para ambos compuestos, en particular para el carbaril. También cabe resaltar la elevada selectividad del procedimiento, debido fundamentalmente a la detección por fluorescencia, a la cual se le unió el poder de confirmación aportado por el DAD.

El artículo científico presentado es el siguiente:

“Rapid determination of carbaryl and 1-naphthol at ppt levels in environmental waters by automated on-line SPE-LC-DAD-FD”

Chromatographia, **47**: 596-600 (1998)

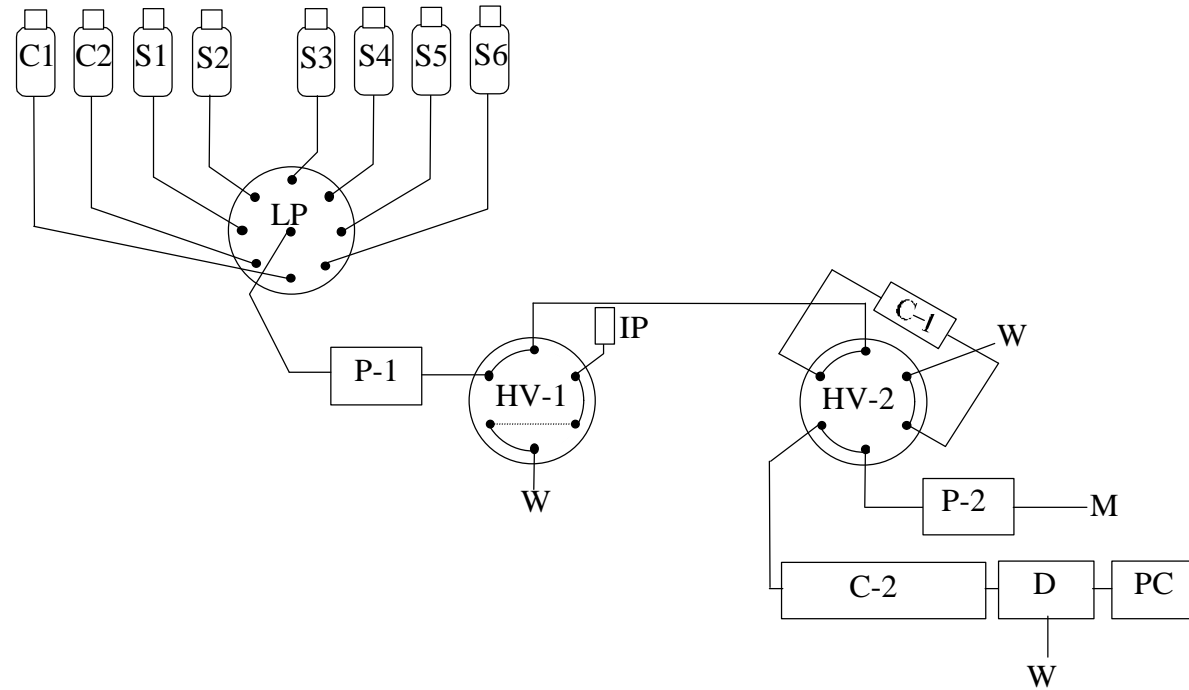


Figura 21. Representación esquemática del equipo instrumental utilizado en el acoplamiento SPE-LC.
C, Disolventes acondicionadores; S, Muestras de agua; LP, Válvula de baja presión; HV-1 y HV-2, Válvulas de alta presión; P-1, Bomba preconcentradora; IP, Puerto de inyección para inyecciones mediante loop; C-1, Columna preconcentradora; P-2, Bomba para la elución y separación cromatográfica; M, Fase móvil; C-2, Columna analítica; D, Detector; PC, Ordenador personal; W, Desecho.

RAPID DETERMINATION OF CARBARYL AND 1-NAPHTHOL AT PPT LEVELS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY AUTOMATED ON-LINE SPE-LC-DAD-FD

C. Hidalgo, J.V. Sancho, A. Roig-Navarro, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

Key Words

Column liquid chromatography
On-line trace-enrichment
Environmental water samples
Trace carbaryl analysis

Summary

A fully automated method, based on on-line solid phase extraction (SPE) then liquid chromatography with diode-array and fluorescence detection, has been developed for the trace-level determination of carbaryl and 1-naphthol, its primary transformation product, in environmental water samples. By means of rapid enrichment on a 30 mm × 4 mm i.d. 10- μ m ODS pre-column, using a 10-mL water sample, before LC determination both compounds were recovered satisfactorily from different environmental water samples spiked at various concentrations (0.05-10 μ g·L⁻¹). Average recoveries were between 93 and 102 % with coefficients of variation between 1 and 4 %; detection limits as low as 10 and 50 ng·L⁻¹ (ppt) were estimated for carbaryl and 1-naphthol, respectively. With this small sample volume, sample throughput was up to 30 samples per day. A carbaryl degradation study was performed by spiking a surface-water sample at 2 μ g·L⁻¹. After 15 days the 80 % of the carbaryl was degraded and the presence of 1-naphthol was confirmed by means of its UV spectrum.

Introduction

Carbaryl is a broad spectrum *N*-methylcarbamate insecticide widely used in European countries (over 500 tons per annum)[1] because of its effectiveness against many agricultural pests and its relatively low acute mammalian toxicology (oral LD50 for male rats 850 mg·kg⁻¹). Carbaryl is degraded by chemical hydrolysis and biodegradation, forming several metabolites; 1-naphthol is the primary transformation product. Although this compound does not accumulate in the body, its toxic effects in the aquatic ecosystem, specially marine invertebrates, have been described, as also have those of the parent compound [2]. The adverse effects of insecticides such as carbaryl on honey-bee colonies are also well known [3].

This insecticide has been classified as a transient leacher according to its Groundwater Ubiquity Score (GUS) index (1.8) assigned by a simple mathematical model applied to predict whether a pesticide can contaminate groundwater. This index can, however, vary substantially according to soil-type, and a monitoring program has shown that carbaryl residues occasionally reach concentrations up to 0.5 µg·L⁻¹ in an aquifer of Almeria (south eastern Spain) [4].

In the Comunidad Valenciana (eastern Spain, on the Mediterranean Coast) carbaryl is widely applied in olive groves for the control of many insect pests; the compound has also been recommended for use in citrus orchards against beetles and other frequent insects.

Because of the widespread use of the compound in agricultural areas, and the possibility of groundwater contamination, rapid, sensitive and selective methods are required to enable monitoring of the insecticide and its main degradation product in different environmental waters. Direct analysis of carbaryl by gas chromatography has proved difficult because of its thermal instability in the hot injector. To overcome this problem derivatization with acetic anhydride [5], trimethyl anilinium hydroxide [6] and other chemicals has been described. LC with ultraviolet, fluorescence or mass

spectrometry (MS) detection can, however, be applied directly, and has usually been the technique of choice.

LC methods developed for multi-residue determination of N-methylcarbamate pesticides include two-step post-column derivatization before fluorescence detection [7,8]. This procedure is also used in EPA method 531.1, which has a detection limit of $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl. For carbaryl and 1-naphthol the derivatization step can, obviously, be avoided because of their natural fluorescence. In recent years, immunoassay methods have also been validated for environmental monitoring of both compounds in ground-water samples [9].

Most recent methods available for determination of carbaryl and/or 1-naphthol make use of on-line or off-line SPE followed by LC with ultraviolet (UV) or mass spectrometric (MS) detection [10-16]. The main drawbacks of off-line methodology (liquid-liquid extraction (LLE) or SPE) have been already reported [17]; they include lack of automation and many time-consuming manual steps, loss of sensitivity owing to the injection of an aliquot, losses in possible evaporation steps, and risks of contamination necessitating the use of internal standards. On-line trace enrichment has, therefore, been preferred because automation can be complete and all the pre-concentrated analyte is introduced into the liquid chromatograph enabling the handling of smaller sample volumes to furnish sensitivities similar to those of off-line techniques.

The main objective of this work was the application of on-line trace-enrichment then LC with diode-array and fluorescence detection (DAD-FD). For this purpose, an automatic sample processor designed for off-line SPE (ASPEC XL) has been adapted by performing hardware and software modification of the commercial equipment. Thus, a short pre-column was placed at the sample loop position of a six-port liquid switching valve; after conditioning and sample loading the pre-column was coupled on-line to the analytical column by switching the valve to the inject position.

Fluorescence detection, possible because of the fluorescent naphthyl group, ensured sensitive and selective determination of both compounds; DAD was used for confirmatory purposes.

Experimental

Chemicals.

Carbaryl was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and 1-naphthol from ACROS (Geel, Belgium). HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA). Stock standard solutions of carbaryl and 1-naphthol (400 and 40 mg·L⁻¹) were prepared in methanol and stored at -20 °C. Diluted standard mixtures were prepared in HPLC water and stored at 4 °C.

Equipment

Experiments were performed with an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France). This system included an ASPEC XL automatic processor equipped with two Rheodyne six-port valves, a model 306 high-pressure pre-concentration pump, a Model 402 low-pressure pump, a Model 817 eight-port valve actuator and a Gilson intelligent keypad.

The LC system consisted of a 9012 ternary LC pump from Varian (Walnut Creek, USA) and an HP 1100 series diode-array detector connected on-line with an HP 1046A fluorescence detector (both from Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). LC columns were obtained from Scharlau Sciences (Barcelona, Spain). A 30 mm × 4 mm i.d. column packed with 10 μm Nucleosil ODS was used for sample enrichment and two 125 mm × 4 mm i.d. columns packed, respectively, with 5 μm and 3 μm Nucleosil ODS-2 were used for analysis. Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with an HP Chem Station for LC 3D System (software version G2180AA).

Surface water samples with suspended particles and containing substantial quantities of organic matter were filtered through 0.45- μm disposable nylon membranes from Scharlau Sciences.

Procedure

The experimental equipment is depicted in **Figure 1**. The enrichment column was sequentially conditioned with methanol, acetonitrile and HPLC water (5 mL of each) at 4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ and then standards or water samples (10 mL) were passed through the cartridge at 4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. Finally, the retained compounds were directly eluted on to the analytical column in the back-flush mode for 30 s by use of the mobile phase, an isocratic 40:60 (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ mixture, at a flow rate of 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. A wavelength timetable, shown in **Table I**, was used to register the fluorescence signal.

Table I. Wavelength timetable used with fluorescence detection.

Time (min)	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)
0	227	335
5.9	231	365

Results and Discussion

Analytical LC Separation

After determination of the excitation and emission wavelengths of carbaryl ($\lambda_{\text{exc.}}$ 227 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 335 nm) and 1-naphthol ($\lambda_{\text{exc.}}$ 331 nm; $\lambda_{\text{em.}}$ 365 nm) the chromatographic conditions were optimized. Acetonitrile was selected as organic modifier because of its low viscosity. Different mobile phases with acetonitrile compositions between 30 and 60 % and two ODS analytical columns (125 mm \times 4 mm i.d.) with different particle size (3 and 5 μm) were evaluated. An isocratic mixture consisting of 40:60 (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ and the 3 μm column were selected, because they furnished satisfactory peak shapes and the best resolution between the analytes.

The LC separation of the two compounds is shown in **Figure 2**, which presents the FD chromatogram obtained from a 100- μL loop injection of a standard mixture of carbaryl and 1-naphthol at 0.5 and 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. From this chromatogram direct detection limits of 0.1 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were obtained for each compound. The response linearity of the analytes was studied by direct injection of standard mixtures with concentrations between 0.5 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (carbaryl) and 2.5 and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1-naphthol); regression coefficients ($n=8$) were 0.9999 and 0.9995 for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

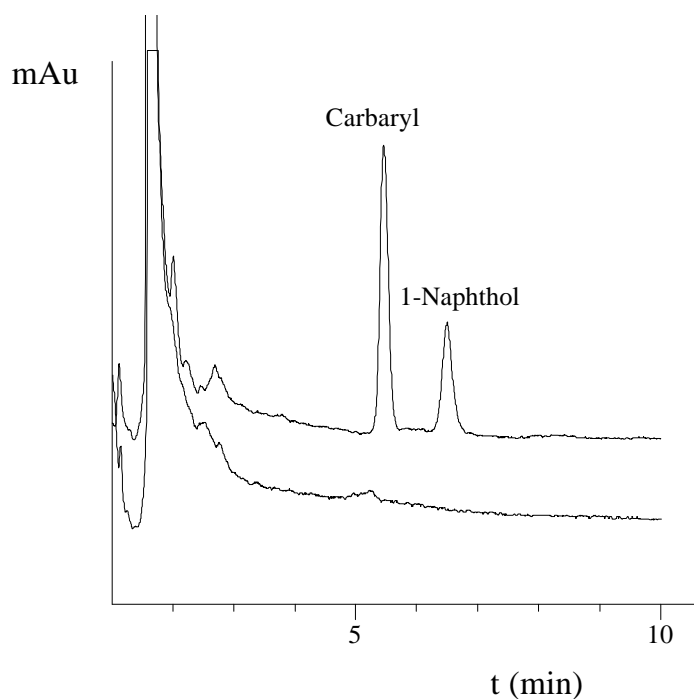


Figure 2. Direct LC-FD separation obtained after 100 μl loop injection, of a standard solution containing a mixture of carbaryl (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and 1-naphthol (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Sample Pre-Concentration

Although the direct detection limit of carbaryl was quite low, a previous enrichment step was added to improve the sensitivity for both parent compound and transformation product. The natural fluorescence of the analytes and the higher sensitivity associated with this technique, in comparison with UV detection, enabled the use of small sample volumes. In this way a water sample volume of 10 mL was considered sufficient to reduce detection limits while avoiding a great increase in total analysis time. FD was approximately 20 times more sensitive than the DAD for carbaryl and about four times more sensitive for 1-naphthol.

The response linearity of the method was studied for standard solutions with concentrations ranging between 0.05 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl and 0.25 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1-naphthol. Regression coefficients ($n=7$) of 0.9981 and 0.9990 for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

Repeatability studies were performed with standard solutions at two levels of concentration, 0.05 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl and 0.25 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1-naphthol; coefficients of variation were between 2 and 7 % ($n=7$).

Determination of Carbaryl and 1-Naphthol in Environmental Water Samples

The procedure was validated by means of recovery experiments with drinking- and surface-water samples spiked at different levels of concentration (0.05-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The recoveries were estimated by comparison of results from the spiked water samples with those from standard solutions pre-concentrated under the same experimental conditions, after verifying by means of 100- μl direct loop injections that breakthrough did not occur. The results, given in **Table II**, are indicative of acceptable recovery and reproducibility. **Figure 3** shows the chromatograms obtained from a surface-water sample spiked at 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with carbaryl and 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with 1-naphthol and from a blank sample. Detection limits as low as 10 and 50 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ were estimated for each compound, respectively.

Table II. Recoveries and coefficients of variation for carbaryl and 1-naphthol in environmental water samples spiked at different levels (n=5).

	Carbaryl		1-Naphthol	
	0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Drinking water	102 (2)	99 (3)	93 (4)	99 (4)
Surface water	100 (1)	99 (1)	101 (2)	99 (3)

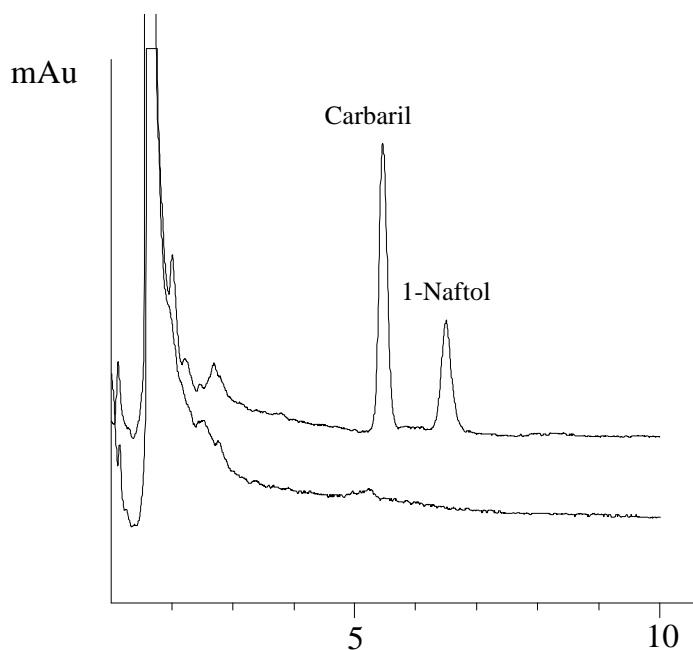


Figure 3. On-line SPE-LC-FD chromatograms obtained from (A) a 10 ml surface water sample spiked with carbaryl (0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and 1-naphthol (0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and (B) blank sample.

The recommended procedure was quite rapid, because of the small volume (10 mL) of water processed and because it was possible to perform chromatographic separation simultaneously with automated enrichment of the next sample. The analysis time was approximately 14 min per sample.

All these characteristics make the procedure very useful for screening drinking waters to ensure they accord with EEC regulations for pesticide residues in these samples [18]; these limit the concentration of individual pesticides and related transformation products to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the total concentration to $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

This procedure was applied in a program performed by our research group to monitor carbaryl and 1-naphthol in surface-water samples from a specially problematic wet area of Castellón (eastern Spain) almost exclusively dedicated to citrus orchards. Fortunately the results were always negative.

Study of the Degradation of carbaryl

The surface-water samples from Castellón were used to study the degradation of carbaryl. Water (250 mL) was spiked with the insecticide ($2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and after several days the amount of carbaryl remaining was estimated. It was confirmed that carbaryl degraded rapidly in the first few days, producing 1-naphthol, the identity of which was confirmed by DAD. **Figure 4** shows the FD chromatogram of the surface-water sample immediately after spiking (A) and 8 days later (B1). B2 shows the DAD chromatogram corresponding to chromatogram B1; 1-naphthol was identified by comparison of its spectrum with that of 1-naphthol in the library (match value 999.9).

It was assumed that the degradation processes followed first-order kinetics and experimental data were fitted to an exponential decay. A half-life time of 2 days was estimated for carbaryl.

Under the conditions used for this work other carbaryl degradation products were not detected during the 15 days of the study; in terms of mass balance the amount of pesticide degraded was equivalent to the amount of 1-naphthol obtained.

Conclusions

A fully automated on-line SPE-LC-DAD-FD method has been developed for the rapid and sensitive determination of carbaryl and its primary transformation product, 1-naphthol, in environmental water samples. Using a small sample volume of only 10 mL, detection limits of approximately 10 and 50 ng·L⁻¹ were estimated for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

Because a study of the degradation of carbaryl showed that 1-naphthol is rapidly formed, analytical procedures developed to monitor the parent compound in environmental water samples should also include this transformation product.

REFERENCES

- [1] *D. Barceló*, *J. Chromatogr.* **643**, 117 (1993).
- [2] *K. A. Massey, D. L. Van Engelen, I. M. Warner*, *Talanta* **42**, 1457 (1995).
- [3] *T. D. Spittler, R. A. Marafioti, G. W. Helfman, R. A. Morse*, *J. Chromatogr.* **352**, 439 (1986).
- [4] *S. Chiron, A. Valverde, A. Fernández-Alba, D. Barceló*, *J. of AOAC Int.* **78**, 1346 (1995).
- [5] *H.-J. Stan, P. Klaffenbach*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 151 (1991).
- [6] *H. Bagueri, C. S. Creaser*, *J. Chromatogr.* **547**, 345 (1991).
- [7] *W. Bläß*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 340 (1991).
- [8] *M. Hiemstra, A. de Kok*, *J. Chromatogr. A* **667**, 155 (1994).
- [9] *M.-P. Marco, S. Chiron, J. Gascón, B. D. Hammock, D. Barceló*, *Anal. Chim. Acta* **311**, 319 (1995).
- [10] *C. H. Marvin, I. D. Brindle, C. D. Hall, M. Chiva*, *Anal. Chem.* **62**, 1495 (1990).
- [11] *A. Di Corcia, M. Marchetti*, *Anal. Chem.* **63**, 580 (1991).
- [12] *H. Bagheri, E. R. Brouwer, R. T. Ghijsen, U. A. Th. Brinkman*, *J. Chromatogr.* **647**, 121 (1993).
- [13] *R. M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U. A. Th. Brinkman*, *J. Chromatogr. A* **696**, 63 (1995).
- [14] *S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen, G. Wünsch*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **351**, 642 (1995).
- [15] *R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **58**, 103 (1995).

-
- [16] *J. Moreno-Tovar, M. J. Santos-Delgado*, An. Quím. **91**, 365 (1995).
- [17] *M. -C. Hennion, P. Scribe*, Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier Science, Amsterdam, 1993, Chapter 2.
- [18] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, 1980.

RAPID DETERMINATION OF CARBARYL AND 1-NAPHTHOL AT PPT LEVELS IN ENVIRONMENTAL WATER SAMPLES BY AUTOMATED ON-LINE SPE-LC-DAD-FD

C. Hidalgo, J.V. Sancho, A. Roig-Navarro, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

Key Words

Column liquid chromatography
On-line trace-enrichment
Environmental water samples
Trace carbaryl analysis

Summary

A fully automated method, based on on-line solid phase extraction (SPE) then liquid chromatography with diode-array and fluorescence detection, has been developed for the trace-level determination of carbaryl and 1-naphthol, its primary transformation product, in environmental water samples. By means of rapid enrichment on a 30 mm × 4 mm i.d. 10- μ m ODS pre-column, using a 10-mL water sample, before LC determination both compounds were recovered satisfactorily from different environmental water samples spiked at various concentrations (0.05-10 μ g·L⁻¹). Average recoveries were between 93 and 102 % with coefficients of variation between 1 and 4 %; detection limits as low as 10 and 50 ng·L⁻¹ (ppt) were estimated for carbaryl and 1-naphthol, respectively. With this small sample volume, sample throughput was up to 30 samples per day. A carbaryl degradation study was performed by spiking a surface-water sample at 2 μ g·L⁻¹. After 15 days the 80 % of the carbaryl was degraded and the presence of 1-naphthol was confirmed by means of its UV spectrum.

Introduction

Carbaryl is a broad spectrum *N*-methylcarbamate insecticide widely used in European countries (over 500 tons per annum)[1] because of its effectiveness against many agricultural pests and its relatively low acute mammalian toxicology (oral LD50 for male rats 850 mg·kg⁻¹). Carbaryl is degraded by chemical hydrolysis and biodegradation, forming several metabolites; 1-naphthol is the primary transformation product. Although this compound does not accumulate in the body, its toxic effects in the aquatic ecosystem, specially marine invertebrates, have been described, as also have those of the parent compound [2]. The adverse effects of insecticides such as carbaryl on honey-bee colonies are also well known [3].

This insecticide has been classified as a transient leacher according to its Groundwater Ubiquity Score (GUS) index (1.8) assigned by a simple mathematical model applied to predict whether a pesticide can contaminate groundwater. This index can, however, vary substantially according to soil-type, and a monitoring program has shown that carbaryl residues occasionally reach concentrations up to 0.5 µg·L⁻¹ in an aquifer of Almeria (south eastern Spain) [4].

In the Comunidad Valenciana (eastern Spain, on the Mediterranean Coast) carbaryl is widely applied in olive groves for the control of many insect pests; the compound has also been recommended for use in citrus orchards against beetles and other frequent insects.

Because of the widespread use of the compound in agricultural areas, and the possibility of groundwater contamination, rapid, sensitive and selective methods are required to enable monitoring of the insecticide and its main degradation product in different environmental waters. Direct analysis of carbaryl by gas chromatography has proved difficult because of its thermal instability in the hot injector. To overcome this problem derivatization with acetic anhydride [5], trimethyl anilinium hydroxide [6] and other chemicals has been described. LC with ultraviolet, fluorescence or mass

spectrometry (MS) detection can, however, be applied directly, and has usually been the technique of choice.

LC methods developed for multi-residue determination of N-methylcarbamate pesticides include two-step post-column derivatization before fluorescence detection [7,8]. This procedure is also used in EPA method 531.1, which has a detection limit of $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl. For carbaryl and 1-naphthol the derivatization step can, obviously, be avoided because of their natural fluorescence. In recent years, immunoassay methods have also been validated for environmental monitoring of both compounds in ground-water samples [9].

Most recent methods available for determination of carbaryl and/or 1-naphthol make use of on-line or off-line SPE followed by LC with ultraviolet (UV) or mass spectrometric (MS) detection [10-16]. The main drawbacks of off-line methodology (liquid-liquid extraction (LLE) or SPE) have been already reported [17]; they include lack of automation and many time-consuming manual steps, loss of sensitivity owing to the injection of an aliquot, losses in possible evaporation steps, and risks of contamination necessitating the use of internal standards. On-line trace enrichment has, therefore, been preferred because automation can be complete and all the pre-concentrated analyte is introduced into the liquid chromatograph enabling the handling of smaller sample volumes to furnish sensitivities similar to those of off-line techniques.

The main objective of this work was the application of on-line trace-enrichment then LC with diode-array and fluorescence detection (DAD-FD). For this purpose, an automatic sample processor designed for off-line SPE (ASPEC XL) has been adapted by performing hardware and software modification of the commercial equipment. Thus, a short pre-column was placed at the sample loop position of a six-port liquid switching valve; after conditioning and sample loading the pre-column was coupled on-line to the analytical column by switching the valve to the inject position.

Fluorescence detection, possible because of the fluorescent naphthyl group, ensured sensitive and selective determination of both compounds; DAD was used for confirmatory purposes.

Experimental

Chemicals.

Carbaryl was obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) and 1-naphthol from ACROS (Geel, Belgium). HPLC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA). Stock standard solutions of carbaryl and 1-naphthol (400 and 40 mg·L⁻¹) were prepared in methanol and stored at -20 °C. Diluted standard mixtures were prepared in HPLC water and stored at 4 °C.

Equipment

Experiments were performed with an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France). This system included an ASPEC XL automatic processor equipped with two Rheodyne six-port valves, a model 306 high-pressure pre-concentration pump, a Model 402 low-pressure pump, a Model 817 eight-port valve actuator and a Gilson intelligent keypad.

The LC system consisted of a 9012 ternary LC pump from Varian (Walnut Creek, USA) and an HP 1100 series diode-array detector connected on-line with an HP 1046A fluorescence detector (both from Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany). LC columns were obtained from Scharlau Sciences (Barcelona, Spain). A 30 mm × 4 mm i.d. column packed with 10 μm Nucleosil ODS was used for sample enrichment and two 125 mm × 4 mm i.d. columns packed, respectively, with 5 μm and 3 μm Nucleosil ODS-2 were used for analysis. Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with an HP Chem Station for LC 3D System (software version G2180AA).

Surface water samples with suspended particles and containing substantial quantities of organic matter were filtered through 0.45- μm disposable nylon membranes from Scharlau Sciences.

Procedure

The experimental equipment is depicted in **Figure 1**. The enrichment column was sequentially conditioned with methanol, acetonitrile and HPLC water (5 mL of each) at 4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ and then standards or water samples (10 mL) were passed through the cartridge at 4 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. Finally, the retained compounds were directly eluted on to the analytical column in the back-flush mode for 30 s by use of the mobile phase, an isocratic 40:60 (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ mixture, at a flow rate of 1 mL $\cdot\text{min}^{-1}$. A wavelength timetable, shown in **Table I**, was used to register the fluorescence signal.

Table I. Wavelength timetable used with fluorescence detection.

Time (min)	$\lambda_{\text{exc.}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em.}}$ (nm)
0	227	335
5.9	231	365

Results and Discussion

Analytical LC Separation

After determination of the excitation and emission wavelengths of carbaryl ($\lambda_{\text{exc.}}$ 227 nm, $\lambda_{\text{em.}}$ 335 nm) and 1-naphthol ($\lambda_{\text{exc.}}$ 331 nm; $\lambda_{\text{em.}}$ 365 nm) the chromatographic conditions were optimized. Acetonitrile was selected as organic modifier because of its low viscosity. Different mobile phases with acetonitrile compositions between 30 and 60 % and two ODS analytical columns (125 mm \times 4 mm i.d.) with different particle size (3 and 5 μm) were evaluated. An isocratic mixture consisting of 40:60 (v/v) $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ and the 3 μm column were selected, because they furnished satisfactory peak shapes and the best resolution between the analytes.

