

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
Departamento de Química Analítica**



**DESARROLLOS METODOLOGICOS EN
CROMATOGRAFIA LIQUIDA CAPILAR Y QUIRAL:
APLICACIÓN A LA DETERMINACION DE HERBICIDAS
FENOXIACIDO EN MUESTRAS COMPLEJAS**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Noelia Rosales Conrado

Bajo la dirección de los doctores:
M^a Eugenia de León González y Luís Vicente Pérez Arribas

Madrid, 2005

ISBN: 84-669-2844-8

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLOS METODOLÓGICOS EN
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR Y QUIRAL.
APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS
FENOXIÁCIDO EN MUESTRAS COMPLEJAS.**

Memoria de tesis doctoral presentada por:

NOELIA ROSALES CONRADO

Para optar al título de Doctor en Ciencias Químicas con mención de Doctorado Europeo

Directores:

Dra. M^a Eugenia de León González

Profesora Titular de la U.C.M.

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

Profesor Titular de la U.C.M.

Madrid, 2005

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**DESARROLLOS METODOLÓGICOS EN
CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR Y QUIRAL.
APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS
FENOXIÁCIDO EN MUESTRAS COMPLEJAS.**

Directores:

Dra. M^a Eugenia de León González

Profesora Titular de la U.C.M.

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

Profesor Titular de la U.C.M.

NOELIA ROSALES CONRADO

Madrid, 2005



Ciudad Universitaria
28040 Madrid (España)
Teléfono: 91 394 43 31
Fax. 91 394 43 29

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

MARIA EUGENIA DE LEÓN GONZÁLEZ Y LUIS VICENTE PÉREZ ARRIBAS,
PROFESORES TITULARES DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo titulado, **“DESARROLLOS METODOLÓGICOS EN CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR Y QUIRAL. APLICACIÓN A LA DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN MUESTRAS COMPLEJAS”**, ha sido realizado en este departamento bajo nuestra dirección, constituyendo la TESIS DOCTORAL de su autora.

Dra. Maria Eugenia de León González

Dr. Luis Vicente Pérez Arribas

MADRID, 20 de Junio de 2005

El trabajo descrito en la presente memoria ha sido realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la profesora Dra. M^a Eugenia de León González y el profesor Dr. Luis Vicente Pérez Arribas, a quienes deseo expresar mi más sincero y cariñoso agradecimiento por su competencia, dedicación e inestimable contribución a mi formación investigadora. Gracias por vuestra confianza, comprensión y amistad, porque sin vuestro apoyo, tanto personal como profesional, no hubiera llegado hasta aquí.

Deseo expresar mi gratitud al Dr. Luis María Polo Díez, Catedrático del Departamento de Química Analítica, por su colaboración, aportación científica y por haber puesto a mi disposición todos los medios necesarios para desarrollar este trabajo.

Asimismo, agradecer al profesor Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón, Director del Departamento de Química Analítica, su acogida en el mismo durante este período de tiempo.

Mi agradecimiento a la Universidad Complutense de Madrid, por concederme una Beca predoctoral F.P.U y permitirme realizar una estancia en otro centro de investigación, así como al Ministerio de Ciencia y Tecnología, porque gracias a la financiación aportada, proyecto BQU 2000-0654 y BQU 2003-00667, se ha llevado a cabo esta tesis doctoral.

Mi especial reconocimiento al Dr. Salvatore Fanali, Istituto di Metodologie Chimiche (IMC) del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR, Roma), por la amable acogida en su grupo de investigación. Gracias por su colaboración e interés en todo momento, por compartir conmigo sus conocimientos y darme la oportunidad de aprender. Gracias también a la Dra. Chiara Polcaro, por su gran ayuda durante mi estancia en el CNR.

Finalmente, me gustaría agradecer de una forma muy especial la ayuda y el apoyo desinteresado que he recibido durante todo este tiempo de mis compañeros, amigos y familia.

Gracias a las personas que habéis trabajado conmigo en el laboratorio y en el Departamento de Química Analítica, porque con todos vosotros he compartido amistad, charlas, desahogos y sobre todo muy buenos momentos.

A mis compañeros del laboratorio del Dr. Fanali, Anna, Valentina, Giovanni y Zeineb, porque gracias a ellos he vivido una experiencia inolvidable. Gracias por hacerme sentir como en casa, por compartir conmigo vuestro tiempo y forma de trabajar. Gracias por vuestra amistad.

A mis amigas Nuria, Irene, Ana, Mari Carmen, Mar y Raquel, porque siempre han estado a mi lado en los momentos más difíciles, porque gracias a ellas nunca me he sentido sola y porque siempre me escuchan, aconsejan y ayudan.

Agradecer el apoyo y sacrificio que mi familia ha hecho siempre por mí, porque con cariño y comprensión me han sabido entender en todo momento. Especialmente doy gracias a mis padres, por quererme y ayudarme tanto, a mi hermana Yolanda y a Carlos, porque cuando más los he necesitado siempre han estado ahí y como no, a Patricia, mi aijada, porque con su sonrisa me ha dado fuerza y ánimo para continuar.

Por último, y aunque no encuentro suficientes palabras para expresar mi gratitud, me gustaría dar las gracias a Alfredo, por aportarme confianza, tranquilidad, serenidad y constancia para seguir adelante. Gracias porque con tu cariño, ternura, bondad, generosidad y sentido del humor, me has ayudado a mirar la vida con optimismo, a volver a confiar y a dar lo mejor de mi misma. Agradecerte tu apoyo, comprensión y paciencia durante estos últimos meses, que sin duda me han hecho sentir mejor. Gracias por compartir mis buenos y malos momentos, por estar a mi lado y hacerme feliz.

Dentro de poco tiempo cumpliré uno de mis grandes sueños, ser Doctora. Con la felicidad, orgullo y satisfacción del trabajo bien hecho, agradezco a todas aquellas personas que de alguna manera han hecho posible que finalmente lo logre. Gracias a todos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INDICE | I |
| ABREVIATURAS | XI |
| ANTECEDENTES | 1 |
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Herbicidas | 5 |
| 2.1. Consideraciones generales | 6 |
| 2.2. Clasificación | 7 |
| 2.3. Dinámica de los herbicidas en el suelo | 12 |
| 3. Herbicidas tipo fenoxiácido | 16 |
| 3.1. Introducción | 16 |
| 3.2. Formas y cultivos de aplicación | 18 |
| 3.3. Propiedades fisicoquímicas | 21 |
| 3.4. Mecanismo de acción y selectividad | 23 |
| 3.5. Persistencia y degradación | 24 |
| 3.6. Efectos tóxicos | 27 |
| 3.7. Legislación y control | 31 |
| 4. Métodos analíticos de determinación de herbicidas fenoxiácido | 33 |
| 4.1. Generalidades | 33 |
| 4.2. Métodos cromatográficos | 34 |
| 4.2.1. Cromatografía de gases. | |
| Aplicaciones al análisis de herbicidas fenoxiácido | 35 |
| 4.2.2. Cromatografía de líquidos de alta eficacia | 43 |
| 4.2.2.1. Consideraciones generales | 43 |
| 4.2.2.2. Efecto de la temperatura en la separación | 44 |
| 4.2.2.3. Desarrollo de nuevas fases estacionarias en HPLC | 47 |
| 4.2.2.4. Separaciones quirales | 49 |
| 4.2.2.5. Aplicaciones al análisis de fenoxiácidos mediante | |
| HPLC convencional | 59 |
| 4.2.2.6. Miniaturización de los sistemas de HPLC | 68 |
| 4.3. Otros métodos analíticos de separación | 88 |
| 4.3.1. Electroforesis capilar y cromatografía electro-cinética micelar | 88 |

| | |
|--|------------|
| 4.3.2. Electro cromatografía capilar | 89 |
| 4.4. Otros métodos analíticos | 92 |
| 4.4.1. Inmunoensayos | 92 |
| 4.4.2. Sensores | 92 |
| 5. Tratamiento de muestra | 93 |
| 5.1. Métodos de extracción y tratamiento de muestras líquidas y sólidas | 93 |
| 5.1.1. Aplicaciones a la extracción de fenoxiácidos | 95 |
| 5.2. Extracción en fase sólida | 96 |
| 5.2.1. Aspectos generales | 96 |
| 5.2.2. Características y tipos de adsorbentes | 100 |
| 5.2.3. Procedimientos en discontinuo y acoplamientos en línea | 105 |
| 5.2.4. Aplicaciones a la preconcentración en discontinuo de herbicidas fenoxiácido | 106 |
| 5.2.5. Micro-extracción en fase sólida | 112 |
| 5.3. Cromatografía de líquidos con columnas acopladas. Aplicaciones al análisis de herbicidas fenoxiácido | 113 |
| OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO | 123 |
| PARTE EXPERIMENTAL | 127 |
| 1. Instrumentación, reactivos y material | 129 |
| 1.1. Instrumentación | 129 |
| 1.1.1. Equipos de HPLC convencional con detección UV/VIS | 129 |
| 1.1.2. Equipos de cromatografía líquida capilar con detección UV/VIS y DAD | 130 |
| 1.1.3. Equipo de nano-LC con detección UV/VIS | 131 |
| 1.1.4. Otros instrumentos | 132 |
| 1.2. Reactivos y material | 134 |
| 1.2.1. Columnas cromatográficas | 134 |
| 1.2.2. Fases estacionarias y capilares para la preparación de micro y nano-columnas en el laboratorio | 135 |
| 1.2.3. Adsorbentes de extracción en fase sólida | 135 |
| 1.2.4. Materiales de filtración de muestra | 136 |

| | |
|--|------------|
| 1.2.5. Material diverso | 137 |
| 1.2.6. Reactivos y disoluciones | 137 |
| 1.2.7. Muestras | 142 |
| 2. Procedimientos de separación y determinación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC en fase inversa con detección espectrofotométrica | 144 |
| 2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas | 144 |
| 2.1.1. Cromatografía de líquidos convencional | 144 |
| 2.1.2. Cromatografía de líquidos con columnas capilares y nano-columnas | 145 |
| 2.1.2.1. Influencia de la temperatura | 145 |
| 2.1.2.2. Gradiente de elución | 145 |
| 2.1.2.3. Condiciones de inyección | 146 |
| 2.2. Determinación de mezclas de herbicidas fenoxiácido | 147 |
| 2.2.1. Cromatografía de líquidos convencional | 147 |
| 2.2.2. Cromatografía líquida capilar | 148 |
| 2.2.2.1. Determinación con temperatura programada | 148 |
| 2.2.2.2. Determinación con gradiente de elución | 149 |
| 3. Procedimientos de extracción en fase sólida de herbicidas fenoxiácido en diferentes adsorbentes | 149 |
| 3.1. Preconcentración en discontinuo | 149 |
| 3.1.1. Preconcentración en la columna MFE [®] Polímero SAX | 150 |
| 3.1.2. Preconcentración en la columna LiChrospher [®] RP-18-ADS | 150 |
| 3.1.3. Cartuchos de extracción LIDA Sep-IC-OH | 151 |
| 3.1.4. Cartuchos de extracción OASIS [®] MCX | 151 |
| 3.2. Preconcentración en línea | 152 |
| 4. Procedimientos de determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas | 155 |
| 4.1. Ensayos previos | 155 |
| 4.1.1. Estabilidad de disoluciones acuosas de los herbicidas | 155 |
| 4.1.2. Materiales de filtración de muestra | 156 |
| 4.2. Procedimientos de preparación de diferentes tipos de muestra y determinación mediante cLC | 156 |

| | |
|---|-----|
| 4.2.1. Muestras líquidas | 157 |
| 4.2.1.1. Zumo de manzana comercial | 157 |
| 4.2.1.2. Orina masculina humana | 157 |
| 4.2.2. Muestras sólidas | 158 |
| 4.2.2.1. Suelo de elevado contenido orgánico | 158 |
| 4.2.2.2. Hojas de menta fresca | 159 |
| 5. Procedimientos de separación y determinación de mezclas racémicas | |
| de herbicidas fenoxiácido mediante cromatografía de líquidos | 160 |
| 5.1. Cromatografía de líquidos convencional | 160 |
| 5.2. Cromatografía líquida capilar y nano-LC | 161 |
| 5.2.1. Preparación de columnas capilares empaquetadas | 161 |
| 5.2.2. Optimización de la separación cromatográfica | 164 |
| 5.2.2.1. Fase estacionaria quirál de teicoplanina | 164 |
| 5.2.2.2. Fase estacionaria quirál de vancomicina | 164 |
| 5.2.3. Determinación de herbicidas fenoxiácidos quirales | 164 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 167 |
| 1. Separación de herbicidas fenoxiácido mediante cromatografía | |
| de líquidos en fase inversa con detección espectrofotométrica | 169 |
| 1.1. Cromatografía de líquidos convencional | 170 |
| 1.2. Cromatografía líquida capilar | 172 |
| 1.2.1. Separación de 2,4-D, 2,4-DB y ésteres de 2,4-D | 172 |
| 1.2.2. Separación de herbicidas fenoxiácido en modo isocrático/isotermo, | |
| isocrático/temperatura programada y gradiente/isotermo | 175 |
| 1.2.2.1 Influencia de la temperatura en la separación | 176 |
| 1.2.2.2. Gradiente de elución | 182 |
| 1.2.2.3. Naturaleza de la fase estacionaria | 184 |
| 1.2.2.4. Optimización de las condiciones de inyección | 188 |
| 2. Determinación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC en | |
| fase inversa con detección UV. Características analíticas | 199 |
| 2.1. Cromatografía de líquidos convencional | 200 |
| 2.2. Cromatografía líquida capilar | 201 |
| 2.2.1. Determinación de 2,4-D, 2,4-DB y ésteres de 2,4-D | 201 |

| | |
|--|------------|
| 2.2.2. Determinación de mezclas de fenoxiácidos | 202 |
| 2.2.2.1. Determinación con temperatura programada | 202 |
| 2.2.2.2. Determinación con gradiente de elución | 203 |
| 3. Extracción en fase sólida de herbicidas fenoxiácido | 204 |
| 3.1. Evaluación y caracterización de adsorbentes en base gel de sílice y base polimérica en discontinuo | 205 |
| 3.1.1. Ensayos previos | 206 |
| 3.1.2. Influencia del pH en el proceso de retención | 207 |
| 3.1.2.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher® RP-18-ADS | 207 |
| 3.1.2.2. Adsorbentes en base polimérica | 208 |
| 3.1.3. Naturaleza del eluyente y volumen de elución | 214 |
| 3.1.3.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher® RP-18-ADS | 214 |
| 3.1.3.2. Adsorbentes en base polimérica | 217 |
| 3.1.4. Evaluación del volumen de ruptura | 224 |
| 3.1.4.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher® RP-18-ADS | 225 |
| 3.1.4.2. Adsorbentes en base polimérica | 228 |
| 3.2. Preconcentración en línea con el adsorbente MFE® Polímero SAX y determinación mediante cLC | 237 |
| 3.2.1. Optimización del acoplamiento LC-cLC | 237 |
| 3.2.2. Características analíticas | 249 |
| 4. Aplicaciones y desarrollo de metodologías para la determinación multiresidual de herbicidas fenoxiácido mediante cLC en muestras complejas | 253 |
| 4.1. Estudios previos | 254 |
| 4.1.1. Estabilidad de herbicidas fenoxiácido en disoluciones acuosas a temperatura ambiente | 255 |
| 4.1.2. Materiales de filtración de muestra | 258 |
| 4.2. Determinación de herbicidas fenoxiácido en matrices complejas mediante cromatografía líquida capilar | 260 |
| 4.2.1 Muestras líquidas | 263 |

| | |
|---|------------|
| 4.2.1.1. Zumo de manzana comercial | 263 |
| 4.2.1.2. Orina masculina humana | 272 |
| 4.2.2. Muestras sólidas | 276 |
| 4.2.2.1. Suelo de elevado contenido orgánico | 276 |
| 4.2.2.2. Hojas de menta fresca | 281 |
| 5. Separación y determinación quiral de herbicidas fenoxiácido mediante cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica | 291 |
| 5.1. Separación quiral mediante HPLC convencional | 291 |
| 5.1.1. Fase estacionaria de fenilcarbamato de celulosa | 292 |
| 5.1.2. Fase estacionaria de β -ciclodextrina | 293 |
| 5.2. Separación quiral con fases estacionarias de antibióticos mediante HPLC con columnas capilares y nano-columnas | 295 |
| 5.2.1. Fase estacionaria de teicoplanina | 296 |
| 5.2.2. Fase estacionaria de vancomicina | 297 |
| 5.2.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas | 297 |
| 5.2.2.2. Determinación y características analíticas | 303 |
| CONCLUSIONES | 307 |
| BIBLIOGRAFÍA | 329 |
| ANEXO I | 347 |
| <i>Revista:</i> Analytica Chimica Acta 470 (2002) 147-154. | |
| <i>Título:</i> “Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient”. | |
| <i>Autores:</i> N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez. | |
| ANEXO II | 357 |
| <i>Revista:</i> Journal Separation Sciencies 27 (2004) 1303-1308. | |
| <i>Título:</i> “Enantiomeric separation of chlorophenoxy acid herbicides by nano liquid chromatography-UV detection on a vancomycin-based chiral stationary phase”. | |
| <i>Autores:</i> N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, G. D’Orazio, S. Fanali. | |

ANEXO III 365

Revista: Journal of Chromatography A, 1076 (2005) 202-206.

Título: “Capillary liquid chromatography of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in apple juice samples after preconcentration on a cation exchanger based on polydivinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone”.

Autores: N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez.

ANEXO IV 373

Revista: Journal of Chromatography A 1081 (2005) 114-121.

Título: “Effect of temperature on the separation of chlorophenoxy acids and carbamates by capillary high-performance liquid chromatography and UV (or diode array) detection”.

Autores: N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez.

ABREVIATURAS

| | |
|----------------------|--|
| α | Factor de separación |
| AIA | Ácido indolacético |
| ALS | Acetolato sintetasa |
| AcN | Acetonitrilo |
| ADN | Ácido dexosirribonucleico |
| AGP | α_1 -glicoproteína ácida |
| ATP | Adenosina trifostato |
| APCI | Ionización química a presión atmosférica |
| API | Ionización a presión atmosférica |
| ASE | Extracción acelerada con disolvente |
| A_s | Asimetría de pico cromatográfico |
| BSA | Albúmina de suero bovino |
| BuOH | Butanol |
| CAS RN | Del inglés “Chemical Abstract Service Registry Number” |
| CBH | Celulasa |
| CD | Ciclodextrina |
| CE | Electroforesis capilar |
| CEC | Electrocromatografía capilar |
| CEZ | Electroforesis capilar de zona |
| cLC | Cromatografía líquida capilar |
| CNR | Del italiano “Consiglio Nazionale delle Ricerche” |
| CSP | Fase estacionaria quiral |
| CV | Coefficiente de variación |
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| DAD | Detección con matriz de diodos |
| DHP | Dihidropteroato |
| 2,4-DB | Ácido 4-(2,4-diclorofenoxi)-butanoico |
| 2,4-DP | Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)-propanoico |
| DCM | Diazometano |
| DMS | Dimetilsulfato |
| DVB | Divinilbenceno |
| ECD | Detector de captura electrónica |

| | |
|---------------|--|
| ED | Detector electroquímico |
| EEC | Comunidad Económica Europea (actualmente EC) |
| EEUU | Estados Unidos |
| EI | Impacto electrónico |
| ELISA | Del inglés “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay” |
| EPA | Agencia de Protección Ambiental (EEUU), del inglés “Environmental Protection Agency” |
| EPSP | Del inglés “5-enol-pyruvylshikimate-3-phosphate“ |
| ESI | Ionización por electroespray |
| FAB | Bombardeo de átomos rápidos |
| FAO | Organización Alimentaria y Agrícola |
| FID | Detector de ionización de llama |
| FL | Fluorescencia |
| FM | Fase móvil |
| FPD | Detector fotométrico de llama |
| GC | Cromatografía de gases |
| GCB | Negro de carbón grafitizado |
| GPC | Cromatografía mediante permeación en gel |
| HAc | Ácido acético |
| 4-HPDD | 4-hidroxifenil-piruvato-dioxigenasa |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta eficacia |
| HEMA | Hidroxietilmetacrilato |
| HEPT | Altura equivalente de plato teórico |
| HSA | Albúmina de suero humano |
| ICP | Plasma acoplado inductivamente |
| I.D. | Diámetro interno |
| k | Factor de retención |
| LC | Cromatografía de líquidos |
| LC | Límite de confianza |
| LD | Límite de detección |
| LLE | Extracción líquido-líquido |
| LMR | Límite máximo de residuo |
| Log P | Coefficiente de reparto octanol-agua |

| | |
|----------------------|---|
| LQ | Límite de cuantificación |
| MASE | Extracción con disolvente asistida por microondas |
| MCPA | Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético |
| MCPB | Ácido 4-(4-cloro-2-metilfenoxi)-butanoico |
| MCPP | Ácido 2-(4-cloro-2-metil)-fenoxipropanoico |
| MeOH | Metanol |
| MEKC | Cromatografía electrocinética micelar |
| MIP | Polímero de impresión molecular |
| MS | Espectrometría de masas |
| N | Número de platos teóricos |
| NCI | Ionización química negativa |
| NI | Detección de iones negativos |
| NP | Fase normal |
| NPD | Detector de nitrógeno-fósforo |
| O.D. | Diámetro externo |
| ODS | Octadecilsilano |
| OVM | Ovomucoide |
| PB | Haz de partículas |
| PCI | Ionización química positiva |
| PEEK | Poli-(éter-éter-cetona) |
| PF | Punto de fusión |
| PFB | Pentafluorobencilo |
| PFBB | Bromuro de pentafluorobencilo |
| PI | Detección de iones positivos |
| PrOH | Propanol |
| PS-DVB | Poliestireno-divinilbenceno |
| PTFE | Politetrafluoroetileno |
| P_v | Presión de vapor |
| R | Coefficiente de regresión o correlación |
| Rec. | Recuperación |
| RP | Fase inversa |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| Rs | Resolución cromatográfica |

| | |
|-----------------|---|
| RSD | Desviación estándar relativa |
| SAX | Intercambiador fuerte de aniones |
| SCX | Intercambiador fuerte de cationes |
| SD | Desviación estándar |
| SDB | Estireno-divinilbenceno |
| SIM | Monitorización de iones seleccionados |
| SFE | Extracción con fluido supercrítico |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| SPME | Micro-extracción en fase sólida |
| 2,4,5-T | Ácido 2,4,5-triclorofenoacético |
| TBA | Tetrabutilamonio |
| TEA | Trimetilamina |
| TFA | Ácido trifluoroacético |
| THF | Tetrahidrofurano |
| TMA | Trimetilamonio |
| 2,4,5-TP | Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)-propanoico |
| TOF | Tiempo de vuelo |
| TSP | Termoespray |
| UE | Unión Europea |
| UHPLC | Cromatografía líquida de ultra alta presión |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volumen |
| VIS | Visible |
| WCOT | Columna abierta de pared recubierta, del inglés “Wall-Coated Open Tubular” |
| WHO | Organización Mundial de la Salud, del inglés “World Health Organization” |

ANTECEDENTES

1. INTRODUCCIÓN

Durante años, la rotación de cultivos se ha utilizado como una forma de control de la aparición de malas hierbas y plagas, pero en la actualidad, el uso de herbicidas se ha impuesto para conseguir cosechas estables y de alto rendimiento, y es que el desarrollo de hierbas indeseables junto con los cultivos, limita la producción agrícola y repercute considerablemente sobre su economía. Sin embargo, el tratamiento de las cosechas supone un riesgo de contaminación de los alimentos y una posible intoxicación de los consumidores, además del desequilibrio biológico que puede ser provocado por el uso de plaguicidas químicos.

Debido al impacto medioambiental de los pesticidas de uso agrícola, las regulaciones sobre la producción, transporte, uso y descarga de este tipo de sustancias se han incrementado de forma considerable, por lo que continua resultando esencial el desarrollo de métodos de análisis que permitan la determinación multiresidual a los niveles establecidos por la legislación.

En la agricultura actual, los herbicidas fenoxiácido son muy utilizados para el control de las malas hierbas de hoja ancha debido a su gran eficacia y selectividad, por lo que sus residuos se encuentran presentes en una gran variedad de matrices.

Aunque su toxicidad, persistencia en el medioambiente, capacidad de bioacumulación y penetración en la planta depende de la forma química en que se encuentran, son muy pocos los métodos propuestos para determinarlos en sus diferentes formas por la dificultad de mantenerlos en su estado original durante la etapa de tratamiento de muestra.

En este sentido, los métodos basados en la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), a diferencia de la cromatografía de gases, pueden resultar eficaces para la determinación simultánea de herbicidas fenoxiácido tanto en forma ácida como de ésteres, pero por lo general, son poco sensibles y no permiten alcanzar los límites de residuos permitidos. Por esta razón, y debido a la complejidad de las muestras tratadas, resulta necesario desarrollar procedimientos de preconcentración y limpieza de la matriz de la muestra con materiales eficaces de extracción en fase sólida.

En los últimos años, los esfuerzos realizados para mejorar la sensibilidad de los métodos de HPLC, han permitido desarrollar columnas de diámetro interno reducido, que presentan claras ventajas analíticas en términos de eficacia y sensibilidad, además de permitir el empleo tanto de gradientes de temperatura como de concentración para controlar la retención y optimizar la separación. Estos sistemas capilares, al disminuir considerablemente el caudal de fase móvil utilizado, permiten un menor consumo de disolventes orgánicos y cantidad de residuos generada.

La cromatografía de líquidos con columnas de diámetro interno reducido se utiliza en áreas como bioanálisis, medioambiente, industria o neurociencia y en la actualidad, debido a la pequeña cantidad necesaria de fase estacionaria, las separaciones quirales constituyen un campo emergente de aplicación de este tipo de técnicas. Alrededor del 25% de los agroquímicos que se utilizan en todo el mundo, son compuestos quirales que se vierten al medioambiente como mezclas racémicas, aunque solo uno de los enantiómeros sea el biológicamente activo y produzca el efecto deseado.

El uso del enantiómero puro produce menor impacto medioambiental, puesto que evita la introducción innecesaria de un 50% de pesticida adicional en el entorno y la dispersión de sustancias que son tóxicas para muchos seres vivos y que no cumplen la función para la que fueron fabricadas. De ahí, la necesidad de utilizar la cromatografía de líquidos como técnica de separación y de resolución de enantiómeros, no solo para controlar la cantidad de cada uno de los isómeros durante el proceso de fabricación, sino también para determinar la pureza enantiomérica de las formulaciones comerciales de herbicidas.

En el campo del análisis medioambiental, continua siendo un reto la utilización de procedimientos que mejoren la calidad de los análisis, sean respetuosos con el entorno y produzcan una contaminación mínima. Por ello, en esta tesis doctoral, se han desarrollado metodologías para la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas de diversa naturaleza mediante cromatografía líquida capilar y quiral, que además de su utilidad e interés actual, también contribuyen a la disminución del impacto medioambiental.

2. HERBICIDAS

Etimológicamente la palabra herbicida se compone de dos vocablos; “herbi” que significa hierba y “cida”, que significa matar. En general, los herbicidas son compuestos químicos que se utilizan para la eliminación selectiva de hierbas y otras plantas indeseables (1) y es que, desde los orígenes de la agricultura, las malas hierbas han constituido un problema importante en la producción de cultivos, por lo que el hombre se ha visto en la necesidad de combatirlos primero mecánicamente y más tarde mediante el empleo de productos químicos. Tradicionalmente, debido a la suficiente mano de obra, la eliminación de malezas con las manos era relativamente fácil y en el siglo XIX, la utilización de la rotación de cultivos como una forma de control de la aparición de plagas era bastante habitual. Durante la Revolución Industrial, debido a la disminución de la mano de obra y al aumento de la superficie cultivada, las dificultades para controlar la aparición de malas hierbas se incrementaron considerablemente, resultando necesaria la utilización de reactivos químicos.

El uso de productos químicos data de 1896 y 1898, cuando se comenzó a utilizar en Francia e Inglaterra respectivamente, sulfato de cobre para el control selectivo de malas hierbas en cultivos de cereales (2). A partir de este momento, el número de productos empleados creció rápidamente y en 1908 se dio a conocer el uso de otros compuestos inorgánicos como NaCl , FeSO_4 , Na_3AsO_3 , NaClO_3 , cuyo modo de acción está basado en la eliminación del agua de la planta (3). Durante la década de los treinta comenzaron a emplearse H_2SO_4 , dinitrofenol y cresol, si bien, la revolución de los herbicidas selectivos se produjo en la década de los cuarenta, cuando en 1941, Pokorny, tratando de buscar nuevos fungicidas y/o insecticidas sintetizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (4). Aunque fue él mismo quien a posteriori demostró la ineficacia del 2,4-D para tales usos, Zimmerman y Hitchcock señalaron en EEUU en 1942, las propiedades reguladoras del crecimiento del 2,4-D, mientras que su uso como herbicida fue propuesto por Mitchell y Hammer en 1944 para el tratamiento de céspedes. En el Reino Unido, Slade, Templeman y Sexto llegaron a la misma conclusión con el MCPA.

Hasta ese momento, la calidad de un herbicida se evaluaba por su capacidad de necrosar tejidos, de modo que la aparición de 2,4-D y MCPA marcó una verdadera diferencia en las técnicas de escarda química, supuso una auténtica revolución al actuar de forma completamente diferente e inició el período de mayor desarrollo de los herbicidas hormonales (5).

2.1. CONSIDERACIONES GENERALES

En la agricultura actual, para garantizar la rentabilidad de las explotaciones y conseguir cosechas estables y de alto rendimiento, los agricultores han descartado la rotación de cultivos como método de control de plagas, recurren al uso de herbicidas para evitar el daño económico causado por el desarrollo de hierbas indeseables y se especializan en un tipo de cultivo para ahorrar costes mediante reducción de maquinaria. Así pues, la eliminación de las malas hierbas en monocultivos extensos resulta imprescindible debido al elevado número de perjuicios que originan y entre los cuales cabe mencionar los siguientes (5):

- disminución de la producción. Se debe principalmente a la competencia activa entre las malas hierbas y las plantas cultivadas por el consumo de elementos nutritivos del suelo, agua y luz.
- dificultades de laboreo y recolección. Produce un aumento en el coste de la cosecha debido a la necesidad de mano de obra.
- disminución de la calidad de las cosechas. Las malas hierbas pueden servir de hospedaje o refugio para los insectos y favorecer la aparición de enfermedades.

De esta forma, las malas hierbas limitan la producción agrícola, repercuten considerablemente sobre su economía y hacen necesaria la utilización de herbicidas selectivos y de gran eficacia, que destruyan las malas hierbas sin afectar a los cultivos, que puedan utilizarse en dosis muy pequeñas para conseguir una aplicación más económica, que persistan en el medio el tiempo justo para conseguir una elevada tasa de eliminación y que no afecten al resto de organismos vivos del entorno. No obstante, el empleo de herbicidas origina diversos problemas derivados de su inespecificidad, del sobretratamiento de los cultivos, de su persistencia y de su síntesis y/o degradación, que puede generar especies más tóxicas.

Los principales factores a tener en cuenta para escoger el producto herbicida a emplear, calcular su dosis y determinar el momento de aplicación, son:

- la sensibilidad de la planta. Puede variar según su estado de desarrollo, del suelo en que crece y de las condiciones meteorológicas que preceden al tratamiento.
- el género y la especie de la planta a destruir.
- su estado de desarrollo.
- las condiciones meteorológicas en el momento del tratamiento.
- el tipo de maquinaria a utilizar.

2.2. CLASIFICACIÓN

Debido al gran número de sustancias que se emplean como herbicidas y con el fin de conocer lógica y ordenadamente sus muy variadas características aplicaciones, ha resultado necesario su clasificación atendiendo a diversos criterios (5, 6):

□ **Selectividad**

Aunque la naturaleza química es el factor más importante, existen otras causas de selectividad en la acción herbicida que dependen de la forma de aplicación y del modo de acción. Según posean o no los herbicidas esta propiedad, se pueden clasificar en selectivos y no selectivos.

Los *herbicidas no selectivos* se utilizan cuando es necesario un control total durante un largo período de tiempo, como es el caso de la eliminación de plantas en los bordes de carreteras, vías del tren y corredores de líneas de alta tensión, donde no se necesita un herbicida que distinga entre tipos de plantas. Por el contrario, los *herbicidas selectivos* destruyen las malas hierbas sin afectar a las plantas cultivadas. En algunas ocasiones, el cultivo se trata de una planta ya desarrollada y en otras, se encuentra en forma de grano que aún no ha germinado. En el primer caso, si hay una gran similitud biológica entre el cultivo y la mala hierba, el control selectivo es más difícil que en el segundo, donde si se aplica el herbicida en forma de aerosol a nivel superficial, se puede solucionar el problema siempre y cuando se escoja una sustancia de acción rápida y baja persistencia.

De todos modos, no conviene olvidar que ningún herbicida es completamente selectivo, es decir, de una inocuidad absoluta para la planta cultivada, y que las malas hierbas son sensibles solamente en un momento muy preciso de su vida vegetativa (7).

□ **Forma de aplicación**

Atendiendo a la dirección o destino del herbicida aplicado se clasifican en:

a) *Herbicidas aplicados por vía foliar*

En este tratamiento, la acción herbicida depende de la cantidad de producto retenido por las plantas, y por tanto, de la superficie de las hojas. La relación entre la cantidad de líquido interceptado por las hojas y la retenida, se ve afectada por factores como:

-inclinación de las hojas. Influye en la superficie de intercepción y en la capacidad de retención.

-tipo de pulverización. La dilución de la pulverización varía el grado de retención del líquido sobre las hojas.

-naturaleza de la superficie foliar. Algunas plantas como el guisante, poseen una película cerosa hidrófoba que recubre la epidermis y que hace que las gotas del herbicida aplicado resbalen por la superficie.

-agentes mojantes La adición de un mojante reduce la tensión superficial y da lugar a una mayor retención del líquido.

b) Herbicidas aplicados al suelo

La eficacia de los herbicidas aplicados al suelo depende de su grado de adsorción a las partículas coloidales de éste, puesto que la adsorción limita el acceso a las raíces y a las semillas de las hierbas. El factor de mayor importancia en la adsorción de herbicidas retenidos por el suelo es el contenido de éste en materia orgánica. Tanto es así, que en suelos muy orgánicos las recomendaciones de aplicación no garantizan su eficacia. Por otra parte, los suelos coloidales, arcillosos o húmicos, poseen un poder de adsorción mayor que los arenosos. Así, hay herbicidas que son selectivos siempre que los cultivos no se asienten sobre suelos poco adsorbentes como los arenosos.

La naturaleza química del herbicida también condiciona la adsorción, de forma que los poco polares apenas se adsorben, mientras que las sales, derivados de la urea, triazinas, etc, se adsorben fuertemente.

□ **Modo de acción**

En función de su modo de acción se clasifican en:

a) Herbicidas que actúan por contacto

Los herbicidas de contacto destruyen los tejidos de las plantas por una fitotoxicidad o causticidad directa. Se utilizan cuando se puede rociar únicamente la mala hierba, puesto que hay que evitar que entre en contacto con la planta de la cosecha.

b) Herbicidas que actúan por traslocación y acción bioquímica

Estos herbicidas, una vez que penetran en la planta se trasladan a través del floema o xilema, sistemas vasculares de las plantas a los cuales concierne el transporte de compuestos a largas distancias, hasta aquellos lugares críticos más o menos distantes

de la zona de aplicación donde se produce su acción tóxica. Se absorben por las hojas o por las raíces y producen reacciones biológicas y trastornos fisiológicos y/o morfológicos. Así, disminuyen o inhiben la fotosíntesis, producen un metabolismo respiratorio acelerado, frenan la absorción de nitrógeno y potasio, aceleran la hidrólisis de proteínas, distorsionan el crecimiento de toda la planta y ejercen cierta acción sobre el sistema enzimático. Su selectividad es de orden bioquímico, de modo que si un proceso bioquímico es específico de cada especie de planta, la alteración del mismo por parte del herbicida será la principal causa de efectividad y de destrucción de las malas hierbas sin afectar el resto de especies cultivadas.

En la tabla 1, se presenta una clasificación de los herbicidas según sus diferentes modos de acción. En general, se pueden dividir en dos grupos principales; herbicidas hormonales y herbicidas relacionados con la fotosíntesis (3).

□ **Época de aplicación**

Tomando como referencia el estado del desarrollo del cultivo y su época de aplicación, se pueden clasificar en herbicidas de:

a) *Presiembra*, se aplican antes de la siembra del cultivo, normalmente mediante métodos mecánicos. Estas sustancias poseen la actividad en suelo denominada comúnmente como “*soil-acting*” y sirven para esterilizar el suelo de todo tipo de plantas.

b) *Pre-emergencia*, la aplicación se realiza después del sembrado de la cosecha pero antes de su germinación. En este caso, el herbicida se ha de elegir cuidadosamente para evitar dañar también la cosecha.

c) *Post-emergencia*, se utilizan tras la germinación del cultivo. A su vez se puede distinguir entre post-emergencia temprana, si se aplica en las primeras fases del desarrollo del cultivo, post-emergencia tardía y pre-recolección, cuya finalidad en muchos caso es el control de malas hierbas perennes.

Tabla 1
Clasificación de los herbicidas en función de su modo de acción

| <i>GRUPO</i> | <i>MODO DE ACCIÓN</i> | <i>FAMILIA QUÍMICA</i> |
|----------------------|---|---|
| <i>A</i> | Inhibición de acetil coenzima carboxilasa | Arilofenoxi-propionatos, ciclohexanodionas |
| <i>B</i> | Inhibición de ALS | Sulfonilureas, imidazolinas, pirimidilos, triazopirimidinas |
| <i>C₁</i> | Inhibición de la fotosíntesis en fotosistema II | Triazinas, triazinonas, uracilos, piridazinona, fenilcarbonatos |
| <i>C₂</i> | Inhibición de la fotosíntesis en fotosistema II | Ureas, amida |
| <i>C₃</i> | Inhibición de la fotosíntesis en fotosistema II | Nitrilos, benzotiadiazol, fenilpiridazina |
| <i>D</i> | Desviación del electrónico en fotosistema I | Bipiridilos |
| <i>E</i> | Inhibición de protoporfirinógeno oxidasa | Difenileteres, tiadiazoles, N-fenilitalimidias, triazolinona |
| <i>F₁</i> | Decoloración; inhibición de la síntesis de carotenoides a nivel de la fitoenodesaturasa | Piridazinona, nicotinalida |
| <i>F₂</i> | Decoloración; inhibición de 4-HPPD | Tricetona, ixosazol, pirazol |
| <i>F₃</i> | Decoloración; inhibición de la síntesis de carotenoides (punto desconocido) | Triazol, isoxazolidionona, urea |
| <i>G</i> | Inhibición de EPSP sintasa | Glicinas |
| <i>H</i> | Inhibición de la glutamino sintasa | Ácido fosfínico |
| <i>I</i> | Inhibición de la DHP sintasa | Carbamatos |
| <i>K₁</i> | Inhibición de la unión de los microtúbulos en la mitosis | Dinitroanilinas, ácido benzoico fosforoamidatos, piridazina |
| <i>K₂</i> | Inhibición de la mitosis | Carbamatos, bencileter |
| <i>K₃</i> | Inhibición de la división celular | Cloroacetamida, carbamatos, benzamida, oxiacatemida |
| <i>L</i> | Inhibición de la síntesis de la pared celular | Nitrilos, benzamida |
| <i>M</i> | Desacopladores (alteración de la membrana) | Dinitrofenoles |
| <i>N</i> | Inhibición de la síntesis de lípidos | Tiocarbamatos, fosforiditioato, benzofurano, ác. clorocarbónico |
| <i>O</i> | Auxinas sintéticas (como la acción del AIA) | Ácidos fenoxicarboxílicos, piridincarboxílicos y quinolincarboxílicos |
| <i>P</i> | Inhibición del AIA | Ftalato, diflufenzopir |
| <i>Z</i> | Desconocido | Ácidos arilaminopropiónicos, organoarsénicos |

□ **Superficie tratada**

En función de cómo se aplica el herbicida en la superficie tratada se puede distinguir entre:

a) *Aplicaciones totales*, si el herbicida se aplica uniformemente en toda el área de cultivo.

b) *Aplicaciones en bandas*, cuando el herbicida se aplica solamente en las bandas en que se siembra el cultivo.

c) *Aplicaciones dirigidas*, se aplican a las hierbas o al suelo en zonas muy localizadas pero de forma que no alcancen a las plantas cultivadas.

□ Estructura química

Atendiendo a su naturaleza química, los principales herbicidas utilizados se pueden clasificar en las familias mostradas en la figura 1. Además de éstas, cabe destacar por su actividad herbicida las siguientes:

- derivados del ácido ftálico.
- compuestos organofluorados.
- derivados de dipiridilo.
- fenoles sustituidos.

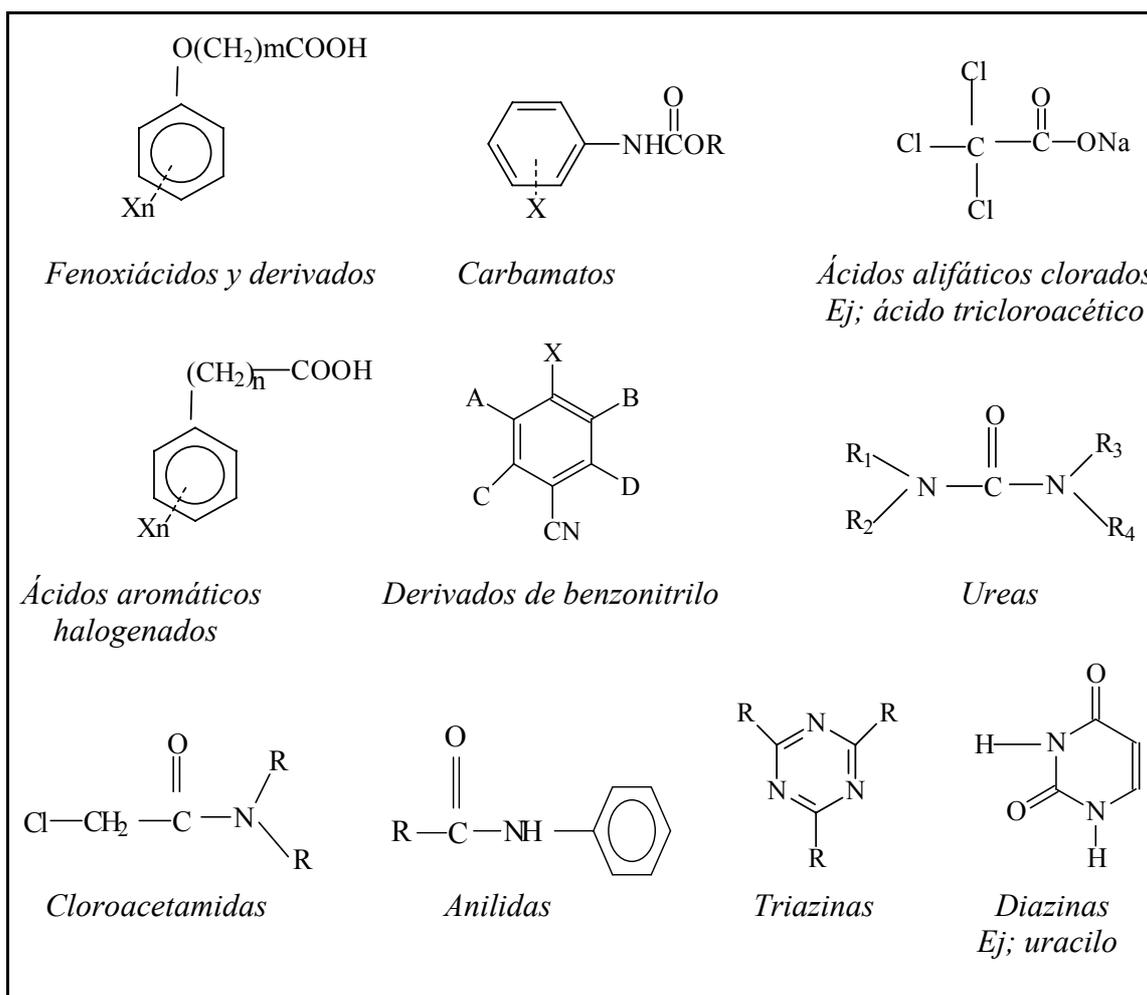


Figura 1. Clasificación de los principales herbicidas según su estructura química.

2.3. DINÁMICA DE LOS HERBICIDAS EN EL SUELO

La concentración de los herbicidas en el suelo a lo largo del tiempo, persistencia o residualidad, depende de las características propias de la molécula (acidez o alcalinidad, solubilidad en agua, presión de vapor), de su interacción con el suelo en función de la constitución de éste (textura y materia orgánica) y de factores ambientales como la temperatura y humedad (1).

□ **Características del herbicida y su relación con las propiedades del suelo**

a) Grado de acidez o alcalinidad

Este atributo determina la capacidad del herbicida para permanecer en la solución del suelo o ser retenido en las partículas coloidales de éste. Los herbicidas iónicos como los carbamatos, amidas, derivados de la urea, del uracilo y benzonitrilo son poco adsorbidos por las arcillas del suelo, aunque con niveles bajos de agua, existe una adsorción por interacciones catión-dipolo, enlaces coordinados, puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals.

Los herbicidas ácidos como el 2,4-D, MCPA, 2,4,5-TP y Picloram, se adsorben principalmente a la materia orgánica del suelo en un intervalo de valores de pH relativamente amplio, siendo esta materia la principal responsable de la inactividad de este tipo de herbicidas en suelo. La adsorción de las moléculas de herbicidas básicos débiles como las triazinas y triazolopirimidinas, depende de la materia orgánica en aquellos suelos con pH neutro a básico y de las arcillas en los suelos ácidos. Sin embargo, los herbicidas fuertemente básicos, como paraquat y diquat, se inactivan rápidamente por los coloides del suelo al ser adsorbidos fuertemente tanto por los minerales de la arcilla como por la fracción orgánica, debido a los intercambios con otros cationes que presentan ambas superficies.

b) Adsorción o retención por partículas coloidales

Los constituyentes coloidales del suelo se pueden dividir en materia orgánica, constituida por sustancias húmicas (ácido húmico, fúlvico y huminas) y no húmicas (carbohidratos, proteínas, aminoácidos), y en fracción mineral (arcilla y óxidos amorfos e hidróxidos). El fenómeno de adsorción se encuentra influenciado por la capacidad de intercambio iónico de los coloides, de modo que la carga de la molécula herbicida influye sobre el fenómeno de adsorción. En general, los herbicidas con elevada retención en el suelo no están sujetos a pérdidas por lixiviación.

c) Solubilidad en agua

Esta propiedad determina la proporción de herbicida que encuentra disponible en disolución para ser adsorbida por la planta, y juega un papel fundamental en su determinación en agua, suelo o aire, puesto que si es muy soluble apenas se retiene en los coloides del suelo.

d) Volatilidad

Se refiere a la tendencia que exhibe un herbicida para transformarse en vapor. Los herbicidas con presión de vapor elevada tienen mayor probabilidad de escapar del suelo y volatilizarse en la atmósfera, lo que puede producir un movimiento indeseable hacia áreas de cultivos sensibles o bien una pérdida de eficacia en el lugar de aplicación. Un herbicida volátil aplicado en suelo húmedo se volatiliza más fácilmente que cuando es aplicado en suelo seco, debido a que en suelos húmedos, la presencia de una película de agua que recubre las partículas del suelo dificulta la adsorción del herbicida.

Las principales características de los herbicidas empleados habitualmente, se pueden observar en la tabla 2 (8).

Tabla 2
Características fisicoquímicas de los principales herbicidas según su estructura química

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Solubilidad en agua</i> | <i>Volatilidad</i> | <i>Retención por las partículas coloidales</i> | <i>Persistencia</i> |
|--------------------------|----------------------------|---------------------|--|------------------------------|
| <i>Dinitroanilinas</i> | Muy baja | Moderada a alta | Moderada a alta | Corta a moderada |
| <i>Tiocarbamatos</i> | Moderada-baja | Alta a muy alta | Baja a moderada | Muy corta a corta |
| <i>Cloroacetamidas</i> | Moderada | Muy baja a moderada | Baja | Muy corta a moderada |
| <i>Ureas sustituidas</i> | Muy baja | Muy baja a baja | Baja a alta | Corta a moderada |
| <i>Fenoxiácidos</i> | Baja | Muy baja | Muy baja a baja | Muy corta a corta (según pH) |
| <i>Sulfonilureas</i> | Muy baja a alta (según pH) | Muy baja | Muy baja a baja (según pH) | Corta a larga |
| <i>Imidazolinonas</i> | Moderada a alta (según pH) | Muy baja a baja | Muy baja a baja (según pH) | Corta a larga |
| <i>Fosfoaminoácidos</i> | Muy alta | Muy baja | Muy alta | - |
| <i>Triazinas</i> | Baja a moderada | Muy baja a baja | Baja a alta (según pH) | Muy corta a moderada |
| <i>Dipiridilos</i> | Muy alta | Muy baja | Muy alta | - |

Actualmente, los herbicidas inorgánicos y organometálicos se han prohibido debido a su elevada persistencia en el suelo, de modo que son los herbicidas orgánicos quienes dominan el mercado (9). Como se puede observar en la tabla, otras sustancias volátiles como algunos tiocarbamatos y dinitroanilinas, poseen tiempos de permanencia relativamente bajos en los intervalos normales de aplicación.

La persistencia en el suelo puede variar desde 2 a 3 semanas hasta 3 a 6 meses, aunque generalmente se estima en 6 u 8 semanas. La acumulación de los herbicidas en el suelo como consecuencia de su aplicación año tras año, constituye un peligro potencial. Si antes de una nueva aplicación el herbicida no ha desaparecido completamente del suelo, al aplicar de nuevo la misma cantidad que la primera vez la concentración será mayor de la necesaria. Además, si cada año se utiliza el mismo tipo de sustancia, el suelo se puede enriquecer con los microorganismos que la degradan, siendo menos efectiva en aplicaciones sucesivas (7).

Dependiendo de su movilidad o capacidad de lixiviación, se puede distinguir entre herbicidas muy lixiviados, de lixiviación media y poco lixiviados. Por otra parte, atendiendo a su comportamiento en los suelos y en función de su grado de persistencia, se pueden clasificar en (4):

- poco persistentes. Sólo muestran actividad en las primeras fases del cultivo.
- persistencia media. Son activos al menos la mitad del ciclo del cultivo.
- persistentes. Son activos durante todo el cultivo e incluso durante parte del período de post-recolección.
- de largo poder residual.

□ **Procesos de disipación de un herbicida**

Tal y como se puede observar en la figura 2, los herbicidas se pueden disipar mediante numerosos procesos entre los cuales cabe destacar la volatilización, la descomposición fotoquímica o microbiana, la ruptura química, el escurrimiento superficial, la lixiviación y la adsorción. Estos procesos se encuentran fuertemente influenciados por el tipo y cantidad de cobertura y labranza (10, 11).

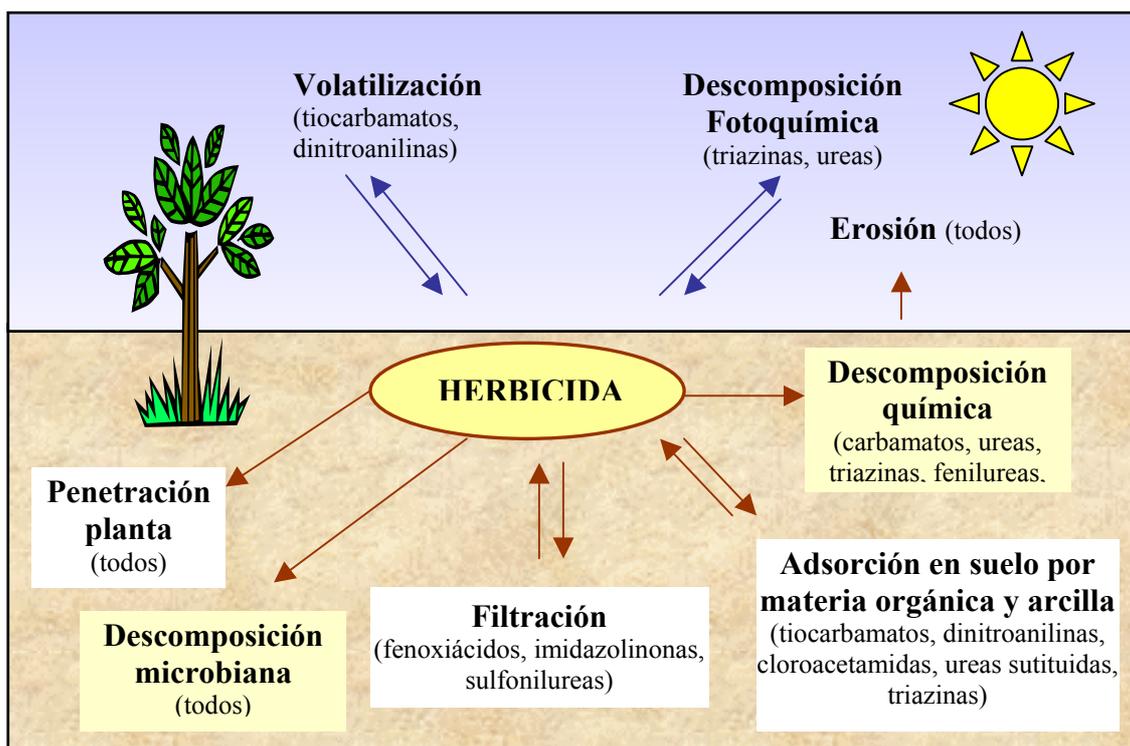


Figura 2. Movilidad y eliminación de los herbicidas aplicados en suelos.

La *descomposición microbiana* ocurre fundamentalmente en la capa superficial del suelo. Los principales microorganismos (algas, hongos, actinomicetos y bacterias) utilizan los herbicidas como fuente de nutrientes. Aplicados en dosis normales, los herbicidas causan un incremento en la población microbiana denominado enriquecimiento del suelo, “*soil conditioning*”, lo que produce que se descompongan cada vez de forma más rápida.

La descomposición de la mayoría de los herbicidas orgánicos ocurre según la curva típica de crecimiento de bacterias, por lo que todas las condiciones que favorecen el desarrollo de los microorganismos del suelo como la temperatura, humedad, nivel de oxígeno, contenido de materia orgánica, pH y fertilidad favorecen la descomposición del herbicida. Las condiciones óptimas para la actividad microbiana en el suelo son: humedad del 50 al 100% de la capacidad de campo, oxígeno en el espacio poroso, temperatura de 27 a 32°C, valores de pH de 6.5 a 8 y alto contenido de materia orgánica.

En relación a la *descomposición química*, los herbicidas pueden sufrir aún en suelos estériles, diferentes reacciones químicas que pueden producir su total desactivación. Algunos de los procesos que involucran dichas reacciones son los siguientes:

-*Desalquilación* (triazinas, dinitroanilinas, ureas sustituidas).

-*Desalcoxilación* (ureas).

-*Descarboxilación*.

-*Deshalogenación*.

-*Rotura del enlace éter*.

-*Hidrólisis*. Es uno de los mecanismos más importantes de degradación, a través del cual las amidas se pueden convertir en ácidos y aminas, los carbamatos en aminas y alcoholes, los nitrilos en amidas y ácidos carboxílicos, los tiocarbamatos en aminas y tioalcoholes, las triazinas en hidroxitriazinas, las fenilureas en anilinas y amidas, y los herbicidas en forma de ésteres en sus ácidos correspondientes.

-*Hidroxilación*.

-*Metilación*.

-*Oxidación/ β -oxidación*.

-*Reducción*.

-*Fisión de anillos* (dinitroanilinas).

La *fotodescomposición* es otro de los mecanismos más importantes de degradación de algunos herbicidas en la superficie del suelo, puesto que la absorción de energía luminosa, especialmente UV, aumenta el nivel de energía de la molécula produciendo alteraciones estructurales de la misma.

3. HERBICIDAS TIPO FENOXIÁCIDO

3.1. INTRODUCCIÓN

Los herbicidas fenoxiácido constituyen el grupo más antiguo de herbicidas sintéticos introducidos en la agricultura desde el año 1940. Su gran éxito de aplicación se ha debido principalmente a su fuerte actividad herbicida, que permite utilizar dosis muy pequeñas con las que su aplicación resulta más económica, y a su gran selectividad, que permite aplicarlos a cultivos de gramíneas, cítricos y cereales que resisten su acción tóxica. Debido a su bajo coste y eficacia son muy utilizados en el control de las malas hierbas de hoja ancha, y se aplican a las cosechas mezclados unos con otros o combinados con otros herbicidas, lo que permite ampliar su campo de acción (6).

Sus residuos y productos de degradación y/o transformación son relativamente móviles en el medio ambiente y causan la contaminación de suelos, aguas superficiales y subterráneas. De esta forma, constituyen un riesgo potencial para la salud humana a través de la exposición directa o mediante los residuos presentes en alimentos y agua de bebida (12). Además, son relativamente persistentes debido a la estabilidad que le confiere el anillo aromático de su estructura, aunque se degradan fácilmente por la luz o el calor y la presencia de grupos polares carboxi e hidroxilo, que tiende a facilitar su degradación biológica (13). Su persistencia en el medio ambiente depende de cómo se encuentran formulados, pero normalmente suele estar comprendida entre 5 y 25 semanas.

Este tipo de herbicidas son más activos en ambiente seco, lo que indica que penetran en la hoja a través de la cutícula, por vía lipídica. Además, requieren un periodo exento de lluvias de unas 4-6 horas después de su aplicación para ser absorbidos, favoreciendo la luz y la temperatura su penetración.

Su toxicidad para animales superiores es moderada y según el Registro Oficial de Productos Fitosanitarios de la Dirección General de la Producción Agraria, se consideran productos medianamente tóxicos que se deben emplear con precauciones mínimas (6).

La figura 3, muestra el nombre y estructura química de los principales herbicidas fenoxiacéticos. Como se puede observar, todos los miembros de este grupo poseen un átomo de cloro en el carbono 4 del anillo bencénico, un grupo metilo o un átomo de cloro en el carbono 2, y a veces un átomo de cloro adicional en el carbono 5.

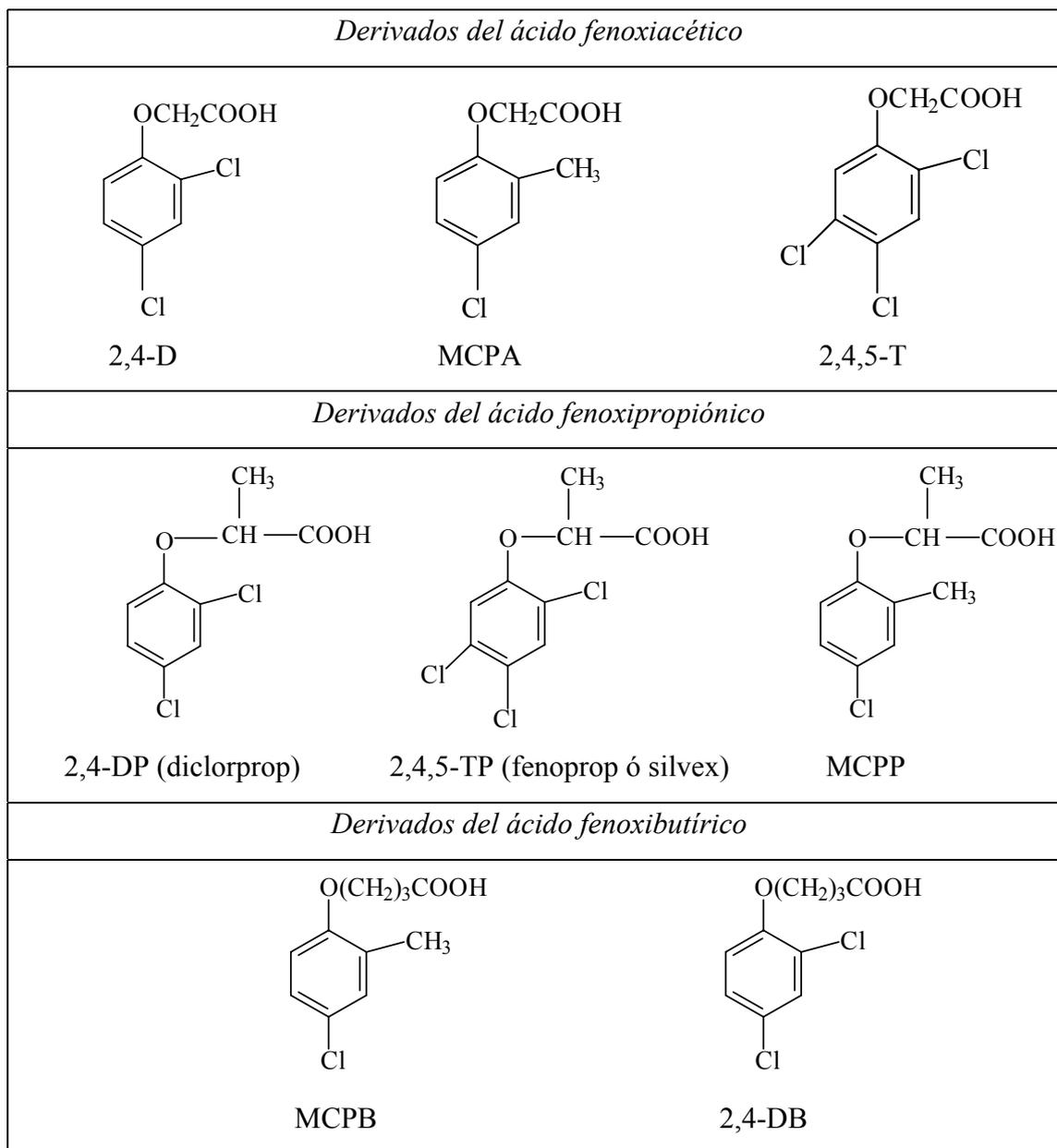


Figura 3. Nombres y formulas estructurales de los principales herbicidas fenoxiácido.

3.2. FORMAS Y CULTIVOS DE APLICACIÓN

Los herbicidas fenoxiácido se presentan en forma de compuestos solubles en agua (sales alcalinas o de aminas) o en forma de ésteres que se formulan como concentrados emulsionables, aunque también se utiliza el ácido libre. Los ésteres, emulsificados en aceite, poseen una gran aceptación comercial debido a su mayor actividad herbicida, poder de penetración y baja presión de vapor, por lo que son muy utilizados.

Debido a que sus moléculas se absorben más fácilmente sin disociar que los aniones correspondientes, si se utilizan en forma iónica sólo penetra una pequeña porción, de forma que todos aquellos factores que impiden la ionización del ácido o favorecen la hidrólisis de las sales, aumentan la eficacia herbicida de estos compuestos. Así, cuanto menor es el pH de la formulación, mayor es la proporción absorbida, ya que la acidez impide la ionización del herbicida y hace la cutícula más permeable.

Las formulaciones solubles en agua más utilizadas son las sales de aminas, que no se adsorben en las capas más superficiales del suelo y que se pueden filtrar a las aguas subterráneas para contaminar posteriormente los acuíferos. Con menor frecuencia se utilizan las sales sódicas o amónicas. Las aminas más ampliamente utilizadas para la preparación de formulaciones herbicidas son: trietanolamina, dietanolamina, trietilamina, trimetilamina, isopropilamina y 2-propanolamina. Estas formulaciones acuosas llevan incorporadas complejantes de iones Ca^{2+} y Mg^{2+} , para evitar la precipitación de sus sales cuando se utilizan aguas duras.

Los ésteres del 2,4-D y análogos, poseen una mayor actividad herbicida que las sales alcalinas, amónicas o de aminas, por lo que su utilización es más frecuente. Sin embargo, la volatilidad de algunos de ellos constituye un peligro para las cosechas sensibles vecinas a los cultivos tratados, por lo en la actualidad, se tiende a utilizar compuestos de mayor peso molecular o mayor polaridad para tener menor volatilidad. La formulación de estos ésteres como emulsiones en aceite potencia la eficacia herbicida, puesto que facilita la penetración al empapar la cutícula y favorece la absorción y el traslado por la planta (5, 6).

Los herbicidas fenoxiácido son muy utilizados en el control selectivo y tratamiento de post-emergencia de especies dicotiledóneas, en cultivos de especies gramíneas como maíz, arroz, trigo, avena, cebada, centeno y caña de azúcar, que resisten su acción tóxica. También se emplean en cultivos leñosos, para controlar especies arbustivas y perennes, y en terrenos no cultivados (tabla 3).

Normalmente se aplican en la parte aérea de las hojas o en la base de los árboles o arbustos a controlar. Los tratamientos se deben hacer cuando las plantas cultivadas tienen de 30 a 40 cm de altura y siempre en cultivos no sensibles, utilizando una concentración que puede variar entre el 0.1 y el 0.4%. Debido a la sensibilidad de algunos cultivos de legumbres, verduras, tabaco y algodón, los daños que se pueden producir por deriva al aplicarlos en cultivos colindantes puede llegar a limitar su empleo (4,6).

Tabla 3
Principales cultivos de aplicación de los herbicidas fenoxiácido

| CULTIVO | HERBICIDAS |
|--|---|
| <i>Cereales de invierno (trigo, cebada, centeno)</i> | MCPA, sales y ésteres del 2,4-D ó 2,4-D+2,4-DP; 2,4-D+MCPA; 2,4-D+2,4,5-T |
| <i>Cereales de primavera (trigo, cebada, avena)</i> | Recomendable el uso del MCPA |
| <i>Maíz</i> | MCPA (más sensible), aminas de 2,4-D (recomendable) |
| <i>Arroz</i> | 2,4-D+2,4,5-T+MCPA (productos clásicos) 2,4-DP+2,4,5-TP (recién introducidos en mercado español) |
| <i>Lino</i> | Sal sódica MCPA en post-emergencia |
| <i>Caña de azúcar</i> | 2,4-D, sal sódica del MCPA |
| <i>Algodón</i> | 2,4-D, 2,4,5-TP |
| <i>Olivo</i> | Sales de 2,4-D o de MCPA |
| <i>Guisantes</i> | MCPA y MCPB en post-emergencia |
| <i>Espárragos y fresas</i> | Sal sódica 2,4-D |
| <i>Manzano y peral</i> | MCPA y 2,4-D (acción foliar interna) |
| <i>Olivo, viña, agrios</i> | Sales del 2,4-D o MCPA |
| <i>Plantas de bulbo o tubérculo</i> | MCPA |
| <i>Praderas temporales</i> | Sales de sodio del MCPA ó 2,4-D y aminas de 2,4-D |
| <i>Praderas permanentes</i> | MCPA, 2,4-D (sal sódica, aminas o ésteres), MCPB, 2,4,5-T |
| <i>Destrucción de arbustos y malezas</i> | Ésteres de 2,4-D+2,4,5-T |
| <i>Defoliación de algodón</i> | 2,4-D; 2,4,5-T |
| <i>Destrucción vegetación acuática</i> | Tratamiento durante la desecación (2,4-D; MCPA) Tratamiento con agua (aminas del 2,4-D, ésteres 2,4,5-T, mezcla de ésteres de 2,4,5-T, 2,4-D y MCPA) |

Como se puede observar, este tipo de herbicidas no sólo se emplean por separado sino que también se comercializan mezclas de los mismos entre las que cabe destacar la asociación de los ésteres del 2,4-D y 2,4,5-T, utilizados para combatir malezas y arbustos, en la escarda de prados invadidos por malas hierbas herbáceas y en determinadas plantas leñosas. En España esta mezcla se utiliza en la escarda de cereales de invierno y las dosis de empleo se establecen en kg de ácido equivalente por hectárea, siendo el ácido equivalente la cantidad de ácido puro que contiene una formulación en concreto (14).

3.3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Los herbicidas fenoxiácido son compuestos blancos o incoloros, cristalinos, poco solubles en agua y solubles en disolventes orgánicos cuando se utilizan como ácidos o ésteres. En general, las sales de metales alcalinos y de amina a diferencia de las alcalinotérreas son muy solubles, y debido a las impurezas de clorofenoles que presentan, los productos técnicos suelen tener un olor fuerte, persistente y adherente (6).

Son compuestos relativamente polares. Diversos autores han estudiado la correlación existente entre la adsorción en suelos y constantes basadas en carbono orgánico, solubilidad en agua, coeficiente de reparto octanol-agua ($\log P$ o $\log K_{o/w}$), tiempo de retención en HPLC de fase inversa y peso molecular (15). En general se sabe que los herbicidas con baja presión de vapor tienden a disiparse lentamente y que los herbicidas con coeficientes de reparto relativamente elevados o baja solubilidad en agua, tienden a adsorberse en el suelo y poseen una gran capacidad de bioacumulación (16).