The LC separation of the two compounds is shown in **Figure 2**, which presents the FD chromatogram obtained from a 100- μ L loop injection of a standard mixture of carbaryl and 1-naphthol at 0.5 and 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. From this chromatogram direct detection limits of 0.1 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were obtained for each compound. The response linearity of the analytes was studied by direct injection of standard mixtures with concentrations between 0.5 and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (carbaryl) and 2.5 and 400 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (1-naphthol); regression coefficients ($n=8$) were 0.9999 and 0.9995 for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

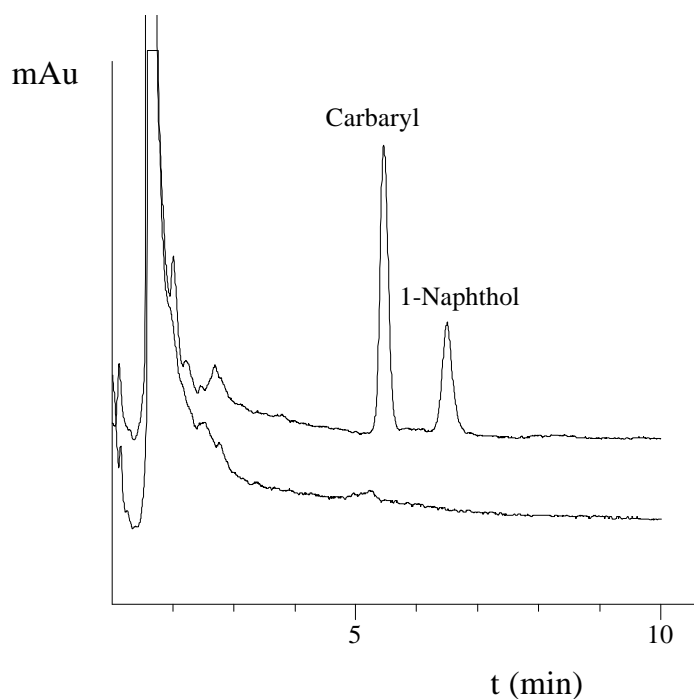


Figure 2. Direct LC-FD separation obtained after 100 μl loop injection, of a standard solution containing a mixture of carbaryl (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and 1-naphthol (2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Sample Pre-Concentration

Although the direct detection limit of carbaryl was quite low, a previous enrichment step was added to improve the sensitivity for both parent compound and transformation product. The natural fluorescence of the analytes and the higher sensitivity associated with this technique, in comparison with UV detection, enabled the use of small sample volumes. In this way a water sample volume of 10 mL was considered sufficient to reduce detection limits while avoiding a great increase in total analysis time. FD was approximately 20 times more sensitive than the DAD for carbaryl and about four times more sensitive for 1-naphthol.

The response linearity of the method was studied for standard solutions with concentrations ranging between 0.05 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl and 0.25 to 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1-naphthol. Regression coefficients ($n=7$) of 0.9981 and 0.9990 for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

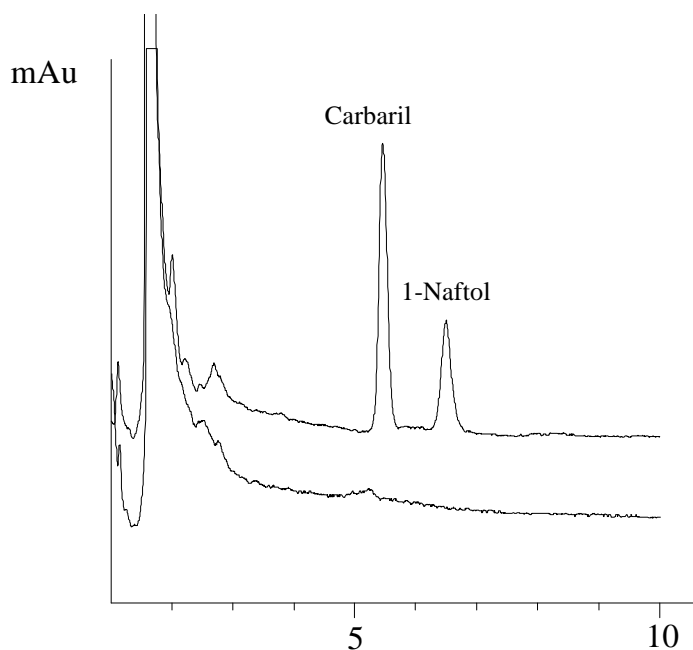
Repeatability studies were performed with standard solutions at two levels of concentration, 0.05 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for carbaryl and 0.25 and 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1-naphthol; coefficients of variation were between 2 and 7 % ($n=7$).

Determination of Carbaryl and 1-Naphthol in Environmental Water Samples

The procedure was validated by means of recovery experiments with drinking- and surface-water samples spiked at different levels of concentration (0.05-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The recoveries were estimated by comparison of results from the spiked water samples with those from standard solutions pre-concentrated under the same experimental conditions, after verifying by means of 100- μl direct loop injections that breakthrough did not occur. The results, given in **Table II**, are indicative of acceptable recovery and reproducibility. **Figure 3** shows the chromatograms obtained from a surface-water sample spiked at 0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with carbaryl and 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with 1-naphthol and from a blank sample. Detection limits as low as 10 and 50 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ were estimated for each compound, respectively.

Table II. Recoveries and coefficients of variation for carbaryl and 1-naphthol in environmental water samples spiked at different levels (n=5).

	Carbaryl		1-Naphthol	
	0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
Drinking water	102 (2)	99 (3)	93 (4)	99 (4)
Surface water	100 (1)	99 (1)	101 (2)	99 (3)

**Figure 3. On-line SPE-LC-FD chromatograms obtained from (A) a 10 ml surface water sample spiked with carbaryl (0.05 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and 1-naphthol (0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and (B) blank sample.**

The recommended procedure was quite rapid, because of the small volume (10 mL) of water processed and because it was possible to perform chromatographic separation simultaneously with automated enrichment of the next sample. The analysis time was approximately 14 min per sample.

All these characteristics make the procedure very useful for screening drinking waters to ensure they accord with EEC regulations for pesticide residues in these samples [18]; these limit the concentration of individual pesticides and related transformation products to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, and the total concentration to $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

This procedure was applied in a program performed by our research group to monitor carbaryl and 1-naphthol in surface-water samples from a specially problematic wet area of Castellón (eastern Spain) almost exclusively dedicated to citrus orchards. Fortunately the results were always negative.

Study of the Degradation of carbaryl

The surface-water samples from Castellón were used to study the degradation of carbaryl. Water (250 mL) was spiked with the insecticide ($2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and after several days the amount of carbaryl remaining was estimated. It was confirmed that carbaryl degraded rapidly in the first few days, producing 1-naphthol, the identity of which was confirmed by DAD. **Figure 4** shows the FD chromatogram of the surface-water sample immediately after spiking (A) and 8 days later (B1). B2 shows the DAD chromatogram corresponding to chromatogram B1; 1-naphthol was identified by comparison of its spectrum with that of 1-naphthol in the library (match value 999.9).

It was assumed that the degradation processes followed first-order kinetics and experimental data were fitted to an exponential decay. A half-life time of 2 days was estimated for carbaryl.

Under the conditions used for this work other carbaryl degradation products were not detected during the 15 days of the study; in terms of mass balance the amount of pesticide degraded was equivalent to the amount of 1-naphthol obtained.

Conclusions

A fully automated on-line SPE-LC-DAD-FD method has been developed for the rapid and sensitive determination of carbaryl and its primary transformation product, 1-naphthol, in environmental water samples. Using a small sample volume of only 10 mL, detection limits of approximately 10 and 50 ng·L⁻¹ were estimated for carbaryl and 1-naphthol, respectively.

Because a study of the degradation of carbaryl showed that 1-naphthol is rapidly formed, analytical procedures developed to monitor the parent compound in environmental water samples should also include this transformation product.

REFERENCES

- [1] *D. Barceló*, *J. Chromatogr.* **643**, 117 (1993).
- [2] *K. A. Massey, D. L. Van Engelen, I. M. Warner*, *Talanta* **42**, 1457 (1995).
- [3] *T. D. Spittler, R. A. Marafioti, G. W. Helfman, R. A. Morse*, *J. Chromatogr.* **352**, 439 (1986).
- [4] *S. Chiron, A. Valverde, A. Fernández-Alba, D. Barceló*, *J. of AOAC Int.* **78**, 1346 (1995).
- [5] *H.-J. Stan, P. Klaffenbach*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 151 (1991).
- [6] *H. Bagueri, C. S. Creaser*, *J. Chromatogr.* **547**, 345 (1991).
- [7] *W. Bläß*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **339**, 340 (1991).
- [8] *M. Hiemstra, A. de Kok*, *J. Chromatogr. A* **667**, 155 (1994).
- [9] *M.-P. Marco, S. Chiron, J. Gascón, B. D. Hammock, D. Barceló*, *Anal. Chim. Acta* **311**, 319 (1995).
- [10] *C. H. Marvin, I. D. Brindle, C. D. Hall, M. Chiva*, *Anal. Chem.* **62**, 1495 (1990).
- [11] *A. Di Corcia, M. Marchetti*, *Anal. Chem.* **63**, 580 (1991).
- [12] *H. Bagheri, E. R. Brouwer, R. T. Ghijsen, U. A. Th. Brinkman*, *J. Chromatogr.* **647**, 121 (1993).
- [13] *R. M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U. A. Th. Brinkman*, *J. Chromatogr. A* **696**, 63 (1995).
- [14] *S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen, G. Wünsch*, *Fresenius J. Anal. Chem.* **351**, 642 (1995).
- [15] *R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch*, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **58**, 103 (1995).

-
- [16] *J. Moreno-Tovar, M. J. Santos-Delgado, An. Quím.* **91**, 365 (1995).
- [17] *M. -C. Hennion, P. Scribe, Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier Science, Amsterdam, 1993, Chapter 2.*
- [18] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, 1980.

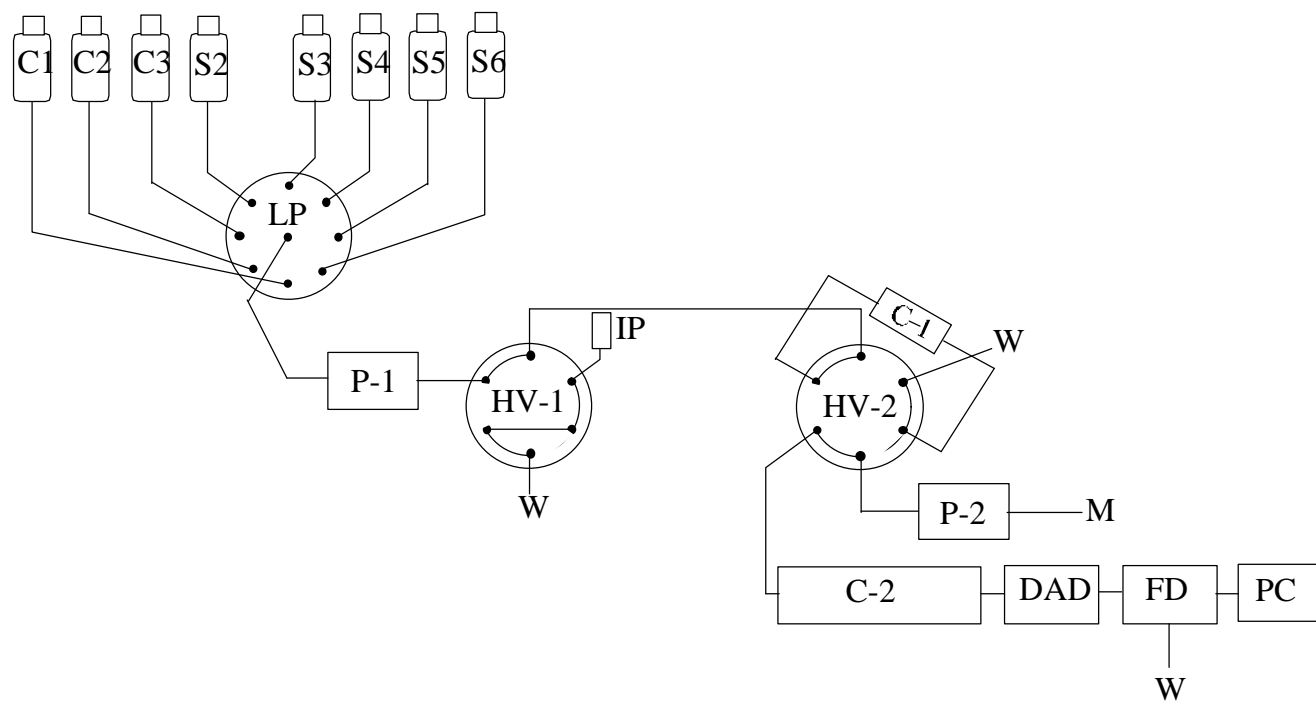


Figure 1. Schematic representation of the on-line pre-concentration system. C, conditioning solvents; S, water samples; LP, low-pressure eight-port valve; HV-1 and HV-2, high pressure six-port valves; P-1, pre-concentration pump; IP, injection port for direct loop injections; C-1, enrichment column; P-2, eluent pump; M, mobile phase; C-2, analytical column; DAD, diode-array detector; FD, fluorescence detector; PC, personal computer; W, waste.

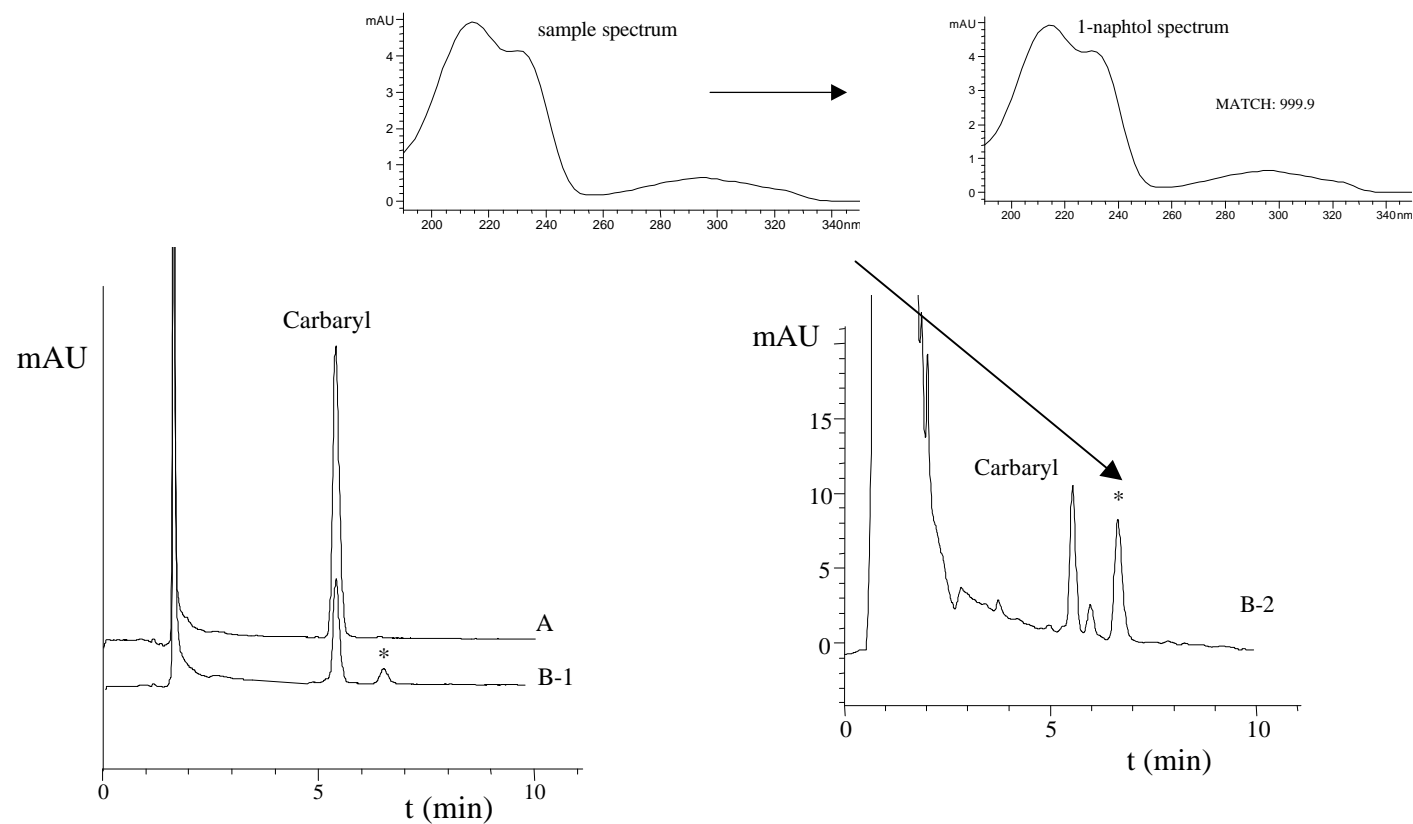


Figure 4. On-line SPE-LC chromatograms obtained from (A) 10 mL surface water immediately after spiking with carbaryl ($2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and (B1) 8 days later, both obtained by FD. B2 is the DAD chromatogram (220 nm) obtained from the latter sample. * Carbaryl transformation product identified as 1-Naphthol.

3.2.2. Aplicación del acoplamiento SPE-LC al análisis de residuos de herbicidas seleccionados

Una vez modificado el equipo instrumental y puesto a punto para poder llevar a cabo SPE-LC completamente automatizada, se planteó la posibilidad de determinar los herbicidas estudiados en el capítulo 2 del presente trabajo, de manera que se pudiera llevar a cabo una comparación de ambas técnicas acopladas en cuanto a su aplicación en el campo del PRA.

En primer lugar, y debido al mayor carácter multiresidual del acoplamiento SPE-LC, se aumentó el número de compuestos analizados simultáneamente, de manera que se determinaron bromacilo y diuron junto con otros herbicidas derivados de la urea, tales como metabenzotiazuron, clortoluron, diuron, linuron y cloroxuron. En el caso de los herbicidas triazínicos, se planteó la determinación conjunta de los herbicidas y de algunos productos de transformación ya estudiados (DIA, HA, DEA, simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrina), añadiendo además otros dos herbicidas triazínicos de gran interés desde el punto de vista medioambiental como son la cianazina y la terbumetona.

Finalmente, se planteó la determinación de seis herbicidas fenil carbámicos (carbetamida, profam, desmedifam, fenmedifam, clorprofam y clorbufam) en muestras de agua, debido fundamentalmente a la ausencia de metodología analítica existente para la determinación de esta familia de compuestos en muestras medioambientales a bajos niveles de concentración.

El proceso experimental seguido consiste en optimizar, en primer lugar, las fases móviles que permitan la correcta separación de los distintos analitos en la columna analítica seleccionada. Para ello se han usado disoluciones patrón, inyectando 100 µl directamente en C-2, introduciéndose en el sistema cromatográfico entre 5-40 ng de analito en función de la señal analítica de cada especie.

Una vez optimizada la separación cromatográfica, se inician las experiencias de preconcentración para lo cual se debe proceder a la selección de las precolumnas

enriquecedoras y llevar a cabo posteriormente los estudios necesarios para determinar el volumen de ruptura de los analitos.

Para llevar a cabo la determinación de los analitos mencionados se seleccionaron diferentes fases adsorbentes, bien fase reversa C₁₈ o bien fase polimérica PRP-1, en precolumnas de distintas dimensiones. En la **Tabla 23** se presentan las precolumnas utilizadas en cada una de las aplicaciones desarrolladas.

Tabla 23. Precolumnas utilizadas para la preconcentración de diferentes herbicidas.

<i>Compuestos</i>	<i>Fase estacionaria</i>	<i>Dimensiones</i>
Herbicidas ureicos	ODS, Spherisorb 5 µm	30 × 4 mm d.i
	PRP-1 10 µm	10 × 2 mm d.i.
Herbicidas triazínicos	ODS, Hypersil, 10 µm	5.8 × 4.6 mm d.i.
	PRP-1 10 µm	10 × 2 mm d.
	ODS, Spherisorb 10 µm	30 × 4 mm d.i
Herbicidas fenilcarbamatos	ODS, Hypersil, 10 µm	5.8 × 4.6 mm d.i.
	PRP-1 10 µm	10 × 2 mm d.i.

Además de las columnas recogidas en la tabla superior, todas ellas comerciales, también se llevaron a cabo experiencias de preconcentración en columnas caseras (5.8 × 4.6 mm d.i.) que se rellenaron con fase polimérica (PLRP-S), mediante un dispositivo de llenado a vacío suministrado por Gilson. Los resultados obtenidos con este tipo de precolumnas no fueron satisfactorios, ya que generaban importantes ensanchamientos de bandas además de resultar inutilizables tras una o unas pocas preconcentraciones, al no retener suficientemente a los analitos.

Se ha descrito que la utilización de pequeñas columnas resulta ventajosa en los procedimientos de SPE “*on-line*” debido a la posibilidad de poder trabajar con elevadas velocidades de muestreo y de minimizar los ensanchamientos de banda durante la etapa de transferencia. Cabe destacar, además, que en este tipo de acoplamiento no se desea que se produzca ningún tipo de separación cromatográfica previa a la que tiene lugar en C-2, y por ello no se necesita que las precolumnas

utilizadas presenten altas eficacias, aunque tienen que ser capaces de retener total o parcialmente los analitos deseados.

En la **Figura 22** se presentan los cromatogramas SPE-LC obtenidos para bromacilo y los herbicidas ureicos estudiados, haciendo uso de las dos precolumnas indicadas en la **Tabla 23**. En todos los casos, se utilizó como C-2 una columna analítica C₁₈ de 125 × 4 mm d.i. A partir de estas experiencias se comprueba la mayor retención de los analitos en la precolumna polimérica PRP-1 en relación con la C₁₈ de 3 cm, a pesar de las mayores dimensiones de esta última y, por lo tanto, de la mayor cantidad de fase adsorbente. De este modo, al aumentar el volumen de muestra acuosa, no se producen variaciones notables de los picos de los analitos concentrados en la precolumna polimérica, mientras que en el caso de la precolumna C₁₈ se observa mayor ensanchamiento de bandas así como variación de los tiempos de retención de los analitos más polares, lo cual indica que estos analitos se desplazan a lo largo de la columna durante la etapa de enriquecimiento. Las grandes dimensiones de esta columna evitaron, sin embargo, que se produjera ruptura de los analitos más polares.

Finalmente, cabe destacar que en el caso particular de las ureas estudiadas y del bromacilo, la preconcentración de 50 ml de muestra acuosa resultó suficiente para llevar a cabo la determinación de estas especies a bajos niveles de concentración, tal y como se muestra en el trabajo experimental presentado en este capítulo.

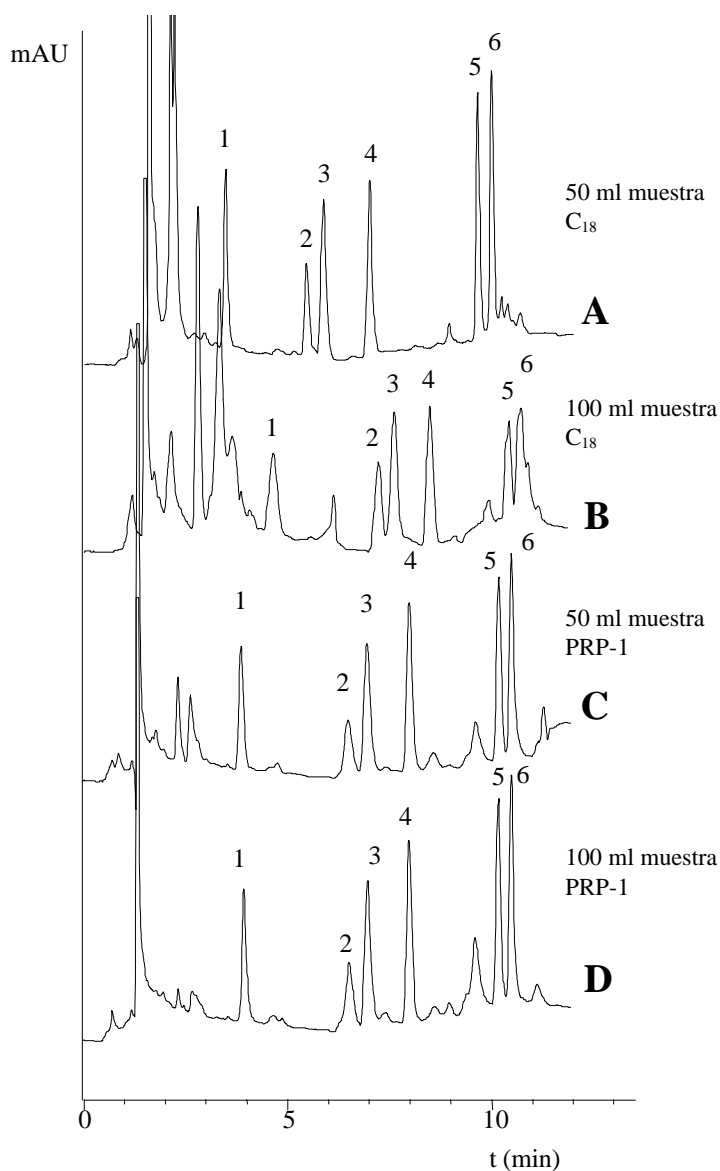


Figura 22. Cromatogramas SPE-LC correspondientes a la preconcentración de disoluciones patrón de bromacilo (1), metabenzotiazuron (2), clortoluron (3), diuron (4), linuron (5) y cloroxuron (6).

A) 50 ml de patrón de 0.2 ppb preconcentrado en precolumna C_{18} de 30 \times 4 mm d.i. B) 100 ml de patrón de 0.1 ppb preconcentrado en precolumna C_{18} de 30 \times 4 mm d.i. C) 50 ml de patrón de 0.2 ppb preconcentrado en precolumna PRP-1 de 10 \times 2 mm d.i. D) 100 ml de patrón de 0.1 ppb preconcentrado en precolumna PRP-1 de 10 \times 2 mm d.i. C-2, columna C_{18} de 125 \times 4 mm d.i. Fase móvil; gradiente $CH_3CN: H_2O$ (ver artículo presentado sobre determinación de bromacilo y herbicidas ureicos).

Un aspecto importante en los procedimientos de acoplamiento SPE-LC desarrollados ha sido la estimación de los volúmenes de ruptura. En relación a este tipo de estudios, en la **Figura 23** se presenta una gráfica que muestra las curvas de ruptura correspondientes a algunos de los compuestos estudiados en este trabajo, utilizando precolumnas tipo C_{18} y poliméricas PRP-1.

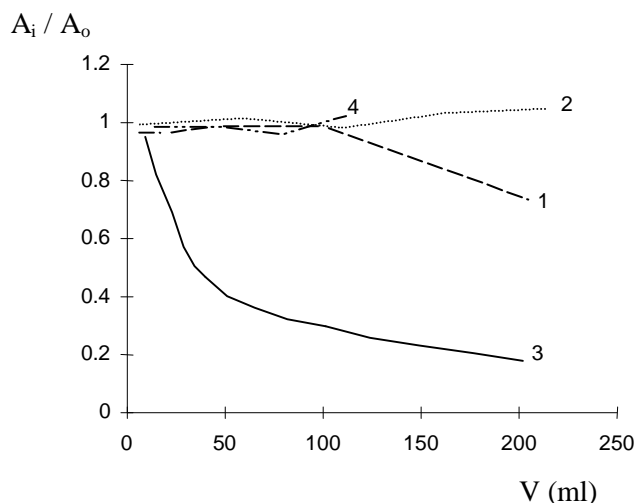


Figura 23. Curvas de ruptura de varios compuestos.