Además, son fácilmente ionizables y poseen valores de pK_a en el intervalo comprendido entre 2.7 y 4.9. También presentan baja volatilidad y se hidrolizan lentamente con los ácidos y bases en caliente.

Las principales características físico-químicas de este tipo de herbicidas se muestra en la tabla 4 (17, 18).

Tabla 4
Propiedades fisicoquímicas de los principales herbicidas fenoxiácido

| HERBICIDA [CAS RN] | Estado físico | Fórmula empírica | Masa molecular (gmol^{-1}) | PF ($^{\circ}\text{C}$) | Solubilidad agua (mg L^{-1}) 25$^{\circ}\text{C}$ | pK_a | P_v (mmHg) 25$^{\circ}\text{C}$ | Log P |
|-------------------------------|----------------------|---|---|---|---|-----------------------|---|--------------|
| 2,4-DB [94-82-6] | Cristales incoloros | $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{Cl}_2\text{O}_3$ | 249.1 | 117-119 | 46 | 4.80 | 1.11×10^{-5} | 3.53 |
| 2,4-D [94-75-7] | Polvo cristalino | $\text{C}_8\text{H}_6\text{Cl}_2\text{O}_3$ | 221.0 | 136-140 | 620 | 2.73 | 8.25×10^{-5} | 2.80 |
| Éster metílico [1928-38-7] | Cristales blancos | $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ | 235.1 | 119 | 258 | - | 0.0023 | 2.90 |
| Éster butílico [94-80-4] | Líquido incoloro | $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{Cl}_2\text{O}_3$ | 277.2 | * | 46 | - | 6.16×10^{-5} | 4.40 |
| MCPB [94-81-5] | Sólido blanco | $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{ClO}_3$ | 228.7 | 100 | 48 | 4.80 | 4.33×10^{-7} | 2.70 |
| 2,4-DP [120-36-5] | Sólido incoloro | $\text{C}_9\text{H}_8\text{Cl}_2\text{O}_3$ | 235.1 | 116-118 | 350 | 3.00 | 7.50×10^{-8} | 3.43 |
| MCPA [94-74-6] | Sólido incoloro | $\text{C}_9\text{H}_9\text{ClO}_3$ | 200.6 | 119-121 | 630 | 3.05 | 5.90×10^{-6} | 1.77 |
| 2,4,5-T [93-76-5] | Sólido blanco | $\text{C}_8\text{H}_5\text{Cl}_3\text{O}_3$ | 225.5 | 154-157 | 150 | 2.80 | 3.75×10^{-5} | 3.31 |
| 2,4,5-TP [93-72-1] | Polvo blanco | $\text{C}_9\text{H}_7\text{Cl}_3\text{O}_3$ | 269.5 | 175-177 | 176 | 3.60 | 9.97×10^{-6} | 3.80 |
| MCPD [93-65-2] | Cristales incoloros | $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClO}_3$ | 214.7 | 94-95 | 620 | 3.75 | 7.50×10^{-7} | 3.13 |

* punto de ebullición 146 $^{\circ}\text{C}$, calor de vaporización 2.05 Kcal mol $^{-1}$

3.4. MECANISMO DE ACCIÓN Y SELECTIVIDAD

Los herbicidas fenoxiácido actúan por contacto y traslocación y al ser sistémicos, ejercen su acción una vez que el producto ha sido absorbido por la planta. Su estructura química constituye una modificación de las hormonas naturales de las plantas denominadas auxinas, las cuales actúan como reguladoras del crecimiento. De este modo, se consideran herbicidas hormonales, y su modo de acción está basado en un crecimiento incontrolado de los tejidos meristemáticos y en una restricción de la síntesis de ADN y de proteínas, alterando los procesos metabólicos básicos de las células de las plantas y de los tejidos (19).

La absorción del herbicida puede ocurrir por las hojas o por las raíces. Cuando se absorben por las raíces de las plántulas jóvenes, la sabia bruta los transporta por los haces leñosos o xilema hasta las hojas. Cuando la absorción es a través de las hojas, se puede pasar de célula a célula hasta el sistema liberiano o floema y de ahí hacia los órganos de reserva y puntos vegetativos. En el tratamiento por vía foliar, debido a que circulan por el interior de la planta, no es necesario recubrirla totalmente y bastan unas gotas en alguna rama para originar la destrucción total. Así, cuando se aplican con pulverizaciones de bajo volumen, se requieren tan sólo cantidades del orden de 10 litros/hectárea para lograr una destrucción satisfactoria de las malas hierbas en los cultivos de cereales, lo que permite que el tratamiento sea poco costoso económicamente. Las condiciones climatológicas influyen en la acción herbicida, así, el tiempo húmedo y cálido intensifican su acción mientras que el frío y la sequía la retrasan.

A las pocas horas del tratamiento, producen una distorsión del crecimiento de toda la planta a partir de su absorción local. Se detiene el crecimiento de los brotes y raíces así como la apertura de las flores, se curvan los tallos y las hojas, se deforman las raíces por proliferación de tejidos y de raíces laterales y finalmente se desintegran (ver figura 4). La acción bioquímica se manifiesta por el aumento del tamaño de las células responsables del crecimiento, por la curvatura en los órganos de proliferación y por una activación del metabolismo. Esto se traduce en una exaltación de la respiración del consumo de hidratos de carbono y de la hidrólisis de proteínas. Además se disminuye la fotosíntesis, la absorción de nitrógeno y potasio, se altera el metabolismo del fósforo y se ejerce cierta acción sobre los sistemas enzimáticos, inhibiéndose algunos de ellos como el de la enzima ascórbico-oxidasa y la catalasa, y estimulando otros como el de las oxidasas del ácido indolacético y de los polifenoles. La muerte de la planta se

produce a los pocos días o al cabo de unos meses, según la susceptibilidad de la especie, puesto que la proliferación anormal del parénquima conduce a una disminución del contenido en azúcares de los órganos afectados y a un agotamiento de las células (6).

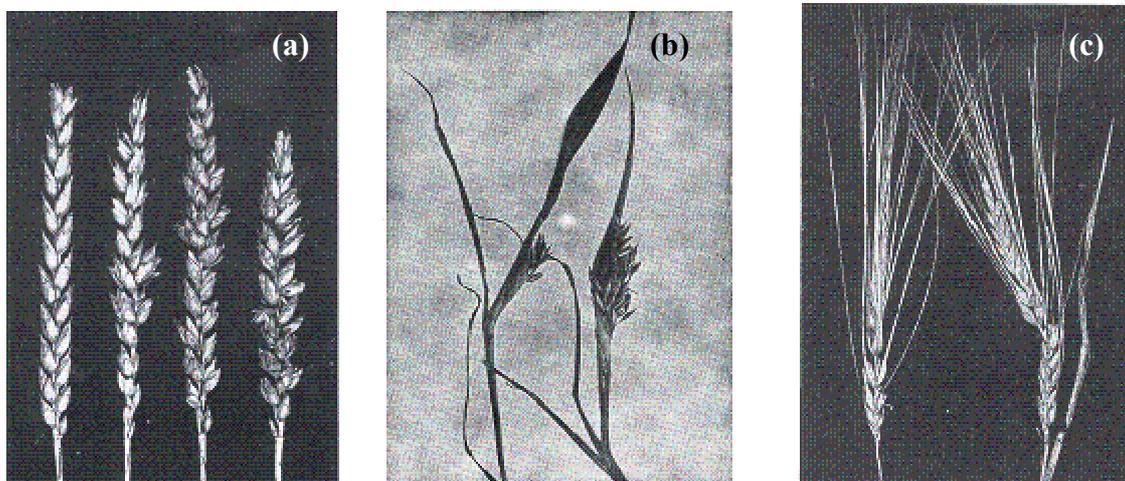


Figura 4. Deformaciones causadas debido a una dosis demasiado elevada o a un incorrecto período de aplicación de 2,4-D en:

(a) espigas de cereales de primavera (espiga izquierda normal y tres espigas con espiguillas suplementarias; (b) plantas de avena (el limbo es anormalmente ancho y se enrolla alrededor de la panoja); (c) espigas de cebada de primavera (algunos raticulos del raquis se encuentran muy alargados, lo que los hace especialmente frágiles en la madurez) (5).

3.5. PERSISTENCIA Y DEGRADACIÓN

En la actualidad, los herbicidas más utilizados como los fenoxiácidos, son más solubles en agua, menos persistentes y a menudo más polares que los de la vieja generación, que eran no polares y altamente persistentes. Tras su aplicación, desaparecen o se degradan en el medio ambiente a través de mecanismos abióticos como la hidrólisis (donde los ésteres se hidrolizan a los ácidos correspondientes), la evaporación, el arrastre por agua, la oxidación, la reducción (donde se sustituyen los átomos de cloro por hidrógenos) y la degradación térmica o fotoquímica, además de los correspondientes mecanismos biológicos, que constituyen la principal vía de eliminación. En ocasiones, estos procesos no son suficientes para reducir las concentraciones de herbicidas y la degradación por efecto del calor, luz o microorganismos genera dioxinas, sustancias más tóxicas, peligrosas y persistentes en el medio ambiente que los propios fenoxiácidos, debido a su baja presión de vapor, solubilidad en agua y a su elevado punto de fusión (20, 21).

Los factores que afectan al transporte de los herbicidas desde los campos hasta las aguas incluyen propiedades inherentes al propio compuesto como la solubilidad, coeficiente de partición en agua y presión de vapor. También depende de otros factores como el coeficiente de reparto octanol-agua del suelo, el contenido de agua y la textura del suelo, el clima y de características del terreno como su topografía y prácticas de trabajo (22).

Se ha considerado, que un pesticida es capaz de contaminar las aguas subterráneas si su solubilidad en agua es mayor de 30 mg L^{-1} , su adsorptividad menor que $300\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$, su tiempo de vida media en suelo mayor de 2-3 semanas, su tiempo de vida media de hidrólisis mayor de 6 meses y su tiempo de vida media de fotólisis mayor que 3 días (23). Debido a su persistencia combinada con su naturaleza polar, los herbicidas fenoxiácido son muy móviles en los tipos de suelos más vulnerables y penetran en las aguas subterráneas mediante drenaje o filtración. En aguas básicas, las formas de ésteres se hidrolizan a las formas aniónicas, mientras que en aguas ácidas y dependiendo del éster en cuestión, predomina la fotodegradación o la vaporización. Así, se ha estimado un tiempo de vida media de fotólisis del 2,4,5-T en aguas superficiales de 15 días (24).

Cuando se aplican en dosis normales no afectan a las bacterias del suelo, pero cuando se aplican dosis mayores disminuyen su capacidad nitrificante y producen efectos dañinos en la microflora del suelo. Su persistencia puede variar desde 2 a 3 semanas hasta 3 a 6 meses y depende de numerosos factores como el contenido de materia orgánica y microorganismos, acidez, humedad y temperatura del suelo. Por lo general son poco persistentes y se descomponen en unas seis semanas, aunque en función de la estructura química, su persistencia varía según el siguiente orden (6, 14):

| | | | | |
|--------------------------|---|-----------------------|---|------------------------|
| Fenoxipropiónicos | > | Fenoxiacéticos | ≈ | Fenoxibutíricos |
| (2,4-D<MCPA<2,4,5-T) | | (2,4-DB<MCPB) | | (2,4-DP<MCPP<2,4,5-TP) |

Además, se ha demostrado que determinadas bacterias del suelo como las *Pseudomonas*, *Artrobacter*, *Xantobacter* y *Alcaligenes* metabolizan estos herbicidas y contribuyen a su eliminación. El tiempo de vida media del 2,4-D en suelos se ha estimado, a una temperatura de 20°C y en condiciones de humedad del 60%, entre 7 y 10 días, mientras que la persistencia del MCPA se ha estimado en 54 días (19) y la del 2,4-DB en menos de 7 días (25). La biodegradación anaeróbica del 2,4,5-T a través de

una serie de etapas secuenciales de deshalogenación produce como principal metabolito 2,4-D, que es degradado fácilmente por los microorganismos del suelo a través de reacciones de hidrólisis, metilación y apertura de anillo aromático a 2,4-diclorofenol (26). Su tiempo de vida media de degradación se ha estimado entre 12 y 59 días, mientras que para el 2,4,5-TP, cuyo producto de degradación primario es el 2,4,5-triclorofenol, se ha estimado en un intervalo de 8 a 17 días (27-29). La descomposición microbiana de 2,4-DP produce tanto 2,4-D como su metabolito, 2,4-diclorofenol (26) y se ha estimado completa en 14 días (30).

Estudios de transformación en suelos del MCPP han permitido determinar un tiempo de vida media de 7-9 días (31), siendo el 2-metil-4-clorofenol su principal producto de degradación, el cual continua transformándose mediante hidroxilación en posición 6 seguida de apertura del anillo aromático (26). Los residuos del MCPP pueden persistir en el suelo hasta dos meses después de su aplicación (32). En cuanto al MCPB, se ha estimado un tiempo de vida media de 4-6 días (28, 31), a menos que los microorganismos del suelo estén aclimatados al herbicida, en cuyo caso es menos de un día (28). Este fenoxiácido se degrada en el suelo a MCPA (31) y a 4-cloro-2-metil-fenol (25).

Normalmente, los herbicidas quirales MCPP, 2,4-DP y 2,4,5-TP se emplean como mezclas racémicas. Su disipación, además de depender de las propiedades del suelo, depende del comportamiento medioambiental de ambas formas enantioméricas en relación a la adsorción, degradación biótica o abiótica y procesos de filtración (33). Algunos estudios han mostrado la degradación preferencial de una de las dos formas en determinados tipos de suelos. En ciénagas y suelos arenosos, la forma *R* se degrada con mayor velocidad, mientras que en suelos arcillosos es la forma *S* quien se degrada con mayor rapidez (34). También se ha determinado que la degradación de 2,4-DP mediante organismos acuáticos es preferencial hacia la forma *R* (35).

Por otro lado, aunque la mayoría de la población no se encuentra ocupacionalmente expuesta a este tipo de herbicidas, en cierta medida todas las personas tienen un nivel de exposición como consecuencia de los residuos presentes en aire, agua y alimentos (36). La exposición y el contacto dérmico debido a usos agrícolas y de jardín, constituye una ruta importante de entrada de herbicidas en el cuerpo humano, dependiendo la cantidad de herbicida absorbido de los ingredientes activos de la formulación, de los disolventes, de la temperatura y del lugar anatómico por donde se produce el contacto.

Aunque los herbicidas fenoxiácido se pueden excretar a través del semen, su principal ruta de eliminación en organismos expuestos es el sistema renal, pero cuando esta vía se satura, los herbicidas se pueden acumular en el plasma y estar más disponibles para la filtración y distribución a otros tejidos (37). En mamíferos, la excreción de los herbicidas se produce a través de la orina sin biotransformación apreciable. En personas ocupacionalmente expuestas, se han determinado concentraciones excretadas de 2,4-D en orina de $5-133 \mu\text{g L}^{-1} \text{ día}^{-1}$, mientras que en individuos con una exposición no ocupacional se han determinado concentraciones menores de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ y hasta $37 \mu\text{g L}^{-1}$ (38). La excreción urinaria del 2,4-D es lenta y muestra un máximo en el primer y segundo día tras la administración oral o la absorción dérmica, mientras que el MCPA se excreta un 40 y un 80% a las 24 horas y a los 5 días respectivamente después de la administración oral, y muestra un máximo de excreción en relación a la absorción dérmica después de las 48 horas de su aplicación. Los límites biológicos de exposición de 2,4-D y MCPA no se encuentran disponibles, aunque algunos autores han sugerido niveles urinarios de MCPA de hasta $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (39). En general, las vidas medias biológicas en mamíferos se han estimado entre 10 y 33 horas, excretándose un 75-95% de la cantidades ingeridas en 96 horas. Cabe destacar, que las conversiones metabólicas solamente ocurren a dosis elevadas, que los tiempos de vida media se incrementan en exposiciones prolongadas, y que las sales y ésteres de los herbicidas fenoxiácido se hidrolizan rápidamente, siguiendo las mismas vías farmacocinéticas que los ácidos libres (40).

3.6. EFECTOS TÓXICOS

El tratamiento de los cultivos y las cosechas con herbicidas fenoxiácido causa efectos negativos en el hombre y su medio ambiente, constituyendo un riesgo de contaminación de los alimentos y una posible intoxicación de los consumidores. Su toxicidad es moderada en animales superiores y está relacionada con la presencia de átomos de cloro en su estructura, que puede producir efectos teratogénicos y mutagénicos tanto mayores cuanto mayor es el número de átomos de cloro en su estructura (41). Tanto los fenoxiácidos como sus productos de degradación clorados han mostrado embriotoxicidad en animales y organismos acuáticos. En el año 1987, sobre la base de una serie de estudios realizados con personas expuestas ocupacionalmente, la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) los clasificó como “posibles carcinogénicos humanos” (IARC’s grupo 2B) (42).

Estos pesticidas se absorben rápidamente a través del tracto gastrointestinal y aunque se distribuyen por todo el cuerpo, no se acumulan en los tejidos humanos ni se almacenan en la grasa de manera significativa (40). Sin embargo el hígado es uno de los órganos donde se pueden bioacumular. De hecho, a dosis comprendidas entre 5 y 150 mg kg⁻¹ día⁻¹, se han observado alteraciones citoplasmáticas de los tubos renales (43).

Puesto que su excreción ocurre casi totalmente a través de la orina, el análisis de este tipo de muestras puede proporcionar un índice de exposición en el medio ambiente (39). Al excretarse también en semen, pueden afectar a la calidad y producción de esperma mediante desequilibrios hormonales y daños genéticos celulares, afectando adversamente a la función reproductiva y produciendo riesgos de anomalía y muerte fetal, al transmitirse a través del fluido seminal a la mujer y al embrión (37).

Además son irritables para la piel, mucosas y aparato respiratorio y producen efectos clínicos considerables, algunos de los cuales se describen a continuación (44).

Tabla 5
Efectos clínicos de herbicidas fenoxiácido

| | |
|-------------------|---|
| <i>CONTACTO</i> | Irrita los ojos, piel y mucosa. Conjuntivitis, lacrimo, blefaritis. Dermatitis de contacto y despigmentación local. |
| <i>INGESTIÓN</i> | Alteraciones gastrointestinales, náuseas, vómitos, diarrea. A dosis elevadas, depresiones neurológicas con convulsiones. Contracción pupilar, dolor de cabeza, confusión. Excitabilidad miocárdica, fibrilación ventricular, hipotermia. Debilidad muscular, acidosis metabólica, daño hepático-renal, cefalea. Miotopía (rigidez e incoordinación de extremidades posteriores). |
| <i>INHALACIÓN</i> | Alteraciones respiratorias, tos, rinitis, disnea, aumento de las secreciones nasales y bronquial. La inhalación prolongada causa vértigos. La inhalación de aerosoles causa sensaciones de quemadura en el tracto nasofaríngeo y pecho. |

En tests de laboratorio, se ha comprobado que el MCPP inhibe la síntesis de ADN e interfiere en la coagulación de la sangre y en la producción de componentes importantes del sistema inmune (42). El herbicida 2,4-D tiene efectos adversos en los procesos biológicos de los animales, alterando la producción de energía y agotando las moléculas de ATP. También inhibe enzimas de la mitocondria, del metabolismo de lípidos y de la síntesis de proteínas y aumenta la actividad de algunas enzimas de las células del músculo que se encargan del transporte de iones a través de las membranas. Además, produce daños genéticos, disminuye la capacidad de la sangre para transportar

oxígeno, altera la función normal del sistema hormonal, del sistema endocrino y del sistema nervioso, puesto que al enlazarse a la acetilcolina e inhibir la acetilcolinesterasa aumenta los niveles de serotonina (46).

El uso de MCP y 2,4-D también puede producir efectos adversos en pájaros. Aplicado a plantas, el MCP puede destruir el hábitat de los insectos que sirven de alimento a determinadas especies de aves (42), mientras que el 2,4-D reduce la incubación de huevos y destruye los hábitats ponederos (47). En ecosistemas acuáticos, el MCP afecta a las diatomeas y al plancton y es tóxico para algunas especies de bacterias que tienen una función importante en la purificación del agua (42). El 2,4-D y su metabolito, el 2,4-diclorofenol, resultan muy tóxicos en pescado y se bioacumulan en los tejidos. La WHO ha establecido, que la toxicidad varía en función de la especie y de la forma química de 2,4-D. Así el butoxietanol es altamente tóxico, siendo el salmón una especie muy sensible (47).

En plantas y suelos, tanto el MCP como el 2,4-D pueden dañar hongos beneficiosos que promueven el crecimiento de determinadas especies de plantas, que aumentan su capacidad para tomar agua y nutrientes y que las previenen de enfermedades (42). El 2,4-D disminuye además el crecimiento y la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias *Rizobium* que se encuentran en las raíces de leguminosas (47).

Por otra parte, las intoxicaciones de pesticidas pueden ser de dos tipos; *intoxicaciones agudas*, que son aquellas originadas por dosis elevadas en un intervalo de tiempo corto, e *intoxicaciones crónicas*, que son producidas por la repetida aplicación de dosis mínimas que el organismo no metaboliza ni elimina y que por tanto se van acumulando. El parámetro que indica la toxicidad aguda es la dosis letal media (LD_{50}), que expresa la cantidad de herbicida en $mg\ kg^{-1}$ de masa corporal del sujeto, capaz de provocar la muerte del 50% de la población estudiada de animales de laboratorio (7). La tabla 6 muestra la dosis letal media de los principales herbicidas fenoxiácido (17, 44, 48).

Tabla 6
Toxicidad expresada como valor LD₅₀

| HERBICIDA | LD ₅₀ Oral Aguda (mg kg ⁻¹) | | LD ₅₀ Dérmica (mg kg ⁻¹) | PELIGROSIDAD SEGÚN WHO (clase) |
|-----------------------|---|-------|--|-----------------------------------|
| | rata | ratón | ratas | |
| MCPP | 650 | 369 | >900 | Débilmente peligroso (III) |
| 2,4-DB | 370 | - | >80 | Moderadamente peligroso (II) |
| dimetil amina | 700 | - | - | Débilmente peligroso (III) |
| metil éster | 700 | - | - | Débilmente peligroso (III) |
| 2,4-D | 375 | 368 | >1600 | Moderadamente peligroso (II) |
| butil éster | 150 | - | - | Altamente peligroso (Ib) |
| metil éster* | 5628 | - | - | No presenta peligrosidad (IV) |
| iso-octil éster | 650 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| iso-propil éster | 700 | 541 | - | Moderadamente peligroso (II) |
| etil hexil éster | 500 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| butoxipropilén éster | 1500 | - | - | Débilmente peligroso (III) |
| isopropil amina | 700 | - | - | Débilmente peligroso (III) |
| dimetil y etanolamina | 300 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| MCPB | 680 | 800 | >2000 | Débilmente peligroso (III) |
| 2,4-DP | 800 | 309 | >4000 | Débilmente peligroso (III) |
| MCPA | 700 | 550 | >4000 | Débilmente peligroso (III) |
| 2,4,5-TP | 650 | - | algo irritante | Débilmente peligroso (III) |
| etil hexil éster | 500 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| 2,4,5-T | 400 | 425 | - | Moderadamente peligroso (II) |
| iso-octil éster | 350 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| trietilamina | 300 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |
| butoxipropilenglicol | 500 | - | - | Moderadamente peligroso (II) |

* 100 µg mL⁻¹ en metanol (producto comercial Chem Service Inc)

Como se puede observar en la tabla anterior, la dosis letal, LD₅₀ oral para 2,4-D (sólido) se ha estimado en 375 mg kg⁻¹, mientras que para su éster butílico (líquido) se ha determinado un valor de 150 mg kg⁻¹. Atendiendo a la clasificación de pesticidas que ha realizado la WHO de la toxicidad en función del valor de LD₅₀ oral en ratas, y que establece el nivel de peligrosidad según su estado físico (sólido o líquido) (49), se puede establecer que el 2,4-D es moderadamente peligroso, mientras que su éster butílico es altamente peligroso como consecuencia de su mayor volatilidad. Por tanto, el nivel de toxicidad depende de la forma química en que se encuentra el herbicida. En general, los herbicidas en forma de ésteres comparados con los ácidos libres, constituyen un peligro adicional puesto que se pueden acumular en los organismos acuáticos y terrestres debido a su mayor coeficiente de reparto octanol-agua (50). Además de la diferencia de toxicidad entre ácidos y ésteres, también se han descrito toxicidades diferentes entre los enantiómeros de los herbicidas fenoxiácido que presentan quiralidad (51).

3.7. LEGISLACIÓN Y CONTROL

Puesto que los pesticidas han aumentado su presencia como contaminantes a niveles traza en agua, suelo y alimentos, continua resultando esencial el desarrollo continuo de nuevos procedimientos para su determinación y control.

En los últimos años, las regulaciones sobre la producción, transporte, uso y descarga de sustancias tóxicas han aumentado considerablemente, y junto con un mejor control, han permitido disminuir la carga de polución. Sin embargo, debido al impacto medioambiental, se han publicado listas de contaminantes prioritarios y sus productos de transformación y/o degradación en medios acuáticos a través de la directiva de la UE 76/464/EEC. Los criterios para incluir un pesticida en una lista prioritaria consisten en determinar si la acción contaminante se produce a niveles cercanos a los de la salud humana. Organismos como la *FAO* y la *WHO*, han definido la ingestión diaria aceptable de un compuesto, el nivel permisible y la tolerancia residual, considerando que los residuos presentes en los alimentos no deben sobrepasar los niveles aceptados como inocuos, ni los niveles resultantes de una buena práctica agrícola (52).

Los niveles de residuos de herbicidas por encima de los cuales no se deben consumir los vegetales tratados están controlados mediante los Límites Máximos de Residuos (LMR_s) que establece cada país. En ocasiones, los niveles aceptables en un país no los son en otros, por lo que organizaciones internacionales como la UE, WHO y FAO, han intentado armonizar los diferentes valores de LMR.

La primera directiva de la UE (76/895/EEC) se publicó en 1976 y establecía LMR_s de pesticidas en frutas y vegetales. Esta directiva fue modificada y ampliada en otras de los años 1980 (80/428/EEC), 1981 (81/36/EEC), 1982 (82/528/EEC), 1988 (88/298/EEC) y 1989 (89/186/EEC). Todas ellas se referían únicamente a 64 ingredientes activos, por lo que eran las directivas nacionales las que cubrían un mayor número de pesticidas, como en el caso de España, donde la legislación contemplaba hasta 380 pesticidas. En 1990, la UE a través de su directiva 90/642/EEC, establecía que aquellos productos con contenidos de residuos superiores a los LMR_s establecidos, no podían circular entre los países miembros, y en 1991, publicó la directiva 91/414/EU, que hacía referencia a la comercialización de productos de pesticidas (53).

Las directivas de la UE no sólo especifican la máxima cantidad que puede admitirse en los alimentos, sino que también establecen el tiempo que debe transcurrir entre la aplicación del plaguicida y la recolección de la cosecha para evitar la presencia de un residuo superior al tolerable.

Los herbicidas tipo fenoxiácido, constituyen un grupo de herbicidas de traslocación ampliamente utilizado debido a su bajo coste y elevada selectividad. Como consecuencia de su toxicidad, muchos países han regulado estrictamente su utilización y su máxima concentración permitida.

En España, el Real Decreto 1138/1990, establece una máxima concentración admisible en agua potable de consumo público de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ para un compuesto individual y sus productos tóxicos de transformación, y de $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ para la suma total de pesticidas (54). Según la UE, los niveles de alerta y alarma de un pesticida individual que no deben excederse en agua superficial son 1 y $3 \mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente (55).

Los niveles permitidos en productos vegetales se encuentran legislados a través del Real Decreto 280/1994. Para juzgar las condiciones de consumo, se puede determinar analíticamente el residuo o dejar pasar los plazos estimados desde la aplicación del herbicida para que no supere el LMR establecido. Así por ejemplo, la aplicación del 2,4-D en hortalizas tiene un plazo de espera de 21 días.

En la tabla 7 se muestran los valores de LMR_s junto con el número de registro del citado Decreto (56).

Tabla 7
Límites máximos y control de residuos en productos vegetales

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Nº registro Real Decreto 280/1994</i> | <i>LMR (mg kg⁻¹)</i> |
|------------------|--|-------------------------------------|
| <i>2,4-DB</i> | 105 | 0.05 |
| <i>2,4-D</i> | 104 | 0.10 |
| <i>MCP P</i> | No aparece | 0.05 |
| <i>MCP B</i> | No aparece | 0.05 |
| <i>2,4-DP</i> | 123 | 0.05 |
| <i>MCP A</i> | 246 | 0.10 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 179 | 0.05 |
| <i>2,4,5-T</i> | 339 | 0.05 |

En el caso de los herbicidas quirales 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP, la actividad herbicida es estereoselectiva y solo el enantiomero (R)-(+) produce el efecto deseado, de forma que el empleo de mezclas racemicas de estos compuestos introduce un 50% de herbicida adicional en el medioambiente y produce una mayor contaminación (35). Por ello, y atendiendo a la diferente toxicidad de los isómeros ópticos, algunos países europeos, como por ejemplo Suiza y Holanda, han restringido la producción de MCPP al enantiomero puro activo, por lo que en estos países, desde hace más de una década, únicamente se pueden comercializar formulaciones ópticamente puras (51, 57). En lo que se refiere a España aún no se ha adoptado legislación similar.

4. MÉTODOS ANALÍTICOS DE DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO

4.1. GENERALIDADES

Debido a las bajas concentraciones permitidas por ley y a la evidencia de la toxicidad de este tipo de herbicidas, resulta necesario disponer de métodos de análisis sensibles, selectivos y de alta eficacia en la separación, que permitan controlar los niveles de concentración en diversas matrices. Inicialmente, la determinación de herbicidas fenoxiácido se llevó a cabo mediante métodos colorimétricos y espectrofotométricos, pero no se alcanzaban las sensibilidades requeridas ni se podía distinguir en muchos casos entre los compuestos originales y sus metabolitos o productos de degradación (58). En la actualidad, se han propuesto diversos procedimientos para su determinación multiresidual a niveles traza en aguas potables y naturales, suelos y en las distintas clases de alimentos, que utilizan en todos los casos técnicas cromatográficas debido a su sencillez en la preparación de muestra y a su rápida determinación (52, 58-62).

Estas técnicas, permiten alcanzar la sensibilidad y selectividad requerida para el análisis, separando y determinando simultáneamente los herbicidas fenoxiácido junto con otros herbicidas utilizados normalmente en combinación con ellos para inhibir el crecimiento de las malas hierbas de hoja ancha. Con objeto de conseguir la mejor separación cromatográfica, el menor tiempo de análisis y eliminar el problema de las interferencias polares de matriz, que en muchas ocasiones son co-extraídas con la muestra, se deben optimizar adecuadamente las condiciones de análisis (63).

El poder de penetración en la planta, la persistencia en el medio ambiente y la toxicidad de los herbicidas fenoxiácido depende, tal y como se ha puesto de manifiesto anteriormente, de cómo se encuentran formulados, por lo que resulta imprescindible el desarrollo de métodos que permitan la determinación conjunta tanto de los herbicidas en forma ácida como de ésteres. En este sentido, los estudios realizados para la determinación en forma de ésteres aislados o en combinación con las formas ácidas son muy escasos, debido a la dificultad de conservar los fenoxiácidos en su forma original durante la etapa de tratamiento de muestra. Igual de interesante resulta la separación y determinación de los distintos enantiómeros de 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP, que si bien poseen similares características físicoquímicas, sus propiedades biológicas y toxicológicas difieren de forma considerable (64), hasta el punto de que sólo el enantiómero *R*-(+) posee actividad herbicida y es responsable de la actividad auxínica (35).

Aparte de los métodos cromatográficos y de la electrocromatografía capilar, híbrido entre las técnicas cromatográficas y electroforéticas, se han utilizado otras técnicas para su determinación como los inmunoensayos y la electroforesis capilar.

4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía constituye un proceso complejo en el que se ponen de manifiesto un elevado número de interacciones selectivas que hacen posible la separación y resolución de los distintos componentes en muestras relativamente complejas (65). Debido a su capacidad para separar y cuantificar compuestos con estructuras moleculares similares, los métodos cromatográficos, y en particular la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos de alta eficacia, han llegado a ser los más importantes en el análisis de herbicidas fenoxiácido. Aunque estos compuestos se pueden separar mediante cromatografía en capa fina y cromatografía en papel (66), la baja reproducibilidad de estos métodos ha limitado considerablemente su aplicación.

La *cromatografía en capa fina* fue muy utilizada entre 1960 y 1970 (67) y en algunos casos más recientes, se ha utilizado como una herramienta económica de diagnóstico o “*screening*” para determinar residuos de herbicidas fenoxiácido en agua mediante detección bioquímica por inhibición de la *Reacción de Hill*, a niveles de concentración comprendidos entre 0.1 y 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (68, 69). Esta reacción, constituye una de las principales etapas del proceso fotosintético en las plantas y se puede

visualizar en un cromatograma de capa fina (70). Los metabolitos y productos de degradación de los herbicidas no inhiben el sistema enzimático de los cloroplastos aislados, mientras que los herbicidas en función de su capacidad inhibidora de la *Reacción de Hill* se clasifican en inhibidor fuerte, débil o no inhibidor, lo que permite confirmar su presencia (49).

4.2.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES. APLICACIONES AL ANÁLISIS DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO.

La cromatografía de gases constituye en la actualidad una técnica versátil, muy sensible, selectiva y adecuada para el análisis de residuos de herbicidas en una amplia variedad de muestras medioambientales, debido a su elevado poder de resolución y número de detectores disponibles. A diferencia de la cromatografía de líquidos utiliza como fase móvil gases inertes, lo que permite disminuir la contaminación medioambiental (71).

Por lo general, la separación de residuos de herbicidas fenoxiácido se ha llevado a cabo con columnas capilares (WCOT) de 0.2 mm de diámetro interno y longitudes comprendidas entre 12 y 25 m (72), con fases estacionarias enlazadas polares como CP Wax, no polares como Ultra-1, de polaridad media como DB-1701 y CP Sil 19 (73) y de baja polaridad como SE-54, Ultra-2, CP Sil 8, BP-1, HP-1, DB-1, BP-5, HP-5 ó DB-5 (72, 74).

En cuanto a los sistemas de detección, tradicionalmente se han utilizado detectores de captura electrónica (ECD) y de ionización de llama (FID) debido a su alta eficacia de separación y su elevada sensibilidad, si bien en la actualidad, la espectrometría de masas se considera la técnica de detección más sensible y selectiva al proporcionar información estructural (58).

Sin embargo, su determinación mediante GC es un procedimiento complicado puesto que su naturaleza polar hace que se adsorban a la fase estacionaria y se produzca asimetría de pico (75), su baja estabilidad térmica que aumente el riesgo de degradación a otros productos (76) y su baja volatilidad debido al enlace de hidrógeno del grupo carboxílico, que no se puedan determinar directamente y se deban llevar a cabo *reacciones de derivatización* a compuestos menos polares, más volátiles y térmicamente estables, que hagan posible su resolución y mejoren la separación cromatográfica en términos de simetría de pico (77).

En estas reacciones de derivatización, se reemplazan los hidrógenos ácidos por grupos no polares antes del análisis cromatográfico mediante reacciones de silanización, alquilación y esterificación, formándose como derivados más comunes los trimetilsililéteres, metiléteres y metilésteres. En general, la silanización no es satisfactoria a niveles traza porque la sensibilidad que producen los silil-derivados es insuficiente, además de que este tipo de reacciones requieren temperaturas de unos 50 °C y tiempos de reacción de aproximadamente 4 horas.

Para llevar a cabo la *alquilación*, se utiliza frecuentemente diazometano como disolvente, tal y como recomienda la EPA en los métodos 515.3 y 8151 para la determinación de herbicidas fenoxiácido en suelos, aguas potables y de desecho. Estas reacciones, suelen ser laboriosas y largas en el tiempo, por la necesidad de formación de diazometano a partir de sus precursores y de limpieza después de la metilación. En muestras de agua, los analitos se transfieren normalmente a una fase orgánica donde se lleva a cabo la alquilación, de forma que son muy escasas las aplicaciones en las que la metilación se realiza directamente en la matriz de agua. En estos casos y con técnicas estáticas de espacio de cabeza, se ha utilizado dimetilsulfato junto con tetrabutilamonio para activar los analitos durante su proceso de metilación in situ (75). También se ha utilizado con herbicidas fenoxiácido la técnica de transferencia de fase catalizada, donde la extracción y la reacción de alquilación ocurren simultáneamente. Esta técnica, se lleva a cabo en un sistema bifásico por compresión de la muestra acuosa a pH elevado y un disolvente no miscible en agua, en presencia de una agente complejante adecuado como sales ternarias de alquilamonio, transfiriéndose a continuación a la fase orgánica donde tiene lugar la reacción (78).

En aguas, se han determinado residuos de estos herbicidas mediante GC-ECD previa derivatización a metil, 2-cloroetil, 2,2,2-tricloroetil y pentafluorobencil ésteres (73). La formación de metilésteres a partir de herbicidas fenoxiácido se ha llevado a cabo con disolventes caros, tóxicos, carcinogénicos y explosivos que requieren condiciones cuidadosas de manipulación, como diazometano (79-81), ácido sulfúrico con MeOH o PrOH, BF₃ en BuOH ó 2-cloroetanol (82) y BF₃ en MeOH (83, 84). Para evitar la derivatización con estos agentes peligrosos, se han empleado otros métodos que además disminuyen los desechos generados de disolvente y simplifican la preparación de muestra. De esta forma, se ha llevado a cabo la esterificación in situ

utilizando DMS para la metilación y sales de TBA como agentes de par iónico en muestras de agua, seguida de LLE y determinación mediante GC-MS con inyección de grandes volúmenes en columna (75). Por otro lado, se han determinado a niveles traza en muestras de agua mediante introducción directa de la muestra y derivatización en el puerto de inyección con reactivos de par iónico como las sales de TBA (82).

La *pentafluorobencilación* con PFBB es una técnica de derivatización muy adecuada para mejorar la sensibilidad, puesto que los derivados bromados proporcionan una respuesta elevada a los detectores de captura electrónica (85). Por ello, cuando se requieren bajos límites de detección en el análisis mediante GC-ECD y solamente es admisible un intervalo estrecho de cuantificación, resulta muy adecuada su utilización. Otros reactivos utilizados en la derivatización de herbicidas fenoxiácido son trifluoroetilo, cloruro acético y iodoetano. Su análisis en suelos y aguas mediante GC-NPD, también se ha llevado a cabo utilizando 2-cianoetildimetildietilaminasiloxano (CEDMSDEA) como agente derivatizante, con la ventaja de que el derivado se forma instantáneamente y se puede detectar con el detector de NPD, que es más sensible y selectivo que el detector de ECD (67).

Como consecuencia de estas reacciones de derivatización, el tiempo de análisis y el tratamiento de la muestra se incrementan considerablemente. Además, cuando se pretende distinguir y determinar simultáneamente herbicidas en forma ácida y de ésteres, la cromatografía de gases no resulta adecuada, por lo que en este caso, se debe recurrir necesariamente al empleo de técnicas de cromatografía de líquidos.

En la tabla 8 se muestran algunos de los métodos publicados para la determinación de herbicidas fenoxiácido mediante GC.

Tabla 8
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de gases

| <i>HERBICIDA</i> | <i>FASE ESTACIONARIA</i> | <i>GAS PORTADOR</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|---|---------------------|--|---|---|---|------------|
| 2,4-D, MCPA MCPD | BP-1 (100% dimetil- polisiloxano) | He | MS (EI) | 0.005 µg/g (suelo) 0.04 µg/g (plantas) | Derivatización BF ₃ -MeOH Limpieza mediante LLE (cromatograma de iones totales) | suelo Rec. >80% SD < 13% plantas Rec. > 95% SD < 10% | (86) |
| MCPD, MCPA 2,4-D 2,4-DP 2,4,5-T, 2,4,5-TP 2,4-DB, MCPB | - | He (99.999%) | MS (EI) (modo iones seleccionados) | 1-10 ng/L | Derivatización PFBB Limpieza mediante SPE con cartuchos C ₁₈ 1g | agua Rec.: 53-104% RSD: 5-16 % | (87) |
| fenoxiácidos | - | - | MS | 0.1-1 µg/L | SPME inmersión directa manual fibra de polidimetilxiloxano- DVB 100µm | agua ultrapura | (88) |
| | | | | 0.03-1.5 µg/L | SPME inmersión directa manual fibra polidimetilxiloxano 65µm | | |
| 2,4-D | HP-1 (100% dimetil- polisiloxano) | - | ECD | 0.05 µg/g | Derivatización BF ₃ -MeOH Extracción con etanol-agua Limpieza LLE-columna fluorisil | trigo | (58) |
| | DC-200 (100% dimetil- polisiloxano) | | | 0.01 µg/g | Derivatización BF ₃ -MeOH Extracción con ACN-agua Limpieza mediante LLE | naranjas pomelo | |
| MCPD | Dexil 300 | - | ECD | 0.05 µg/g | Derivatización con BF ₃ -MeOH Extracción con NaOH 0.1 M Limpieza LLE-columna fluorisil | cebada | |

Tabla 8 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de gases

| <i>HERBICIDA</i> | <i>FASE ESTACIONARIA</i> | <i>GAS PORTADOR</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|---|----------------------|-------------------------|------------|---|------------------------------------|------------|
| 2,4-D | DB-1701 (14%cianopropilfenil- metilpolisiloxano) | - | MS | 0.2 µg/g | Derivatización BF ₃ -MeOH Extracción con MeOH | naranjas | (58) |
| | DB-5 (5% fenil- metilpolisiloxano) | - | ECD | 10 µg/g | Derivatización con DCM Extracción MeOH-agua Limpieza cartucho C ₁₈ | frutas y patatas | |
| MCPP, 2,4-D | OV-17 (50% fenil- metilpolisiloxano) QF-1 (trifluoropropilmetil- polisiloxano) | - | ECD | 0.005 µg/g | Derivatización con DCM Extracción con MeOH Limpieza LLE fluorisil | Trigo cebada | |
| Formas R-S de MCPP,2,4-DP | β-CD permetilada | He (1 mL/min) | MS (trampa de iones) | - | Extracción MeOH-agua-HAc Derivatización BF ₃ -MeOH | suelos | (33) |
| fenoxiácidos | HP-5 (5% fenil-95% metilsiloxano) | - | MS | < 1ng/L | Derivatización con PFBB | agua | (72) |
| 2,4-D, MCPP | | He | MS | 0.1 µg/g | SPE cartuchos C ₁₈ | suelo Rec.: 90% | (89) |
| MCPP, 2,4,5-T | - | - | MS | 0.1 µg/L | SPE Sep-pack C ₁₈ | Agua Rec.: 63-98% | (90) |
| 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4,5-TP | DB-1701 | MeOH/CO ₂ | ECD | 0.3 ng/L | Preextracción con CO ₂ supercrítico | polvo de casa | (91) |
| 2,4-D | DC-200 | N ₂ | FID | 0.069 µg/g | Derivatización BF ₃ -MeOH | suelo | (92) |
| MCPP, MCPA, 2,4-DP,2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPB, ésteres de 2,4-D, | HP-5 (5% fenil-95% metilsiloxano) | N ₂ | FID | 6-26 µg/Kg | Esterificación con MeOH y H ₂ SO ₄ . Niveles: 5 µg/mL (fenoxiácidos), 10 µg/mL (ésteres 2,4-D) | suelo Rec.: 76-97% S.D: 4-7% | (93) |

Tabla 8 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de gases

| <i>HERBICIDA</i> | <i>FASE ESTACIONARIA</i> | <i>GAS PORTADOR</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---------------------------------|--|---------------------|--|------------------|--|---------------------------------------|------------|
| MCPB 2,4,5-T 2,4-D,MCPP | OV-17 (50% fenil- metilpolisiloxano) | - | MS | 0.5-1.5 µg/Kg | Iones seleccionados; m/z 267 (MCPB), m/z 394 (MCPP), m/z 400 (2,4-D), m/z 434 (2,4,5-T) | 20 g de suelo de campo de arroz | (94) |
| MCPP | Chromosorb W 5% Dexil | He (35 mL/min) | ECD | - | Derivatización BF ₃ -MeOH Extracción e hidrólisis alcalina Limpieza con fluorisil | cebada | (95) |
| 2,4-D | Ultra-Bond 20 Mm | He (40 mL/min) | ECD ³ H ⁶³ Ni | - | Derivatización BF ₃ -MeOH Extracción con NaOH Limpieza con fluorisil | trigo Rec.: 83-88 % | (84) |
| fenoxiácidos | DB-1 (100%dimetil- polisiloxano | - | MS | 0.2 µg/L | Derivatización con DCM | agua | (96) |
| | OV-17, Carbowax* | - | ECD | del orden ng | Derivatización con BCl ₃ -butilalcohol | suelo, agua | (72) |
| | OV-17, DC-200 | - | ECD | 0.01 µg/g | Derivatización con BCl ₃ -2cloroetanol | suelo | (72) |
| | Rtx-1 (100% dimetil- polisiloxano) | - | ECD | 2 pg | Derivatización H ₂ SO ₄ -trifluoroetanol | suelo | (72) |
| 2,4-D 2,4-DP MCPP MCPA | BP-5 (5% fenil-95% metilsiloxano) | He (10 mL/min) | FID | - | Derivatización con isoocetil, 2- butoxietil, isobutil alcohol y cloruro acético como catalizador Identificación con detección de trampa de iones en columna BP-1 | - | (97) |
| fenoxiácidos | DB-XLB (100% fenilmetil- polisiloxano) | He | MS | 10-60 ng/L | Derivatización in situ con dimetilsulfato Catalizador sales de TBA | agua | (75) |

* fase estacionaria de polietilenglicol

Tabla 8 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de gases

| <i>HERBICIDA</i> | <i>FASE ESTACIONARIA</i> | <i>GAS PORTADOR</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|--|-------------------------------|----------------------------|--|--|---|--------------------|
| 2,4,5-TP 2,4,5-T 2,4-D | DB-5MS (5%fenil- metilpolisiloxano) | - | MS (trampa de iones) | 0.1-0.2 µg/L | Extracción en cartucho GCB y ENVI-carb. Derivatización en línea con TBA-H ₂ SO ₄ o TMA- H ₂ SO ₄ en el puerto de inyección Introducción directa de muestra con grandes volúmenes (10-20 µL) | 500 mL agua Rec.: 70-99% RDS; 1-13 % | (82) |
| MCP MCPA MCPB, 2,4,5-T 2,4-D 2,4-DP | HP-5 (95%metilsiloxano entrecruzado con 5% fenilsilicona) | He (0.98 mL/min) | MS | 1-18 µg/Kg | Extracción con acetona Limpieza mediante cromatografía de permeación en gel Derivatización mediante silanización con trimetilsilildiazometano Modo de iones seleccionados | césped | (98) |
| 2,4-D MCP MCPA | Glas Chrom Q con 3% Silar 10 CP | N ₂ (15 mL/min) | ⁶³ Ni-ECD | 0.1 µg/L (agua) 0.5-1.0 µg/L (sedimentos) | Derivatización a pentafluorbencil ésteres | agua sedimentos | (99) |
| 2,4-D 2,4,5-T | OV-101 (100%dimetil- polisiloxano) | - | ⁶³ Ni-ECD | - | Derivados metilados | alimentos Rec.: 53-93·% | (99) |
| fenoxiácidos | PTE-5 (5%fenil- metilpolisiloxano) SE-54 (5%fenil- metilpolisiloxano) | He He | MS ECD | - 100 ng/L | Derivados metilados Empleo de estándar interno Derivatización a metil, butil y etil ésteres | suelos aguas subterráneas | (100) (101) |

Tabla 8 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de gases

| <i>HERBICIDA</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>GAS PORTADOR</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|---|---------------------|----------------------------|--|--|----------------------|------------|
| fenoxiácidos | Ultra-2 (5%fenil-metilpolisiloxano) DB-1701 (14%cianopropilfenil-metilpolisiloxano) | - | MS ECD | 0.02-0.05 µg/L | Ácido diclorobenzoico como estándar interno Derivatización a pentafluorobencil ésteres | agua superficial | (99) |
| fenoxiácidos junto con otros herbicidas ácidos | HP-5 (5% fenil-95% metilsiloxano) | He | MS | 1-10 ng/L | Precolumna HP-5 Detección de iones múltiples | agua de bebida | (102) |
| 2,4,5-T MCPA | BP-5 (5%fenilmetilsilicona) | He | ⁶³ Ni-ECD MS | 0.4-4 nmol/L | Derivatización con H ₂ SO ₄ -trifluoroetanol a trifluoroetil ésteres | agua | (103) |
| fenoxiácidos | DB-5 (5% fenil-95% metilsiloxano) | He | MS | - | Derivados metilados | Aguas Delta del Ebro | (104) |
| MCPA 2,4-D 2,4,5-T | DB-17 (50%fenilmetil-polisiloxano) | - | MS | 0.003 µg/g | Extracción doble Derivatización con DCM Antraceno como patrón interno | suelos | (105) |
| 2,4-DP MCPA 2,4-D 2,4,5-T | SE-54 (5%fenil-metilpolisiloxano) | He | MS | 100 ng/Kg de filete (150 ng/Kg 2,4,5-T) 3 ng/g lípido (4 ng/g 2,4,5-T) | Extracción Soxhlet GPC Metilación Limpieza en sílica gel | pescado | (106) |

4.2.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA EFICACIA

4.2.2.1. Consideraciones generales

La cromatografía de líquidos es una técnica muy utilizada en el análisis de pesticidas, especialmente cuando los compuestos de interés son poco volátiles o térmicamente inestables y en consecuencia, no se pueden determinar mediante técnicas de cromatografía de gases. El análisis de residuos en aguas, suelos y alimentos suele llevarse a cabo con columnas de fase inversa C_{18} o C_8 , fases móviles acuosas y detección UV, fluorescente, con matriz de diodos o MS (53). Aunque algunas de sus principales desventajas son la falta de sensibilidad y la dificultad de acoplamiento con otras técnicas, como la espectrometría de masas, la cromatografía de líquidos es una técnica selectiva que permite la introducción directa de muestras acuosas y la determinación de compuestos muy polares y de ácidos carboxílicos libres sin previa derivatización (85). Así la capacidad y utilidad de HPLC comparada con GC, se debe en gran medida al amplio intervalo de modos de adsorción disponibles y a la facilidad de modificar radicalmente la naturaleza química y el poder eluotrópico de la fase móvil.

Sin embargo, en esta técnica de separación, la demanda de métodos rápidos, poco costosos, que proporcionen una resolución adecuada y que consuman bajos volúmenes de disolvente es continua. Puesto que para aumentar la resolución en HPLC es necesario que la transferencia de masa entre el material de empaquetamiento y la fase móvil sea rápida, los principales avances se han fundamentado en el desarrollo de materiales de soporte eficaces de diámetro de poro controlado entre 50 y 150 Å, con partículas esféricas enlazadas a una capa orgánica polar o hidrofóbica de 5 ó 10 μm .

Debido a que la disminución del tamaño de partícula a un valor inferior a 5 μm mejora la eficacia del lecho cromatográfico y permite obtener un elevado número de platos teóricos por metro, se han desarrollado columnas empaquetadas con partículas de 3 μm , con las que el volumen de la célula del detector debe ser $\leq 10 \mu\text{L}$ y el de los acoplamientos con la columna el mínimo posible, para evitar una pérdida excesiva de resolución de los picos cromatográficos (65). La utilización de empaquetamientos de partículas de 3.5 μm y fritas de tamaño de poro 2 μm , ha proporcionado una eficacia de separación adecuada y columnas con tiempos de vida largo (107).

En la tabla 9 se muestran las características de algunas de las columnas disponibles comercialmente en HPLC (108).

Tabla 9
Principales características de algunas columnas de cromatografía de líquidos

| TIPO | DIÁMETRO INTERNO (mm) | LONGITUD (cm) | TAMAÑO DE PARTÍCULA (μm) |
|------------------------------------|--------------------------|------------------|--|
| <i>Nano</i> | 0.100 | 5-15 | 3-5 |
| <i>Capilar</i> | 0.150-0.500 | 5-15 | 3-5 |
| <i>Microbore</i> | 1.0-2.1 | 15-25 | 3-8 |
| <i>Analítica</i> (convencional) | 3.0-4.6 | 3-25 | 3-10 |
| <i>Semipreparativa</i> | 8-10 | 10-25 | 5-20 |
| <i>Preparativa</i> | 20-50 | 10-25 | 5-20 |

4.2.2.2. Efecto de la temperatura en la separación

Desde que HPLC de fase inversa se consolidó como una técnica de separación, muchos cromatografistas reconocieron la ventaja de modificar la composición de fase móvil para controlar la selectividad, aunque el efecto de la temperatura en la retención era conocido desde el año 1970 (109). La elevada sobrepresión de la columna en cromatografía de líquidos comparada con la cromatografía de gases o de fluido supercrítico disminuye la eficacia de la separación. Sin embargo, el aumento de temperatura produce una mejora considerable, ya que la disminución de la viscosidad de la fase móvil permite la utilización de caudales mayores, y el incremento de la difusión del analito el empleo de fases estacionarias de menor tamaño de partícula o de columnas más largas con un mayor número de platos (110).

Tradicionalmente el control de la temperatura no ha sido muy utilizado, salvo en cromatografía de exclusión por tamaño con polímeros de baja solubilidad, debido a los problemas asociados a la aplicación de gradientes de temperatura, razón por la cual se han utilizado en mayor medida los gradientes de composición de fase móvil (111). Además, el interés por el empleo de temperaturas elevadas en medios acuosos ha sido moderado por el temor a la descomposición de los analitos y de las fases estacionarias, pero en los últimos años, el desarrollo de fases de zirconio, carbono grafitizado, partículas rígidas de PS-DVB y sílice polidentada, estables a temperaturas superiores de 60°C, ha permitido la utilización de temperaturas de hasta 225°C con las fases estacionarias de PS-DVB y de 200°C con las de zirconio recubiertas de una capa de polibutadieno (110, 112).

Respecto a la instrumentación disponible, se han utilizado calentadores en bloque de columna que al no ser capaces de transferir el calor de forma rápida, reproducible y eficaz a la fase móvil y al interior de la columna convencional de HPLC (4.6 mm I.D), hacen necesario el precalentamiento de la fase móvil con objeto de evitar que se caliente y avance más rápidamente a lo largo de las paredes que en el centro, produciéndose desequilibrios térmicos y en consecuencia, ensanchamientos de pico a temperaturas inferiores a 80°C. El calor procedente de hornos de aire de convección forzada también es insuficiente por si solo para calentar la fase móvil a la misma temperatura de la columna, puesto que las columnas utilizadas son menores en masa u operan a caudales menores. Para precalentar la fase móvil, los intercambiadores pasivos de calor a diferencia de los baños líquidos han resultado efectivos, si bien ninguno de los dos proporciona respuestas rápidas. Actualmente se encuentra disponible nueva instrumentación para trabajar con columnas convencionales y temperaturas de hasta 200°C (110). En estas columnas, la diferencia de temperatura con la fase móvil debe ser menor de 7°C para evitar el ensanchamiento de pico, que depende tanto de la diferencia de temperatura, como del diámetro de la columna (112).

En cromatografía de líquidos, la temperatura controla la retención (k), el factor de separación (α), la presión del sistema y estabilidad de la columna, por lo que su influencia se ha utilizado para optimizar la resolución con un elevado número de muestras. El efecto de la temperatura en la altura de plato ha sido estudiado por Giddings, que ha establecido que al disminuir el coeficiente de difusión, para la mayoría de los caudales utilizados rutinariamente en HPLC, disminuye el ancho de pico y aumenta el número de platos (109). Además, puesto que la velocidad lineal óptima de la ecuación de van Deemter es mayor a temperaturas elevadas, los tiempos de análisis disminuyen considerablemente. Como regla general, la retención puede cambiar entre un 1-3% por cada cambio de 1°C en la temperatura, por lo que para obtener tiempos de retención reproducibles resulta necesario su control (113). En algunas ocasiones se han observado efectos inversos, es decir, mayor retención a mayor temperatura, lo que se ha atribuido a interacciones secundarias, ionización reducida o baja solubilidad en la fase móvil (112).

Los efectos de la temperatura y los cambios de la composición de la fase móvil son más pronunciados en muestras iónicas y analitos con sustituyentes polares.

La temperatura afecta al grado de ionización de la muestra, al pK_a de sus componentes, a la retención hidrofóbica de los analitos iónicos, a las interacciones de las especies iónicas con los grupos silanol y al pH de la fase móvil (113). Con columnas de sílice se ha observado asimetría de pico en analitos con grupos básicos, debido a las interacciones secundarias que se pueden producir con los grupos silanol residuales. Por otro lado, la selectividad de los ácidos carboxílicos puede disminuir a temperatura elevadas con tampones de pK_a menor que el de los solutos y aumentar con tampones de pK_a mayor. En general, los compuestos ionizables mejoran su selectividad a temperaturas elevadas con valores de pH de fase móvil elevados. El hecho de que la selectividad disminuya a alta temperatura no implica una disminución de resolución, aunque en tal caso, la mejora en el ancho y simetría de pico puede ser más importante que el cambio de selectividad (112).

En general, los efectos observados por cambios de temperatura o de composición de fase móvil son complementarios y ortogonales unos de otros, por lo que a menudo es posible su combinación. En ocasiones, los cambios de temperatura pueden resultar más convenientes que los de disolvente o pH (109), puesto que comparados con el gradiente de composición de fase móvil, cuando se utilizan detectores de MS, la relación masa/carga y la abundancia de los fragmentos de iones permanece más constante. Sin embargo, cuando se utilizan detectores de UV, debido a la dependencia de los índices de refracción de algunos disolventes con la temperatura, se pueden producir problemas en la línea base, aunque en los sistemas de fase inversa donde normalmente se utilizan mezclas acuosas de MeOH o AcN, los efectos observados son menores (112).

En las columnas convencionales de HPLC, la transferencia de calor no es tan efectiva como en las columnas de diámetro interno reducido, de forma que las separaciones, al ser difícil el desarrollo de programas de temperatura, se han optimizado fundamentalmente en condiciones isotermas a temperatura elevada. Con microcolumnas, el empleo de gradientes térmicos es habitual y constituye en la actualidad una alternativa importante a los gradientes de elución para controlar la separación y la retención.

Una herramienta útil para predecir y optimizar la separación de muestras complejas es la simulación computacional, que permite estudiar la separación en función de las diferentes condiciones experimentales y de la temperatura de la columna (114-116).

4.2.2.3. Desarrollo de nuevas fases estacionarias en HPLC

Tradicionalmente los empaquetamientos basados en sílice han sido los más utilizados en HPLC, puesto que su superficie se puede modificar con una gran variedad de fases y por tanto, permite introducir diferentes funcionalidades (65).

Además de los materiales de sílice, se emplean empaquetamientos de partículas porosas poliméricas de PS-DVB en prácticamente todo el intervalo de pH, esferas porosas de carbono negro grafitizado y en los últimos años, materiales basados en zirconio, especialmente estables a temperaturas elevadas (108). Recientemente se han sintetizado *fases estacionarias monolíticas* de sílice o de polímeros orgánicos con propiedades únicas, mediante procesos sencillos de polimerización in situ o consolidación dentro del entubado de la columna. Estos materiales constan de esqueletos interconectados entre sí, que generan estructuras porosas unitarias y continuas que se pueden considerar una sola pieza. La estructura porosa del empaquetamiento es bimodal, con grandes canales para el flujo y pequeños poros para la adsorción. Debido a su elevada relación tamaño de poro/tamaño de esqueleto, este tipo de columnas resultan muy permeables, por lo que comparadas con las de partículas empaquetadas, disminuyen la longitud de los caminos de difusión, la resistencia de flujo y proporcionan mayores eficacias. Además, se pueden utilizar a caudales elevados como consecuencia de su baja sobrepresión, lo que aumenta su estabilidad y vida media. Optimizando la relación de los poros con la porosidad total y la anchura del esqueleto, se pueden obtener separaciones a velocidades de flujo significativamente más elevadas, debido a la adsorción y desorción acelerada de los solutos.

Las *columnas monolíticas en base sílice* constan de un esqueleto de sílice que contiene mesoporos de aproximadamente 13 nm y macroporos de diámetro 2 μm , que permiten el transporte del analito a baja presión hasta la superficie activa para conseguir la separación cromatográfica, tal y como se muestra, a modo de ejemplo, en la figura 5.

Su elevada porosidad externa en comparación con las columnas convencionales, da lugar a una permeabilidad de 2 a 30 veces mayor que la de una columna empaquetada con partículas de 5 μm . Para obtener una elevada eficacia de separación en un tiempo corto, se ha reducido el tamaño de poro y esqueleto, y para aumentar el área superficial del material poroso, se ha incrementado el número de microporos con diámetros pequeños de 2 nm y de mesoporos (2-50 nm), llegando siempre a un compromiso con la resistencia al flujo de fase móvil.

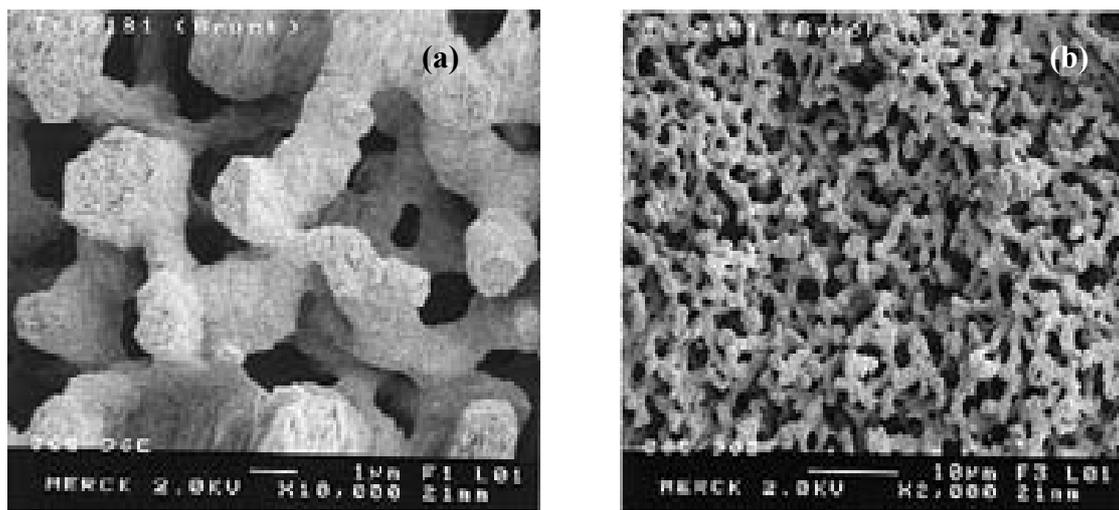


Figura 5. Mesoporos (a) y macroporos (b) del esqueleto en base sílice de la columna monolítica Chromolith™ RP-18 (MERCK).

Para la preparación de los monolitos de sílice se ha utilizado fundamentalmente el proceso sol-gel, que permite construir estructuras uniformes del monolito, mediante policondensación hidrolítica de un alcoxisilano, como por ejemplo tetrametoxisilano o tetraetoxisilano, en presencia de polímeros orgánicos solubles en agua y un catalizador adecuado, como el ácido acético. La adición de aditivos como el polietilenglicol, permite controlar el tamaño y volumen de los macroporos en el gel.

Los principales problemas que presentan las columnas monolíticas en base sílice, se deben a las discontinuidades radiales asociadas a la fabricación y a las discontinuidades axiales producidas por la inestabilidad del empaquetamiento. Cuanto mayor es el diámetro de la columna, mayor es la discontinuidad y en consecuencia el efecto adverso en la eficacia de la columna.

Las *fases monolíticas poliméricas* se hinchan con disolventes orgánicos, lo que limita su estabilidad. Además, debido a la alta proporción de poros de gran tamaño en el volumen total, poseen un área superficial baja y en consecuencia, también menor capacidad. Su preparación es muy sencilla y se basa en la reacción de polimerización de una mezcla de monómeros mediante inicialización térmica o fotoquímica.

En este tipo de fases, la presencia de microporos en la estructura puede disminuir la eficacia de la columna y aumentar la asimetría de pico (117).

4.2.2.4. Separaciones quirales

La quiralidad es una característica muy importante a tener en cuenta en muchos compuestos farmacéuticos, moléculas biológicas y agroquímicos, puesto que a menudo solo uno de sus isómeros posee la actividad deseada y no produce efectos adversos.

En el caso de la industria agroquímica, alrededor del 25% de los productos comercializados poseen centros quirales y son producidos y utilizados como mezclas racémicas. Por ello, en los últimos años, los avances en el campo de las separaciones enantioméricas han sido considerables, no solo para determinar la pureza óptica, sino también para obtener isómeros ópticos a gran escala.

Hasta la mitad de los años ochenta, los empaquetamientos y las fases estacionarias disponibles no permitían la separación de mezclas racémicas, puesto que los enantiómeros al poseer idénticas propiedades físicas y químicas, no se podían distinguir mediante técnicas cromatográficas. Por ello, las separaciones quirales se basaban en la derivatización en una precolumna de los isómeros D y L del racémico con un reactivo asimétrico ópticamente puro, con el objeto de obtener una mezcla de diastereoisómeros con distintas propiedades físicas, que si se podían separar mediante HPLC de fase normal o inversa. Sin embargo, estos procedimientos no resultaban sencillos, puesto que a menudo, las proporciones de reacción de los enantiómeros eran diferentes y los diastereoisómeros se formaban en distintas proporciones a las de los enantiómeros presentes en el racémico.

La introducción de fases estacionarias quirales desde el año 1980 permitió la resolución directa de los enantiómeros por formación de diastereoisómeros temporales entre los enantiómeros de la muestra y la fase estacionaria, constituyendo las diferencias de estabilidad de los diastereoisómeros formados la base de la separación, puesto que aquel enantiómero que forma el complejo menos estable es el primero en que se eluye de la columna (65). En la actualidad, se han comercializado más de 100 CSP_s. Normalmente, se utilizan partículas poliméricas o de sílice como materiales soporte a los que se une física, covalente o iónicamente la fase estacionaria quiral.

La capacidad de un analito y de la fase para formar un complejo transitorio depende de la formación de enlaces de hidrógeno, de interacciones π - π , dipolos, interacciones estéricas y complejos de inclusión.

Para que dos enantiomeros se resuelvan es necesario que ocurran un mínimo de tres interacciones, una de las cuales debe ser al menos estereoquímicamente dependiente. La capacidad de los métodos de HPLC para separar dos enantiomeros se mide a través la enantioselectividad (α), que debe tener un valor superior a 1.1 (108).

En algunos casos, la separación también depende de la temperatura, del pH y de la naturaleza del tampón de la fase móvil. Como consecuencia de la interacción de la fase móvil con los diferentes sitios de enlace disponibles en la fase estacionaria o en las moléculas de los enantiomeros, se han observado inversiones en el orden de elución. Por otra parte, la temperatura puede producir cambios conformacionales en la estructura de las CSPs, lo que afecta a la geometría de los centros responsables de la discriminación estérica y puede producir cambios en la selectividad (118).

□ Fases estacionarias

Actualmente se encuentran disponibles una amplia variedad de fases estacionarias quirales, entre las cuales cabe destacar las descritas a continuación (108).

Tabla 10
Principales fases estacionarias quirales

| <i>TIPO</i> | <i>MECANISMO DE RECONOCIMIENTO</i> | <i>CARACTERÍSTICAS DEL ANALITO</i> | <i>FASE MÓVIL</i> |
|-----------------------------------|--|--|------------------------------------|
| <i>Proteínas</i> | Interacciones hidrofóbicas y electrostáticas | Grupos ionizables, grupos aromáticos | Solo RP |
| <i>Ciclodextrinas</i> | Inclusión-complejación, enlaces de hidrógeno | Grupos aromáticos y polares | RP, NP |
| <i>Polisacáridos</i> | Inclusión-complejación, interacciones atractivas | Capacidad de formación de enlaces de hidrógeno | RP, NP |
| <i>Tipo Pirkle</i> | Enlaces de hidrógeno, dipolos, interacciones π - π | Capacidad de formación de enlaces π o hidrógeno | Sobre todo NP, RP menor resolución |
| <i>Intercambio de ligandos</i> | Complejos de coordinación a metales | α -amino o α -hidroxiaminoácidos | RP |
| <i>Antibióticos macrocíclicos</i> | Enlaces de hidrógeno, dipolos, interacciones π - π , impedimentos estéricos, interacciones hidrofóbica | Capacidad de formación de enlaces π , dipolos o enlaces de H | RP, NP |

a) Proteínas inmovilizadas

Algunas proteínas como la albúmina de suero humano y bovino, α -glicoproteína, ovomucoide, celulasa y pepsina se han enlazado covalentemente a soportes poliméricos y de sílice para formar CSP_s comercialmente disponibles. Como principal ventaja cabe destacar su compatibilidad con fases móviles acuosas tamponadas, aunque los mecanismos de separación son complejos por la diversidad de las características estructurales de la proteína, sus conformaciones y el número de centros quirales que presentan. Las principales interacciones que se ponen de manifiesto son las hidrofóbicas y electrostáticas, aunque las interacciones de transferencia de carga, los enlaces de hidrógeno y la inclusión en la estructura tridimensional de la proteína también pueden contribuir a la selectividad quiral. Además, puesto que la proteína inmovilizada posee un determinado valor de punto isoeléctrico, el pH de la fase móvil se puede utilizar para controlar la retención.