1. Carbaril (10 ng) en precolumna C_{18} (5.8 \times 4.6 mm d.i.); 2. Bromacilo (10 ng) en precolumna C_{18} (30 \times 4 mm d.i.); 3. DIA (40 ng) en precolumna PRP-1 (10 \times 2 mm d.i.); 4. Carbetamida (20 ng) en precolumna PRP-1 (10 \times 2 mm d.i.).

A la vista de la anterior figura se observa que un plaguicida moderadamente polar como el carbaril presenta ruptura en pequeñas columnas C_{18} únicamente para volúmenes mayores de 100 ml, lo cual está muy por encima del volumen requerido en el procedimiento propuesto para su determinación a niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. En el caso del bromacilo, analito más polar que el carbaril, se deben utilizar columnas C_{18} más largas para las cuales se comprobó que el analito no presentaba ruptura en los primeros 200 ml. En el caso del DIA y del herbicida carbetamida, se ha comprobado que debido a su mayor polaridad, presentan mejores retenciones en precolumnas de tipo polimérico, pero aun así se observa una elevada ruptura del DIA (alrededor de un 70 % del analito) cuando se concentran volúmenes de muestra del orden de 100 ml.

Respecto a este último compuesto (DIA) y al resto de TP's de atrazina estudiados en la presente Memoria, en el artículo científico presentado se discute el comportamiento de estos analitos en las tres precolumnas ensayadas (C_{18} 5.4×4.6 mm d.i.; C_{18} 30×4 mm d.i.; PRP-1 10×2 mm d.i.) y se presentan datos de validación del método propuesto para la determinación conjunta de los mismos junto al resto de triazinas. En el caso particular del DIA, y atendiendo a la importante ruptura que presentaba en las columnas estudiadas, se llevó a cabo la determinación del volumen de ruptura (V_b) de manera directa, conectando la precolumna seleccionada PRP-1 (10×2 mm d.i.) al detector y registrando el cromatograma correspondiente a la elución del analito (**Figura 24**). Este estudio se hizo para varios niveles de concentración (200 - $800 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$), que tuvieron que ser siempre mayores a los niveles usuales de trabajo para poder detectar la diferencia de respuesta del eluyente sin analito y en presencia de este. Se observa cómo el volumen de ruptura disminuye a medida que aumenta la concentración de la disolución percolada.

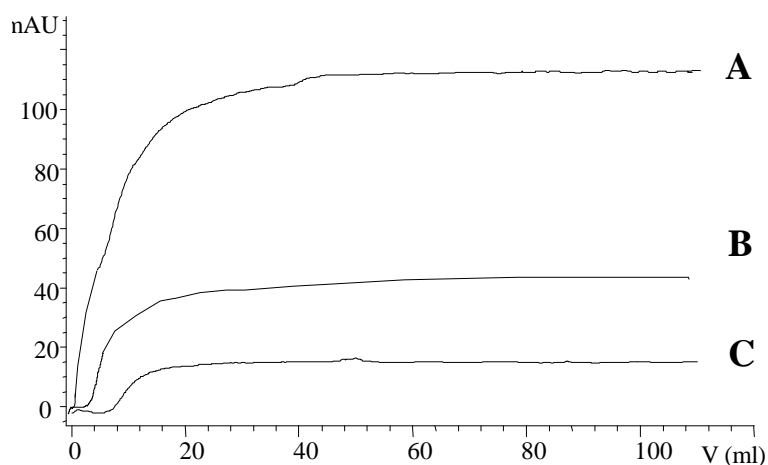


Figura 24. Elución "on-line" de distintas disoluciones patrón de DIA. (A) $800 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, (B) $400 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ (B) y (C) $200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. V_b (A)= 1 ml; V_b (B)=2 ml, V_b (C)= 4 ml.

Una vez estudiada la separación cromatográfica y los parámetros de preconcentración, en cuanto a selección de precolumnas y estimación de volúmenes de ruptura, se procedió a la validación de los métodos desarrollados mediante su aplicación a muestras de agua de diferente procedencia fortificada a varios niveles de concentración, obteniendo en cada caso las recuperaciones, precisión y los límites de detección. Los datos correspondientes a estas experiencias se muestran en los artículos científicos que se adjuntan.

Es interesante señalar que en el caso particular de los herbicidas fenilcarbamatos seleccionados, se observó una rápida degradación de dos compuestos, desmedifam y fenmedifam, habiéndose incluido un estudio de este proceso en el trabajo experimental que se presenta. En las **Figuras 25** y **26** se muestra la variación de la cantidad de analito presente con el tiempo en una muestra de agua superficial, así como de alguno(s) de sus productos de transformación detectados. En el caso de aguas potables la variación de la respuesta fue similar.

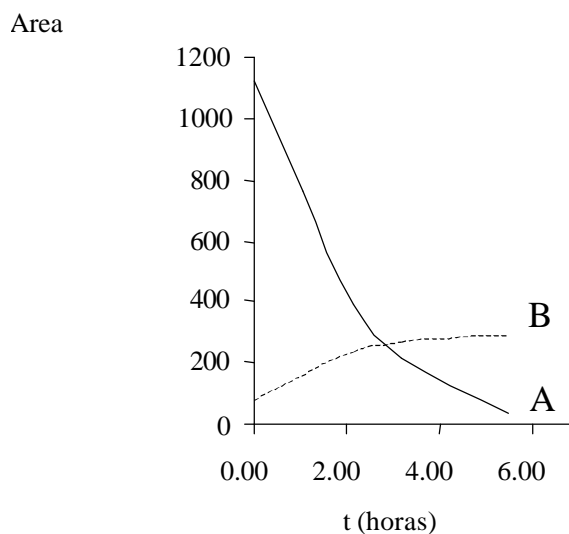


Figura 25. (A) Curva de degradación del desmedifam en agua superficial. (B) Curva correspondiente al producto de transformación del desmedifam detectado a 236 nm.

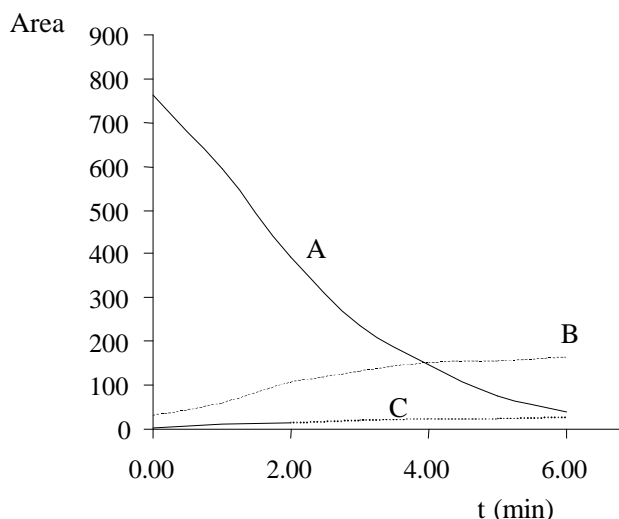
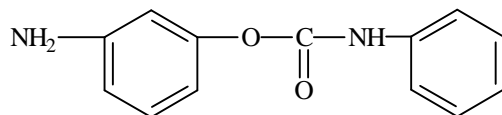


Figura 26. (A) Curva de degradación del fenmedifam en agua superficial. (B) y (C) Curvas correspondientes a los productos de transformación detectados a 236 nm.

En la **Figura 27** se presentan los espectros de absorción del desmedifam junto a su TP localizado y del phenmedipham junto a sus dos TP's localizados. A la vista de los mismos se puede observar que los espectros de ambos herbicidas, por un lado, y los de algunos TP's, por otro, presentan bastante similitud. El TP encontrado en guías comerciales tanto para el desmedifam como para el fenmedifam es el 3-amino-fenol, sin embargo en las experiencias llevadas a cabo no se detectó ningún TP común para ambas especies, ya que los TP's localizados para el fenmedifam presentaban diferente tiempo de retención que el correspondiente al TP detectado para el desmedifam. Hogendoorn y van Zoonen (1990) propusieron una estructura para un TP del desmedifam tras un estudio mediante LC-MS usando una interfase "frit-FAB" en el modo de ionización química positiva, e interpretación del correspondiente espectro de masas. El compuesto propuesto fue:



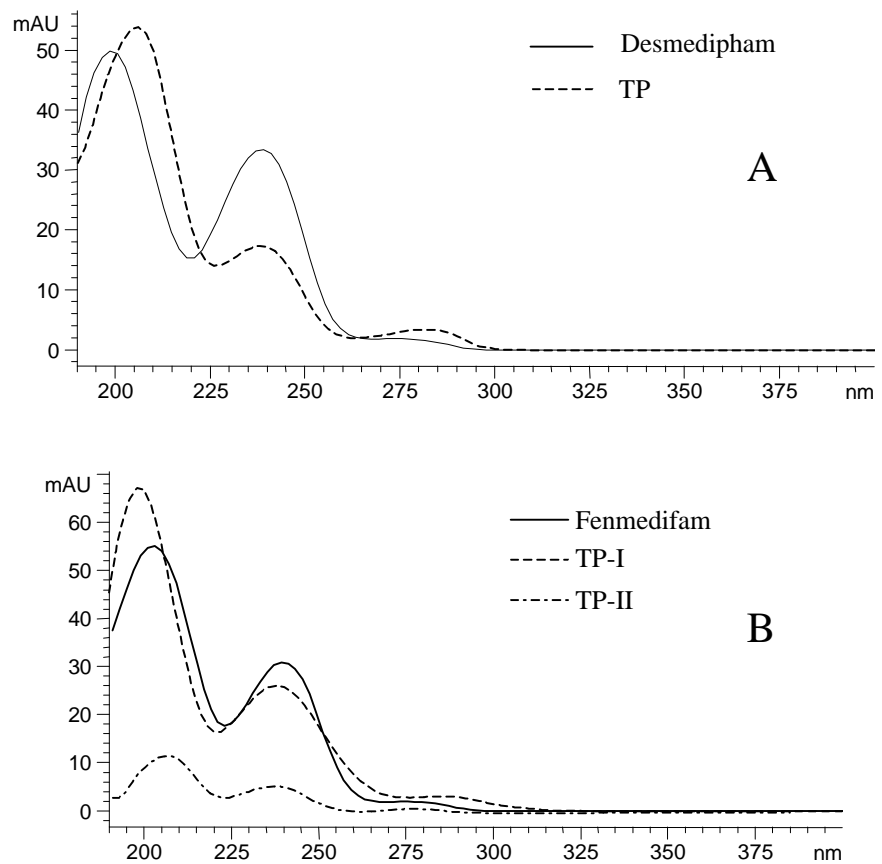


Figura 27. Espectros de absorción del desmidifam y de su TP detectado (A) y del fenmedifam junto a sus dos TP's detectados (B).

A la vista de los resultados obtenidos para estos dos herbicidas, y de la degradación total que se observa al cabo de 6-7 horas en las muestras de agua estudiadas, parece evidente que difícilmente se podrán detectar estos productos en muestras acuosas. Los esfuerzos analíticos deberán dirigirse, por tanto, hacia la elucidación estructural de los TP's y hacia el desarrollo de nuevos métodos de análisis que permitan la determinación de estos derivados en muestras de interés ambiental.

A continuación se presenta una copia de los artículos científicos publicados en revistas de ámbito internacional; en los cuales se muestran los resultados experimentales obtenidos en este Capítulo de la Memoria:

“On-line trace enrichment of polar herbicides in environmental waters by reversed-phase liquid chromatography-diode array detection”

Química Analítica, **16 (Suppl 2)**: S259-S265 (1997)

“Coupled-column liquid chromatography applied to the trace level determination of triazine herbicides and some of their metabolites in water samples”

Analytical Chemistry, **70**: 3322-3328 (1998)

“Automated determination of phenylcarbamate herbicides in environmental waters by on-line trace enrichment and reversed-phase liquid chromatography-diode array detection”

Journal of Chromatography A, **823**: 121-128 (1998)

ON-LINE TRACE ENRICHMENT OF POLAR HERBICIDES IN ENVIRONMENTAL WATERS BY REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY-DIODE ARRAY DETECTION.

C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

Received February, 3th, 1997/Accepted March, 19th, 1997

Summary

A fully automated liquid chromatographic method using on-line trace-enrichment, gradient elution and diode array detection is described for the trace-level determination of bromacil and five urea herbicides in environmental water samples.

A sample volume of 50 mL was preconcentrated on a short 30 × 4 mm i.d. C₁₈ column prior to the chromatographic separation on a 125 × 4 mm i.d. C₁₈ analytical column. Detection limits between 0.02-0.05 µg·L⁻¹ were reached for all the analytes using the proposed procedure. At 0.1-0.2 µg·L⁻¹ level, coefficients of variation of retention times and peak areas were in the range 0.1-0.3 % and 1-4 % respectively. Calibration graphs were linear in the range 0.05-10 µg·L⁻¹.

All these compounds were successfully recovered from drinking and surface water samples spiked at different concentration levels (0.2-1 µg·L⁻¹) yielding average recoveries between 84-105 % with coefficients of variation in the range 0.2-9 %.

Using the proposed procedure, bromacil and diuron were detected at sub-ppb levels in surface water samples from a wet area of Castellón (Spain). The presence of bromacil was also confirmed by gas chromatography with mass spectrometry detection.

Keywords. On-line trace enrichment, Liquid chromatography, Urea herbicides, Bromacil, Water analysis

Introduction

The amount of herbicides used in agriculture is considerably high in recent years in spite of their environmental adverse effects. Urea herbicides as methabenzthiazuron, chlortoluron, diuron and linuron are widely used in European countries (over 500 tons per annum) and they have been classified as probable or transient leachers as well as of potential concern in Mediterranean countries [1].

Diuron, which is one of the most used urea herbicides, is widely applied together with bromacil for weed control in citrus orchards at the Comunidad Valenciana (eastern Spain) as active ingredients in the commercial herbicide Krovar marketed by Du Pont. Residues of the uracil compound have been already found in surface water samples from the Castellón province within a monitoring program [2]. Reported leaching experiments of bromacil have shown that deeper penetration of this compound across the soil is also possible [3] involving a serious risk of groundwater pollution.

In this way, due to the wide use of these herbicides in this Mediterranean Spanish area and the high possibilities of water contamination, sensitive and selective methods for the analysis of bromacil and some urea herbicides in environmental water samples are required in order to evaluate the risk of pollution in this media. Due to the restrictive European regulations, which limit the concentration of individual pesticides and toxic transformation products in drinking water to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and the total concentration to $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ [4], most of analytical methods available for pesticide monitoring usually include preconcentration steps in order to detect such a low concentrations.

Gas chromatography (GC) with mass spectrometry (MS) or electron capture (EC) detectors has been used for the trace-level determination of bromacil in environmental water samples after a preconcentration step by liquid-liquid extraction (LLE) [2]. However, it is well known that many urea herbicides require chemical derivatization prior to the determination by GC due to their thermal instability [5]. Therefore, liquid chromatography (LC), which is usually the technique of choice for the analysis of moderately to highly polar compounds, seems to be more appropriate for the simultaneous determination of the selected herbicides.

In a previous work, coupled-column liquid chromatography (LC-LC) with large volume injection followed by UV detection has been applied for the trace-level determination of bromacil and diuron in environmental water samples [6]. The procedure was completely automated, did not require any preconcentration step and it was quite selective and sensitive, with detection limits around $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. However, this very selective technique has, in principle, a limited application range and it seems to be more appropriate to solve analytical problems related with the determination of selected “difficult-polar” compounds. Hence there is a disagreement with the preference to develop multiresidue methods [7] which are more suitable in Monitoring Programmes.

Off-line solid phase extraction (SPE) followed by LC with ultraviolet (UV) or MS detection has been used for the trace-level determination of some urea herbicides [8-12] and detection limits at sub-ppb levels have been reached, generally due to high enrichment factors since large amounts of sample (500 mL and even more) are normally preconcentrated.

Against off-line techniques, on-line trace enrichment followed by LC with UV or MS detection has been in recent years preferred for trace analysis of polar compounds in aqueous samples [13-18]. This technique allows complete automation of the analytical process as well as the handling of smaller sample volumes as the

whole sample is analysed [19]. In this way, very sensitive multiresidual methods for pesticide determination in aqueous media have been developed.

Different sorbents have been assayed to preconcentrate non-polar to relatively polar analytes (i.e. C₁₈ bonded silicas, graphitized carbon black, styrenedivinylbenzene polymers etc.). The choice of the suitable sorbent depends on the sample volume which must be preconcentrated to reach the desirable detection limits and on the nature of the solutes to be determined [19].

The aim of the present work is the development of a fully automated and sensitive method based on on-line SPE coupled to LC using diode array detection (DAD), which allows the simultaneous determination of bromacil and some urea herbicides as methabenzthiazuron, chlortoluron, diuron, linuron and chloroxuron in environmental water samples. For this purpose, an automatic sampler processor designed for off-line SPE (ASPEC XL) has been adapted by performing hardware and software modifications in the commercial equipment.

A C₁₈ bonded silica sorbent was selected for performing the enrichment step, since it is one of the most used in liquid chromatography mainly due to its good reproducibility in retention, rapid equilibrium with mobile phases and rarity of irreversible adsorption. Besides, a large number of compounds, from non-polar to moderately polar are satisfactory retained [19].

Experimental

Chemicals

Diuron and linuron were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany) meanwhile bromacil, methabenzthiazuron, chlortoluron and chloroxuron from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Methanol and acetonitrile, both HPLC-grade, were purchased from Scharlau Science (Barcelona, Spain). HPLC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA).

Stock standard solutions (ca. 400 and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) of herbicides were prepared in methanol and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Diluted standard solutions were prepared in HPLC-grade water and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Equipment

Experiments were performed using an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France). This system included an ASPEC XL automatic processor equipped with two Rheodyne six-port valves, a model 306 high pressure preconcentration pump, a Model 402 low-pressure pump, a Model 817 eight-port valve actuator and a Gilson intelligent keypad. The LC system consisted of a 9012 ternary HPLC pump from Varian (California, USA) and a HP 1100 Series Diode Array Detector from Hewlett Packard (Waldbronn, Germany).

As regards the LC columns, a $30 \times 4\text{ mm}$ i.d column packed with $5\text{ }\mu\text{m}$ Spherisorb ODS used for sample enrichment and a $125 \times 4\text{ mm}$ i.d. analytical column packed with $5\text{ }\mu\text{m}$ Spherisorb ODS-2 were both obtained from Scharlau Science (Barcelona, Spain).

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a HP Chem Station for LC 3D System (software version G2180AA). Pipetmans (200, 1000 and 5000 μl) were obtained from Gilson.

Surface water samples with suspended particles and important amounts of organic matter were previously filtered on 0.45 μm disposable Nylon membranes.

Procedure

Automation of on-line trace enrichment was performed using the ASPEC XL system (**Figure 1**) in which a short column was placed in the sample loop position of a six-port valve. An eight-port valve actuator and a high pressure pump were used for conditioning the short column and percolating samples.

The conditioning process was performed sequentially with 5 mL of methanol, 5 mL of acetonitrile and 5 mL of HPLC water at 4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; afterwards 50 mL of water sample were percolated through the short column at 5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ and, finally, the retained compounds were directly eluted by the mobile phase set at 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ to the analytical column in the backflush mode. Mobile phase consisted of the following $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradient: from 70 % H_2O to 65 % in 5 min and from 65 % H_2O to 45 % in 4 min.

A home-made Pascal software program was required in order to control the whole process since the original software supplied with the equipment was not designed to performed this kind of work. The different time-programmed events are shown in **Table 1**.

Results and discussion

Analytical LC separation.

The chromatographic separation of analytes was studied by direct injection (100 μL) of standard solutions on the C_{18} analytical column. Due to the wide range of polarity between the analytes, a $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ gradient was optimised in order to obtain good resolution between peaks as well as short analysis time (see experimental procedure).

Chromatograms at different wavelengths were recorded in order to achieve maximum absorbance for each compound. Optimum wavelengths were obtained from spectra data (277 nm for bromacil, 273 nm for methabenzthiazuron and 250 nm for the rest of urea herbicides). **Figure 2** shows the chromatographic separation of a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ standard solution of the selected herbicides (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the case of bromacil). From this, direct detection limits around 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were reached for each compound.

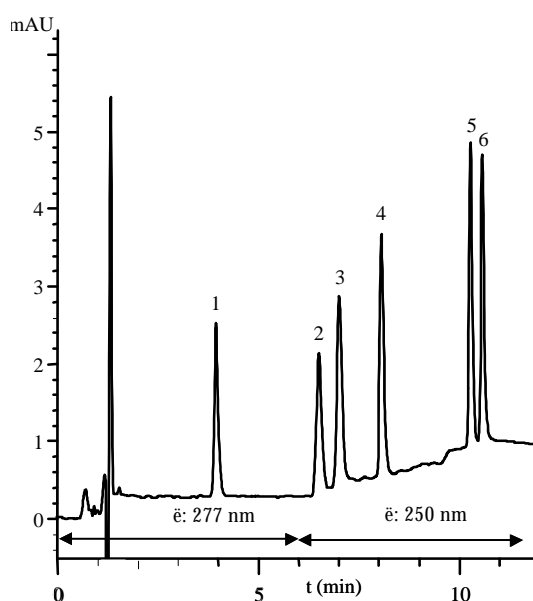


Figure 2. Direct LC-DAD separation on a standard mixture solution of selected herbicides by 100 μL loop injection.

1. Bromacil: 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$; 2. Methabenzthiazuron, 3. Chlortoluron, 4. Diuron, 5. Linuron, 6. Chloroxuron: 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Preconcentration parameters.

The breakthrough volume, which is the sample volume that can be percolated through the short column without any loss of analytes, was studied by considering the elution process. For this purpose, standard solutions (20 ng of bromacil and 10 ng of each urea herbicide) with volumes ranging between 10-500 mL were preconcentrated. Recoveries were compared to those obtained with the percolation of the 10 mL sample volume after verifying that no breakthrough occurred from the C₁₈ column with this small volume (10 mL) by comparing with a 100 µL direct loop-injection. Although there were not important losses due to breakthrough for all the volumes assayed, even in the case of the most polar compounds, it was observed that sample volumes higher than 50 mL produced band broadening in some chromatographic peaks (i.e. bromacil).

Generally, band broadening is related to the size of the column where trace enrichment is performed. The volume of this column should be small for a good coupling, so that a narrow profile of concentrated species could be transferred to the analytical column [20,21]. However, in the case of polar compounds it is usual to increase as much as possible the amount of sorbent and therefore the enrichment column dimensions in order to obtain breakthrough volumes as high as possible [21].

In the present work, the size of the first column was selected large enough (30 × 4 mm i.d.) to avoid breakthrough of analytes. Recently, similar short columns (between 20-60 mm of length) have also been used for both, sample enrichment and LC [22,23].

According to the proposed direct detection limits, sample volumes of 50 mL were considered sufficient to perform quantitative analysis at the 0.1 µg·L⁻¹ level which requires at least a minimum detection limit of 0.05 µg·L⁻¹ [15] although a report of the EEC stated that analytical methods would need detection limits of 0.02 µg·L⁻¹ [24]. No sample clean-up was necessary before the automated enrichment, excepting a rapid prefiltering step in the case of surface water samples.

A chromatogram of a standard HPLC-grade water solution of the selected herbicides at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for bromacil) obtained after on-line SPE using the proposed chromatographic conditions is shown in **Figure 3**. Repeatability studies at analyte concentrations of 0.1 and $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were performed by preconcentration of the same standard solutions ($n=7$), achieving successful results with coefficients of variation for retention times and peak areas between 0.1 - 0.3 % and 1 - 4 %, respectively. Finally, the response linearity of the method was also studied for standard solutions ranging between 0.05 - $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=10$). The results are shown in **Table 2**.

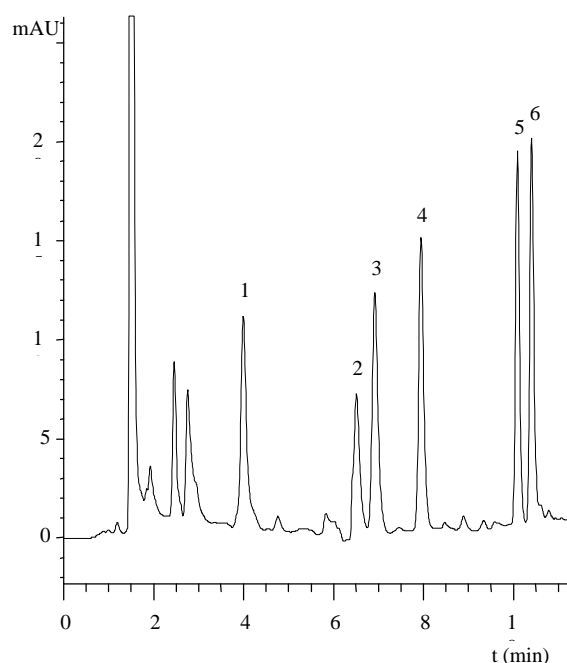


Figure 3. On-line SPE-LC-DAD chromatogram of a 50 mL standard solution of selected herbicides.

1. Bromacil: $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2. Methabenzthiazuron, 3. Chlortoluron, 4. Diuron, 5. Linuron, 6. Chloroxuron: $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Table 2. Calibration curves for bromacil (0.1-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and urea herbicides (0.05-5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) in HPLC water samples (n=10).

	Bromacil	MB*	Chlortoluron	Diuron	Linuron	Chloroxuron
<i>Standard error</i>	3.071	8.461	4.635	7.595	12.92	13.20
<i>R</i>	0.9999	0.9996	0.9999	0.9998	0.9995	0.9992
<i>Interception</i>	0.3173	6.376	3.007	0.2052	0.7604	13.61
<i>SD^a_{Interception}</i>	1.377	4.221	2.077	3.4043	5.793	5.943
<i>Slope</i>	153.1	159.1	202.8	225.5	215.8	187.1
<i>SD_{Slope}</i>	0.6025	1.692	0.9092	1.490	2.535	2.819

MB*, Methabenzthiazuron; ^a, Standard Deviation

Determination of herbicides in different environmental water samples

The described method was validated by means of recovery experiments in environmental water samples spiked with standard mixtures at different levels (between 0.1-1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Recoveries values were estimated by comparison of the spiked water samples with standard solutions preconcentrated under the same experimental conditions as recommended [25]. The results, shown in **Table 3**, are acceptable with regard to both recovery and reproducibility between samples.

Table 3. Average recoveries and coefficients of variation (%) of selected herbicides analysed by the proposed on-line SPE-LC-DAD procedure in environmental water samples spiked at different levels (n=5).

<i>Compound</i>	<i>Drinking water</i>		<i>Surface water</i>	
	<i>0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>
<i>Bromacil</i>	100 (6)	99 (1)	94 (3)	99 (1)
	<i>0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>	<i>0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$</i>
<i>Methabenzthiazuron</i>	90 (9)	95 (3)	84 (3)	96 (0.5)
<i>Chlortoluron</i>	97 (4)	101 (4)	102 (5)	103 (0.2)
<i>Diuron</i>	93 (4)	97 (4)	100 (2)	101 (0.70)
<i>Linuron</i>	100 (1)	96 (2)	102 (1)	97 (0.5)
<i>Chloroxuron</i>	103 (3)	105 (3)	97 (4)	103 (0.8)

The former procedure is illustrated in **Figure 4**, which shows the chromatogram of a drinking water sample spiked at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with urea herbicides and $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with bromacil. Polar matrix interferences, which depend largely on the gradient applied and also on the nature of the sample, appeared at the beginning of the chromatogram. In the case of water samples with high amounts of organic matter, early eluting interferences present a broader peak, as in **Figure 5**, which shows the chromatogram of a surface water sample spiked at the same low level ($0.1\text{-}0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and a blank chromatogram.

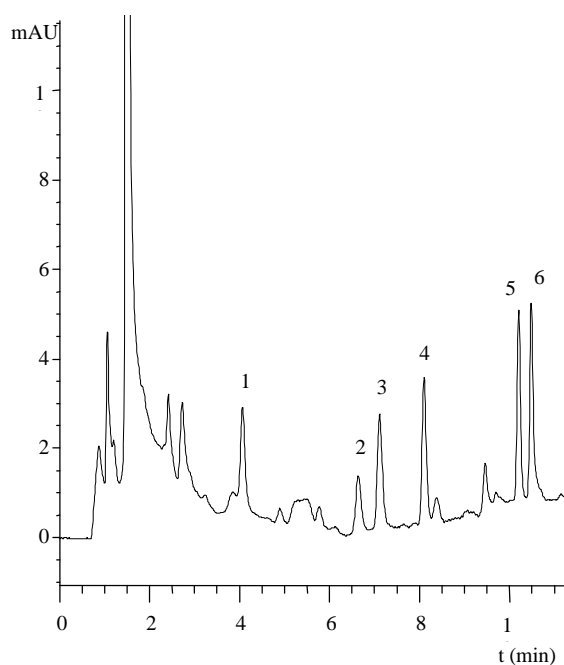


Figure 4. On-line SPE-LC-DAD chromatogram of a 50 mL drinking water sample spiked with selected herbicides.

1. Bromacil: $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2. Methabenzthiazuron, **3.** Chlortoluron, **4.** Diuron, **5.** Linuron, **6.** Chloroxuron: $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

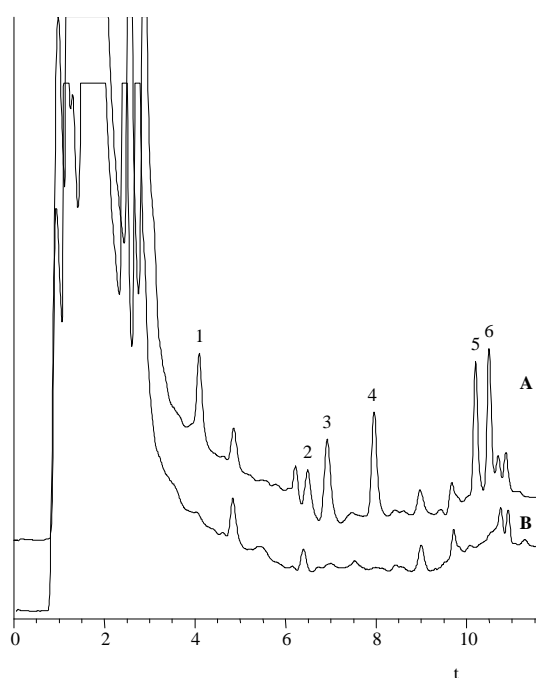


Figure 5. On-line SPE-LC-DAD chromatograms of a 50 mL surface water sample spiked with selected herbicides (A) and a blank (B). 12.5 mAUFS.

1. Bromacil: $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2. Methabenzthiazuron, 3. Chlortoluron, 4. Diuron, 5. Linuron, 6. Chloroxuron: $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$

As can be deduced from the previous chromatograms at the $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ level, the detection limits in water samples were around $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for urea herbicides and $0.05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for bromacil. Besides, sample manipulation was minimised since the procedure was completely automated from the preconcentration until the analysis and only a prefiltering step was added in the case of dirty water samples. As can be seen in **Table 1**, the possibility of overlapping the chromatographic separation with the enrichment of the following sample involves a real analysis time of around 19 min per sample, resulting in sample throughputs of 25 samples per day.

In comparison with our previous LC-LC reported method [6] in which bromacil and diuron were rapidly analysed in environmental water samples by large

sample volume injection (2 mL), the present work allows the simultaneous determination of some other interesting herbicides at lower concentration levels. Obviously, the improvement in sensitivity and the major multiresidual character of the proposed method suppose a two-fold decrease in sample throughput (from 50 to 25 samples per day) and a small loss of selectivity.

Surface water samples used in a Monitoring Programme carried out by our laboratory were taken from a wet area of Castellón (Spain) and analysed by the described on-line SPE-LC-DAD procedure. Residues of some herbicides were found (**Figure 6**) at concentration of $0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (bromacil) and $0.21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (diuron). UV spectra and retention times of the detected compounds were favourably compared with the library spectra.

The presence of bromacil was confirmed by a previously reported method [2, 26] used in our laboratory for multiresidue analysis of pesticides in surface water samples by means of GC-MS. **Figure 7** shows the GC-MS chromatogram of the former water sample in which the presence of bromacil at a similar concentration ($0.17 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) was confirmed.

With regard to diuron, the use of a confirmatory analytical column with different polarity or better, the development of efficient interfacing with MS is recommended. However, it is relevant to emphasise that bromacil and diuron are widely applied together in Castellón area for weed control in citrus orchards. This fact, joined to the good concordance of UV spectras (**Figure 6**) and to the confirmation of bromacil by GC-MS make more reliable the presence of diuron in the water sample.

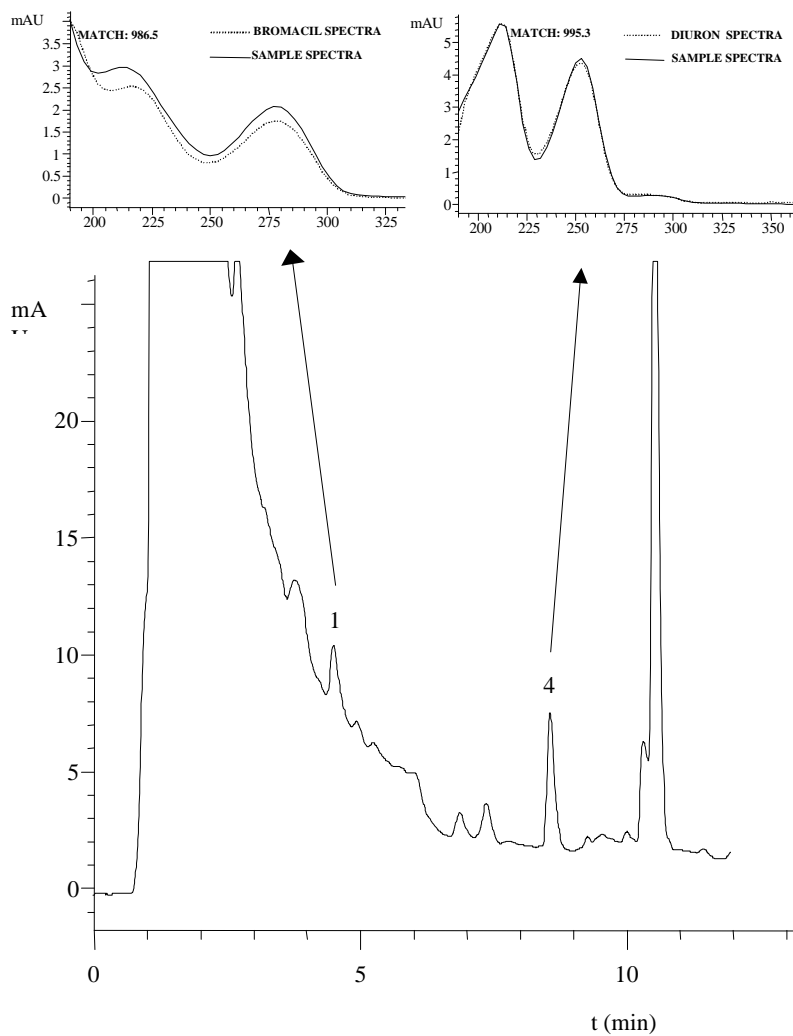


Figure 6. Chromatogram obtained by on-line SPE-LC-DAD of a surface water sample from a wet area of Castellón (Spain).
1. Bromacil: $0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. 4. Diuron: $0.21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

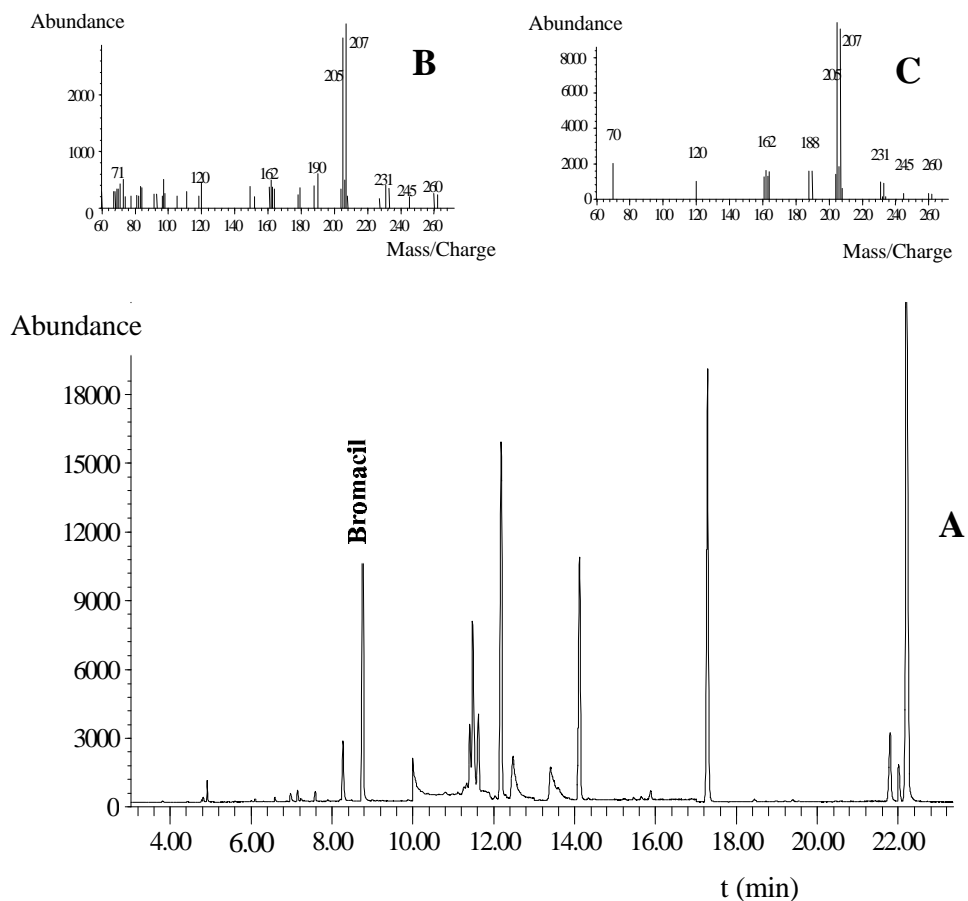


Figure 7. (A) GC-MS chromatogram in selected ion monitoring mode, obtained by liquid-liquid extraction of a 500 mL surface water sample from a wet area of Castellón (Spain); (B) Bromacil spectra in the water sample; (C) Bromacil spectra in the library.

Conclusions

On-line sample handling coupling SPE and LC is a simple and powerful tool for the analysis of trace amounts of polar compounds in environmental aqueous samples. In the present work, this technique has been applied to the trace-level determination of some polar herbicides widely used in European countries. The proposed method allowed the quantitation of bromacil and five urea herbicides at $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in environmental water samples, reaching detection limits between $0.02\text{-}0.05 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ by preconcentration of only 50 mL of water and without any previous clean-up step. High sample throughputs of around 25 samples per day were also achieved. Finally, the procedure was applied to a surface water sample in which $0.22 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of bromacil and $0.21 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of diuron were found.

References

- [1] Barceló D., **1993**. *J. Chromatogr.* 643: 117-143
- [2] Hernández F., Serrano R., Miralles M.C., Font N., **1996**. *Chromatographia*, 42:151-158
- [3] Zandvoort R., Van den Born G. W., Braber J. M., Smelt J.H., **1980**. *Water, Air and Soil Pollution* 13: 363-372
- [4] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, **1980**
- [5] Karg F. P. M., **1993**. *J. Chromatogr.* 634: 87-100
- [6] Sancho J.V., Hidalgo C., Hernández F., *J. Chromatogr.* in press
- [7] Van Zoonen P., **1993**. *Sci. Total Environ.* 132: 105-114
- [8] Di Corcia A., Marchetti M., **1991**. *J. Chromatogr.* 541: 365-373
- [9] De la Colina C., Báez M.E., Peña A., Romero E., Dios G., Sánchez-Rasero F., **1994**. *Sci Total Environ.* 153: 1-6
- [10] Volmer D., Levsen K., **1994**. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 5: 655-675
- [11] Nouri B., Fouillet B., Toussaint G., Chambon P., Chambon R., **1995**. *Analyst* 120:1133-1136

- [12] Schüleín J., Martens D., Spitzauer P., Kettrup A., **1995**. *Fresenius J. Anal. Chem.* 352: 565-571
- [13] Goewie C.E., Kwakman P., Frei R. W., Brinkman U.A.Th., Maasfeld W., Seshadri T., Kettrup A., **1984**. *J. Chromatogr.* 284:73-86
- [14] Bagheri H., Brouwer E.R., Ghijsen R.T., Brinkman U.A.Th., **1992**. *Analisis* 20:475-482
- [15] Pichon V., Hennion M.-C., **1994**. *J. Chromatogr. A* 665:269-281
- [16] Hatrík Š., Lehotay J., Tekel' J., **1994**. *J. High Resolution Chromatogr.* 17:756-758
- [17] Van der Wal E.H.R., Brouwer E.R., Lingeman H., Brinkman U.A.Th., **1994**. *Chromatographia* 39:239-245
- [18] Marcé R.M., Prosen H., Crespo C., Calull M., Borrull F., Brinkman U.A.Th., **1995**. *J. Chromatog. A* 696: 63-74
- [19] Hennion M.-C., Scribe P. **1993**. *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam pp. 23-77
- [20] Hennion M.-C., Pichon V., Barceló D., **1994**. *Tr. in Anal. Chem.* 13:361-372
- [21] Guenu S., Hennion M.-C., **1994**. *J. Chromatogr. A* 665:243-251
- [22] Hupe K.-P., Riedmann M., Rozing G., **1995**. *Chromatographia* 40:631-637
- [23] Minnaard W.A., Slobodník J., Vreuls J.J., Hupe K.-P., Brinkman U.A.Th., **1995**. *J. Chromatogr. A* 696:333-340
- [24] Fielding M., Barceló D., Helweg A., Galassi S., Torstensson L., Van Zoonen P., Wolter R., Ageletti G. **1992**. *Pesticides in Ground and Drinking Water (Water Pollution Research Report, 27)*, Commission of the European Communities, Brussels pp 1-136.
- [25] Subra P., Hennion M.-C., Rosset R., Frei R.W., **1988**. *J. Chromatogr.* 456:121-141
- [26] Hernández F., Morell I., Beltran J., López F.J., **1993**. *Chromatographia* 37:303-312

Table 1. Time-programmed events used in the fully automated on-line SPE-LC-DAD method.

Time (min)	LP	P-1 (mL·min ⁻¹)	HV-1	HV-2	PC
0	C1	5	INJECT	LOAD	
1		4	LOAD		
2.25	C2	5	INJECT		
3.25		4	LOAD		
4.50	C3	5	INJECT		
5.50		4	LOAD		
6.75	S1	5	INJECT		
7.75		5	LOAD		
17.75		0		INJECT	START
18.75			LOAD		
32.5					STOP

Time (min)	LP	P-1 (mL·min ⁻¹)	HV-1	HV-2	PC
0	C1	5	INJECT	LOAD	
1		4	LOAD		
2.25	C2	5	INJECT		
3.25		4	LOAD		
4.50	C3	5	INJECT		
5.50		4	LOAD		
6.75	S2	5	INJECT		
7.75		5	LOAD		
17.75		0		INJECT	START
18.75				LOAD	
32.5					STOP

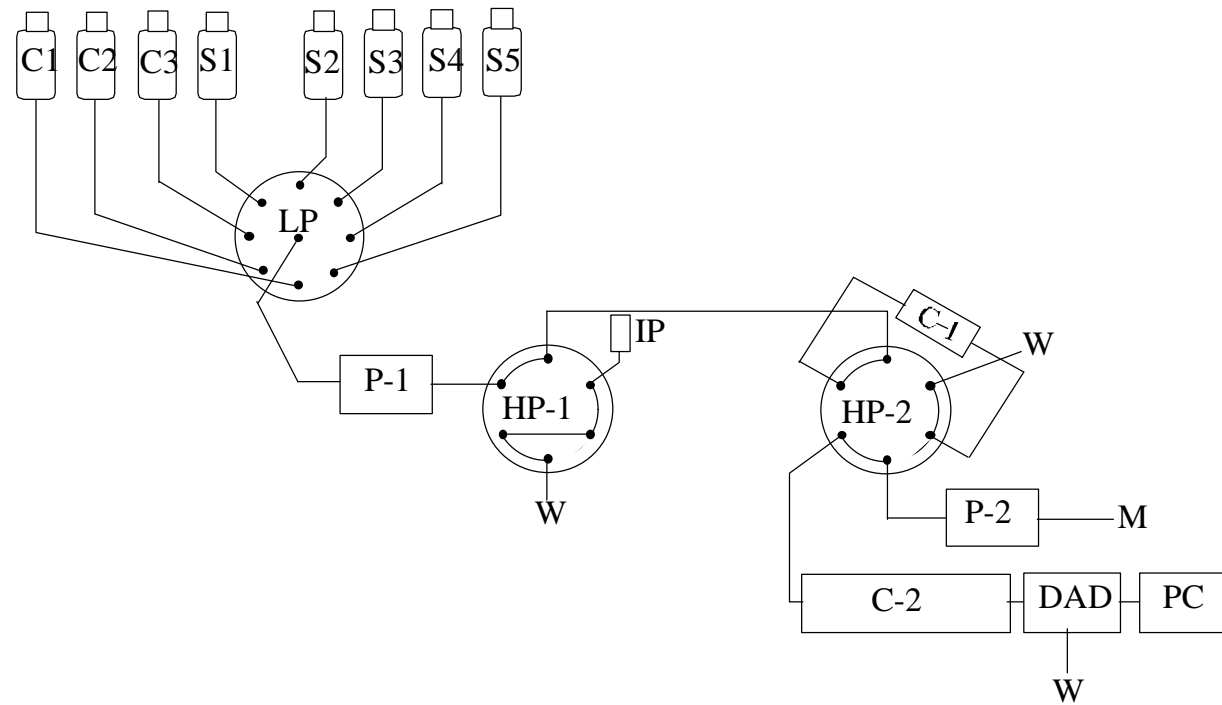


Figure 1. Schematic representation of the on-line preconcentration system.

C, conditioning solvents; S, water samples; LP, low pressure eight-port valve; HV-1 and HV-2, high pressure six-port valves; P-1, preconcentration pump; IP, injection port for direct loop injections; C-1, enrichment column; P-2, eluent pump; M, mobile phase; C-2, analytical column; DAD, diode array detector; PC, personal computer; W, waste.

COUPLED-COLUMN LIQUID CHROMATOGRAPHY APPLIED TO THE TRACE-LEVEL DETERMINATION OF TRIAZINE HERBICIDES AND SOME OF THEIR METABOLITES IN WATER SAMPLES.

Félix Hernández*, Carmen Hidalgo, Juan V. Sancho and Francisco J. López

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

ABSTRACT

In the present work, a study is reported of the potential of coupled-column liquid chromatography (LC) applied to the determination of triazine residues in environmental water samples. For this purpose, two different techniques have been compared: on-line trace enrichment followed by LC (SPE-LC) and coupled-column liquid chromatography (LC-LC). First, a completely automated liquid chromatographic method based on on-line trace enrichment in a prepacked precolumn and using diode array detection has been developed for the simultaneous trace-level determination of six triazine herbicides (simazine, cyanazine, atrazine, terbumeton, terbuthylazine, and terbutryn) and the main atrazine metabolites (desisopropylatrazine, desethylatrazine, and hydroxyatrazine). After preconcentration parameters were optimized by testing two different sorbents (C₁₈ and PRP-1) in three cartridges with different dimensions, a sample volume of 100 mL was selected in order to achieve maximal solute preconcentration. Detection limits lower than 0.1 µg·L⁻¹ were obtained even for the most polar analyte (desisopropylatrazine), which presented recoveries of around 30%. The method was validated by means of recovery experiments in groundwater and surface water samples spiked with the analytes at different levels (0.2-2 µg·L⁻¹). Afterward, the procedure was successfully applied in a program for monitoring of triazine residues in surface water carried out in a wet area of Castellón, Spain. Different triazine herbicides such as simazine, terbumeton, terbuthylazine and terbutryn were identified and quantified. The identity of these

compounds was confirmed by their absorption UV spectra and by GC/MS analysis. Finally, two rapid, sensitive, and selective procedures, previously developed in our laboratory for the trace-level determination of triazine compounds, both based on LC-LC, were compared with the former procedure. The SPE-LC approach showed a considerable improvement in the global sensitivity at the expense of a decrease in selectivity as well as in sample throughput.

INTRODUCTION

Triazine herbicides have been widely applied in agriculture for crop protection during the past few decades. Some of these herbicides have been classified as probable or transient leachers used in Europe in amounts over 50 000 kg/annum (simazine, cyanazine, terbuthylazine, terbutryn) and 500 000 kg/annum (atrazine). According to considerations of usage, physicochemical properties and persistence, some of them have also been compiled in a priority list of herbicides established for Mediterranean countries such as France, Italy, Greece, and Spain. This is the case with atrazine, simazine, terbumeton, terbuthylazine, and terbutryn.¹

This family of herbicides is among the classes of chemical pollutants more heavily monitored by water authorities, and their residues have been frequently detected in environmental waters through the European Union,²⁻⁴ usually at levels higher than the maximum amount allowed, which is limited in drinking water to 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for single pesticides and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for the sum of pesticides including toxic transformation products.⁵ In the United States, triazines as atrazine, simazine, and cyanazine are some of the agents more commonly found in groundwater, often in concentrations that exceed the Environmental Protection Agency's (EPA) drinking water standard.⁶

Studies recently carried out by the U.S. Geological Survey indicate that metabolites occur in groundwater more commonly than their parent substances.⁷ In this way, it is not surprising that, together with the parent compounds, some degradation products have also been detected in natural waters. This is the case with

the main atrazine metabolites such as deisopropylatrazine (DIA), deethylatrazine (DEA), and hydroxyatrazine (HA).⁴ DIA and DEA, the dealkylated metabolites, are obtained by microbiological transformations, and HA, which is considered a major abiotic degradation product of atrazine in water and soil,⁸ is achieved via chemical hydrolysis.

Many analytical methods for the determination of triazine herbicides in water samples have been reported. Traditional procedures have made use of gas chromatography (GC) with nitrogen-phosphorus detection (NPD), electron capture detection (ECD), or mass spectrometry detection (MSD).^{2,9-13} This is also the case with reported EPA methods 505, 507 and 525, useful for monitoring some triazine herbicides in water samples.¹ In these methods, one or more enrichment steps are added by means of organic solvents (liquid-liquid extraction or microextraction) or solid-phase extraction (SPE) in order to make the aqueous sample compatible with the chromatographic system as well as to decrease detection limits. Unfortunately, they do not allow direct determination of the hydroxy metabolites, and previous derivatization steps should be applied.

Therefore, reversed-phase liquid chromatography (RPLC) with ultraviolet (UV) or MS detection has been, in recent years, preferred as an alternative chromatographic technique for the determination of triazine compounds in environmental water samples.¹⁴⁻¹⁹

In recent years, coupled-column liquid chromatography using two analytical columns and large-volume injection has been successfully applied to the trace-level determination of polar compounds.²⁰⁻²⁷ Two LC-LC procedures have recently been developed in our laboratory for the determination of four triazines (simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn)²⁶ as well as atrazine together with its major metabolites (DIA, HA, DEA)²⁷ in different environmental water samples, achieving detection limits between 0.1 and 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ by direct injection of 2 mL of water sample without any previous enrichment step.

However, in the treatment of reported methods based on LC include on- or off-line enrichment steps of the water samples in order to decrease detection limits according to the European norms.⁵ The main drawbacks of off-line methodology (LLE or SPE) have already been reported,²⁸ including the lack of automation with many time-consuming manual steps, loss of sensitivity owing to the injection of an aliquot, losses in possible evaporation steps, risks of contamination usually requiring internal standards, etc. Therefore, on-line trace enrichment has been preferred, since automation can be complete and the whole amount of analyte preconcentrated in a cartridge placed in the loop position of a six-port switching valve is introduced in the liquid chromatographic system, allowing the handling of smaller sample volumes with sensitivities similar to those of off-line techniques. This technique has been successfully applied to the trace-level determination of a great number of polar and/or thermolabile compounds such as some uracil, urea and phenyl carbamate herbicides^{29,30}.

Related to the determination of triazines in environmental water samples, reported methods based on on-line SPE followed by LC are quite sensitive for the parent compounds, but they present serious problems in the determination of polar metabolites, mainly DIA. This compound is especially troublesome since its recovery is low from conventional sorbents such as C₁₈ or polymeric derivatives of styrenedivinylbenzene (PRP-1, PLRP-S, etc.). Recently, the use of more specific sorbents for polar compounds as Licrolut EN¹⁹ or other polymeric sorbents with high specific surface areas³¹ has been described. Unfortunately, the enrichment of many polar matrix interferences appearing at the beginning of the chromatogram together with the most polar analytes cannot be avoided, and their determination by means of conventional UV detection is quite difficult.

The first aim of this work is to study the feasibility of the on-line SPE technique followed by LC with diode array detection (DAD) for the trace-level determination of triazine herbicides and three polar metabolites. For this purpose, an automatic sampler processor designed for off-line SPE (ASPEC XL) has been

adapted by performing hardware and software modifications to the commercial equipment. Three different prepacked precolumns filled with C₁₈ or PRP-1 sorbents have been assayed in order to get the maximum enrichment of the polar analytes. As a result, a fully automatic on-line SPE-LC-DAD procedure is developed. Then, considering that coupled chromatographic techniques are among the most sensitive and selective techniques available for the trace-level determination of pollutants in environmental samples,³² two different coupled-column LC techniques (on-line SPE-LC and LC-LC) are finally compared, and both are applied to the trace-level determination of triazine herbicides in environmental water samples.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals. The triazine herbicides and atrazine metabolites were obtained from Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany). LC-grade methanol and acetonitrile were purchased from Scharlau Sciences (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA). Sodium hydroxide (97%) was provided by Scharlau Sciences. Potassium dihydrogen phosphate and hydrochloric acid of analytical reagent grade were bought from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of atrazine, terbuthylazine, cyanazine, terbumeton, terbutryn (all 400 µg·mL⁻¹), DIA, and DEA (200 µg·mL⁻¹) were prepared in acetonitrile, while the stock standard solution of simazine (200 µg·mL⁻¹) was prepared in methanol. Finally, the stock standard solution of hydroxyatrazine (100 µg·mL⁻¹) was prepared in LC-grade water by dropwise addition of reagent-grade hydrochloric acid. These solutions were stored at -20 °C, and diluted standard mixtures were prepared weekly in LC water and stored at 4 °C.

Equipment. Experiments were performed using an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France). This system included an ASPEC XL automatic processor equipped with two Rheodyne six-port valves, a model 306 high-pressure preconcentration pump, a Model 402 low-pressure pump, a Model 817 eight-port

valve actuator, and a Gilson intelligent keypad. The LC system consisted of a 9012 ternary LC pump from Varian (San Fernando, CA) and a HP 1100 series diode array detector from Hewlett-Packard (Waldbronn, Germany).

With regard to the LC precolumns, a 30-mm \times 4-mm-i.d. column packed with 10- μ m Spherisorb ODS was obtained from Scharlau Sciences, a 5.8-mm \times 4.6-mm-i.d. Prelute cartridge packed with 10- μ m Hypersil ODS was purchased from Gilson, and a 10-mm \times 2-mm-i.d. cartridge filled with 10- μ m PRP-1 sorbent was obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain). The analytical LC column consisted of a 125-mm \times 4-mm-i.d. packed with 5- μ m Spherisorb ODS-2 from Scharlau Sciences.