Con fases móviles acuosas, la retención disminuye con el incremento de temperatura y aumenta con la proporción de modificador orgánico (118). Las principales propiedades de las proteínas más utilizadas en separaciones quirales se muestran en la siguiente tabla (108).

Tabla 11
Principales características de las proteínas utilizadas en las CSP_s comerciales

| Proteína | Peso (Da) | Punto isoelectrico | % carbohidrato | Puentes moleculares S-S |
|----------|-----------|--------------------|----------------|-------------------------|
| BSA, HSA | 66000 | 4.7 | - | 17 |
| AGP | 141000 | 2.7 | 45 | 2 |
| OVM | 28800 | 3.7-4.5 | 30 | 8 |
| CBH | 64000 | 3.9 | 6 | 12 |
| Pepsina | 34600 | <1 | - | 3 |

b) Polisacáridos

Los derivados de celulosa y amilosa exhiben excelentes propiedades como CSP_s. Contienen unidades de cadenas lineales de glucopiranosas enlazadas unas a otras mediante enlaces 1,4-glicosídico, que se agregan en estructuras regulares con propiedades cristalinas y una estructura helicoidal ordenada (65). La mayoría de las columnas comercialmente disponibles se utilizan en modo normal y poseen una eficacia moderada, normalmente inferior a las de proteína. Algunas de las ventajas que presentan

son su alta capacidad de carga y la facilidad para llevar a cabo separaciones preparativas, aunque la mayoría de ellas requieren muestras y disolventes libres de agua.

El mecanismo de retención en este tipo de fases estacionarias depende de factores como el grupo funcional del derivado de polisacárido, el peso molecular promedio, la distribución de peso molecular del polímero, el disolvente utilizado para depositar el polímero en el soporte, la naturaleza del soporte y el grado de cristalinidad del derivado de polisacárido. Los derivados de celulosa como los de carbamato y éster bencílico (Ej; Chiralcel OD, OJ) y los de amilosa (Ej; Chiralpak AD), han resultado muy eficaces para la separación de agroquímicos y compuestos farmacéuticos. La separación de compuestos que poseen grupos amino o hidroxilo con polisacáridos de ésteres de benzoato, implican interacciones dipolo-dipolo con el grupo carbonilo y enlaces de hidrógeno (108). En el caso de polisacáridos de fenilcarbamato, la capacidad de reconocimiento quiral está influenciada por los grupos fenilo, que pueden modificar la polaridad de los grupos carbamato, lo que sugiere que los sitios principales de adsorción para la discriminación quiral son los grupos polares carbamato (119).

La discriminación estérica parece estar afectada por la diferencia “llave-cerradura” entre los enantiómeros en el interior de la cavidad quiral de la estructura del polisacárido. Para compuestos con sustituyentes polares, también se han observado interacciones de hidrógeno y dipolo-dipolo. Los solutos rígidos conformacionalmente se resuelven peor que los solutos flexibles, de forma que se requiere una conformación adecuada del sustrato para conseguir una buena interacción estérica y una enantioselectividad adecuada. Respecto a las fases móviles, se recomienda hexano con una pequeña cantidad de alcohol como 2-propanol para muchos empaquetamientos, aunque en algunas ocasiones, alcoholes de mayor peso molecular proporcionan mayores valores de α , puesto que tienen una tendencia reducida a interactuar mediante enlaces de hidrógeno con la fase estacionaria y proporcionan una resolución mayor en compuestos que también compiten por estos sitios quirales activos (108).

c) Fases de tipo Pirkle

Este tipo de fases estacionarias dadoras-aceptoras, están formadas en general mediante enlace covalente de un derivado de aminoácido ópticamente puro a un γ -aminopropil silanizado en base gel de sílice, y se han utilizado para separar alcoholes, dioles poliaromáticos, diacilgliceroles y compuestos heterocíclicos aromáticos de interés farmacéutico (65).

El mecanismo de retención se basa en el enlace preferencial de uno de los enantiomeros a la fase estacionaria a través de una combinación de enlaces π - π , enlaces de hidrógeno, interacciones estéricas y dipolos inducidos. Para que ocurra separación, dos de las interacciones debe ser atractivas mientras que la tercera puede ser atractiva o repulsiva (estérica). Estas interacciones hacen que se forme rápida y reversiblemente el complejo diastereoisómero transitorio entre el enantiomero y la fase estacionaria. El grado de separación se encuentra relacionado con la diferencia de energía entre los pares diastereoisómeros formados, siendo el más estable de ellos el más retenido.

La fase más utilizada ha sido la 3,5-dinitrobenzoilfenilglicina, que ha resultado adecuada para resolver enantiomeros aromáticos, que son considerados buenos dadores π . Además de estas interacciones, puesto que esta fase contiene dos hidrógenos ácidos y dos grupos carbonilo básicos, se pueden formar enlaces de hidrógeno con amidas, aminas o hidroxilos. Como fase móviles se suelen utilizar mezclas de un disolvente no polar como hexano, con un disolvente polar como isopropanol o etanol (108).

En algunos casos se han observado inversiones de los enantiomeros por cambios en la composición de la fase móvil o en la temperatura (118).

d) Ciclodextrinas

Las ciclodextrinas son carbohidratos cíclicos quirales que contienen seis, siete u ocho unidades de D-(+)-glucopiranosas conectadas entre sí mediante enlaces 1,4-glicosídicos. Como se puede observar en la figura 6, poseen una superficie externa hidrofílica por la presencia de grupos hidroxilo primarios en posición 6 y secundarios en posición 2 y 3, y una estructura de toroide hueco truncado que permite la entrada de la parte hidrofóbica de los analitos a la cavidad interna, la cual presenta diferentes profundidades en función del número de unidades de glucopiranosas (65).

En la tabla 12 se describen las principales características de las α , β y γ -ciclodextrinas. La baja solubilidad de las β -ciclodextrinas en agua, limita su aplicación en electroforesis capilar, al ser el disolvente más utilizado en este tipo de técnicas (120).

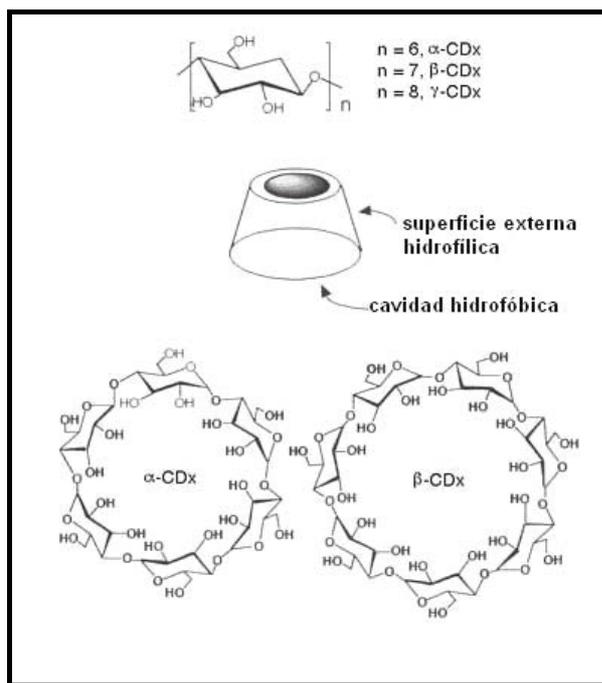


Figura 6. Estructura química de las fases estacionarias quirales de ciclodextrina.

Tabla 12
Principales propiedades de las ciclodextrinas nativas empleadas como CSP,

| Tipo | Número de glucopiranososa | $D[\alpha]^{25}$ | Cavidad (nm) | | Peso (Da) | Solubilidad en agua a 25°C (g/100 mL) |
|----------|---------------------------|------------------|--------------|-------------|-----------|---------------------------------------|
| | | | Diámetro | Profundidad | | |
| α | 6 | +150.5 | 0.47-0.60 | 0.78 | 972 | 14.5 |
| β | 7 | +162.0 | 0.80 | 0.78 | 1135 | 1.85 |
| γ | 8 | +177.4 | 1.0 | 0.78 | 1297 | 23.3 |

$D[\alpha]^{25}$; rotación específica a 25°C (normalmente si no se especifica la longitud de onda se supone que es la correspondiente a la línea amarilla del sodio 589.3 nm)

Cuando se utilizan con disolventes de fase inversa el mecanismo de retención es sobre todo de inclusión-complejación y de enlaces de hidrógeno. Estas interacciones necesitan que el analito contenga al menos una parte hidrofóbica para que pueda penetrar en la cavidad. Si además el analito contiene grupos polares que se pueden enlazar a los grupos hidroxilo de la ciclodextrina mediante enlaces de hidrógeno, la selectividad mejora considerablemente. Por lo general, cuanto más hidrofóbico es el analito en cuestión, la afinidad por la cavidad interna es mayor y el complejo de inclusión formado es más estable.

En modo normal, la fase móvil ocupa la cavidad y el soluto interacciona con los grupos hidroxilo secundarios superficiales, por lo que la retención depende fundamentalmente de los enlaces de hidrógeno que se forman.

La α -CD es la menos rígida de todas ellas, por lo que puede aceptar moléculas más grandes en su cavidad interior. El tamaño de la molécula del analito determina si penetra o no en la cavidad. Si la parte hidrofóbica del analito es mayor que la abertura de la cavidad, el enlace del complejo de inclusión será muy débil o inexistente y no habrá resolución.

Como regla general, los compuestos con un único anillo aromático se separan en las α -CD, los que contienen dos en las β -CD y los que contiene tres en la γ -CD. Para contribuir de forma eficaz a la separación, el analito necesita penetrar en la cavidad y ser capaz de interactuar con los grupos OH secundarios o terciarios a su entrada (108).

e) Antibióticos macrocíclicos

El uso de antibióticos macrocíclicos como selectores quirales fue introducido por Armstrong y col. en 1994 (121). Son compuestos eficaces tanto en forma ionizada como en forma molecular y exhiben buena enantioselectividad para una amplia variedad de analitos. Por lo general, son más estables y muestran capacidades mayores que las CSP_s de proteína y mayores eficacias que las de ciclodextrina. Además, se pueden utilizar en modo normal sin que ello suponga un cambio irreversible de enantioselectividad (122).

Los macrociclos glicopeptídicos han sido muy eficaces y por ello muy utilizados. Presentan una serie de características estructurales que les hace especialmente útiles para su interacción con solutos quirales, siendo capaces de asociarse a ellos mediante interacciones iónicas, π - π , hidrofóbicas, dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno (123). Poseen numerosos grupos funcionales hidrofílicos e ionizables que les hace solubles en disoluciones acuosas, y además poseen baja o nula absorción en el espectro UV-VIS. Sus principales propiedades físicas y químicas se muestran en la tabla 13.

Tabla 13
Características fisicoquímicas de las principales CSP, de antibióticos glicopeptídicos

| Tipo | Fórmula | Peso (Da) | Centros Asimétricos | Número cavidades inclusión | Número de carbohidratos | Grupos ionizables ^a |
|---------------|---|-----------|---------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Teicoplanina | C ₈₈ H ₉₇ Cl ₂ N ₉ O ₃₃ | 1878 | 20 | 4 | 3 | 2 |
| Ristocetina A | C ₉₅ H ₁₁₀ N ₈ O ₄₄ | 2066 | 38 | 4 | 6 | 2 |
| Vancomicina | C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O _{24a} | 1448 | 18 | 3 | 2 | 3 |

^a grupos ionizables incluyendo ácidos carboxílicos y aminos pero excluyendo grupos fenol.

Comparadas con las fases estacionarias típicas de fase inversa, los macrociclos glicopeptídicos presentan una eficacia de separación menor, lo que es especialmente cierto para el segundo enantiomero eluido.

Todos ellos consisten en moléculas de carbohidratos y en una porción aglicónica que adopta forma de cesta y que consta de tres o cuatro anillos macrocíclicos aromáticos fusionados, compuestos con grupos amino enlazados y fenoles sustituidos. Los azúcares unidos a la cesta tienen libertad de rotación y se pueden orientar de forma diferente. Entre sí, los antibióticos glicopeptídicos difieren en el número y tipo de grupos carbohidrato colgantes (122). A diferencia del resto, la teicoplanina, cuya estructura química se puede observar en la figura 7, es la única que presenta una cadena hidrofóbica acilo unida a un grupo 2-amino-2-deoxi-β-glicopiranosil.

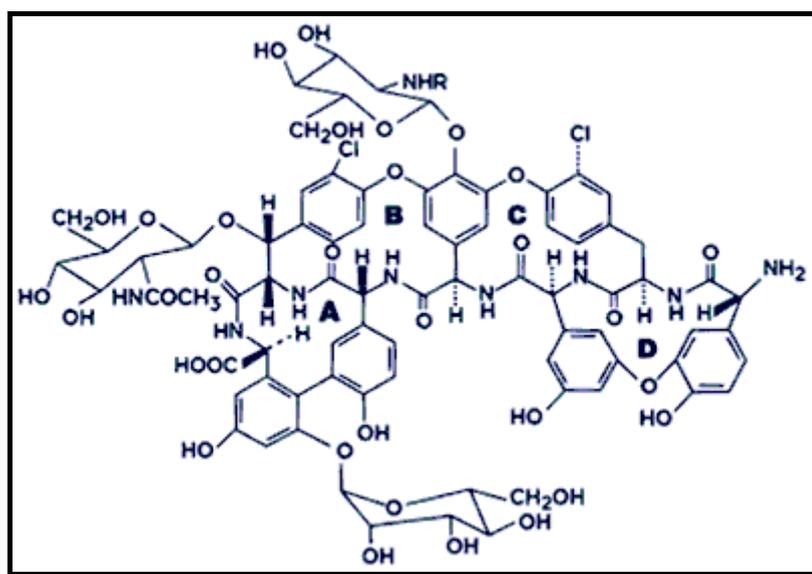


Figura 7. Estructura química del antibiótico macrocíclico teicoplanina.

La temperatura puede incrementar la transferencia de masa, la difusión del analito y en consecuencia la eficacia de la separación. A. Berthod y col., han estudiado el efecto de la temperatura en la separación de una amplia variedad de compuestos quirales desde un punto de vista experimental, utilizando antibióticos comerciales y diferentes fases móviles. Por lo general, la separación se debe optimizar a baja temperatura aunque los tiempos de retención sean elevados y la eficacia de pico pequeña, y a continuación, incrementarse progresivamente para mejorar la forma de pico y reducir los tiempos de análisis, llegando a un compromiso con la enantioresolución (124).

El antibiótico *vancomicina*, cuya estructura química se muestra en la figura 8, es muy soluble en agua y disolventes polares apróticos, pero poco soluble o insoluble en alcoholes y disolventes orgánicos menos polares. En solución acuosa se puede dimerizar dependiendo del tipo de disolución y de su concentración, aunque es estable a baja temperatura en el intervalo de pH 3-6. Su elevado peso molecular limita el proceso de difusión, lo que aumenta la eficacia de la separación. Este selector quiral ha demostrado ser adecuado en el reconocimiento enantiomérico de compuestos aniónicos, especialmente aquellos que contienen grupos carboxílicos, cuyo mecanismo de retención se encuentra basado probablemente en la interacción con los grupos amino de su estructura. De hecho, las mejores separaciones se han obtenido con tampones ácidos a valores de pH cercanos o por debajo de su punto isoeléctrico (125).

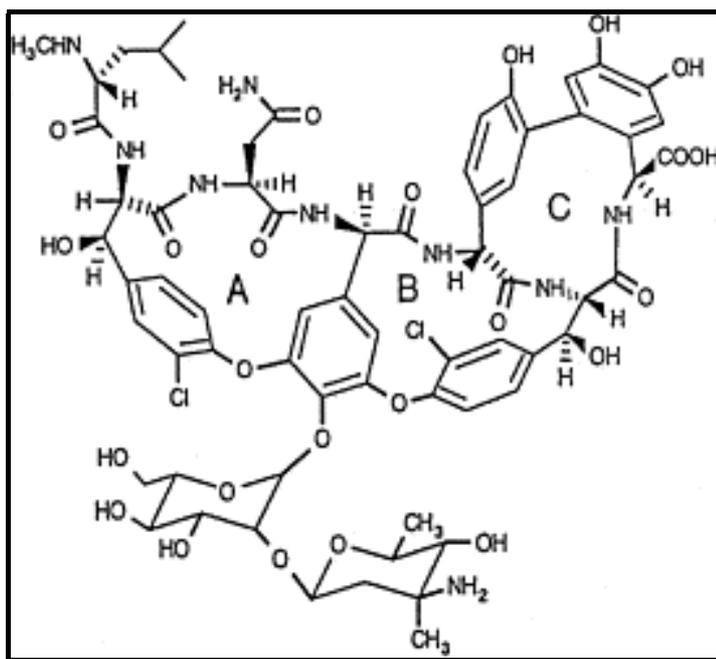


Figura 8. Estructura química del antibiótico macrocíclico vancomicina.

Las fases estacionarias de teicoplanina muestran un ligero carácter aniónico incluso a pH ácido, pero al igual que la vancomicina, posee afinidad hacia compuestos con grupos carboxílicos, por lo que ha sido eficaz en la separación de aminoácidos y de péptidos. En este caso, si el grupo amino del aminoácido se encuentra estéricamente impedido, la interacción electrostática se sustituye por interacciones hidrofóbicas o de enlace de hidrógeno (126).

f) Fases estacionarias de bajo peso molecular

En este tipo de fases, denominadas comúnmente “Brush Type”, las moléculas quirales se encuentran distribuidas de manera uniforme en la superficie de una matriz idealmente inerte, y son fácilmente accesibles a las moléculas de los analitos. El enlace de las moléculas utilizadas como selector quiral con los grupos silanol de los soportes de sílice es el responsable de la capa orgánica monomolecular superficial. Las fases oligoméricas o poliméricas se obtienen cuando se utilizan selectores de bajo peso molecular que contienen un silano trifuncional, a través del cual se anclan a la superficie de la sílice. De este modo se han sintetizado CSP_s con selectores derivados de aminoácidos, de ácidos como el tartárico y de determinados alcaloides.

Estos materiales son química y térmicamente inertes, presentan buenas propiedades cinéticas, un amplio intervalo de aplicación y en general, son compatibles con cualquier fase móvil. Su baja complejidad estructural y la disponibilidad de buenos modelos para sus propiedades de reconocimiento, han facilitado la mejora de las estructuras existentes y el diseño de mejores selectores quirales (127).

En los últimos años, además del interés por el desarrollo de nuevas fases estacionarias quirales, ha cobrado especial importancia el desarrollo de **polímeros de impresión molecular** con sitios enlazantes enantioselectivos. Para ello, se forman complejos no covalentes con el enantiomero utilizado como plantilla que se polimerizan en presencia de un elevado contenido de disolvente entrecruzado porogénico, para formar una matriz polimérica rígida. Después de la extracción del enantiomero plantilla, se obtienen polímeros con cavidades que proporcionan formas y funcionalidades complementarias a las del enantiomero impreso. Así, bajo condiciones cromatográficas, exhiben excelentes propiedades de reconocimiento hacia el enantiomero plantilla y se pueden utilizar en la separación de las mezclas racémicas correspondientes.

Los polímeros quirales de impresión muestran las siguientes características; el orden de elución se encuentra predefinido, el enantiomero original utilizado como plantilla es siempre el más fuertemente retenido, no se necesita elaborar diseños sofisticados y protocolos laboriosos para generar los sitios enantioselectivos de interacción, los componentes necesarios se encuentran fácilmente disponibles y los reactivos químicos que se emplean no son costosos. Además, son estables a elevadas temperaturas y presiones, ácidos, bases, iones metálicos y disolventes. Todas estas características junto con su larga vida les hace muy adecuados en aplicaciones medioambientales, y también se han utilizado en separaciones de aminoácidos, péptidos y aminoalcoholes. Sin embargo, sólo un 10-15% de la plantilla se enlaza de forma eficaz, tienen baja capacidad de carga y en ocasiones presentan sitios heterogéneos que producen colas en los picos cromatográficos, lo que puede limitar su utilización.

Otra alternativa prometedora en el campo de las separaciones quirales son los *sensores enantioselectivos*, que permiten una determinación rápida cualitativa y cuantitativa de la pureza enantiomérica mediante la detección de cambios de color o fluorescencia. Con transductores adecuados se puede convertir la señal química en electrónica, y de esta forma, obtener sensores que permiten la monitorización en línea de la pureza enantiomérica en procesos medioambientales, de biotransformación y de síntesis asimétricas, además de ser útiles en el control de calidad en la industria farmacéutica (128).

4.2.2.5. Aplicaciones al análisis de fenoxiácidos mediante HPLC convencional

Aunque por lo general los límites de detección obtenidos mediante HPLC son menores que los conseguidos por GC, la cromatografía de líquidos proporciona una sensible y útil alternativa a los métodos basados en cromatografía de gases para el análisis de herbicidas tipo fenoxiácido, con la ventaja de que no requiere la esterificación de los herbicidas ácidos para su determinación y permite distinguir entre los herbicidas en forma ácida y de ésteres.

La separación de estos compuestos se han llevado a cabo principalmente mediante cromatografía de líquidos de fase inversa con columnas C₁₈ o C₈ (85). Como consecuencia de su elevada polaridad, las fases móviles utilizadas suelen ser mezclas de MeOH o AcN en agua o mezclas de los tres disolventes, aunque debido a sus características ácido-base se deben utilizar disoluciones reguladoras a pH ácido para disminuir el ensanchamiento de pico cromatográfico.

Los detectores más utilizados para su determinación han sido UV, DAD y MS, aunque en aplicaciones puntuales se ha utilizado la detección electroquímica para la determinación de MCPA, MCPB, 2,4,5-T y 2,4-D en aguas subterráneas y de bebida (129).

Puesto que la detección fluorescente es muy sensible, aunque no muestran fluorescencia nativa y no se pueden analizar directamente, su conversión en compuestos fluorescentes se puede conseguir mediante procedimientos de derivatización pre o post-columna basados en reacciones químicas o fotoquímicas (130). Así se han determinado previa derivatización con irradiación directa de luz UV para formar vía radicales libres fotoproductos fluorescentes, utilizando además tensoactivos catiónicos para mejorar la intensidad de la fluorescencia inducida fotoquímicamente (131). La derivatización química con 9-antrildiazometano ha permitido su determinación en aguas subterráneas a niveles de concentración de $0.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (132). Por otra parte, se han utilizado extracciones de par iónico con un contraión fluorescente para su determinación, que han permitido alcanzar límites de detección del orden de $0.05\text{-}0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ (49). También se ha llevado a cabo la detección indirecta de 2,4-D, 2,4-DB y 2,4,5-T por adición de hierro (II) 1,10-fenantrolina a la fase móvil. Este aditivo, mediante interacciones iónicas ha permitido la detección de los herbicidas a una longitud de onda de 510 nm y la separación en una columna RP-2 con una fase móvil de MeOH-agua (40:60 v/v), que contiene una concentración de aditivo $34 \mu\text{M}$ (99).

Los herbicidas fenoxiácido presentan dos bandas de absorción en el espectro UV. La primera en el intervalo de 230-235 nm, la cual presenta una absorptividad mayor que la segunda, observada alrededor de 280 nm. La detección UV con longitud de onda fija o variable se utiliza frecuentemente en el análisis de residuos de estos herbicidas debido a su amplio intervalo de aplicación, sencillez, estabilidad y bajo coste en comparación con otras técnicas de detección, si bien no resuelve el problema de la identificación y/o confirmación de compuestos de la misma familia química por la elevada similitud entre espectros (73, 133). La detección con matriz de diodos ha permitido incrementar la capacidad de confirmación (67, 73) y combinada con técnicas de SPE, se ha utilizado para la determinación de residuos de herbicidas, incluidos fenoxiácidos, con límites de detección de $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$, un orden de magnitud por debajo de los niveles establecidos por ley (134).

La detección UV a una longitud de onda de aproximadamente 230 nm continúa siendo la más utilizada para su determinación, pero durante los últimos años, la MS ha recibido especial interés por ser una técnica mucho más sensible y selectiva que proporciona información estructural para su identificación, al igual que la combinación MS-MS, donde la fragmentación controlada produce cromatogramas limpios que mejoran la relación señal/ruido y aumentan la sensibilidad (135). Además, en comparación con la detección UV, las desviaciones de la línea base producidas por las sustancias húmicas co-extraídas en el análisis de aguas y suelos son menores cuando se utiliza el detector de MS e inexistentes cuando se utiliza MS-MS, debido a su mayor selectividad (136).

Como consecuencia de sus propiedades ácidas y de los átomos de cloro presentes en su estructura, los fenoxiácidos proporcionan una respuesta superior en el modo negativo de detección de iones, lo cual se puede acentuar aun más si se añade un modificador halogenado a la fase móvil (85). En el análisis de herbicidas, las interfases más utilizadas han sido API, ESI (137, 138) y APCI (139-141). Estas dos últimas, son métodos blandos de ionización que proporcionan predominantemente iones moleculares protonados $(M+H)^+$ o desprotonados $(M-H)^-$ en el modo positivo y negativo de detección de iones respectivamente (78). En general, para herbicidas ácidos parece que la sensibilidad es mayor con interfases ESI que con APCI (12), pero en el caso de los herbicidas fenoxiácido las interfases más utilizadas han sido PB, que en general no resultan adecuadas en el análisis de pesticidas no polares (78, 142, 143) y TSP, que necesita un control estricto de la temperatura (133) y que proporciona espectros sencillos y elevada sensibilidad cuando se utiliza detección en modo SIM (73). La combinación LC-TSP-MS produce un rendimiento de fragmentos de iones muy bajo que dificulta su confirmación. Por ello, en algunos casos se ha utilizado la formación de aductos de iones con disolventes como formiato amónico, AcN y otros no polares, para obtener información estructural complementaria al espectro TSP y facilitar la identificación (144).

Como alternativa a la interfase TSP se ha utilizado PB, cuyos espectros al ser independientes de las condiciones del espectrómetro se pueden comparar con espectros de referencia estándar. Esta interfase proporciona una excelente confirmación en el análisis de herbicidas fenoxiácido por el elevado número y reproducibilidad de los fragmentos de iones (73, 77), si bien su aplicación se encuentra limitada por la

sensibilidad térmica de este tipo de herbicidas. Por otra parte, durante la ionización se puede perder eficacia cromatográfica y en consecuencia obtener picos en los cromatogramas de masas de cola considerable. Además, se pueden adsorber en la superficie de la fuente y producir efecto memoria, y debido al impacto de nuevas partículas de los compuestos adsorbidos desde la superficie de la fuente a la fase gas, se pueden dar nuevos procesos de ionización. Cubriendo la superficie de la fuente de iones con un polímero de teflón se han conseguido mejorar los espectros de masas y los resultados cromatográficos, minimizando la adsorción de los analitos y en consecuencia, el riesgo de ionizaciones múltiples. El uso de un nebulizador de microflujo también puede contribuir a mejorar la eficacia de la interfase, como se ha comprobado para la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras de agua (145).

Respecto a la separación quirral de mezclas racémicas de herbicidas fenoxiácido, inicialmente se utilizaron columnas convencionales de ODS con fases móviles quirales, añadiendo aditivos como la L-propil-n-octilamida de Ni (II) (146). Una de las primeras separaciones realizadas de los ácidos libres con fases estacionarias quirales, fueron llevadas a cabo por N. Blessington y col. que utilizaron una fase estacionaria de α -glicoproteína (Enantiopac) y establecieron una disminución en la selectividad con el aumento del número de átomos de cloro sustituidos. Estos mismos autores, también emplearon una fase iónica de tipo Pirkle, constituida por N-(3,5-dinitrobenzoil)-(R)-(-)-fenilglicina enlazada iónicamente a un soporte aquiral de sílice γ -aminopropil, que no permitía la resolución directa de los racémicos ácidos pero sí de los derivados de difenilamida correspondientes. Durante este proceso de derivatización, según pudieron comprobar, no se producían procesos de enantiomerización (57, 64).

Más recientemente se ha utilizado una fase estacionaria quirral basada en tergurida para la resolución de MCPP, 2,4,5-TP y 2,4-DP. En este caso el mecanismo observado ha sido contrario al de las fases de α -glicoproteína, y se ha determinado una selectividad para los enantiomeros con tres átomos de cloro superior a los derivados monoclorados en un 30%. En este tipo de fase, parece que la enantiodiscriminación está controlada mediante interacciones π - π , lo que proporciona elevada selectividad a través de los grupos fuertes dadores de electrones. Además, los grupos en posición orto son determinantes para la resolución, puesto que proporcionan una estructura molecular que favorece las interacciones estabilizadoras con el esqueleto de la fase de tergurida (51).

El mecanismo de reconocimiento quiral en fases de teicoplanina ha sido estudiado y evaluado por Y. C. Guillaume y col., en función de parámetros como la temperatura y el modificador orgánico de la fase móvil.

Esta fase estacionaria posee grupos ionizables en su estructura como ácidos carboxílicos y aminas primarias, con valores de pK_a respectivos alrededor de 2.5 y 9.2, y grupos fenol. El valor de pH de la fase móvil puede influir en las interacciones iónicas de atracción entre la formas aniónicas de los fenoxiácidos y la superficie ionizada de la teicoplanina, por lo que la interacción primaria consiste en una combinación de la atracción electrostática y del efecto hidrofóbico, mientras que las interacciones secundarias consisten en interacciones de van der Waals y de enlace de hidrógeno (126). La enantioselectividad mejora considerablemente con el incremento del contenido de metanol de la fase móvil, debido a la restricción de la asociación de los solutos con la teicoplanina, que produce interacciones estereoselectivas favorables.

A través de estos estudios, también se ha puesto de manifiesto la influencia de la temperatura de la columna en la separación. El antibiótico macrocíclico de teicoplanina se encuentra en equilibrio entre dos conformeros que difieren entre sí por una rotación aproximada de 180° de uno de sus residuos de azúcar, si bien, la proporción entre uno y otro varía considerablemente por efecto de la temperatura, la cual produce cambios conformacionales en su estado nativo (147, 148).

La separación de los enantiomeros de MCPD también se ha llevado a cabo utilizando otro tipo de fases estacionarias quirales diferentes a las mencionadas anteriormente, como fases estacionarias de bajo peso molecular o “brush type” (149, 150).

Algunas de las principales aplicaciones de la cromatografía de líquidos convencional para la determinación de este tipo de herbicidas incluyendo separaciones quirales, se detallan en la tabla 14.

Tabla 14
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos convencional

| <i>HERBICIDA</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD.</i> | <i>Rec.</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|--|--|--|---------------------|-------------------------|--|------------------------------|------------|
| MCPA, 4-cloro-2-metilfenol | Nucleosil C ₁₈ 80 x 2 mm (5 µm) | AcN-0.01% HCOOH acuoso 35:65 (v/v) | ESI-MS | 0.04-1.0 ng/mL | 91 % RSD 7% (N=5) | Extracción alcalina SPE con cartuchos de sílice C ₁₈ 500 mg | suelo | (12) |
| 2,4-D, 2,4-DB, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP | Spherisorb ODS 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) | 65%MeOH- 34.6% H ₂ O- 0.4% H ₃ PO ₄ | UV (232 nm) | - | > 67% SD 6-26% | SPE en columna MFE polímero (HEMA) | tomate | (63) |
| 2,4-D, MCPA, dicamba, bentazona | Lichrosorb RP-18 250 x 4.6 mm (5µm) par iónico | MeOH-TEA acuosa pH 6.9 20:80 (v/v) | UV (230 nm) | 0.02-0.1 µg/L | 73-90 % | SPE con cartuchos Sep-Pak C ₁₈ 500 mg | agua subterránea | (151) |
| MCPA, MCPB, 2,4-D, 2,4,5-T | LiChrocart 125 x 4 mm (5µm) | MeOH-solución acuosa 3:2 (v/v) (2g/L LiClO ₄ , 2 mL HAc glacial pH 3.9) | ED (0.9V) fotólisis por irradiación a 254 nm | 1-100 pg/mL | 83-106 % | SPE con cartuchos C ₁₈ LiChrolut EN 200 mg | agua | (129) |
| 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4,5-T, 2,4-DB, 2,4,5-TP | Spherisorb ODS 210 x 4.6 mm (5µm) | ACN-agua (gradiente) | UV (230 nm) | 1-2 µg/L | ≈ 100 % RSD <10 % | Limpieza PRP-X100 10 µm, preconcentración en línea con precolumna polimérica CHP-3C | agua superficial y de río | (59) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPP, MCPB | PRLP-S 250 x 4.6 mm (5 µm) | AcN-agua (gradiente) | UV (232 nm) | 5-20ng/L | > 83% RSD 3-7% | Limpieza pH elevado SPE en línea a pH 2.8 con precolumna PRLP-S 10 x 2 mm 15-25 µm | agua | (152) |
| 2,4-D, MCPP, MCPA, 2,4,5-T y clorofenoles | Sepharon SGX 150 x 3.3 mm I.D. C ₁₈ (5µm) | AcN-0.01 M HAc 52:48 (v/v) | UV (225 nm) | 0.015- 0.03 µg/L | >94% SD<5.6% | SPE previa en minicolumna Bakerbond C ₁₈ 500 mg | agua potable | (153) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-TP, 2,4-DB, 2,4,5-T | Spherisorb ODS 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) | 65%MeOH- 34.6% H ₂ O- 0.4% H ₃ PO ₄ | UV (232 nm) | 1-4 µg/L | - | SPE en línea con columna MFE polímero (HEMA) | agua superficial | (154) |

Tabla 14 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos convencional

| <i>HERBICIDA</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>Rec.</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|---|--|---|-------------------------------------|-------------------|--|-------------------------|------------|
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-TP, 2,4-DB, 2,4,5-T | Spherisorb ODS 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) | 65%MeOH-34.6% H ₂ O-0.4% H ₃ PO ₄ | UV (232 nm) | - | 50-89% SD 2-5% | SPE cartuchos Lida Sep-Ic-OH | pera | (154) |
| 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, dicamba, dinoseb | Pecosphere C ₁₈ | 60% agua (1% H ₃ PO ₄)-40% AcN | DAD | 2-10 µg/L | 92-101% RDS 3-9 % | SPE con sílice C ₁₈ | agua de bebida | (155) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB | C ₁₈ (5 µm) | AcN-solución acuosa TFA 0.05 % (gradiente) | UV | 0.003-0.7 µg/L | ≈95% | SPE con cartucho Carbo-pack B 250 mg 6.5 x 1.4 cm | agua | (156) |
| MCPP y otros pesticidas | C ₁₈ 150 x 0.18 mm I.D. (3 µm) | MeCN-agua (gradiente) | UV (220 nm) | 0.74 µg/L | 85-107 % | SPE fuera de línea con discos C ₁₈ | agua, manzana | (62) |
| 2,4-D, 2,4,5-TP 2,4-DP ,MCPA, MCPP, 2,4,5-T, 2,4-DB, MCPB y sus ésteres etílicos | TSK-gel ODS 12T 250 x 4.6 mm I.D. 25°C | AcN-agua 3:1 3% THF 1.0 mL/min | fluorescente 9-antrilDMS λ _{em} . 365 nm λ _{exc} . 412 nm | 500 pg/inyecc. 2,4,5-T 1 ng/inyecc. | 92-103% | SPE100 mg sílice C ₁₈ . Los ésteres se hidrolizan y se determinan por diferencia entre cantidad total y cantidad de herbicidas ácidos | agua subterránea | (132) |
| 2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4-DP | Spherisorb ODS 250 x 4.6 mm I.D. interacción iónica | 5mM n-octilamonio o-fosfato en AcN/agua pH 6.4 | UV (228 nm) | - | 64-75 % SD 9-10 % | LLE con NaOH 0.1M | suelo Macomer (Cerdeña) | (157) |
| 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4-DP,2,4-DB, MCPB | Alltima C ₁₈ 25cm x 4.6 mm (5 µm) | agua-AcN 80:20 (v/v) con 0.3 mM fluoruro TBA | ESI-MS (NI) | 1.7-10 ng/g | 64-88% | Extracción con agua caliente (90°C) en línea con SPE en cartucho carbograph 0.5 g | suelo | (158) |

Tabla 14 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos convencional

| <i>HERBICIDA</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>Rec.</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|---|--|-----------------|------------------|---|---|------------------------------|------------|
| 2,4-D | C ₁₈ Micropak 150 x 4 mm I.D. (5 µm) | AcN-solución acuosa HAc 2% 50:50 (v/v) | UV (280 nm) | - | 69-92 % | LLE con acetona- diclorometano 2:1 (v/v) Limpieza con Amberlita | tomate | (159) |
| 2,4-D, MCPA, MCPB, MCPP, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, bentazona | PLRP-S 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) | AcN-solución acuosa 0.005 mM TBA 30:70 (v/v) | UV | 0.05-0.1 µg/L | >85% SD 2-9% (N=5) | Preconcentración a pH 3 PRLP-S 10 x 2 mm 15-25 µm. Separación a 50 °C | agua superficial | (160) |
| 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4-DB, MCPB | C1:GFF II 50 x 4.6 mm 5µm C2: Microspher C ₁₈ 50 x 4.6 mm (3 µm) | M1: MeOH- solución acuosa 0.05% TFA M2: MeOH- solución acuosa 0.1% TFA (gradiente) | UV (228 nm) | 5-50 µg/Kg | 60-90 % RSD 5-25 % | Extracción MASE CH ₂ Cl ₂ -MeOH-TFA 90:10:0.1 v/v 950 W, 690 KPa, 10 min a 60 °C. Columnas acopladas en línea, C1: limpieza | suelo | (136) |
| 2,4-D, MCPP, dicamba | C ₁₈ 150 x 4.6 mm (5 µm) | AcN-2% HAc (gradiente) | UV (280 nm) | - | - | RSD inter-día 0.6-5.5% | Formulaciones comerciales | (99) |
| 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4,5-T | C ₁₈ | MeOH- 0.01 M HAc 61:39 (v/v) | UV (235 nm) | 0.03 µg/L | - | - | agua de bebida | |
| 2,4-D, 2,4,5-TP, 2,4,5-T | C ₁₈ 300 x 2.1 mm I.D. | 30:70 (v/v) MeOH-agua | PB-MS | orden de µg/L | - | Tiempo de análisis 10 min | - | (161) |
| 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4-DP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP | C1:GFF II 50 x 4.6 mm 5µm C2: Microspher C ₁₈ 50 x 4.6 mm (3 µm) | M1: MeOH- TFA 0.05% en agua 5:95 (v/v) M2: MeOH-0.03 M fosfato pH 2.4 60:40 (v/v) | UV (228 nm) | 0.1 mg/Kg | 60-90% (nivel 0.8 mg/Kg) RSD 4-11% | Hidrólisis NaOH 0.05 N SPE en dos cartuchos: 100 mg C ₁₈ sílice 100 mg | cereales y judías | (162) |

Tabla 14 (continuación)
Determinación de herbicidas fenoxiácido en diversas matrices mediante cromatografía de líquidos convencional

| <i>HERBICIDA</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>Rec.</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|---|--|--------------------------|-----------|-----------------|---|---------------------|------------|
| 2,4-D, MCPA, MCPB, MCPP, 2,4-DP, 2,4-DB, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, mezclas de los ésteres isobutílico e isobutileter de 2,4-D, 2,4-DB y 2,4,5-T | ODS-102 10 cm x 2.1 mm ODS-222 22 cm x 2.1 mm | AcN o MeOH-solución acuosa HAc (gradiente) | UV (230 nm) PB-MS | 12-80 ng | 78% RSD 4.2% | LLE con etilacetato Hidrólisis de los ésteres a los ácidos correspondientes Inyección 10 µL | agua suelo | (77) |
| Separación quiral MCPP | Chirobiotic T 150 x 4.6 mm 5 µm teicoplanina en gel de sílice | MeOH-solución tampón citrato 0.5 mM pH 5.5 20:80 (v/v) 30-50°C | DAD | - | - | Enantioselectividad 1.43 Tiempo de análisis 2 min | soluciones estándar | (126) |
| Separación quiral 2,4-DP, MCPP, 2,5-TP | 150 x 4.6 mm I.D. tergurida en base sílice 10 µm | AcN-tampón acetato pH 3.5 0.02 M 1:1 (v/v) (0.8 mL/min) | UV (254 nm) | - | - | Temperatura ambiente Enantioselectividad 1.20-1.35 Factor de retención 9.0-11.9 | soluciones estándar | (51) |
| Separación quiral MCPP, 2,4-DP | Enantiopac α-glicoproteína | 2-propanol-0.1M NaCl en tampón fosfato 10 mM pH 6 8:92 (v/v) (0.20 mL/min) | UV (240 nm) | - | - | Enantioselectividad 1.00-1.25 | soluciones estándar | (57) |
| Separación quiral MCPP, 2,4-DP | Fase tipo Pirkle | 2-propanol-hexano 10:90 (v/v) (1.0 mL/min) | UV (240 nm) | - | - | Derivatización a las correspondientes difenilamidas Enantioselectividad 1.10 | soluciones estándar | |

4.2.2.6. Miniaturización de los sistemas de HPLC

En los últimos años, para incrementar la eficacia de la separación, la sensibilidad de la detección y disminuir los tiempos de análisis con columnas convencionales de HPLC, se ha reducido el tamaño de partícula del material de empaquetamiento. Considerando la *ecuación de van Deemter*, esta reducción produce una contribución menor del coeficiente de difusión de Eddy y de la transferencia de masa de la fase móvil (término A), así como una disminución en la longitud de los caminos de difusión (término C).

Ecuación de van Deemter

$$H = A + (B/u) + Cu \quad A = \lambda d_p \quad B = \gamma D_M \quad C = C_s + C_M$$

H; altura equivalente de plato teórico

A; término de difusión de Eddy y caminos desiguales

λ ; constante que considera el intervalo de tamaño de partícula, la uniformidad del empaquetamiento y las dimensiones y geometría de la columna

d_p ; tamaño de partícula de la fase estacionaria

B; término de difusión longitudinal

γ ; factor de obstáculo dependiente de las características del empaquetamiento

D_M , difusión en la fase móvil

u; velocidad lineal de la fase móvil

C; término de resistencia a la transferencia de masa que engloba la difusión en la fase estacionaria (C_s), relacionada directamente con el espesor de la película de fase estacionaria, y la difusión en la fase móvil (C_M), directamente proporcional al diámetro de las partículas.

Como se puede observar en la ecuación anterior, la reducción del tamaño de partícula puede producir mayor eficacia de la columna por la disminución de la altura equivalente de plato teórico, y en consecuencia, del incremento del número de platos para una longitud determinada. Sin embargo, debido a los elevados gradientes de presión, no se han obtenido buenos resultados con partículas de tamaño inferior a 3 μm , por lo que ha sido necesario llegar a un compromiso entre la eficacia y caída de presión mediante el ajuste del tamaño de partícula, normalmente 3-5 μm , y de la longitud de la columna (163).

Para evitar el problema de la elevada sobrepresión con partículas pequeñas, también se han utilizado técnicas como CEC con flujo electrosmótico, cromatografía con columnas tubulares abiertas, con columnas a temperaturas elevadas y cromatografía de líquidos a alta presión (UHPLC). Esta última, ha permitido mejorar la eficacia y reducir los tiempos de análisis en columnas empaquetadas con partículas no porosas de sílice-ODS de 1.5 y 2.0 μm , trabajando a presiones de hasta 60000 psi (164, 165).

Por otro lado, los importantes avances que han tenido lugar en las tecnologías de fabricación de columnas, han permitido el desarrollo de columnas micro y capilares que respecto a las convencionales de diámetro interno 4.6 mm ofrecen considerables ventajas. Así, la combinación de columnas capilares y células de flujo de nanovolumen con gradiente de elución y temperatura, han permitido desarrollar sistemas de *cromatografía líquida capilar de alta resolución*, que presentan límites de detección comparables a los obtenidos mediante cromatografía de gases capilar.

La introducción de micro-columnas o columnas capilares en HPLC, término que se utiliza en general para referir columnas de pequeño diámetro, se debe a Horváth y col., quienes utilizaron en el año 1967 columnas empaquetadas de diámetro interno comprendido entre 0.5 y 1.0 mm para la separación de ribonucleótidos (166). En la últimas dos décadas, la automatización y la miniaturización han sido muy importantes en el desarrollo de la cromatografía líquida, y en función del diámetro interno de la columna y de los caudales utilizados, las técnicas de HPLC se han clasificado en diversas categorías (167).

Tabla 15
Nomenclatura de columnas de diámetro interno reducido en HPLC

| COLUMNA (\varnothing INTERNO) | CAUDAL | NOMBRE |
|----------------------------------|-------------------------------|------------|
| 0.5-1.5 mm | 10-100 $\mu\text{L min}^{-1}$ | Micro-LC |
| 150-500 μm | 1-10 $\mu\text{L min}^{-1}$ | Capilar-LC |
| 10-150 μm | 10-1000 nL min^{-1} | Nano-LC |

□ **Aspectos generales**

Debido al diámetro interno reducido, los caudales de fase móvil utilizados con micro-columnas son muy pequeños, lo que produce una disminución considerable del consumo de reactivos y disolventes, y por ello de los desechos generados y del impacto medioambiental (65).

Además, por su posibilidad de trabajar con pequeños volúmenes de muestra y su reducida dilución cromatográfica (168), poseen una excelente capacidad de acoplamiento directo a técnicas de detección como la resonancia magnética nuclear, la espectrofotometría infrarroja con transformada de Fourier y la MS, que requiere la eliminación previa del disolvente (169).

En comparación con los sistemas convencionales de HPLC, este tipo de técnicas mejoran la detección y permiten obtener eficacias de separación elevadas. Teóricamente, el uso de micro-columnas aumenta la velocidad de la separación por la mayor velocidad linear de la fase móvil. Estas mejoras cinéticas, junto con el pequeño caudal de fase móvil, permiten reducir la sobrepresión, conectar columnas en serie y conseguir eficacias de hasta 10^5 - 10^7 platos teóricos, que permiten la resolución de mezclas complejas. Por otra parte, el pequeño volumen en el que se eluyen los analitos proporciona mayor sensibilidad y mejoras de hasta 20 órdenes de magnitud en la respuesta del detector (65). De acuerdo con el factor teórico de disminución de escala, las sensibilidades se pueden incrementar del orden de 200 veces en detectores másicos, al reducir el diámetro interno de la columna de 4.6 mm a 320 μm (166), de forma que las micro-columnas han sido muy utilizadas para aumentar la sensibilidad de la detección y la resolución cuando el volumen de muestra disponible para la inyección es limitado o los compuestos a determinar se encuentran presentes a bajas concentraciones en las distintas muestras (170).

a) Columnas

Además de las columnas capilares empaquetadas con las mismas fases típicas de cromatografía de líquidos convencional, se han utilizado ***columnas capilares tubulares abiertas*** con diámetros internos menores de 15 μm , donde la fase estacionaria se encuentra soportada en la pared interior de la columna. Teóricamente, las columnas tubulares abiertas poseen la geometría más adecuada para llevar a cabo separaciones mediante cromatografía de líquidos, permiten obtener eficacias elevadas en la resolución de mezclas complejas (171) y tiempos aceptables de análisis, ya que sus características favorables de flujo aumentan la velocidad de separación.

En este tipo de columnas la síntesis de la película de fase estacionaria en la pared interna del capilar resulta especialmente crítica. De esta forma, para conseguir materiales con suficiente retención y capacidad de carga se han utilizado procedimientos estáticos, de creación de estructuras porosas en el interior del capilar y

de inmovilización química de una monocapa o una fase estacionaria polimérica. Utilizando procedimientos con una fase inicial térmica de polimerización in situ, se han preparado películas de polimetacrilato enlazadas a un capilar de sílice fundida de 25 μm , cuya selectividad se puede ajustar con la concentración de monómero y entrecruzante, así como a través de los grupos funcionales incorporados en la matriz polimérica, lo que permite fabricar fases estacionarias para separaciones iónicas, quirales o de afinidad (172). Sin embargo, las fases estacionarias enlazadas químicamente a la pared interna del capilar, presentan relaciones de fase muy bajas que conducen a retenciones pobres, y aunque las fases poliméricas, como los polisiloxanos y poliacrilatos entrecruzados proporcionan fases estacionarias estables, con elevada relación de fases y suficiente retención, suelen presentar baja eficacia debido a la lenta difusión de los solutos. Alternativamente, empleando un material híbrido de vidrio orgánico-inorgánico fabricado mediante el proceso sol-gel, se han preparado fases estacionarias en una sola etapa que combina la síntesis de una fase enlazada y una matriz de vidrio porosa, que han aumentado el área superficial de la columna capilar (13 μm I.D) y por ello la relación de fases (173).

La separación en cromatografía de líquidos de fase inversa de p-hidroxibenzoatos con columnas tubulares abiertas, se ha realizado utilizando presión en el vial de entrada de un equipo comercial de CEC como fuerza de elución, sin necesidad de utilizar fuentes de alimentación de alto voltaje o bombas de micro-HPLC, lo que demuestra que las separaciones en LC con columnas tubulares abiertas se pueden realizar con instrumentación muy sencilla, sin bombas ni válvulas, que por otra parte son indispensables cuando se utilizan capilares empaquetados (172).

En el área de las técnicas de separación, la simplificación de los procedimientos de preparación de las columnas cromatográficas sin pérdida de eficacia es uno de los principales objetivos a alcanzar, si bien, las columnas basadas en monolitos pueden constituir una solución potencial a este planteamiento. Del mismo modo que en cromatografía de líquidos convencional, y debido a la menor impedancia de la separación en relación con las columnas de partículas empaquetadas, también se han utilizado en micro-cromatografía *columnas monolíticas*, que por su elevada permeabilidad, pueden solucionar el problema de la elevada caída de presión asociada al pequeño tamaño de partícula de las columnas empaquetadas de HPLC. Mediante procesos sol-gel fundamentalmente, se han preparado capilares con monolitos de sílice

de diámetros internos comprendidos entre 50 y 100 μm (174). En este caso, para preparar el monolito en un capilar de sílice fundida, la estructura de sílice se debe unir a la pared del tubo para evitar la contracción de los esqueletos (175). Con una amplia variedad de polímeros y copolímeros, se han preparado columnas monolíticas en HPLC con capilares de sílice fundida o PEEK, aunque también se han utilizado capilares de PTFE transparentes a la luz UV, que permiten iniciar la polimerización mediante irradiación directa de forma más rápida que las iniciadas térmicamente (176).

Basadas en monolitos de butil-metacrilato se han preparado columnas capilares para HPLC de fase inversa de diámetro interno 320 μm (177). Utilizando fotopolimerización in situ, se han sintetizado monolitos de polibutil-metacrilato-co-etileno-dimetacrilato (178), y mediante copolimerización de estireno y divinilbenceno con una mezcla de THF y decanol como porogénico, monolitos de PS-DVB (179), en ambos casos en capilares de 200 μm .

También se han preparado columnas monolíticas de polimetacrilato con capilares de sílice fundida mediante copolimerización vía radicales libres, que se han comparado con columnas monolíticas comerciales capilares en base sílice en función de las curvas de Van Deemter obtenidas, de la permeabilidad, de la distribución de los poros en los monolitos y de las interacciones con ácidos naftalenosulfónicos (180).

Recientemente se ha preparado una nueva columna monolítica de 530 μm para cLC mediante copolimerización in situ de octil metacrilato y etilenodimetacrilato, en presencia de disolvente porogénico con 1-propanol, 1,4-butanodiol y agua con azo-bis-isobutironitrilo como iniciador, que bajo condiciones experimentales óptimas, ha mostrado buena permeabilidad y estabilidad (181).

b) Ensanchamiento de banda extracolumna

Puesto que el volumen de elución de los analitos se encuentra relacionado con el cuadrado del diámetro de la columna, el efecto de los parámetros que contribuyen al ensanchamiento de banda puede ser mayores con columnas de diámetro interno reducido y con volúmenes pequeños de inyección (182). Así, las columnas capilares empaquetadas son muy sensibles a los volúmenes muertos de las válvulas de inyección, de los tubos de conexión y de las células de flujo de detección, lo que implica necesariamente un control crítico de los procesos de ensanchamiento de banda para conseguir resoluciones y eficacias adecuadas (183).

La eficacia total de un sistema cromatográfico es función de la eficacia de la columna y de la contribución instrumental al ensanchamiento de banda. Considerando que todas las contribuciones a la variancia de pico son independientes, la variancia total (σ^2_{tot}) se puede expresar como suma de las siguientes contribuciones:

$$\sigma^2_{\text{tot}} = \sigma^2_{\text{col}} + \sigma^2_{\text{cap}} + \sigma^2_{\text{inj}} + \sigma^2_{\text{det}} + \sigma^2_{\text{otros}}$$

siendo σ^2_{col} la variancia de la columna; σ^2_{cap} la variancia originada por los capilares de conexión; σ^2_{inj} la variancia del volumen y del proceso de inyección; σ^2_{det} la variancia producida por el volumen de la célula del detector y las contribuciones de su tiempo de respuesta; σ^2_{otros} las contribuciones producidas por otros componentes como por ejemplo las uniones del sistema.

Para calcular el ensanchamiento de banda extracolumna se han utilizado diversos procedimientos como el acoplamiento directo sin columna entre el dispositivo de inyección y detección o el método de extrapolación lineal con columna, que basado en la correlación entre las varianzas de los picos y los factores de capacidad de una serie homóloga, tiene en cuenta la contribución de las fritas y el perfil del flujo a la entrada y salida de la columna. También se ha utilizado la medida de la dispersión del volumen inyectado de muestra con fotodiodos colocados a lo largo de una columna transparente, procedimiento que no es aplicable con la mayoría de las columnas de HPLC (182).

Estudios recientes, han demostrado que el ensanchamiento de banda en algunos sistemas capilares comerciales modificados es del mismo orden que en los sistemas convencionales de HPLC, aunque en columnas capilares, la influencia en la eficacia por cambios en la densidad del empaquetamiento cerca de la pared de la columna es más importante, debido a la mayor proporción de partículas cerca de la región central y de la pared (184). Por otra parte, y puesto que los capilares utilizados para la conexión de la columna con el detector y el inyector pueden contribuir de forma considerable a la dispersión, su diámetro y longitud se debe elegir cuidadosamente, considerando la limitación de sobrepresión del sistema. Así, para caudales de $5 \mu\text{L min}^{-1}$ se ha recomendado la utilización de capilares de $50 \mu\text{m}$ de diámetro interno, y en general, conexiones de volumen muerto cero que eviten el ensanchamiento de banda adicional y la pérdida de resolución. Puesto que el diámetro interno del bucle de inyección también contribuye a la dispersión de la muestra, Vissers y col. han sugerido un valor óptimo de $100 \mu\text{m}$ (183).

□ Instrumentación

A pesar de las ventajas que presenta el empleo de micro-columnas y de los beneficios de la miniaturización, los requerimientos instrumentales son complejos debido a los volúmenes muertos y a los problemas asociados al acoplamiento de los capilares al detector y al inyector. Por ello, para adecuarse a las características de operación con este tipo de columnas y evitar el ensanchamiento de banda extracolumna, resulta necesario adaptar el sistema de bombeo, el de inyección y el de detección.

Aunque los sistemas de micro-HPLC al disminuir el consumo de fase móvil reducen los costes de disolventes y los desechos generados, la instrumentación analítica y las columnas utilizadas siguen resultando costosas, lo que todavía es uno de sus principales inconvenientes. Sin embargo, la demanda de este tipo técnicas ha permitido el desarrollo de equipos que en la actualidad se encuentran comercialmente disponibles.

a) Sistemas de bombeo

Inicialmente, debido al reducido diámetro interno de la columna, el transporte de caudales precisos en los intervalos de nL y μL no se podía realizar por bombeo directo, de forma que se utilizaban técnicas de división de flujo basadas en columnas específicas o aparatos divisores de flujo (166). Actualmente se encuentran bombas disponibles capaces de operar a estos caudales bajo condiciones isocráticas, aunque debido a la demanda de sistemas de nanoflujo estables con gradientes de elución, los últimos avances han permitido miniaturizar bombas de alta presión capaces de realizar gradientes de composición que requieren caudales del orden de los sub- μL (65). Puesto que el coste de este tipo de bombas es elevado, se continúan utilizando otros métodos como la formación de gradientes exponenciales o la formación de gradientes fuera de línea. Recientemente se ha desarrollado un método basado en un sistema estándar de gradiente semi-micro, con una válvula de inyección de 10 vías y otras dos válvulas de inyección, que ha permitido generar fácilmente a un caudal de 200 nL min^{-1} un gradiente de nanoflujo y que se ha podido acoplar a ESI-MS con tiempo de vuelo (185).

b) Sistemas de inyección y focalización

El volumen de muestra inyectado y el modo en el cual el bolo de muestra se transfiere a la columna afecta, de forma considerable, tanto al ensanchamiento de la banda cromatográfica como a la resolución entre picos. Dado que el volumen de elución aumenta con el cuadrado del diámetro de la columna, la inyección resulta un parámetro

crítico cuando se disminuye el tamaño de la columna cromatográfica (166). Para columnas con diámetros internos de entre 50 y 100 μm se suelen utilizar volúmenes de inyección del orden de nL y para columnas de 1.0 mm de diámetro interno un volumen de 1 μL .

En cromatografía líquida convencional, en la inyección manual, se suelen utilizar válvulas con bucles de inyección de volumen fijo. En el caso de la cromatografía capilar, se pueden utilizar también bucles de volumen fijo de hasta 20 nL, aunque en este caso el bucle de inyección es interno. Para utilizar volúmenes menores, es necesario adaptar las técnicas de inyección de modo que se pueda controlar el tiempo de inyección y el caudal de fase móvil que circula a través del inyector (184).

Un problema general de las técnicas de miniaturización en cromatografía líquida es la pérdida de sensibilidad en el proceso de detección debido al pequeño volumen inyectado, problema que se puede minimizar inyectando grandes volúmenes de muestra y utilizando algunas de las denominadas *técnicas de focalización*. Estas técnicas tienen en común que el disolvente o la temperatura a la que se encuentra la muestra posee un poder de elución menor que el de la fase móvil o la temperatura utilizada para la separación, lo que permite que los analitos queden retenidos en un pequeño volumen cuando el bolo de muestra inyectado alcanza la cabeza de columna. El tiempo necesario para cargar un volumen de muestra dado en condiciones de focalización aumenta al disminuir el diámetro interno de la columna y en el caso de las nanocolumnas, además es necesario conectar a la columna analítica una precolumna que permita la retención adecuada de los analitos.

De forma general, los *modos de inyección* en cromatografía líquida capilar y en nanocromatografía se pueden clasificar en cinco grupos:

I. Inyección por división

Parte de la muestra contenida en un bucle se introduce en la columna cromatográfica y parte se desecha. La relación de división puede ser elegida en función del tamaño de un capilar restrictor.

II. Llenado parcial del sistema de inyección.

El volumen inyectado viene dado por la cantidad dispensada desde una jeringa.

III. Llenado completo.

El volumen de inyección, que viene determinado por el tamaño de una cámara de muestra, es desplazado completamente por la fase móvil. En el modo de bucle completo no se pueden inyectar volúmenes de pocos nanolitros con bucles externos y no es posible construir una cámara para la muestra de pocos nanolitros sin que se produzcan problemas de presión que afecten a la reproducibilidad de la inyección.

IV. Inyección por tiempo.

El volumen inyectado es función del tiempo en que el inyector se encuentra en la posición de inyección y del caudal de la fase móvil.

V. Técnicas de enriquecimiento (168, 183, 186).

La inyección con división se ha utilizado con columnas monolíticas capilares de diámetros internos comprendidos entre 50 y 100 μm (174). La división se puede controlar o bien con tubos restrictores o con nanoconectores en Y, utilizando sistemas de contrapresión para evitar pérdidas de presión durante el proceso de inyección. La inyección por división se puede controlar mecánica o eléctricamente. En este último caso la reproducibilidad de la inyección se aumenta considerablemente, mejora que ha permitido determinar oligómeros de polietilenglicol (169).

Claessens y col. han estudiado el efecto que produce sobre diversos parámetros cromatográficos los diferentes modos de inyección, las técnicas de concentración en cabeza de columna, la inyección total y la inyección parcial en columnas de diámetros internos entre 1-35 mm (187).

Cuando los analitos se encuentran en muy baja concentración pero en un volumen suficiente se pueden inyectar grandes volúmenes de muestra, pero es necesario disminuir la posible pérdida de resolución causada por la sobrecarga de esos volúmenes, para los cual se pueden utilizar varias estrategias. Vissers y col (183) han evaluado la posibilidad de inyectar grandes volúmenes de muestra (1-5 μL) con columnas de diámetro interno entre 300 μm y 1 mm, utilizando para su inyección un disolvente de menor poder eluotrópico que la fase móvil empleada para la separación. Utilizando focalización se han podido inyectar 100 μL de muestra para la determinación de derivados de isocianatos en una columna de fase inversa de 320 μm de diámetro interno (187) y de ácidos de alquifosfónico (188). Con este mismo tipo de columnas y grandes volúmenes de muestra se han determinado productos de degradación de neurotóxicos

utilizados en la guerra química (189), pesticidas polares (190) e inhibidores de la serotonina en muestras biológicas (170). La composición de la disolución de focalización se debe elegir cuidadosamente, ya que en algunos casos se puede llegar a favorecer la disociación de sustancias con características ácido-base. La adición de modificadores como el ácido trifluoroacético (191) ha hecho posible la preconcentración en cabeza de columna de pesticidas ácidos sin los problemas asociados a la pérdida de resolución por desdoblamiento de los picos cromatográficos.

Cuando se trabaja en fase inversa no siempre es posible introducir disoluciones de focalización con grandes contenidos de fase acuosa, de forma que en estos casos se puede utilizar la focalización con temperatura subambiente y un bucle de inyección de 100 μL (192) o bien en una precolumna (193).

También se pueden utilizar grandes volúmenes de inyección cargando previamente la muestra en una precolumna y utilizando diferentes técnicas de elución, en cuyo caso se necesita utilizar una bomba adicional para cargar la muestra y limpiar la precolumna para futuras inyecciones (168, 183, 194). En algunos casos, también es necesario utilizar un patrón interno para mejorar la reproducibilidad (194).

c) Sistemas de detección

Los detectores utilizados con este tipo de columnas deben proporcionar respuestas rápidas (menores de 5 s), y como consecuencia de los reducidos caudales, la célula de flujo del detector debe ser \leq a 10 nL con columnas tubulares abiertas, y 100 nL en el caso de columnas capilares empaquetadas (65). Tanto en análisis isocrático como en gradiente, los canales de flujo del detector, los tubos de conexión y el propio detector, pueden producir una dispersión significativa que disminuye la resolución y la sensibilidad de la detección (186).

En miniaturización, el desarrollo de detectores adecuados se ha centrado fundamentalmente en los detectores UV, fluorescentes y electroquímicos, utilizando células en línea para reducir el ensanchamiento de banda e incrementar la sensibilidad, y en el caso de los dos primeros láseres y fibra óptica ultravioleta como fuentes de excitación.

Por otro lado, se ha potenciado y desarrollado el acoplamiento directo a sistemas de detección que requieren el transporte y/o concentración previa del disolvente como MS, sistemas de llama e ICP (65).

Los principales detectores utilizados en micro-cromatografía son los siguientes:

I. Detector de absorbancia UV.

Dada su facilidad de uso y gran área de aplicación, este detector es también muy utilizado con columnas de pequeño diámetro. La apertura de la célula debe ser relativamente grande y puesto que la sensibilidad es proporcional a la longitud de paso de la célula de flujo, se debe llegar a un compromiso entre la máxima sensibilidad y la mínima dispersión de pico. Para evitar esta dispersión, se han utilizado células de flujo longitudinales en forma de U y Z con longitudes de paso óptico extendidas (3-8 mm), conectores de volumen muerto cero y conexiones de capilares de diámetro interno reducido menores en algunos casos de 20 μm , cuya contribución al ensanchamiento de banda extracolumna es despreciable (167). También se ha utilizado una fuente de láser y se ha desarrollado la detección con matriz de diodos en micro-cromatografía.

II. Detector de fluorescencia.

Proporciona mayor sensibilidad y selectividad que la absorción UV o la detección de índice de refracción.

III. Detectores electroquímicos.

Pueden ser amperométricos, potenciométricos y de conductividad. Se han utilizado fundamentalmente en el área de bioanálisis (166).

IV. Espectrómetros de masas.

Por diversas razones, las técnicas de MS con ionización suave y la mayoría de las interfases actuales funcionan mejor si la mayor parte del disolvente es eliminado antes de la ionización. Interfases como las de ESI y FAB, toleran solamente caudales de fase móvil menores de 10 $\mu\text{L min}^{-1}$. Con las técnicas de micro-HPLC, el uso de nebulizadores de microflujo permite que el soluto, que se distribuye a través de un gran número de partículas de baja masa, se vaporice rápidamente en la fuente de iones, minimizándose su descomposición térmica. Este hecho supone una gran ventaja en el caso de herbicidas ácidos como los fenoxiácidos, y produce mejoras en los espectros de masas obtenidos (191). Puesto que las micro-columnas se pueden acoplar directamente a fuentes de iones como EI, PB, ESI y FAB, el ensanchamiento de banda extracolumna se disminuye considerablemente (166, 195).

□ **Gradientes de elución y programas de temperatura**

Inicialmente, el ajuste de la fuerza eluotrópica de la fase móvil mediante gradientes de composición, no resultaba sencillo con columnas de diámetro interno reducido por los bajos caudales utilizados. En la actualidad, no existen limitaciones instrumentales en relación al empleo de gradientes de elución con micro-columnas, pero se necesitan además de varios depósitos y canales de disolventes bombas de micro-flujo, que aunque se encuentran comercialmente disponibles resultan todavía bastante costosas (111).

Debido a la bajas capacidades caloríficas, a la favorable geometría, a los despreciables gradientes radiales de temperatura y a la rápida respuesta térmica, el uso de programas de temperatura con este tipo de columnas puede ser una buena alternativa a los gradientes de elución para optimizar la separación (166, 169, 170, 192, 193). Desde un punto de vista instrumental, los gradientes térmicos son más sencillos de conseguir que los de fase móvil, puesto que solo se necesita una bomba, un depósito de disolvente y un sistema de calefacción o de refrigeración, además de requerir un mantenimiento menor. A diferencia de las columnas utilizadas en LC convencional, con micro-columnas no se requiere el calentamiento previo de los disolventes, y puesto que la transferencia de calor es muy efectiva, el efecto de la temperatura en el control de la retención y de la selectividad es más importante (111).

Recientemente se ha estudiado el efecto de la temperatura en la separación de compuestos de diferente naturaleza, carácter iónico y polaridad (fenoxiácidos y carbamatos) con una columna capilar empaquetada C₁₈ (3 μm, 15 cm x 300 μm I.D.), utilizando grandes volúmenes de inyección (20 μL) y disoluciones de muestra de bajo poder eluotrópico, en función de parámetros cromatográficos como el ancho de pico, resolución, factor de retención y número de platos. De esta forma, se ha comprobado que la temperatura puede ser una herramienta útil para controlar la eficacia y la resolución en sistemas de cLC bajo condiciones isocráticas, puesto que comparada con los gradientes equivalentes de composición de fase móvil, produce cambios más importantes en la fortaleza de elución y mejora los parámetros cromatográficos (196).

□ **Aplicaciones de nano y cLC**

Actualmente, las ventajas del empleo de micro-columnas en HPLC en relación a las columnas de diámetro interno convencional, son evidentes y se encuentran bien establecidas. El interés por el desarrollo de micro-columnas, ha crecido fundamentalmente por las mejoras que ha supuesto su utilización en áreas como el bioanálisis y la neurociencia, donde la cantidad de muestra disponible para el análisis suele ser muy pequeña. Otra de sus características que ha permitido extender su aplicación a otras áreas, es su bajo consumo de fase móvil, pero también, las pequeñas cantidades de fase estacionaria necesarias para la preparación de columnas, que en ocasiones, como en el caso de las fases estacionarias quirales resultan muy costosas. De esta forma, el campo de las separaciones enantioméricas, tanto en medioambiente como en la industria farmacéutica, resulta muy prometedor, por lo que sigue resultando esencial el desarrollo de nuevos métodos y aportaciones en las separaciones con micro-columnas.