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a HP Chem Station for LC 3D System (software version A.04.01). Surface water samples with suspended particles and significant amounts of organic matter were previously filtered on 0.45- μ m disposable Nylon membranes purchased from Scharlau Sciences.

Procedure. Automation of on-line trace enrichment was performed using the ASPEC XL system, whose external configuration was modified in our laboratory (**Figure 1**). An eight-port valve actuator and a high-pressure pump were added for conditioning and percolating samples through a short column (C-1) placed in the sample loop position of a six-port valve. In addition, a homemade Pascal software program was required in order to control the whole process, since the original software supplied with the equipment was not designed to performed this kind of work.

The conditioning process was performed sequentially with 5 mL of LC water, 5 mL of acetonitrile, and another 5 mL of LC water at 4 mL \cdot min⁻¹; afterward 100 mL of water sample were percolated through the short column at 2 mL \cdot min⁻¹, and, finally, the retained compounds were directly eluted by the mobile phase, set at 1 mL \cdot min⁻¹, to the analytical column (C-2) in the backflush mode over 15 minutes. The mobile phase consisted of the gradient shown in **Table 1**.

RESULTS AND DISCUSSION

Analytical LC Separation. The chromatographic separation of the analytes was studied by 100- μ l direct loop injection of standard solutions on the C₁₈ analytical column. Acetonitrile was preferred to methanol as organic modifier due to its lower viscosity and UV absorbance in the range of work. With regard to the aqueous mobile phase, a buffer solution was necessary in order to get peak compression of both hydroxyatrazine (HA) and terbumeton. A 0.05 M KH₂PO₄ solution adjusted to pH 7 by dropwise addition of a 2 M KOH solution was used. The gradient elution proposed is shown in **Table 1**, and a LC chromatogram of a 400 μ g·L⁻¹ standard solution is shown in **Figure 2**.

Table 1. Mobile Phase Compositions Used in the On-line SPE-LC-DAD Procedure.

<i>t</i> (min)	% CH ₃ CN	KH ₂ PO ₄ (0.05 M, pH 7) (%)
0	20	80
10	25	75
18	41	59
23	41	59
25	45	55
30	50	50

Preconcentration Parameters. The breakthrough volume, which is the sample volume that can be percolated through the short enrichment column without any loss of analytes, was studied by considering the elution process. In this way, three different prepacked precolumns were assayed: (1) a 5.8-mm \times 4.6-mm-i.d. Prelute cartridge packed with 10- μ m Hypersil ODS, (2) a 30-mm \times 4-mm-i.d. column packed with 10- μ m Spherisorb ODS, and (3) a 10-mm \times 2-mm-i.d. cartridge filled with 10- μ m PRP-1. Standard solutions containing the same amount of herbicides (40 ng each) with volumes ranging between 10 and 200 mL were preconcentrated. Recoveries were compared to those obtained with the percolation of the 10-mL sample volume.

Previously, we verified that no breakthrough occurred from the enrichment precolumns using this small sample volume (10 mL) by comparing this method with a 100- μ L direct loop-injection.

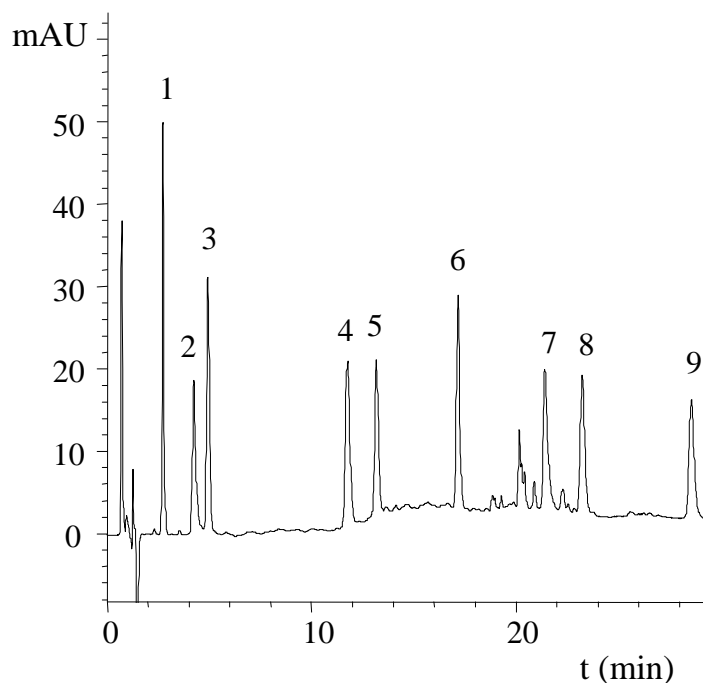


Figure 2. Direct LC-DAD chromatogram ($\lambda = 220$ nm) of a standard mixture solution ($400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) obtained by 100- μ L loop injection. Peaks: 1, DIA; 2, HA; 3: DEA; 4, simazine; 5, cyanazine; 6, atrazine; 7, terbuteton; 8, terbuthylazine; 9, terbutryn.

Some experimental breakthrough curves referring to the most polar analytes DIA (A), HA (B), and DEA (C) are shown in **Figure 3**. It can be seen that the short C_{18} precolumn (5.8 mm) presented the lowest retention in the case of DIA and DEA. This fact was due to the small amount of prepacked sorbent (70 mg) in comparison with the larger C_{18} column (30 mm), which afforded major retention of DIA without any important breakthrough of HA and DEA after percolating 100 mL of water sample. Unfortunately, peak broadening of DIA and DEA was evident after percolating the first 40 mL since the mobile phase could not refocus the compounds at

the beginning of the analytical column. With the polymeric sorbent, the enrichment of sample volumes of 100 mL led to breakthrough of around 70 % of DIA and 15% each of HA and DEA, in each case with correct peak shape. Comparing the two short precolumns (C₁₈ 5.8 mm and PRP-1 10 mm), less retention of polar analytes was achieved with the C₁₈ one. This fact was expected, since it is well known that retention factors of analytes are between 25 and 40 times higher when using polymeric sorbents instead of C₁₈ silicas.³³

The PRP-1 precolumn was selected in the next experiments for the enrichment of 100 mL of water samples, as a compromise between recovery values and satisfactory peak shapes. This sample volume (100 mL) was the minimum required to obtain detection limits below to 0.1 µg·L⁻¹ despite the breakthrough of polar analytes. With regard to that, it is demonstrated that, in on line SPE-LC procedures, maximal solute preconcentration sometimes involves the use of sample volumes larger than the breakthrough volume (V_b), assuming recoveries lower than 100%.³⁴

In recent papers, the use of new polymeric sorbents with high specific surface areas, such as SDB-1 and Lichrolut EN, has been described.^{19,31} These sorbents avoid the breakthrough of many polar compounds such as DIA and DEA, but, unfortunately, many polar matrix interferences, which frequently coelute with polar analytes, are also extracted from the water sample. Therefore, the UV determination of polar analytes at sub-ppb levels could be difficult, mainly in matrixes with high amounts of organic matter, such as surface water samples, if the enrichment of large sample volumes (100 mL) is required in order to get low detection limits. Obviously, the use of small sample volumes (10-25 mL) at greater levels of concentration (ppb levels) are feasible without any breakthrough of polar compounds. Another drawback, in the case of such specific sorbents, is the poor coupling with C₁₈ analytical columns, since the mobile phases used do not allow correct transfer of analytes, causing band broadening of peaks. Similar retention by both the sorbents used in the precolumn and the analytical column is required; for instance, the use of carbon-based analytical columns coupled with the above mentioned precolumns has been described.³¹

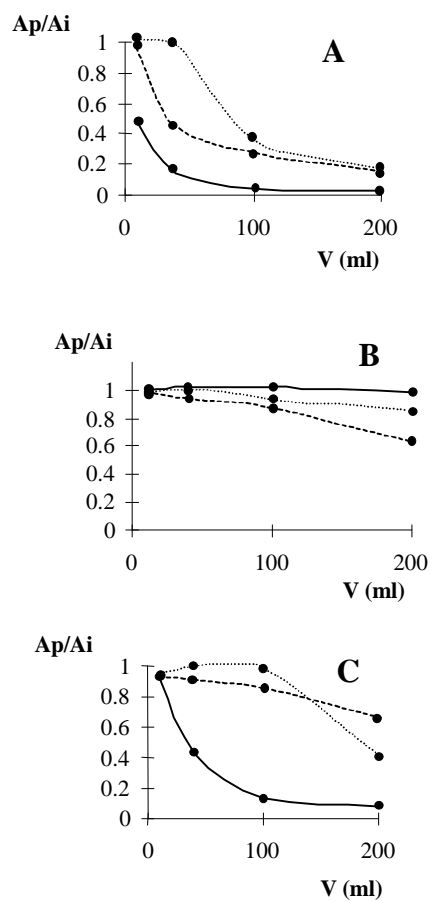


Figure 3. Experimental breakthrough curves of (A) DIA, (B) HA and (C) DEA in three different cartridges: (···) C₁₈, 30-mm × 4-mm-i.d., (- -) PRP-1, 10-mm × 2-mm-i.d., and (—) C₁₈, 5.8-mm × 4.6-mm-i.d.

In this work, the reproducibility of recoveries obtained by using the selected PRP-1 precolumn was studied by performing enrichment experiments with standard solutions at two levels of concentration, 0.4 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The results showed coefficients of variation lower than 10% for each compound ($n = 7$), even in the case of DIA.

The possibility of determining the greatest polar atrazine metabolite (DIA) -although we obtained only recoveries of around 30%- long with the good reproducibility of the resulting values, showed that polymeric sorbents such as PRP-1 are quite useful in on-line SPE methodology, even for the enrichment of polar compounds.

The response linearity of the SPE-LC-DAD method was studied for standard solutions ranging between 0.2 and 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($n=6$) yielding correlation coefficients better than 0.998 for all compounds. In the case of polar metabolites, the response was linear only between 0.2 and 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (DIA) and between 0.2 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (HA and DEA). The lack of linearity in these compounds at higher levels could be explained on the basis of the different analyte breakthrough depending of the amount of compound preconcentrated.

Determination of Triazine and Metabolites in Environmental Water Samples. The proposed on line SPE-LC-DAD method was validated by means of recovery experiments in drinking and surface water samples spiked with standard mixtures at different levels of concentration (0.2 and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Recovery values were estimated by comparison of the spiked water samples with direct 100 μL loop injection standards. The results, shown in **Table 2**, are satisfactory with regard to reproducibility between samples. Obviously, recoveries lower than 100% were obtained in the case of polar metabolites.

The procedure is illustrated in **Figure 4**, which shows the chromatogram of a drinking water sample spiked with triazine herbicides and metabolites at levels as low

as $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The blank chromatogram of the water sample was also registered; polar matrix interferences, which depend largely on the gradient applied and on the nature of the sample, appeared at the beginning of the chromatogram.

Table 2. Average Recoveries and Coefficients of Variation (% in Parentheses) for On-Line SPE-LC-DAD Analysis of Triazine Herbicides in Environmental Water Samples Spiked at Different Levels ($n=5$).

Compound	Drinking water		Surface water	
	$0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
DIA	28 (2)	24 (6)	33 (8)	33 (6)
HA	98 (4)	78 (3)	75 (7)	87 (5)
DEA	104 (5)	83 (2)	79 (10)	93 (2)
Simazine	101 (6)	100 (4)	104 (4)	109 (1)
Cyanazine	99 (1)	101 (2)	95 (8)	108 (1)
Atrazine	92 (8)	97 (4)	108 (1)	110 (2)
Terbumeton	95 (5)	108 (5)	95 (2)	107 (4)
Terbuthylazine	103 (3)	100 (4)	104 (6)	109 (1)
Terbutryn	102 (5)	100 (2)	104 (4)	110 (1)

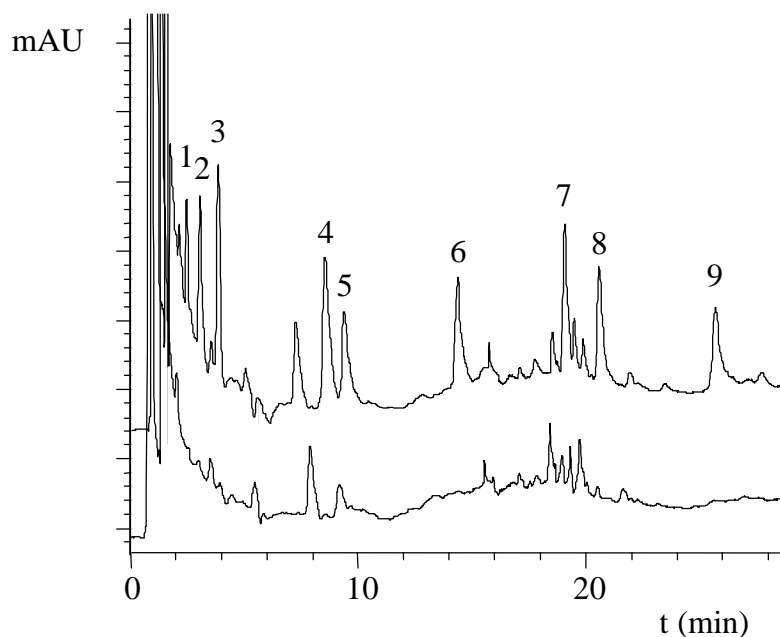


Figure 4. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($\lambda = 220 \text{ nm}$) of (A) a 100-mL drinking water sample spiked with selected herbicides at $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and (B) a blank sample.

As can be deduced from the previous chromatogram, detection limits ($S/N=3$) below $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ were estimated in environmental water samples. Besides, sample manipulation was minimized, since the procedure was completely automated from the preconcentration until the analysis, and only a prefiltering step was added in the case of surface water samples.

This procedure was applied in a program for monitoring of triazine herbicides carried out by our research group (from May to September, 1997) in surface water samples from a wet area of Castellón (Mediterranean region, eastern Spain) almost exclusively dedicated to citrus orchards. The results, presented in **Table 3**, confirm that these natural waters are contaminated by triazine herbicides, especially by simazine. **Figure 5** shows the SPE-LC-DAD chromatogram of one of the water samples analyzed in which simazine, terbumeton and terbuthylazine were detected. Although a spectral library search was used for the identification of triazine herbicides and match parameters between 990 and 998 were obtained, the findings were also confirmed by a previously reported method^{2,35} used in our laboratory for multiresidue analysis of pesticides in water samples by means of liquid-liquid extraction (LLE) followed by GC/MS. The results obtained by the LLE-GC/MS procedure were similar to those of the SPE-LC-DAD procedure, as shown in **Table 3**.

Table 3. Concentration of Triazine Herbicides in Surface Water Samples from a Wet Area of Castellón, Spain^a

Water Samples	Concentration ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
	<i>Simazine</i>	Terbumeton	<i>Terbuthylazine</i>	<i>Terbutryn</i>
27/05/1997	2.00 (2) 1.7 ^c	nd ^b	nd	nd
04/07/1997	1.7 (0.3) 1.5 ^c	nd	nd	1.5 (3) 1.2 ^c
28/07/1997	0.7 (2) 0.6 ^c	0.9 (10) 0.7 ^c	0.4 (10) 0.3 ^c	nd
31/08/1997	nd	nd	nd	nd
03/09/1997	nd	nd	nd	nd

^a Analysis performed by SPE-LC-DAD; mean concentrations ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and coefficients of variation (%) for $n=3$. ^b nd, not detected. ^c LLE-GC/MS data.

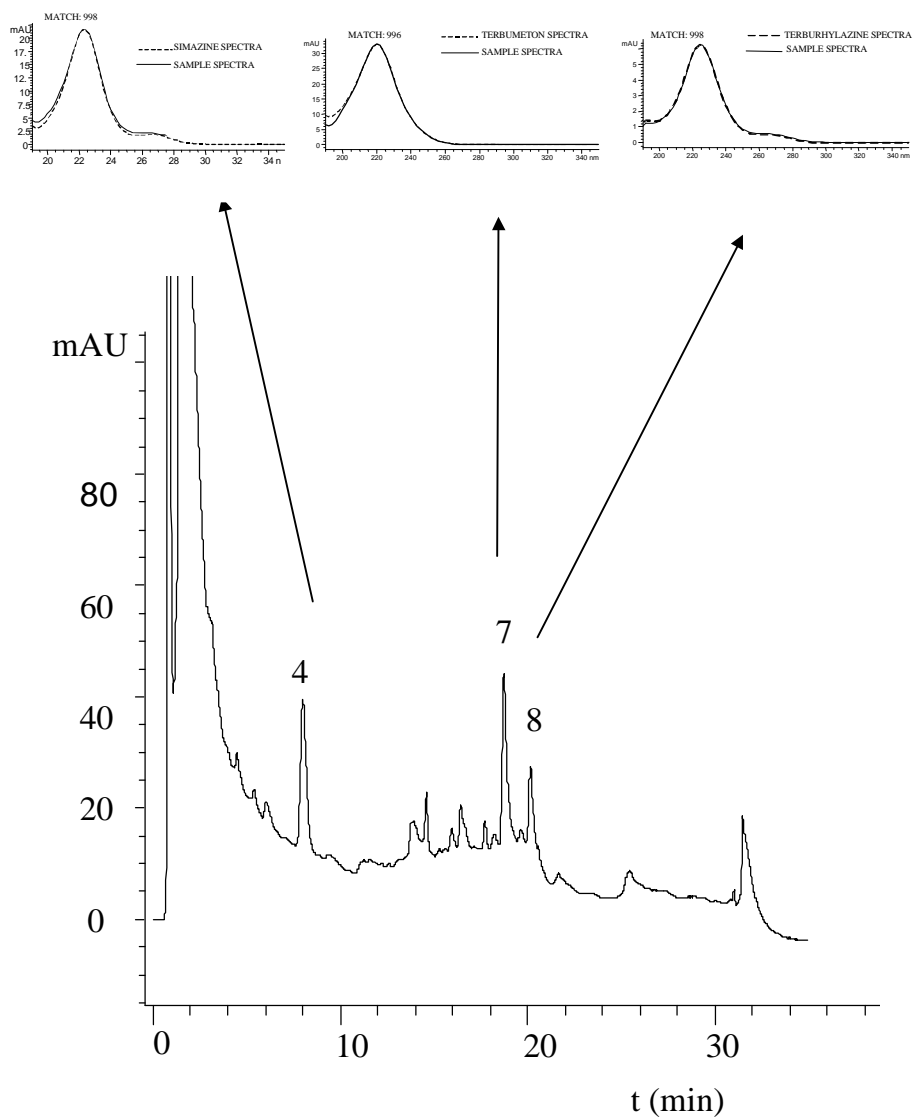


Figure 5. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($I = 220 \text{ nm}$) of a 100-mL surface water sample from a wet area of Castellón, Spain. Peaks: 4, simazine ($0.70 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 7, terbutometon ($0.88 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); 8, terbutylazine ($0.44 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$).

Comparison between Different Procedures Based on Coupled-Column LC.

Finally, the proposed on-line SPE-LC-DAD procedure was compared with two previous methods, recently developed in our laboratory, in which four triazine herbicides (simazine, atrazine, terbuthylazine and terbutryn)²⁶ and atrazine together with their main metabolites (DIA, HA and DEA)²⁷ were determined by LC-LC with large-volume injection of 2 mL of water sample. The proposed LC-LC procedures were rapid, sensitive and selective, and no significant handling of sample was necessary. They were validated by means of recovery experiments in drinking and surface water samples spiked at different levels of concentration (0.4–20 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). The results were satisfactory with regard to both recovery (87-104%) and reproducibility (CV, 1-7%), since the total amount of analytes was transferred from the first short column (C-1) to the second column (C-2) without breakthrough of polar analytes as DIA. **Figures 6 and 7** show the LC-LC chromatograms of two environmental water samples spiked with triazine herbicides at 0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and with atrazine and metabolites at 2 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Direct detection limits, without any preconcentration step, were in the range of 0.1-0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

It can be concluded that the LC-LC procedures are quite sensitive and can be applied to programs for monitoring of surface waters where the maximum concentration allowed for each pesticide, according to the European Union regulations, is 1-3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. In addition, these procedures are also useful for monitoring of pesticides in drinking waters, attending to the health advisory levels proposed by the EPA for some triazine herbicides (3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for atrazine and 4 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for simazine). These values are possibly more correct than the maximum European levels allowed for drinking waters, which have been fixed at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for all the individual pesticides without making any distinction between different toxicity levels. The strict regulation in the European Union demands that analytical methods be extremely sensitive, with detection limits around 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, to be useful for monitoring programs. For this reason, we added an off-line SPE pre-enrichment step using disposable SPE C₁₈ cartridges to the developed LC-LC procedures. With regard to

this step, the advantages of on-line SPE enrichment compared to the off-line methodology have been already described in the introduction. The enrichment of 100 mL of water sample which takes place in the on-line SPE-LC procedure led to a higher sensitivity of the procedure but also to an increase in the total analysis time compared to that of the direct LC-LC procedures, which presented high sample throughputs of around 60 samples²⁶ and 30 samples²⁷ per day.

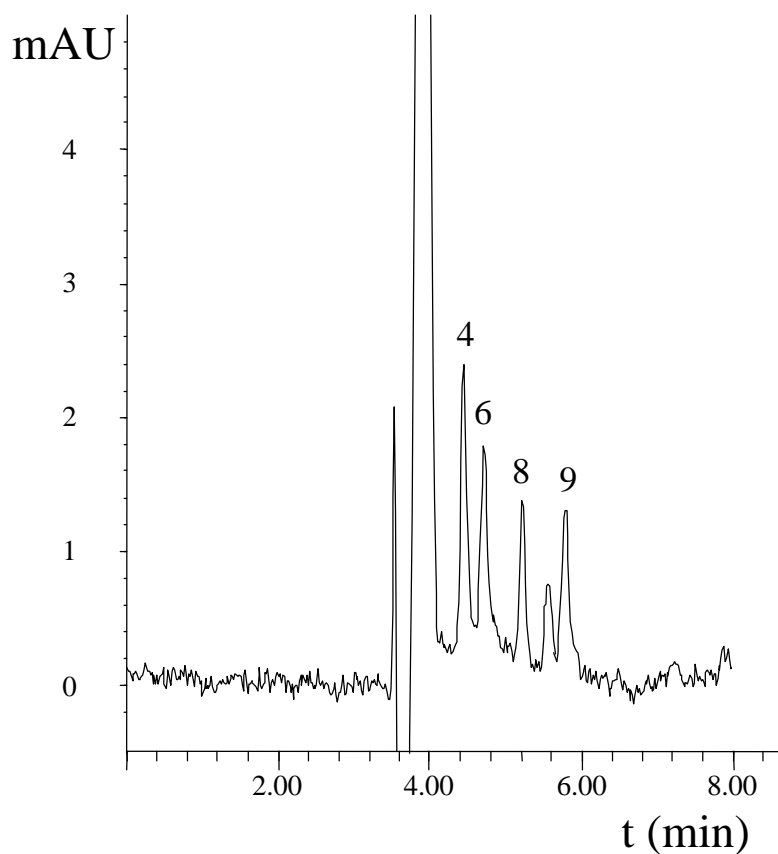


Figure 6. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked at $0.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with triazine herbicides, registered at 223 nm. Volume of sample injected, 2 mL; cleanup time, 2.90 min; transfer time, 0.7 min; blank subtracted. Peaks: 4, simazine; 6, atrazine; 8, terbuthylazine; 9, terbutryn.

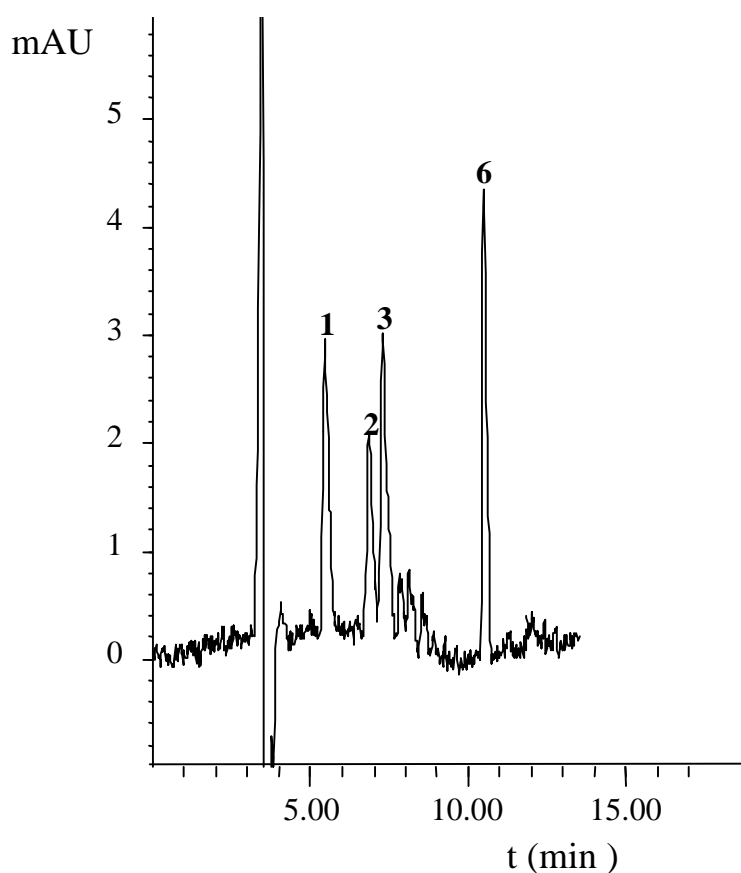


Figure 7. LC-LC chromatogram of a surface water sample spiked at $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ with atrazine and metabolites registered at 220 nm. Volume of sample injected, 2 mL; cleanup time, 2.60 min; transfer time, 4.2 min; blank subtracted. Peaks: 1, DIA; 2, HA; 3, DEA; 6, atrazine.

Regarding the selectivity, the described on-line SPE-LC procedure allowed the simultaneous determination of nine compounds, despite the fact that matrix interferences were preconcentrated together with the analytes. Although no problems were observed in the samples analyzed, in other types of matrices containing higher amounts of organic matter, humic and fulvic acids, the analysis might be more difficult. In such cases, only the use of selective sorbents such as immunosorbents, cation exchanges, etc. and/or selective detection systems (MS) could minimize this

effect. However, the selectivity was enhanced in the LC-LC procedures by the use of two analytical columns. The first short column (C-1) allows the separation between analytes and interferences, and only the fraction of sample containing the analytes is transferred to the second column (C-2), where they are successfully separated. In this way, an automated cleanup of the aqueous sample is carried out, and the future application to other matrixes such as soil, foodstuffs, etc. seems to be very interesting. But this enhancement of selectivity, inherent to the LC-LC technique, reduces its applicability to a reduced number of compounds simultaneously, preferably with similar retention capabilities in C-1. Therefore, the development of multiresidual analytical procedures based on LC-LC seems to be more difficult.

In conclusion, and with reference to the determination of triazines and metabolites in water samples, the LC-LC methodology is very useful for the analysis of all these compounds at levels higher than $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. However, when detection limits below $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ are required, a preconcentration step is then necessary. In these cases, the SPE-LC methodology seems to be more advantageous, since there is no sample manipulation between the preconcentration and the analysis, and it is more sensitive due to the handling of larger sample volumes.

All the described procedures have been successfully applied for monitoring triazine herbicides in water samples. The choice of one method over the others greatly depends on the sensitivity required, the matrix interferences, and the number of compounds which must be analyzed simultaneously. Not to be underestimated as important factors to be taken into account are the laboratory experience, the facilities, and, obviously, the know-how.

CONCLUSIONS

In the present work, a very sensitive procedure based on on-line SPE-LC-DAD has been developed, which allows the simultaneous determination of nine triazine compounds of great concern in Mediterranean countries. The applicability of PRP-1 sorbents for on-line trace enrichment of very polar compounds has been described,

assuming in this case recoveries lower than 100%. The procedure has been successfully applied in a program for monitoring of surface water samples carried out by our laboratory.