La cromatografía líquida capilar acoplada con espectrometría de masas se ha utilizado para determinar proteínas, aductos de ADN formados “in vivo”, metabolitos de vitamina D (166), hormonas del crecimiento en ratas (197) y β -lactamas en leche (198). Con columnas capilares y programas de temperatura, se ha llevado a cabo la separación de β -lactoglobulinas (199), y combinando temperatura y focalización en columna con grandes volúmenes de inyección se han determinado retinoides (200) y antidepresivos (170) en columnas empaquetadas de fase inversa de 320 μm I.D. Recientemente, mediante el empleo de técnicas de nano-LC con capilares de sílice fundida empaquetados de diámetro interno 75 y 100 μm , se ha conseguido respectivamente la resolución de los enantiómeros de la D,L-loxiglumida en medicamentos utilizados para prevenir desórdenes gastrointestinales (201) y la determinación de tocoferoles en suero y preparaciones farmacéuticas (202). Utilizando un capilar de 75 μm empaquetado con una CSP de vancomicina y un detector de UV, se ha llevado a cabo la separación y determinación quiral de una amplia variedad de compuestos ácidos y básicos de interés farmacéutico, como por ejemplo el β -blocante metopropol en comprimidos (203).

En el campo del *análisis de muestras industriales* se han utilizado columnas capilares empaquetadas con técnicas de focalización en cabeza de columna y programas de temperatura en algunos casos, para la separación y determinación de antioxidantes en poliolefinas (192), oligómeros de polietilenglicol utilizados en la síntesis de tensoactivos y emulsificantes (169), isocianatos empleados normalmente en la producción de poliuretano, pinturas, adhesivos, lacas y tintes (204), y aminas de bajo peso molecular utilizadas en la estabilización de poliolefinas (205).

En *análisis medioambiental*, la cromatografía líquida capilar ha resultado muy eficaz para la determinación de residuos de pesticidas y otros contaminantes de diversa polaridad en una amplia variedad de muestras (41, 62, 145, 168, 191, 199, 206-210). En lo que respecta a la separación quiral de herbicidas fenoxiácido, tradicionalmente se ha llevado a cabo mediante electroforesis capilar utilizando como selectores quirales tensoactivos (211), ciclodextrinas (212) o antibióticos (213, 214), y aunque se han realizado separaciones mediante LC convencional con fases estacionarias de tergurida (51), α -glicoproteína y tipo Pirkle (57, 64), teicoplanina (126, 147, 148) y otros antibióticos macrocíclicos como ristoceina A y vancomicina (215), hasta el momento no se había descrito ninguna aplicación mediante cLC o nano-LC. Sin embargo, recientemente se ha conseguido la separación de 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP con un capilar de sílice fundida de 75 μm empaquetado con vancomicina, lo que constituye una aplicación novedosa de este tipo de nano-columnas (216).

Por otra parte, y debido a las mejoras observadas en la sensibilidad cuando se utilizan columnas capilares en lugar de convencionales, se han podido determinar residuos de herbicidas fenoxiácido con columnas capilares empaquetadas de sílice C_{18} , a los máximos niveles permitidos por ley con recuperaciones aceptables en una amplia variedad de muestras como judías verdes, utilizando gradiente de elución en la separación (41), suelos, mediante técnicas de focalización en cabeza de columna, grandes volúmenes de inyección y programa de temperatura (206), y muestras de zumo de manzana comercial, en este caso mediante gradiente de elución con focalización e inyección de grandes volúmenes (217).

Utilizando *columnas tubulares abiertas* con películas de espesor 0.75 ó 1.5 μm de etoxietilacrilato preparadas por fotopolimerización in situ, se han separado derivados de antraceno y alquilaminas derivatizadas con orto-ftaldehído, en capilares de

dimensiones 5 m x 10 μm I.D. y 1.2 m x 5 μm I.D. respectivamente, empleando para su determinación detección fluorescente inducida por láser (171). Mediante cromatografía de afinidad, se ha llevado a cabo la separación de BSA y lisozima con gradiente de elución, en una columna tubular abierta preparada por inmovilización de azul de cibacron F3GA (denominación comercial) en la superficie interior de un capilar de 50 μm I.D. (218). También se han separado hidrocarburos poliaromáticos como el naftaleno, bifenilo, fluoreno, 2-etilnaftaleno y 2,6-dimetilnaftaleno en columnas tubulares abiertas con fases estacionarias inmovilizadas a la pared de un capilar de 50 cm x 10 μm I.D. de n-octiltrietoxisilano/tetraetoxisilano en relación 0.5 y octiltrietoxisilano, a un caudal de 3.3 nL min⁻¹ y detección UV a 220 nm, con eficacias de hasta 285000 platos m⁻¹ (173).

El empleo de *columnas capilares monolíticas* en bioanálisis ha aumentado de forma considerable en los últimos años. La separación de mezclas de proteínas como la ribonucleasa A, citocromo C, mioglobina y ovoalbúmina, se ha realizado en columnas de 200 μm I.D de polibutylmetacrilato-co-etileno-dimetacrilato a un caudal de 100 μL min⁻¹ y en un tiempo menor de 40 s, sin observar efecto alguno del tamaño de poro en el intervalo de 0.66-2.2 μm (178). También se han separado oligonucleótidos (179) y oligodeoxinucleótidos (219) con elevada eficacia, en una columna de 200 μm I.D de PS-DVB y polinorboneno entrecruzado respectivamente. La combinación LC-MS con columnas capilares monolíticas en base sílice, ha sido muy utilizada en proteómica en el análisis de fosfolípidos, péptidos y suero humano (220). Con columnas monolíticas de PS-DVB preparadas por copolimerización radical in situ y MS, se han separado y determinado con alta resolución fragmentos de DNA (221). En el campo de las separaciones quirales, se han utilizado columnas monolíticas en base sílice de 100 μm I.D modificadas químicamente con selectores quirales como L-fenilalaninamida, L-alaninamida y L-prolinamida en su superficie, para la separación enantiomérica de dansil aminoácidos e hidroxiaácidos (222). Utilizando una columna monolítica capilar de sílice modificada con celulosa tris-3,5-dimetilfenilcarbamato, se ha realizado la enantioseparación de algunas drogas quirales (223).

Las tablas 16-18 muestran algunas aplicaciones del empleo de micro-columnas en HPLC.

Tabla 16
Principales aplicaciones de nano-LC y cLC en el campo del bioanálisis

| <i>TÉCNICA</i> | <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|----------------|---|--|--|-----------------|--------------------------------|--|------------|
| cLC | antidepresivos; citalopram, paroxetina, fluoxetina y metabolitos (plasma) | Kromasil C ₁₈ 300 x 0.32 mm I.D. 3.5 μm | AcN-45 mM formiato amónico pH 4.0 25:75 (v/v) | UV (230 nm) | 0.05-0.26 μM | SPE C ₈ Programa de temperatura de 35°C (3 min) hasta 100°C (10 min) a 1.3°C min ⁻¹ Inyección de 10 μL en fase móvil 3:97 (v/v) | (170) |
| | retinoides | Suplex pKb-100 25 cm x 320 μm I.D. 5 μm | AcN-acetato amónico (0.5% en agua)-HAc 94.9:5:0.075 (v/v/v) 5 μL min ⁻¹ | UV (360 nm) | 5 ng mL ⁻¹ | Separación a 50°C Inyección de 100 μL en disolución de focalización AcN-acetato amónico (0.5% en agua)-agua 45:5:50 (v/v/v) | (200) |
| nano-LC | D,L-loxiglumida | Hepta-Tyr aminosílice 3:1 (p/p) 7 cm x 75 μm I.D. | 50% AcN 50% tampón fosfato 100 mM pH 6 | DAD (206 nm) | 0.3-0.5 μg mL ⁻¹ | Separación en 5 min Inyección hidrodinámica a 12 bar, 0.2 min | (201) |
| | α, γ, δ-tocoferol, α-tocoferol acetato (suero, preparaciones farmacéuticas) | 3-5 μm Sílice RP ₁₈ 23 cm x 100 μm I.D. | MeOH-AcN-H ₂ O 240 nL min ⁻¹ | UV (205 nm) | 4-6 μg mL ⁻¹ | Extracción en hexano, evaporación y reconstitución con AcN-MeOH 70:30 (v/v) Inyección 40 nL | (202) |
| | Separación quiral de metoprolol (preparación farmacéutica Lopreson [®]) | Vancomicina (5μm) 23 cm x 75 μm I.D. | 500 mM acetato amónico pH 4.5- agua-MeOH 1:4:95 (v/v/v) | UV (195 nm) | 1.5 μg mL ⁻¹ | Inyección 60 nL Recuperación ≈ 97% | (203) |

Tabla 17
Principales aplicaciones de cLC en el análisis industrial

| <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|--|---|--|--|----------------------------|--|------------|
| oligómeros nativos de polietilenglicol | Hypersil ODS 300 x 0.32 mm I.D. (3 µm) | AcN-agua 30:70 v/v 3 µL min ⁻¹ | Evaporación por dispersión de luz (N ₂) | - | Dependencia inversa con T (mayor k a mayor T) Programa de temperatura; de 80 a 25 °C a -1.5°C min ⁻¹ Inyección con división por tiempo. Separación de 26 picos en un tiempo de 43 min | (169) |
| antioxidantes (poliolefinas) | Kromasil ODS 50 cm x 320 µm I.D. (3.5 µm) | AcN | UV (280 nm) célula en forma de U | 33 ng mL ⁻¹ | Extracción soxhlet-MASE Inyección 100 µL y focalización en columna a temperatura sub-ambiente Programa de temperatura; 7 a 90°C (3°C min ⁻¹) | (192) |
| isocianatos derivados de 1-(2-metoxifenil)-piperazina (aire) | Hypersil ODS 250 x 0.320 mm I.D. (3 µm) | AcN-tampón acetato (3% TEA, pH 4.5) 45:55 (v/v) 5 µL min ⁻¹ | UV (235 nm) célula en forma de U | 44-210 pg mL ⁻¹ | Temperatura programada Inyección 100 µL Disolución de focalización en fase móvil 30:70 (v/v) | (197) |
| aminas de bajo peso molecular (poliolefinas) | Hypersil ODS 35 cm x 0.32 mm ID (3 µm) | Etilacetato-AcN-TEA-HAc 45.0:44.9:10:0.1 (v/v/v/v) 5 µL min ⁻¹ | Evaporación por dispersión de luz ESI-TOF-MS | - | Temperatura programada de 30 a 120°C | (205) |

Tabla 18
Principales aplicaciones de nano-LC y cLC en medioambiente

| <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|---|--|---|---------------------|----------------------------|--|------------|
| 2,4-D, 2,4-DB ésteres metílico y butílico de 2,4-D (suelo) | Hypersil BDS 150 x 0.3 mm I.D. (3 µm) | MeOH-solución acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 56:44 (v/v) 10 µL min ⁻¹ | UV (232 nm) | 0.3-0.5 µg g ⁻¹ | Inyección 20 µL Disolución de focalización agua-AcN 85:15 (v/v) Gradiente de temperatura de 20 °C (6 min) a 65°C (9°C min ⁻¹) Extracción con ultrasonidos | (206) |
| triazinas y sus productos de degradación (agua) | Spherisorb ODS 150 x 0.3 mm I.D. (3 µm) | Acetato amónico 50 mM pH 7-AcN 69:31 (v/v) 10 µL min ⁻¹ | UV (228 nm) | 9-45 ng L ⁻¹ | Preconcentración en columna PRP-X100 Gradiente de temperatura de 15°C (1 min) a 70°C (2°C min ⁻¹) Inyección 5 µL Dis. focalización 50 mM acetato amónico en agua | (207) |
| clorobencenos | Hypersil BDS 50 x 0.18 mm I.D. (3 µm) | AcN-agua 3:7 (v/v) | UV (210 nm) | - | Gradiente de caudal (de 80 a 150 µL min ⁻¹) Gradiente de temperatura (de 323 a 383 K a 6 K min ⁻¹). Inyección 60 nL | (208) |
| sarín, somán y sus productos de hidrólisis (suelos) | Zorbax C ₁₈ SB 150 x 0.32 mm I.D (5 µm) | A: 0.1% TFA-agua B: 0.1% TFA en AcN-agua 95:5 (v/v) Gradiente de 1 a 75% B en 30 min 16 µL min ⁻¹ | ESI-MS (TOF) | 10 µg g ⁻¹ | Extracción acuosa previa con ultrasonidos Inyección de 5 µL | (209) |

Tabla 18 (continuación)
Principales aplicaciones de nano-LC y cLC en medioambiente

| <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|---|--|--|---|---------------------------------|--|------------|
| etilbenceno, tolueno, nitrobenzeno, fenol, benceno, n-propilbenceno | zirconia 13 cm x 180-360 µm ID (3 µm) | Agua caliente pura 8.6 µL min ⁻¹ | UV (195 nm) FID | - | Temperatura de 370°C (10000 psi) Bucle de inyección 20 nL | (210) |
| cloranben, dinoterb, bentazona, dinoseb, pentaclorofenol, 2,4-DB, MCPB (agua superficial) | C ₁₈ 25 cm x 0.25 mm I.D. (5 µm) | Agua 0.5% TFA- MeOH 0.5% TFA Gradiente de elución de 100:0 a 20:80 (v/v) (40 min) 1.0 µL min ⁻¹ | PB-MS | 20 ng L ⁻¹ | SPE en cartucho 0.5 g negro de carbono grafitizado Inyección de 50 µL | (191) |
| hidrocarburos poliaromáticos | Zorbax SB ODS sílice 27 cm x 0.18 mm I.D. (6 µm) | Gradiente de elución 68-80 (v/v) AcN-agua | UV (254 nm) | - | Gradiente de temperatura 30-80°C (5°C min ⁻¹) Inyección 60 nL | (199) |
| insecticidas, herbicidas, fungicidas (agua, manzana) | C ₁₈ 150 mm x 0.18 mm I.D. (5 µm) | Gradiente de elución AcN-agua Gradiente caudal 3-4 µL min ⁻¹ | UV (220 nm) célula en forma de U (35 nL) | 0.15-0.80 µg L ⁻¹ | Discos de SPE C ₁₈ Inyección de 0.25-µL a temperatura ambiente | (62) |
| dicamba, MCPA, 2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-TP, 2,4,5-T, MCPB, 2,4-DB (agua) | C ₁₈ 25 cm x 0.25 mm I.D. (5 µm) | 0.05% TFA-agua 0.025%TFA-AcN Gradiente elución 100:0 a 20:80 (v/v) (40 min). Gradiente caudal 1-5 µL min ⁻¹ | PB-MS | 0.7-5.0 ng | SPE cartucho de negro de carbono Carbograph 1 6.5 x 1.4 cm I.D. | (145) |

Tabla 18 (continuación)
Principales aplicaciones de nano-LC y cLC en medioambiente

| <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>COLUMNA</i> | <i>FASE MÓVIL</i> | <i>DETECTOR</i> | <i>LD</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|--|--|--|--|-----------------------------|---|------------|
| carbamatos (agua) | Hypersil C ₁₈ 15 cm x 0.3 mm I.D (3 μm) | Gradiente de elución AcN-agua 10:90 (v/v) a 60:10 (v/v) (1 min) 4 μL min ⁻¹ | UV (220 nm) célula en forma de U (35 nL) | 0.02-0.3 μg L ⁻¹ | SPME en línea Inyección 30-45 μL Focalización en columna, disolución AcN:agua 10:90 (v/v) | (168) |
| fenoxiácidos y dicamba (judías verdes) | Spherisorb ODS 15 cm x 0.3 mm I.D (3 μm) | Isocrática MeOH : s. acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 53:47 (v/v) Gradiente de elución de 50:50 a 80:20 (v/v) 5 μL min ⁻¹ | UV (232 nm) célula 35 nL | 5-20 pg | Hidrólisis básica y SPE en columna MFE-Polímero (HEMA) funcionalizada con grupos amonio cuaternario Temperatura 20°C Inyección 100 nL | (41) |
| separación de enantiómeros de 2,4-DP, MCP, P, 2,4,5-TP | sílice vancomicina 21 cm x 75 μm I.D. (5 μm) | MeOH-acetato amónico 500 mM pH 4.5-agua 85:5:10 (v/v/v) 60 nL min ⁻¹ | UV (195 nm) | 1.4-4.2 μg mL ⁻¹ | α: 1.6-1.9 Inyección 10 s <>60 nL | (215) |
| fenoxiácidos, en forma ácida y de ésteres (zumo de manzana) | Hypersil C ₁₈ BDS 15 cm x 0.3 mm I.D (3 μm) | Gradiente de elución MeOH : solución acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ de 40:60 (25 min) a 70:30 (v/v) en 15 min (8 μL min ⁻¹) | UV (232 nm) célula 35 nL | 3-11 μg L ⁻¹ | Filtración en membranas de poliéster y SPE en cartuchos OASIS [®] MCX Temperatura 25°C Volumen inyección 20 μL Disolución focalización agua-MeOH 85:15 (v/v) | (217) |

4.3. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS DE SEPARACIÓN

En los últimos años, la separación de herbicidas fenoxiácido también se ha llevado a cabo mediante métodos basados en electrocromatografía capilar (CEC), cromatografía electrocinética micelar (MEKC) y electroforesis capilar (CE), aunque en la actualidad, los métodos cromatográficos continúan siendo los más utilizados.

4.3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR Y CROMATOGRAFÍA ELECTRO-CINÉTICA MICELAR

La electroforesis capilar es una técnica analítica recientemente aplicada al análisis de pesticidas, que utiliza un capilar de sílice fundida relleno con una solución electrolítica, dentro del cual se genera un flujo electro-osmótico que produce que todos los iones, incluso las especies cargadas negativamente, migren hacia al cátodo. Dentro de la CE, la técnica más utilizada ha sido la cromatografía electrocinética micelar (MECK), donde se añade al electrolito de fondo un tensoactivo en concentración superior a su concentración micelar crítica, de forma que se produce la interacción de los analitos con las micelas formadas. Algunas de las ventajas de los métodos basados en CE son su simplicidad, los pequeños volúmenes de muestra y disolvente, la fácil automatización y el bajo coste del capilar. Su baja sensibilidad con detección UV, se ha intentado solucionar con técnicas de preconcentración y con el desarrollo de nuevos detectores como el de fluorescencia inducida por láser (224).

Utilizando *electroforesis de zona capilar* (CZE), se ha investigado la separación de 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4-DP, MCP y 2,4,5-TP y de sus enantiómeros con ciclodextrinas (CD) modificadas como la 2- y 3-monometilada y 2,3-dimetilada α -, β -, γ -CD (218). La separación de los enantiómeros de MCP y 2,4-DP se ha llevado a cabo a 20°C con una α -CD nativa, hidroxipropil- β -CD y un etilcarbonato derivado de β -CD, con detección UV a 214 nm aplicando un voltaje de 20 kV y utilizando como electrolito Na_2HPO_4 45 mM pH 5, aunque solamente el derivado de etilcarbonato ha permitido la separación a línea base de los cuatro enantiómeros estudiados (212). Estos estudios han resultado especialmente útiles para comprender los mecanismos de enantioseparación, puesto que la modificación química de las CD_s nativas produce cambios en la forma y tamaño de la cavidad y en consecuencia, en la capacidad de interacción y de formación de enlaces de hidrogeno. A parte de las ciclodextrinas, se han utilizado antibióticos como la vancomicina en concentración 6 mM, para la separación quiral de 2,4-DP, MCP y

2,4,5-TP, empleando la técnica de llenado parcial para incrementar la sensibilidad del método electroforético (225). Utilizando ristoceina A y tampón fosfato 0.1 M pH 6-10% 2-propanol (226), y teicoplanina con tampón fosfato 0.1 M pH 6-30% AcN (227), se ha conseguido la resolución a línea base de los enantiómeros del herbicida MCPP.

En lo que respecta a la separación de herbicidas tipo fenoxiácido mediante *cromatografía electrocinética capilar*, se ha estudiado el efecto de la adición de tensoactivos catiónicos como el bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), aniónicos como el dodecilsulfato (SDS) y no iónicos como el Brij 35 en la separación, y se han obtenido resoluciones adecuadas por adición simultánea de SDS y Brij35 (228). También se ha estudiado la adición de CDs y modificadores orgánicos a tampones borato-SDS, para la separación quiral y no quiral de ésteres metílicos de fenoxiácidos. Así, por adición de γ -CD (60 mM) y 15 % de metanol, se ha conseguido la separación a línea base de ésteres metílicos de fenoxiácidos y de los enantiómeros del éster metílico de 2,4,5-TP, mientras que la adición de otras CDs como la α -, β -, hidroxipropil- β , dimetil- β y la trimetil- β -CD, no ha permitido la separación de los enantiómeros de los ésteres metílico de 2,4-DP y 2,4,5-TP (229).

La separación enantiomérica de herbicidas fenoxiácido también se ha evaluado con tensoactivos quirales alquilglucósido. Como se ha podido comprobar, la concentración necesaria de tensoactivo para una máxima resolución es una función inversa de la hidrofobicidad del analito, y el incremento del pH del electrolito, al aumentar su grado de ionización, disminuye la asociación con las micelas quirales y en consecuencia la resolución de la separación, aunque a temperatura sub-ambiente se puede favorecer la asociación soluto-micela y mejorar la resolución enantiomérica (211).

4.3.2. ELECTROCROMATOGRAFÍA CAPILAR

Como alternativa a las técnicas electroforéticas basadas en MEKC, se ha desarrollado la electrocromatografía capilar, que utiliza capilares empaquetados en vez de una pseudo-fase estacionaria micelar y fases móviles conducidas electroosmóticamente a través de la columna por un campo eléctrico intenso, que modifica la adsorción de los componentes de la muestra a la fase estacionaria. Esta técnica, que combina la elevada selectividad de HPLC y la alta eficacia de CE, permite la separación

de las especies neutras por distribución entre la fase móvil y estacionaria, mientras que las especies cargadas experimentan una separación adicional debido a su movilidad electroforética inherente.

Estos sistemas no se caracterizan solamente por el factor de retención, sino también por el factor de velocidad de la migración electroforética (230). Algunas de sus principales ventajas son su capacidad para analizar moléculas neutras y cargadas y su bajo consumo de muestra y disolvente orgánico. Su elevada eficacia de separación comparada con HPLC permite obtener mayor resolución, capacidad de pico y menores tiempo de análisis, y su bajo caudal resulta compatible con sistemas de MS.

Sin embargo, la mayoría de las columnas utilizadas no se encuentran disponibles comercialmente, por lo que se preparan en los propios laboratorios de análisis. Además, el uso de campos eléctricos muy intensos junto con elevadas fuerzas iónicas pueden producir alteraciones de la corriente por calentamiento de Joule, lo que constituye todavía dos inconvenientes considerables (231).

En la tabla 19 se muestran algunas de las principales aplicaciones de los métodos de separación basados en CE y CEC para el análisis de herbicidas fenoxiácido.

Tabla 19
Aplicaciones de los métodos de CE y CEC a la separación de herbicidas fenoxiácido

| <i>ANALITOS (MUESTRA)</i> | <i>MÉTODO DE ANÁLISIS</i> | <i>CARACTERÍSTICAS</i> | <i>OBSERVACIONES</i> | <i>REF</i> |
|---|-------------------------------|--|---|------------|
| MCP, 2,4,5-TP Fluazip, Haloxyfop (Aguas de riego y de río) | CE (UV 205 nm) | $\varepsilon = 15$ KV Cátodo de poliacetamida | Cartuchos de estireno divinilbenceno Rec.; 87-100% RSD < 2 n = 10 | (91) |
| 2,4-D, 2,4,5-T, 2,4-DP, 2,4,5-TP | CE | Capilar de sílice fundida 50 μ m I.D. | LD= 10^{-4} M (detección UV) LD = 2.5×10^{-6} M (detección fluorescente) LD = 10^{-9} M (fluorescencia inducida láser) | (232) |
| 2,4-D, Dicamba (Caña de azúcar, arroz y maíz) | CEC | Detección UV | LLE y limpieza con columna fluorisil LD = 0.6 pg | (233) |
| Fenoxiácidos | CEZ (UV 220 nm) | +30 kV 30°C Acetato de litio 30-50 mM pH 4.8 | LD 1×10^{-5} M | (234) |
| 2,4-DP, MCP, 2,4,5-TP | CE ESI-MS (NI) | Capilar 50 μ m I.D. x 375 μ m O.D. longitud total 980 mm 20 mM Heptakis(2,3,6-tri-O-metil)- β - ciclodextrina-acetato amónico 50 mM pH 4.6 25°C -27.5 kV 16 μ A | Tiempo de separación 5 min Concentración 10^{-4} M en acetonitrilo | (235) |
| 2,4-D, MCPA, MCPB, 2,4-DP | CEC (UV 240 nm) | Columna monolítica de poliacrilamida Fase móvil; 23% AcN-2.4 mM formiato amónico pH 2.2 (TFA) | Tiempo de análisis 15 min Inyección 15 s a 20 kV | (236) |

4.4. OTROS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.4.1. INMUNOENSAYOS

Los métodos de determinación basados en inmunoensayos se caracterizan por su especificidad, sensibilidad, simplicidad y rapidez, y puesto que no requieren instrumentación sofisticada, también poseen bajo coste. A diferencia de los métodos cromatográficos de GC y HPLC no proporcionan información de la composición de la muestra y no permiten determinar más de un compuesto por análisis, pero han resultado bastante útiles para el “*screening*” en tiempo corto de un determinado analito en un gran número de muestras (53). Los más utilizados en el análisis de pesticidas han sido los inmunosensores, la cromatografía de inmunoafinidad y fundamentalmente los ensayos ELISA, que pueden reducir los efectos de matriz y por tanto la necesidad de limpieza y de preconcentración de la muestra, aunque no permiten la utilización de concentraciones de disolvente mayores del 10% (224).

Utilizando ensayos ELISA, se ha podido determinar 2,4-D en muestras de agua, suelo, frutas y vegetales (237), en semen (37) y en orina, mediante el empleo de un kit comercial adaptado (38). Otros fenoxiácidos como el 2,4,5-T se han cuantificado mediante el empleo de un fluoroinmunoensayo para anticuerpos y la medida de la intensidad de fluorescencia a 420 nm (238). Por otra parte, se ha determinado el herbicida 2,4-DP en muestras de manzana mediante incubación con fluoresceinamina en medio tamponado, y se han obtenido recuperaciones de aproximadamente 120% y límites de detección del orden de $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (239).

4.4.2. SENSORES

Tomando como referencia las técnicas de inmunoensayos, se han utilizado electrodos con biomoléculas inmovilizadas para la detección de analitos mediante interacciones específicas (224). Así, Kroger y col. han desarrollado un inmunosensor basado en la medida amperométrica de la actividad de la glucosa-oxidasa para la determinación semicuantitativa de 2,4-D a concentraciones por debajo del nivel de mg L^{-1} en extractos de suelo (240).

Otro tipo de sensores desarrollados para la determinación de herbicidas fenoxiácido han sido los biosensores de resonancia, que han permitido mediante el empleo de un compensador, la determinación de 2,4-D en aguas por contraste de polarización de fase (241).

5. TRATAMIENTO DE MUESTRA

En la mayoría de los casos, el análisis cromatográfico en muestras medioambientales no se puede llevar a cabo directamente como consecuencia de la complejidad y de los bajos niveles de existencia de los analitos en las muestras (suelo y productos vegetales ng kg^{-1} - mg kg^{-1} , aguas ng L^{-1}), por lo que resulta necesario una etapa previa de extracción, preconcentración y a veces una limpieza adicional, para disminuir el efecto perturbador de la materia orgánica co-extraída, eliminar los compuestos interferentes y determinar los analitos a las bajas concentraciones impuestas por las diferentes agencias reguladoras.

La estabilidad, toxicidad, persistencia en el medio ambiente y penetración en la planta de los herbicidas fenoxiácido depende de cómo se encuentran formulados, y aunque se han propuesto diferentes métodos, los estudios realizados para su determinación en forma de ésteres aislados o en combinación con las formas ácidas son muy escasos, debido a la dificultad de conservarlos en su forma original durante la etapa de tratamiento de muestra. Por ello resulta imprescindible controlar el pH, la temperatura y evitar cualquier etapa que implique la calefacción y/o la eliminación del disolvente, porque aunque se realice cuidadosamente se puede producir transformación entre especies (hidrólisis de ésteres a su forma ácida, conversión de enantiómeros), alteración y/o descomposición de los analitos y pérdidas por volatilidad (sobre todo con los herbicidas en forma de ésteres). De esta forma, la etapa de tratamiento de muestra constituye una de las etapas más críticas, lentas y laboriosas del análisis.

5.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS LÍQUIDAS Y SÓLIDAS

El tratamiento de la muestra se debe elegir cuidadosamente en función de su naturaleza química, estado físico y componentes a determinar.

En el caso de *muestras líquidas*, aunque la LLE ha sido muy utilizada, se suelen emplear métodos de SPE, puesto que son menos incómodos y laboriosos, requieren menor manipulación de la muestra y cantidades de disolvente orgánico, evitan la formación de emulsiones, proporcionan extractos más limpios, mayores factores de preconcentración y vida media de las columnas cromatográficas, además de ser procedimientos más fácilmente automatizables. También se ha empleado la microdiálisis, que utiliza una membrana semipermeable entre dos fases líquidas acuosas

para transferir los analitos de una a otra en base a su concentración diferencial. Esta técnica se puede utilizar en línea con micro-columnas de HPLC, y con determinados tipos de membranas, permite la desproteinización de muestras biológicas.

Las *muestras sólidas* se pueden disolver o bien tratar directamente. Su puesta en disolución se puede realizar mediante homogeneización, donde la muestra se agita constantemente con un disolvente orgánico o acuoso, o hidrólisis, en cuyo caso, la muestra se trata con un disolvente ácido o básico para eliminar la materia orgánica de la matriz. Después de la disolución de la muestra, para la separación o eliminación de las partículas suspendidas resulta necesaria una etapa adicional de filtración, centrifugación o sedimentación, que aunque permite la recuperación de diferentes tamaños de partícula a varios niveles, es extraordinariamente lenta. Una vez en disolución se pueden realizar cualquiera de los tratamientos mencionados anteriormente (108).

La separación de los analitos de interés en muestras sólidas mediante lixiviación se lleva a cabo con técnicas de extracción sólido-líquido como la extracción con **Soxhlet**, donde el disolvente puro refluye constantemente a través de la muestra contenida en un cartucho poroso desechable (242). Esta técnica, aunque es poco costosa, no requiere filtración después de la extracción, no es dependiente de la matriz y puede ser automatizada, es muy lenta, requiere grandes volúmenes de disolventes, evaporación tras la extracción y que la muestra sea estable a la temperatura de ebullición del disolvente utilizado (243). La **sonicación**, en cambio, es mucho más rápida, y en ella, la muestra finamente dividida se somete con un disolvente adecuado a radiación ultrasónica en un baño de ultrasonidos. En los últimos años, para disolver a los analitos de interés se han desarrollado otro tipo de técnicas de extracción como **ASE**, **SFE** o **MASE** con objeto de disminuir los tiempos de análisis, los volúmenes de disolvente, el coste de la preparación de la muestra y mejorar la precisión en la recuperación de los analitos (108).

En la extracción acelerada con disolvente, la muestra se introduce en un contenedor sellado o en un cartucho de extracción, y los analitos se extraen de la matriz con disolventes a temperaturas elevadas (50-200°C) y presiones de hasta 20 MPa. Esta técnica incrementa la velocidad del proceso de extracción, pero al igual que en otras, la extracción de compuestos orgánicos en función de su polaridad es muy difícil (169).

En el caso de la SFE, el fluido supercrítico se hace pasar a través de la muestra y después de la despresurización, el analito extraído se colecta en un disolvente o se atrapa en un adsorbente (108). Las propiedades físico-químicas del fluido como su baja viscosidad, su elevada difusión a través del sólido y su gran capacidad de penetración, contribuyen a incrementar la velocidad y a reducir el tiempo de extracción (244). Puesto que la densidad del fluido es función de la temperatura y de la presión, se necesita un control preciso de ambos parámetros, para controlar tanto la fortaleza del disolvente como la selectividad de la extracción. El agua, dada su elevada presión y temperatura crítica no se suele emplear en esta técnica (242), y normalmente debido a su baja toxicidad, reactividad química, pureza y escasa contaminación medioambiental, el disolvente más utilizado es el CO₂, aunque al ser relativamente no polar, se necesitan disolventes más polares como el metanol para mejorar la extracción en el caso de pesticidas polares. Como inconvenientes cabe destacar su limitación en el tamaño de la muestra, el coste de los equipos y la dependencia de la recuperación con la matriz (243).

En la extracción asistida con microondas, la muestra se calienta con energía de microondas en un contenedor abierto o cerrado y los analitos se extraen a un disolvente adecuado (108). Esta técnica permite el empleo de temperatura elevada, el control de todos los parámetros de la extracción (tiempo, potencia, temperatura) y la utilización de agua para calentar la matriz. Sin embargo, los extractos se deben filtrar y limpiar después de la extracción, puesto que se coextraen muchos de los componentes de la matriz (243).

En ocasiones, para poder aplicar la técnica de determinación seleccionada, se requiere un tratamiento de muestra adicional como por ejemplo su dilución, para evitar la sobrecarga de la columna cromatográfica o entrar dentro del intervalo de respuesta lineal del detector, o como su evaporación, para conseguir mayores factores de preconcentración (108).

5.1.1. APLICACIONES A LA EXTRACCIÓN DE FENOXIÁCIDOS

En lo que se refiere a la determinación de herbicidas fenoxiácido en distintas matrices, los métodos estándar de preparación de muestra incluyen LLE con disolventes como acetona, acetonitrilo, cloruro de metileno o dietiléter; extracción con Soxhlet y separación en fracciones con columnas cromatográficas.

El análisis de residuos en muestras de cereales, frutas y vegetales se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante hidrólisis ácida o básica, extracción con disolventes orgánicos de polaridad media o alta y limpieza en columnas empaquetadas con florisil, alúmina o gel de sílice antes de su determinación cromatográfica (58, 72, 84, 245-247). Puesto que estos métodos son lentos, laboriosos y requieren en general, grandes volúmenes de caros y a veces tóxicos e inflamables disolventes orgánicos, en la actualidad, la SPE ha reemplazado a los métodos convencionales basados en LLE, ya que disminuye los tiempos de análisis, reduce los volúmenes de disolvente y permite realizar la preconcentración y la limpieza en una sola etapa (242, 248).

Aparte de la LLE y SPE, también se ha utilizado la sonicación con disolventes orgánicos o acuosos y la centrifugación para su extracción mediante ultrasonidos en muestras de suelos (94, 206), y recientemente se ha empleado agua subcrítica en el tratamiento del mismo tipo de muestra (169). La utilización de extractantes acuosos muestra ventajas como su bajo coste, contaminación y la posibilidad de modificar su polaridad mediante cambios de temperatura (71).

Otras técnicas como la SFE con CO₂ supercrítico se han utilizado para la extracción de 2,4-D y de mezclas de fenoxiácidos en suelos (71, 99, 243) y muestras de polvo (91). La ASE a 100°C con diclorometano-acetona como disolvente, también se ha empleado para su extracción en distintos tipos de suelo, aunque las recuperaciones y precisiones obtenidas no han sido satisfactorias (249). Utilizando MASE con una energía de microondas de 950 W, se ha llevado a cabo la extracción de los herbicidas 2,4-D, MCPA, MCPB, MCPP, 2,4-DP, 2,4-DB y 2,4,5-TP de muestras de suelo (136). Sin embargo, cuando se utilizan técnicas que como las tres anteriores requieren temperaturas elevadas, la posibilidad de pérdidas por degradación y volatilización es mayor, por lo que no resultan adecuadas cuando se pretende la determinación de herbicidas en forma de ésteres.

5.2. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

5.2.1. ASPECTOS GENERALES

En la actualidad, resulta imprescindible el desarrollo de métodos sensibles y selectivos de extracción y separación en matrices complejas. Los procedimientos de SPE, no se utilizan únicamente para la extracción de trazas de compuestos orgánicos de muestras medioambientales, sino también para el almacenamiento, conservación y

transporte de la muestra, la eliminación de compuestos interferentes y la obtención de extractos limpios que contengan únicamente los analitos de interés.

La selectividad requerida, es función de la capacidad de la técnica de extracción para separar los analitos de las interferencias en la muestra original, por lo que un factor muy importante a tener en cuenta es la selectividad del adsorbente utilizado para la SPE, puesto que el objetivo principal es la eliminación de interferencias y la determinación mediante metodologías analíticas convencionales como GC o HPLC, que son técnicas cromatográficas que no resultan selectivas respecto a los compuestos co-extraídos de la muestra. De ahí la importancia de la elección adecuada del adsorbente y del protocolo de extracción, y por ello, la continua necesidad de desarrollo de nuevos adsorbentes.

La extracción en fase sólida es una técnica de preparación de muestra que se basa en la adsorción selectiva de los analitos en una fase sólida y que consta en general de las siguientes etapas: acondicionamiento, adsorción, lavado y elución.

Antes de llevar a cabo la extracción de los analitos, el adsorbente se debe acondicionar para hacer efectiva la superficie de contacto con la disolución de la muestra. En la etapa de adsorción, la muestra líquida se hace pasar a través del adsorbente que retiene los analitos de interés y el objetivo de la etapa de lavado es la eliminación de las sales y otros componentes de la matriz que se han retenido en el adsorbente sin que se produzca la elución de los analitos de interés. Por último, los analitos se eliminan del adsorbente sólido y se devuelven a la fase líquida, que es más adecuada para la medida analítica. Normalmente, se utiliza como eluyente un disolvente cuya naturaleza es función del mecanismo de retención, aunque también es posible la desorción térmica de los analitos con la ayuda de una corriente gaseosa.

Los distintos materiales adsorbentes utilizados en la SPE se encuentran disponibles comercialmente por las casas de suministros cromatográficos en diversos formatos entre los cuales cabe destacar las columnas, los cartuchos y los discos de extracción.

Las *columnas* se encuentran disponibles en diferentes dimensiones y permiten la automatización y utilización del adsorbente durante largos períodos de tiempo. Para una máxima eficacia, debe tener la mínima longitud posible y estar empaquetada con un adsorbente de pequeño tamaño de partícula, aunque se requiera mayor presión para forzar a la muestra a atravesar la columna.

El *cartucho de extracción* es otro formato frecuentemente utilizado porque además de la automatización, presenta como principal ventaja una mayor velocidad sin necesidad de ejercer gran presión. Las dimensiones del lecho adsorbente son suficientemente pequeñas como para permitir fácilmente el flujo de la muestra mediante succión o gravedad, y aunque el tamaño de partícula es variable, normalmente oscila entre 40 y 50 μm de diámetro. Las pequeñas dimensiones minimizan el volumen de disolvente necesario para acondicionar la columna y para eluir los analitos adsorbidos (250).

Los *discos* se utilizan fundamentalmente para reducir los tiempos de análisis cuando se manipulan grandes volúmenes de muestra, puesto que admiten mayores caudales y tienen mayores áreas transversales que las columnas y los cartuchos, y en consecuencia presentan menor posibilidad de taponamiento (251, 252). La elución de los analitos retenidos en la membrana es rápida y eficaz si el lecho adsorbente es de pequeño tamaño, en cuyo caso, la cantidad de disolvente orgánico necesaria para la desorción es menor que con cartuchos o columnas. Generalmente, se utilizan membranas flexibles de 0.5 mm de espesor constituidas por fibras de PTFE impregnadas, donde aproximadamente el 90% de la masa de la membrana contiene partículas del adsorbente sólido de 8 μm de diámetro (250).

La selección de un procedimiento adecuado de SPE depende del mecanismo de interacción entre el adsorbente y el analito de interés, para lo cual hay que conocer la hidrofobicidad y las propiedades polares e iónicas del soluto y del adsorbente. Los diversos mecanismos de retención que se ponen de manifiesto en un proceso de SPE son similares a los de cromatografía líquida, aunque no se producen por separado, sino combinados unos con otros. Así, los principales mecanismos que tienen lugar son reparto en fase inversa, partición en fase normal, intercambio iónico y exclusión por tamaño (253).

Los principales tipos de adsorbentes, los analitos y eluyentes adecuados para cada uno de ellos en función de los mecanismos de retención se muestran en la tabla 20 (108).

Tabla 20
Principales mecanismos de adsorción y condiciones de trabajo

| MECANISMO DE SEPARACIÓN | ADSORBENTES TÍPICOS | ESTRUCTURA | TIPO DE ANALITO | DISOLVENTE DE CARGA | DISOLVENTE DE ELUCIÓN |
|---------------------------------|--|---|--|---|--|
| <i>Partición en fase normal</i> | Sílice, alúmina, fluorisil | - SiOH, AlOH, Mg ₂ SiO ₃ | Ligeramente a moderadamente polar | Baja polaridad (hexano, CHCl ₃) | Alta polaridad (MeOH, etanol) |
| | Fase normal enlazada a grupos ciano, amino, diol | -CN, -NH ₂ , -CH(OH)-CH(OH)- | Moderadamente a fuertemente polar | Baja polaridad (hexano, CHCl ₃) | Alta polaridad (MeOH, etanol) |
| <i>Reparto en fase inversa</i> | Fase enlazada no polar, fuertemente hidrofóbica a octadecilxilosano, octilxilosano | (-CH ₂ -) ₁₇ -CH ₃ (-CH ₂ -) ₇ -CH ₃ | Hidrofóbico (fuertemente no polar) | Alta polaridad (H ₂ O, CH ₃ OH/H ₂ O, CH ₃ CN/H ₂ O) | Baja polaridad (hexano, CHCl ₃) |
| | Fase enlazada no polar, hidrofobicidad intermedia a ciclohexil, fenil, difenil | C ₅ H ₁₀ -CH-, Ph-CH-Ph | Moderadamente no polar | Alta polaridad (H ₂ O, CH ₃ OH/H ₂ O, CH ₃ CN/H ₂ O) | Polaridad intermedia (acetato etilo, CH ₂ Cl ₂) |
| | Fase enlazada no polar, baja hidrofobicidad a butil, etil, metil | (-CH ₂ -) ₃ -CH ₃ , -C ₂ H ₅ , -CH ₃ | Ligeramente polar a moderadamente no polar | De alta polaridad (H ₂ O) a moderada polaridad. | Alta polaridad (MeOH, etanol) |
| <i>Intercambio aniónico</i> | Polímero o sílice enlazada a amina 1 ^a , amina 2 ^a | (-CH ₂ -) ₃ NH ₂ , (CH ₂ -) ₃ NHCH ₂ CH ₂ NH ₂ | Ionizable, ácido | Agua, tampón (pH= pK _a +2) | Tampón (pH= pK _a -2) |
| | amina 4 ^a | (-CH ₂ -) ₃ N ⁺ (CH ₃) ₃ | Ionizable, ácido | Agua, tampón (pH= pK _a +2) | Tampón (pH= pK _a -2) |
| <i>Intercambio catiónico</i> | Polímero o sílice enlazada a ácido carboxílico | (-CH ₂ -) ₃ COOH | Ionizable, básico | Agua, tampón (pH= pK _a -2) | Tampón (pH= pK _a +2) |
| | ácido sulfónico aromático, ácido alquil sulfónico | Ph-SO ₃ H (-CH ₂ -) ₃ SO ₃ H | Ionizable, básico | Agua, tampón (pH= pK _a -2) | Tampón (pH= pK _a +2) |

5.2.2. CARACTERÍSTICAS Y TIPOS DE ADSORBENTES

Los diferentes tipos de adsorbentes utilizados en la SPE se pueden clasificar en fases no polares, polares y cambiadoras de iones. Los adsorbentes no polares son aquellos que contienen grupos funcionales octilo, octadecil o metilo enlazados a la superficie de sílice. Los adsorbentes polares corresponden a sílice no modificada o sílice con grupos enlazados ciano, amino o diol, mientras que los adsorbentes de intercambio iónico poseen grupos funcionales catiónicos (SCX) o aniónicos (SAX) (243).

La eficacia de los adsorbentes utilizados se puede determinar en función del porcentaje de recuperación de los analitos estudiados. Algunos autores consideran que dicha recuperación depende de la eficacia de elución de los analitos y de la etapa de extracción inicial, por lo que se debe determinar la capacidad del adsorbente en la etapa de retención. En este sentido, la *capacidad de carga* es un buen indicador de la eficacia de extracción de un adsorbente determinado, y se define como el número total de moles o masa de analito extraído por unidad de masa del adsorbente. En el caso de que el mecanismo de retención sea de intercambio iónico, este parámetro puede dar idea de la accesibilidad a los grupos funcionales y cuando la extracción está basada únicamente en interacciones hidrofóbicas, a menudo se encuentra relacionado con el área superficial de la resina una vez acondicionada.

Otro factor importante durante la etapa de adsorción es el *volumen de ruptura*, que corresponde al volumen de muestra acuosa que se puede introducir a través del adsorbente sin pérdida de analito, y que se puede estimar con el factor de capacidad del analito en agua pura y el volumen muerto del soporte de extracción, teniendo en cuenta el volumen de retención del soluto en agua. Experimentalmente se suele determinar a partir de curvas de ruptura, obtenidas mediante el paso de disoluciones acuosas con una cantidad fija del analito a través del adsorbente hasta que se produce la ruptura, determinando la disminución en la recuperación (254).

Los principales adsorbentes utilizados en SPE se describen a continuación.

□ **Sílices modificadas**

Durante muchos años han sido los materiales más utilizados por su gran accesibilidad, aunque presentan baja estabilidad en el intervalo entero de pH, pequeños volúmenes de ruptura y necesitan siempre una etapa de acondicionamiento con un disolvente orgánico como metanol. Las más empleadas son las funcionalizadas con

grupos C₈, C₁₈ y CN, si bien la sílice modificada con grupos C₁₈ es la que posee mayor capacidad de carga. El mecanismo de retención se basa en interacciones hidrofóbicas (fuerzas de van der Waals), interacciones polares secundarias dipolo-dipolo y enlaces de hidrógeno (254, 255).

□ **Carbón activo**

Son materiales no específicos y muy porosos que por lo general poseen una elevada área superficial y capacidad de adsorción, aunque su actividad catalítica superficial puede originar problemas (256) y su elevado poder de retención favorecer la adsorción irreversible de algunos analitos (255). Debido a la presencia de heterogeneidades químicas cargadas positivamente en su superficie puede actuar además como intercambiador aniónico (257).

□ **Adsorbentes poliméricos**

A diferencia de las sílices modificadas, los polímeros orgánicos son estables en un intervalo de pH mayor, por lo que la adsorción se puede realizar en condiciones extremas ácidas o básicas, no presentan los problemáticos grupos silanol, poseen un área superficial mayor y en la mayoría de los casos, los analitos se adsorben y eluyen con facilidad en pequeños volúmenes de disolventes orgánicos (256). Los más utilizados son los copolímeros de estireno-divinilbenceno, que presentan una superficie hidrofóbica con numerosos centros activos responsables de interacciones π - π , pero que son poco selectivos y muestran volúmenes de ruptura bajos con analitos muy polares. Algunas de estas desventajas se pueden minimizar mediante la unión de grupos polares a los anillos aromáticos (254), de forma que estas resinas modificadas, son capaces de retener solutos muy polares que presentan por lo general baja capacidad de retención en los adsorbentes de fase inversa C₁₈ (250). Dentro de ellas, algunas de las más utilizadas son las denominadas comercialmente XAD-2 y XAD-4, que han demostrado buena capacidad para la retención de triazinas, fenoles y otros compuestos aromáticos polares (258), la PRP-1 y PLRP-S (134, 259, 260), ésta última muy adecuada para la extracción de trazas de pesticidas orgánicos y sus metabolitos en muestras de aguas subterráneas (261, 262).

Otros adsorbentes utilizados para extracción de compuestos polares de muestras de agua son los polímeros comerciales LiChrolut EN y Isolute ENV (261), que poseen un alto grado de entrecruzamiento y por ello una estructura abierta (materiales de alta

porosidad) que aumenta el área superficial específica (hasta 1000 m²/g) y proporciona mayores interacciones π - π entre los analitos aromáticos y el adsorbente (263). Generalmente, se modifican con grupos funcionales acetil, hidroximetil, benzoil y o-carboxibenzoil, que proporcionan superficies más polares y permiten su utilización sin pre-tratamiento alguno con metanol (261). En estos casos, se pueden producir interacciones de enlaces de hidrógeno con los analitos e incrementar su retención, puesto que además pueden actuar como intercambiadores catiónicos (264). Así, Masqué y col. han funcionalizado PS-DVB y para compuestos polares han obtenido mayores recuperaciones y volúmenes de ruptura que con sílice modificada y resinas poliméricas no funcionalizadas (262, 265-267).

Además de los adsorbentes de PS-DVB otros desarrollados recientemente han sido los copolímeros macroporosos humectables con agua de divinilbenceno y N-vinilpirrolidona, que al presentar centros hidrofílicos y lipofílicos en su estructura, con capaces de extraer compuestos ácidos, básicos, neutros y de distintas polaridades (250).

□ **Adsorbentes de intercambio iónico**

En este tipo de adsorbentes, las interacciones que se ponen de manifiesto son de tipo iónico, por lo que resultan adecuados para la extracción de compuestos iónicos o que pueden ser convertidos en iónicos ajustando el pH de las disoluciones acuosas (259). Para que se produzca la máxima retención, el pH de la matriz se debe encontrar dos unidades por debajo del pK_a del catión y dos unidades por encima del pK_a del anión (268). En el caso de herbicidas ácidos en solución acuosa, cuando el pH se encuentra dos unidades por debajo del pK_a el 99 % del herbicida se encuentra ionizado, pero la recuperación puede ser incompleta dependiendo de las propiedades del adsorbente, la hidrofobicidad y el tamaño de la forma ionizada del analito (253).

Los más utilizados suelen ser copolímeros, sobre todo de PS-DVB, funcionalizados con grupos aniónicos y catiónicos fuertes o débiles. Debido a su excelente hidrofobicidad, los copolímeros parcialmente sustituidos con grupos ácido sulfónico o amonio cuaternario han sido muy utilizados en la extracción de compuestos orgánicos polares sin pre-tratamiento alguno con metanol (254). La introducción de grupos sulfónicos en las resinas de poliestireno a concentraciones comprendidas entre 0.4 y 1.0 meq g⁻¹ proporcionan superficies hidrofílicas, pero mantienen la capacidad para la extracción de analitos orgánicos (269).

Los polímeros de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona se han funcionalizado con grupos ácido sulfónico (Oasis[®] MCX) y grupos dimetilbutilamina (Oasis[®] MAX), para incrementar la selectividad en la retención de compuestos básicos y ácidos respectivamente. Estos adsorbentes con tamaños de partícula de 30 y 60 μm poseen un mecanismo de retención mixto, de fase inversa y de intercambio catiónico o aniónico (270). Otros polímeros en base hidroxietilmetacrilato, HEMA, también se han funcionalizado con grupos amonio cuaternarios y se han utilizado para la extracción de compuestos muy polares (254).

□ **Materiales de acceso restringido**

Inicialmente se desarrollaron para la extracción de analitos de bajo peso molecular en fluidos biológicos con un tratamiento mínimo de muestra, aunque también han resultado adecuados para la extracción de herbicidas en aguas con contenido elevado de ácidos húmicos y se han utilizado en el tratamiento de muestra en línea con sistemas de HPLC. Estos materiales permiten la extracción consecutiva de los analitos sin cambios en sus propiedades o acumulación de componentes de la matriz (271), y presentan un interior hidrofóbico y una barrera hidrofílica, que impide el acceso de macromoléculas a aquellas regiones del adsorbente donde se produce la retención de los analitos de interés, debido a la barrera física o química de difusión con fases mono y difuncionales y al diámetro de poro de la superficie interna del adsorbente (272). De esta forma combinan mecanismos de fase inversa y exclusión por tamaño (273) y permiten la extracción y limpieza en matrices biológicas complejas como suero, sangre y plasma, por restricción de la entrada de proteínas al interior del adsorbente (256).

□ **Inmunosorbentes y polímeros de impresión molecular**

El uso de adsorbentes no selectivos puede ser un problema cuando los analitos de interés se encuentran a muy bajas concentraciones y los compuestos interferentes, como en el caso de los ácidos húmicos y fúlvicos presentes en las aguas naturales, a concentraciones elevadas. Con objeto de conseguir interacciones altamente selectivas como las antígeno-anticuerpo, se han desarrollado inmunosorbentes y polímeros de impresión molecular.

En el caso de los *inmunosorbentes*, los anticuerpos producidos contra los compuestos de interés se inmovilizan en un soporte de sílice y se utilizan como un ligando de afinidad para extraer el analito y otros compuestos similares de las muestras.

Cuando se analizan muestras complejas de agua, debido a la alta afinidad y selectividad de la interacción que permite que cualquier material no reconocido por el anticuerpo no se retenga, se obtienen cromatogramas limpios que permiten la determinación y cuantificación a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$.

Su preparación es difícil y requiere bastante tiempo, debido en parte a la necesidad de purificación tanto del anticuerpo como del adsorbente. Además, pequeñas variaciones en el anticuerpo producen irreproducibilidades en el adsorbente que afectan a la recuperación, aunque esta desventaja se puede minimizar cuando se utilizan anticuerpos monoclonales, si bien los costes se incrementan considerablemente (261). Debido a la reactividad cruzada de los anticuerpos por compuestos de estructura química similar a la del analito utilizado para la inmunización, se pueden emplear inmunosorbentes selectivos para la retención de una determinada familia química. Por otro lado, su acoplamiento en línea con sistemas de HPLC es posible cuando los anticuerpos se inmovilizan covalentemente a adsorbentes con propiedades cromatográficas como la sílice (264).

Con objeto de obtener elevada selectividad y superar algunas desventajas de los inmunosorbentes como el elevado coste, la necesidad de organismos vivos y la inestabilidad de materiales biológicos como los anticuerpos, se han desarrollado *polímeros de impresión molecular*, que son polímeros sintéticos estables que intentan emular a los inmunosorbentes y que poseen sitios moleculares de reconocimiento específico para ciertas moléculas. Se preparan sintetizando un polímero de elevado grado de entrecruzamiento en presencia de una molécula plantilla. Después de eliminar esta molécula, el polímero se puede utilizar como un medio enlazante selectivo para el analito o compuestos estructuralmente relacionados. Estos polímeros, son receptores sintéticos específicos de los analitos y se conocen como anticuerpos de plástico, puesto que poseen propiedades similares a las de los anticuerpos (261).

Las principales ventajas que presentan respecto a los inmunosorbentes son la mayor reproducibilidad de la preparación, capacidad de carga y estabilidad a elevadas temperaturas, intervalo de pH y variedad de disolventes orgánicos. Algunos de los problemas que presentan en la SPE son la presencia de sitios heterogéneos, la baja transferencia de masa, la dificultad para eliminar todo el “analito plantilla” incluso después de varios lavados y para obtener desorciones cuantitativas y rápidas, como consecuencia de la alta afinidad del MIP por el analito (274).

5.2.3. PROCEDIMIENTOS EN DISCONTINUO Y ACOPLAMIENTOS EN LÍNEA

La SPE se puede utilizar de forma discontinua, donde el tratamiento de muestra está completamente separado del análisis cromatográfico, y en línea, cuando se encuentra directamente integrada en el sistema analítico. En el procedimiento en *discontinuo* cabe destacar como principal desventaja las posibles pérdidas de analito y los pequeños factores de preconcentración, como consecuencia de la inyección de una sola alícuota del extracto. De esta forma, la *automatización* del método manual de SPE, puede proporcionar una introducción de muestra más rápida y mejorar los resultados y la fiabilidad de los análisis.

El acoplamiento de la SPE con HPLC y GC constituye uno de los sistemas de preconcentración más utilizados. Con estos métodos, y utilizando técnicas de detección basadas en MS, pequeños volúmenes de muestra son suficientes para obtener límites de detección de 0.01-0.1 $\mu\text{g L}^{-1}$ con una gran variedad de compuestos, lo que supone una ventaja considerable respecto a los métodos en discontinuo. En estos sistemas, los adsorbentes no sólo se eligen en función de su eficacia para retener a los analitos, sino también de su compatibilidad con el adsorbente de la columna analítica, que debe tener la mismas o mayores propiedades de retención que el material de la pre-columna (248).

La *preconcentración en línea acoplada con HPLC* es fácil de desarrollar en cualquier laboratorio utilizando válvulas de intercambio, y ha supuesto una mejora considerable respecto a SPE-GC, al ser compatible el disolvente de elución con el método final de separación. En los sistemas de SPE-LC, el adsorbente se encuentra empaquetado generalmente en una pre-columna de longitud muy corta que se conecta a la posición del bucle de inyección de una válvula de seis vías que a su vez se conecta a una bomba que proporciona tanto el volumen adecuado de muestra como el disolvente necesario para purgar, lavar y activar la pre-columna. Los compuestos retenidos en la pre-columna se eluyen y transfieren directamente a la columna analítica mediante la fase móvil utilizada para la separación, por lo que al no existir manipulación de la muestra entre la extracción y las etapas analíticas, se evita la contaminación y/o pérdida de los analitos. Además, puesto que todos los compuestos retenidos en el adsorbente durante la introducción de la muestra son transferidos y analizados, el volumen de muestra necesario es menor que en los sistemas en discontinuo, y se obtienen mejores límites de detección y una reproducibilidad mayor (264). En vez de una pre-columna, también se han utilizado adsorbentes en discos con dispositivos especiales.

Este tipo de acoplamiento en línea, SPE-LC, se ha utilizado en el análisis medioambiental para solucionar el problema de la detección de analitos a muy bajas concentraciones y también para la automatización de los análisis (275).

Así, la extracción, preconcentración y separación de una amplia variedad de pesticidas y sus metabolitos correspondientes, se ha llevado a cabo con pre-columnas empaquetadas de adsorbentes poliméricos como PS-DVB (276).

5.2.4. APLICACIONES DE LA PRECONCENTRACIÓN EN DISCONTINUO DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO

La utilización de técnicas de SPE ha resultado especialmente ventajosa en la determinación de herbicidas fenoxiácido en muestras de agua con cantidades relativamente grandes de material húmico o carbono orgánico disuelto. Las sustancias húmicas poseen sustituyentes ácidos y fenólicos que dificultan su separación de los herbicidas y que frecuentemente hacen que sean coextraídas y coeluídas, originando picos anchos en los cromatogramas que solapan con los de los analitos de interés. Sin embargo, la SPE permite la eliminación de estas sustancias y la obtención de extractos limpios libres de interferencias de matriz, que mejoran la selectividad y permiten su determinación a niveles traza (152).

Por otro lado, la SPE ha resultado más adecuada que otros métodos de extracción como la LLE, para eliminar y determinar sus metabolitos y productos de degradación, algunos de los cuales son fitotóxicos y más persistentes que los propios fenoxiácidos, por lo que su determinación en agua y suelo permite obtener información sobre la contaminación medioambiental y los problemas de fitotoxicidad (49).

El primer procedimiento de SPE desarrollado para herbicidas ácidos, mejoraba los procedimientos analíticos de LLE y utilizaba adsorbentes de sílice enlazada empaquetados en columnas o cartuchos. Posteriormente, se observó que los adsorbentes de fase inversa como la sílice C₁₈ eran apropiados para compuestos de polaridades extremas y en general, para aquellos caracterizados por coeficientes de reparto octanol-agua mayores que dos (277, 278). El adsorbente de sílice C₁₈, es todavía en la actualidad un excelente adsorbente para la familia de herbicidas derivados del ácido clorofenoxiácético, aunque su capacidad de retención es muy baja sin acidificación previa de la muestra (normalmente para una recuperación efectiva el pH se debe encontrar dos unidades por debajo del valor de pK_a pero no inferior a pH 2).

Butz y col. han utilizado adsorbentes de fase inversa C₁₈ (60 Å, 20-45 µm, partícula irregular) para la extracción de 34 ácidos fenoxialcanoicos y otros compuestos, y han determinado que la recuperación disminuye con el incremento de la longitud de la cadena alifática del herbicida, por ejemplo de 2,4-D a 2,4-DB y de MCPA a MCPB, mientras que aumenta con el incremento de ramificaciones, de forma que el 2,4-DP se extrae mejor que el 2,4-D y el MCPP mejor que el MCPA (102). Otros adsorbentes utilizados para la extracción y preconcentración de estos analitos en diversos tipos de muestras han sido la sílice modificada con grupos C₈ y el negro de carbón grafitizado (265, 279, 280), pero debido a su falta de selectividad, la tendencia actual es la utilización de co-polímeros modificados, que además de ser más selectivos son capaces de soportar condiciones extremas de pH.

Con adsorbentes poliméricos de PS-DVB funcionalizados con grupos amonio cuaternario, los herbicidas fenoxiácido se han determinado mediante HPLC a los niveles permitidos por las regulaciones Europeas en muestras de pera previamente hidrolizada con NaOH 0.1M (154). Otros materiales basados en el polímero comercial MFE (HEMA) con grupos amonios cuaternario han sido eficazmente empleados para su extracción de muestras de judías verdes (41) y tomates (63), también con hidrólisis básica previa. Este adsorbente, ha demostrado gran capacidad para la retención de este tipo de herbicidas, reteniendo cantidades de hasta 1000 µg cuando la preconcentración se ha llevado a cabo en medio ácido acuoso a pH 1. A este pH, todos los herbicidas son moléculas neutras, lo que sugiere que el modo de retención está basado principalmente en un mecanismo de fase inversa, y que la alta capacidad de retención es debida probablemente al alto poder polarizante de los grupos amonio cuaternario, que son capaces de inducir fuertes dipolos en las moléculas neutras de fenoxiácido (154). Recientemente, se ha utilizado un adsorbente macroporoso basado en el copolímero de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona para su extracción y preconcentración en muestras de agua (281), y funcionalizado con grupos ácido sulfónico ha resultado muy adecuado para su extracción de muestras de zumo de manzana, sin más tratamiento previo que la dilución, ajuste de pH y filtración (217). Nuevas posibilidades de la SPE para la preconcentración de herbicidas fenoxiácido se encuentran en la utilización de materiales de acceso restringido, que han permitido su extracción de muestras de agua superficial con elevado contenido de ácido húmico (118) y de varios tipos de suelo (125).

Utilizando como molécula plantilla 2,4,5-T, se han sintetizado polímeros de impresión molecular (MIP), que se han empaquetado en columnas para ser empleados como materiales de SPE. Estas columnas han mostrado buena selectividad hacia la molécula plantilla y otros fenoxiácidos, con un mecanismo de reconocimiento molecular basado en interacciones hidrofóbicas y de par iónico (282). De esta forma, con 4-vinilpiridina como monómero, etilendimetacrilato como agente entrecruzante y una mezcla de metanol-agua como porogénico, se ha sintetizado un MIP que ha permitido la limpieza de muestras de agua de río y la determinación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC con recuperaciones cuantitativas comparables a las obtenidas con los típicos adsorbentes de fase inversa C₁₈ (283).

Para la determinación de algunos fenoxiácidos, como por ejemplo 2,4-D en muestras de semen, también se han empleado inmunosorbentes (37). El análisis de muestras de orina, al proporcionar un índice de exposición de los individuos a este tipo de herbicidas en el medioambiente, resulta muy interesante y por lo general, se ha llevado a cabo previa hidrólisis ácida, básica o enzimática, extracción con disolventes orgánicos para su posterior determinación mediante GC y limpieza mediante SPE con adsorbentes de sílice (39).

En definitiva, la SPE constituye una eficaz y reconocida alternativa a los métodos de LLE para la extracción y preconcentración de herbicidas fenoxiácido. Actualmente, las resinas cambiadoras de iones son muy utilizadas, puesto que mejoran la selectividad, hacen que la muestra requiera menor o ninguna purificación antes de la determinación cromatográfica y disminuyen el efecto perturbador de la materia orgánica coextraída.

Algunos de métodos publicados para la preconcentración en discontinuo de herbicidas fenoxiácido mediante extracción en fase sólida se describen en la tabla 21.

Tabla 21
Métodos de preconcentración en discontinuo de herbicidas fenoxiácido y limpieza de muestra mediante SPE

| <i>ANALITOS</i> | <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | <i>SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA</i> | <i>DET.</i> | <i>LD</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|--|--|--|----------------|--------------------------------|-------------------------|------------|
| MCPPP y otros pesticidas | Discos de sílice C ₁₈ 25 mm | 2 x 1.0 mL acetona 1 x 1.0 mL MeOH (0.5 mL/min) | cLC; columna C ₁₈ 150 x 0.18 mm I.D. (3 μm) FM: AcN/H ₂ O gradiente | UV (220 nm) | 0.15-0.8 μg L ⁻¹ | agua manzana | (62) |
| MCPPP, 2,4-DB, 2,4-DP, MCPB, MCPA, 2,4-D | Cartuchos Carbograph 1 (250 mg) | 6mL CH ₂ Cl ₂ /MeOH (60:40) 16 mM KOH | cLC; columna C ₁₈ (5 μm) FM: AcN-agua (gradiente) | MS | 0.1-1.0 μg L ⁻¹ | agua | (191) |
| 2,4-D fenilureas | Discos de SDB-SAX 10 μm y sílice C ₁₈ 10 μm | acetato etílico-MeOH | LC fase inversa | DAD | 0.3 μg L ⁻¹ | agua superficial | (261) |
| 2,4-D, MCPH, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, MCPPP, MCPB, 2,4-DB | SPE en dos cartuchos 1° carbopack B 50 mg 2° sílice SAX 70 mg | 1° CH ₂ CH ₂ /MeOH 80:20 1mM NaOH 2° H ₂ O/MeOH 50:50 0.5% TFA | LC columna C ₁₈ FM: MeOH-solución acuosa 0.08% TFA 59:41 (v/v) | UV (230 nm) | - | agua de río y de mar | (284) |
| 2,4-D,2,4,5-T, 2,4,5-TP, MCPA, 2,4-DB,dicamba | Columna (HEMA) MFE polímero 250x4 mm I.D. 3g 50 μm grupos amonio 4° | 10 mL de MeOH HNO ₃ 60 mM | LC columna Spherisorb ODS 250 x 4 mm I.D. 5μm FM: 65% MeOH-34.6% H ₂ O-0.4% H ₃ PO ₄ | UV (232 nm) | LQ 0.05 mg kg ⁻¹ | tomate | (63) |

Tabla 21 (continuación)
Métodos de preconcentración en discontinuo de herbicidas fenoxiácido y limpieza de muestra mediante SPE

| <i>ANALITOS</i> | <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | <i>SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA</i> | <i>DET.</i> | <i>LD</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|--|---|--|--|--------------|----------------------------|------------------|---------------|
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB, | SPE en columna 150 x 4.6 mm I.D. MFE-Pol. (HEMA) 50 µm | FM: 65 % MeOH-34.6 % H ₂ O-0.4 % H ₃ PO ₄ | LC ODS 250 x 4 mm I.D. FM: 65% MeOH-34.6% H ₂ O-0.4% H ₃ PO ₄ | UV (232 nm) | 1.0-4.0 µg L ⁻¹ | agua superficial | (154) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB | SPE cartuchos Lida Sep-Ic-OH 0.5 mL PS-DVB SAX | 5 mL MeOH-HNO ₃ (2 mL/min) | LC ODS 250 x 4 mm I.D. FM: 65% MeOH-34.6% H ₂ O-0.4% H ₃ PO ₄ | | - | pera | |
| Dicamba, 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP | Columna (HEMA) MFE polímero 250x4 mm I.D. 3g 50 µm grupos amonio 4° | 10 mL AcN HCl 60 mM | cLC Spherisorb ODS 150 x 0.3 mm I.D. (3µm) FM (grad): MeOH-solución acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 20 °C | | | 10-20 pg | judías verdes |
| 2,4-D, MCPA | Purificación en adsorbente de sílice | Extracción previa con CH ₂ Cl ₂ | LC;C ₈ 250x4.6 mm I.D. 5µm FM AcN-fosfato pH 3.2 (grad) | DAD (230 nm) | 15 µg L ⁻¹ | orina (20 mL) | (39) |
| MCPA, MCPB, 2,4-D, 2,4,5-T | Cartuchos Bond Elut C ₁₈ 1000 mg Bakerbond C ₁₈ 1000mg LiChroun EN 200 mg | 4 x 1 mL MeOH o AcN | LC: 150 x 4 mm I.D. LiChropher C ₁₈ . FM; MeOH-agua HAc pH 3.9 2g LiClO ₄ | ED 0.3 V | 2 pg mL ⁻¹ | agua (500 mL) | (129) |

Tabla 21 (continuación)
Métodos de preconcentración en discontinuo de herbicidas fenoxiácido y limpieza de muestra mediante SPE

| <i>ANALITOS</i> | <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | <i>SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA</i> | <i>DET.</i> | <i>LD</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|--|---|--|-----------------|----------------------------|--------------------------------|------------|
| 2,4-D, MCPA y otros pesticidas | Sep-Pak C ₁₈ 500 mg con trietilamina como agente de par iónico pH neutro | 2 mL de MeOH evaporación con N ₂ | LC; LiChrosorb RP-18 5µm 250 x 4.6 mm I.D. FM (grad); MeOH-TEA 0.01 M pH 6.9 | UV (230 nm) | 0.1 µg L ⁻¹ | agua | (151) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPP, MCPB | SPE en columna (10x2 mm I.D.) PSDVB 15- 25 µm a pH 2.8 Limpieza a pH 8.8 | AcN-agua 4:96 (v/v) | LC pares iónicos PLRP-S 250 x 4.6 mm I.D. (5 µm) FM (grad); AcN-agua | UV (232 nm) | 5-20 ng L ⁻¹ | agua superficial (60 mL) | (152) |
| MCPA y 4-cloro- 2-metilfenol | Cartuchos C ₁₈ 100-500 mg 40 µm | 0.2 mL MeOH 0.6 mL agua | LC; C ₁₈ 5 µm 80 x 2 mm I.D. FM; AcN-HCOOH 0.01% | ESI MS-MS | 40 ng L ⁻¹ | agua suelo | (12) |
| 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, MCPB 2,4-DB | OASIS [®] HLB 60 mg-3 mL | 3 mL etilacetato | C ₁₈ 5 µm 250 x 4.6 mm I.D. Elución en gradiente a 40°C | DAD (230 nm) | 0.5 ng mL ⁻¹ | agua (500 mL) | (281) |
| MCPP, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP | MIP plantilla 2,4,5-T monómero 4-vinilpiridina | 1 x 2 mL MeOH-Hac 4:1 (v/v) | LC: col. monolítica ODS 100 x 4.6 mm I.D., FM; MeOH- H ₂ O 1:1 (v/v) 0.1% Hac | UV (280 nm) | ng mL ⁻¹ | agua de río | (283) |

5.2.5. MICRO-EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida se puede realizar a nivel de micro-escala, donde una fibra pequeña recubierta de un polímero adecuado se introduce en una muestra líquida con agitación durante un determinado período de tiempo. Después de la extracción, la fibra se introduce por lo general en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases, donde los analitos se desorben térmicamente y se focalizan a continuación a la entrada de la columna capilar (250). La desorción térmica en el inyector de GC permite su empleo para compuestos térmicamente estables, aunque los analitos termolábiles también se pueden determinar mediante SPME-LC o SPME-GC, si se lleva a cabo una reacción de derivatización previa in situ a la extracción en medio acuoso (248).

El primer dispositivo de SPME fue desarrollado en 1990 y comercializado en el año 1993 por Supelco, y desde entonces, se ha utilizado fundamentalmente en cromatografía de gases. Los principales parámetros a optimizar son el tipo de fibra, el tiempo de extracción, la temperatura y el tiempo de desorción. Considerando la extracción de herbicidas ionizables como los fenoxiácidos, otro parámetro muy importante en la eficacia de extracción es el pH, el cual se debe ajustar a un valor de 1. Es una técnica sencilla, fácilmente automatizable, que se puede utilizar con volúmenes pequeños de muestra y que no requiere ningún disolvente líquido (285), aunque al ser una técnica de equilibrio, solo una pequeña fracción de los analitos es extraída (250).

Esta técnica se ha utilizado para la micro-extracción y análisis de residuos de pesticidas en aguas, suelos, alimentos y fluidos biológicos. En suelos, la presencia de materia orgánica influye considerablemente en la recuperación, de forma que la cuantificación se debe realizar con patrón interno o con calibrados de adiciones estándar (285). En zumos y frutas, se puede reducir el efecto matriz por dilución de la muestra con agua destilada (224). Empleando SPME, se han extraído y determinado varias clases de pesticidas mediante LC-ESI-MS en muestras acuosas, con límites de detección del orden de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ y con recuperaciones mayores que con los métodos de tradicionales de SPE basados en adsorbentes C_{18} y GCB (286). La micro-extracción en fase sólida también ha sido eficazmente acoplada a la cromatografía de líquidos capilar y fácilmente automatizada utilizando un automuestreador disponible comercialmente. En este sistema se ha utilizado una columna monolítica capilar de sílice enlazada a C_{18} para la SPME en tubo. Los resultados obtenidos con algunas clases de pesticidas han demostrado que la eficacia de preconcentración comparada con la SPME en tubo convencional es excelente (287).

Por otro lado, la SPME seguida de HPLC ha sido utilizada para el análisis de pesticidas en aguas de bebida, mediante desorción de los analitos adsorbidos en la fibra con un disolvente extractante e introducción de este disolvente en el inyector de LC. Para incrementar la eficacia de la extracción se ha optimizado la temperatura, la agitación y la concentración de sal, y el análisis se ha realizado con detección UV y una columna convencional de HPLC (288). Utilizando GC-MS, los herbicidas fenoxiácido se han determinado en muestras de agua por inmersión manual directa y adsorción en fibras de polidimetilsiloxano y poliácilato. La desorción se ha realizado con gas DCM durante 7 min a 250°C, y se han obtenido LD_s en el intervalo de 0.01-1.5 µg L⁻¹ (289). Por otra parte, Nilsson y col. han evaluado las diferentes condiciones de derivatización con PFBB y de SPME-GC-MS también para su determinación en muestras de agua, pero en este caso, con fibras de polidimetilsiloxano-DVB y desorción a 250°C durante 5 min, alcanzando LD_s de 0.1-1.0 µg L⁻¹ (290).

5.3. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON COLUMNAS ACOPLADAS. APLICACIONES AL ANÁLISIS DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO.

El poder de resolución de HPLC se puede mejorar significativamente por la utilización de técnicas de cromatografía líquida multidimensional, que proporcionan la eficacia y selectividad adecuada para la separación de los componentes de interés en muestras complejas, y que minimizan el tiempo de análisis por la disminución del tiempo empleado en la separación de aquellos que no poseen interés analítico, lo cual proporciona ventajas considerables respecto a las técnicas de SPE-LC en línea, que no siempre permiten alcanzar los límites de detección necesarios (275).

La *cromatografía multidimensional*, también conocida como cromatografía con columnas acopladas o “*column switching*”, representa una importante alternativa a los métodos clásicos de HPLC unidimensional.

Consiste en transferir completa y selectivamente una porción del eluato que contiene los analitos de interés de una columna inicial (C₁) a una segunda columna (C₂) para su posterior separación, de forma que se requiere un control estricto del tiempo de operación. Su principal objetivo consiste en hacer máxima la inyección de la banda de analito en la columna C₂ y mínima la de compuestos interferentes, de forma que la muestra se separa parcialmente en la columna C₁, y la fracción que contiene los analitos de interés se transfiere a la columna C₂ para su separación final (108).

Esta técnica se puede llevar a cabo en línea, conectando ambas columnas con una válvula de intercambio (switch) de alta presión o en discontinuo, donde las fracciones eluidas de la primera columna se recogen manualmente o con un colector de fracciones para a continuación volver a ser reinyectadas en la segunda columna. Este procedimiento, no necesita válvulas de intercambio y las fases móviles utilizadas no tienen por qué ser necesariamente compatibles, si bien, suelen ser procesos largos y laboriosos que proporcionan bajas recuperaciones de muestra. Las técnicas en línea poseen la ventaja de la automatización por control neumático o eléctrico de las válvulas, que permiten el intercambio del eluyente directamente de la primera a la segunda columna. Así permiten la introducción de un mayor número de muestras por unidad de tiempo, disminuyen los tiempos de análisis, el consumo de disolventes y la manipulación de la muestra, lo que minimiza las pérdidas y proporciona elevada selectividad, sensibilidad y reproducibilidad. Sin embargo, requieren válvulas, columnas y bombas adicionales, fases móviles compatibles en términos de miscibilidad y fuerza eluotrópica, puesto que el eluyente de la primera columna es el disolvente de inyección para la segunda, lo que produce que no todas las columnas sean mutuamente compatibles y necesita de la sustitución periódica de la pre-columnas utilizadas (272, 275).

El volumen transferido de fase móvil desde la primera a la segunda columna puede corresponder a un grupo de picos, a un solo pico o a una fracción de un pico, por lo que las diferentes partes de la muestra pueden seguir caminos diferentes a través de la configuración LC-LC. En el desarrollo de este tipo de procedimientos juega un papel importante el poder de separación de las columnas cromatográficas, la composición de la fase móvil, la naturaleza y número de analitos y el tipo de matriz y sus interferencias relacionadas. En el modo LC-LC, las dos columnas se enlazan a través de una válvula de intercambio, de forma que cualquier componente que atraviesa la primera columna puede llegar directamente al detector, al desecho o a la segunda columna (275).

El sistema más simple consiste en la utilización de una bomba y una válvula de tres o cuatro vías colocada entre la columna C_1 y la columna C_2 . En este tipo de acoplamiento, una posición de la válvula permite el paso de la fase móvil por la columna C_1 y el desecho o el detector, y el cambio de posición la transferencia de una a otra columna. Sin embargo, en la mayoría de las aplicaciones se utilizan dos bombas y

por lo tanto un caudal simultáneo a través de cada columna. De esta forma, se minimizan los pulsos de presión producidos por cambios repentinos de caudal que afectan adversamente a la línea base del detector y se evita la posible pérdida de eficacia de la columna debido a la formación de espacios vacíos. En este caso las etapas a seguir son las siguientes (figura 9):

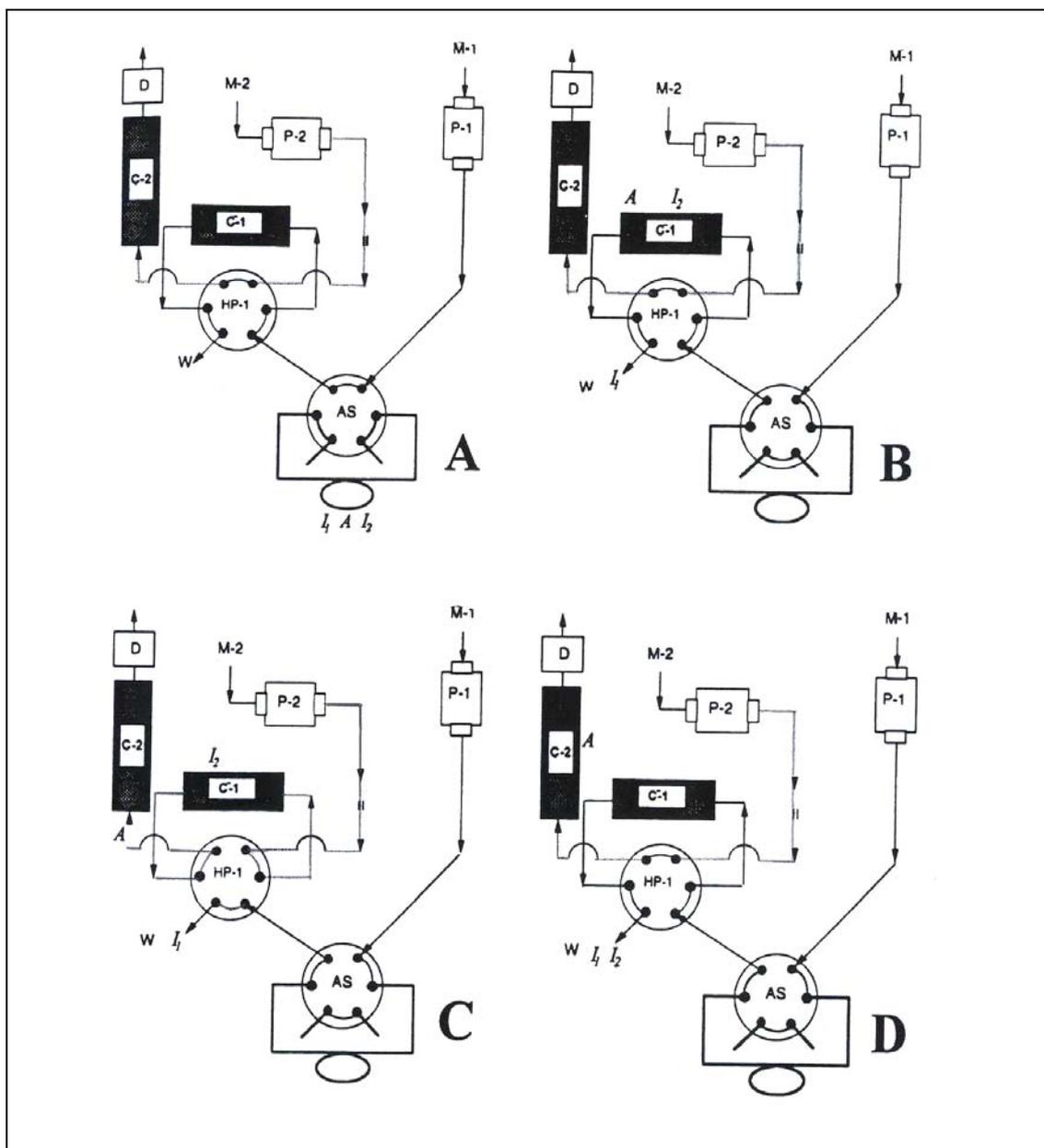


Figura 9 . Etapas de un procedimiento con acoplamiento LC-LC. (A) Inyección, (B) Purificación, (C) Transferencia, (D) Análisis.

C-1 y *C-2*, primera y segunda columna separadora; *AS*, autoinyector; *I₁* e *I₂*, interferentes de la muestra (de cabeza y de cola respectivamente); *A*, fracción de analito; *P-1* y *P-2*, bombas; *M-1*, fase móvil para la purificación en *C-1*; *M-2*, fase móvil de *C-2*; *HP-1*, válvula de alta presión de seis vías; *D*, detector; *W*, desecho.

□ Inyección

Se carga la muestra o el extracto obtenido en el bucle del autoinyector, mientras la fase móvil M-1 (fig. 9A) pasa por la columna C-1 y la fase móvil M-2 por la columna C-2. Se activa la válvula del autoinyector (AS) y comienza el análisis, pasando a la siguiente etapa.

□ Purificación

Se purifica la muestra o extracto con un determinado volumen de fase móvil M-1 (fig. 9B). Los interferentes menos retenidos (I_1) se eliminan al desecho. Cuando el primer analito se comienza a eluir de la columna C-1, se activa la válvula (HP-1) que actúa de interfase entre los dos sistemas de LC, finalizando de esta forma la etapa de purificación y comenzando la etapa de transferencia.

□ Transferencia

La columna C-1 se acopla en línea con la columna C-2 y se utiliza un volumen determinado de la fase móvil M-2 para eluir la fracción que contienen los analitos de interés de la columna C-1 a la columna C-2 (fig. 9C). Cuando se ha transferido el último analito se activa la válvula (HP-1) y finaliza esta etapa.

□ Análisis y lavado

La fracción transferida desde la columna C-1 a la columna C-2 se separa en esta etapa mediante la fase móvil M-2 (fig. 9D), de la misma forma que en la LC convencional. Simultáneamente, la primera columna C-1 se lava con la fase móvil M-1 para eliminar los compuestos interferentes que muestran mayor retención. Si la fase móvil no es capaz de eluirlos completamente mientras tiene lugar la separación de los analitos en la columna C-2, la columna C-1 se puede lavar con un eluyente más fuerte, reacondicionando posteriormente la columna C-1 antes de la siguiente inyección con la fase móvil M-1 (108).

El dispositivo típico consiste en dos columnas de diferente longitud o de longitud similar pero con diferente selectividad, siendo la primera de ellas la más corta. El acoplamiento se puede subdividir a su vez en homo-modal y hetero-modal. En el primer caso las columnas poseen análoga selectividad y en el segundo, el mecanismo de separación se varía modificando la naturaleza de la fase estacionaria y se opera con una amplia variedad de mecanismos de separación (275).

Cuando el caudal de fase móvil en ambas columnas es el mismo, el acoplamiento es sencillo de realizar y considerando que las columnas se encuentran disponibles en una longitud determinada, el principal parámetro a tener en cuenta es el tiempo de transferencia, que debe permitir la llegada de los analitos de interés a la segunda columna y la eliminación de las interferencias menos y más retenidas (108).

Otros parámetros a optimizar son el diámetro interno de partícula de ambas columnas, que debe ser similar para minimizar el ensanchamiento de banda extracolumna (272), y la fuerza eluotrópica de la fase móvil M_1 utilizada en la etapa de purificación, que se debe elegir mediante el compromiso entre una fuerza eluotrópica baja, que aunque permite la inyección de volúmenes mayores de muestras acuosas sin producir un ensanchamiento de banda apreciable, restringe la eliminación eficaz de los interferentes menos retenidos (I_1), y una fuerza eluotrópica elevada, que mejora la resolución entre I_1 y la fracción de analitos de interés (A), pero que disminuye el tiempo de purificación. Además hay que tener en cuenta que la fracción de muestra transferida a la columna C_2 se debe encontrar en un disolvente compatible con la fase móvil M_2 .

Las condiciones finales de acoplamiento LC-LC se pueden determinar fácilmente a través del volumen de purificación y de transferencia (figura 10).

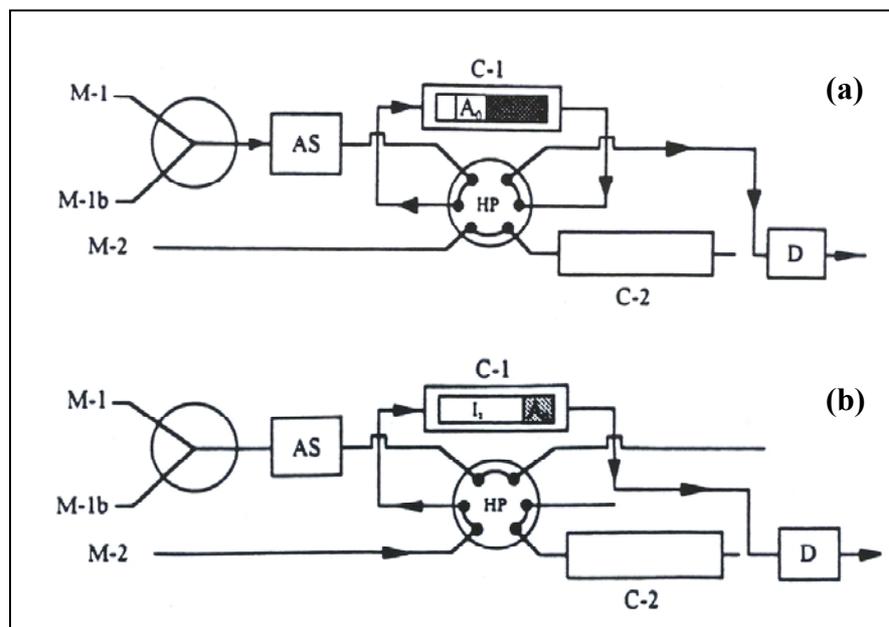


Figura 10. Representación esquemática del diseño para la determinación del volumen de purificación (a) y volumen de transferencia (b). $C-1$ y $C-2$, primera y segunda columna separadora; AS , autoinyector; A_o , analito menos retenido en $C-1$; A_n , analito más retenido en $C-1$; $M-1$, fase móvil para la purificación en $C-1$ (eliminación de I_1); $M-1b$, eluyente fuerte (eliminación de I_2); $M-2$, fase móvil de $C-2$; HP , válvula de seis vías; D , detector.

Para determinar el *volumen de purificación*, la columna C-1 se conecta directamente al detector y se inyecta el analito de interés que presenta la menor retención con la fase móvil M-1 (A_0). El volumen de ruptura que presenta este analito en estas condiciones, determina el volumen máximo de purificación a aplicar en el procedimiento. Por el contrario, el *volumen de transferencia* se determina inyectando el analito que presenta la mayor retención (A_n), pero siendo eluido con la fase móvil M-2, que es la que realiza la transferencia. En este caso interesa que el volumen de la fracción transferida sea lo menor posible para minimizar de esta forma el ensanchamiento de banda y aumentar la sensibilidad.

Tanto el volumen de purificación como el volumen de transferencia se deben comprobar periódicamente para asegurar que ambas etapas se llevan a cabo sin pérdidas de analito (108).

Esta técnica se puede utilizar para eliminación de los compuestos interferentes que solapan con las bandas de los analitos de interés en la segunda columna (purificación), para la preconcentración de muestras, para mejorar la resolución de una parte de la muestra compleja y como alternativa al gradiente de elución (272), aunque sus principales aplicaciones son la preconcentración y la limpieza de muestras. En los últimos años, el interés en este tipo de técnicas ha aumentado particularmente en las áreas de análisis medioambiental y limpieza y/o preconcentración de matrices biológicas complejas, que requieren la determinación precisa de compuestos a muy bajos niveles de concentración.

Con estos métodos, la preconcentración se basa en la posibilidad de retención de los analitos en una zona estrecha de la parte superior de la primera columna cuando se introduce un gran volumen de muestra a través de la misma, sin que se sobrepase su capacidad. En los últimos años se han descrito un número significativo de aplicaciones por acoplamiento de la cromatografía de inmunoafinidad y HPLC de fase inversa, utilizando un inmunosorbente como empaquetamiento de la pre-columna. También se han empleado este tipo de técnicas en separaciones quirales y en general, en aquellas donde se necesita un elevado número de platos. Según se ha demostrado, la capacidad de pico en columnas acopladas aumenta linealmente con la raíz cuadrada del número de columnas conectadas en serie, y la caída de presión linealmente con la longitud de la columna, pero en la práctica son las condiciones de operación las que limitan el número de columnas que se pueden acoplar y por ello, lo que limita el número total de platos teóricos que se pueden obtener en tiempo razonable.

La cromatografía multidimensional es una opción muy razonable cuando se analizan muestras medioambientales mediante HPLC de fase inversa y se observan interferencias debido a presencia de compuestos polares que dificultan la determinación de aquellos analitos más polares que se eluyen en la primera parte del cromatograma, sobre todo cuando se utilizan detectores no selectivos como el UV (275).

En el análisis multiresidual de pesticidas se ha utilizado la cromatografía multidimensional con una amplia variedad de muestras.

Utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (MS-MS) e interfases ESI y APCI en los modos PI y NI, se han cuantificado mediante calibración externa a un nivel de $0.4 \mu\text{g L}^{-1}$ herbicidas ácidos, incluyendo MCPA y MCPP, en muestras de agua. La inyección directa de muestra se ha realizado con volúmenes de 0.25 ó 2.0 mL en una columna de 2.1 mm ID ó 4.6 mm ID para los modos ESI y APCI respectivamente. El acoplamiento LC-LC-ESI-MS-MS ha permitido eliminar el problema de las interferencias de matriz con los primeros analitos eluidos y ha hecho posible la determinación a niveles de $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ en menos de 10 min (291).

Las principales aplicaciones de cromatografía multidimensional con herbicidas fenoxiácido se describen en la tabla 22.

Tabla 22
Métodos de preconcentración de herbicidas fenoxiácido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas

| <i>ANALITOS</i> | <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | <i>TÉCNICA</i> | <i>LD</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|---|---|---|---|---|------------|
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPB | Pretratamiento cartuchos de 1 mL C ₁₈ 100 mg y sílice 100 mg (40 µm) C ₁ : GFF II 5 µm C ₂ : Microspher C ₁₈ 3 µm | FM ₁ : MeOH/0.05% TFA acuoso 5:95 (v/v) FM ₂ : MeOH/fosfato pH 2.4 60:40 (v/v) | LC-LC-UV (230 nm) Hidrólisis NaOH 0.05 N | 0.8 mg Kg ⁻¹ | cereales, judías verdes | (162) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, MCPB | C ₁ : PLRP-S 150 x 4.1 mm I.D. 10µm C ₂ : PLRP-1 150 x 4.1 mm 10 µm I.D. | FM ₁ : AcN-agua 30:70 (v/v) pH 3, FM ₂ : AcN-agua 30:70 (v/v) 0.01 M TBA | LC-LC-UV (230 nm) 50 °C | 0.1-0.5 µg L ⁻¹ | agua superficial | (292) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, MCPB, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPB | Limpieza en línea con cartucho sílice 10 mg (40 µm) C ₁ : GFF II 10 x 3 mm I.D. (5 µm) C ₂ : Microspher 30 x 4.6 mm I.D. 3µm | FM ₁ : MeOH-0.05 % TFA acuoso 60/40 (v/v) FM ₂ : MeOH-0.05 % TFA acuoso 5/95 (v/v) | LC-LC-UV (228 nm) 30°C | 0.1-µg L ⁻¹ | agua potable, superficial y subterránea | (60) |
| MCPA, 4-cloro-2- metilfenol, 4-clorofenol | C ₁ : Kromasil ODS 30 x 4 mm (5 µm) C ₂ : Kromasil ODS120 x 4 mm (5 µm) (agua y suelos); 50 x 4.6 mm I.D. HipSep 5µm (RAM), 150 x 4.6 mm I.D. SPS (5µm) (RAM) (olivo) | FM ₁ : ACN- 0.05% TFA en gradiente FM ₂ : 0.05 % TFA/AcN 55:45 (v/v) | LC-LC-DAD (228 nm) LC-LC-MS-MS | agua: 0.1-0.5 µg L ⁻¹ suelo: 0.02-0.05 mg Kg ⁻¹ olivo: 0.05 mg Kg ⁻¹ | (293) | |

Tabla 22 (continuación)
Métodos de preconcentración de herbicidas fenoxiácido mediante cromatografía líquida con columnas acopladas

| <i>ANALITOS</i> | <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | <i>TÉCNICA</i> | <i>LD</i> | <i>MUESTRA</i> | <i>REF</i> |
|---|---|---|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|------------|
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, 2,4,5-TP, 2,4-DB, MCPD | Precolumna 20 x 2 mm PSDVB CHP-3C (10 µm) C ₁ : PRP-X100 (10 µm) C ₂ : 150 x 4.6 mm I.D. ODS-2 (5 µm) | FM ₁ : AcN-NaOH 10:90 (v/v) pH 10 FM ₂ : gradiente AcN-agua 0.01 M ác. fórmico ó HClO ₄ | LC-LC-UV (230 nm) | 1-2 µg L ⁻¹ | agua superficial y de río | (59) |
| 2,4-D, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-T, MCPD, 2,4-DB, MCPB | Temperatura columna 30°C C ₁ : GFF II 50 x 4.6 mm I.D. (5 µm) C ₂ : 50 x 4.6 mm I.D. Microspher C ₁₈ columna RAM | FM ₁ : MeOH-0.05% TFA en agua 25:75 (v/v) FM ₂ : MeOH-0.05% TFA en agua 25:75 (v/v) gradiente | MASE LC-LC-UV (228 nm) | 5-50 µg Kg ⁻¹ | suelo arcilloso y arenoso | (136) |
| MCPA, MCPD | C ₁ : 50 x 2.1 mm I.D. ISRP GFF-II 5 µm ó 50 x 2.1 mm I.D. SPS C ₁₈ 5 µm, C ₂ : 50 x 2.1 mm Discovery C ₁₈ 5 µm | FM ₁ : 30 % AcN-agua 0.1 % ác. fórmico, FM ₂ : 50 % AcN- agua 0.1 % ác. fórmico | LC-LC-ESI MS-MS | 0.4 µg L ⁻¹ | agua | (294) |
| 2,4-D y sus ésteres metílico y butílico, 2,4-DP, MCPA, 2,4,5-TP, MCPD, 2,4-DB, MCPB | C ₁ : MFE polímero (HEMA) 150 x 4.6 mm I.D. (50 µm) C ₂ : Hypersyl C ₁₈ BDS 150 x 0.3 mm I.D. (3 µm) | FM ₁ : 80 % MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ -19.2% agua FM ₂ : 45 % MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ -54.2% agua, gradiente de temperatura | LC-cLC-UV (232 nm) | 1.2-20.8 µg | 100 mL agua | (295) |

OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO

La revisión bibliográfica realizada anteriormente ha puesto de manifiesto que, en la actualidad, los herbicidas fenoxiácido son compuestos orgánicos de gran interés analítico, ya que se utilizan con gran profusión como pesticidas de uso agrícola en una amplia variedad de cultivos.

Incluso a bajas concentraciones, resultan tóxicos para el hombre y los organismos vivos, razón por la cual se consideran contaminantes prioritarios y la legislación es cada vez más exigente en cuanto a las cantidades máximas admisibles en muestras medioambientales y alimentos. Su toxicidad y acción herbicida, depende de su forma química, ácido o éster fundamentalmente, y en el caso de presentar quiralidad, de su forma enantiomérica.

El trabajo presentado en esta tesis doctoral tiene como objetivo la puesta a punto de nuevas metodologías para resolver los problemas de su determinación multiresidual en muestras complejas, con el fin de evaluar su incidencia en el medioambiente y en la salud humana.

Puesto que la cromatografía líquida capilar y la nano-cromatografía proporcionan sensibilidad adecuada, consumen pequeñas cantidades de disolventes orgánicos y generan pocos residuos, se pretende desarrollar las metodologías correspondientes considerando las particularidades de este tipo de técnicas, que incluyen desde el control de la temperatura en la separación, a técnicas de inyección que posibiliten la focalización en cabeza de columna y aumenten la sensibilidad del análisis.

Respecto a la determinación de herbicidas quirales, el principal objetivo es el desarrollo de métodos de separación que permitan su reconocimiento enantiomérico, para lo cual, resulta necesario evaluar la enantioselectividad de distintas fases estacionarias quirales hacia los fenoxiácidos de interés.

Por otra parte, para alcanzar los máximos niveles permitidos por las regulaciones españolas y europeas en matrices complejas medioambientales y de alimentos, así como para el control residual en humanos, se necesitan técnicas eficaces de determinación.

Debido a que los métodos cromatográficos no permiten alcanzar por sí solos la selectividad y sensibilidad requerida, otro de los objetivos será el desarrollo de métodos de extracción, preconcentración y limpieza de muestra.

Con esta finalidad, se pretende evaluar nuevos materiales de extracción en fase sólida que faciliten tanto la eliminación de los compuestos interferentes de la matriz como la preconcentración de los analitos sin modificar su forma química.

PARTE EXPERIMENTAL

1. INSTRUMENTACIÓN, REACTIVOS Y MATERIAL

1.1. INSTRUMENTACIÓN

1.1.1. EQUIPOS DE HPLC CONVENCIONAL CON DETECCIÓN UV/VIS

□ ***Cromatógrafo de líquidos Perkin-Elmer***

Equipado con una bomba isocrática modelo LC-250, válvula de inyección Rheodyne[®] con bucle externo de 20.0 μL , detector UV/VIS LC-290 de longitud de onda variable con célula de flujo de 8 μL y 1 cm de paso óptico, interfase Perkin-Elmer Nelson 900 series y procesador de datos HP Vectra CS con monitor monocromo e impresora LX-800. El control y procesamiento de datos se ha realizado con el programa informático Nelson (versión 5.1), de Nelson Systems, Inc.

□ ***Cromatógrafo de líquidos Beckman*** (Fullerton, CA, USA)

Constituido por módulo de disolventes modelo 125 S System Gold[®] con doble bomba y sistema binario de mezcla de disolventes en alta presión, válvula de inyección de seis vías Rheodyne[®] con bucle externo reemplazable de 20.0 μL , detector UV/VIS modelo 166 System Gold[®] de longitud de onda variable y programable, equipado con célula de flujo de 11 μL y 1 cm de paso óptico. Todo ello acoplado a un ordenador DELL Optiplex Gs con procesador MMX de 166 Mhz e impresora HP 690. El control de equipo se ha realizado mediante el programa Gold Noveau[®] Chromatography Workstation Software (v 1.6) para Windows, que ha permitido el procesamiento de los resultados.

□ ***Cromatógrafo de líquidos para la separación quiral en fase normal***

Formado por los siguientes dispositivos: bomba isocrática modelo Perkin-Elmer Series 3B LChrom, válvula Rheodyne de seis vías con bucle externo de 5.0 μL y detector Varian UV/VIS 2550 (Harbor City, CA, USA). Todos los elementos se han acoplado a un integrador Chromatopac modelo C-R5A (Shimadzu) para el registro y tratamiento de datos.

□ ***Cromatógrafo de líquidos para la separación quiral en fase inversa***

Equipado con una bomba isocrática LabFlow 3000 (LabService Analytica), una válvula Rheodyne de seis vías con bucle externo de 20.0 μL y un detector DAD Shimadzu modelo SPD-MGA se ha acoplado a un ordenador Compaq Prolinea 4/50 y una impresora Epson LX-400. El control de equipo se ha realizado mediante el programa informático Programn Manager[®] para Windows 3.1.

1.1.2. EQUIPOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR CON DETECCIÓN UV/VIS Y DAD

□ ***Cromatógrafo con detección UV/VIS***

El cromatógrafo de líquidos convencional Beckman descrito anteriormente, se ha adaptado para su utilización en cromatografía líquida capilar cambiando las conexiones y la célula de flujo del detector. Para ello, se han utilizado capilares de sílice fundida de 50 μm de diámetro interno y una célula de flujo de 35 nL y 8 mm de paso óptico (Beckman, Fullerton, CA, USA). Además se ha incorporando una válvula de inyección de seis vías Rheodyne[®] con bucles externos reemplazables de acero inoxidable de volúmenes 1.2, 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 μL (Beckman, Fullerton, CA, USA) y un horno programable MISTRAL para la termostatación de las columnas cromatográficas a temperaturas comprendidas en el intervalo de 10 a 90°C (Beckman, Fullerton, CA, USA).

□ ***Cromatógrafo con detector de matriz de diodos (DAD)***

El sistema cromatográfico, modelo Agilent 1100 Series (Agilent Technologies, España), consta de los siguientes elementos: módulo de disolventes con bomba binaria capilar G1376 A y desgasificador G1379 A incorporado, detector de diodos en serie G1315B con célula de flujo de 500 nL y 10 mm de paso óptico, válvula de inyección Cheminert[™] con bucle interno de 100 nL (LC Packings, Amsterdam, Holanda), válvula de inyección de seis vías Rheodyne[®] con bucle interno de volumen 2.0 μL y bucles externos reemplazables de 5.0, 10.0 y 20.0 μL (Beckman, Fullerton, CA, USA) y horno programable MISTRAL para la termostatación de columnas (Beckman, Fullerton, CA, USA). Se han utilizado conexiones de PEEK de 50 μm de diámetro interno y mangas, también de este material, para conectar tubería capilar adecuadas al diámetro externo de cada una de las columnas cromatográficas empleadas.

Todos los componentes se han acoplado a un ordenador HP con procesador Intel Pentium 4 e impresora LaserJet 4100, con software Agilent Chemstation G2170AA para sistemas LC y módulo espectral de evaluación G2180AA para el sistema operativo Microsoft Windows XP Professional. En la figura 11 se muestra la disposición de los diferentes elementos.



Figura 11. Equipo de cromatografía líquida capilar con detector de matriz de diodos (Agilent Mod. 1100 Series).

1.1.3. EQUIPO DE NANO LC CON DETECCIÓN UV/VIS

El equipo cromatográfico utilizado, suministrado por Termo Separation Products (Fremont, CA, USA), consta de los siguientes dispositivos: bomba de gradiente HPLC Spectra System P2000 (relación de división de caudal de $\approx 1/2000$), válvula de inyección modificada Rheodyne (con divisor incorporado), pieza en forma de T de acero inoxidable (Valco Instruments, Houston, TX, USA) conectada a la bomba a través de un capilar PEEK de 50 cm x 127 μm I.D., tubo de acero inoxidable 5 cm (100 μm I.D.) para la conexión al inyector, capilar de sílice fundida 40 cm (50 μm I.D.) para la conexión al desecho, desgasificador de membrana a vacío SCM 1000 y detector UV/VIS Spectra Focus. Todos los componentes se han conectado a un ordenador COMPAQ ProLinea 433 equipado con el software Spectra System PC1000 (sistema operativo OS/2 Warp IBM, versión 3.0) (Fremont, CA, USA) para el tratamiento de datos. La figura 12 muestra un esquema de los diferentes componentes cromatográficos.

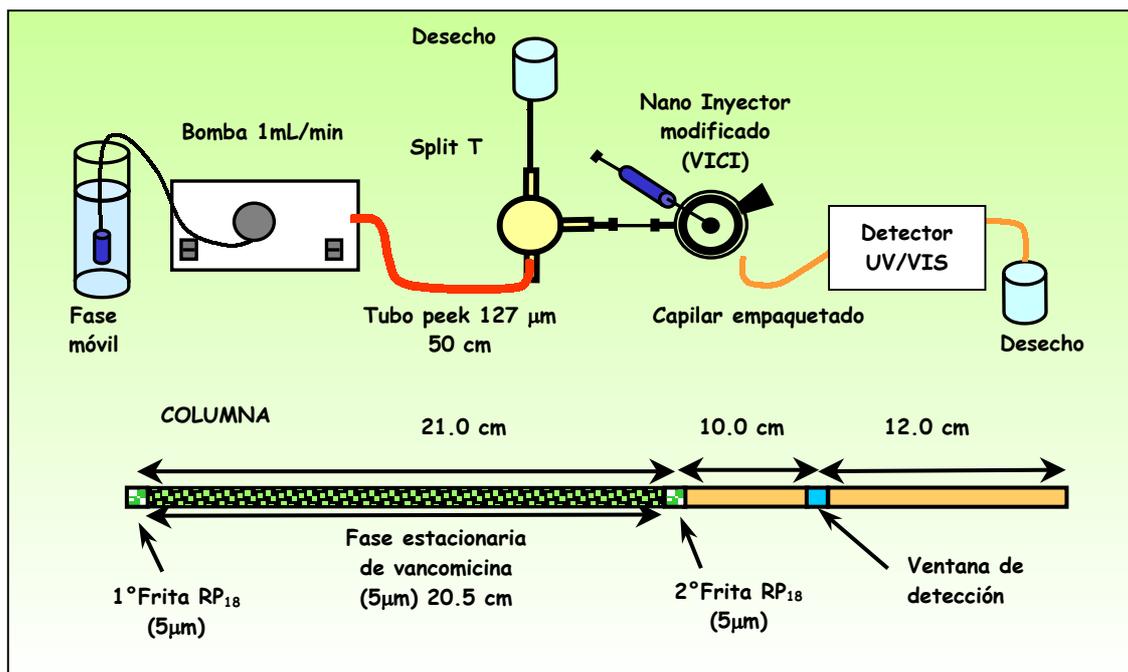


Figura 12. Representación esquemática del equipo cromatográfico de nano-LC con detección UV/VIS.

1.1.4. OTROS INSTRUMENTOS

□ *Espectrofotómetro UV/VIS*

Espectrofotómetro de matriz de diodos HP 8543, unido a través de una interfase a un ordenador HP Kayak XA que contiene el programa HP Chemstation y a su vez está conectado a una impresora HP Deskjet 895 Cxi (Agilent Technologies, España). Para medidas en discontinuo se ha utilizado una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico y para medidas en continuo, una cubeta de flujo de cuarzo de 1 cm de paso óptico y 18 µL de volumen.

□ *Sistemas de extracción y preconcentración de muestras*

-Baño de ultrasonidos (Selecta, Barcelona).

-Sistema de extracción en fase sólida Varian para la extracción simultánea de 20 muestras (Harbor City, CA, USA). Tal y como se puede observar en la figura 13, se ha acoplado a una bomba de membrana P-Selecta (Selecta, Barcelona) para su funcionamiento a vacío.

-Bomba digital Series II de preparativa para preconcentración de muestras en discontinuo capaz de suministrar hasta 10.0 mL min⁻¹ (Konik-Tech, Madrid, España).

- Bomba digital programable ProStar 210 Solvent Delivery Module, capaz de suministrar desde $10.0 \mu\text{L min}^{-1}$ hasta $100.00 \text{ mL min}^{-1}$ y soportar presiones de hasta 8700 psi (Varian, Harbor City, CA, USA).
- Válvula de alta presión LabPro Rheodyne de 6 vías, capaz de operar por control remoto con la bomba Varian ProStar 210 (Varian, Harbor City, CA, USA).
- Kuderna-Danish con baño termostático P-Selecta (Barcelona, España).
- Rotavapor (Heidolph, Schwabach, Alemania)



Figura 13. Sistema de extracción múltiple Varian.

- ***Instrumentación para la preparación de columnas capilares empaquetadas***
Se ha utilizado una bomba isocrática de HPLC Perkin-Elmer, un baño de ultrasonidos, un aparato calentador provisto de filamento eléctrico de Ni-Cr (RM1 Serai, Isem) para la formación de fritas, un microscopio óptico Bausch & Lomb, 2 x 31-26-19, 30 x W.F 31-15-65 (Cambridge Instruments) para el control del empaquetamiento, una precolumna de HPLC de acero inoxidable (10 cm x 4.1 mm I.D) como depósito de la fase estacionaria y una frita mecánica de HPLC (Valco, Houston, Tx, USA).
- ***Equipos auxiliares***
-pH-metro PH M 82 Radiometer, con electrodo combinado de vidrio Crison 52-02 y referencia interna Ag/AgCl (Copenague, Dinamarca).

- Bomba de membrana P-Selecta para la filtración de fases móviles a vacío (Barcelona, España).
- Centrífuga P-Selecta (Barcelona, España).
- Balanza analítica digital Sartorius Basic, de precisión 0.1 mg.
- Sistema de purificación de agua milli-Q de Millipore (Bedford, MA, USA).
- Refrigerador de 0 a 4°C para la conservación de patrones de herbicidas, tampones y otras disoluciones.

1.2. REACTIVOS Y MATERIAL

1.2.1. COLUMNAS CROMATOGRÁFICAS

□ *Columnas de HPLC convencional*

- Columna de fase inversa Atlantis dC₁₈ 150 x 4.6 mm I.D., de tamaño de partícula 5 µm, porosidad 69%, diámetro de poro medio 99 Å y área superficial 323 m² g⁻¹ (Waters, Milford, Massachusetts, USA)
- Columna con fase estacionaria de carbamato de celulosa CHIRALCEL[®] OD-H, de 150 x 2.1 mm I.D. y tamaño de partícula 5 µm para la separación quiral en fase normal (Daicel Chemical Industries, Chiral Technologies Europa, Illkirch-Cedex, Francia).
- Columna con fase estacionaria de carbamato de celulosa CHIRALCEL[®] OD-RH, de 150 x 4.6 mm I.D. y tamaño de partícula 5 µm para la separación quiral en fase inversa (Daicel Chemical Industries, Chiral Technologies Europa, Illkirch-Cedex, Francia).
- Columna con fase estacionaria de β-ciclodextrina ORpak CDBS-453 HQ, de 150 x 4.6 mm I.D. y tamaño de partícula 5 µm para la separación quiral en fase inversa (Shodex).

□ *Columnas capilares y nano-columnas*

- Columna de fase inversa Hypersil C₁₈ BDS, de 150 x 0.3 mm I.D. y tamaño de partícula 3 µm (LC Packings, Amsterdam, Holanda).
- Nano-columna monolítica en base sílice Chromolith[™] Cap Rod[™] LC performance RP-18 encapsada, 150 x 0.1 mm I.D. (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).

-Columna capilar empaquetada con fase estacionaria quiral de teicoplanina (Chirobiotic T[®]), de 0.320 I.D. x 0.450 mm O.D. y tamaño de partícula 5 µm para la separación en fase inversa. Longitud total 20 cm y longitud de fase estacionaria quiral 15 cm.

-Nano-columna empaquetada con fase estacionaria de vancomicina-sílice modificada para la separación quiral en fase inversa, de 0.075 mm I.D. x 0.375 mm O.D. y tamaño de partícula 5 µm, con una longitud de fase estacionaria de 21 cm, una longitud total de 43 cm, una longitud efectiva 33 cm y una ventana para la detección a 10 cm de distancia de la terminación final del capilar.

1.2.2. FASES ESTACIONARIAS Y CAPILARES PARA LA PREPARACIÓN DE MICRO Y NANO-COLUMNAS EN EL LABORATORIO.

-Sílice LiChrospher[®] 100 RP C₁₈, 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemania).

-Chirobiotic T[®] (teicoplanina), 5 µm (Technokroma, Barcelona, España).

-Fase estacionaria quiral de diol-sílice modificada con vancomicina (5 µm) sintetizada en el laboratorio del Dr. Fanali (CNR, Roma, Italia) según método publicado (296).

-Capilares de sílice fundida de 0.075 mm I.D. x 0.375 mm O.D. y 0.320 mm I.D. x 0.450 mm O.D. (Composite Metal Services, Hallow, Worcestershire, UK).

1.2.3. ADSORBENTES DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Se han empleado diversos materiales empaquetados en columnas o en cartuchos de extracción de diferentes dimensiones.

□ *Columnas empaquetadas*

-MFE[®] Polímero SAX, 150 x 4.6 mm I.D., hidroxietilmetacrilato (HEMA), 50 µm, con grupos funcionales amonio cuaternario, tamaño de poro 35 nm, capacidad de intercambio iónico 0.4–0.8 meq g⁻¹ (Análisis Vínicos, Ciudad Real, España).

-LiChrospher[®] RP-18-ADS, 25 x 4 mm I.D., material de acceso restringido en base gel de sílice, 25 µm, tamaño de poro 60 Å (Merck, Darmstadt, Alemania).

□ *Cartuchos de extracción*

-Lida Sep-IC-OH, 0.5 mL, PS-DVB con grupos funcionales amonio cuaternario, capacidad de intercambio iónico 0.6 meq g⁻¹ (Teknochroma, Barcelona, España).

-OASIS[®] MCX, 3 mL, polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona funcionalizado con grupos ácido sulfónico (60 mg), capacidad de intercambio iónico 0.80–1.20 meq g⁻¹, tamaño de partícula 30–60 µm, tamaño de poro 7.3-8.9 nm (Waters Corporation, Milford, USA).

Los diferentes formatos utilizados de SPE se muestran en las figuras 14 y 15.



Figura 14. Columnas empaquetadas de SPE.



Figura 15. Cartuchos de extracción.

1.2.4. MATERIALES DE FILTRACIÓN DE MUESTRA

-Membranas de poliéster (Ø 47 mm), tamaño de poro 2.0 µm (Osmonics Inc).

-Membranas de celulosa MicronSep (Ø 47 mm), tamaño de poro 2.0 µm (Scharlab, Barcelona, España).

- Membranas de nailon 66 (\varnothing 47 mm), tamaño de poro 0.45 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA).
- Membranas de ésteres de celulosa y nitrocelulosa (\varnothing 47 mm), tamaño de poro 1.20 μm (Millipore, Bedford, MA, USA).
- Filtro de jeringa de PTFE de tamaño de poro 0.20 μm .
- Papel de filtro para análisis gravimétrico lavado a los ácidos (589²) (Schleicher & Schuell, Dassel, Alemania).
- Placa de vidrio filtrante de tamaño de poro controlado (G4) (Álamo, Madrid).

1.2.5. MATERIAL DIVERSO

- Material de vidrio; matraces aforados de clase A de 2, 5, 10, 50, 100, 250 y 1000 mL de MBL, pipetas de clase A de 0.1, 0.5, 1, 2, 5 y 10 mL de MBL, vasos de precipitados de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 y 1000 mL de Pirex, bureta de clase A de 50 mL, probetas de 10, 50 y 100 mL.
- Sistema de filtración a vacío de fases móviles de cromatografía de líquidos (Supelco).
- Mortero cerámico.
- Micropipetas Brand regulables de émbolo capilar de 25 y 100 μL .
- Jeringa Hamilton de 50 μL .
- Resina epoxi (Patex).

1.2.6. REACTIVOS Y DISOLUCIONES

□ *Patrones de herbicidas*

Las principales características de los herbicidas fenoxiácido incluidos en el presente estudio se muestran en la tabla 23.

Sus disoluciones patrón, de concentración exactamente conocida y del orden de 200 mg L^{-1} , se han preparado en metanol y se han conservado a 4 °C en la oscuridad durante un periodo máximo de 3 meses.

Por dilución adecuada de estos patrones, se han obtenido disoluciones de trabajo de los herbicidas con la concentración adecuada para cada uno de los experimentos realizados. Para prevenir la influencia en los resultados de la posible degradación de los pesticidas, estas disoluciones se han preparado diariamente.

Tabla 23
Características de los patrones de herbicidas fenoxiácido

| <i>NOMBRE COMÚN</i> | <i>NOMENCLATURA IUPAC</i> | <i>MASA MOLECULAR (g mol⁻¹)</i> | <i>PUREZA (%)</i> | <i>SUMINISTRADOR</i> |
|----------------------|--|--|-------------------|----------------------|
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético | 221.04 | 99 | Aldrich |
| 2,4,5-TP | (R,S) (±) Ácido 2-(2,4,5-triclorofenoxi)-propiónico | 269.51 | 97 | |
| MCPA | Ácido 2-metil-4-clorofenoxiacético | 200.60 | 95 | |
| 2,4-DP | (R,S) (±) Ácido 2-(2,4-diclorofenoxi)-propiónico | 235.10 | 95 | Sigma |
| Éster metílico 2,4-D | 2,4-dicloro-fenoxiacetato de metilo | 235.07 | 97 | |
| 2,4-DB | Ácido 4-(2,4-diclorofenoxibutírico) | 249.09 | 97 | |
| MCPB | Ácido 4-(2-metil-4-clorofenoxi)-butírico | 228.67 | 99 | Riedel-de-Haën |
| MCPP | (R,S) (±) Ácido 2-(2-metil-4-clorofenoxi)-propiónico | 214.65 | 99 | |
| Éster butílico 2,4-D | 2,4-dicloro-fenoxiacetato de butilo | 277.15 | 98 | |

□ ***Patrones internos utilizados para la preconcentración en línea con la columna empaquetada MFE[®] Polímero SAX***

Se han preparado disoluciones madre en metanol de concentración exactamente conocida de 2,4,6-tribromofenol (99 %, Aldrich) y 2,6-diisopropilfenol (97 %, Aldrich), que se han conservado a 4 °C en la oscuridad y se han diluido adecuadamente para obtener la concentración necesaria en cada experimento.

□ ***Ácidos***

-Ácido orto-fosfórico 85%, ácido ftálico (Fluka).

-Ácido clorhídrico 35%, ácido nítrico 60%, ácido sulfúrico 96% (Panreac, Barcelona, España).

-Ácido perclórico 70%, ácido acético glacial 99.5%, ácido trifluoroacético, ácido fórmico 90% (Carlo Erba, Milán, Italia).

□ ***Disolventes orgánicos***

-Metanol, acetonitrilo, acetona y 2-propanol de calidad gradiente HPLC (Scharlab, Barcelona, España).

-n-hexano y n-heptano de calidad HPLC (Carlo Erba, Milán, Italia).

□ ***Otros reactivos***

-Hidróxido sódico, sulfato amónico, citrato sódico (Panreac, Barcelona, España).

-Hidróxido amónico 30% (Ferosa, Barcelona, España).

-Hidróxido amónico (máx. 33% NH₃) extra puro (Riedel de Hæen, Seelze, Alemania).

-Acetato sódico (Probus, Badalona, España).

-Dihidrógeno fosfato de sodio, cloruro amónico, formiato amónico (Carlo Erba, Milán, Italia).

□ ***Disoluciones reguladoras***

-*Tampón acético/acetato*: se han preparado disoluciones de acetato sódico 100 mM y 50 mM que se han ajustado respectivamente a valores de pH 4.8 y 5.0 mediante un pH-metro y HCl diluido. A partir de la sal de acetato de amonio, se han preparado disoluciones reguladoras de concentración 500 mM a pH 4.5 y pH 6.0.

-*Tampón fosfato*: se ha preparado una disolución acuosa de NaH_2PO_4 0.1 M y por dilución de ésta otra de concentración 0.05 M. Utilizando hidróxido sódico 0.1 M se ha ajustado convenientemente el pH para obtener disoluciones reguladoras de concentración 0.1 M a pH 7.2 y 0.05 M a pH 7.0. También se ha preparado una disolución 0.2 M de esta misma sal que se ha ajustado con el pH-metro a valores de pH 2.0 y 3.0 con ácido fosfórico concentrado.

-*Tampón amonio/amoniaco*: utilizando sulfato amónico se ha preparado una disolución acuosa de concentración 0.1 M que se ha ajustado a pH 9.2 con NaOH diluido. Análogamente se ha preparado una disolución reguladora de esta misma concentración a partir de hidróxido amónico, que se ajustado a pH 10.0.

-*Tampón formiato*: a partir de una disolución de formiato amónico 100 mM y ajustando el pH convenientemente se han preparado disoluciones reguladoras de concentración 5 mM a pH 3.5 y 5.5, 20 mM y 100 mM a un valor de pH 3.5.

-*Tampón citrato*: se ha diluido adecuadamente una disolución de citrato de sodio 0.1 M para obtener disoluciones de concentración 20 mM que se han ajustado a valores de pH 2.8, 3.5, 4.1, 4.5 y 5.5 con ácido clorhídrico diluido.

□ *Fases móviles*

Como paso previo a su utilización, se ha llevado a cabo la filtración con membranas de teflón de diámetro de poro 0.45 μm (Supelco) y membranas de nailon de diámetro de poro 0.20 μm (Albet[®]), en cromatografía de líquidos convencional y cromatografía con columnas de diámetro interno reducido respectivamente. Además, en los equipos de cromatografía líquida capilar sin desgasificador incorporado, han sido continuamente desgasificadas con helio (Air Liquide) durante la estabilización de la columna y el análisis cromatográfico.

- *Cromatografía de líquidos convencional*: metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v), 60:40 (v/v), 55:45 (v/v); heptano-isopropanol-TFA 98.9:1.0:0.1 (v/v/v); acetonitrilo-tampón NaH_2PO_4 0.2 M pH 2 (H_3PO_4) 40:60 (v/v), 20:80 (v/v); metanol-tampón NaH_2PO_4 50 mM pH 3 (H_3PO_4) 50:50 (v/v); acetonitrilo-disolución acuosa NaCl 0.2M 1.1% ácido acético 10:90 (v/v), 15:85 (v/v); acetonitrilo-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% ácido acético 10:90 (v/v), 20:80 (v/v); hexano-isopropanol-TFA 96.9:3.0:0.1 (v/v/v), 98.9:1.0:0.1 (v/v/v).

- *Cromatografía líquida capilar*: acetonitrilo-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 60:40 (v/v), 40:60 (v/v); metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 70:30 (v/v), 56:44 (v/v), 50:50 (v/v), 45:55 (v/v), 40:60 (v/v), 25:75 (v/v); metanol-tampón formiato 5 mM pH 3.5 20:80 (v/v), 30:70 (v/v), 50:50 (v/v); metanol-tampón formiato 5 mM pH 5.5 30:70 (v/v); acetonitrilo-tampón formiato 5 mM pH 5.5 10:90 (v/v), 20:80 (v/v), 30:70 (v/v); acetonitrilo-tampón formiato 20 mM pH 3.5 10:90 (v/v), 20:80 (v/v); acetonitrilo-tampón formiato 100 mM pH 3.5 10:90 (v/v); metanol-tampón citrato 20 mM pH 4.1 30:70 (v/v); acetonitrilo-tampón citrato 20 mM pH 2.8 ó 4.5 20:80 (v/v); acetonitrilo-tampón citrato 20 mM pH 5.5 40:60 (v/v); acetonitrilo-tampón citrato 20 mM pH 2.8 ó 3.5 10:90 (v/v).
- *Cromatografía de líquidos con nano-columna*; metanol-tampón acetato amónico 500 mM pH 4.5-agua 95:2:3 (v/v/v), 90:2:8 (v/v/v), 85:2:13 (v/v/v), 85:5:10 (v/v/v); metanol-tampón acetato amónico 500 mM pH 6.0-agua 85:5:10 (v/v/v), 85:2:13 (v/v/v).

□ ***Disolventes de elución de los adsorbentes de SPE***

En función del material adsorbente, la elución de los herbicidas retenidos se ha llevado a cabo con diferentes eluyentes.

- *Columna MFE-Polímero SAX (HEMA)*: metanol 60 mM HCl metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v), 80:20 (v/v), 70:30 (v/v), 60:40 (v/v), 50:50 (v/v) y 40:60 (v/v); acetonitrilo-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v), 80:20 (v/v); 70:30 (v/v), 60:40 (v/v), 50:50 (v/v), 40:60 (v/v), 30:70 (v/v) y 20:80 (v/v).
- *Columna LiChrospher[®] RP-18-ADS RAM*: metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v), 80:20 (v/v); metanol-0.8% H₃PO₄.
- *Cartuchos Lida Sep-IC-OH*: ácido nítrico 60 mM en metanol.
- *Cartuchos OASIS[®] MCX*: metanol-0.8% ácido fosfórico; 60 mM HCl en metanol y 60 mM HCl en acetonitrilo.

□ ***Disoluciones de focalización***

Mezclas de metanol-agua con una proporción de modificador orgánico de hasta un 30% y mezclas acetonitrilo-agua de diferente composición.

□ **Disoluciones auxiliares**

- HCl 0.1 M y 5.0 M.
- NaCl 0.1 M y 0.2 M.
- NaOH 0.1 M y 1.0 M.
- H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0) y 0.1 M.
- HClO₄ 0.001 M y 0.1 M.
- Disolución saturada de Ca(OH)₂.
- Ácido ftálico 0.01 M pH 2.8.
- Disolución acuosa a pH 4.0 (ajustada con HAc concentrado) y pH 1.0 (ajustada con H₂SO₄ concentrado).
- Disolución acuosa con 5% de metanol, 50% de metanol y 95% de metanol a pH 4.0 (ajuste con HAc concentrado)
- Disolución acuosa 1% NH₄OH.
- HCl 60 mM en metanol
- Metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 50:50 (v/v), 15:85 (v/v).
- HNO₃ 60 mM en 99% de metanol.

1.2.7. MUESTRAS

-Suelo de elevado contenido orgánico

El muestreo se ha realizado en una superficie de suelo no tratado con herbicidas y despoblado de vegetación de 20 x 30 cm y una profundidad 3 cm ($\approx 40 \text{ Kg m}^{-2}$ de tierra). Las muestras recogidas se ha conservado y almacenado en el laboratorio a temperatura ambiente. La figura 16 muestra una porción del suelo muestreado.



Figura 16. Muestra de suelo de elevado contenido orgánico.

-Zumo de manzana comercial (Cofrutos®)

Para evitar la descomposición y el crecimiento microbiano, las muestras compradas en supermercados en envases de “*tetra-brik*” de volumen 1 L, se han conservado a 4°C en la oscuridad durante un periodo máximo de 15 días. Antes de tomar alícuotas de 6 ó 10 g de zumo, la muestra se ha homogenizado convenientemente mediante agitación.

-Hojas de menta fresca

Las hojas sin tallos tomadas de la planta “*mentha-piperita*”, se han conservado en la oscuridad refrigeradas a una temperatura de 4°C durante 7 días. La figura 17 muestra la planta utilizada en el muestreo, que ha sido cultivada en el propio departamento.



Figura 17. Planta de *mentha-piperita*.

-Orina masculina humana

La fracción liofilizada con aquellos componentes de peso molecular menor de 10000 Daltons y la proteína urinaria liofilizada con aquellas proteínas de peso molecular mayor de 10000 Daltons (Sigma), se han conservado y almacenado a una temperatura de 0°C. Las muestras reconstituidas con la cantidad adecuada de cada fracción y de volumen 50 mL, se han conservado refrigeradas a 4°C en ausencia de luz y se han almacenado en frascos de vidrio topacio durante un tiempo máximo de 4 días.

2. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE HPLC EN FASE INVERSA CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

La separación y determinación de este tipo de herbicidas se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos utilizando columnas convencionales y de diámetro interno reducido, en cuyo caso, se han utilizado grandes volúmenes de inyección y técnicas de focalización. La detección se ha efectuado a una longitud de onda de 232 nm y la identificación de cada uno de los herbicidas, se ha realizado por comparación de sus tiempos de retención con los obtenidos para cada compuesto por separado, y en algunos casos, por enriquecimiento de las disoluciones inyectadas.

2.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

Las condiciones de separación se han optimizado con disoluciones estándar de los herbicidas estudiados en función de la composición de la fase móvil, tanto en modo de elución isocrático como en gradiente. En el caso de la cromatografía líquida capilar, se han estudiado otras variables como la temperatura, el volumen del bucle de inyección y la composición de la disolución inyectada para conseguir la focalización de los analitos en cabeza de columna.

2.1.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CONVENCIONAL

La separación de mezclas acuosas de los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP, éster metílico y butílico de 2,4-D en concentración 1.0 mg L^{-1} cada uno de ellos mediante cromatografía de líquidos convencional, se ha llevado a cabo a temperatura ambiente con la columna de fase inversa Atlantis dC₁₈ a un caudal de 1.0 mL min^{-1} , utilizando el cromatógrafo de líquidos marca Beckman descrito en el apartado 1.1.1 e inyectando volúmenes de disolución de $20.0 \text{ }\mu\text{L}$.

Como fase móvil, se han empleado mezclas de metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico de diferente composición y la separación se realizó en modo de elución isocrático y en gradiente. En todos los programas de composición de fase móvil ensayados se ha mantenido constante una proporción inicial y final de modificador orgánico del 55 y 80% respectivamente.

2.1.2. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON COLUMNAS CAPILARES Y NANO-COLUMNAS

Para optimizar la separación con temperatura y con gradiente de elución, el volumen del bucle de inyección se ha fijado en 20.0 μL y con propósitos de focalización, se han inyectado disoluciones acuosas de los herbicidas con un 10% de metanol, y por ello, de baja fuerza de elución.

2.1.2.1. Influencia de la temperatura

Utilizando el cromatógrafo de líquidos Beckman descrito en el apartado 1.1.2 con detección UV/VIS y manteniendo constante la composición de la fase móvil a un caudal de 10.0 $\mu\text{L min}^{-1}$, la separación de diferentes mezclas de herbicidas en la columna capilar Hypersil C₁₈ BDS se ha optimizado en función de la temperatura. Por un lado se han estudiado mezclas de 2,4-D, 2,4-DB y de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D y por otro, mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido, concretamente de 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP.

En el caso de la separación de 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D se ha utilizado como fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 56:44 (v/v) y se han inyectado disoluciones acuosas de concentración 1.0 mg L^{-1} . La temperatura se ha mantenido constante a 20, 40 ó 65°C, si bien, se han ensayado diversos programas de temperatura en el intervalo de 20 a 65°C.

La separación de mezclas acuosas de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP, se ha llevado a cabo con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico 45:55 (v/v), con disoluciones acuosas de los herbicidas de concentración 25.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ y temperatura constante de 20, 40, 50 ó 65°C. La separación con temperatura programada se ha realizado por aplicación de gradientes desde una temperatura inicial de 20°C hasta una temperatura final de 65°C.

2.1.2.2. Gradiente de elución

Para optimizar las condiciones cromatográficas con gradiente de composición de fase móvil se ha utilizado el cromatógrafo de líquidos con detector de matriz de diodos descrito en el apartado 1.1.2, la columna capilar Hypersil C₁₈ BDS y la nano-columna monolítica ChromolithTM RP-18.

La separación se ha llevado a cabo para los herbicidas 2,4-D, MCPA, ésteres metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP, con disoluciones de concentración $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$ cada uno de ellos en la columna Hypersil C₁₈ BDS y 1.0 mg L^{-1} en la columna Chromolith™ RP-18.

La temperatura se ha mantenido constante de 25°C y se han estudiado diferentes gradientes de composición con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄. En la columna Hypersil C₁₈ BDS la proporción inicial y final de metanol en la mezcla se ha fijado en 40 y 70% respectivamente y el caudal se ha mantenido a un valor de $8.0 \mu\text{L min}^{-1}$, mientras que en la columna monolítica, la proporción inicial de modificador orgánico ha sido del 25, 30 ó 35%, la final del 70% y se ha modificado el caudal de fase móvil en el intervalo de 3.0 a $5.0 \mu\text{L min}^{-1}$.

2.1.2.3. Condiciones de inyección

Las condiciones adecuadas para la inyección de mezclas de los herbicidas 2,4-D, MCPA, ésteres metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP, se han evaluado en función del volumen del bucle de inyección y de la naturaleza de la disolución inyectada de focalización, utilizando el sistema de cromatografía líquida capilar con DAD (Agilent) descrito en el apartado de instrumentación 1.1.2 y la columna Hypersil C₁₈ BDS. La separación se ha realizado a temperatura constante de 25°C y a un caudal de $8.0 \mu\text{L min}^{-1}$ con el siguiente gradiente de elución: metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 40:60 (v/v) durante 25 min, incremento lineal de la proporción de metanol en un tiempo de 15 min hasta alcanzar una composición del 70% y etapa isocrática hasta el final del cromatograma a dicha composición.

Con el bucle interno de inyección de 100 nL, los herbicidas se han inyectado en metanol en concentraciones del orden de los mg L^{-1} , mientras que con volúmenes de 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 μL , las concentraciones de cada uno de ellos en las disoluciones inyectadas han sido del nivel de los $\mu\text{g L}^{-1}$. Con los bucles de volumen comprendido en el intervalo de 2.0 a 20.0 μL , se han inyectado mezclas de metanol-agua con proporciones de disolvente orgánico del 5, 10, 20 y 30%, con objeto de evaluar la contribución de la composición de la disolución de inyección a la focalización de los analitos en cabeza de columna. En algunos casos, el pH de las disoluciones acuosas inyectadas con los herbicidas de interés se ha ajustado con ácido fosfórico al 0.8%.

2.2. DETERMINACIÓN DE MEZCLAS DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO

Una vez seleccionadas las condiciones cromatográficas de separación, se han determinado los límites de detección y cuantificación de los métodos analíticos desarrollados. Las rectas del calibrado se han obtenido mediante el procedimiento del patrón externo en los intervalos adecuados de concentración y la reproducibilidad, se ha estimado a través de las áreas integradas de pico cromatográfico y en algunos casos, con la variación de los tiempos de retención.

2.2.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CONVENCIONAL

La determinación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D en disoluciones estándar a concentraciones comprendidas en el intervalo de 0.150-1.20 mg L⁻¹, se ha realizado con gradiente de composición de fase móvil en las condiciones descritas a continuación.

Tabla 24
Condiciones cromatográficas para la determinación mediante HPLC convencional

| | |
|-----------------------------|--|
| <i>COLUMNA</i> | Atlantis dC ₁₈ 150 x 4.6 mm I.D. (5 μm) |
| <i>GRADIENTE DE ELUCIÓN</i> | 1º) MeOH-dis. acuosa 0.8% ác. fosfórico 55:45 (v/v) durante 20 min 2º) incremento a 80% MeOH en un tiempo de 20 min 3º) etapa isocrática con 80% MeOH hasta final cromatograma |
| <i>CAUDAL</i> | 1.0 mL min ⁻¹ |
| <i>V INYECCIÓN</i> | 20.0 μL |
| <i>λ</i> | 232 nm |

Las ecuaciones del calibrado (n=5) se han obtenido en el intervalo de concentración 0.150-1.20 mg L⁻¹ para los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D y MCPP; 0.250-1.20 mg L⁻¹ para 2,4-DP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP y 0.300-1.20 mg L⁻¹ para el éster butílico de 2,4-D.

La reproducibilidad del método analítico se ha estimado con concentraciones inyectadas de cada uno de los herbicidas de 0.500 ó 1.00 mg L⁻¹ a través de las áreas de pico integradas para un total de tres determinaciones.

2.2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

La determinación de herbicidas los fenoxiácido de interés mediante cromatografía líquida capilar, se ha llevado a cabo en la columna Hypersil C₁₈ BDS 150 x 0.3 mm I.D. (3 µm) con temperatura programada y con gradiente de elución a caudales de 10.0 y 8.0 µL min⁻¹ respectivamente. Para ello, se ha inyectado un volumen de 20.0 µL de disoluciones acuosas con un 10% de metanol y concentraciones de cada uno de los herbicidas en el intervalo de 0.010 a 1.00 mg L⁻¹, de acuerdo a los procedimientos descritos en los apartados 2.1.2.1 y 2.1.2.2. La detección se ha efectuado a 232 nm.

2.2.2.1. Determinación con temperatura programada

El análisis de mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D se ha llevado a cabo con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 56:44 (v/v), manteniendo constante la temperatura a 20°C durante 6 minutos, aplicando a continuación un incremento lineal a razón de 9°C min⁻¹ hasta una temperatura de 65°C y finalmente realizando una etapa isotérmica a 65°C hasta el final del cromatograma. En estas condiciones, el calibrado (n=5) para cada uno de los fenoxiácidos se ha realizado en el margen de concentraciones de 15.0 a 70.0 µg L⁻¹ y la reproducibilidad (n=5), se ha estimado a través de la variación de los tiempos de retención y de las áreas de pico cromatográfico con disoluciones estándar de los herbicidas de concentración 35.0 µg L⁻¹.