The interest of coupled-column LC applied to the residue analysis of triazine herbicides and metabolites has been discussed by comparing the SPE-LC and the LC-LC methodologies. The advantages and drawbacks of each technique have been discussed, concluding that their choice is determined mainly by the problem to be solved (sensitivity required, matrix interferences, number of analytes and samples to be analyzed) as well as the technical possibilities and expertise of the laboratory.

REFERENCES

- [1] Barceló, D. *J. Chromatogr.* **1993**, *643*, 117-143.
- [2] Hernández, F.; Serrano, R.; Miralles, M.C.; Font, N. *Chromatographia* **1996**, *42*, 151-158.
- [3] Pichon, V.; Hennion, M.-C. *J. Chromatogr., A* **1994**, *665*, 269-281.
- [4] Berg, M.; Müller, S.R.; Schwarzenbach, R.P. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 1860-1865.
- [5] EEC Drinking Water Guideline, 80, 778, EEC, EEC No. L229/11-29, EEC, Brussels, 30th August, 1980.
- [6] Haaser, C.A.; Karrie, J.M.; Lees, S.M. *Pesticides in ground water database; a compilation of monitoring studies: 1971-1991*. In: *Eighth IUPAC international congress of pesticide chemistry*. Washington DC, 4-9 July 1994; Blackwell Scientific: Oxford, UK, 1994; Book of Abstracts Vol. 1, p 862.
- [7] Kolpin, D.W.; Thurman, E.M.; Goolsby, D.A. *Environ. Sci. Technol.* **1996**; 335-40 in "Risk of pesticides to groundwater ecosystems" Health Council of the Netherlands: Committee on Pesticides and groundwater, August 1996.

- [8] Lerch, R.N.; Donald, W.W. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 922-927.
- [9] Psathaki, M.; Manoussaridou, E.; Stephanou, E.G. *J. Chromatogr., A* **1994**, *667*, 241-248.
- [10] Crespo, C.; Marcé, R.M.; Borrull, F. *J. Chromatogr., A* **1994**, *670*, 135-144.
- [11] Eisert, R.; Levsen, K. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1995**, *351*, 555-562.
- [12] Cassada, D.A.; Spalding, R.F.; Cai, Z.; Gross, M.L. *Anal. Chim. Acta* **1994**, *287*, 7-15.
- [13] Sabik, H.; Cooper, S.; Lafrance, P.; Fournier, J. *Talanta* **1995**, *42*, 717-724.
- [14] Samara, C.; Lintelmann, J.; Kettrup, A. *Fresenius Envir. Bull.* **1994**, *3*, 534-539.
- [15] Vitali, P.; Venturini, E.; Bonora, C.; Calori, R.; Raffaelli, R. *J. Chromatogr., A* **1994**, *660*, 219-222.
- [16] Prosen, H.; Zupancic-Kralj, L.; Marsel J. *J. Chromatogr., A* **1995**, *704*, 121-130.
- [17] Saez, A.; Gómez de Barreda, D.; Gamon, M.; Garcia de la Cuadra, J.; Lorenzo, E.; Peris, C. *J. Chromatogr., A* **1996**, *721*, 107-112.
- [18] Pichon, V.; Chen, L.; Guenu, S.; Hennion, M.-C. *J. Chromatogr., A* **1995**, *711*, 257-267.
- [19] Önnérkjord, P.; Barceló, D.; Emnéus, J.; Gorton, L.; Marko-Varga, G. *J. Chromatogr., A* **1996**, *737*, 35-45.
- [20] Hogendoorn, E.A.; Verschraagen, C.; Brinkman, U.A. Th; Van Zoonen, P. *Anal. Chim. Acta* **1992**, *268*, 205-215.
- [21] Sancho, J.V.; Hernández, F.; Hogendoorn, E.A.; Van Zoonen, P. *Anal. Chim. Acta* **1993**, *283*, 287-296.
- [22] Sancho, J.V.; López, F.J.; Hernández, F.; Hogendoorn, E.A.; Van Zoonen, P. *J. Chromatogr., A* **1994**, *678*, 59-67.
- [23] Sancho, J. V.; Hidalgo, C.; Hernández, F.; López, F.J.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1996**, *62*, 53-63.

- [24] Sancho, J. V.; Hernández, F.; López, F.J.; Hogendoorn, E.A.; Dijkman, E., Van Zoonen, P. *J. Chromatogr.*, A **1996**, 737,75-83.
- [25] Sancho, J.V.; Hidalgo, C.; Hernández, F. *J. Chromatogr.*, A **1997**, 761, 322-326.
- [26] Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Hernández, F. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 338, 223-229.
- [27] Hernández, F.; Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; López F.J. *J. Chromatogr.*, A **1997**, 778, 171-181.
- [28] Hennion, M.-C.; Scribe, P. *Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance*, Elsevier Science Publishers: Amsterdam, 1993, pp 23-77.
- [29] Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Hernández, F. *Quím. Anal.* **1997**, 16, 259-265.
- [30] Hidalgo, C.; Sancho, J.V.; Hernández, F. submitted to *J. Chromatogr.*, A.
- [31] Guenu, S.; Hennion, M.-C. *J. Chromatogr.*, A **1996**, 737, 15-24.
- [32] Van Zoonen, P.; Hogendoorn, E. A.; Van der Hoff, G. R.; Baumann, R. A. *Trends Anal. Chem.* **1992**, 11, 11-17.
- [33] Hennion, M.-C.; Pichon, V.; Barceló, D. *Trends Anal. Chem.* **1994**, 13, 361-372.
- [34] Subra, P.; Hennion, M.-C.; Rosset, R.; Frei, R. W. *J. Chromatogr.* **1988**, 456, 121-141.
- [35] Hernández, F.; Morell, I.; Beltran, J.; López, F. J. *Chromatographia* **1993**, 37, 303-312.

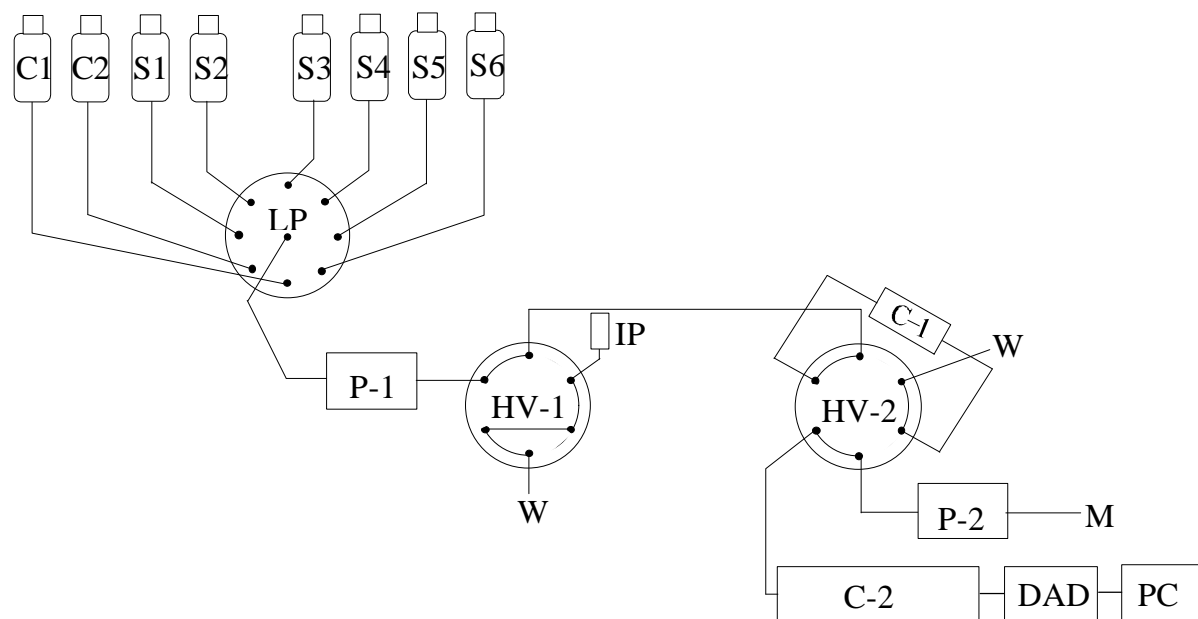


Figure 1. Schematic representation of the on-line preconcentration system. *C*, conditioning solvents; *S*, water samples; *LP*, low-pressure eight-port valve; *HV-1* and *HV-2*, high-pressure six-port valves; *P-1*, preconcentration pump; *IP*, injection port for direct loop injections; *C-1*, enrichment column; *P-2*, eluent pump; *M*, mobile phase; *C-2*, analytical column; *DAD*, diode array detector; *PC*, personal computer; *W*, waste.

AUTOMATED DETERMINATION OF PHENYLCARBAMATE HERBICIDES IN ENVIRONMENTAL WATERS BY ON-LINE TRACE ENRICHMENT AND REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY-DIODE ARRAY DETECTION.

C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. J. López, F. Hernández*

Analytical Chemistry, Experimental Sciences Department, University Jaume I, P.O.Box 224, 12080 Castellón, Spain

Abstract

A fully automated liquid chromatographic method using on-line trace-enrichment, gradient elution and diode array detection is described for the trace-level determination of several phenylcarbamate herbicides, such as carbetamide, propham, desmedipham, phenmedipham, chlorbufam and chlorpropham, in environmental water samples. In this work, two different enrichment pre-columns have been assayed, a 5.8×4.6 mm I.D., $10 \mu\text{m}$ ODS Prelute cartridge and a 10×2 mm I.D. cartridge filled with $10 \mu\text{m}$ PRP-1 polymer, both coupled to a 150×4.6 mm I.D. analytical column filled with $5 \mu\text{m}$ ODS. Using the C_{18} pre-column, up to 50 ml of water sample could be percolated without peak broadening of any compound. However, a lack of reproducibility was observed in the case of carbetamide, the most polar analyte, after performing recovery experiments by percolating drinking and surface water samples spiked at several levels (0.5 and $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). On the other hand, the PRP-1 pre-column allowed the enrichment up to 100 ml of water sample with satisfactory results for every compound, including carbetamide. The procedure was validated by recovery experiments in environmental water samples spiked at 0.2 and $1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ yielding average recoveries between 84-108 % with relative standard deviations in the range 2-12 %. Detection limits as low as $0.04 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ were achieved. It was observed that desmedipham and phenmedipham degraded rapidly in the environmental water samples as showed the degradation studies performed along 24 h in drinking and surface waters spiked at

4 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Although the standard mixture, prepared in HPLC water, was stable around one week, in the environmental water matrices more than 95 % of each herbicide degraded after 6 h, and new chromatographic peaks corresponding to the degradation products were detected.

Keywords

Environmental analysis; Water analysis; Sample handling; Pesticides; Phenylcarbamates

1. Introduction

The widespread use of herbicides in agriculture leads to an increase in the presence of their residues in environmental samples. Phenylcarbamate herbicides are widely applied in agriculture for crop protection. Carbetamide is employed to control grasses and some broad-leaved weeds in chicory, red clover, endive, lucerne and oilseed rape. Phenmedipham is widely applied, sometimes together with desmedipham, as postemergent herbicide for broad-leaved weed control in beet crops, especially in sugar beet crops. Chlorpropham is frequently applied with propham as preemergent herbicides in different crops. They are also used for plant growth regulation especially in potatoes.

Some of these compounds, such as carbetamide, phenmedipham and propham, have been classified as probable or transient leachers used in Europe in amounts over 50 tonnes per annum (500 tonnes in the case of carbetamide) in a pesticide priority list a few years ago published [1]. The majority of the high priority pesticides listed with some potential to leach are frequently found in environmental waters. This is the case for carbetamide, which has been detected in European ground and drinking water at concentrations greater than 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ [2]. However, some other compounds as phenmedipham and propham, which are also listed as priority pesticides, are apparently not found in environmental waters, and the availability of suitable analytical methods could be the cause [2].

The analytical determination of phenylcarbamate herbicides by gas chromatography (GC) is quite troublesome, requiring chemical derivatization. A multi-residue method for analysing herbicides in crops including protham, chlorprotham and phenmedipham by generation of anilines after alkaline hydrolysis was described [3]. The corresponding anilines were determined by GC with electron-capture detection (ECD) after bromation. Another procedure described the alkaline hydrolysis to m-toluidine, for determining phenmedipham in spinach, with direct determination of this compound (m-toluidine) by GC with flame ionization detection [4]. GC with mass spectrometry (MS) detection has also been used for the determination of thermolabile carbamates (phenmedipham) after derivatization with acetic anhydride [5].

Therefore, the use of liquid chromatography (LC) seems to be more appropriate since it is the technique of choice in the case of low volatile, polar and thermolabile compounds. LC followed by ultraviolet (UV) or MS detection after off-line solid-phase extraction (SPE) on different sorbents (C_{18} , graphitised carbon black and polymeric sorbents) has been used for developing multiresidual procedures in which several phenylcarbamate herbicides were enclosed [6-9]. However, in general, there is a lack of analytical methodology focusing on this family of herbicides, since the major part of reported procedures concerning carbamate analysis have been focused on methyl-carbamate insecticides [10].

According to the restrictive European Union regulations, which limit the maximum amount allowed for single pesticides in drinking water to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and for the sum of pesticides to $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ including toxic transformation products [11], very sensitive analytical methods for monitoring drinking water samples are required.

In this way, on- or off-line enrichment steps previously to the chromatographic determination are necessary. The main advantages of on-line methodology in front of off-line methods are well known [12] since it allows complete automation of the analytical processes avoiding sample manipulation. Besides, the whole amount of the analytes present in the sample, which are retained by the suitable sorbent, are

introduced in the chromatographic system. In this way, smaller sample volumes than off-lines methods are required achieving similar detection limits.

On-line trace enrichment on short and usually disposable pre-columns joined to LC has been recently applied to the trace level determination of pesticide residues in environmental water samples [13-17]. The aim of the present work is the development of an on-line SPE procedure followed by LC with diode array detection (DAD) which allows the sensitive determination of carbetamide, propham, desmedipham, phenmedipham, chlorbufam and chlorpropham. With this purpose, an automatic sample processor originally designed for off-line SPE (ASPEC XL) has been adapted by performing hardware and software modifications of the commercial equipment.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The phenylcarbamate herbicides were purchased from Dr. Ehrenstofer (Augsburg, Germany). LC-grade methanol and acetonitrile for pesticide residue analysis were purchased from Scharlau Sciences (Barcelona, Spain). LC-grade water was obtained by purifying demineralized water in a Nanopure II system (Barnstead, Newton, MA, USA).

Stock standard solutions of phenylcarbamate herbicides (400 and 40 mg·l⁻¹) were prepared in methanol and stored at -20 °C. Diluted standard mixtures were prepared in LC water and stored at 4 °C.

2.2. Equipment

Experiments were performed using an automatic sample processor from Gilson (Villiers-le-Bel, France). This system included an ASPEC XL automatic processor equipped with two Rheodyne six-port valves, a model 306 high-pressure preconcentration pump, a Model 402 low-pressure pump, a Model 817 eight-port valve actuator and a Gilson intelligent keypad. The LC system consisted of a 9012

ternary LC pump from Varian (San Fernando, CA, USA) and a HP 1100 Series diode array detector from Hewlett Packard (Waldbronn, Germany).

As regards the LC pre-columns, a 5.8×4.6 mm I.D. Prelute cartridge packed with $10 \mu\text{m}$ Hypersil ODS was purchased from Gilson and a 10×2 mm I.D. cartridge filled with $10 \mu\text{m}$ PRP-1 sorbent was obtained from Teknokroma (Barcelona, Spain). The analytical column consisted of a 150×4.60 mm I.D. Res Elut packed with $5 \mu\text{m}$ C₁₈ and was obtained from Varian.

Recording of chromatograms and quantitative measurements of peak areas were performed with a HP Chem Station for LC 3D System (software version Rev. A.05.03).

Surface water samples with suspended particles and important amounts of organic matter were previously filtered on $0.45\text{-}\mu\text{m}$ disposable nylon membranes purchased from Scharlau Sciences.

2.3. Procedure

Automation of on-line trace enrichment was performed using the ASPEC XL system (**Fig. 1**) in which a short column was placed in the sample loop position of a six-port valve. An eight-port valve actuator and a high-pressure pump were used for conditioning the short column and percolating samples.

The conditioning process was performed sequentially with 5 ml of methanol, 5 ml of acetonitrile and 5 ml of LC water at $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$; afterwards the water sample was percolated through the short column at $4 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ and, finally, the retained compounds were directly eluted by the suitable mobile phase, set at $1 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$, to the analytical column in the backflush mode during 20 minutes.

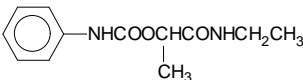
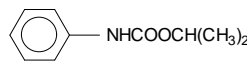
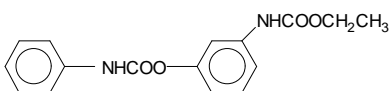
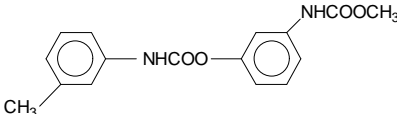
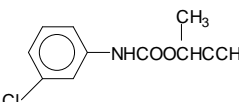
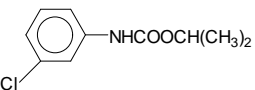
A laboratory-made Pascal software program was required in order to control the whole process, since the original software supplied with the equipment was not designed to perform this kind of work.

3. Results and discussion

The UV spectra of the studied phenylcarbamate herbicides were monitored in order to evaluate their UV maximum absorbance wavelength, which are shown in **Table 1** together with some other physico-chemical parameters.

The chromatographic separation of analytes was studied by 100 µl loop injection of standard solutions on the analytical C₁₈ column. Due to the wide range of polarity between the compounds, a gradient elution, which allowed correct resolution between chromatographic peaks, was optimised. Firstly, acetonitrile was preferred as organic modifier due to its lower viscosity and UV cut-off, however, after assaying different CH₃CN-water gradients, it was not possible to obtain good resolution between desmedipham and phenmedipham with suitable peak shape. This lack of resolution was solved by adding a constant percentage of methanol in the mobile phase, so that resolution between desmedipham and phenmedipham improved without significant increase of the background absorbance. The gradient elution programme, which was performed only modifying the amount of acetonitrile, is shown in **Table 2**. A LC chromatogram of a 200 µg·l⁻¹ standard solution is shown in **Fig. 2**.

Table 1. Physical and chemical properties of studied phenylcarbamate herbicides shown in order of retention on a reversed-phase column.

No	Compound	Chemical Structure	$S_{H_2O}, 20^\circ C$ ($mg \cdot l^{-1}$)	I_{max}
1	Carbetamide		3500	194, 236
2	Propham		32	196, 236
3	Desmedipham		7	200, 238
4	Phenmedipham		6	202, 238
5	Chlorbufam		540	206, 240
6	Chlorpropham		89 ^(a)	208, 240

^(a), S_{H_2O} at $25^\circ C$

Table 2. Mobile phase used for the LC separation of phenylcarbamate herbicides.

t (min)	MeOH (%)	water (%)	CH_3CN (%)
0	30	50	20
11.5	30	47	23
20	30	35	35

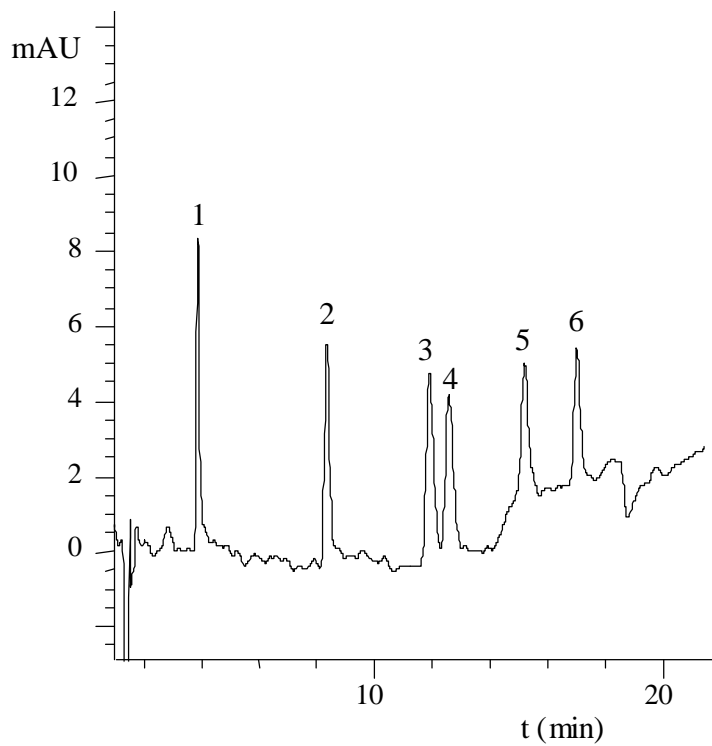


Fig. 2. Direct LC-DAD chromatogram ($\lambda = 236 \text{ nm}$) of a standard mixture solution ($200 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) obtained by $100 \mu\text{l}$ loop injection.

3.1. Preconcentration experiments

Once the LC separation was achieved, on-line trace enrichment of analytes was considered in order to decrease detection limits. The main parameter of the concentration procedure is the selection of the sorbent, which must allow a convenient breakthrough of the analytes, so that detection limits lower than $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ could be obtained.

Firstly, a 5.8×4.6 mm I.D. Prelute cartridge packed with 10 μm Hypersil ODS was selected, mainly due to the reported good reproducibility in retention, rapid equilibrium with mobile phase and unusual irreversible adsorption of solutes on this kind of silica sorbents [12]. Besides, a large number of organic compounds, from non-polar to moderately polar, are retained by n-octadecyl silicas, although there is a limitation in the case of many polar to moderately polar analytes, which are not well retained [12]. So, in our case, the enrichment of carbetamide (the most polar analyte) could be troublesome.

Different sample volumes (10-100 ml) with the same amount of analytes (20 ng), were percolated through the C_{18} pre-column in order to evaluate the maximum sample volume which could be preconcentrated without breakthrough of analytes and avoiding peak broadening. Finally, 50 ml of water sample was selected as optimum. The response linearity of the procedure was studied with standard solutions ranging between $0.5\text{-}4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ($n=5$) achieving coefficients of regression larger than 0.999 in every case.

The former procedure was applied to drinking and surface water samples spiked at two levels of concentration (0.5 and $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$). The results, shown in **Table 3** were satisfactory with regard to both recoveries and relative standard deviations (R.S.D.s) excepting for carbetamide, which presented lack of reproducibility at low levels of concentration. **Fig. 3** shows a chromatogram of a surface water sample spiked at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ together with its blank. According to this figure, detection limits down to $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ could be estimated.

However, from the later experiments it was also evident that both, desmedipham and phenmedipham degraded rapidly in the spiked water samples although standard solutions at similar levels of concentration were stable around one week. In order to avoid the degradation during the performance of the later experiments, water samples were preconcentrated immediately after spiking but, obviously, additional degradation experiments, which are described in Section 3.2., were required.

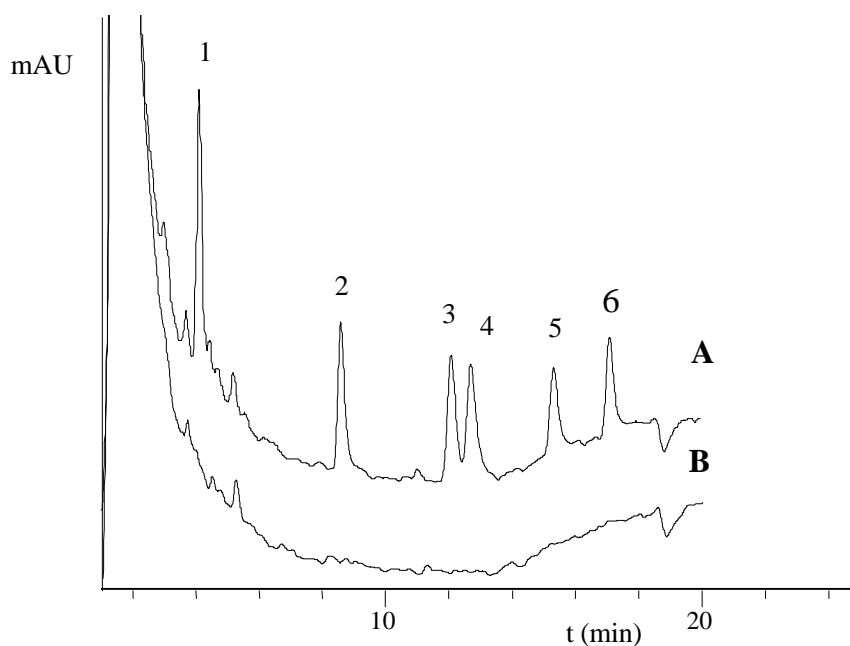


Fig. 3. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($\lambda = 236 \text{ nm}$) of (A) a 50 ml surface water sample spiked with selected herbicides at $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and (B) the blank sample. Enrichment column: $5.8 \times 4.6 \text{ mm I.D. C}_{18}$ Prelute.

Attending to the problems with carbetamide, whose recoveries were not reproducible at low levels of concentration, a $10 \times 2 \text{ mm I.D.}$ cartridge filled with $10 \mu\text{m}$ PRP-1 sorbent was assayed as enrichment pre-column. In this case, the desorption was not possible with the proposed mobile phase in **Table 2**, mainly due to the presence of methanol (30 %) which could not properly elute the retained analytes, although, on the other hand, was necessary for assessing peak resolution between phenmedipham and desmedipham. Therefore, the later analyte (desmedipham) was discarded in further investigations assuming its lower use in European countries and its easy degradation in the environmental water samples. In this way, a new CH_3CN -water gradient elution, which allowed LC separation of the five analytes, was used (**Table 4**).

Table 4. Mobile phase gradient used in the on-line trace-enrichment with PRP-1 pre-column.

<i>t</i> (min)	water (%)	CH ₃ CN (%)
0	50	50
7	40	60
10	35	65
20	35	65

In this case, 100 ml of water sample were preconcentrated since it is well known that retention factors of analytes are between 25- and 40-times higher using polymeric sorbents instead of C₁₈ silicas [18]. The response linearity of the method was studied for standard solutions ranging between 0.2-4 µg·l⁻¹ (*n*=6) and the results are shown in **Table 5**.

The method was validated by spiking drinking and surface water samples at 0.2 and 1 µg·l⁻¹ yielding satisfactory results (**Table 3**) regarding to recoveries and R.S.D.s, even for carbetamide. **Fig. 4** shows the chromatograms of a surface water sample spiked at 0.2 µg·l⁻¹ and its blank. Detection limits between 0.04-0.1 µg·l⁻¹ could be estimated for the five phenylcarbamate herbicides studied.

Table 5. Calibration curves for phenylcarbamate herbicides (0.2-4 µg·l⁻¹, *n*=6) in LC water samples.

	Analitos				
	Carbetamide	Propham	Phenmedipham	Chlorbufam	Chlorpropham
Standard error	11.75	19.48	16.00	7.686	15.00
<i>R</i>	0.9998	0.9997	0.9999	0.9999	0.9997
Intercept	-2.479	12.29	4.142	9.867	13.54
<i>SD</i> ^a _{Intercept}	10.09	13.08	10.744	5.158	10.07
Slope	367.0	466.6	574.2	358.4	357.35
<i>SD</i> _{Slope}	4.102	5.820	4.782	2.296	4.48

^a Standard deviation

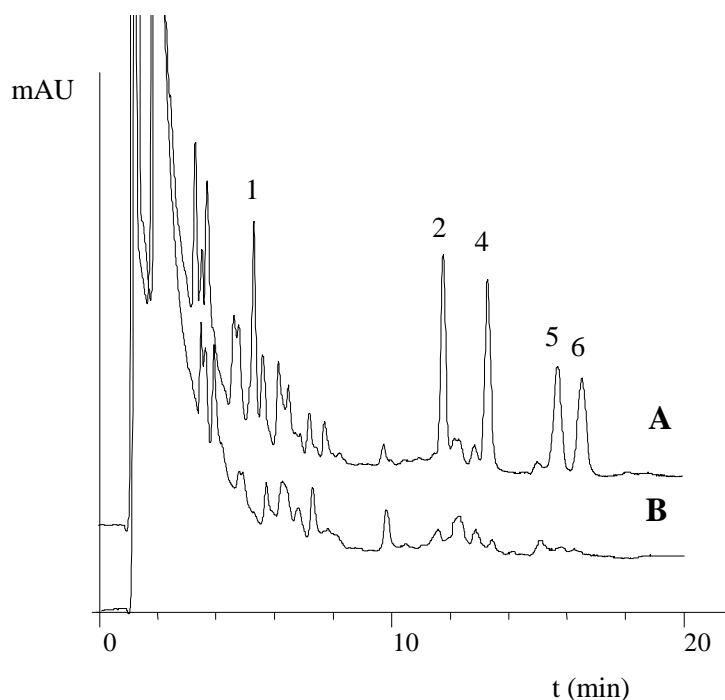


Fig. 4. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($\lambda = 236 \text{ nm}$) of (A) a 100 ml surface water sample spiked with selected herbicides at $0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and (B) the blank sample. Enrichment column: $10 \times 2 \text{ mm I.D. PRP-1}$.

3.2. Phenmedipham and Desmedipham degradation

During the development of this work, an unexpected rapid degradation of desmedipham and phenmedipham in spiked environmental water samples was observed, meanwhile the standard solutions, prepared in LC water, were stable during several days. Degradation studies were performed in order to set up the degradation rate of these compounds as well as to obtain some information about degradation products.

Five hundred ml of drinking and surface water samples were individually spiked with desmedipham and phenmedipham at $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. The remaining amount of each analyte was estimated each hour, by on-line SPE of 50 ml of water sample using the C_{18} sorbent. The results, given in **Table 6**, show that after 6 h the presence of herbicides was insignificant.

With regard to phenmedipham, two different degradation products were detected (**Fig. 5**) while for desmedipham, one new compound was clearly found (**Fig. 6**). A decomposition of desmedipham was reported by Hogendoorn et. al. [19, 20] during the storage of standard solutions prepared in mixtures of methanol-water. They detected a degradation product whose identity was investigated by means of LC-MS using a “frit-fast atom bombardment” interface in the positive chemical ionisation mode proposing a structural formula of the degradation compound by interpretation of the mass spectrum.

Assuming that the degradation processes follows first-order kinetics, experimental data were fitted to exponential decay and the half-life times for desmedipham and phenmedipham were finally estimated (**Table 6**).

It is relevant to emphasise that although phenmedipham is included in the black list of pesticides, it seems to be difficult to found its residues in environmental waters, mainly due to its rapid degradation in these kind of matrices.

Obviously, in the near future, attention must be devoted to the chemical identification of the degradation products and, afterwards, to the development of new analytical procedures including these compounds. For this purpose, multidimensional LC with DAD or MS detection could be a very useful tool.

Table 6. Amount not degraded and half-life times of desmedipham and phenmedipham in environmental water samples spiked at $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Time (h)	Drinking water		Surface water	
	Desmedipham (%)	Phenmedipham (%)	Desmedipham (%)	Phenmedipham (%)
0	100	100	100	100
1	70	65	65	72
2	40	38	34	47
3	22	21	18	30
4	10	11	9	20
5	4	4	5	10
6	2	2	2	5
24	0	0	0	0
$T_{1/2}$ (h)	1,01	1,01	1,05	1,39

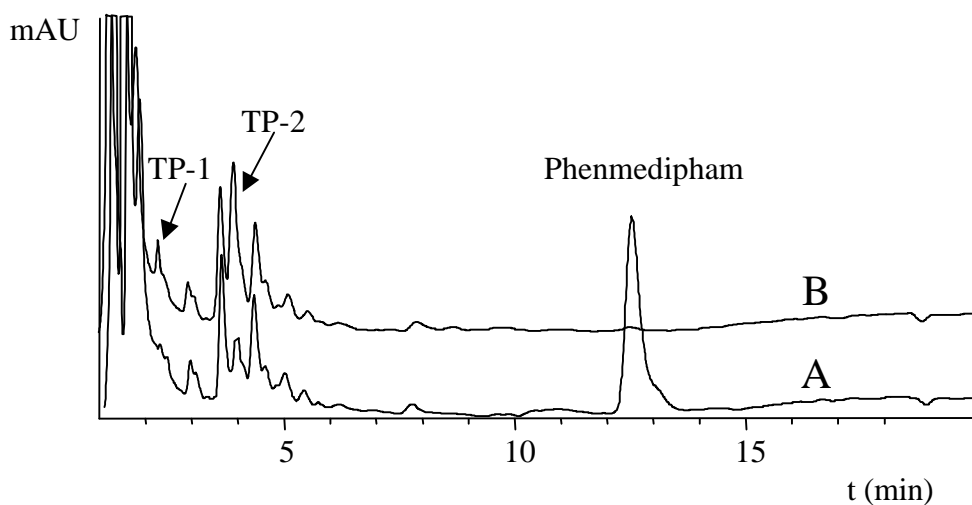


Fig. 5. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($\lambda = 236 \text{ nm}$) of (A) a 50 ml drinking water sample after spiking with phenmedipham at $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and (B) 6 h later. TP-1 and TP-2= Transformation Products

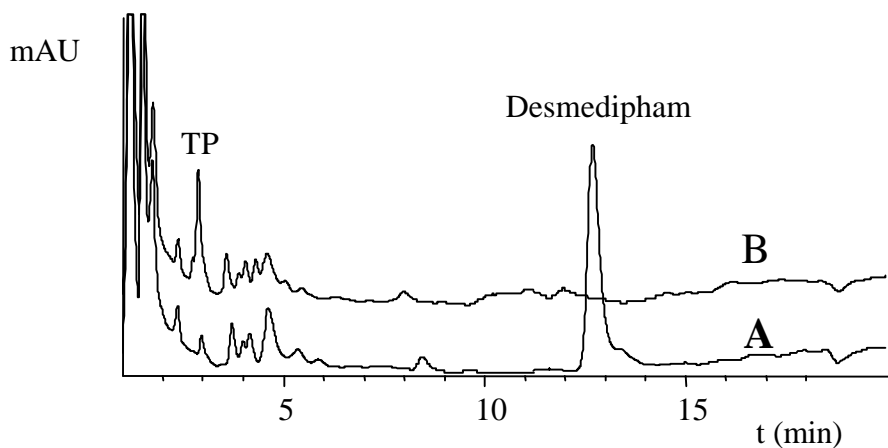


Fig. 6. On-line SPE-LC-DAD chromatograms ($\lambda = 236 \text{ nm}$) of (A) a 50 ml drinking water sample after spiking with desmedipham at $4 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ and (B) 6 h later. TP= Transformation Product.

4. Conclusions

This paper has been focused on the on-line SPE-LC-DAD determination of several phenylcarbamate herbicides mainly due to their wide use in European countries and to the lack of available analytical procedures. Two different sorbents were assayed in order to optimised the enrichment of analytes, and finally, detection limits between 0.04-0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ were reached by preconcentration of 100 ml of water sample on a PRP-1 cartridge. The robustness of the procedures is also remarkable as the same enrichment cartridges and analytical column were used during all the experiments.

Finally, degradation studies of desmedipham and phenmedipham were included showing that these compounds are rapidly degraded in environmental waters, so that the determination of their residues in water samples should be focused on their transformation products.

References

- [1] D. Barceló, J. Chromatogr. 643 (1993) 117.
- [2] M. Fielding, D. Barceló, A. Helweg, S. Galassi, L. Torstensson, P. van Zoonen, R. Wolter, G. Angeletti, in: Pesticides in Ground and Drinking Water (Water Pollution Research Report, 27), Commission of the European Communities, Brussels, 1992, pp. 1-136.
- [3] J.W. Dornseiffen, W. Verwaal, Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent 44 (1979) 867.
- [4] V. Borek, V. ehánková, L. Babi ka, J. Hubá ek, Agrochémia (Bratislava) 26 (1986) 118.
- [5] H.-J. Stan, P. Klaffenbach, Fresenius J. Anal. Chem. 339 (1991) 151.
- [6] A. D. Corcia, M. Marchetti, Anal. Chem. 63 (1991) 580.

- [7] V. Tatarkovičová, R. Machac, *Collect. Czech. Chem. Commun.* 57 (1992) 2295.
- [8] D. Volmer, K. Levsen, G. Wünsch, *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 231.
- [9] A. Junker-Buchheit, M. Witznbacher, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 67.
- [10] J. Tekel', J. Kovačičová, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 291.
- [11] EEC Drinking Water Guideline, 80/778, EEC, Brussels, 30th August, 1980.
- [12] M.-C. Hennion, P. Scribe, in: D. Barceló (Ed.), *Environmental Analysis Techniques, Applications and Quality Assurance (Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry, Vol. 13)*, Elsevier, Amsterdam, 1993, pp. 4-77.
- [13] S. Sennert, D. Volmer, K. Levsen, G. Wünsch, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 642.
- [14] R.M. Marcé, H. Prosen, C. Crespo, M. Calull, F. Borrull, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 63.
- [15] S. Guenu, M.-C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 15.
- [16] C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernandez, *Quím. Anal.*, in press.
- [17] C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernandez, *Anal. Chem.*, submitted for publication.
- [18] M.-C. Hennion, V. Pichon, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 361.
- [19] E. A. Hogendoorn, P. van Zoonen, *Meded. Fac. Landbouwwet. Rijksuniv. Gent* 55(b) (1990) 1275.
- [20] E. A. Hogendoorn, Ph. D. Thesis, Free University, Amsterdam, 1993, pp. 75-87.

Table 3. Average recoveries and R.S.D.s (%) of the analytes by the proposed on-line SPE-LC-DAD procedures in environmental water samples spiked at different levels (n=5).

Compound	<i>C₁₈</i> pre-column				<i>PRP-1</i> pre-column			
	Drinking water		Surface water		Drinking water		Surface water	
	<i>0.5 μg·l⁻¹</i>	<i>4 μg·l⁻¹</i>	<i>0.5 μg·l⁻¹</i>	<i>4 μg·l⁻¹</i>	<i>0.2 μg·l⁻¹</i>	<i>1 μg·l⁻¹</i>	<i>0.2 μg·l⁻¹</i>	<i>1 μg·l⁻¹</i>
<i>Carbetamide</i>	-	105 (3)	-	105 (4)	84 (12)	101 (3)	102 (8)	101 (3)
<i>Propham</i>	101 (2)	98 (3)	99 (3)	97 (3)	90 (5)	102 (5)	97 (6)	102 (3)
<i>Desmedipham</i>	84 (9)	86 (8)	94 (7)	98 (7)	-	-	-	-
<i>Phenmedipham</i>	87 (2)	97 (6)	98 (10)	108 (7)	87 (3)	101 (2)	93 (6)	104 (3)
<i>Chlorbufam</i>	105 (5)	99 (2)	102 (4)	97 (1)	106 (7)	101 (3)	99 (5)	105 (2)
<i>Chlorpropham</i>	103 (2)	99 (1)	108 (3)	106 (2)	105 (5)	101 (4)	99 (5)	108 (2)

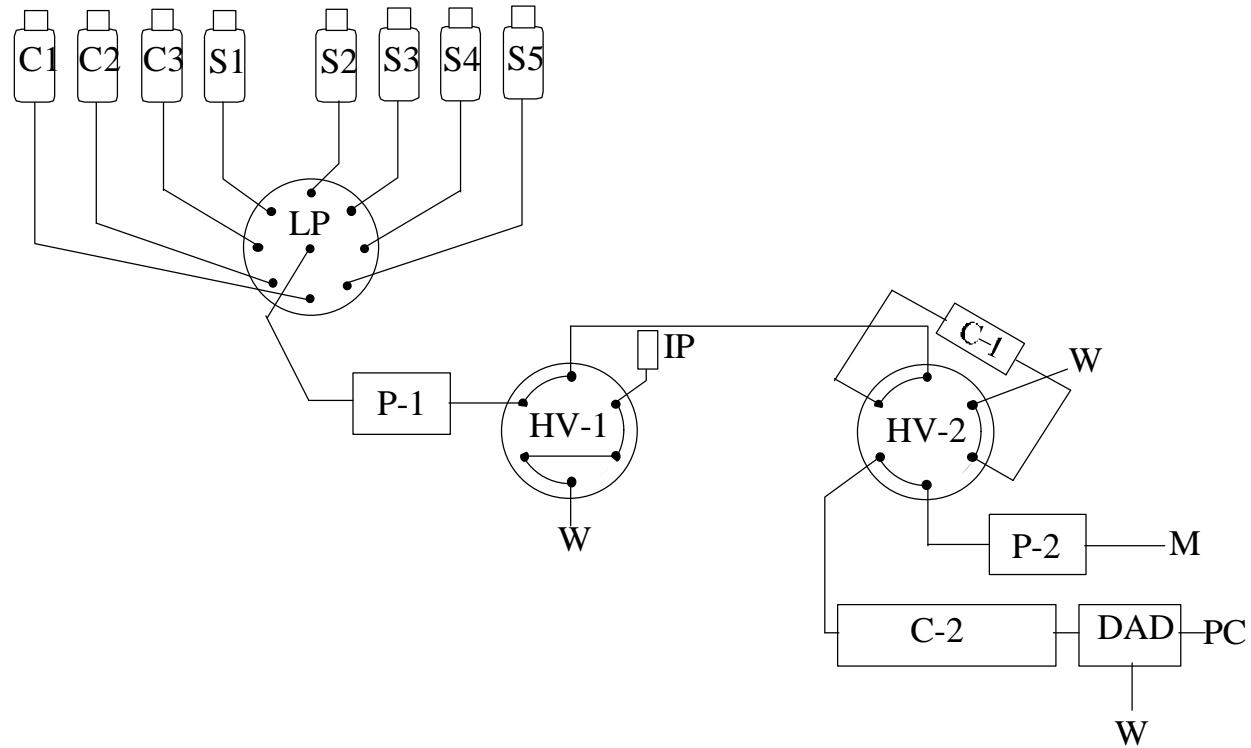


Figure 1. Schematic representation of the on-line preconcentration system. C=conditioning solvents; S=water samples; LP=low-pressure eight-port valve; HV-1 and HV-2=high pressure six-port valves; P-1=preconcentration pump; IP=injection port for direct loop injections; C-1=enrichment column; P-2=eluent pump; M=mobile phase; C-2=analytical column; DAD=diode-array detector; PC=personal computer; W=waste.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS ACOPLAMIENTOS LC-LC / SPE-LC
APLICADOS AL ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS

Uno de los objetivos principales de esta tesis doctoral ha sido la aplicación de dos técnicas analíticas de gran potencial para el análisis de herbicidas, como son el acoplamiento LC-LC y el acoplamiento SPE-LC, de manera que se pudieran establecer las ventajas y, limitaciones de cada una de ellas y, en definitiva, su potencial en este campo de trabajo.

A partir del trabajo experimental llevado a cabo para la determinación de residuos de triazinas y TP's, y expuesto en forma de artículo científico en el Capítulo anterior, se pueden comparar las posibilidades de ambas técnicas aplicadas al análisis de estos compuestos. A modo de resumen en la **Tabla 24** se presentan las principales diferencias entre los métodos de análisis desarrollados atendiendo a algunos parámetros de interés analítico, tales como rapidez, sensibilidad (límites de detección) o selectividad.

A continuación, se discuten las principales ventajas e inconvenientes de ambas modalidades de trabajo desde un punto de vista general, teniendo en cuenta que en algunos aspectos son dos formas muy próximas de enfocar la problemática que supone el PRA, pero que, por otra parte, presentan una serie de diferencias notorias que las hacen más adecuadas para unos casos u otros.

Ventajas y limitaciones del acoplamiento LC-LC

Las ventajas fundamentales del acoplamiento LC-LC ya se han comentado en los trabajos experimentales presentados y se pueden resumir como mejora de selectividad, aumento de sensibilidad -respecto a procedimientos basados en LC convencional- y posibilidad de automatización, lo que hace que esta técnica tenga un gran futuro en el PRA, a pesar de que todavía no se ha aprovechado todo su potencial en este campo de trabajo.

En cuanto a las mejoras de sensibilidad, se debe resaltar de nuevo la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra acuosa (de hasta varios ml), lo cual supone una mejora considerable de los niveles de determinación, en comparación con los métodos de LC convencionales, en que se inyectan 100-200 μ l. En el acoplamiento LC-LC se puede conseguir un pequeño enriquecimiento de los analitos en la primera columna durante la etapa de muestreo; sin embargo, seguidamente se lleva a cabo una separación analítica en esa misma columna, a diferencia de lo que ocurre en el acoplamiento SPE-LC.

Cabe también destacar que los procedimientos desarrollados son normalmente muy rápidos, de modo que en unos pocos minutos se obtienen análisis completos de los compuestos seleccionados con muy buenos parámetros de sensibilidad. Así, a modo de ejemplo se pueden obtener capacidades de análisis del orden de 50 muestras por día, en el caso de la determinación de bromacilo y diuron, o de 60 muestras por día, en el caso de la determinación de simazina, atrazina terbutilazina y terbutrina por LC-LC.

Respecto a las mejoras de selectividad, ya se ha indicado que se lleva a cabo una purificación automatizada de la muestra, de forma que la aplicación de esta técnica a matrices complejas (muestras acuosas con elevados contenidos de ácidos húmicos y fúlvicos, extractos de suelos, extractos de alimentos, etc.) parece muy indicada, ya que la mayor parte de los interferentes son eliminados en la 1ª columna. De este modo, se resuelve uno de los principales problemas que surge durante el desarrollo de un método de análisis, que es la aplicabilidad del mismo a diferentes matrices. Sin embargo, no debe olvidarse que en el caso de muestras complejas es inevitable que parte de los interferentes se transfieran junto a los analitos desde C-1 a C-2, de modo que en general la selectividad alcanzada vendrá determinada por la efectividad de la etapa de purificación en C-1 y por el volumen necesario para transferir los analitos. Esto implica que la selectividad óptima se conseguirá para volúmenes de transferencia mínimos. Se trata, por lo tanto, de un técnica muy útil para la determinación de compuestos especialmente “difíciles” o problemáticos desde el punto de vista analítico, y cuyo principal campo de aplicación se encuentra

en el análisis de uno o como mucho unos pocos analitos cuyo aislamiento, extracción o preconcentración de la muestra acuosa puedan resultar problemáticos.

Aunque también se ha descrito la aplicación del LC-LC en métodos multiresiduales, en estos casos suelen requerirse transferencias muy elevadas debido a la existencia de analitos con diferentes retenciones en C-1, lo cual repercute en una disminución de la selectividad inherente a la técnica. Sin embargo, tampoco debe olvidarse que muchas veces los interferentes presentes en muestras medioambientales son compuestos polares, poco retenidos en fase inversa, y que, por tanto, pueden eliminarse antes de llevar a cabo la transferencia desde C-1 hasta C-2. A modo de ejemplo, destacar la determinación de atrazina junto a sus productos de transformación, para la cual se llevaron a cabo transferencias grandes con unos 4 ml de fase móvil M-2 debido a la diferente polaridad entre el producto de transformación más polar (DIA) y el analito más retenido (atrazina). Ello suponía que tras una breve purificación (debido a la alta polaridad del DIA) en C-1 con 2.6 ml de fase móvil M-1, la mayor parte de los componentes de la muestra eran introducidos conjuntamente con el resto de analitos en C-2. Este problema se observará siempre que se quieran analizar simultáneamente compuestos de muy diferentes polaridades usando la técnica LC-LC pues será necesario abrir mucho la ventana de transferencia, con lo que se perderá parte de la selectividad y, en parte, la sensibilidad propias de esta técnica. Comparando este trabajo con el descrito para la determinación de los 4 herbicidas triazínicos, en el que sí se pudo llevar a cabo una transferencia ajustada de los 4 analitos debido a sus polaridades más o menos semejantes, con solo 700 µl de M-2, se observa las mejoras que en este último caso se obtuvieron en cuanto a sensibilidad y selectividad.

En cuanto a las limitaciones, como ya se ha indicado, la técnica LC-LC resulta más adecuada para la determinación de uno o unos pocos analitos (SRMs), a ser posible con coeficientes de retención en C-1 semejantes, de modo que se puedan llevar a cabo transferencias selectivas de todos los analitos. Por lo tanto el desarrollo de MRMs mediante LC-LC que, a menudo, implica la determinación de analitos con diferentes parámetros de detección y retención, parece menos atractivo.

Por otro lado, cuando se trabaja con detección UV a menudo no es posible alcanzar los bajos límites de detección deseados mediante el procesamiento de unos pocos ml de muestra, por ejemplo en el caso de aguas potables de acuerdo a la restrictiva legislación comunitaria. Por ello, a veces se requieren etapas previas de preconcentración, que alargan los métodos de análisis, aumentan las posibilidades de error y dificultan la automatización global del procedimiento. Esto ocurría en la determinación de residuos de herbicidas triazínicos y productos de transformación, según la metodología descrita en el capítulo 2, para los cuales fue necesaria una preconcentración de 100 ml de muestra acuosa en cartuchos desechables de SPE, previamente a la introducción de 2 ml del extracto en el sistema de LC-LC, si se querían determinar niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

Sin embargo no hay que olvidar que la posibilidad de llevar a cabo etapas de preconcentración “*off-line*” puede llegar a ser ventajoso en determinadas ocasiones, como en el caso de pocas muestras que se toman durante largos periodos de tiempo que se pueden analizar en lotes, aprovechando que los extractos orgánicos obtenidos a partir de las etapas de preconcentración se pueden almacenar durante bastante tiempo.

También cabe destacar la necesidad de controlar y comprobar frecuentemente las condiciones de acoplamiento (volumen de purificación y de transferencia), de modo que se pueda asegurar que los analitos son transferidos íntegramente desde C-1 hasta C-2. Este hecho es de especial interés en el caso de analitos cuya retención en la fase seleccionada venga modificada por la matriz de la muestra, lo cual, aunque afortunadamente no es usual, fue determinante para la determinación de bromacilo en diferentes muestras de agua. Este hecho supuso una seria limitación en cuanto a la aplicabilidad del procedimiento propuesto, que se pudo solventar más tarde con la tamponación de la muestra, tal y como se ha descrito en el capítulo 2 de este trabajo.

Por otro lado, aunque el elevado grado de automatización alcanzado es favorable y en principio deseable en todo procedimiento de PRA, no hay que olvidar que, en contrapartida, ello obliga a una mayor sofisticación en equipos

instrumentales usados, así como a una mayor formación y experiencia en el acoplamiento LC-LC, en comparación con los métodos de LC convencionales.

Finalmente, otro aspecto a tener en cuenta es que se está trabajando con acoplamiento de dos columnas de alta resolución, de modo que tanto C-1 como C-2 presentan pequeños tamaños de partícula. Por ello, pueden tener lugar aumentos importantes de presión en C-1 después de varios días de uso continuado, al ser la primera columna la que está sufriendo la entrada de elevados volúmenes de muestra, de modo que llega un momento que se hace imposible trabajar en esas condiciones, y la columna debe de ser sustituida.

Ventajas y limitaciones del acoplamiento SPE-LC

Como ya se ha comentado en el Capítulo 3 de esta Memoria, esta modalidad de acoplamiento se ha desarrollado ampliamente dentro del campo del PRA, probablemente, la causa se encuentre en las importantes ventajas que presenta esta técnica en cuanto a sensibilidad y automatización de los métodos de análisis.

La gran sensibilidad inherente a esta técnica, debido a la posibilidad de preconcentrar volúmenes de muestra del orden de 100 o más mililitros, en comparación con los volúmenes utilizados en LC-LC (hasta varios ml), hace que en general resulte muy adecuada, sobre todo en el procesamiento de muestras acuosas, que se pueden preconcentrar directamente sobre C-1 sin necesidad de manipulaciones previas.

Respecto a la automatización, cabe resaltar que desde hace algunos años existen equipos comerciales como el PROSPEKT que permiten trabajar mediante SPE-LC de manera totalmente desatendida, contribuyendo también al auge que ha experimentado recientemente.

Por otro lado, debido a las características de esta modalidad de acoplamiento, en cuanto a que básicamente se aplica una etapa de SPE previa a una determinación convencional por LC, y atendiendo al hecho de que la SPE es una técnica

actualmente bien conocida y ampliamente utilizada, parece que en principio resulte más fácil de entender así como de aplicar. Del mismo modo, la metodología existente para el PRA en la cual se hace uso de SPE “*off-line*” puede, en principio, aplicarse también al acoplamiento SPE-LC “*on-line*”, de modo que no resulta complicado desarrollar MRMs, ya que analitos con diferentes propiedades pueden ser preconcentrados de manera simultánea en C-1 y posteriormente separados en una columna de alta resolución.

En contrapartida a las ventajas anteriormente citadas, se encuentra su principal limitación, que es la poca selectividad de los procedimientos desarrollados, fundamentalmente cuando se usa detección ultravioleta, que actualmente todavía es uno de los sistemas de detección más utilizados en LC. En este sentido, hay que destacar, que mediante SPE-LC los analitos se preconcentran junto a los interferentes retenidos, de manera que todos los compuestos (analitos e interferentes) son transferidos hasta la segunda columna. Así, cuando se trabaja en fase inversa la determinación de compuestos muy polares y por tanto poco retenidos en C-1 y en C-2 plantea problemas, debido fundamentalmente a que su volumen de ruptura es muy bajo y a que la cantidad de analito que se transfiere (normalmente menos del 100 %) podría coeluir con el frente de elución de los interferentes poco retenidos y tan abundantes en matrices medioambientales. A modo de ejemplo, se puede destacar la ruptura temprana del DIA cuando se utilizan fases adsorbentes convencionales C-18 y PRP-1. En este caso, las recuperaciones fueron del orden del 30 %, aunque afortunadamente debido a la buena reproducibilidad del método y a su alta sensibilidad permitieron su determinación en las muestras estudiadas.

De este modo, el mayor carácter multiresidual de los métodos SPE-LC desarrollados, conlleva una disminución de la selectividad de los mismos, por lo que la aplicación a muestras con elevadas cantidades de interferentes, tales como muestras acuosas con altos contenidos de ácidos húmicos y fúlvicos, extractos de suelos, extractos de alimentos, etc. resulta dificultosa, a no ser que se utilicen sistemas de retención en C-1 o de detección más selectivos. Como ya se ha comentado a lo largo de esta Memoria, la solución a la escasa selectividad de los

métodos desarrollados podría encontrarse en la utilización de precolumnas específicas para unos pocos compuestos, de manera que solo éstos fueran retenidos en C-1. Sin embargo, la solución más adecuada a medio plazo parece estar relacionada con el importante auge que en la actualidad están teniendo los espectrómetros de masas acoplados a los cromatógrafos líquidos, debido a la importante selectividad y sensibilidad inherente a este sistema de detección, además de la información estructural que pueden llegar a aportar sobre la identidad del analito. Desafortunadamente, estos detectores todavía no están disponibles en la mayoría de laboratorios dedicados al PRA, debido fundamentalmente a su elevado coste.

Otro aspecto a considerar es que las capacidades de análisis suelen ser, en general, inferiores a las de los métodos basados en LC-LC, ya que normalmente se procesan grandes volúmenes de muestra (50-200 ml) que son introducidos en la columna enriquecedora, la cual suele presentar grandes tamaños de partícula (10-40 μm) para evitar así la obturación de la misma. Respecto a esta primera columna, cabe comentar que frecuentemente es desechable y tras una o unas pocas preconcentraciones dejan de utilizarse. Ello puede ser debido, a la extrapolación de la filosofía de trabajo utilizada en la SPE “*off-line*” en cartuchos desechables, de manera que incluso alguno de los equipos automáticos, como el PROSPEKT, trabajan de acuerdo a esta metodología. A pesar de ello, en todos los trabajos experimentales que se han presentado en esta Memoria se han utilizado precolumnas comerciales, que han mostrado mayor durabilidad y reproducibilidad que las preparadas por nosotros manualmente.