Para la determinación de 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D se ha utilizado como fase móvil la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico 45:55 (v/v) y el siguiente programa de temperatura: etapa isotérmica inicial a 20°C durante 25 minutos, incremento lineal de 20 a 30°C en un tiempo de 10 minutos, incremento lineal de 30 a 65°C a razón de 5°C min⁻¹ y a continuación temperatura constante de 65°C hasta el final del cromatograma. El calibrado (n=5) se ha obtenido en el intervalo de concentración de 10.0-50.0 µg L⁻¹ para todos los herbicidas con la excepción del éster butílico del 2,4-D, que se ha estudiado en el intervalo de 30.0 a 70.0 µg L⁻¹.

La reproducibilidad (n=3) se ha determinado con los valores obtenidos de área de pico cromatográfico para concentraciones de 55.0 µg L⁻¹ del éster butílico de 2,4-D y de 35.0 µg L⁻¹ del resto de herbicidas.

2.2.2.2. Determinación con gradiente de elución

Manteniendo constante la temperatura a un valor de 25°C, la determinación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D se ha llevado a cabo con gradiente de elución utilizando el siguiente programa de composición de fase móvil: metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 40:60 (v/v) durante 25 minutos, incremento lineal de la proporción de metanol en un tiempo de 15 minutos hasta alcanzar una composición del 70% y etapa isocrática hasta el final del cromatograma a dicha composición.

En estas condiciones de separación, los gráficos del calibrado (n=5) se han obtenido en el intervalo de concentración de 4.0-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el herbicida 2,4,5-TP; 5.0-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 2,4-D; 6.0-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MCPB; 7.0-50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para MCPA y 2,4-DB; 20.0-50.0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 2,4-DP, MCPP y éster metílico de 2,4-D y finalmente, 40.0-600 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el éster butílico de 2,4-D.

La reproducibilidad del método de determinación se ha evaluado a través de las áreas de pico cromatográfico medidas para cada uno de los herbicidas a concentraciones comprendidas en el primer y último tercio del intervalo de calibración, analizando tres réplicas de la disolución estándar inyectada.

3. PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN DIFERENTES ADSORBENTES

La extracción y preconcentración de los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, 2,4-DB, MCPP, MCPB, 2,4,5-TP, éster metílico y butílico de 2,4-D se ha llevado a cabo con los adsorbentes descritos en el apartado 1.2.3 (figuras 14 y 15). De este modo, se ha utilizado la columna MFE[®]-Polímero SAX, la columna LiChrospher[®] RP-18-ADS, los cartuchos de extracción de un solo uso OASIS[®] MCX y Lida Sep-IC-OH, así como la instrumentación referida anteriormente (apartado 1.1.4).

3.1. PRECONCENTRACIÓN EN DISCONTINUO

La extracción en fase sólida con los adsorbentes empaquetados en columna se ha realizado con la bomba de preparativa Konik-Tech, mientras que con los cartuchos de extracción, se ha utilizado el sistema múltiple de Varian acoplado a la bomba de vacío P-Selecta (figura 13).

Como paso previo, y con los adsorbentes LiChrospher[®] RP-18-ADS y MFE-polímero, se han determinado los volúmenes de desecho correspondientes. En todos los casos se han evaluado las condiciones de acondicionamiento, carga, lavado y elución. Los volúmenes de ruptura de los fenoxiácidos objeto de estudio se han determinado mediante la preconcentración de disoluciones acuosas al pH óptimo de retención en cada uno de los adsorbentes, con una cantidad fija de los herbicidas en el intervalo de 0.30 a 20 µg y volúmenes crecientes de disolución comprendidos entre 10.0 y 1000 mL.

3.1.1. PRECONCENTRACIÓN EN LA COLUMNA MFE[®]-POLÍMERO SAX

Antes de la retención de los fenoxiácidos en el adsorbente, se ha llevado a cabo una etapa de acondicionamiento a un caudal de 2.0 mL min⁻¹, con 20.0 mL de una disolución acuosa ajustada al valor de pH de cada uno de los experimentos realizados. Finalizada esta etapa y al mismo caudal, la capacidad de retención del adsorbente se ha evaluado preconcentrando, al pH adecuado, 25.0 mL de una disolución acuosa de los herbicidas de concentración 0.4 mg L⁻¹ cada uno de ellos. La elución de los analitos retenidos se ha realizado con 5.0 mL de mezclas de MeOH o AcN y una disolución acuosa con 0.8% de ácido fosfórico en diferente proporción, despreciando anteriormente un volumen de desecho de 3.0 mL.

Para determinar el volumen de ruptura se ha ajustado el pH de las disoluciones preconcentradas a un valor de 3.0 y para eluir a los herbicidas retenidos, se ha utilizado la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 80:20 (v:v).

Las fracciones de elución se han diluido a un volumen final de 50.0 mL con propósitos de focalización antes de su análisis mediante cromatografía líquida capilar con temperatura programada, según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.1.

Entre cada uno de los ensayos, la columna se ha lavado a un caudal de 2.0 mL min⁻¹ con una disolución de HCl 60 mM en metanol y se ha regenerado periódicamente con 30 mL de HNO₃ 60 mM en 99% de MeOH a un flujo de 0.5 mL min⁻¹ (63).

3.1.2. PRECONCENTRACIÓN EN LA COLUMNA LiChrospher[®] RP-18-ADS

La columna, empaquetada con el material de acceso restringido en base sílice, se ha acondicionado a un caudal de 1.5 mL·min⁻¹ con 15.0 mL de metanol-agua 5:95 (v/v) al valor de pH adecuado para cada uno de los experimentos realizados. Una vez acondicionada, la retención de los herbicidas fenoxiácido se ha evaluado pasando a través del adsorbente 25.0 mL de disoluciones acuosas con un 5% de MeOH, 1.5 µg del

éster butílico de 2,4-D y 0.30 μg del resto de herbicidas, a un caudal de 1.5 mL min^{-1} . La elución se ha realizado con 1.5 mL de disoluciones acuosas con un contenido de H_3PO_4 del 0.8% y proporciones variables de MeOH, desechando 4.2 mL.

El volumen de ruptura de cada fenoxiácido se ha determinado a pH 4.0 utilizando la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H_3PO_4 90:10 (v:v) como eluyente.

En todas las condiciones ensayadas, las fracciones eluidas se han analizado mediante cLC con gradiente de composición de fase móvil según el procedimiento 2.2.2.2, previa dilución con agua purificada a un volumen de 10.0 mL para focalizar los analitos en cabeza de columna.

Antes de su utilización, el lavado de la columna se ha realizado con 2-propanol a un caudal de 0.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ durante aproximadamente 15 minutos.

3.1.3. CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN LIDA Sep-IC-OH

El acondicionamiento del material adsorbente Lida Sep-IC-OH se ha llevado a cabo siguiendo el procedimiento descrito en un trabajo publicado previamente (154), con 250 mL de agua milli-Q para hinchar la resina, 10.0 mL de HCl 60 mM en metanol para su activación y limpieza y finalmente, 25.0 mL de una disolución acuosa al pH óptimo de retención, a un caudal aproximado de 10.0 mL min^{-1} .

La preconcentración, a este mismo caudal, se ha realizado con disoluciones acuosas de 50.0 mL a pH 1 con cantidades de 1.5 μg de éster butílico de 2,4-D y 0.30 μg del resto de herbicidas. Los analitos retenidos en el adsorbente se han eluido con 2.0 mL de HNO_3 60 mM en metanol a un caudal de 2.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ y las fracciones recogidas, se han diluido a un volumen de 10.0 mL antes de su correspondiente análisis mediante cLC en las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2.

3.1.4. CARTUCHOS DE EXTRACCIÓN OASIS[®] MCX

El acondicionamiento de este adsorbente polimérico se ha llevado a cabo inicialmente con 1.5 mL de metanol para solvatar los grupos funcionales superficiales y a continuación, con 1.5 mL de agua milli-Q. Tras la etapa de acondicionamiento, su capacidad de retención se ha evaluado a $\text{pH}\leq 2.0$, preconcentrando a un caudal de aproximadamente 2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, disoluciones acuosas de 25.0 mL con cantidades de 1.5 μg del éster butílico de 2,4-D y 0.30 μg del resto de herbicidas. La elución se ha realizado con 1.5 mL de metanol-0.8% ácido fosfórico y HCl 60 mM en metanol o acetonitrilo.

Los volúmenes de ruptura se han determinado a pH 1.0 y se ha utilizado MeOH-0.8% ácido fosfórico para eluir del adsorbente a los herbicidas retenidos. En todos los casos, los extractos recogidos se han llevado a un volumen final de 10.0 mL y se han analizado mediante cLC con gradiente de elución, según el procedimiento 2.2.2.2.

3.2. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA

La extracción y preconcentración de los herbicidas estudiados en forma ácida y de ésteres en el adsorbente MFE[®]-Polímero SAX (*columna preparativa*), se ha llevado a cabo en línea con la determinación mediante cromatografía líquida capilar en la columna Hypersil C₁₈ BDS (*columna analítica*), utilizando la técnica de columnas acopladas.

El esquema de conexiones se muestra en la figura 18. Como se puede apreciar, se ha utilizado una válvula de alta presión de seis vías (LabPro Rheodyne) capaz de operar por control remoto con la bomba digital programable Varian ProStar 210 (*bomba 2*) que impulsa la fase móvil a través del sistema. El acondicionamiento, retención y elución en la columna preparativa se han realizado con la bomba de preparativa Konik-Tech (*bomba 1*). Cambiando la posición de la válvula de conexión entre ambas columnas, se ha llevado a cabo la etapa de preconcentración (*posición 2*) o la de elución y análisis (*posición 1*).

La columna preparativa, se ha acondicionado en *posición 2* a un caudal de 2.0 mL min⁻¹ con 20 mL de una disolución acuosa a pH 3 (HClO₄ 0.1 M) antes de la retención de los herbicidas a este mismo pH y caudal en el adsorbente. La elución se ha realizado con la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v) a 0.5 mL min⁻¹. El adsorbente se ha regenerado periódicamente a un caudal de 0.5 mL min⁻¹ con HNO₃ 60 mM en 99 % de MeOH.

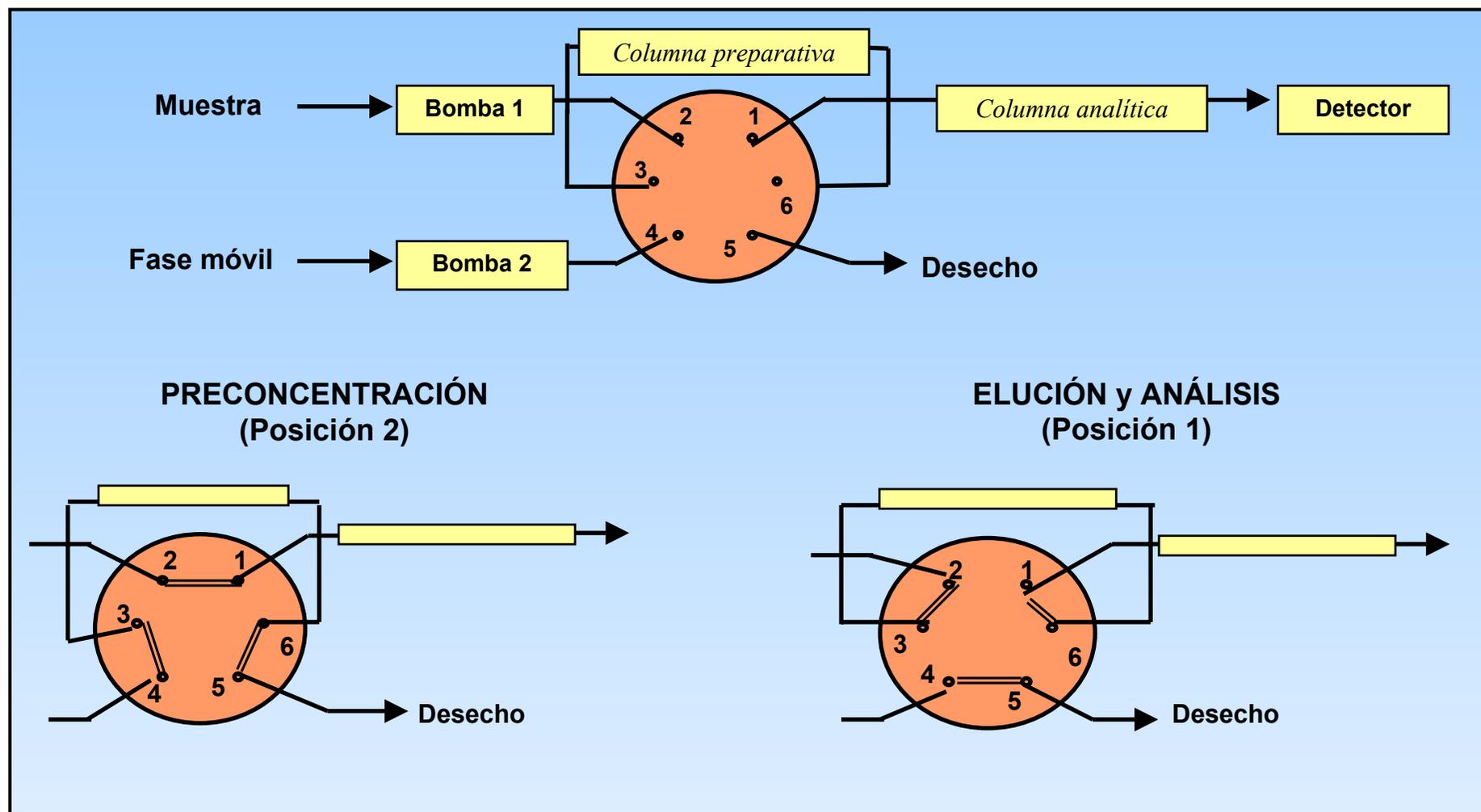


Figura 18. Esquema de conexiones del acoplamiento LC-cLC utilizado para la SPE en la columna MFE® Polímero SAX y el análisis mediante cromatografía líquida capilar de herbicidas fenoxiácido.

Las condiciones de operación del acoplamiento LC-cLC utilizado se resumen en la tabla 25.

Tabla 25
Condiciones de operación del proceso de extracción y preconcentración con columnas acopladas

| <i>VOLUMEN</i> (mL) | <i>CAUDAL</i> (mL min ⁻¹) | <i>POSICIÓN</i> VÁLVULA | <i>ETAPA</i> |
|------------------------|--|-----------------------------------|--|
| 20.0 | 2.0 | 2 | Acondicionamiento de la columna preparativa con agua milli-Q a pH 3 |
| 25.0 ó 100 | 2.0 | 2 | Retención de la muestra (pH 3) |
| 5.0 | 2.0 | 2 | Lavado con agua milli-Q |
| 0.5 | 0.5 | 1 | Elución con metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v) y transferencia de 10 µL a la columna analítica |
| 10.0 | 2.0 | 2 | Limpieza de la columna preparativa con HCl 60 mM en MeOH. |

La determinación de los herbicidas en la columna analítica se ha llevado a cabo con temperatura programada según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.1, prolongando la etapa isotérmica inicial a 20 °C hasta un tiempo de 35 minutos. El programa de temperatura y el registro del cromatograma se han iniciado al comenzar la transferencia de los herbicidas desde la columna de preconcentración a la de separación. Con propósitos de focalización en cabeza de columna, se han inyectado 20.0 µL de una disolución acuosa con un 10 % de MeOH a un tiempo de 1.5 min desde el inicio del cromatograma, que corresponde al tiempo estimado para que los herbicidas alcancen la válvula de inyección.

Durante el proceso de preconcentración y determinación cromatográfica se ha utilizado tribromofenol ó 2,6-diisopropilfenol como patrón interno.

Para optimizar las condiciones de acoplamiento se han determinado los volúmenes de purificación y de transferencia, preconcentrando 25.0 mL de disoluciones acuosas con cantidades de cada uno de los herbicidas comprendidas entre 2.0 y 200 µg a un caudal de 2.0 mL min⁻¹. Finalmente, se ha realizado un calibrado utilizando 2,6-diisopropilfenol como patrón interno en los siguientes intervalos de concentración: 0.250-1.50 mg L⁻¹ para el herbicida 2,4-D; 50.0-250 µg L⁻¹ para el éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP y 2,4,5-TP; 10.0-150 µg L⁻¹ para MCPP y MCPB; 25.0-150 µg L⁻¹ para 2,4-DB; 75.0-250 µg L⁻¹ para el éster butílico de 2,4-D y 100-500 µg L⁻¹ para el MCPA.

4. PROCEDIMIENTOS DE DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN MUESTRAS COMPLEJAS

La determinación de trazas de los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, 2,4-DB, MCPP, MCPB, 2,4,5-TP, éster metílico y butílico de 2,4-D en diversos tipos de muestras como suelos, alimentos (zumo de manzana), plantas (*mentha-piperita*) y matrices biológicas (orina humana) se ha llevado a cabo mediante cLC con inyección de grandes volúmenes (20.0 μL) y focalización en cabeza de columna.

En función de la naturaleza de la muestra se ha establecido el tratamiento más adecuado de extracción, preconcentración y limpieza. Previamente, se ha evaluado la estabilidad de algunos de los herbicidas estudiados en diferentes medios y la idoneidad de diversos materiales para la filtración de la muestra.

4.1. ENSAYOS PREVIOS

4.1.1. ESTABILIDAD DE DISOLUCIONES ACUOSAS DE LOS HERBICIDAS

La estabilidad de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D en agua pura milli-Q, disolución de NaOH 0.1 M, disolución de HCl 0.1 M, tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.8, tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, tampón amonio/amoniaco 0.1 M pH 9.2 y disolución de H_2SO_4 5 mM (pH 2.0) se ha evaluado a temperatura ambiente mediante cromatografía líquida capilar y espectrofotometría UV/VIS.

El estudio espectrofotométrico se ha llevado a cabo a temperatura ambiente, con disoluciones de los herbicidas en los distintos medios estudiados de concentración 5.0 mg L^{-1} cada uno de ellos, registrando espectros en el intervalo de 190 a 350 nm y midiendo la variación de la absorbancia durante 30 días a una longitud de onda próxima a 230 nm, valor al que la absorbancia del disolvente se puede despreciar y se observa el máximo de absorción para todos los herbicidas.

La estabilidad, mediante cromatografía líquida capilar, se ha evaluado a través de la variación de las áreas de pico cromatográfico correspondientes a disoluciones de los herbicidas de concentración 1.0 mg L^{-1} . Los análisis se han realizado según el procedimiento 2.2.2.1 para la determinación de mezclas de 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D. Las recuperaciones se han calculado por comparación de las áreas de pico con las de un patrón de la misma concentración.

4.1.2. MATERIALES DE FILTRACIÓN DE MUESTRA

La influencia de los materiales de filtración en la recuperación de los herbicidas se ha evaluado mediante cLC en las condiciones descritas en el apartado 2.2.2.2.

Para ello, se han preparado disoluciones acuosas con una proporción del 10% de metanol y una concentración de 2.0 mg L⁻¹ de cada uno de los analitos estudiados, que se han inyectado en el sistema cromatográfico antes y después de pasarlas a través de los siguientes materiales de filtración:

- membranas de poliéster (Ø 47 mm) de tamaño de poro 2.0 µm.
- membranas de celulosa MicronSep (Ø 47 mm) de tamaño de poro 2.0 µm.
- membranas de nailon 66 (Ø 47 mm) de tamaño de poro 0.45 µm.
- membranas de ésteres de celulosa y nitrocelulosa (Ø 47 mm), tamaño de poro 1.20 µm.
- papel de filtro para análisis gravimétrico lavado a los ácidos (589²).
- placa de vidrio filtrante de tamaño de poro controlado (G4).

En todos los casos se han realizado tres determinaciones y los valores de recuperación, se han calculado por comparación de las áreas de pico cromatográfico determinadas antes y después de la etapa de filtración.

4.2. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE DIFERENTES TIPOS DE MUESTRA Y DETERMINACIÓN MEDIANTE cLC

Dependiendo de las características de la matriz se han desarrollado métodos de tratamiento de muestra que incluyen diversas etapas, como el ajuste de pH, dilución, filtración, centrifugación, extracción, preconcentración y limpieza antes de la determinación mediante cromatografía líquida capilar en las condiciones cromatográficas óptimas.

La determinación de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres se ha realizado en muestras de suelo de elevado contenido orgánico tomadas de terrenos libres de vegetación no tratados con herbicidas, en muestras de zumo de manzana comercial (Cofrutos[®]) y en hojas de menta fresca de la planta "*mentha-piperita*", que para evitar la presencia otros pesticidas se ha cultivado en el propio departamento. Los residuos de los herbicidas en forma ácida se han determinado en orina masculina humana adquirida comercialmente en forma liofilizada y reconstituida mediante la adición del volumen adecuado de agua purificada.

4.2.1. MUESTRAS LÍQUIDAS

4.2.1.1. Zumo de manzana comercial

A cantidades de 6 y 10 gramos de zumo se le han adicionado concentraciones de los herbicidas en el intervalo 0.050-0.150 mg·kg⁻¹ para 2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D, 0.025-0.100 mg·kg⁻¹ para 2,4-DB, MCPB, 2,4-DP, 2,4,5-TP y MCPP y 0.075-0.150 mg·kg⁻¹ para el éster butílico del 2,4-D. Tras un tiempo de interacción aproximado de 20-30 min se ha realizado un dilución con agua purificada hasta un volumen final de 20.0 mL. La disolución resultante se ha ajustado a pH 1 con H₂SO₄ concentrado y se ha filtrado a vacío a través de una membrana de poliéster (tamaño de poro 2.0 µm). Finalizada esta etapa, el residuo de muestra se ha lavado con 3 volúmenes de 5.0 mL de una disolución acuosa a pH 1.

La extracción, preconcentración y limpieza de las muestras de zumo de manzana preparadas (≈ 50 mL) se ha llevado a cabo en el adsorbente polimérico OASIS[®] MCX, siguiendo el procedimiento 3.1.4. La muestra, al pH adecuado para la retención, se ha introducido a través del cartucho de SPE a un caudal de 2.0 mL·min⁻¹ y antes de la elución, se ha realizado una etapa de lavado con 2.0 mL de disolución acuosa a pH 1, 2.0 mL de disolución acuosa con 50% de metanol y finalmente 2.0 mL de disolución acuosa con una proporción del 15% de metanol y 0.8% de ácido fosfórico.

Para el análisis mediante HPLC convencional según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1, se ha tratado una cantidad de 10 g de zumo y los herbicidas retenidos se han eluido en 2.0 mL de una mezcla de 0.8% de ácido fosfórico en metanol. Cuando la determinación se ha realizado mediante cLC, la cantidad de muestra tratada ha sido de 6 g y los herbicidas se han eluido en 1.5 mL de metanol-0.8% H₃PO₄. Las fracciones de elución se han diluido con agua purificada hasta un volumen final de 10.0 mL, para obtener una disolución que permita la focalización en columna de los analitos antes de su análisis con gradiente de elución, según el procedimiento 2.2.2.2.

4.2.1.2. Orina masculina humana

La muestra de orina utilizada consta de dos fracciones liofilizadas; una que contiene aquellos componentes con un peso molecular inferior a 10000 Daltons y otra que contiene proteínas de mayor peso molecular. Para reconstituirla según las instrucciones recomendadas por la casa comercial (Sigma), se ha disuelto una cantidad

de 1.5 g y 1.7 mg de la fracción de bajo y elevado peso molecular respectivamente con agua purificada hasta a un volumen final de 50.0 mL.

Sobre alícuotas de 9.5 mL de la orina reconstituida, se ha añadido 0.5 mL de metanol y cantidades de 1.5 µg de los herbicidas estudiados en forma ácida. Tras un tiempo de aproximadamente 20-30 min, sin más tratamiento que el ajuste a pH 4 con HAc concentrado, se ha introducido la disolución resultante (≈ 10 mL) a través del material de acceso restringido LiChrospher® RP-18-ADS a un caudal de 1.0 mL min⁻¹. El adsorbente se ha acondicionado previamente según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.2.

Antes de la elución, se ha realizado una etapa de lavado a un caudal de 1.0 mL min⁻¹, con 4.0 mL de agua a pH 4.0 y 4.0 mL de una disolución acuosa con 15% de metanol-0.8% de ácido fosfórico. Los herbicidas retenidos en el adsorbente, se han eluido con 1.5 mL de la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v) a razón de 1.0 mL min⁻¹, desechando previamente un volumen de 4.7 mL de eluyente. El análisis de los extractos recogidos se ha realizado mediante cLC con gradiente de elución según el procedimiento 2.2.2.2, previa dilución con agua pura a un volumen final de 5.0 mL para obtener una disolución que permita focalizar los analitos en cabeza de columna.

4.2.2. MUESTRAS SÓLIDAS

4.2.2.1. Suelo de elevado contenido orgánico

Una vez homogeneizada la muestra en mortero, se ha adicionado sobre un 1 gramo de suelo cantidades de 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D en el intervalo de concentración comprendido entre 2.5 y 6.0 µg g⁻¹. La extracción de las muestras adicionadas, tras un tiempo de interacción de 20-30 min, se ha realizado a temperatura ambiente en un baño de ultrasonidos mediante tres etapas de 5 min de duración cada una de ellas. Las dos primeras extracciones se han realizado con 5 mL de acetonitrilo, mientras que para la tercera, se han utilizado 5 mL de una disolución de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0). Los extractos líquidos de cada una de las etapas se han separado del residuo sólido mediante centrifugación a 4000 rpm durante un tiempo de 5 min y se han recogido en un matraz.

Con propósitos de focalización en cabeza de columna, los extractos recogidos se han llevado con agua purificada hasta un volumen final de 1000 mL. La determinación se ha realizado inyectando en el cromatógrafo 20.0 μL de la disolución resultante a través de un filtro de jeringa de PTFE de tamaño de poro 0.20 μm y los análisis, se han llevado a cabo con temperatura programada según el procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.1 para mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D.

4.2.2.2. Hojas de menta fresca

Sobre una cantidad de 1 gramo de hojas de menta fresca a las que no se ha realizado ningún tratamiento previo salvo la eliminación de los tallos correspondientes, se ha adicionado un volumen de 1.0 mL de una disolución acuosa que contiene los herbicidas en la concentración adecuada para obtener niveles finales de adición de 0.10 ó 0.30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para 2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D, y 0.05 ó 0.30 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP. Transcurrido un tiempo de 20-30 min, la extracción de los herbicidas se ha realizado mediante baño de ultrasonidos con 20.0 mL de agua milli-Q durante un tiempo de 15 min. La suspensión resultante se ha filtrado en papel de análisis gravimétrico y el residuo de filtración se ha lavado con tres volúmenes de 5.0 mL de agua. Las fracciones acuosas recogidas se han ajustado a pH 1.0 con H_2SO_4 concentrado y se han filtrado nuevamente con una membrana de poliéster (tamaño de poro 2.0 μm). El residuo obtenido se ha lavado cuidadosamente con tres volúmenes de 5.0 mL de una disolución acuosa a pH 1.0.

Una vez finalizado este tratamiento, la extracción, preconcentración y limpieza de las muestras de menta (≈ 50 mL) se ha llevado a cabo en el adsorbente de intercambio aniónico Lida Sep-IC-OH, que se ha acondicionado previamente según el procedimiento 3.1.3. Concluida la etapa de retención, el cartucho de SPE se ha lavado con 2.0 mL de una disolución acuosa a pH 1.0 y los herbicidas retenidos se han eluido con 2.0 mL de ácido nítrico 60 mM en metanol.

Las fracciones recogidas de elución se han diluido con propósitos de focalización en cabeza de columna a un volumen final de disolución de 10.0 mL y se han analizado mediante cromatografía líquida capilar con gradiente de composición de fase móvil, de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 2.2.2.2.

5. PROCEDIMIENTOS DE SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE MEZCLAS RACEMICAS DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

La separación y determinación de los herbicidas quirales 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP, se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos con detección espectrofotométrica, utilizando columnas convencionales y de diámetro interno reducido empaquetadas con fases estacionarias quirales de carbamato de celulosa, β -ciclodextrina y antibióticos glicopeptídicos macrocíclicos (vancomicina y teicoplanina).

5.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CONVENCIONAL

Se han utilizado los equipos descritos en el apartado 1.1.1 y fases estacionarias quirales de gel de sílice enlazada a celulosa tris-(3,5-dimetil-fenilcarbamato), columnas CHIRALCEL[®] OD-H (150 x 2.1 mm I.D., 5 μ m) y CHIRALCEL[®] OD-RH (150 x 4.6 mm I.D., 5 μ m), y de β -ciclodextrina carboxipermetilada, columna ORpak CDBS-453 HQ (150 x 4.6 mm I.D., 5 μ m).

La separación en la columna CHIRALCEL[®] OD-H se ha llevado a cabo en fase normal a un caudal de 0.1 mL min⁻¹, utilizando como fase móvil mezclas de n-hexano con diferentes proporciones de isopropanol. Para ello, se han inyectando por separado disoluciones de cada herbicida de concentración 100 μ g mL⁻¹ en la fase móvil correspondiente y la detección se ha efectuado a una longitud de onda de 232 nm.

Utilizando la columna CHIRALCEL[®] OD-RH, la separación de los herbicidas de interés se ha llevado a cabo en fase inversa con distintas proporciones de acetonitrilo-tampón NaH₂PO₄ 0.2 M pH 2 (H₃PO₄) a un caudal de 0.5 mL min⁻¹. La detección se ha realizado a 240 nm y se han analizado por separado disoluciones de cada uno de los herbicidas en metanol de concentración 5 mM.

Con la fase estacionaria de β -ciclodextrina carboxipermetilada, columna ORpak CDBS-453 HQ, la separación se ha realizado también en fase inversa, a un caudal de 0.5 mL min⁻¹ y una longitud de onda de detección de 240 nm, con disoluciones de los herbicidas de concentración 0.5 mM en metanol. Como fase móvil se han empleado mezclas de MeOH-tampón NaH₂PO₄ 50 mM pH 3, AcN-disolución acuosa NaCl 0.2M 1.1% HAc y AcN-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% HAc en diferente proporción.

5.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR Y NANO-LC

La separación y determinación de las parejas de enantiómeros de los herbicidas racémicos 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP con las fases estacionarias quirales de teicoplanina y vancomicina, se ha llevado a cabo respectivamente mediante cLC y nano-LC utilizando los cromatógrafos descritos en los apartados 1.1.2 y 1.1.3 (figuras 11 y 12) y las columnas empaquetadas en el laboratorio del Dr. Fanali (CNR, Roma, Italia) con la instrumentación detallada en el apartado 1.1.4.

5.2.1. PREPARACIÓN DE COLUMNAS CAPILARES EMPAQUETADAS

Se han utilizado capilares de sílice fundida de diámetro interno variable y fases estacionarias de antibióticos como la teicoplanina (Chriobiotic T[®]) y la vancomicina, adquiridas comercialmente o sintetizadas, como en el caso de la vancomicina, de acuerdo a métodos publicados (296). El empaquetamiento se ha realizado conectando uno de los extremos del capilar a una precolumna (10 cm x 4.1 mm I.D) que cumple la función de reservorio de la suspensión de fase estacionaria, mientras que el otro se ha conectado a una frita mecánica de HPLC. Para evitar la formación de agregados de partículas el reservorio se ha introducido en un baño de ultrasonidos refrigerado y para impulsar la fase estacionaria del reservorio al interior del capilar, se ha bombeado agua a un caudal de 0.5 mL min⁻¹ y una presión máxima de 50 MPa. La homogeneidad del empaquetamiento se ha controlado por observación con microscopio óptico y una vez empaquetada la longitud deseada, la fase se ha compactado introduciendo acetona a través del capilar y mediante cambios bruscos de presión.

Para la preparación de la columna de *vancomicina* se ha utilizado un capilar de 0.075 mm I.D. x 0.375 mm O.D. El reservorio se ha llenado con una suspensión de partículas de LiChrospher[®] 100 C₁₈ (5 µm) en acetona (1:1) y se ha empaquetado una longitud de 10 cm aproximadamente a una presión de 30 MPa. A continuación, el reservorio se ha lavado, llenado con agua y conectado nuevamente al capilar, por el que se ha introducido agua durante 30 min. Tras la etapa de lavado, la primera frita se ha preparado por sinterización de las partículas de sílice mediante calefacción con un filamento eléctrico a una temperatura de 700°C durante 5 s. El capilar se ha cortado próximo al final de la frita preparada y el exceso de fase estacionaria de sílice C₁₈, se ha eliminado por bombeo de agua a través de la columna en sentido contrario a la dirección del empaquetamiento, a un caudal de 0.8 mL min⁻¹.

Una vez preparada la primera frita, la fase estacionaria quiral de vancomicina-sílice modificada ($5\ \mu\text{m}$) se ha suspendido en una mezcla de agua-acetona (1:1), el reservorio con la suspensión se ha conectado al extremo final abierto del capilar y se ha empaquetado una longitud de 21 cm. Una vez compactada la fase estacionaria, la frita del extremo final del capilar se ha preparado de forma análoga a la inicial, empaquetando aproximadamente una longitud de 5 cm del capilar con las partículas de sílice RP18 y lavando con agua nuevamente el capilar para eliminar la fase estacionaria libre. Esta frita se ha recubierto con una capa de resina epoxi para su mayor protección. Finalmente, el capilar se ha cortado a una longitud de 43 cm y la ventana de detección, se ha preparado a una distancia de 10 cm a partir del extremo final del capilar empaquetado, por calefacción con el filamento eléctrico a 700°C durante 5 s para eliminar la capa de poliamida que recubre el capilar (216).

En la figura 19 se muestra el capilar empaquetado con vancomicina. en el que se puede apreciar la primera y segunda frita preparadas.

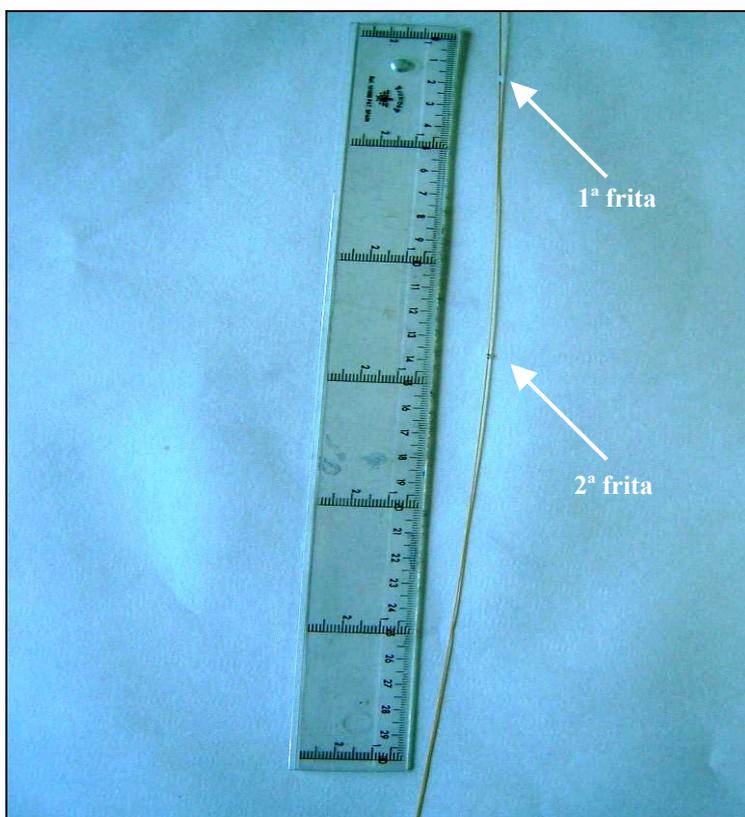


Figura 19. Capilar empaquetado con la fase estacionaria quiral de vancomicina-sílice modificada ($5\ \mu\text{m}$) de dimensiones 0.075 mm I.D. x 0.375 mm O.D. Longitud fase estacionaria quiral 21 cm, longitud total 43 cm y longitud efectiva 33 cm.

Utilizando la fase estacionaria quirál de *teicoplanina* y capilares de 0.320 mm I.D. x 0.450 mm O.D. se han preparado columnas empaquetadas de forma análoga a la vancomicina pero sin ventana de detección. En este caso, la longitud empaquetada ha sido 15.4 cm y la longitud quirál de 15 cm.

Las fritas se han preparado por empaquetamiento de una longitud del capilar de aproximadamente 10 cm con partículas de LiChrospher[®] 100 C₁₈ (5 µm) suspendidas en acetona, bombeando una disolución acuosa de NaCl 3 mM a un caudal de 0.6 mL min⁻¹ para compactar la fase estacionaria. Debido al mayor diámetro interno del capilar, la sinterización de las partículas de sílice se ha realizado por calefacción durante 30 s a una temperatura de 1150°C.

En la figura 20 se muestra una de las columnas empaquetadas, donde se puede observar la segunda frita preparada.



Figura 20. Capilar empaquetado con la fase estacionaria quirál de teicoplanina Chirobiotic T[®] (5 µm) de dimensiones 0.320 I.D. x 0.450 mm O.D. Longitud fase estacionaria quirál 15 cm, longitud total 20 cm.

5.2.2. OPTIMIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

5.2.2.1. Fase estacionaria quiral de teicoplanina

Las condiciones de separación cromatográfica se han optimizado mediante cLC con disoluciones acuosas del herbicida MCPP en concentración 2.0 mg L^{-1} y un contenido del 10% de metanol, a temperatura constante de 25°C y en modo de elución isocrático.

Se ha utilizado un capilar de $0.320 \text{ mm I.D.} \times 0.450 \text{ mm O.D.}$ empaquetado con teicoplanina según el procedimiento descrito anteriormente y la separación, se ha realizado a un caudal de $4.0 \mu\text{L min}^{-1}$ con mezclas de metanol o acetonitrilo y tampón formiato o citrato a diferentes concentraciones y valores de pH.

La detección se ha efectuado a una longitud de onda de 232 nm y el volumen inyectado de disolución ha sido de $5.0 \mu\text{L}$.

5.2.2.2. Fase estacionaria quiral de vancomicina

Utilizando un capilar de $0.075 \text{ mm I.D.} \times 0.375 \text{ O.D.}$ empaquetado con vancomicina de acuerdo al procedimiento 5.2.1, la separación de los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP mediante nano-LC se ha optimizado independientemente en condiciones isocráticas con disoluciones estándar de concentración $50.0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para ello, se ha utilizado como fase móvil una mezcla de agua-metanol-tampón acetato amónico 500 mM a pH 4.5 ó pH 6.0, con una proporción de tampón del 2 ó 5% y contenidos de metanol en el intervalo 85-95%.

El caudal en columna se ha fijado en 120 ó 60 nL min^{-1} , la longitud de onda de detección en 195 nm y el volumen de disolución inyectado en 60 nL aproximadamente.

5.2.3. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDOS QUIRALES

La determinación de mezclas racémicas de los herbicidas fenoxiácido 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP se ha llevado a cabo para cada uno de ellos por separado mediante nano-LC, utilizando el capilar empaquetado con la fase estacionaria quiral de vancomicina según el procedimiento 5.1.2.

Las condiciones óptimas para el análisis se detallan en la tabla 26.

Tabla 26
Condiciones cromatográficas de la determinación de fenoxiácidos quirales mediante nano-LC con CSP de vancomicina

| | |
|--|---|
| <i>COLUMNA</i> | vancomicina-sílice modificada (5 μm) 0.075 mm I.D. x 0.375 O.D. longitud fase estacionaria quiral 21 cm; longitud efectiva 33 cm; longitud total 43 cm. |
| <i>ELUCIÓN</i> | Isocrática metanol-tampón de acetato amónico 500 mM pH 4.5-agua 85:5:10 (v/v/v) |
| <i>CAUDAL</i> | 60 nL min^{-1} (\approx 34 bar) |
| <i>INYECCIÓN</i> | \approx 60 nL en fase móvil (tiempo de inyección 10 s) |
| <i>λ DE DETECCIÓN</i> | 195 nm |

Las características del método analítico se han evaluado a través de los límites de detección y cuantificación, intervalo de linealidad y reproducibilidad.

Las ecuaciones del calibrado (n=5) se han obtenido con disoluciones estándar de cada uno de los herbicidas en fase móvil en el intervalo de concentración 15-75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el 2,4-DP y 2,4,5-TP y 5.0-75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el herbicida MCP. La reproducibilidad (n=5) se ha estimado a través de la variación de los tiempos de retención y de las áreas de pico cromatográfico con disoluciones de los herbicidas de concentración 50.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. SEPARACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS EN FASE INVERSA CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

Como ya se puso de manifiesto en la revisión bibliográfica, los herbicidas fenoxiácido presentan baja volatilidad y naturaleza relativamente polar, de forma que su determinación mediante técnicas de cromatografía de gases se encuentra limitada por la necesidad de reacciones de derivatización. En los últimos años, la cromatografía de líquidos de alta eficacia ha reemplazado a los métodos tradicionales de cromatografía de gases y debido a las ventajas del empleo de columnas de diámetro interno reducido, las técnicas de LC capilar y nano-LC han recibido especial interés.

En este estudio, la separación de herbicidas fenoxiácido se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos en fase inversa utilizando columnas de diámetro interno variable, tal y como se puede apreciar en la figura 21. Además, puesto que la toxicidad y actividad herbicida depende de las distintas formas en que se presentan, resulta necesario desarrollar métodos para su determinación en forma ácida y de ésteres.

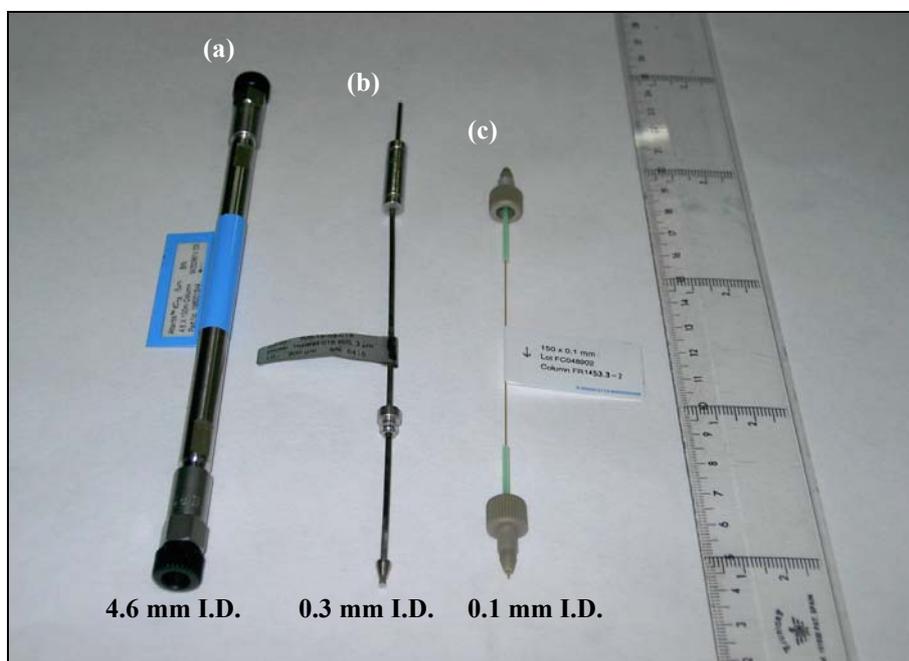


Figura 21. Columnas utilizadas en la separación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC de fase inversa. (a) columna Atlantis dC₁₈ (b) columna Hypersil C₁₈ BDS (c) columna monolítica ChromolitTM Cap RodTM RP-18. Longitud de las columnas, 150 mm.

Este tipo de herbicidas, poseen propiedades ácido-base y son relativamente polares, de modo que su separación en columnas de fase inversa C₁₈ se debe realizar con fases móviles de polaridad elevada, utilizando mezclas de MeOH o AcN en agua o mezclas de los tres disolventes. Puesto que todos ellos son ácidos débiles ($pK_a < 4.9$) y la separación depende del tipo de modificador orgánico y del pH del componente acuoso de la fase móvil, el empleo de tampones ácidos resulta, por lo general, adecuado para obtener picos cromatográficos simétricos y de anchura relativamente baja.

1.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CONVENCIONAL

La separación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP se ha llevado a cabo según el procedimiento 2.1.1 descrito en la sección experimental, utilizando la columna de fase inversa Atlantis dC₁₈ en gel de sílice. Las condiciones cromatográficas se han optimizado estudiando la influencia de la composición de la fase móvil en la retención y se han escogido a través del compromiso entre aceptable resolución (R_s) y menor tiempo de análisis.

Tomando como referencia las condiciones descritas anteriormente (41), se han empleado fases móviles de metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico de diferente composición. Utilizando una proporción de fase acuosa-modificador orgánico 40:60 (v/v) no se ha podido resolver a línea base el éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB y MCPB. Resoluciones aceptables se han obtenido para todos ellos con la fase móvil 45:55 (v/v), aunque en estas condiciones, la fuerte retención del éster butílico de 2,4-D en la columna ha incrementado el tiempo de análisis hasta 100 min.

Con objeto de obtener anchuras de pico ($w_{1/2}$) y tiempos de resolución aceptables, se ha decidido optimizar la separación con gradiente de composición de fase móvil. Manteniendo una composición de metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 55:45 (v/v) durante 25 min e incrementando linealmente la proporción de metanol hasta el 80% en un tiempo de 13 min, se han separado adecuadamente todos los herbicidas estudiados en un tiempo de 45 min aunque el menor tiempo de análisis, se ha conseguido con el gradiente de elución descrito en procedimiento 2.2.1 (tabla 24) y representado sobre el cromatograma de la figura 22. Como se puede apreciar en dicho cromatograma, el gradiente seleccionado de elución ha permitido la resolución de la mezcla de herbicidas en un tiempo de 40 minutos aproximadamente.

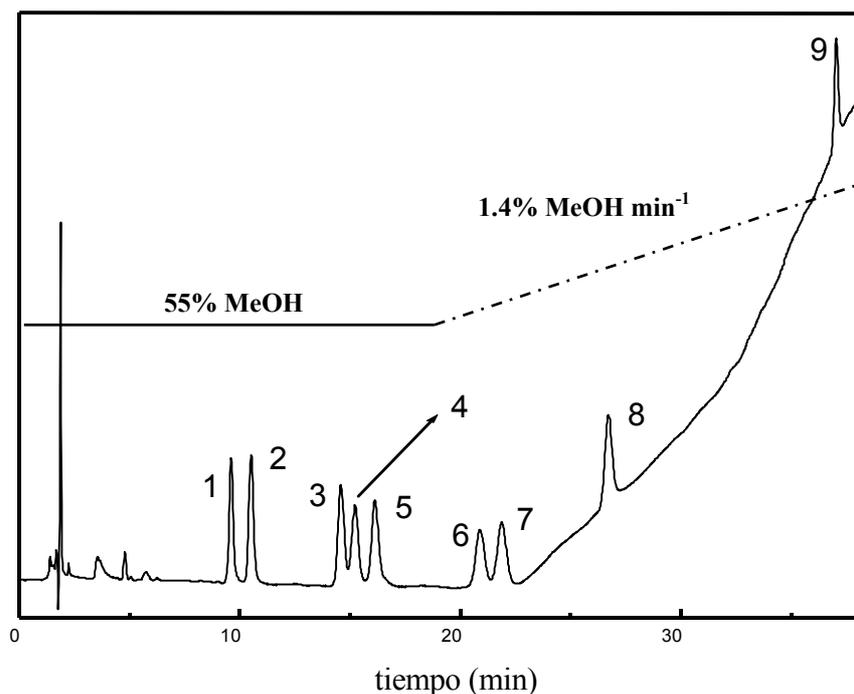


Figura 22. Cromatograma de un mezcla acuosa de herbicidas en concentración 1.0 mg L⁻¹ con gradiente de elución en la columna Atlantis dC₁₈.

Herbicidas: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) éster metílico 2,4-D; (4) 2,4,-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB; (7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) éster butílico 2,4-D.

Los valores de resolución y otros parámetros cromatográficos obtenidos en las condiciones óptimas de separación se incluyen en la tabla 27, donde se pueden observar valores de anchura de pico relativamente bajos para todos los herbicidas y en especial, para los dos primeros compuestos eluidos de la columna y el éster butílico de 2,4-D.

Tabla 27
Parámetros cromatográficos de la separación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC convencional

| HERBICIDA | PARÁMETRO | | | |
|----------------------|--------------------------|----------------------|------------------------|----------------|
| | Área (u.a.) ^a | t _R (min) | w _{1/2} (min) | R _s |
| 2,4-D | 45564 | 9.60 | 0.23 | 2.2 |
| MCPA | 49500 | 10.5 | 0.24 | |
| Éster metílico 2,4-D | 53967 | 14.6 | 0.33 | 8.3 |
| MCPP | 48034 | 16.2 | 0.37 | 1.0 |
| 2,4-DP | 57361 | 16.1 | 0.42 | 1.3 |
| 2,4-DB | 42178 | 20.9 | 0.47 | 6.3 |
| MCPB | 47791 | 21.9 | 0.48 | 1.3 |
| 2,4,5-TP | 53339 | 26.7 | 0.39 | 6.5 |
| Éster butílico 2,4-D | 36121 | 37.2 | 0.22 | 20 |

^a Concentración de herbicidas 1.0 mg L⁻¹

1.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

Para incrementar la eficacia del proceso cromatográfico y disminuir la cantidad de disolvente orgánico utilizado, se ha procedido a estudiar y optimizar la separación de los herbicidas en la columna capilar de fase inversa Hypersil C₁₈ BDS.

En la revisión bibliográfica realizada se ha puesto de manifiesto la necesidad de compensar la falta de sensibilidad de la cromatografía líquida capilar con diversas técnicas, debido a los pequeños volúmenes inyectados. Puesto que la introducción de grandes volúmenes de muestra es una práctica habitual, se requieren técnicas de focalización o preconcentración en cabeza de columna para evitar pérdida de resolución. De esta forma, debido a la considerable influencia tanto del volumen de inyección como de la disolución de focalización en la separación y en la sensibilidad de la detección, se ha llevado a cabo un estudio completo de las condiciones de inyección.

Por otro lado, y puesto que el pequeño diámetro de la columna permite que la transferencia de calor sea muy efectiva, resulta necesario evaluar el efecto de la temperatura en la separación, con objeto de utilizar gradientes térmicos como alternativa a los gradientes de elución.

1.2.1. SEPARACIÓN DE 2,4-D, 2,4-DB Y ÉSTERES DE 2,4-D

El herbicida 2,4-D es uno de los fenoxiácidos más utilizados y se aplica a los cultivos junto con sus ésteres y en mezclas con el 2,4-DB. Tanto el 2,4-DB como los ésteres del 2,4-D se degradan o hidrolizan respectivamente a 2,4-D. Por esta razón, la separación de mezclas de 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D ha resultado de especial interés y se ha optimizado de acuerdo al procedimiento descrito en 2.1.2.1. Tomando como referencia el método cromatográfico propuesto por Lucas-Delfa y col. (41), la separación de los herbicidas en condiciones isocráticas se ha realizado con mezclas de metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico y proporciones de modificador orgánico en el intervalo 45-60%.

Cuando se utilizan técnicas de focalización en cabeza de columna hay que considerar que la fuerza eluotrópica de la disolución inyectada con los analitos de interés debe ser menor que la de la fase móvil utilizada en la separación. A través de ensayos previos se ha podido comprobar que la disolución metanol-agua 10:90 (v/v), debido a su baja fuerza de elución, resulta adecuada para la focalización de estos herbicidas, por lo que se ha utilizado para optimizar la separación.

Manteniendo constante la temperatura a 20°C y con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico 56:44 (v/v) se ha conseguido la resolución a línea base de todos los analitos en un tiempo de 35 minutos. Como se puede observar en la tabla 28, el aumento de la temperatura de la columna ha afectado al factor de retención (k), anchura de pico ($w_{1/2}$) y resolución (R_s), de forma que a 65°C el tiempo de análisis ha disminuido 20 min aproximadamente y se ha empeorado la resolución del par formado por el éster metílico de 2,4-D y 2,4-DB. La disminución en la anchura de pico con el incremento de temperatura ha sido especialmente considerable con los herbicidas más retenidos.

Tabla 28
Influencia de la temperatura en los parámetros cromatográficos de separación

| TEMPERATURA | | | | | | | | | |
|----------------------|------|--------------------|-------|------|--------------------|-------|------|--------------------|-------|
| HERBICIDA | 20°C | | | 40°C | | | 65°C | | |
| | k | $w_{1/2}$ (min) | R_s | k | $w_{1/2}$ (min) | R_s | k | $w_{1/2}$ (min) | R_s |
| 2,4-D | 4.6 | 0.40 | | 3.4 | 0.19 | | 2.9 | 0.09 | |
| Éster metílico 2,4-D | 6.2 | 0.51 | 3.7 | 4.6 | 0.24 | 3.3 | 3.8 | 0.11 | 3.1 |
| 2,4-DB | 9.5 | 0.82 | 5.2 | 6.2 | 0.34 | 3.2 | 4.4 | 0.13 | 0.8 |
| Éster butílico 2,4-D | 27 | 2.10 | 12 | 18 | 0.82 | 12 | 11 | 0.30 | 11 |

A diferencia de las columnas convencionales de HPLC, las columnas de diámetro interno reducido permiten la aplicación de gradientes térmicos para facilitar la elución de los analitos. Para comprobar la eficacia de los programas de temperatura con este tipo de columnas se han realizado diversos ensayos en el intervalo de 20 a 65°C. Entre todos ellos se ha seleccionado el que se describe a continuación:

- etapa isotérmica inicial a 20°C durante 6 min
- incremento lineal a 65°C en un tiempo de 5 min
- etapa isotérmica a 65°C hasta el final del cromatograma

En estas condiciones, y como se puede apreciar en el cromatograma mostrado en la figura 23, se ha conseguido la resolución total de los herbicidas en un tiempo de análisis de 21 min, mejorando la separación respecto a las obtenidas en condiciones isotermas.

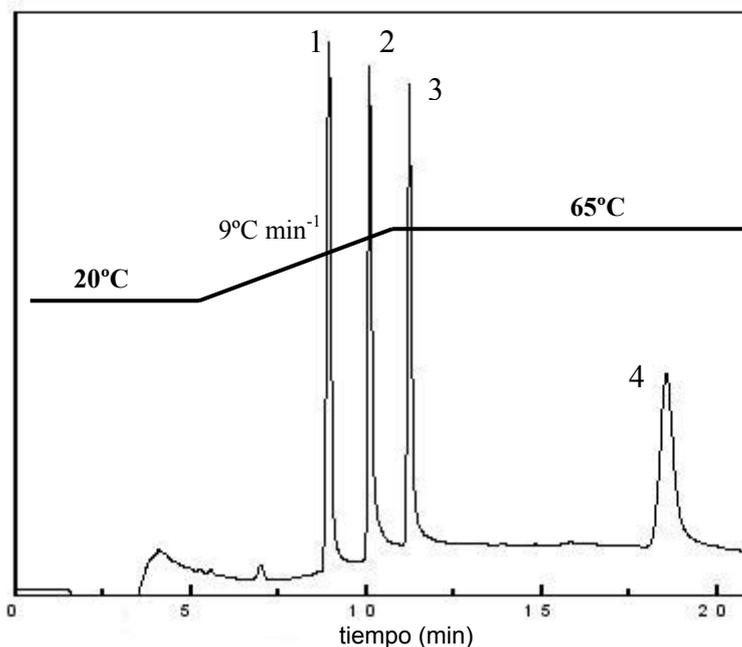


Figura 23. Cromatograma de una mezcla de 1.0 mg L^{-1} con la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico 56:44 (v/v) y temperatura programada. Herbicidas: (1) 2,4-D; (2) éster metílico 2,4-D; (3) 2,4,-DB; (4) éster butílico 2,4-D.

Una vez optimizada la separación, y con el gradiente térmico escogido, se han llevado a cabo una serie de ensayos para evaluar el efecto del volumen de inyección tanto en la separación como en la detección.

Para ello, se han utilizado bucles en el intervalo de volumen de 1.2 hasta $20.0 \mu\text{L}$ y se han inyectado disoluciones acuosas con una concentración de cada uno de los herbicidas de 0.20 mg L^{-1} y una proporción de 10% de metanol. Los tiempos de retención no han mostrado una variación significativa con el volumen de inyección, por lo que análogamente al tiempo básico de la separación se pueden considerar independientes. En relación a la anchura de pico, el éster butílico de 2,4-D ha mostrado una disminución considerable a partir de un volumen de inyección de $2.0 \mu\text{L}$, si bien para el resto de herbicidas ha permanecido prácticamente constante en el intervalo de volumen estudiado. La inyección de un volumen de $20.0 \mu\text{L}$ ha proporcionado las mayores áreas de pico cromatográfico para todos los herbicidas y por tanto, la mayor sensibilidad, sin pérdida apreciable de resolución.

En la tabla 29, se pueden observar los valores obtenidos de tiempo de retención, área y anchura de pico cromatográfico con un volumen de inyección de $20.0 \mu\text{L}$.

Tabla 29
Parámetros cromatográficos de la separación de herbicidas fenoxiácido mediante cLC con temperatura programada y un volumen de inyección de 20.0 µL

| <i>HERBICIDA</i> | <i>PARÁMETRO</i> ^a ± SD | | |
|-----------------------------|--|--|--|
| | <i>t_R</i> (<i>min</i>) | <i>Área x 10⁻³</i> (<i>u.a.</i>) | <i>w_{1/2}</i> (<i>min</i>) |
| <i>2,4-D</i> | 10.5 ± 0.4 | 96 ± 2 | 0.14 ± 0.01 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 11.7 ± 0.6 | 104 ± 2 | 0.18 ± 0.01 |
| <i>2,4-DB</i> | 12.8 ± 0.8 | 92 ± 2 | 0.20 ± 0.01 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 21.1 ± 0.2 | 59 ± 3 | 0.64 ± 0.03 |

^a Valor medio de tres determinaciones, ^b Concentración de herbicidas 0.20 mg L⁻¹

1.2.2. SEPARACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN MODO ISOCRÁTICO/ISOTERMO, ISOCRÁTICO/TEMPERATURA PROGRAMADA Y GRADIENTE/ISOTERMO

A través de los estudios realizados anteriormente con mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D (apartado 1.2.1), se ha puesto de manifiesto la influencia de la temperatura y la efectividad de los gradientes térmicos en la separación. Además, se ha comprobado la capacidad de focalización de la disolución metanol-agua 10:90 (v/v) y el aumento de sensibilidad producido por la inyección de grandes volúmenes (20.0 µL), razón por la cual, los estudios de temperatura y gradiente de elución que se detallan a continuación se han llevado a cabo en estas condiciones de inyección.

La separación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante cLC se ha realizado en diversos modos de trabajo con objeto de evaluar las ventajas y desventajas de la utilización de programas de temperatura y de composición de fase móvil. Para ello, se han determinado parámetros cromatográficos como el factor de retención (*k*), resolución (*R_s*), eficacia de la columna (*N*), anchura y asimetría de pico cromatográfico (*A_s*), atendiendo a las siguientes expresiones:

$$k = (t_R - t_0) / t_0$$

$$R_s = (t_{Ra} - t_{Rb}) / [0.85 (w_{1/2a} + w_{1/2b})]$$

$$N = 5.54 (t_R / w_{1/2})^2$$

$$A_s = B / A$$

siendo t_R ; tiempo de retención, t_0 ; tiempo básico, $w_{1/2}$; anchura de pico a media altura y L ; longitud de la columna. La asimetría de pico (A_s), se ha estimado gráficamente mediante el trazado de una línea vertical desde el máximo del pico hasta la base y medida del segmento horizontal izquierdo (A) y derecho (B) trazado al 10% de la altura total.

Las condiciones de separación cromatográfica se han seleccionado llegando a un compromiso entre el tiempo de análisis y el valor de cada parámetro evaluado.

1.2.2.1. Influencia de la temperatura en la separación

En cromatografía líquida capilar y debido al pequeño diámetro interno de la columna, los cambios de temperatura afectan de forma considerable a la separación y permiten controlar la retención sin necesidad de modificar la composición de fase móvil. En HPLC de fase inversa, el incremento de la temperatura modifica la viscosidad de la fase móvil y produce por lo general una disminución de los tiempos de retención y una mejora de la eficacia de la columna cromatográfica, si bien no se puede aumentar indefinidamente para evitar la descomposición de la fase estacionaria y/o de los analitos de interés. Además, en el caso de los herbicidas en forma ácida se debe considerar que la temperatura puede afectar a su grado de disociación.

Inicialmente, la separación de los nueve herbicidas fenoxiácido estudiados se ha llevado a cabo en modo de elución isocrático a temperatura constante de 20°C con diferentes mezclas de metanol o acetonitrilo y una disolución acuosa con 0.8% de ácido fosfórico. Con una proporción del 40 ó 60% de acetonitrilo en la fase móvil no se ha obtenido una resolución aceptable, pero utilizando fases móviles con metanol se ha mejorado la separación. Para incrementar la resolución del par crítico formado por los herbicidas 2,4-DB y MCPB con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 50:50 (v/v), se ha disminuido a un 45% la proporción de metanol. Con esta nueva composición, y aunque todos los herbicidas se han separado a línea base, se han obtenido anchuras de pico considerables y tiempos de retención de 163 min para el penúltimo compuesto eluído (2,4,5-TP) y superiores a este valor para el éster butílico de 2,4-D, que al ser el más apolar de todos ellos es el más retenido en la columna.

Manteniendo constante la composición de fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 45:55 (v/v) y según el procedimiento 2.1.2.1, se ha evaluado el efecto de la temperatura en la separación en el intervalo de 20 a 65°C, donde no se han observado síntomas de degradación ni cambios en el orden de elución de los herbicidas.

La influencia de la temperatura en la retención se ha estudiado a través de la ecuación de Van't Hoff:

$$\ln k = -\Delta H/RT + \Delta S/R + \ln \beta$$

donde ΔH es el cambio de entalpía debido a la transferencia del soluto entre la fase móvil y la fase estacionaria, ΔS el cambio de entropía, R la constante termodinámica de los gases, T la temperatura absoluta y β la relación de fases de la columna, que se ha considerado constante puesto que se ha utilizado la misma columna en todas las separaciones. En la mayoría de los sistemas cromatográficos de fase inversa la contribución de la temperatura al mecanismo de retención se encuentra determinada fundamentalmente por la entalpía del soluto, cuyo valor se suele encontrar en el intervalo de -10 a -15 kJ mol^{-1} (112).

Los gráficos del logaritmo del factor de retención en función de la inversa de la temperatura se muestran en la figura 24.

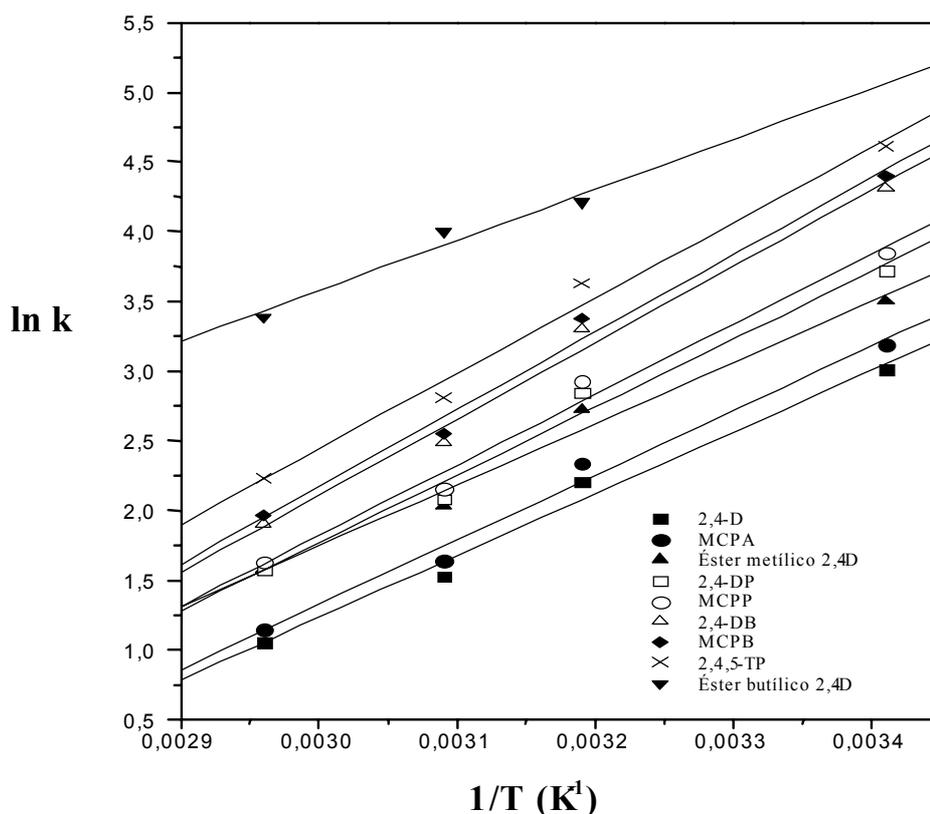


Figura 24. Gráficos de Van't Hoff de los herbicidas fenoxiácido obtenidos con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 45:55 (v/v), ilustrando el efecto de la temperatura en el factor de retención (k).

Como se puede observar, los valores representados para todos los herbicidas se ajustan a una línea recta (R^2 0.960-0.988), lo que indica que en el intervalo de temperatura considerado no se modifica el mecanismo de retención. La pendiente de todas las rectas es positiva pero diferente para cada una de ellas, lo que sugiere un cambio negativo de entalpía y en consecuencia, una transferencia entálpica favorable desde la fase móvil a la fase estacionaria. Para un mismo cambio de temperatura, los herbicidas con mayor ΔH son los más afectados, mientras que aquellos cuyo valor de ΔH apenas se modifica con el cambio de temperatura, no experimentan una variación apreciable en el factor de retención. Así, los factores menos afectados son aquellos de los compuestos más fuertemente retenidos, y en este caso particular el del éster butílico del 2,4-D.

Por otra parte, las diferencias observadas entre las pendientes permiten investigar el efecto del cambio de temperatura en la resolución y estimar los intervalos que pueden ser útiles para llevar a cabo separaciones con temperatura programada. La conveniencia de las etapas isotérmicas, especialmente a temperaturas elevadas, también son evidentes a través de estos gráficos de Van't Hoff, ya que permiten disminuir la retención de los compuestos más fuertemente retenidos y por lo tanto, el tiempo de análisis.

La tabla 30, muestra los valores obtenidos de los parámetros cromatográficos evaluados a diferentes temperaturas. En ella se aprecia una dependencia negativa entre la temperatura y la retención, ya que su aumento favorece la desorción de los analitos de la fase estacionaria y disminuye los tiempos de retención. Sin embargo, a temperaturas elevadas (65°C), la pérdida de resolución produce que el éster metílico de 2,4-D y el 2,4-DP se detecten como un solo pico cromatográfico, y que únicamente el 2,4,5-TP y el éster butílico de 2,4-D se resuelvan a línea base y no constituyan, a diferencia del resto de herbicidas, un par crítico. Aunque las separaciones isotérmicas a 20, 40 y 50°C han permitido obtener una resolución aceptable para todos ellos, el tiempo de análisis ha sido excesivamente largo.

Como también se puede observar en dicha tabla, la anchura de pico cromatográfico ha disminuido prácticamente a la mitad al incrementar la temperatura de 20 a 40°C. A temperaturas mayores, la disminución ha sido más suave para todos los herbicidas, excepto para el éster butílico del 2,4-D, cuya variación en la anchura de pico ha sido muy acusada en todo el intervalo. Aún así, el ensanchamiento de los últimos picos eluidos a 40°C y especialmente a 20°C ha sido considerable.

Tabla 30
Influencia de la temperatura en la separación isocrática de herbicidas fenoxiácido mediante cLC con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 45:55 (v/v)

| HERBICIDA ^a | TEMPERATURA (°C) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------------------------|------|---------------------------|------|-----|-------------------------|------|---------------------------|------|-----|-------------------------|------|---------------------------|------|------|-------------------------|------|---------------------------|------|------|
| | 20 | | | | | 40 | | | | | 50 | | | | | 65 | | | | |
| | t _R (min) | k | w _{1/2} (min) | N | Rs | t _R (min) | k | w _{1/2} (min) | N | Rs | t _R (min) | k | w _{1/2} (min) | N | Rs | t _R (min) | k | w _{1/2} (min) | N | Rs |
| 2,4-D | 34.4 | 20.3 | 1.5 | 3076 | - | 16.3 | 9.10 | 0.60 | 3829 | - | 9.00 | 4.60 | 0.41 | 3663 | - | 6.30 | 2.90 | 0.2 | 4986 | - |
| MCPA | 40.8 | 24.4 | 1.7 | 3229 | 2.4 | 18.4 | 10.4 | 0.72 | 4056 | 1.9 | 9.90 | 5.10 | 0.43 | 3394 | 1.3 | 6.70 | 3.20 | 0.3 | 3679 | 1.1 |
| Éster metílico 2,4-D | 54.7 | 33.0 | 2.2 | 3520 | 4.2 | 26.2 | 15.3 | 1.0 | 3960 | 5.5 | 13.4 | 7.60 | 0.55 | 3541 | 5.1 | 9.40 | 4.80 | - | - | 2.8 |
| 2,4-DP | 68.1 | 41.3 | 2.7 | 3659 | 3.3 | 29.3 | 17.2 | 1.0 | 4952 | 1.9 | 14.7 | 8.10 | 0.57 | 4262 | 1.0 | 9.40 | 4.80 | - | - | 0 |
| MCPD | 77.0 | 46.8 | 2.9 | 4004 | 1.9 | 31.8 | 18.8 | 1.1 | 4715 | 1.4 | 15.6 | 8.70 | 0.62 | 3292 | 1.0 | 9.80 | 5.10 | 0.4 | 4343 | 0.72 |
| 2,4-DB | 121 | 74.4 | 4.8 | 3604 | 6.9 | 45.5 | 27.2 | 1.6 | 4594 | 6.0 | 20.9 | 12.0 | 0.84 | 3781 | 4.4 | 12.4 | 6.70 | 0.4 | 4607 | 3.9 |
| MCPB | 133 | 81.7 | 5.0 | 4022 | 1.4 | 49.0 | 29.4 | 1.8 | 3972 | 1.2 | 22.3 | 12.8 | 0.91 | 3401 | 1.0 | 13.1 | 7.10 | 0.5 | 3385 | 0.81 |
| 2,4,5-TP | 163 | 100 | 5.9 | 4199 | 3.2 | 62.5 | 37.8 | 2.1 | 4815 | 4.0 | 28.5 | 16.7 | 1.1 | 3719 | 3.7 | 16.6 | 9.30 | 0.6 | 4103 | 3.6 |
| Éster butílico 2,4-D | - | - | - | - | - | 110 | 67.4 | 8.9 | 860 | 5.1 | 89.3 | 54.5 | 3.4 | 3937 | 15.8 | 49.2 | 29.5 | 1.6 | 5238 | 17.3 |

^a Concentración de cada herbicida 25.0 µg L⁻¹

Respecto a la influencia de la temperatura en la eficacia de la columna, tal y como se pone de manifiesto en la tabla 30, todos los herbicidas han mostrado un incremento en el número de platos teóricos con el aumento de temperatura, aunque en el caso del 2,4-D, al ser el más ácido de todos ellos, la mayor eficacia a 65°C no se puede explicar únicamente por el cambio de temperatura y probablemente influye de manera considerable el equilibrio ácido-base. En el caso del éster butílico del 2,4-D, que es el compuesto más apolar y por ello retenido en la columna, se ha observado un fuerte aumento en el número de platos teóricos a 65°C, respecto al resto de herbicidas estudiados y a una temperatura de 40°C, consecuentemente con la disminución de su anchura de pico.

Entre todas las separaciones realizadas en condiciones isoterma con la fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 45:55 (v/v), únicamente la temperatura de 50°C ha proporcionado una resolución aceptable en el menor tiempo de análisis. En estas condiciones, el elevado tiempo de retención del éster butílico del 2,4-D (≈ 89 min) ha incrementado excesivamente el tiempo de separación.

Con objeto de disminuir el tiempo de análisis y mantener la resolución, se han estudiado diferentes *programas de temperatura*, manteniendo su valor constante a 20°C durante 20 ó 25 minutos y aplicando un incremento lineal hasta 65°C a razón de 2°C min^{-1} , temperatura que ha permanecido constante hasta el final del cromatograma. Análogamente, se han aplicado otros gradientes térmicos elevando la temperatura hasta 30 ó 40°C a 1°C min^{-1} y a continuación hasta 65°C aumentando 2, 4 ó 5°C la temperatura por minuto. Finalmente se ha seleccionado el siguiente programa: etapa isotérmica inicial a 20°C durante 25 min, incremento lineal a 30°C en un tiempo de 10 min, incremento lineal a 65°C durante 7 min y etapa isotérmica hasta el final del cromatograma a 65°C.

En la tabla 31 se incluyen los valores obtenidos de tiempo y factor de retención, anchura de pico cromatográfico y resolución, donde se puede apreciar que en relación a la separación isoterma a 50°C (tabla 30), la anchura de pico ha disminuido de forma apreciable para los cuatro últimos compuestos eluidos y en especial, para el éster butílico de 2,4-D. Por otra parte, se ha mejorado la resolución entre el éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP y MCPP, así como del par crítico formado por el 2,4-DB y el MCPB, que ha aumentado de un valor de 1.0 a 1.6.

Tabla 31
Parámetros cromatográficos de la separación mediante cLC con temperatura programada y la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 45:55 (v/v)

| <i>HERBICIDA</i> ^a | <i>PARÁMETRO</i> | | | |
|-------------------------------|-------------------------|------|---------------------------|--|
| | t _R (min) | k | w _{1/2} (min) | Rs |
| <i>2,4-D</i> | 16.3 | 2.4 | 1.0 | 2.5 4.7 3.1 1.8 9.1 1.6 4.3 5.6 |
| <i>MCPA</i> | 18.8 | 2.9 | 1.0 | |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 24.3 | 4.1 | 1.3 | |
| <i>2,4-DP</i> | 28.6 | 5.0 | 1.5 | |
| <i>MCPP</i> | 31.3 | 5.5 | 1.5 | |
| <i>2,4-DB</i> | 40.5 | 7.4 | 0.63 | |
| <i>MCPB</i> | 41.5 | 7.6 | 0.76 | |
| <i>2,4,5-TP</i> | 44.3 | 8.2 | 0.61 | |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 69.0 | 13.4 | 0.30 | |

^a Concentración de cada herbicida 25.0 µg L⁻¹

La figura 25 muestra el cromatograma registrado con el gradiente de temperatura seleccionado. Como se puede observar, los herbicidas fenoxiácido se han separado con total resolución en un tiempo de 70 min, lo que ha supuesto una disminución de 20 min aproximadamente respecto a la separación isoterma a 50°C (tabla 30).

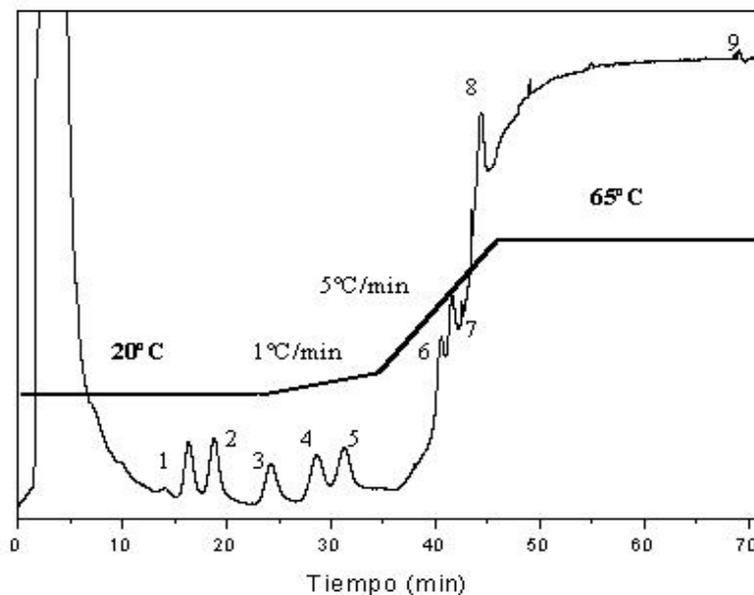


Figura 25. Cromatograma de una disolución estándar de 25.0 µg L⁻¹ con gradiente de temperatura y la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 45:55 (v/v)
 Herbicidas: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) éster metílico 2,4-D; (4) 2,4,-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB; (7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) éster butílico 2,4-D.

El éster butílico del 2,4-D, tal y como se puede apreciar en el cromatograma de la figura 25, experimenta una fuerte retención en la columna con el gradiente térmico seleccionado y su cuantificación, podría resultar dificultosa por la deriva observada en la línea base.

1.2.2.2. Gradiente de elución

Para mejorar las condiciones de separación, se ha evaluado el efecto del cambio de composición de fase móvil en la elución de los herbicidas retenidos en la columna capilar Hypersil C₁₈ BDS a temperatura constante de 25°C. Para ello, se han ensayado diferentes programas de composición con una mezcla de metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico, según el procedimiento 2.1.2.2. En todos ellos, la proporción inicial y final de MeOH en la fase móvil ha sido del 40 y 70% respectivamente.

La composición, se ha modificado a un tiempo de 20 ó 25 min a razón de 1, 2 ó 3% de metanol por minuto y las mejores condiciones encontradas de separación, llegando a un compromiso entre resolución y tiempo de análisis, han sido las siguientes; MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 40:60 (v/v) durante 25 min, incremento lineal hasta un 70% de MeOH en un tiempo de 15 min (2% min⁻¹) y a continuación, etapa isocrática final a dicha composición. El cromatograma obtenido con el gradiente seleccionado de elución se muestra en la figura 26.

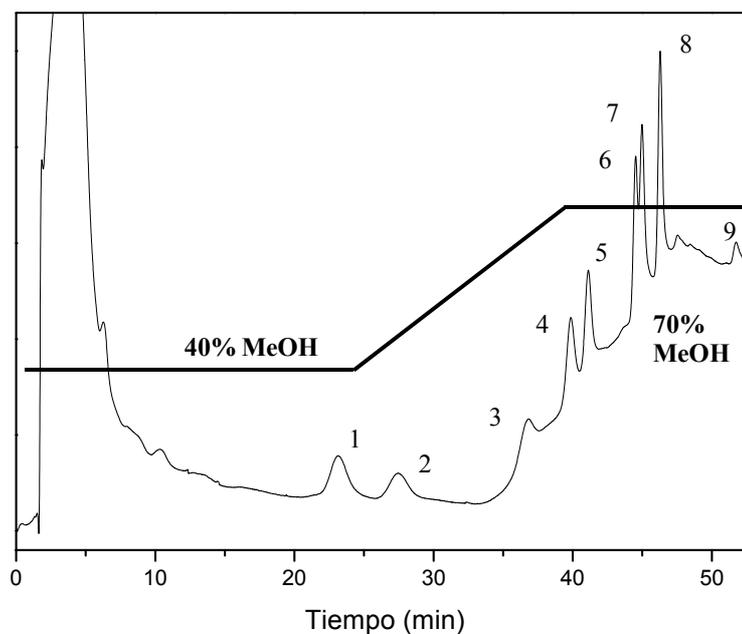


Figura 26. Cromatograma de una disolución estándar de herbicidas en concentración 25.0 µg L⁻¹ con gradiente de elución a una temperatura de 25°C. Herbicidas: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) éster metílico 2,4-D; (4) 2,4,-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB; (7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) ester butílico 2,4-D.

Como se puede observar en la figura anterior, con el gradiente escogido de elución se ha conseguido la separación de todos los herbicidas de interés con aceptable resolución en un tiempo de análisis de 55 min, incluyendo el par crítico formado por el 2,4-DB y el MCPB (R_s 1.4), cuya resolución resulta especialmente dificultosa debido a su similar estructura química.

Respecto a los resultados obtenidos en modo de elución isocrático con la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% H_3PO_4 45:55 (v/v) a temperatura constante en el intervalo de 20-65°C, la separación con gradiente de composición de fase móvil ha supuesto una mejora considerable. Además de la disminución del tiempo de análisis también se han observado picos muy estrechos para los herbicidas 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP.

Por otra parte, los factores de retención de los últimos compuestos eluidos han sido similares a los obtenidos en condiciones de separación isocrática con gradiente de temperatura. En el caso de los herbicidas menos retenidos en la columna (2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D), los valores de k han estado comprendidos entre 4.3 y 7.0, por lo que comparados con los obtenidos mediante temperatura programada (tabla 31), se han incrementado del orden del 40% y han sido relativamente altos. En general, los programas de temperatura al igual que los gradientes de composición de fase móvil incrementan el poder eluotrópico, pero al permitir un ajuste más fino, permiten obtener intervalos más anchos de factores de retención desde valores mucho más pequeños de k .

A través del compromiso entre resolución y tiempo de análisis, la separación de mezclas de los nueve herbicidas estudiados, tanto en forma ácida como de ésteres, mediante cLC en la columna Hypersil C_{18} BDS, ha resultado más adecuada con gradiente de elución a temperatura constante de 25°C, puesto que respecto al modo de separación isocrático/temperatura programada, ha reducido el tiempo de análisis en 15 minutos.

1.2.2.3. Naturaleza de la fase estacionaria

La influencia de la fase estacionaria en la retención, se ha evaluado por comparación de los resultados obtenidos con la columna Hypersil C₁₈ BDS 150 x 0.3 mm I.D. (3 µm) en modo gradiente de elución/isotermo y la columna monolítica ChromolithTM RP-18 150 x 0.1 mm I.D., ambas en base gel de sílice.

Como paso previo se han optimizado las condiciones de separación en la columna monolítica, según el procedimiento descrito en la sección experimental (apartado 2.1.2.2), inyectado disoluciones acuosas con una concentración de cada uno de los herbicidas de 1.0 mg L⁻¹ y un contenido del 10% de metanol

Manteniendo constante la temperatura de la columna a un valor de 25°C y una composición de fase móvil metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 40:60 (v/v) a un caudal de 3.0 µL min⁻¹, el tiempo de análisis ha sido excesivamente largo por la fuerte retención del éster butílico del 2,4-D, y además, no se ha conseguido separar a línea base el resto de herbicidas.

Para mejorar la resolución, se ha disminuido la proporción de metanol en la mezcla y para reducir el tiempo de análisis, se han empleado diferentes gradientes de composición, que como se ha puesto de manifiesto anteriormente para la separación de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido, han resultado más ventajosos que el empleo de programas de temperatura. También se ha optimizado el caudal de fase móvil a través de la columna.

Las condiciones evaluadas de separación se incluyen en la tabla 32, junto con el valor obtenido en cada caso de tiempo de retención, anchura de pico cromatográfico y resolución.

Tabla 32
Condiciones experimentales y parámetros cromatográficos de la separación en la columna monolítica Chromolith™ RP-18

| | CONDICIONES DE SEPARACIÓN | | | | | | | | |
|-------------------------------|---|--------------------|-------|---|--------------------|-------|---|--------------------|-------|
| | Caudal: 3.0 $\mu\text{L min}^{-1}$ | | | Caudal: 4.0 $\mu\text{L min}^{-1}$ | | | Caudal: 5.0 $\mu\text{L min}^{-1}$ | | |
| | 1) 20 min: MeOH-s. acuosa 0.8% ác. fosfórico 35:65 (v/v) | | | 1) 20 min: MeOH-s. acuosa 0.8% ác. fosfórico 30:70 (v/v) | | | 1) 20 min: MeOH-s. acuosa 0.8% ác. fosfórico 25:75 (v/v) | | |
| | 2) rampa a 70% MeOH en 20 min | | | 2) rampa a 70% MeOH en 20 min | | | 2) rampa a 70% MeOH en 20 min | | |
| | 3) 70% hasta final cromatograma | | | 3) 70% hasta final cromatograma | | | 3) 70% hasta final cromatograma | | |
| <i>HERBICIDA</i> ^a | t_R (min) | $w_{1/2}$ (min) | R_s | t_R (min) | $w_{1/2}$ (min) | R_s | t_R (min) | $w_{1/2}$ (min) | R_s |
| <i>2,4-D</i> | 8.22 | 0.48 | 1.4 | 7.66 | 0.47 | 1.8 | 8.51 | 0.58 | 2.0 |
| <i>MCPA</i> | 9.45 | 0.57 | | 9.21 | 0.54 | | 10.7 | 0.69 | |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 13.8 | 0.65 | 4.2 | 14.5 | 0.75 | 4.8 | 17.8 | 1.1 | 4.8 |
| <i>2,4-DP</i> | 14.7 | 0.77 | 0.8 | 15.8 | 0.90 | 1.0 | 19.9 | 1.3 | 1.0 |
| <i>MCP P</i> | 16.6 | 0.78 | 1.4 | 18.5 | 0.82 | 1.8 | 24.0 | 1.2 | 2.0 |
| <i>2,4-DB</i> | 25.6 | 1.2 | 5.3 | 31.5 | 1.2 | 7.5 | 34.4 | 0.47 | 7.6 |
| <i>MCP B</i> | 28.0 | 1.6 | 1.0 | 34.1 | 0.92 | 1.2 | 35.4 | 0.41 | 1.4 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 33.7 | 1.2 | 2.4 | 37.3 | 0.67 | 2.4 | 36.8 | 0.40 | 2.0 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 47.2 | 0.54 | 9.1 | 48.2 | 0.44 | 12 | 43.4 | 0.27 | 12 |

^a Concentración de herbicida 1.0 mg L⁻¹

Llegando a un compromiso entre resolución aceptable y menor tiempo de análisis, se ha seleccionado el gradiente de elución descrito en la tabla 32 con un caudal de fase móvil de $5.0 \mu\text{L min}^{-1}$. En todas las condiciones estudiadas, las asimetrías y colas de pico cromatográfico han sido importantes, por lo que el correspondiente aumento de la anchura de pico ha disminuido la resolución de algunos pares, como por ejemplo el formado por el éster metílico de 2,4-D y el 2,4-DP, analitos que se eluyen de la columna cuando el gradiente de composición de fase móvil aún no se ha iniciado.

En la figura 27 se puede observar el cromatograma obtenido en las condiciones cromatográficas seleccionadas. Como se puede apreciar, todos los herbicidas se han separado con aceptable resolución en un tiempo análisis de 45 minutos, si bien todos ellos han mostrado colas considerables.

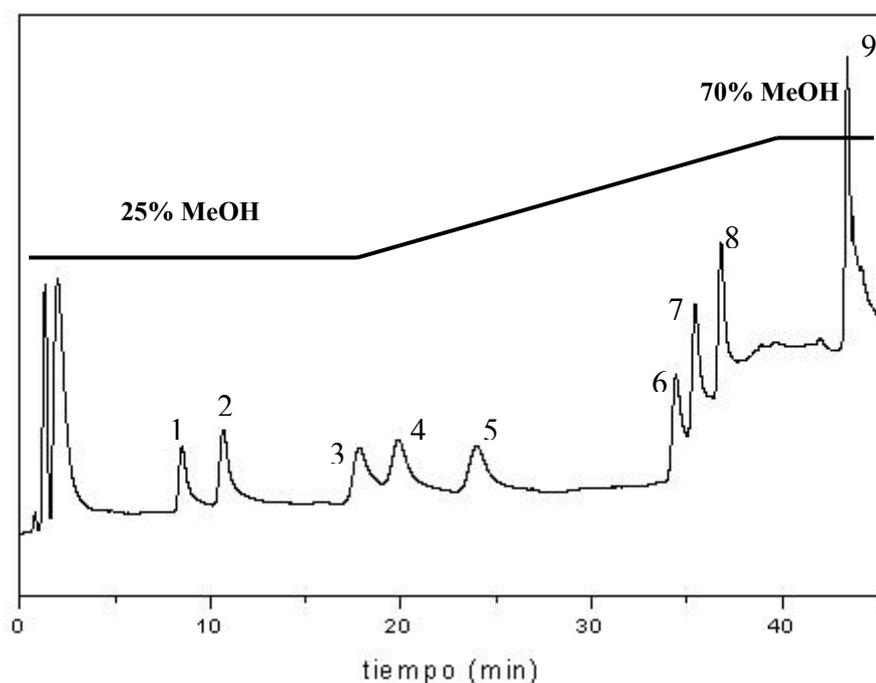


Figura 27. Cromatograma de una mezcla de herbicidas fenoxiacido en concentración 1.0 mg L^{-1} a temperatura constante de 25°C con gradiente de composición de fase móvil en la columna monolítica ChromolithTM RP-18. Herbicidas: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) éster metílico 2,4-D; (4) 2,4,-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB;(7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) ester butílico 2,4-D.

Un pico cromatográfico perfectamente simétrico presenta un valor 1 de asimetría, por lo que los picos más simétricos son aquellos que más se aproximan a este valor. Los valores de asimetría de pico calculados a partir del cromatograma mostrado en la figura anterior, se encuentran comprendidos para todos los herbicidas en el intervalo 1.7-2.7, lo que en algunos casos, supera claramente el valor de asimetría de pico considerado recomendable.

Este hecho, se debe atribuir a la presencia de macroporos y microporos en la estructura monolítica, que produce respectivamente una transferencia lenta de materia y una difusión interna también lenta de las moléculas pequeñas y que es responsable del mayor ensanchamiento de banda. Por esta razón, las columnas empaquetadas con partículas de sílice suelen proporcionar valores de asimetría más próximos a 1.

La tabla 33, muestra algunos de los parámetros cromatográficos obtenidos con disoluciones estándar de concentración 1.0 mg L^{-1} y el gradiente seleccionado de elución en la columna ChromolithTM RP-18 y la columna Hypersil C₁₈ BDS.

Tabla 33
Parámetros cromatográficos de la separación con gradiente de elución a temperatura constante de 25°C en columnas de fase inversa sílice C₁₈

| CONDICIONES DE SEPARACIÓN | Monolítica Chromolith TM RP-18, 150 x 0.1 mm I.D. | | | | Hypersil C ₁₈ BDS 150 x 0.3 mm I.D. (3 μm) | | | |
|---------------------------|--|------------------------|------|----------------|--|------------------------|------|----------------|
| | Caudal: 5.0 μL min ⁻¹ 1) 20 min: MeOH-s. acuosa 0.8% ác. fosfórico 25:75 (v/v) 2) rampa a 70% MeOH en 20 min 3) 70% hasta final cromatograma | | | | Caudal: 8.0 μL min ⁻¹ 1) 25 min: MeOH-s. acuosa 0.8% ác. fosfórico 40:60 (v/v) 2) rampa a 70% MeOH en 15 min 3) 70% hasta final cromatograma | | | |
| HERBICIDA | t _R (min) | w _{1/2} (min) | Rs | A _s | t _R (min) | w _{1/2} (min) | Rs | A _s |
| 2,4-D | 8.51 | 0.58 | | 2.0 | 23.8 | 0.73 | | 1.2 |
| MCPA | 10.7 | 0.69 | 2.0 | 2.1 | 28.1 | 0.81 | 3.3 | 1.6 |
| Éster metílico 2,4-D | 17.8 | 1.1 | 4.8 | 2.5 | 37.1 | 0.70 | 7.0 | 1.0 |
| 2,4-DP | 19.9 | 1.3 | 0.9 | 2.4 | 39.9 | 0.51 | 2.7 | 1.0 |
| MCPP | 24.0 | 1.2 | 2.0 | 1.8 | 41.1 | 0.44 | 1.5 | 1.3 |
| 2,4-DB | 34.4 | 0.47 | 7.6 | 2.0 | 44.4 | 0.33 | 5.1 | 1.0 |
| MCPB | 35.4 | 0.41 | 1.4 | 1.7 | 44.9 | 0.37 | 1.4 | 1,4 |
| 2,4,5-TP | 36.8 | 0.40 | 2.0 | 1.9 | 46.2 | 0.36 | 2.1 | 1.2 |
| Éster butílico 2,4-D | 43.4 | 0.27 | 12.3 | 2.7 | 51.7 | 0.29 | 10.0 | 1.7 |

Como se puede observar en la tabla anterior, la columna la columna Hypersil C₁₈ BDS ha proporcionado menores anchuras y colas de pico cromatográfico para la mayoría de los herbicidas, lo que ha permitido obtener asimetrías de pico más cercanas a la unidad.

La resolución de los primeros compuestos eluidos ha sido mayor en la columna Hypersil, especialmente para el éster metílico del 2,4-D y el 2,4-DP y con la columna monolítica, aunque la separación se ha realizado a un caudal inferior, se ha reducido el tiempo de análisis en 10 minutos aproximadamente. La elevada porosidad de la columna monolítica permite una gran permeabilidad y debido a la acelerada adsorción y desorción de los analitos, que mejora las propiedades de transferencia de masa del esqueleto del monolito por el mecanismo de convección, es posible una elevada velocidad de separación y por tanto, una reducción significativa del tiempo de análisis. Sin embargo, la principal desventaja de la columna monolítica Chromolith™ RP-18 es la elevada asimetría de pico, que influye en la resolución y probablemente en la cuantificación de los herbicidas de interés, por lo que su separación cromatográfica resulta más adecuada en la columna capilar Hypersil C₁₈ BDS.

1.2.2.4. Optimización de las condiciones de inyección

En cromatografía líquida capilar, el volumen de inyección y el modo en el cual se transfiere a la columna afecta de manera considerable a la separación, de forma que con columnas de diámetro interno reducido la etapa de inyección resulta especialmente crítica. Por otra parte, con este tipo de columnas, suele ser habitual la introducción de grandes volúmenes de muestra para conseguir elevada sensibilidad, junto con la utilización de técnicas de focalización o preconcentración en cabeza de columna para evitar pérdida de resolución.

Tal y como se ha puesto de manifiesto anteriormente, los mejores resultados para la separación cromatográfica de mezclas de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante cLC, se han obtenido en la columna Hypersil C₁₈ BDS con gradiente de elución a temperatura constante de 25°C. De este modo, el estudio de las condiciones de inyección se ha realizado según el procedimiento descrito en la sección experimental (apartado 2.1.2.3), con disoluciones de los analitos de menor poder de elución que el de la fase móvil utilizada en la separación.

Para establecer las condiciones adecuadas, además del volumen del bucle de inyección, se ha evaluado el efecto de la composición de la disolución de focalización sobre diversos parámetros cromatográficos como el tiempo de retención, área y anchura de pico.

□ ESTUDIOS PREVIOS

La influencia del volumen de inyección en la sensibilidad de la detección se ha evaluado teniendo en cuenta las áreas de pico obtenidas con diferentes bucles de inyección y diferentes concentraciones de los herbicidas objeto de estudio. Así, se han utilizado bucles de inyección con volúmenes comprendidos entre 100 nL y 20.0 μL .

En el estudio con el bucle de 100 nL se han utilizado concentraciones del orden de los mg L^{-1} , mientras que con los de volumen mayor se han podido detectar mezclas de fenoxiácidos en concentraciones del orden de los $\mu\text{g L}^{-1}$. Por lo que respecta a la naturaleza de la disolución de inyección, con bucles de 100 nL ó 2.0 μL se han podido utilizar disolventes orgánicos puros como acetonitrilo o metanol, si bien en el caso de volúmenes de inyección mayores, ha resultado necesaria la utilización de disoluciones de contenido acuoso elevado para favorecer la concentración en cabeza de columna. Con los bucles de volumen 10.0 y 20.0 μL y disoluciones de inyección con un contenido orgánico de 50% de MeOH, no ha sido posible la separación de los herbicidas 2,4 D, MCPA, éster metílico del 2,4 D, 2,4 DP, MCPP, 2,4 DB, MCPB y 2,4,5 TP.

En la tabla 34 se incluyen las áreas de pico y los tiempos de retención obtenidos con diferentes volúmenes del bucle de inyección.

Tabla 34
Influencia del volumen de inyección sobre diversos parámetros cromatográficos

| HERBICIDA | VOLUMEN DEL BUCLE DE INYECCIÓN | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|-----------------------------|----------------|
| | 100 nL | | 2.0 μL | | 5.0 μL | | 10.0 μL | | 20.0 μL | |
| | Área ^a (u.a.) | t_r (min) | Área ^b (u.a.) | t_r (min) |
| 2,4 D | 79 | 18.4 | 101 | 26.1 | 112 | 23.5 | 379 | 24.6 | 329 | 24.5 |
| MCPA | 88 | 21.9 | 80 | 31.4 | 159 | 27.9 | 388 | 29.0 | 355 | 29.2 |
| éster metílico 2,4 D | 65 | 29.7 | 189 | 38.5 | 234 | 36.4 | 460 | 37.6 | 485 | 38.1 |
| 2,4 DP | 70 | 34.4 | 123 | 40.6 | 140 | 39.2 | 449 | 40.3 | 427 | 40.7 |
| MCPP | 90 | 35.8 | 160 | 41.6 | 214 | 40.3 | 545 | 41.5 | 501 | 41.8 |
| 2,4 DB | 78 | 39.7 | 145 | 44.4 | 164 | 43.4 | 440 | 44.7 | 457 | 45.0 |
| MCPB | 102 | 40.2 | 225 | 44.9 | 292 | 44.1 | 647 | 45.2 | 630 | 45.5 |
| 2,4,5 TP | 87 | 41.6 | 198 | 46.1 | 382 | 45.4 | 602 | 46.5 | 659 | 46.7 |
| éster butílico 2,4 D | 41 | 46.5 | 80 | 51.9 | 150 | 51.1 | 265 | 52.0 | 266 | 52.3 |

^a disolución de inyección 100% metanol. Concentración de herbicidas 10.0 mg L^{-1} .

^b Disolución de inyección; 10% metanol-90% agua. Concentración de herbicidas: 120 $\mu\text{g L}^{-1}$, excepto para el éster butílico del 2,4 D (300 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Como se puede observar en función de las áreas de pico cromatográfico obtenidas, la sensibilidad se incrementa con el aumento del volumen de inyección siempre y cuando se utilicen disoluciones de contenido acuoso elevado, aunque también se produce un aumento en el tiempo de retención de todos los herbicidas que hace que los cromatogramas se alarguen del orden de seis minutos.

□ **INFLUENCIA DEL VOLUMEN DE INYECCIÓN Y DE LA NATURALEZA DE LA DISOLUCIÓN DE FOCALIZACIÓN**

Mediante los ensayos previos realizados para la separación de los analitos de interés, se ha podido comprobar que el volumen de inyección y la naturaleza de la disolución utilizada para inyectar la muestra en el sistema cromatográfico, afectan tanto a la sensibilidad como a la eficacia del proceso de separación.

Como se ha descrito en la revisión bibliográfica, los fenoxiácidos estudiados poseen propiedades ácido-base y sus valores de pK_a se encuentran comprendidos entre 2.7 y 4.8, lo que permite pensar que su retención en cabeza de columna es función del pH de la disolución de inyección. Por ello, se ha evaluado el efecto sobre diversos parámetros cromatográficos de la presencia o ausencia de medio ácido (ácido fosfórico al 0.8%) en la disolución de inyección.

Utilizando bucles de volumen entre 5.0 y 20.0 μL , se ha observado una especial influencia del medio ácido en las áreas de pico cromatográfico, aunque que su efecto depende también de la proporción de disolución acuosa/modificador orgánico utilizada en la inyección.

En la tabla 35, se incluyen a modo de ejemplo los valores de área de pico y de otros parámetros cromatográficos obtenidos con un bucle de 20.0 μL y una disolución acuosa de inyección con un 10% de metanol. En ella se puede apreciar que el área de pico aumenta para algunos de los analitos estudiados y disminuye para otros, como es el caso del 2,4 DP, 2,4-DB, MCPB y éster butílico del 2,4 D, en presencia de ácido fosfórico al 0.8%. Por lo que se refiere a la eficacia del proceso cromatográfico, los tiempos de retención al igual que las anchuras de pico han sido muy similares para todos ellos con y sin medio ácido en la disolución de inyección.

Tabla 35
Influencia del pH de la disolución de focalización sobre diferentes parámetros cromatográficos con un bucle de inyección de 20.0 μL

| <i>HERBICIDA</i> | <i>DISOLUCIÓN DE INYECCIÓN</i> | | | | | |
|-----------------------------|--------------------------------|----------------|--------------------|---|----------------|--------------------|
| | 90% agua 10% metanol | | | 90% disolución acuosa de ácido fosfórico al 0.8%-10% metanol | | |
| | Área ^a (u.a.) | t_r (min) | $w_{1/2}$ (min) | Área ^a (u.a.) | t_r (min) | $w_{1/2}$ (min) |
| <i>2,4 D</i> | 68 | 23.3 | 1.0 | 118 | 23.4 | 1.0 |
| <i>MCPA</i> | 85 | 27.6 | 1.2 | 174 | 27.6 | 1.1 |
| <i>éster metílico 2,4 D</i> | 154 | 36.6 | 0.90 | 190 | 36.6 | 0.90 |
| <i>2,4 DP</i> | 89 | 39.7 | 0.54 | 76 | 39.7 | 0.53 |
| <i>MCPP</i> | 88 | 40.9 | 0.44 | 127 | 40.9 | 0.47 |
| <i>2,4 DB</i> | 125 | 44.0 | 0.32 | 108 | 44.4 | 0.35 |
| <i>MCPB</i> | 149 | 44.4 | 0.32 | 97 | 44.9 | 0.35 |
| <i>2,4,5 TP</i> | 112 | 46.1 | 0.31 | 187 | 46.1 | 0.31 |
| <i>éster butílico 2,4 D</i> | 257 | 51.6 | 0.41 | 242 | 51.6 | 0.41 |

^a Concentración de herbicidas: 28.0 $\mu\text{g L}^{-1}$, excepto éster butílico de 2,4 D; 300 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Puesto que la influencia de unas variables sobre otras es compleja, se ha realizado un diseño factorial para evaluar cómo afecta al tiempo de retención, área y anchura de pico cromatográfico, el volumen del bucle de inyección, la proporción de modificador orgánico y el medio ácido en la disolución de focalización.

En este diseño se han incluido bucles de volumen 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 μL y se han utilizado como disoluciones de inyección, mezclas de metanol-agua en diferente proporción. En la mitad de los experimentos realizados se ha ajustado el pH de la disolución acuosa con ácido fosfórico al 0.8%, mientras que en la otra mitad no se ha realizado ajuste de pH.

En la tabla 36, se indican las condiciones de los 32 experimentos llevados a cabo. Cada uno de ellos se ha repetido tres veces y en todos los casos, la concentración de herbicida en las disoluciones inyectadas ha sido de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.

La separación cromatográfica de las mezclas de los herbicidas de interés se ha llevado a cabo según las condiciones descritas en el procedimiento 2.1.2.3.

Tabla 36
Condiciones experimentales del diseño factorial realizado para evaluar la influencia de las distintas variables de inyección

| Nº de experimento | V de inyección (µL) | Contenido acuoso (%) | Ácido fosfórico al 0.8% |
|-------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| 1 | 20.0 | 95 | sí |
| 2 | | | no |
| 3 | | 90 | sí |
| 4 | | | no |
| 5 | | 80 | sí |
| 6 | | | no |
| 7 | | 70 | sí |
| 8 | | | no |
| 9 | 10.0 | 95 | sí |
| 10 | | | no |
| 11 | | 90 | sí |
| 12 | | | no |
| 13 | | 80 | sí |
| 14 | | | no |
| 15 | | 70 | sí |
| 16 | | | no |
| 17 | 5.0 | 95 | sí |
| 18 | | | no |
| 19 | | 90 | sí |
| 20 | | | no |
| 21 | | 80 | sí |
| 22 | | | no |
| 23 | | 70 | sí |
| 24 | | | no |
| 25 | 2.0 | 95 | sí |
| 26 | | | no |
| 27 | | 90 | sí |
| 28 | | | no |
| 29 | | 80 | sí |
| 30 | | | no |
| 31 | | 70 | sí |
| 32 | | | no |

En todos los ensayos realizados, se han obtenido los valores de tiempo de retención, área y anchura de pico cromatográfico en función del volumen inyectado y de la composición de la disolución de inyección. A modo de ejemplo, se han incluido en la tabla 37, los valores de estos parámetros para algunos de los herbicidas estudiados, en las condiciones de los experimentos 9 a 16 ambos inclusive.

Tabla 37
Influencia de la composición de la disolución de inyección sobre diversos
parámetros cromatográficos con un bucle de 10 μ L

| N° experimento | 2,4 D | | | MCPA | | | éster metílico 2,4 D | | | 2,4,5 TP | | |
|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------------|--|
| | Area ^a , u.a. | t _r ^a , min | w _{1/2} ^a , min | Área ^a , u.a. | t _r ^a , min | w _{1/2} ^a , min | Area ^a , u.a. | t _r ^a , min | w _{1/2} ^a , min | Área ^a , u.a. | t _r ^a , min | w _{1/2} ^a , min |
| 9 | 228 | 22.6 | 0.90 | 240 | 26.9 | 1.0 | 263 | 36.0 | 0.88 | 780 | 45.5 | 0.37 |
| 10 | 186 | 22.7 | 0.89 | 200 | 27.1 | 1.0 | 180 | 36.6 | 0.86 | 780 | 45.3 | 0.39 |
| 11 | 244 | 23.8 | 1.4 | 198 | 28.1 | 1.4 | 203 | 36.7 | 0.96 | 322 | 45.5 | 0.36 |
| 12 | 170 | 24.5 | 1.0 | 178 | 29.7 | 1.2 | 240 | 38.0 | 0.72 | 276 | 45.2 | 0.42 |
| 13 | 196 | 24.8 | 1.0 | 151 | 29.9 | 1.1 | 201 | 38.0 | 0.66 | 304 | 46.0 | 0.38 |
| 14 | 209 | 24.0 | 0.98 | 207 | 28.6 | 0.98 | 245 | 37.2 | 0.69 | 288 | 46.0 | 0.37 |
| 15 | 200 | 23.9 | 1.1 | 220 | 28.7 | 1.7 | 217 | 37.4 | 0.76 | 278 | 45.9 | 0.39 |
| 16 | 212 | 24.5 | 1.0 | 214 | 29.3 | 1.1 | 241 | 37.6 | 0.89 | 310 | 46.1 | 0.37 |

^a valor medio de tres determinaciones

Tal y como se puede observar en la tabla 37, la naturaleza de la disolución de inyección afecta tanto al tiempo de retención como a la anchura de pico cromatográfico, aunque la variación es más significativa en lo que se refiere a los valores de área.

El efecto del volumen de inyección y de la naturaleza de la disolución de focalización en la sensibilidad de la detección, se ha estudiado a través de superficies de respuesta con las áreas de pico cromatográfico obtenidas en las condiciones de los 32 experimentos realizados. Las superficies correspondientes a los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4,5-TP, éster metílico y butílico de 2,4-D sin ajuste de pH de la disolución acuosa de inyección y en presencia de ácido fosfórico al 0.8%, se muestran en las figuras 28-32.

Las superficies planas indican independencia o falta de interacción entre el contenido de agua de la disolución focalizadora y el volumen de inyección. Por el contrario, cuanto mayor es la deformación de la superficie, mayor es la interacción entre las variables evaluadas.

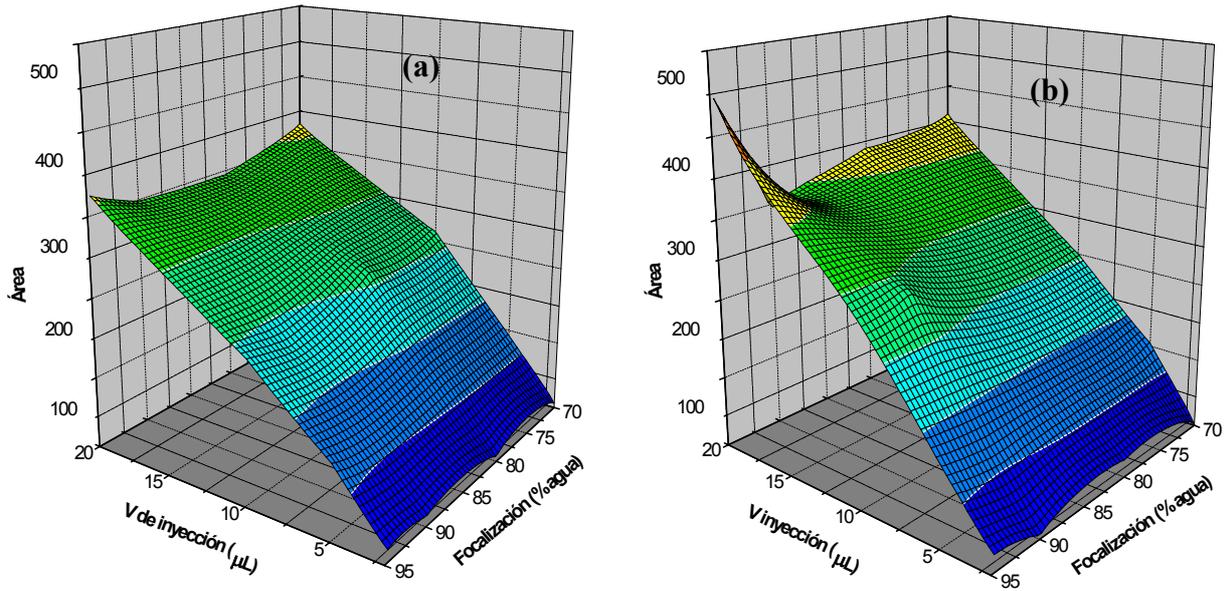


Figura 28. Superficies de respuesta obtenidas con los valores de área de pico del herbicida 2,4 D, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

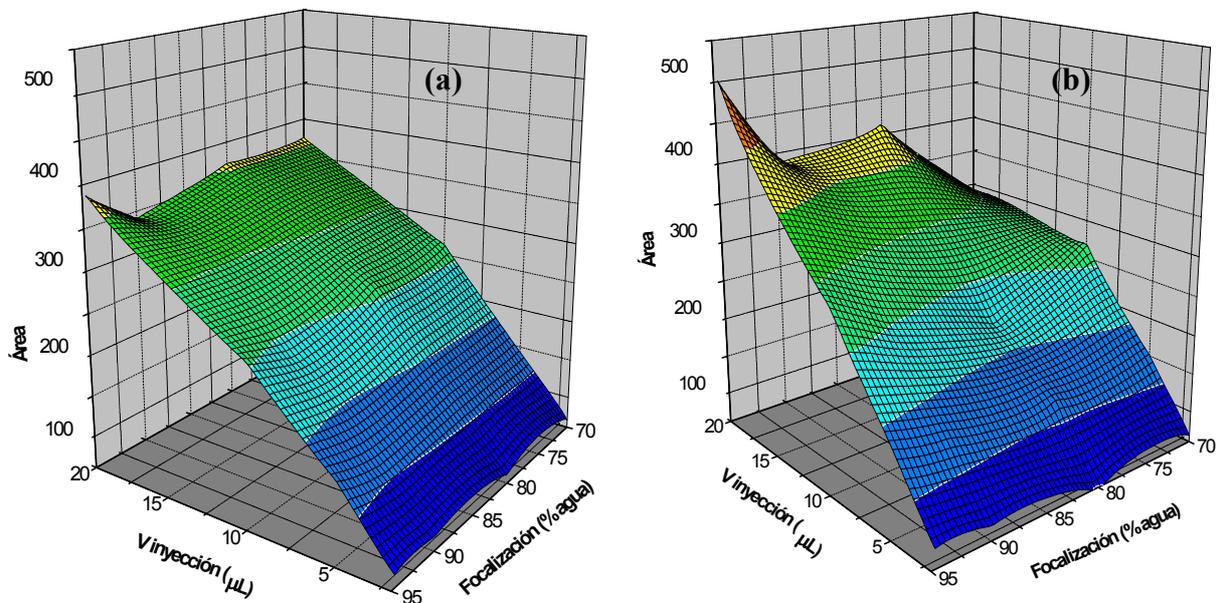


Figura 29. Superficies de respuesta obtenidas con los valores de área de pico del herbicida MCPA, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

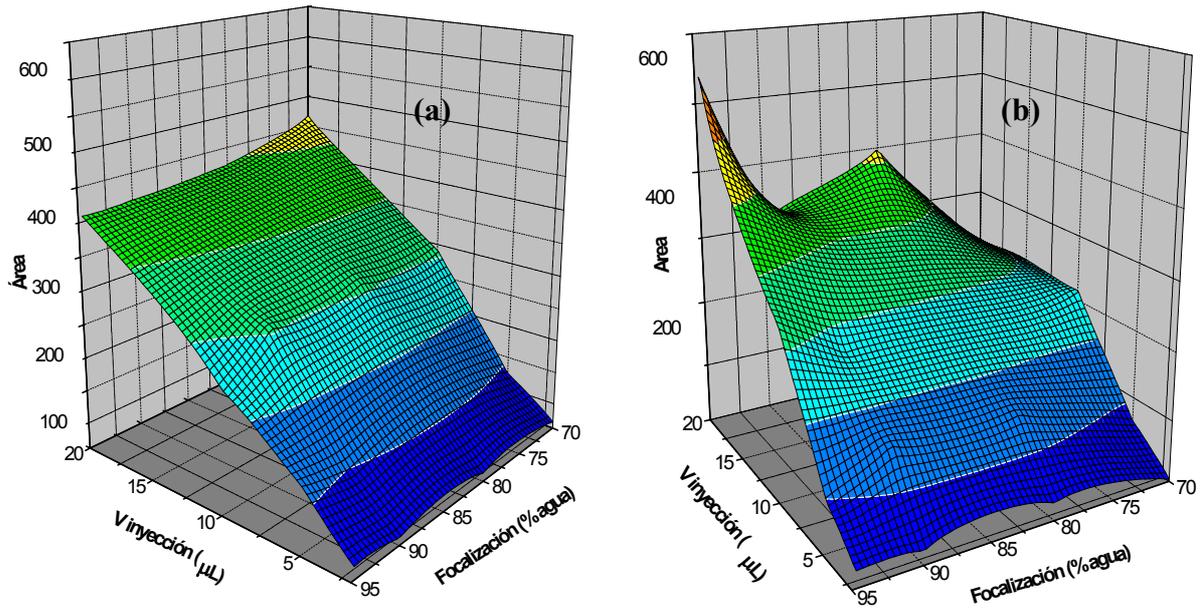


Figura 30. Superficies de respuesta obtenidas con los valores de área de pico del éster metílico de 2,4-D, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

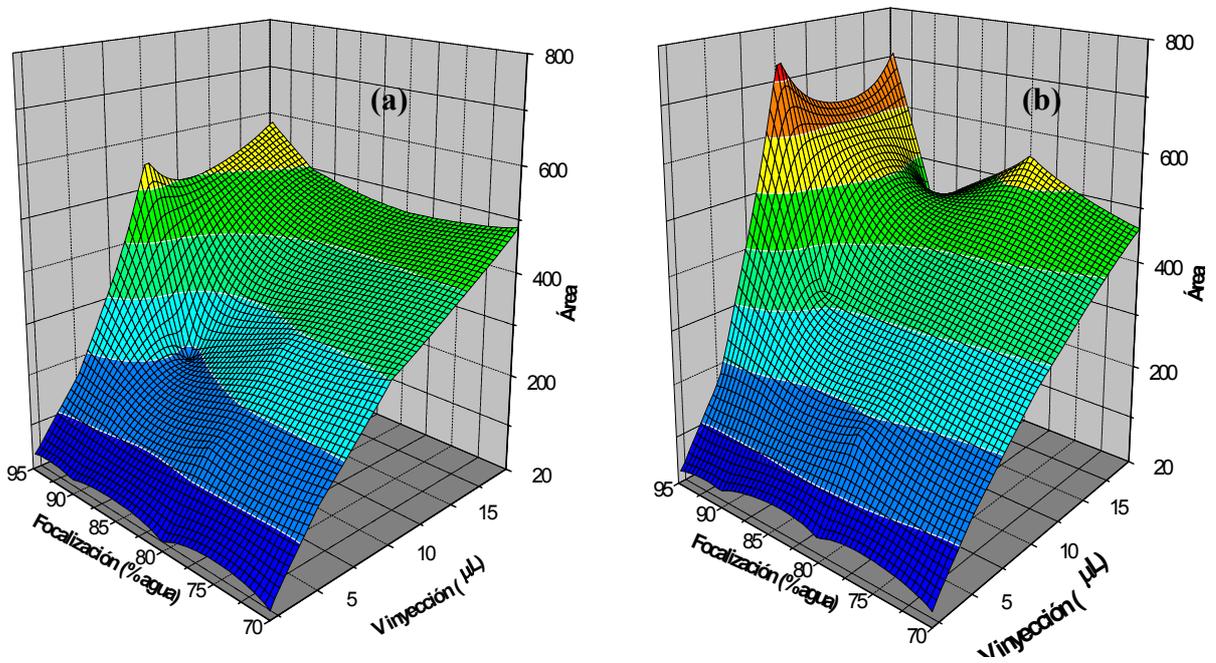


Figura 31. Superficies de respuesta obtenidas con los valores de área de pico del herbicida 2,4,5-TP, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

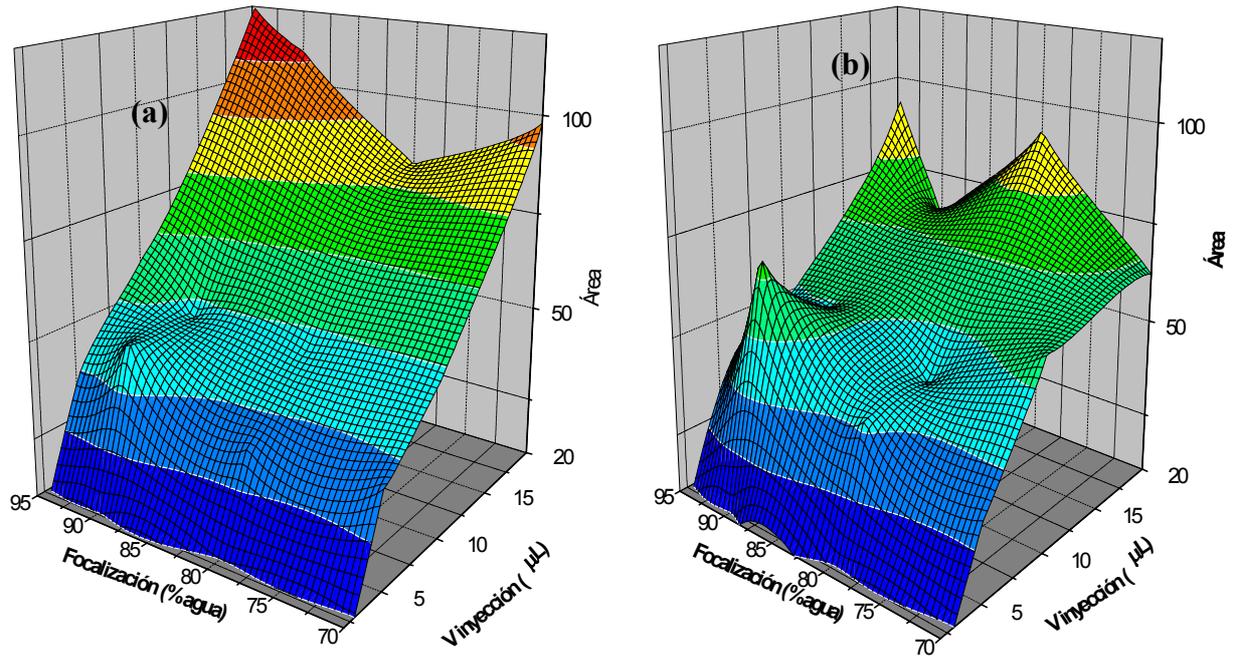


Figura 32. Superficies de respuesta obtenidas con los valores de área de pico del éster butílico de 2,4-D, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

Del análisis y observación de las superficies de respuesta se puede apreciar fácilmente que, en general, la presencia de ácido de fosfórico al 0.8% en la disolución de focalización, tiene un efecto muy acusado sobre la otra variable (volumen inyectado), dando lugar a superficies mucho más deformes.

En el caso de la focalización en agua pura y para los herbicidas 2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D se ha observado una débil interacción entre las dos variables representadas, de forma que con una proporción acuosa del 95% la respuesta es casi lineal. Con ajuste de pH, las menores efectos se han producido para todos ellos con un 95% de la disolución ácida de focalización.

La relación entre el volumen inyectado y la proporción de agua pura en la disolución focalizadora ha sido más pronunciada para el herbicida 2,4,5-TP, tal y como se puede observar en la figura 31.a. Con un contenido acuoso del 70% se aprecia una relación lineal de segundo orden que produce una ligera curvatura en la representación. Las interacciones en medio ácido son todavía más pronunciadas (figura 31.b), aunque en este caso, los menores efectos se producen con el mayor contenido de metanol en la disolución de inyección.

Para el éster butílico del 2,4 D (figura 32.a), y en el caso de la focalización en agua pura, las interacciones no son tan pronunciadas como para el herbicida 2,4,5 TP, aunque del mismo modo son menos acusadas con una proporción acuosa del 70%. Las interacciones que se ponen de manifiesto entre las variables son considerablemente mayores cuando se utiliza medio ácido en la disolución de focalización, como se puede apreciar en la figura 32.b. En este caso, al igual que en agua pura, los menores efectos se producen con un 70% de disolución acuosa con 0.8% de ácido fosfórico.

En general, las superficies representadas en las figuras 28-32, han mostrado relaciones lineales entre el volumen de inyección y la composición de la disolución de focalización (metanol-agua o metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico) para los compuestos menos retenidos como el 2,4-D. En el caso de los herbicidas más retenidos en columna, las interacciones entre las variables han sido más complejas, puesto que son los más afectados por la focalización.

Las superficies de respuesta constituyen un herramienta útil para optimizar el volumen y la composición de las disoluciones de inyección, y a través de ellas, se puede determinar la conveniencia o no de utilizar disoluciones ácidas de focalización. En algunas condiciones y para algunos herbicidas, el área de pico y por ello la sensibilidad, ha sido mayor en medio ácido que en agua pura. Sin embargo, para el éster butílico de 2,4-D, la mayor sensibilidad se ha obtenido en ausencia de ácido fosfórico al 0.8%, lo que condiciona que la inyección de mezclas de los nueve herbicidas estudiados se deba realizar en agua pura.

En todos los medios acuosos evaluados sin ajuste de pH, se ha observado elevada sensibilidad con el bucle de 20 μ L, que ha proporcionado las mayores áreas de pico cromatográfico para todos los herbicidas de interés. Con este volumen de inyección, tanto el 2,4-D como su éster metílico no han mostrado diferencias apreciables de sensibilidad con contenidos acuosos entre el 95 y 70% en la disolución de focalización. Los herbicidas MCPA y 2,4,5-TP han mostrado un ligero aumento de sensibilidad con una proporción acuosa del 95%, mientras que para el éster butílico de 2,4-D, las mayores área de pico se han obtenido con 95 y 90% de agua. En general, no se han observado diferencias considerables de sensibilidad para todos ellos con disoluciones acuosas de focalización y una proporción del 5 ó 10% de metanol.

Las condiciones de inyección no sólo afectan, como se ha puesto de manifiesto anteriormente, al área de pico y por ello a la sensibilidad de la detección, sino que también influyen en la eficacia del proceso cromatográfico.

Para evaluar la influencia del volumen de inyección y de la disolución de focalización en la retención, se ha representado en una superficie de respuesta experimental, la variación del factor de retención del herbicida 2,4-D en función de la proporción de metanol y del volumen del bucle de inyección. Como se puede observar en el cromatograma de la figura 26, el 2,4-D es el único de todos los analitos estudiados que se eluye de la columna cuando el gradiente de composición de fase móvil aún no ha comenzado, y por tanto, el primero en condiciones isocráticas.

Las superficies de respuesta obtenidas con los valores del factor de retención cuando se han inyectado disoluciones de focalización con y sin ácido fosfórico al 0.8%, se muestran en la figura 33.

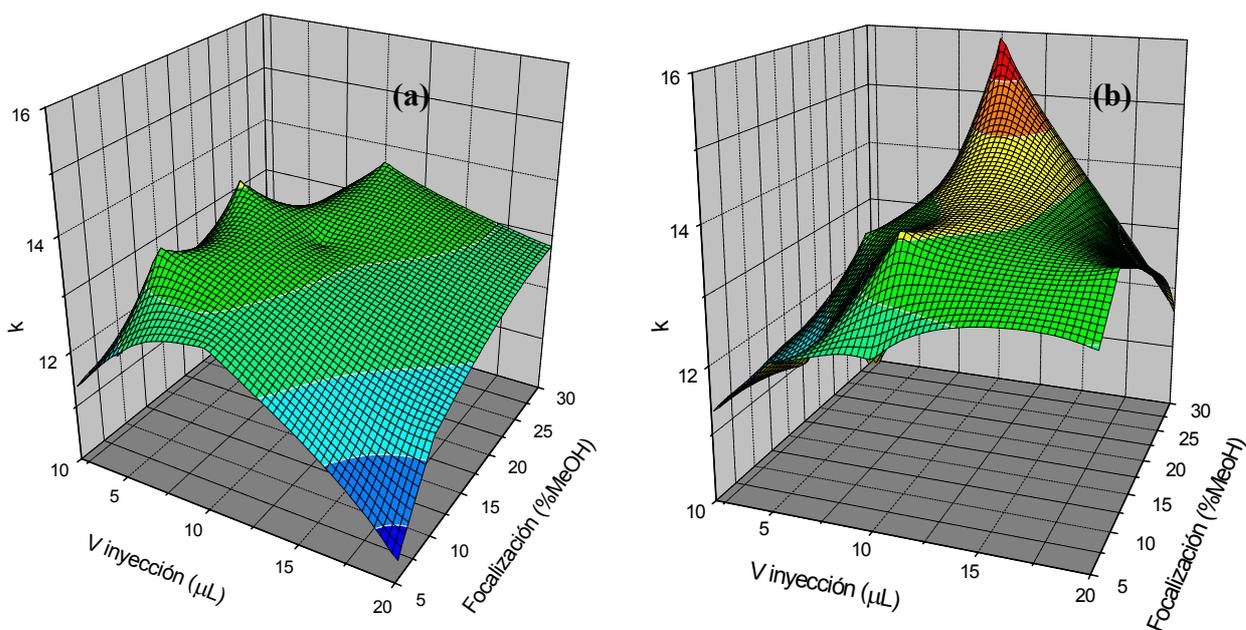


Figura 33. Superficies de respuesta obtenidas con los valores del factor de retención del herbicida 2,4 D, sin ajuste de pH en la disolución acuosa de inyección (a) y en presencia de ácido fosfórico al 0.8% (b).

En la figura 33.a se pueden observar elevados factores de retención en un amplio intervalo de volúmenes de inyección y de disoluciones de focalización. En cambio, en condiciones de disolución acuosa ácida, figura 33.b, las condiciones de retención elevada son muy críticas y se producen para un bucle de inyección de 10.0 µL y con proporciones elevadas de metanol.

Considerando que para obtener elevada sensibilidad la inyección se debe realizar en medio acuoso sin ajuste de pH con un bucle de 20.0 μL , en la figura 33.a se puede apreciar que con un volumen de inyección de 20.0 μL y un 5% de metanol en la disolución de focalización, el herbicida 2,4-D presenta menores valores de factor de retención. Sin embargo, con proporciones de modificador orgánico del 10, 20 ó 30% aumenta el factor de retención del 2,4-D y se obtienen elevados valores de área de pico cromatográfico (figura 28.a).

Cuando no se ajusta el pH de la disolución de inyección y se utiliza metanol para focalizar, hay que considerar que en proporciones elevadas, el metanol, al ser un medio disociante puede afectar el equilibrio ácido-base, por lo que es necesario llegar a un compromiso entre sensibilidad y eficacia cromatográfica, situación que como se ha podido comprobar a través del estudio realizado de las condiciones de inyección, se produce cuando se utiliza una mezcla de metanol-agua 10:90 (v/v) para focalizar los analitos de interés en la cabeza de la columna capilar.

2. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE HPLC EN FASE INVERSA CON DETECCIÓN UV. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

La determinación de mezclas de herbicidas fenoxiácido se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos convencional y cromatografía líquida capilar en las condiciones de separación seleccionadas en el apartado anterior.

La *sensibilidad* de los diferentes métodos de determinación se ha estimado a través de los límites de detección y cuantificación obtenidos con disoluciones estándar de los herbicidas cada vez más diluidas, hasta encontrar aquella concentración a la que el analito ha proporcionado una señal de tres y diez veces respectivamente la señal del ruido en las proximidades del pico.

La *cuantificación*, se ha llevado a cabo por integración del área correspondiente a cada pico cromatográfico y los gráficos del calibrado, mediante el procedimiento del patrón externo, se han obtenido por representación de los valores de área en función de la concentración y ajuste a una recta por el método de mínimos cuadrados, en los intervalos adecuados de concentración según los límites de cuantificación determinados.

La *reproducibilidad* del método analítico se ha estimado a través de la variación del tiempo de retención y/o área de pico cromatográfico para cada uno de los herbicidas de interés entre inyecciones consecutivas en el mismo día.

2.1. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CONVENCIONAL

Las características analíticas del método de separación se han evaluado de acuerdo al procedimiento de determinación descrito en la sección experimental (apartado 2.2.1).

La reproducibilidad se ha estimado a través del coeficiente de variación de las áreas de pico cromatográfico obtenidas a concentraciones comprendidas en el primer y último tercio del intervalo de calibración.

En la tabla 38 se incluyen entre otros datos los límites de detección y cuantificación determinados para cada uno de los herbicidas estudiados, el intervalo de linealidad y coeficiente de regresión de la rectas de ajuste.

Tabla 38
Características analíticas de la determinación de herbicidas fenoxiácido mediante HPLC convencional en la columna Atlantis dC₁₈

| <i>HERBICIDA</i> | LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Intervalo lineal ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Coeficiente de regresión (R) | Reproducibilidad | | |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|------------------------------------|-------------------------------|------------------------|-----|
| | | | | | C ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV ^b (%) | |
| <i>2,4-D</i> | 30.0 | 100 | 150-1200 | 0.9997 | 500 | 13 | |
| | | | | | 1000 | 1.4 | |
| <i>MCPA</i> | 30.0 | 100 | | 0.9999 | 500 | 8.5 | |
| | | | | | 1000 | 1.9 | |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 40.0 | 133 | | 0.9996 | 500 | 12 | |
| | | | | | 1000 | 13 | |
| <i>MCPP</i> | 40.0 | 133 | | 0.9993 | 500 | 10 | |
| | | | | | 1000 | 7.6 | |
| <i>2,4-DP</i> | 60.0 | 200 | | 250-1200 | 0.9990 | 500 | 6.0 |
| | | | | | | 1000 | 9.0 |
| <i>2,4-DB</i> | 70.0 | 233 | | | 0.9998 | 500 | 10 |
| | | | | | | 1000 | 2.2 |
| <i>MCPB</i> | 70.0 | 233 | 0.9989 | | 500 | 9.6 | |
| | | | | | 1000 | 3.0 | |
| <i>2,4,5-TP</i> | 75.0 | 250 | 0.9985 | | 500 | 7.0 | |
| | | | | | 1000 | 1.4 | |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 102 | 300 | 300-1200 | 0.9998 | 500 | 9.7 | |
| | | | | | 1000 | 3.0 | |

^an=5, ^bn=3

Como se puede apreciar en la tabla 38, la determinación mediante HPLC convencional ha proporcionado límites de detección en el intervalo de 30-102 $\mu\text{g L}^{-1}$. Todos los herbicidas han mostrado linealidad en el margen estudiado de concentración y en todos los casos, se han obtenido coeficientes de variación entre el 1.4 y 13%.

2.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

La determinación de los analitos objeto de estudio mediante cLC con temperatura programada y con gradiente de elución, se ha llevado a cabo según los procedimientos detallados en el apartado 2.2.2 de la sección experimental, con la columna capilar Hypersil C₁₈ BDS. Para evaluar las características analíticas del método y con objeto de obtener la mayor sensibilidad, se ha utilizado un bucle de 20.0 μL y una disolución acuosa de focalización, sin ajuste de pH, con un contenido de 10% de metanol, considerando los resultados obtenidos anteriormente en el estudio de las condiciones de inyección (apartado 1.2.2.4 de la sección de resultados).

2.2.1. DETERMINACIÓN DE 2,4-D, 2,4-DB Y ÉSTERES DE 2,4-D

La determinación de mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D se ha llevado a cabo con elución isocrática y temperatura programada. La sensibilidad, el intervalo lineal y la reproducibilidad del método de separación cromatográfica, se han evaluado atendiendo al procedimiento 2.2.2.1 descrito en la sección experimental.

Las características analíticas determinadas se muestran en la tabla 39. Como se puede observar, los calibrados han mostrado linealidad en el intervalo de 15 a 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ y en cuanto a la reproducibilidad de las áreas de pico cromatográfico, en ningún caso se han obtenido desviaciones mayores del 4.0%.

Tabla 39
Características analíticas de la determinación mediante cLC

| <i>HERBICIDA</i> | LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Intervalo lineal ^a ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | Coficiente regresión (R) | CV ^{a, b} (%) |
|-----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|-----------------------------|---------------------------|
| <i>2,4-D</i> | 1.8 | 6.0 | 15-70 | 0.994 | 2.4 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 1.6 | 5.3 | | 0.998 | 1.9 |
| <i>2,4-DB</i> | 1.9 | 6.3 | | 0.998 | 3.9 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 3.2 | 11 | | 0.997 | 4.0 |

^a n=5, ^b Concentración de herbicida 35 $\mu\text{g L}^{-1}$

Los límites de detección están comprendidos para todos los herbicidas en el intervalo de 1.6 a 3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y son menores que los obtenidos mediante HPLC convencional con gradiente de elución en la columna Atlantis dC₁₈ (tabla 38), lo que pone de manifiesto el importante incremento de sensibilidad que se puede llegar a conseguir al disminuir el diámetro interno de la columna y al utilizar grandes volúmenes de inyección junto con técnicas de focalización.

2.2.2. DETERMINACIÓN DE MEZCLAS DE FENOXIÁCIDOS

La determinación de 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP, se ha realizado en diferentes modos de separación, isocrático/temperatura programada y gradiente/isotermo, siguiendo respectivamente los procedimientos descritos en 2.2.2.1 y 2.2.2.2 de la sección experimental.

2.2.2.1. Determinación con temperatura programada

Las características analíticas del método con elución isocrática y programa de temperatura se han evaluado en función de los límites de detección y cuantificación, intervalo lineal y reproducibilidad, estimada como coeficiente de variación del área de pico cromatográfico a una concentración intermedia en el intervalo de calibración. Los valores determinados se muestran en la tabla 40.

Tabla 40
Características analíticas de la determinación mediante cLC con gradiente térmico

| <i>HERBICIDA</i> | LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Intervalo lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a | Coeficiente regresión (R) | Reproducibilidad | |
|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|------------------------------|----------------------------|---------------------|
| | | | | | C ($\mu\text{g L}^{-1}$) | CV (%) ^b |
| <i>2,4-D</i> | 3.0 | 11 | 10-50 | 0.998 | 35 | 9.4 |
| <i>MCPA</i> | 3.0 | 10 | | 0.998 | | 3.1 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 3.0 | 9.0 | | 0.991 | | 5.3 |
| <i>2,4-DP</i> | 3.0 | 9.0 | | 0.997 | | 5.8 |
| <i>MCPP</i> | 3.0 | 9.0 | | 0.996 | | 4.5 |
| <i>2,4-DB</i> | 3.0 | 10 | | 0.996 | | 5.1 |
| <i>MCPB</i> | 3.0 | 10 | | 0.995 | | 4.6 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 2.0 | 7.0 | | 0.994 | | 6.2 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 10 | 32 | 30-70 | 0.995 | 55 | 7.4 |

^a n=5, ^b n=3

Como se puede apreciar en la tabla anterior, los límites de detección están comprendidos en el intervalo de 2.0-10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ para todos los herbicidas. Los calibrados han mostrado buena linealidad ($R>0.991$) en el margen de concentraciones estudiadas. La desviación en los valores obtenidos de área de pico cromatográfico ha oscilado para todos ellos entre el 3.1 y 9.4%.

2.2.2.2. Determinación con gradiente de elución

La determinación de los herbicidas objeto estudio se ha realizado con gradiente de composición de fase móvil a temperatura constante de 25°C y considerando los mismos parámetros que en el apartado anterior, se han evaluado las características analíticas del método de separación y determinación. En la tabla 41, se incluyen los resultados obtenidos.

Tabla 41
Características analíticas de la determinación mediante cLC con gradiente de elución a temperatura constante de 25°C

| <i>HERBICIDA</i> | LD ($\mu\text{g L}^{-1}$) | LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Intervalo lineal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ^a | Coeficiente regresión (R) | Reproducibilidad | |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|---------------------------------|--|------------------------|
| | | | | | C ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | CV (%) ^b |
| <i>2,4-D</i> | 2.0 | 5.0 | 5.0-50 | 0.996 | 12 35 | 7.1 3.1 |
| <i>MCPA</i> | 2.0 | 6.0 | 7.0-50 | 0.994 | 15 35 | 1.5 1.7 |
| <i>Éster metílico</i> <i>2,4-D</i> | 5.0 | 18 | 20-50 | 0.998 | 23 45 | 3.4 4.1 |
| <i>2,4-DP</i> | 6.0 | 20 | 20-50 | 0.994 | 23 45 | 2.2 1.0 |
| <i>MCP P</i> | 6.0 | 19 | 20-50 | 0.992 | 23 45 | 2.1 2.7 |
| <i>2,4-DB</i> | 2.0 | 7.0 | 7.0-50 | 0.997 | 15 35 | 3.5 0.45 |
| <i>MCPB</i> | 2.0 | 6.0 | 6.0-50 | 0.998 | 15 35 | 2.4 1.1 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 1.0 | 3.0 | 4.0-50 | 0.999 | 8 35 | 3.0 2.5 |
| <i>Éster butílico</i> <i>2,4-D</i> | 11 | 38 | 40-600 | 0.998 | 130 500 | 7.3 0.43 |

^a n=5, ^b n=3

Todos los calibrados han mostrado un comportamiento lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, con valores del coeficiente de regresión de las rectas de ajuste entre 0.992 y 0.999.