Respecto a la aplicabilidad del acoplamiento LC-LC y del acoplamiento SPE-LC al PRA en muestras medioambientales, hay que destacar que ambas técnicas resultan complementarias, en función de la problemática a resolver. Así, cuando se estudia una contaminación puntual, a menudo en matrices diferentes (por ejemplo agua, suelo y productos vegetales), parece interesante hacer uso de un procedimiento basado en LC-LC. De este modo, se pueden conseguir buenas purificaciones de la muestra, sin apenas etapas manuales, aún cuando a veces se requieran experiencias

previas de preconcentración “*off-line*” para poder alcanzar los niveles exigidos por la legislación.

En relación con la aplicabilidad del acoplamiento SPE-LC, resulta muy útil con fines de “*screening*” cuando se quiere abarcar un amplio número de plaguicidas, fundamentalmente en muestras acuosas. Hay que destacar su enorme potencial en este campo de trabajo, especialmente si se acopla con los modernos detectores espectrométricos de masas, que pueden solventar la mayor parte de los problemas de selectividad inherentes a la técnica y que además mejoran notablemente la sensibilidad, ya que existe constancia de que preconcentrando unos pocos ml de muestra se pueden obtener límites de detección del orden de ppt para algunos analitos.

Tabla 24. Comparación entre LC-LC y SPE-LC on-line en la determinación de residuos de triazinas y TP's en muestras de agua.

<i>Parámetro analítico</i>	<i>LC-LC</i>	<i>SPE-LC on-line</i>
<i>Compuestos</i>	<i>Método I: simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrina</i> <i>Método II: DIA, HA, DEA, atrazina</i>	<i>DIA, HA, DEA, simazina, cianazina, atrazina, terbumeton, terbutilazina y terbutrina</i>
<i>Volumen de muestra requerido</i>	<i>2 ml</i>	<i>100 ml</i>
<i>LOD</i>	<i>0.1-0.5 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)</i>	<i>0.05-0.1 ($\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$)</i>
<i>Sensibilidad</i>	<i>Buena para los compuestos originales estudiados</i> <i>Mejor después de SPE off-line, especialmente en el caso de los TP's</i>	<i>Muy buena</i>
<i>Selectividad</i>	<i>Muy buena (purificación automatizada)</i>	<i>En función de la matriz de la muestra.</i> <i>Puede producir preconcentración de las interferencias</i>
<i>Capacidad de análisis (rapidez)</i>	<i>60 muestras/día (compuestos originales)</i> <i>30 muestras/día (TP's)</i>	<i>Alrededor de 10 muestras/día</i>

CONCLUSIONES

- A lo largo de esta Memoria se ha mostrado el enorme potencial de la cromatografía líquida con columnas acopladas para el análisis de residuos de herbicidas polares en muestras acuosas. En cuanto a las características analíticas de los métodos desarrollados, cabe destacar su rapidez, selectividad y sensibilidad, además de la simplificación en el tratamiento de la muestra debido a la posibilidad de automatización en todas las etapas del análisis, exceptuando la toma de muestra.
- Se han descrito las características más relevantes del acoplamiento LC-LC en cuanto a las principales etapas del análisis: (a) inyección de la muestra, (b) purificación, (c) transferencia de la fracción de los analitos y (d) análisis y lavado, así como a la optimización de las condiciones cromatográficas: (a) selección de la primera columna C-1, (b) selección de la fase móvil M-1 y (c) optimización de las condiciones de acoplamiento (volumen de purificación y volumen de transferencia).
- Se ha desarrollado un procedimiento analítico muy rápido, sensible y selectivo para la determinación de residuos de dos herbicidas ampliamente utilizados en la Comunidad Valenciana, bromacilo y diuron, en muestras de agua mediante LC-LC y detección UV. La inyección directa de 2 ml de muestra permite obtener límites de detección del orden de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, para ambos compuestos. El mayor inconveniente del procedimiento desarrollado fue que las condiciones de acoplamiento variaban en función de la matriz de la muestra acuosa estudiada, efecto que se solventó posteriormente tamponando la muestra con $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.1 M (pH=7).
- Se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de residuos de 4 herbicidas triazínicos (simazina, atrazina, terbutilazina y terbutrina) mediante LC-LC con detección UV. El procedimiento resultó muy rápido (con posibilidad de analizar hasta 60 muestras/día), muy selectivo (por la transferencia ajustada de los analitos utilizando únicamente 700 μl de fase móvil M-2) y bastante sensible, obteniéndose límites de detección entre $0.1\text{-}0.2 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ mediante inyección directa de 2 ml de muestra acuosa. El procedimiento se aplicó con éxito a la determinación de estos herbicidas en muestras de aguas superficiales de la Comunidad Valenciana en

las que se detectaron frecuentemente los herbicidas simazina, terbutilazina y terbutrina. Finalmente, este procedimiento se optimizó para su aplicación a muestras de aguas potables, en las que la restrictiva legislación comunitaria en materia de plaguicidas establece un máximo permitido de $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Para ello, se introdujo una simple etapa de preconcentración “*off-line*” de 100 ml de muestra por SPE, lo que permitió disminuir los límites de detección a valores comprendidos entre $0.02\text{-}0.03 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$.

- Atendiendo a la preocupación creciente en cuanto a presencia de productos de transformación de los plaguicidas en aguas, se ha desarrollado un procedimiento para la determinación multiresidual de atrazina y sus principales productos de transformación detectados en aguas: DIA, HA y DEA. El procedimiento resultó bastante rápido (30 muestras/día) y sensible, con límites de detección directos entre $0.4\text{-}1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. La selectividad vino determinada por la purificación de los interferentes poco retenidos en C-1 durante los primeros 2.6 min, ya que el volumen de transferencia de la fracción de analitos desde C-1 hasta C-2 resultó bastante elevado (4.2 ml) debido a las diferencias de retención en C-1 de los diferentes compuestos. Al igual que en el procedimiento anterior, se consiguieron disminuir los límites de detección, hasta niveles inferiores a $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, mediante la incorporación de una etapa de SPE “*off-line*” utilizando 100 ml de muestra acuosa.
- Se han descrito las principales características del acoplamiento SPE-LC haciendo hincapié en las etapas del análisis: (a) acondicionamiento de la precolumna, (b) carga de la muestra, (c) transferencia desde C-1 hasta C-2 y (d) separación analítica y detección, así como en los principales parámetros de preconcentración: (a) tamaño de la precolumna, (b) selección de la fase adsorbente y (c) estimación de volúmenes de ruptura.
- Se ha modificado el equipo ASPEC XL, originalmente diseñado para llevar a cabo SPE “*off-line*”, para poder llevar a cabo la preconcentración de los analitos en modo “*on-line*”. Para ello se ha incorporado una válvula de baja presión de ocho

vías y una bomba de LC para llevar a cabo la preconcentración, así mismo se han desarrollado programas de “*software*” adecuados para controlar todos los módulos. Haciendo uso del mencionado equipo se ha desarrollado un procedimiento para la determinación de carbaril y su producto de transformación, 1-naftol, en aguas mediante SPE “*on-line*” de 10 ml de muestra y posterior análisis por LC-DAD-FD. Aprovechando la elevada selectividad y sensibilidad de la detección fluorescente, se ha podido determinar carbaril y 1-naftol en muestras de agua a niveles de 0.05 y 0.25 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, respectivamente. El pequeño volumen de muestra preconcentrado y la posibilidad de solapar la separación de los analitos en C-2 con el procesamiento de la siguiente muestra en C-1 permitieron capacidades de análisis de hasta 30 muestras/día. Se realizó, así mismo, un estudio adicional de degradación de carbaril en muestras de agua potable y superficial fortificadas a 2 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, comprobándose la formación de 1-naftol, que fue fácilmente identificado mediante el DAD.

- Se ha llevado a cabo la determinación multiresidual de bromacilo junto con cinco herbicidas ureicos mediante SPE-LC-DAD de manera completamente automatizada. Preconcentrando 50 ml de muestra acuosa en una precolumna C₁₈ (30 × 4 mm d.i.) se pudieron determinar todos los analitos a niveles inferiores a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$, siendo posible también en este caso el solapamiento de la etapa de separación cromatográfica en C-2 con la de preconcentración en C-1. El procedimiento desarrollado se aplica actualmente para el control de herbicidas en muestras de agua superficial de la Comunidad Valenciana, habiéndose detectado bromacilo y diuron en varias de las muestras analizadas. La utilización de precolumnas poliméricas (PRP-1, 10 × 2 mm d.i.) permite aumentar el volumen de muestra hasta 100 ml, debido a la mayor retención de los analitos, sin que se produzca ensanchamiento de bandas ni variaciones en los tiempos de retención de los analitos más polares.
- Se han determinado varios herbicidas triazínicos (simazina, cianazina, atrazina, terbumeton, terbutilazina y terbutrina) junto a algunos productos de transformación (DIA, HA y DEA) mediante SPE-LC-DAD. La preconcentración de 100 ml de

muestra acuosa utilizando una precolumna polimérica (PRP-1, 10 × 2 mm d.i.) permitió determinar todos los analitos a bajos niveles de concentración, proponiéndose límites de detección entre 0.05-0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Cabe destacar, que el analito más polar (DIA) presentaba considerable ruptura en las condiciones de trabajo seleccionadas, sin embargo, los resultados de recuperación obtenidos fueron lo suficientemente reproducibles para permitir la correcta determinación de este analito junto al resto de compuestos a los bajos niveles de concentración ensayados. Este procedimiento se ha aplicado a la determinación de dichos herbicidas en muestras de agua superficial, habiéndose llevado a cabo un estudio (desde el 27/05/97 hasta el 03/09/97) sobre la presencia de los mismos en un enclave especialmente conflictivo, en cuanto a presencia de plaguicidas, de la provincia de Castellón. Finalmente, el procedimiento desarrollado se ha comparado con los procedimientos anteriormente propuestos mediante LC-LC para el análisis de algunos herbicidas de esta familia y productos de transformación, concluyéndose que ambas técnicas resultan muy útiles y que la elección de una u otra viene determinada por el problema a resolver (analitos y/o matrices a analizar).

- Finalmente, se ha desarrollado un procedimiento basado en SPE-LC-DAD para la determinación de seis herbicidas fenilcarbamatos, compuestos para los que existe poca información bibliográfica en cuanto a su determinación analítica. Se estudiaron dos precolumnas diferentes -una C_{18} de (5.8 × 4.6 mm d.i.) y una polimérica (10 × 2 mm d.i.)- seleccionándose la precolumna polimérica, ya que permitió determinar todos los analitos en aguas potables y superficiales mediante preconcentración de 100 ml de muestra, alcanzándose límites de detección inferiores a 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$. Se ha comprobado la rápida degradación del desmedifam y fenmedifam en las aguas estudiadas por lo que resulta necesario dirigir los esfuerzos analíticos hacia la determinación de sus productos de transformación, utilizando técnicas tales como LC-MS.

- Se ha efectuado un estudio comparativo entre los dos acoplamientos descritos en esta Memoria, atendiendo a criterios tales como sensibilidad, selectividad y rapidez de los procedimientos analíticos desarrollados, destacándose en cada caso las ventajas, limitaciones y rango de aplicabilidad de ambas modalidades de trabajo.
 - La principal ventaja del acoplamiento LC-LC radica en su rapidez y elevada selectividad, así como en la posibilidad de analizar directamente muestras de agua, sin necesidad de efectuar ningún pre-tratamiento de las mismas con límites de detección razonablemente bajos. Esta técnica resulta muy adecuada para el análisis de herbicidas polares así como de sus productos de transformación, y su principal campo de aplicación se encuentra en el desarrollo de métodos específicos para uno o unos pocos analitos seleccionados, ya que en el caso de métodos multiresiduales se deberían utilizar volúmenes de transferencia (desde C-1 a C-2) elevados, con lo que se perderían las ventajas de selectividad inherentes a la propia técnica.
 - El acoplamiento “*on-line*” SPE-LC resulta más adecuado para el desarrollo de métodos multiresiduales y su principal ventaja radica en la mayor sensibilidad al poder preconcentrar volúmenes de muestra de hasta varios cientos de mililitros. Sin embargo, se produce una pérdida de selectividad, en comparación con el acoplamiento LC-LC, ya que, frecuentemente también se produce una preconcentración de los interferentes de la muestra.

En resumen, ambas modalidades de acoplamiento son muy útiles para el análisis de residuos de herbicidas y presentan ventajas evidentes en relación con los métodos basados en LC convencional.

Programas en Turbo Pascal

A continuación se presentan varios programas escritos en lenguaje de programación Turbo Pascal que permiten llevar a cabo la preconcentración y posterior análisis de diferentes analitos mediante SPE-LC, utilizando el ASPEC XL y el programa de software 719 v2.01 suministrado por Gilson. Cabe destacar, que aunque no se recogen todos los programas que se utilizaron durante el desarrollo de las experiencias descritas en esta Memoria, si se recogen los que se han considerado más interesantes.

1. Programa sencillo que permite preconcentrar un volumen determinado de una muestra situada en cualquiera de los canales de la válvula de baja presión de ocho vías, a excepción de los utilizados para acondicionar. Tras un tiempo (t) de acoplamiento de las dos columnas el sistema vuelve a su posición inicial.

PROGRAM Método para preconcentrar una muestra seleccionando volumen y canal;

{ \$X+ }
USES Samplib, Sampglob, Crt;

VAR vmuestra: longint;
canal, l : string;
tubo: integer;
t: real;
{ Main Program }

PROCEDURE acondicionar;

Begin
ClrEol;
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
SwitchValve(1, LEFT, LOAD);
BufCmd(20, 'pa');
Writeln('purga del canal (a) con metanol ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('acondicionamiento del cartucho con metanol ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000, 4, 4);

```

BufCmd(20, 'pb');
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
Writeln('purga del canal (b) con acetonitrilo ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('acondicionamiento del cartucho con acetonitrilo ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000, 4, 4);

```

```

BufCmd(20, 'pc');
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
Writeln('purga del canal (c) con H2O ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT,5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('acondicionamiento del cartucho con agua ');
DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000, 4, 4);
End;

```

BEGIN

```

DefineSampler(1, 10, 183, 40, M233);
SetValveDefault(1, RIGHT, INJECT);
SetValveDefault(1, LEFT, INJECT);
DefineHPPump(1, 1, 25, 300);
Define402Dilutor(2, 0, 10000, 1000, 10000);

```

```

CheckConfiguration;
InitializeSystem;
SetSensitivity(1, 3);

```

```
{*****Start Method*****}
```

```

ClrEol;
REPEAT
Write('Volumen de muestra a preconcentrar ( ml) ');
LinputN(vmuestra);
Writeln;
UNTIL (vmuestra>=0) and (vmuestra<=1000);

```

REPEAT

```
ClrEol;
```

```
Write('Nº de canal (1=d, 2=e, 3=f, 4=g, 5=h)');
InputN(tubo);
Writeln;
```

```
UNTIL (tubo>=1) and (tubo<=5);
```

```
IF tubo=1 THEN
BEGIN
canal:='d';
END;
```

```
IF tubo=2 THEN
BEGIN
canal:='e';
END;
```

```
IF tubo=3 THEN
BEGIN
canal:='f';
END;
```

```
IF tubo=4 THEN
BEGIN
canal:='g';
END;
```

```
IF tubo=5 THEN
BEGIN
canal:='h';
END;
```

```
l:=canal;
writeln('el canal seleccionado es', l);
```

```
ClrEol;
Write('Cuanto tiempo espero ? ');
FInputN(t);
Writeln;
```

```
{LLAMADA AL PROCEDIMIENTO }
```

acondicionar;

```
canal:='p'+l;
BufCmd(20,canal);
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
WriteLn('purga del canal de la muestra ',l);
DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
WriteLn('preconcentracion de ',vmuestra,' ml de la muestra ', l);
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, vmuestra*1000, 5, 5);
SwitchValve(1, LEFT, INJECT);
SetElectricalContact(1, 1, PULSE);
SetElectricalContact(1, 3, PULSE);
WaitTime(t);
SwitchValve(1, LEFT, LOAD);
AbortApplication;
End.
```

Observaciones:

Este fue uno de los primeros programas que se utilizaron, a la vista del mismo se observa que permite la preconcentración automatizada de tan solo una muestra, de modo que tendría que ejecutarse para cada una de las muestras.

Los siguientes programas se elaboraron con más detalle, de modo que se pudiera llevar a cabo la preconcentración de varias muestras de manera automatizada. Resultaba interesante poder seleccionar el número de veces que se necesitaba preconcentrar una misma muestra situada en un canal, de modo que se pudiera analizar varias réplicas de una misma muestra. Para ello se desarrolló el programa 2, que permitió preconcentrar hasta 6 muestras distintas pudiéndose realizar hasta 10 réplicas de cada una de ellas.

Por otro lado, con el fin de poder modificar el volumen de muestra a preconcentrar se desarrolló el programa 3.

2. Programa para preconcentrar hasta 6 muestras diferentes, un determinado número de veces (hasta 10), seleccionando un único volumen de muestra.

PROGRAM preconcent;

```
{ $X+ }
USES Samplib, Sampglob, Crt;
```

```
VAR vmuestra: longint;
    nveces, t: integer;
    q, p, nmuestra: integer;
    canal: string;
    l: char;
```

```
{ Main Program }
```

PROCEDURE acondicionar;

```
Begin
ClrEol;
BufCmd(20, 'pa');
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
SwitchValve(1, LEFT, LOAD);
Writeln('purga del canal (a) con acetonitrilo ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('acondicionamiento de la precolumna con acetonitrilo');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000, 4, 4);
BufCmd(20, 'pb');
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
Writeln('purga del canal (b) con agua ');
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT,5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('acondicionamiento de la precolumna con agua ');
DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000, 4, 4);
End;
```

```
BEGIN
```

```
DefineSampler(1, 10, 183, 40, M233);
SetValveDefault(1, RIGHT, INJECT);
SetValveDefault(1, LEFT, INJECT);
DefineHPPump(1, 1, 25, 300);
Define402Dilutor(2, 0, 10000, 1000, 10000);
```

```
CheckConfiguration;
InitializeSystem;
SetSensitivity(1, 3);

{ *****Start Method***** }
ClrEol;
REPEAT
WriteLn('Nº de veces que quieres preconcentrar cada muestra');
InputN(nveces);
WriteLn;
UNTIL (nveces>=1) and (nveces<=10);

ClrEol;
REPEAT
WriteLn('Nº de muestras a procesar');
InputN(nmuestra);
WriteLn;
UNTIL (nmuestra>=1) and (nmuestra<=6);

BEGIN
ClrEol;
WriteLn('Volumen de la muestra en ml ');
LinputN(vmuestra);
WriteLn;
END;

writeLn ('Coloca la primera muestra en el canal c');

q:=1;
p:=1;
l:='c';

ClrEol;
Write('Cuanto tiempo transfiero? ');
InputN(t);
WriteLn;
```

REPEAT

REPEAT

acondicionar;

canal:='p'+1;

BufCmd(20, canal);

SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);

Writeln(*'purga del canal de la muestra ',l*);

DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000,5,5);

SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);

Writeln(*'preconcentracion de ',vmuestra,' ml de muestra del canal ',l*);

DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 1000*vmuestra, 5, 5);

SwitchValve(1, LEFT, INJECT);

SetElectricalContact(1, 1, PULSE);

SetElectricalContact(1, 3, PULSE);

WaitTime(t);

SwitchValve(1, LEFT, LOAD);

q:=q+1;

UNTIL (q>nveces);

q:=1;

l:=succ(l);

p:=p+1;

UNTIL (p>nmuestra);

AbortApplication;

End.

3. Programa que permite preconcentrar diferentes volúmenes de muestras situadas en diferentes canales.

PROGRAM ruptura

{ \$X+ }

USES Samplib, Sampglob, Crt;

VAR vmuestra: array [1..5] of longint;

q, nmuestra, i, t: integer;

canal:string;

l:char;

{ Main Program }

PROCEDURE acondicionar;

Begin

ClrEol;

BufCmd(20, 'pa');

SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);

SwitchValve(1, LEFT, LOAD);

Writeln('purga del canal (a) con acetonitrilo ');

DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000,5,5);

SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);

Writeln('acondicionamiento de la precolumna con acetonitrilo ');

DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000, 4,4);

BufCmd(20, 'pb');

SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);

Writeln('purga del canal (b) con agua');

DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 5000, 5, 5);

SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);

Writeln('acondicionamiento de la precolumna con agua ');

DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000, 4, 4);

End;

BEGIN

DefineSampler(1, 10, 183, 40, M233);

SetValveDefault(1, RIGHT, INJECT);

SetValveDefault(1, LEFT, LOAD);

DefineHPPump(1, 1, 25, 300);

Define402Dilutor(2, 0, 10000, 1000, 10000);

```

CheckConfiguration;
InitializeSystem;
SetSensitivity(1, 3);

{*****Start Method*****}
ClrEol;
REPEAT
Write('N° de muestras que quieres preconcentrar ');
InputN(nmuestra);
Writeln;
UNTIL (nmuestra>=1) and (nmuestra<=6);

FOR i := 1 To nmuestra DO
BEGIN
ClrEol;
Write('volumen de la muestra ',i,' (ml)');
LinputN(vmuestra[i]);
Writeln;
END;

ClrEol;
Write('Cuanto tiempo espero ');
InputN(t);
Writeln;

writeln ('Coloca la primera muestra en el canal c');

q:=1;
l:='c';

REPEAT

acondicionar;

canal:='p'+l;
BufCmd(20, canal);
SwitchValve(1, RIGHT, INJECT);
Writeln('purga canal muestra ',l);
DispenseToInjectionPort(1,1, RIGHT, 5000,5,5);
SwitchValve(1, RIGHT, LOAD);
Writeln('preconcentracion de ',vmuestra[q],' ml de muestra ',l);
DispenseToInjectionPort(1, 1, RIGHT, 1000*vmuestra[q], 5, 5);

```

```
SwitchValve(1, LEFT, INJECT);  
SetElectricalContact(1, 1, PULSE);  
SetElectricalContact(1, 3, PULSE);  
WaitTime(t);  
SwitchValve(1, LEFT, LOAD);  
l:=succ(l);  
q:=q+1;
```

```
UNTIL (q>nmuestra);
```

```
AbortApplication;  
End.
```


AED	<i>Atomic Emission Detector</i> Detector de emisión atómica
AMPA	<i>Aminomethylphosphonic acid</i> Ácido aminometilfosfónico
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i> Ionización química a presión atmosférica
API	<i>Atmospheric Pressure Ionization</i> Ionización a presión atmosférica
ASPEC XL	<i>Automatic Sample Processor system using Enrichment Columns</i> Sistema automático para procesar muestras mediante columnas concentradoras
CV	<i>Coefficient of Variation</i> Coeficiente de variación
DAD	<i>Diode Array Detector</i> Detector de barrido de diodos
DEA	<i>Deethylatrazine</i> Desetilatrazina
DIA	<i>Deisopropylatrazine</i> Desisopropilatrazina
EACD	<i>Empore Activated Carbon Disk</i> Discos Empore de carbón activado
ECD	<i>Electron capture detector</i> Detector de captura de electrones
EIA	<i>Enzime Immuno-Assay</i> Inmunoensayo
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> Agencia de protección medioambiental
ESP	<i>Electrospray</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardment</i> Bombardeo con átomos rápidos
FCSE	<i>Fully Concurrent Solvent Evaporation</i> Evaporación total de disolvente
FD	<i>Fluorescence Detector</i> Detector de fluorescencia

FID	<i>Flame Ionisation Detector</i> Detector de ionización de llama
FMOC	<i>9-Fluorenylmethyl-chloroformiate</i> 9-Fluorenilmetil-cloroformiato
FPD	<i>Flame Photometric Detector</i> Detector fotométrico de llama
GC	<i>Gas Chromatography</i> Cromatografía de gases
GCB	<i>Graphitized Carbon Black</i> Carbón negro grafitizado
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> Cromatografía de permeación en gel
GUS	<i>Groundwater Ubiquity Score</i> Índice de ubicuidad en agua subterránea
HA	<i>Hydroxyatrazine</i> Hidroxiatrazina
HFBA	<i>Heptafluorobutyric acid</i> Ácido heptafluorobutírico
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida de alta resolución
ISP	<i>Ionspray</i>
ISRP	<i>Internal Surface Reversed Phase</i> Superficie interna en fase inversa
LC	<i>Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida
LC ₅₀	<i>Lethal Concentration for 50 % of test organism</i> Concentración letal para el 50 % de la población
LC-GC	<i>Liquid Chromatography coupled to Gas Chromatography</i> Cromatografía líquida acoplada a cromatografía de gases
LC-LC	<i>Liquid Chromatography coupled to Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida acoplada a cromatografía líquida
LD ₅₀	<i>Lethal Dosis for 50 % of test organism</i> Dosis letal para el 50 % de la población
LLE	<i>Liquid-Liquid extraction</i> Extracción líquido-líquido

LOD	<i>Limit of Detection</i> Límite de detección
LVI	<i>Large Volume Injection</i> Inyección de grandes volúmenes
MCA	<i>Multicomponent Analysis</i> Análisis de multicomponentes
MD	<i>Multidimensional</i> Multidimensional
MDL(s)	<i>Minimum Detection Limit(s)</i> Límites de detección mínimos
MLLE	<i>Micro Liquid Liquid Extraction</i> Microextracción líquido-líquido
MRM(s)	<i>Multiresidue Method(s)</i> Método(s) multiresidual(es)
MS	<i>Mass Spectrometry</i> Espectrometría de masas
MSD	<i>Mass Spectrometric Detector</i> Detector espectrométrico de masas
NPD	<i>Nitrogen-Phosphorus Detector</i> Detector de Nitrógeno-Fósforo
ODS	<i>Octadecylsilica</i> Octadecilsilica
OPA	<i>o-phthaldialdehyde</i> o-ftalaldehído
PB	<i>Particle Beam</i> Haz de partículas
PCB	<i>Polychlorinated biphenyl</i> Bifenilo policlorado
PCSE	<i>Partially Concurrent Solvent Evaporation</i> Evaporación parcial de disolvente
PGC	<i>Porous Graphitized Carbonblack</i> Carbón grafitizado poroso
PRA	<i>Pesticide Residue Analysis</i> Análisis de residuos de plaguicidas

PTV	<i>Programmed Temperature Vaporizer</i> Vaporizador a temperatura programada
RSD(s)	<i>Relative Standard Deviation(s)</i> Desviación(es) estándar relativa(s)
RAM	<i>Restricted Access Media</i> Medio de acceso restringido
RPLC	<i>Reversed Phase Liquid Chromatography</i> Cromatografía líquida en fase inversa
SE	<i>Standard Error</i> Error estándar
S/N	<i>Signal/Noise</i> Señal/Ruido
SAMOS	<i>System for Automated Measurement of Organic Micropollutants in Surface Water</i> Sistema para la medida automática de microcontaminantes orgánicos en aguas superficiales
SCA	<i>Standing Committee of Analysts</i>
SCX	<i>Strong Cation Exchange</i> Intercambiador catiónico fuerte
SD	<i>Standard Deviation</i> Desviación estándar
SDB	<i>Styrene-divinylbenzene</i> Estireno-divinilbenceno
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> Extracción en fase sólida
SPE-GC	<i>Solid Phase Extraction coupled to Gas Chromatography</i> Extracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases
SPE-LC	<i>Solid Phase Extraction coupled to Liquid Chromatography</i> Extracción en fase sólida acoplada a cromatografía líquida
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i> Microextracción en fase sólida
SRM(s)	<i>Single Residue Method(s)</i> Método(s) de análisis individual
TP'(s)	<i>Transformation Product(s)</i> Producto(s) de transformación
TSP	<i>Thermospray</i>

UV

Ultraviolet
Ultravioleta