Los coeficientes de variación correspondientes al área de pico cromatográfico han oscilado entre 2.1 y 7.3% para la menor concentración estudiada y entre 0.43 y 4.1% para la mayor concentración. En lo que se refiere a los límites de detección, los valores determinados han estado comprendidos en el intervalo de 1.0 a 11 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Si se comparan las características analíticas de la determinación con temperatura programada (tabla 40) y con gradiente de elución (tabla 41), no se aprecian diferencias en cuanto a la sensibilidad de la detección, pero en lo que se refiere a la reproducibilidad de las áreas de pico cromatográfico, la separación con gradiente de composición de fase móvil ha proporcionado menores valores de coeficiente de variación. Además, tal y como se ha puesto de manifiesto en el apartado 1.2.2.2 de la sección de resultados, el gradiente de elución ha reducido en 15 min el tiempo de separación, lo que constituye una de sus principales ventajas respecto al modo isocrático/temperatura programada.

De este modo, llegando a un compromiso entre resolución, tiempo de análisis y sensibilidad, la determinación de mezclas de los nueve herbicidas estudiados mediante cLC resulta más adecuada con gradiente de composición de fase móvil. Comparada con el método, también con gradiente de elución, utilizado en la columna convencional Atlantis dC₁₈ (tabla 38), la sensibilidad ha aumentado de forma considerable y además de la mayor reproducibilidad, la determinación mediante cLC presenta otras ventajas adicionales como el pequeño caudal de fase móvil, 8.0 $\mu\text{L min}^{-1}$ en comparación con el caudal de 1.0 mL min^{-1} de la separación en la columna convencional.

3. EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO

Como se ha puesto de manifiesto en la revisión bibliográfica y en el apartado anterior de resultados en función de los límites de detección, los métodos cromatográficos no alcanzan por sí solos la sensibilidad necesaria para determinar estos analitos a los bajos niveles permitidos por ley en una amplia variedad de matrices. Por ello, y como paso previo a la separación y determinación cromatográfica resulta necesaria una etapa de preconcentración, que normalmente se realiza mediante técnicas de extracción en fase sólida al permitir simultáneamente la extracción, el enriquecimiento y en muchas ocasiones, la limpieza de la matriz de la muestra.

Los procedimientos de SPE se pueden llevar a cabo en discontinuo o en línea con el proceso cromatográfico. La correcta elección del adsorbente utilizado para la retención de los analitos de interés resulta de especial importancia, y es que el tipo de adsorbente, en base sílice o en base polimérica, condiciona el pH de retención. Los adsorbentes poliméricos son estables en un intervalo de pH mayor, si bien en algunos casos y con algunas fases poliméricas surge la necesidad de hinchado antes de su utilización. De esta forma, los distintos adsorbentes se deben evaluar teniendo en cuenta diversos parámetros y los compuestos a determinar, y una vez seleccionados los más adecuados, dependiendo de la matriz de la muestra que se pretende analizar.

3.1. EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ADSORBENTES EN BASE GEL DE SÍLICE Y BASE POLIMÉRICA EN DISCONTINUO

La capacidad de retención de diferentes adsorbentes para la SPE de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres, se ha evaluado en discontinuo con disoluciones estándar según el procedimiento 3.1 de la sección experimental. En este estudio se han incluido adsorbentes en base sílice como el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, adsorbentes poliméricos de intercambio de cationes como el copolímero de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona OASIS[®] MCX funcionalizado con grupos ácido sulfónico y adsorbentes poliméricos de intercambio de aniones, de PS-DVB como el adsorbente Lida Sep-IC-OH y de HEMA como el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, ambos con grupos funcionales amonio cuaternario. Estos adsorbentes presentan mecanismos mixtos de retención basados en partición, intercambio iónico y exclusión por tamaño.

Debido al carácter ionizable de los herbicidas fenoxiácido, cuyos valores de pK_a oscilan entre 2.7 y 4.8 (17), uno de los principales parámetros a considerar en el proceso de retención es el pH de la disolución. Por otra parte, la fuerte retención de los analitos en el adsorbente es sólo uno de los procesos deseados durante la etapa de extracción y preconcentración, puesto que además, es recomendable que las sustancias adsorbidas se recuperen fácilmente durante la etapa de elución. Con objeto de establecer las condiciones óptimas de SPE en cada uno de los adsorbentes evaluados, se ha realizado un estudio de recuperación en términos del pH de retención, de la naturaleza del eluyente y del volumen de elución.

Adicionalmente, se han determinado los volúmenes de ruptura de los herbicidas en cada uno de los adsorbentes, que además de ser indicativos de la capacidad de retención, proporcionan el volumen de disolución que se puede introducir a través del adsorbente sin pérdida de recuperación. Sus valores, se han estimado gráficamente a través de curvas que muestran la disminución en la recuperación de una cantidad fija de analito con volúmenes crecientes de disolución.

Puesto que los adsorbentes utilizados en los procedimientos de SPE deben proporcionar alta selectividad y elevados factores de preconcentración, las condiciones óptimas de extracción se han seleccionado a través del compromiso entre la elevada recuperación y el pequeño volumen de elución. La determinación de los analitos de interés se ha realizado mediante cLC, que tal y como se ha puesto de manifiesto en el apartado 2.2.2.2 de resultados, ha proporcionado mayor sensibilidad y reproducibilidad que la cromatografía de líquidos convencional. En cLC, es fundamental tener en cuenta el volumen y la composición de la disolución de inyección, que debe ser compatible con las condiciones de elución del proceso de preconcentración.

3.1.1. ENSAYOS PREVIOS

El material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS y el adsorbente MFE[®] Polímero SAX se encuentran empaquetados en columnas, por lo que resulta necesario determinar el volumen de eluyente a desechar antes de la desorción de los analitos retenidos. Estos volúmenes de desecho, corresponden al volumen básico de la columna y al volumen de los tubos de conexión del sistema utilizado en la preconcentración.

Una vez acondicionadas ambas columnas, se han preconcentrado 10.0 mL de una disolución acuosa de 2,4-D de concentración 2.0 mg L⁻¹, y la elución con metanol-0.8% de ácido fosfórico a un caudal de 1.0 mL min⁻¹, se ha monitorizado en continuo a una longitud de onda de 232 nm con el espectrofotómetro UV/VIS de matriz de diodos. Este procedimiento se ha repetido varias veces y el volumen de desecho se ha estimado a través del volumen recogido desde que comienza la elución hasta que se detecta el máximo de absorción.

Para la columna LiChrospher[®] RP-18-ADS se ha determinado un volumen de desecho de 4.2 mL aproximadamente, mientras que para la columna MFE[®] Polímero SAX el volumen determinado ha sido de 3.0 mL.

3.1.2. INFLUENCIA DEL pH EN EL PROCESO DE RETENCIÓN

La influencia del pH en la retención de los herbicidas fenoxiácido en los adsorbentes evaluados, se ha estudiado a través del porcentaje de recuperación obtenido a los diferentes valores de pH de las disoluciones acuosas preconcentradas. Para cada herbicida y pH, se han realizado tres determinaciones y se ha calculado el límite de confianza con el valor de t de Student a un 95% de probabilidad.

Basándonos en las condiciones descritas por Geerdink y col., cuando la retención se ha llevado a cabo a pH 3.0, el pH de la disolución preconcentrada se ha ajustado con pH-metro utilizando una disolución de HClO₄ de concentración 0.1 M (152, 292).

3.1.2.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher[®] RP-18-ADS

Este material, en base alquil-diol-sílice, es un adsorbente de fase inversa muy utilizado para la extracción directa y el enriquecimiento de analitos hidrofóbicos y de bajo peso molecular de muestras de origen biológico no tratadas. La extracción y el fraccionamiento se basan en dos procesos de separación: fase inversa/cromatografía de par iónico y cromatografía de tamaño de exclusión. Debido a su tamaño de poro (60 Å), aquellas macromoléculas con un peso molecular superior a 15000 Daltons no son capaces de penetrar y se eluyen con el volumen básico de la columna, por lo que constituye un material de acceso restringido.

De acuerdo al intervalo de estabilidad descrito por el suministrador (pH 2.0-7.5), la influencia del pH en la retención se ha evaluado entre pH 3.0 y 7.0. El estudio de recuperación se ha realizado según el procedimiento experimental 3.1.2, utilizando la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v) como eluyente.

Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la tabla 42. En ella se puede apreciar que cuando la retención se lleva a cabo a pH 5.0 se producen pérdidas importantes en la recuperación de los herbicidas 2,4-D, MCPA y 2,4-DP, si bien el porcentaje recuperado de 2,4-DB es mayor que a un valor de pH 3.0. A pH 7.0, no se produce retención de 2,4-D y MCPA, las recuperaciones de 2,4-DP y MCPP son inferiores al 20% y para el resto de herbicidas, las recuperaciones disminuyen considerablemente respecto a las obtenidas a pH 3.0 y 5.0. A un valor de pH 4.0, las recuperaciones son aceptables para todos ellos y similares a las obtenidas a pH 3.0, con la diferencia de que se consigue una mayor recuperación del herbicida 2,4-DB.

Tabla 42
Variación de la recuperación con el pH de retención en el adsorbente
LiChrospher® RP-18-ADS

| <i>HERBICIDA</i> | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | pH 3.0 ^(a) | pH 4.0 ^(b) | pH 5.0 ^(c) | pH 7.0 ^(d) |
| <i>2,4-D</i> | 96 ± 2 | 97 ± 1 | 32 ± 3 | 0 |
| <i>MCPA</i> | 97 ± 4 | 96 ± 3 | 38 ± 6 | 0 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 104 ± 4 | 99 ± 1 | 91 ± 1 | 84 ± 3 |
| <i>2,4-DP</i> | 96 ± 4 | 97 ± 4 | 77 ± 6 | 17 ± 7 |
| <i>MCPA</i> | 97 ± 4 | 96 ± 4 | 92 ± 5 | 19 ± 8 |
| <i>2,4-DB</i> | 71 ± 2 | 100 ± 4 | 98 ± 4 | 47 ± 1 |
| <i>MCPB</i> | 97 ± 1 | 94 ± 2 | 98 ± 2 | 55 ± 1 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 92 ± 3 | 97 ± 1 | 100 ± 1 | 39 ± 2 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 98 ± 5 | 97 ± 2 | 95 ± 2 | 88 ± 2 |

n=3, el pH se ha ajustado con pH-metro utilizando disoluciones de: ^(a) HClO₄ 0.1M, ^(b) gotas de HAc cc, ^(c) tampón HAc/Ac⁻ 0.05 M, ^(d) tampón fosfato 0.05 M

De este modo, entre todas las condiciones evaluadas, se ha seleccionado pH 4.0 como valor óptimo de retención de los herbicidas de interés en el material de acceso restringido.

3.1.2.2. Adsorbentes en base polimérica

□ *MFE*[®] *Polímero SAX*

Para determinar el pH adecuado de retención y siguiendo el procedimiento 3.1.1 descrito en la sección experimental, se ha realizado un estudio de recuperación en el intervalo comprendido entre pH 0 y pH 11.0, utilizando una disolución de HCl 60 mM en metanol durante la etapa de elución.

Los resultados correspondientes a este adsorbente de intercambio de aniones, se muestran en tabla 43.

Tabla 43
Influencia del pH de retención en la recuperación de los herbicidas fenoxiácido del adsorbente MFE[®] Polímero SAX

| <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | | | | | | | |
|------------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| <i>HERBICIDA</i> | pH 0 ^(a) | pH 1.0 ^(a) | pH 2.0 ^(a) | pH 3.0 ^(b) | pH 5.0 ^(c) | pH 7.0 ^(d) | pH 9.0 ^(e) | pH 11.0 ^(e) |
| <i>2,4-D</i> | 91 ± 6 | 88 ± 4 | 92 ± 5 | 93 ± 4 | 95 ± 2 | 98 ± 3 | 111 ± 3 | 193 ± 6 |
| <i>2,4-DP</i> | 94 ± 3 | 92 ± 5 | 89 ± 2 | 95 ± 4 | 93 ± 5 | 87 ± 4 | 89 ± 3 | 98 ± 3 |
| <i>MCP</i> | 86 ± 4 | 88 ± 5 | 89 ± 3 | 93 ± 2 | 93 ± 8 | 88 ± 4 | 91 ± 5 | 98 ± 6 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 87 ± 4 | 91 ± 9 | 94 ± 4 | 92 ± 4 | 90 ± 7 | 94 ± 4 | 80 ± 8 | 0 |
| <i>2,4-DB</i> | 90 ± 4 | 88 ± 8 | 87 ± 2 | 89 ± 4 | 87 ± 5 | 73 ± 3 | 72 ± 4 | 76 ± 4 |
| <i>MCPB</i> | 97 ± 2 | 97 ± 3 | 91 ± 3 | 93 ± 1 | 89 ± 2 | 83 ± 8 | 85 ± 7 | 75 ± 2 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 89 ± 2 | 85 ± 3 | 85 ± 4 | 83 ± 5 | 90 ± 2 | 83 ± 3 | 84 ± 5 | 84 ± 5 |
| <i>MCPA</i> | 92 ± 3 | 91 ± 5 | 90 ± 2 | 94 ± 4 | 94 ± 1 | 89 ± 5 | 92 ± 1 | 91 ± 3 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 79 ± 2 | 78 ± 5 | 83 ± 3 | 84 ± 4 | 79 ± 3 | 80 ± 3 | 75 ± 1 | 0 |

n=3, el pH se ha ajustado con pH-metro utilizando disoluciones de: ^(a) gotas de H₂SO₄ cc, ^(b) HClO₄ 0.1M, ^(c) tampón HAc/Ac⁻ 0.05 M, ^(d) tampón fosfato 0.05 M, ^(e) NaOH cc.

Como se puede observar en la tabla 43, la recuperación de 2,4-DB permanece prácticamente constante hasta pH 5.0, a partir del cual disminuye y se mantiene constante hasta pH 11.0, lo que se puede atribuir probablemente a procesos de degradación del herbicida. Por otra parte, la recuperación de 2,4-DP, 2,4,5-TP y MCPA apenas se modifica en el intervalo de pH estudiado, de forma que la retención no se encuentra afectada por el pH de la disolución preconcentrada. En relación al herbicida MCPP, no se ha observado influencia en el porcentaje de recuperación hasta pH 9.0, valor al que se ha producido un incremento. Los resultados obtenidos para el MCPB han mostrado que la recuperación disminuye a medida que aumenta el pH de la disolución.

En lo que se refiere a los resultados obtenidos para el 2,4-D y sus ésteres metílico y butílico, se ha observado que la recuperación de 2,4-D permanece prácticamente constante hasta pH 7.0, valor a partir del cual, aumenta de forma considerable hasta pH 11.0. Justo la tendencia contraria se ha observado en sus dos ésteres, puesto que a partir de pH 7.0 la recuperación disminuye drásticamente, siendo nula a pH 11.0. La figura 34 muestra esta variación para el 2,4-D y su éster metílico. La forma divergente de ambas curvas, presentando incluso cierta simetría con respecto al intervalo horizontal, sugiere un proceso de hidrólisis alcalina del éster para producir el ácido correspondiente (2,4-D).

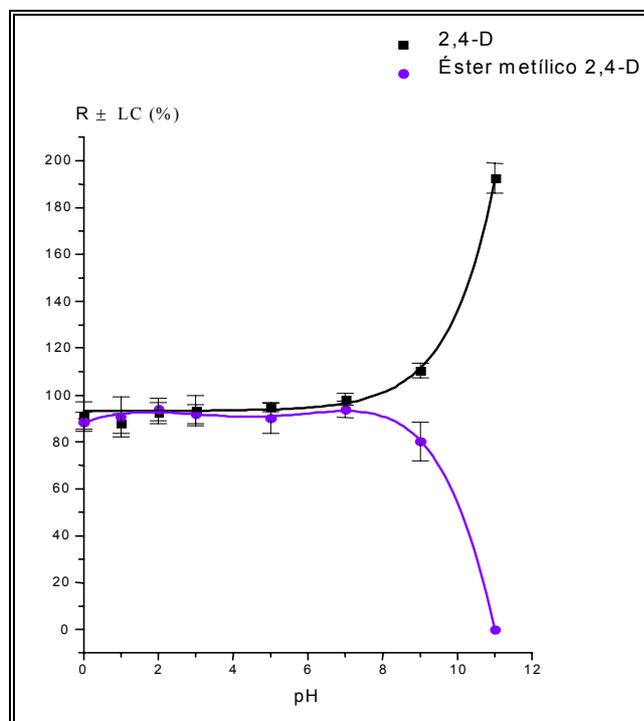


Figura 34. Variación de la recuperación de 2,4-D y su éster metílico con el pH de retención en el adsorbente MFE® Polímero SAX.

En función de los resultados obtenidos se puede concluir que para preconcentrar y determinar mezclas de los herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres, el pH para la retención en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX debe ser inferior a 7.0, ya que la velocidad de la reacción de hidrólisis de los ésteres a los ácidos correspondientes, es mayor a medida que aumenta el pH de la disolución. Por otra parte, la disminución en el porcentaje recuperado de 2,4-DB comienza a ser significativa, tabla 43, a partir de pH 5.0, por lo que para obtener recuperaciones elevadas el pH de retención debe estar comprendido entre pH 0 y pH 5.0. En este intervalo, la recuperación de todos los herbicidas permanece prácticamente constante, con la excepción del MCPB, para el que la recuperación disminuye con el aumento de pH, aunque esta disminución es poco acusada hasta un valor de pH 3.0. De este modo, la etapa de retención en este adsorbente de hidroxietilmetacrilato se debe realizar a pH ácido, en el intervalo 0-3.0.

Como se puede apreciar en la tabla 43, las recuperaciones son ligeramente mayores para todos los herbicidas a pH 3.0, por lo que se ha elegido como valor óptimo para llevar a cabo la preconcentración. En estas condiciones de retención el pK_a del 2,4-D se encuentra por debajo del pH seleccionado (forma ácida), el pK_a de los herbicidas 2,4-DB, MCPB, MCPB y 2,4,5-TP es superior al valor del pH de retención (forma básica) y en el caso del 2,4-DP y MCPA, el valor de pK_a coincide con el valor del pH (equilibrio), según los valores de pK_a mostrados en la tabla 4 (sección de antecedentes), donde se indican las principales propiedades fisicoquímicas de este tipo de herbicidas.

□ *LIDA Sep-IC-OH*

La capacidad de retención de este intercambiador de aniones de PS-DVB con el pH de disolución, ha sido evaluada previamente por S. Menor y col. para los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPB, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP (154). En este estudio, se ha puesto de manifiesto que las mayores recuperaciones se obtienen a un valor de pH próximo a 1.0 ó 10.0 y que la menor retención se produce una o dos unidades por encima del valor de pK_a de cada uno ellos.

Este comportamiento sugiere que para los herbicidas en forma ácida, el mecanismo de retención predominante en medio ácido se debería a interacciones π - π y de van der Waals, mientras que a mayor pH, donde el equilibrio ácido-base se encuentra claramente desplazado hacia la forma iónica, predominaría el mecanismo de intercambio iónico.

Puesto que en nuestro caso se pretende además la preconcentración de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D, y considerando que según los estudios realizados anteriormente con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, los herbicidas en forma de ésteres se hidrolizan al correspondiente ácido (2,4-D) a pH básico, la retención de los herbicidas de interés se ha evaluado únicamente a un valor de pH 1.0. Para ello, se ha procedido según el procedimiento 3.1.3 descrito en la sección experimental y se ha ajustado el pH de la disolución preconcentrada con H₂SO₄ cc. En estas condiciones se ha observado la adecuada retención en el adsorbente de todos los herbicidas estudiados tanto en forma ácida como de ésteres y las recuperaciones para todos ellos, han estado comprendidas entre el 80 y 97%.

A este pH fuertemente ácido (pH 1.0), no se ha producido hidrólisis apreciable de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D, por lo que ha resultado adecuado para la retención de las mezclas de los herbicidas evaluados.

□ *OASIS[®] MCX*

Este intercambiador de cationes basado en el co-polímero polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona, es capaz de retener analitos de diferente polaridad y características ácido-base. A diferencia de los materiales en base gel de sílice y análogamente al resto de adsorbentes poliméricos evaluados, presenta estabilidad en el intervalo entero de pH.

A través de los estudios realizados con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX se ha podido comprobar, que para evitar reacciones de hidrólisis y poder determinar herbicidas en forma ácida y de ésteres, el pH de retención debe ser inferior a pH 7.0. Algunos estudios previos realizados en los cartuchos de extracción OASIS[®] MCX, han mostrado una retención considerable a valores de pH fuertemente ácidos, de forma que el estudio de recuperación se ha realizado entre pH 0 y pH 2.0, según el procedimiento experimental descrito en 3.1.4, utilizando para la elución HCl 60 mM en metanol.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 44. En ella se puede observar que en todas las condiciones evaluadas, las recuperaciones para la mayoría de los herbicidas han oscilado entre el 80 y 100% y que por lo general, las recuperaciones a pH 1.0 han sido superiores a las obtenidas a pH 2.0. A pH 0, el herbicida 2,4-D ha mostrado una recuperación de aproximadamente 140%, mientras que las recuperaciones obtenidas para sus ésteres metílico y butílico han sido respectivamente del 55% y 35%, lo que claramente sugiere un proceso de hidrólisis ácida al herbicida ácido 2,4-D.

Tabla 44
Recuperaciones obtenidas en el adsorbente OASIS[®] MCX en función del pH de retención

| <i>HERBICIDA</i> | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | |
|-----------------------------|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| | pH 0 ^(a) | pH 1.0 ^(a) | pH 2.0 ^(b) |
| <i>2,4-D</i> | 138 ± 7 | 84 ± 4 | 64 ± 2 |
| <i>MCPA</i> | 89 ± 3 | 98 ± 2 | 85 ± 5 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 55 ± 4 | 75 ± 2 | 70 ± 3 |
| <i>2,4-DP</i> | 86 ± 1 | 98 ± 1 | 91 ± 4 |
| <i>MCPD</i> | 103 ± 3 | 102 ± 3 | 99 ± 4 |
| <i>2,4-DB</i> | 83 ± 3 | 88 ± 8 | 80 ± 2 |
| <i>MCPB</i> | 91 ± 3 | 99 ± 7 | 94 ± 2 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 98 ± 2 | 99 ± 2 | 100 ± 6 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 35 ± 4 | 84 ± 2 | 89 ± 2 |

n=3, el pH se ha ajustado con pH-metro utilizando: ^(a) gotas de H₂SO₄ cc, ^(b) H₂SO₄ 5 mM.

Considerando la recuperación y la velocidad de la reacción de hidrólisis, se ha seleccionado pH 1.0 como el valor óptimo para la etapa de retención en el adsorbente polimérico OASIS[®] MCX. Este material de SPE, combina funcionalidades de fase inversa y de intercambio de cationes, de modo que el proceso de retención puede incluir mecanismos de cambio iónico, fuerzas de van der Waals e interacciones π - π . Puesto que los herbicidas fenoxiácido son moléculas neutras a pH 1.0, es probable que la retención a este pH se encuentre basada fundamentalmente en un mecanismo de partición.

A través del estudio realizado en los distintos adsorbentes, se ha puesto de manifiesto la importante influencia del pH en la retención de los herbicidas fenoxiácido, tanto en forma ácida como de ésteres. Salvo el material de acceso restringido en base gel de sílice LiChrospher[®] RP-18-ADS, que presenta estabilidad en el intervalo de pH 2.0-7.5, el resto de adsorbentes estudiados, intercambiadores catiónicos o aniónicos fuertes, poseen una excelente resistencia química debido a su base polimérica y a los grupos funcionales ácido sulfónico o amonio cuaternario, que permite utilizarlos prácticamente en el intervalo entero de pH, sin degradación ni pérdida de su capacidad iónica.

En general, todos los adsorbentes han mostrado una fuerte retención en medio ácido, si bien, las mayores recuperaciones en los adsorbentes Lida Sep-IC-OH y OASIS[®] MXC, se han obtenido a pH 1.0. Esto parece indicar que las interacciones iónicas no favorecen la retención, puesto que a pH 1.0, los herbicidas se encuentran en forma neutra y el mecanismo predominante es de partición. Por el contrario, el intercambiador de aniones MFE-Polímero[®] SAX, ha mostrado recuperaciones aceptables para todos los herbicidas a pH 3.0. A este pH, algunos de ellos se encuentran disociados, por lo que existe un mecanismo mixto de retención, cambio iónico y partición.

Por su naturaleza, y a diferencia de los adsorbente poliméricos, el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, no permite la retención a pH fuertemente ácido. Este adsorbente combina mecanismos de partición y exclusión por tamaño, aunque con disoluciones estándar de los herbicidas, la retención se encuentra basada exclusivamente en el de partición. En este caso, las mayores recuperaciones se han obtenido a un valor de pH 4.0.

3.1.3. NATURALEZA DEL ELUYENTE Y VOLUMEN DE ELUCIÓN

Una vez seleccionado el pH óptimo de retención en los distintos adsorbentes, se ha realizado un estudio para determinar el disolvente o mezcla apropiada de disolventes que permite la elución completa de los herbicidas retenidos en el menor volumen posible y que proporciona recuperaciones entorno al 100% para cada uno de ellos. Con este objeto, se han evaluado las recuperaciones obtenidas al utilizar como eluyente mezclas de metanol o acetonitrilo con concentraciones variables de ácidos inorgánicos y mezclas acuosas de dichos disolventes.

De forma análoga al estudio realizado en el apartado anterior, para cada herbicida y eluyente, se han realizado tres determinaciones y se ha calculado el límite de confianza con el valor de t de Student a un 95% de probabilidad.

3.1.3.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher[®] RP-18-ADS

La naturaleza y composición del eluyente se ha estudiado siguiendo el procedimiento 3.1.2 descrito en la sección experimental, preconcentrando disoluciones acuosas de los herbicidas a un valor de pH 4.0 y utilizando proporciones variables de metanol con un contenido de ácido fosfórico del 0.8% durante la etapa de elución. Los resultados de recuperación obtenidos para cada eluyente se muestran en la figura 35.

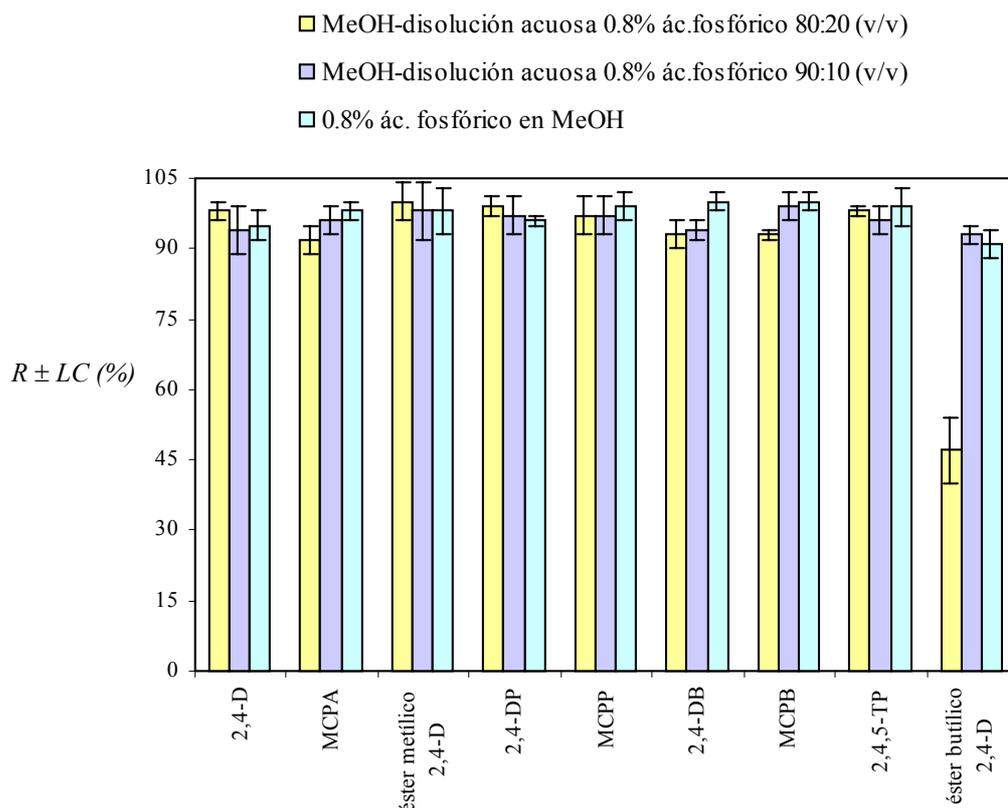


Figura 35. Influencia del eluyente en la recuperación de los herbicidas del material de acceso restringido LiChrospher® RP-18-ADS.

Como se puede observar en el gráfico anterior, las recuperaciones obtenidas cuando la elución se lleva a cabo con 0.8% ácido fosfórico en MeOH y MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v) son muy similares entre sí, y en ambos casos, oscilan en el intervalo 91-100%. La mezcla de MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v) ha proporcionado recuperaciones mayores del 90% para todos los herbicidas excepto para el éster butílico del 2,4-D, que ha mostrado una recuperación menor del 50%, por lo que no se podría utilizar como eluyente si se pretende la extracción y posterior determinación de todos los herbicidas.

De este modo, se ha seleccionado como eluyente óptimo la disolución acuosa con 90% de metanol, puesto que proporciona recuperaciones aceptables para todos ellos con el menor contenido de disolvente orgánico, y ya que la fracción acuosa de la mezcla, puede contribuir a la focalización de los analitos en cabeza de columna para su posterior determinación mediante cromatografía líquida capilar.

Para establecer el volumen adecuado de eluyente, se ha determinado la recuperación de cada herbicida en las fracciones eluidas del adsorbente con volúmenes de 1.0, 1.5 y 2.0 mL de la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 90:10 (v/v).

Como se puede apreciar en la tabla 45, la desorción de todos los analitos es incompleta cuando la elución se realiza con 1.0 mL de eluyente. En este caso, las recuperaciones han oscilado entre el 8 y 45%, y para el éster metílico del 2,4-D, ni siquiera se ha detectado su elución del adsorbente. Mayores recuperaciones se han obtenido con un volumen de eluyente de 1.5 mL, pero únicamente se han observado recuperaciones superiores al 90% para todos los herbicidas cuando se ha utilizado un volumen de 2.0 mL, por lo que se ha seleccionado como volumen óptimo para la desorción y elución de los fenoxiácidos retenidos en el material de acceso restringido.

Tabla 45
Variación de la recuperación con el volumen de eluyente en el adsorbente
LiChrospher® RP-18-ADS

| <i>HERBICIDA</i> | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | |
|-----------------------------|------------------------------|--------|--------|
| | 1.0 mL | 1.5 mL | 2.0 mL |
| <i>2,4-D</i> | 45 ± 4 | 62 ± 7 | 94 ± 5 |
| <i>MCPA</i> | 38 ± 3 | 54 ± 5 | 96 ± 3 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | - | 62 ± 4 | 98 ± 6 |
| <i>2,4-DP</i> | 28 ± 5 | 42 ± 4 | 97 ± 4 |
| <i>MCPB</i> | 28 ± 8 | 44 ± 4 | 97 ± 4 |
| <i>2,4-DB</i> | 27 ± 9 | 49 ± 3 | 94 ± 2 |
| <i>MCPB</i> | 27 ± 7 | 50 ± 5 | 99 ± 3 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 8 ± 1 | 70 ± 2 | 96 ± 3 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 11 ± 2 | 54 ± 3 | 93 ± 2 |

(n=3)

En el apartado 3.1.1 de la sección de resultados, se puso de manifiesto la necesidad de despreciar un volumen de eluyente de 4.2 mL antes de la elución de los herbicidas retenidos en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS. Para reajustar este volumen de desecho y eluir los analitos en el menor volumen posible, se han recogido tras el volumen de desecho fracciones de elución de 0.5 mL hasta un volumen total de 2.0 mL, que se han analizado mediante cLC para determinar la recuperación de los herbicidas en cada una de ellas. Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la figura 36.

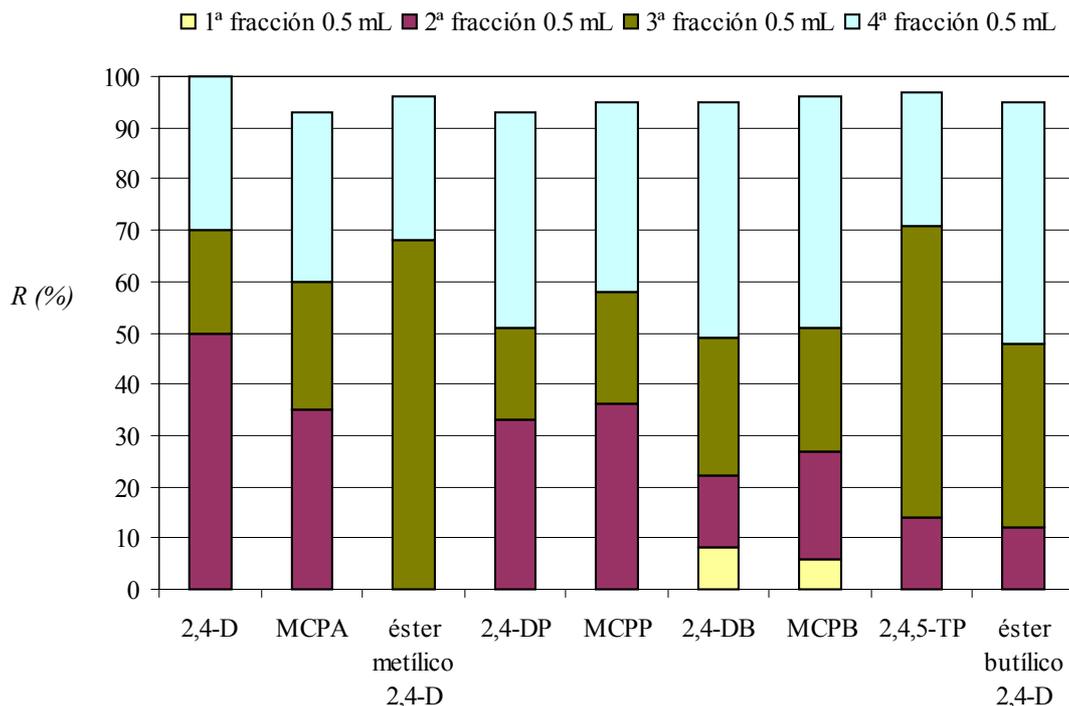


Figura 36. Recuperación de los herbicidas en las fracciones eluidas del adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS con el eluyente MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v).

Como se observa en la figura anterior, la elución de los herbicidas en la primera fracción recogida de 0.5 mL es prácticamente despreciable, por lo que se puede considerar como volumen de desecho un valor de 4.7 mL. Una vez ajustado este volumen, los herbicidas se pueden eluir completamente del adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS en una fracción de 1.5 mL del eluyente MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 90:10 (v/v).

3.1.3.2. Adsorbentes en base polimérica

□ MFE® Polímero SAX

El estudio de elución se ha realizado utilizando disoluciones acuosas con un contenido de ácido fosfórico del 0.8% y proporciones de MeOH en el intervalo 90-40% o AcN en el intervalo 90-20%, según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1 de la sección experimental y mediante la preconcentración de disoluciones estándar de los herbicidas a pH 3.0. Estos eluyentes son similares a las fases móviles empleadas en cLC para la separación de herbicidas fenoxiácido (41, 63, 154, 206, 217, 295), lo que puede facilitar su acoplamiento en línea con el sistema de extracción y preconcentración.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 46 y 47. En ellas se puede apreciar que la recuperación de 2,4-D es mayor cuando se utilizan eluyentes que contienen AcN como disolvente orgánico. La recuperación de este herbicida ha permanecido prácticamente constante con proporciones de AcN entre 90 y 40%, porcentaje a partir del cual la elución cuantitativa no ha sido posible. Con MeOH, la recuperación ha permanecido constante en el intervalo 90-70% y con una proporción del 50% no se ha detectado su elución.

Similar comportamiento se ha observado para los demás fenoxiácidos estudiados, y en general se puede concluir que debido al mayor poder eluotrópico del acetonitrilo, las recuperaciones son mayores con los eluyentes que contienen este modificador orgánico. Así, mientras la cantidad recuperada se encuentra por debajo del límite de detección con una proporción del 40% de MeOH, con un 40% de AcN la recuperación es todavía considerable y sólo con un 20% de AcN no se eluye ningún herbicida del cambiador iónico.

Puesto que porcentajes de metanol o acetonitrilo del 80 ó 90% proporcionan recuperaciones aceptables y mayores del 87% para todos los herbicidas estudiados, se ha seleccionado como eluyente óptimo para la desorción y elución de los analitos del adsorbente MFE[®] Polímero SAX, la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v). Este eluyente es compatible con las fases móviles utilizadas en la separación y determinación de fenoxiácidos mediante cromatografía líquida capilar, que normalmente también contienen metanol como disolvente de elución. Además, por su mayor contenido acuoso puede contribuir a la focalización en cabeza de columna.

Tabla 46

Variación de la recuperación con distintas proporciones de MeOH en la mezcla eluyente en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX (n=3)

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Elución con MeOH-disolución acuosa 0.8 % H₃PO₄</i> | | | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | |
|-----------------------------|---|---------|--------|------------------------------|--------|-----|
| | 90% | 80% | 70% | 60% | 50% | 40% |
| <i>2,4-D</i> | 92 ± 4 | 92 ± 4 | 94 ± 2 | 64 ± 2 | 0 | 0 |
| <i>2,4-DP</i> | 94 ± 5 | 93 ± 3 | 95 ± 2 | 89 ± 4 | 36 ± 5 | 0 |
| <i>MCP</i> | 95 ± 3 | 93 ± 3 | 93 ± 1 | 86 ± 1 | 72 ± 2 | 0 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 92 ± 2 | 89 ± 3 | 87 ± 3 | 86 ± 3 | 0 | 0 |
| <i>2,4-DB</i> | 86 ± 3 | 87 ± 3 | 88 ± 2 | 87 ± 4 | 0 | 0 |
| <i>MCPB</i> | 93 ± 3 | 90 ± 4 | 80 ± 3 | 68 ± 1 | 0 | 0 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 93 ± 3 | 92 ± 3 | 80 ± 4 | 72 ± 4 | 0 | 0 |
| <i>MCPA</i> | 96 ± 4 | 92 ± 4 | 95 ± 2 | 92 ± 2 | 30 ± 4 | 0 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 100 ± 2 | 100 ± 4 | 99 ± 1 | 86 ± 3 | 28 ± 4 | 0 |

Tabla 47

Variación de la recuperación con distintas proporciones de AcN en la mezcla eluyente en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Elución con AcN-disolución acuosa 0.8 % H₃PO₄</i> | | | | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | | |
|-----------------------------|--|--------|--------|--------|------------------------------|--------|--------|-----|
| | 90% | 80% | 70% | 60% | 50% | 40% | 30% | 20% |
| <i>2,4-D</i> | 99 ± 3 | 99 ± 4 | 98 ± 3 | 95 ± 2 | 96 ± 4 | 95 ± 4 | 53 ± 3 | 0 |
| <i>2,4-DP</i> | 97 ± 1 | 99 ± 2 | 97 ± 4 | 98 ± 3 | 92 ± 4 | 89 ± 2 | 72 ± 3 | 0 |
| <i>MCP</i> | 99 ± 1 | 99 ± 1 | 99 ± 2 | 99 ± 2 | 96 ± 2 | 89 ± 3 | 83 ± 2 | 0 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 100 ± 3 | 99 ± 2 | 99 ± 2 | 96 ± 1 | 96 ± 1 | 94 ± 3 | 65 ± 4 | 0 |
| <i>2,4-DB</i> | 94 ± 4 | 91 ± 1 | 91 ± 2 | 92 ± 4 | 91 ± 4 | 90 ± 3 | 0 | 0 |
| <i>MCPB</i> | 95 ± 2 | 96 ± 3 | 94 ± 4 | 92 ± 3 | 88 ± 1 | 71 ± 4 | 50 ± 4 | 0 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 88 ± 4 | 87 ± 3 | 88 ± 4 | 89 ± 4 | 80 ± 4 | 71 ± 1 | 59 ± 4 | 0 |
| <i>MCPA</i> | 97 ± 3 | 96 ± 1 | 96 ± 3 | 96 ± 5 | 96 ± 2 | 96 ± 3 | 67 ± 3 | 0 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 99 ± 2 | 94 ± 3 | 89 ± 1 | 90 ± 2 | 87 ± 1 | 83 ± 2 | 79 ± 3 | 0 |

Una vez seleccionado como eluyente la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v), se ha realizado un estudio de recuperación en función del volumen de elución. Las fracciones recogidas de 2.0 mL se han diluido a 25.0 mL con agua purificada, mientras que las de 5.0 y 10.0 mL se han llevado a un volumen final de 50.0 mL, con propósitos de focalización antes de su análisis mediante cromatografía líquida capilar según el procedimiento descrito en 2.2.2.1 de la sección experimental. Los resultados de este estudio se muestran en la figura 37.

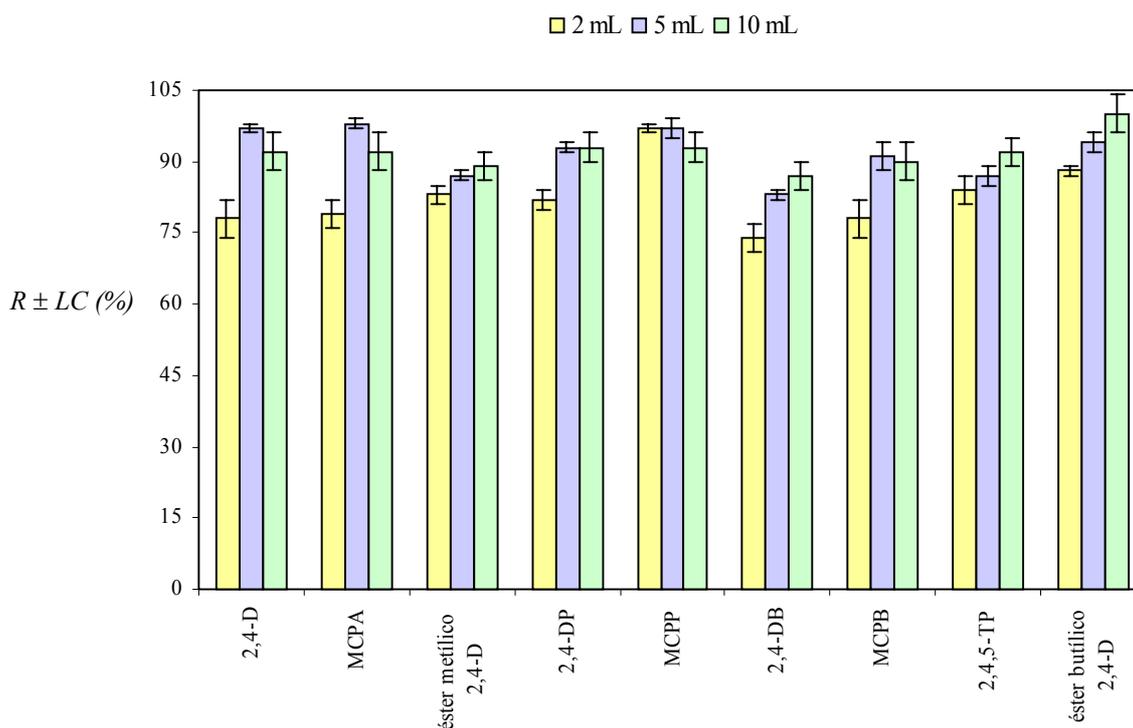


Figura 37. Variación de la recuperación con el volumen de eluyente en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, (n=3).

En el gráfico anterior se aprecia que las mayores recuperaciones se producen con volúmenes de eluyente de 5.0 ó 10.0 mL y que no existen diferencias significativas entre los valores obtenidos en ambos casos.

Puesto que la desorción de los analitos del cambiador iónico se debe realizar en el menor volumen posible, los herbicidas retenidos en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX se pueden eluir con recuperaciones aceptables, comprendidas en el intervalo 83-98%, en un volumen de 5.0 mL con la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v).

□ *LIDA Sep-IC-OH*

En un estudio anterior, S. Menor y col. determinaron como eluyente óptimo para la desorción de herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP del adsorbente LIDA Sep-IC-OH, una mezcla de metanol con una concentración de HNO_3 60 mM (154). Teniendo en cuenta estos resultados, y de forma análoga a los estudios descritos anteriormente con otros adsorbentes, la recuperación de los herbicidas en las fracciones eluidas de este cambiador iónico se han evaluado siguiendo el procedimiento 3.1.3 de la sección experimental.

La figura 38 muestra las recuperaciones obtenidas en fracciones de 1.0 mL. Como se puede observar, cuando la elución se realiza con 1.0 mL de HNO_3 60 mM en metanol se obtienen recuperaciones inferiores al 84%. En la segunda fracción, las cantidades eluidas de herbicida son todavía considerables mientras que en la tercera fracción recogida no se ha detectado elución. Así, para eluir completamente a los analitos retenidos en el adsorbente LIDA Sep-IC-OH, se necesita un total de 2.0 mL de eluyente. Con este volumen, las recuperaciones han oscilado entre 81 y 97% para todos los herbicidas estudiados.

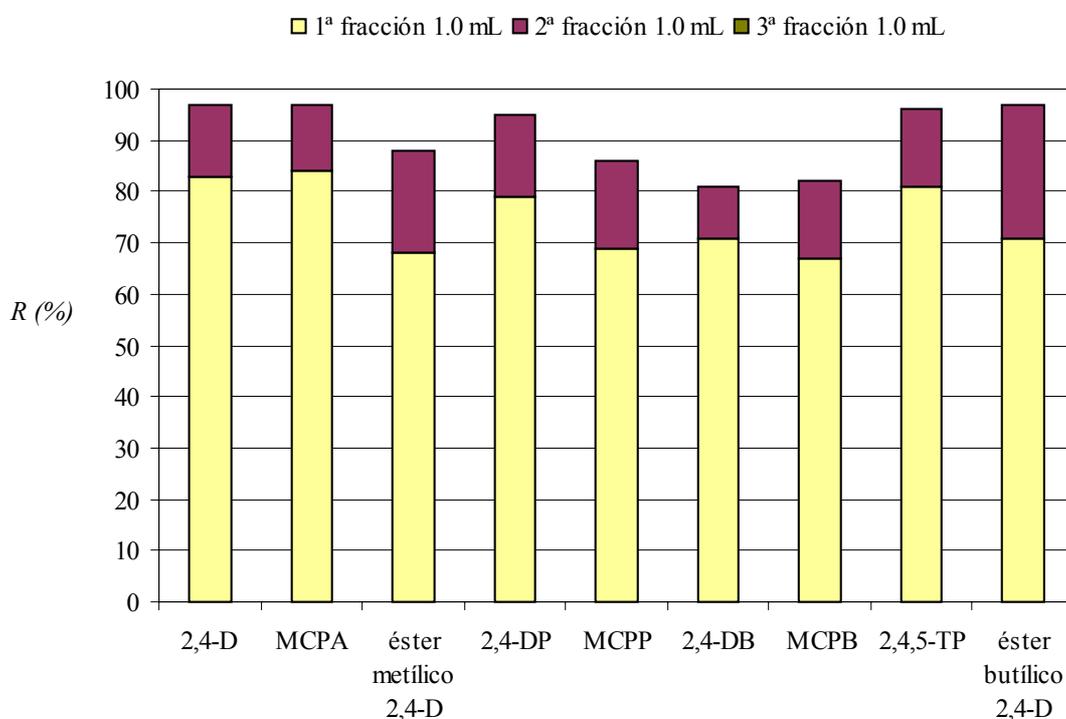


Figura 38. Recuperación de los herbicidas en las fracciones eluidas del adsorbente Lida Sep IC-OH con el eluyente ácido nítrico 60 mM en metanol.

□ OASIS[®] MCX

En el caso del adsorbente polimérico OASIS[®] MCX, la naturaleza y el volumen de eluyente se han evaluado siguiendo un procedimiento similar al resto de adsorbentes. La preconcentración se ha realizado según las condiciones descritas en el apartado 3.1.4 de la sección experimental y para la elución de los herbicidas retenidos se ha utilizado 1.5 mL de metanol o acetonitrilo con una concentración de HCl 60 mM y metanol con un contenido de ácido fosfórico del 0.8%. Los resultados obtenidos en el estudio de recuperación realizado se muestran a continuación (figura 39).

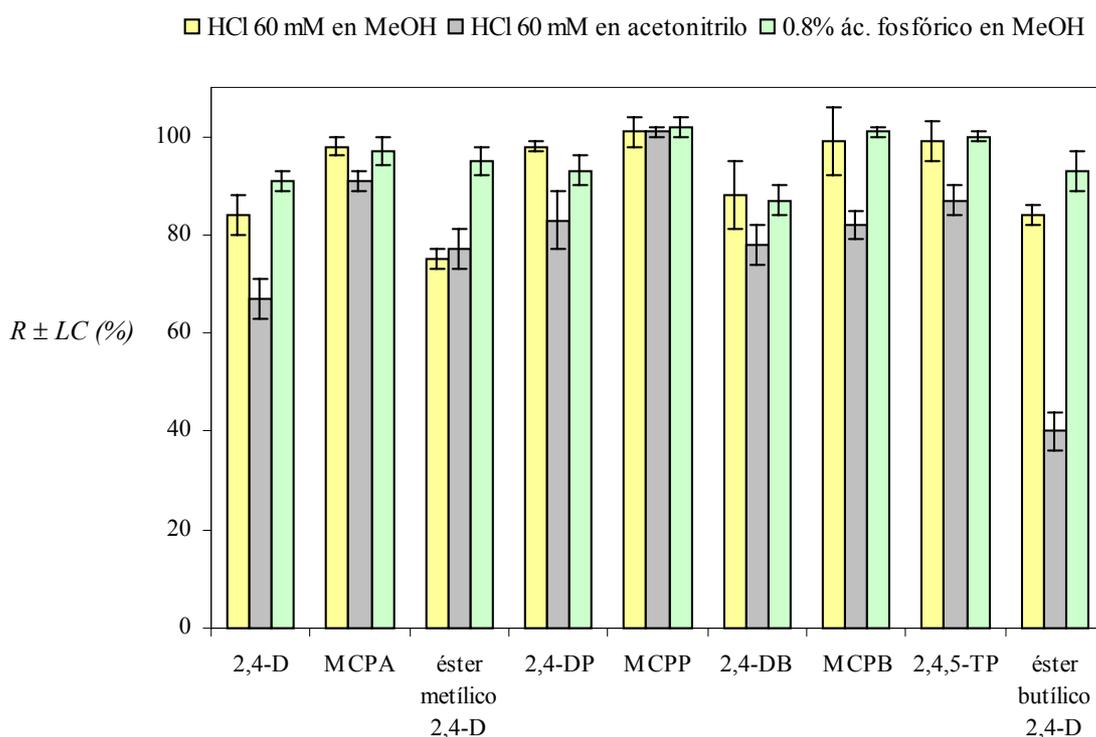


Figura 39. Influencia de la naturaleza y composición del eluyente en la recuperación de los herbicidas del adsorbente OASIS[®] MCX, (n=3).

Como se puede apreciar en la figura 39, la mezcla de acetonitrilo-HCl 60 mM proporciona bajas recuperaciones (< 85%) para los herbicidas 2,4-D, éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP y en especial para el éster butílico del 2,4-D, cuya recuperación es del 40% aproximadamente. Mayores recuperaciones se han obtenido con HCl 60 mM en metanol, aunque sólo el empleo de metanol con un contenido de ácido fosfórico del 0.8% ha permitido alcanzar recuperaciones superiores al 90% para el 2,4-D y sus ésteres metílico y butílico, por lo que se ha seleccionado como el eluyente adecuado para la desorción de los herbicidas retenidos en el adsorbente a pH 1.0.

Como en los casos anteriores, el volumen apropiado de eluyente se ha determinado a través de las recuperaciones obtenidas en fracciones de 1.0, 1.5 y 2.0 mL.

Los resultados de este estudio se muestran en la tabla 48. En ella se pueden observar recuperaciones menores del 80% para los herbicidas 2,4-D y 2,4-DP con un 1.0 mL del eluyente MeOH-0.8% ácido fosfórico. Para estos herbicidas, y cuando la elución se ha realizado con 1.5 mL, se han obtenido recuperaciones del 91% y 93% respectivamente y para el resto, o se han mantenido prácticamente constantes o se han incrementado. La elución con 2.0 mL de eluyente no muestra diferencias significativas respecto a un volumen de 1.5 mL, por lo que llegando a un compromiso entre el menor volumen de elución y la elevada recuperación, se ha escogido un volumen de 1.5 mL, que ha permitido obtener recuperaciones en el intervalo 86-101 % para todos los herbicidas objeto de estudio.

Tabla 48
Variación de la recuperación con el volumen del eluyente MeOH-0.8% H₃PO₄ en el adsorbente polimérico OASIS[®] MCX

| <i>HERBICIDA</i> | <i>RECUPERACIÓN ± LC (%)</i> | | |
|-----------------------------|------------------------------|---------|---------|
| | 1.0 mL | 1.5 mL | 2.0 mL |
| <i>2,4-D</i> | 78 ± 2 | 91 ± 2 | 89 ± 1 |
| <i>MCPA</i> | 87 ± 2 | 97 ± 3 | 101 ± 2 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 89 ± 2 | 95 ± 3 | 92 ± 4 |
| <i>2,4-DP</i> | 74 ± 2 | 93 ± 3 | 99 ± 3 |
| <i>MCPA</i> | 101 ± 1 | 102 ± 2 | 102 ± 2 |
| <i>2,4-DB</i> | 87 ± 2 | 86 ± 3 | 86 ± 1 |
| <i>MCPB</i> | 102 ± 2 | 101 ± 1 | 101 ± 1 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 99 ± 3 | 100 ± 1 | 100 ± 2 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 91 ± 3 | 93 ± 4 | 92 ± 3 |

(n=3)

A través de los estudios realizados en este apartado, se ha podido determinar como afecta la naturaleza del disolvente orgánico y su proporción en la mezcla eluyente a la recuperación y en consecuencia, a la elución en los distintos adsorbentes.

Para desorber completamente a los analitos retenidos, los eluyentes empleados deben contener una proporción elevada de disolvente orgánico.

A diferencia del acetonitrilo y aunque su poder eluotrópico sea mayor, el empleo de metanol en los adsorbentes MFE[®] Polímero SAX y OASIS[®] MCX ha permitido una mayor recuperación de los herbicidas. De este modo, la etapa de elución se debe realizar en todos los adsorbentes evaluados utilizando mezclas metanólicas acidificadas con pequeñas cantidades de ácidos inorgánicos como ácido fosfórico en una proporción del 0.8% o ácido nítrico en concentración 60 mM. Los eluyentes seleccionados de elución en el caso de los adsorbentes LiChrospher[®] RP-18-ADS y MFE[®] Polímero SAX contienen además una fracción acuosa del 10 y 20% respectivamente, hecho que puede contribuir a la focalización de los analitos en la cabeza de la columna capilar.

Respecto al volumen de elución, la desorción completa de los analitos retenidos en la mayoría de los adsorbentes se puede conseguir con un volumen de 1.5 ó 2.0 mL de los eluyentes orgánicos seleccionados, pero con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX se necesita un volumen mayor (5.0 mL), lo que implica una mayor dilución de los extractos para conseguir disoluciones adecuadas de focalización y en consecuencia puede producir una pérdida de sensibilidad en la determinación mediante cLC.

3.1.4. EVALUACIÓN DEL VOLUMEN DE RUPTURA

La eficacia de las resinas modificadas químicamente se puede determinar a través de la recuperación de los analitos estudiados, que depende a su vez de la eficacia de retención y elución en un determinado adsorbente.

Una buena indicación de la capacidad de retención es el volumen de ruptura, que corresponde al grado de dilución que puede presentar la muestra que se introduce a través del material adsorbente sin que se produzca apreciable pérdida de analito. De este modo, para completar la caracterización de los distintos adsorbentes, se ha realizado un estudio de recuperación en función del volumen preconcentrado de disolución.

El volumen de ruptura de los fenoxiácidos estudiados se ha determinado al pH óptimo para la retención, con el eluyente y el volumen de elución seleccionado para cada adsorbente en el apartado 3.1.3 de resultados. Su valor se ha estimado a través de las curvas obtenidas experimentalmente por representación del porcentaje de recuperación para una cantidad fija de herbicida en función del volumen de disolución, puesto que al trazar una recta tangente a ambos extremos de la curva, se define un punto de corte que determina el volumen al cual se comienzan a producir pérdidas de analito.

En todos los casos se han realizado tres determinaciones y se ha calculado el límite de confianza con el valor de t de Student a un 95% de probabilidad.

3.1.4.1. Adsorbente en base gel de sílice LiChrospher® RP-18-ADS

Los volúmenes de ruptura en el material de acceso restringido se han determinado según el procedimiento 3.1.2 de la sección experimental, preconcentrado disoluciones acuosas al pH adecuado de retención (pH 4.0) con una cantidad de 1.5 µg del éster butílico de 2,4-D y 0.30 µg del resto de herbicidas. Los volúmenes introducidos a través del adsorbente han estado comprendidos en el intervalo de 10.0 a 250 mL.

La figura 40 muestra la variación de la recuperación con el volumen de disolución, así como la estimación del volumen de ruptura para cada fenoxiácido. Como se puede observar, las recuperaciones varían para todos los herbicidas entre 94 y 100% cuando se preconcentra un volumen de disolución de 25 mL. El éster butílico del 2,4-D ha mostrado la mayor capacidad de retención en el adsorbente, de forma que se pueden introducir volúmenes de disolución de al menos 250 mL sin que se produzca pérdida de este analito y por tanto, disminución considerable en la recuperación.

Los volúmenes de ruptura obtenidos a través de las curvas mostradas en la figura 40 se muestran a continuación (tabla 49).

Tabla 49
Volúmenes de ruptura de los herbicidas fenoxiácido en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS

| <i>HERBICIDA</i> | <i>VOLUMEN DE RUPTURA (mL)</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>2,4-D</i> | 25 |
| <i>MCPA</i> | 25 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 60 |
| <i>2,4-DP</i> | 75 |
| <i>MCP</i> | 130 |
| <i>2,4-DB</i> | 35 |
| <i>MCPB</i> | 25 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 135 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | >250 |

Como se puede apreciar, los volúmenes de ruptura de los herbicidas han estado comprendidos en el intervalo 25-135 mL y como se ha comentado anteriormente, el éster butílico del 2,4-D ha mostrado un comportamiento excepcional.

Figura 40. Curvas de ruptura en la condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS.

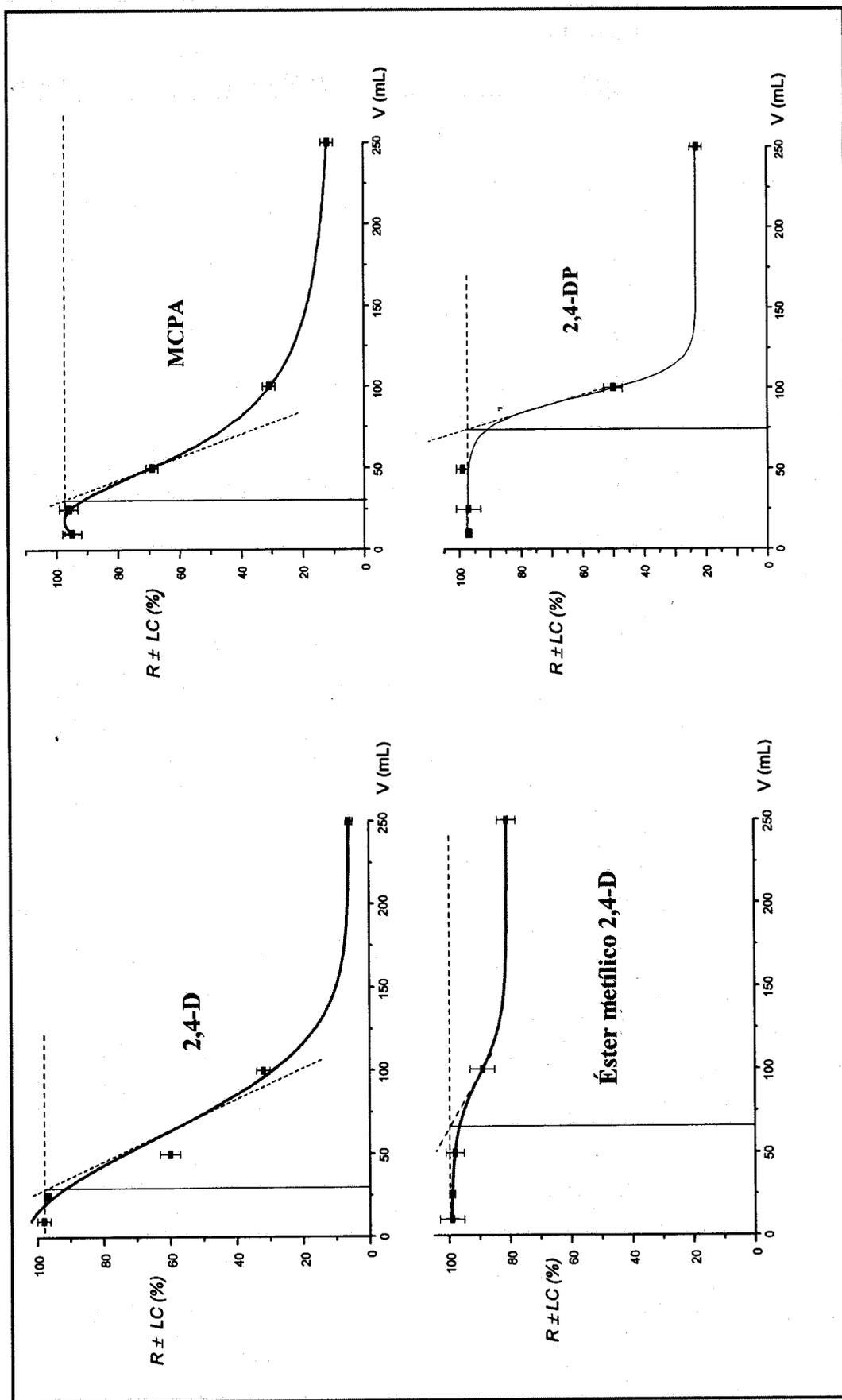
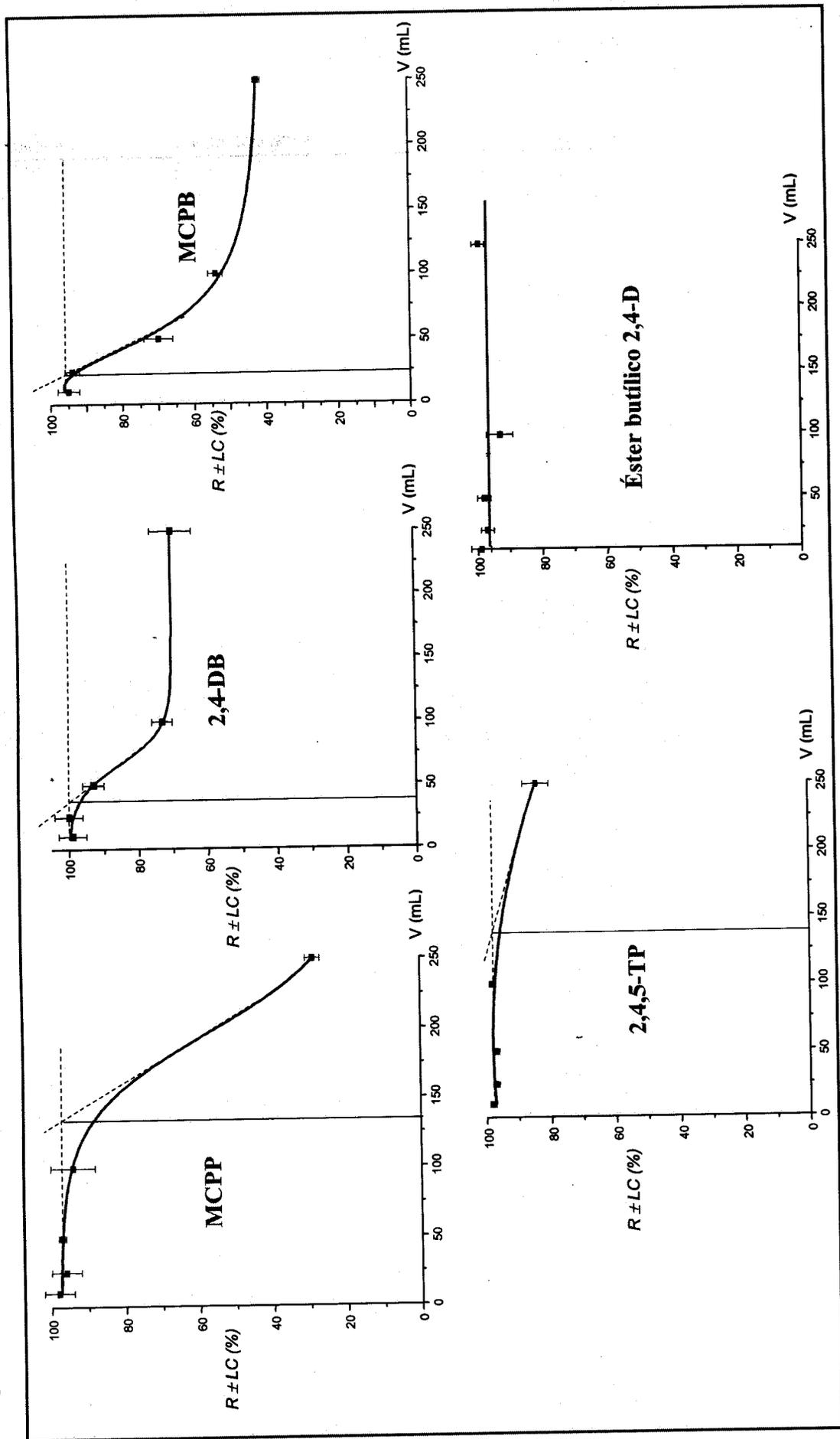


Figura 40 (cont). Curvas de ruptura en la condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS.



3.1.4.2. Adsorbentes en base polimérica

□ MFE[®] Polímero SAX

Para determinar los volúmenes de ruptura en la columna empaquetada con este adsorbente de hidroxietilmetacrilato y siguiendo el procedimiento 3.1.1 de la sección experimental, se han preconcentrado volúmenes entre 25.0 y 1000 mL de disoluciones acuosas con 20 µg de cada herbicida al pH óptimo de retención (pH 3.0).

Representando el porcentaje de recuperación en función del volumen de disolución introducido a través del adsorbente se han obtenido las curvas de la figura 41, que han permitido estimar el volumen de ruptura mostrado en la tabla 50 para cada uno de los herbicidas estudiados.

Tabla 50
Volúmenes de ruptura de los herbicidas fenoxiácido en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX

| <i>HERBICIDA</i> | <i>VOLUMEN DE RUPTURA (mL)</i> |
|-----------------------------|------------------------------------|
| <i>2,4-D</i> | 300 |
| <i>MCPA</i> | 830 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 325 |
| <i>2,4-DP</i> | 575 |
| <i>M CPP</i> | 860 |
| <i>2,4-DB</i> | 800 |
| <i>MCPB</i> | 730 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 690 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 730 |

Como se puede observar, los volúmenes de ruptura en el adsorbente MFE[®] Polímero SAX varían entre los 300 mL correspondientes al 2,4-D y los 860 mL del herbicida MCPP. El 2,4-D y su éster metílico presentan volúmenes de ruptura similares, mientras que el éster butílico del 2,4-D muestra en comparación un volumen mayor.

Considerando los resultados de la tabla anterior, se puede deducir que la preconcentración de volúmenes de disolución mayores de 300 mL no resulta conveniente cuando se pretende determinar todos los herbicidas estudiados, mientras que en el análisis de mezclas de todos ellos excepto el 2,4-D y su éster metílico, los volúmenes introducidos través del adsorbente pueden ser el doble aproximadamente.

Figura 41. Curvas de ruptura en la condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente MFE® Polímero SAX.

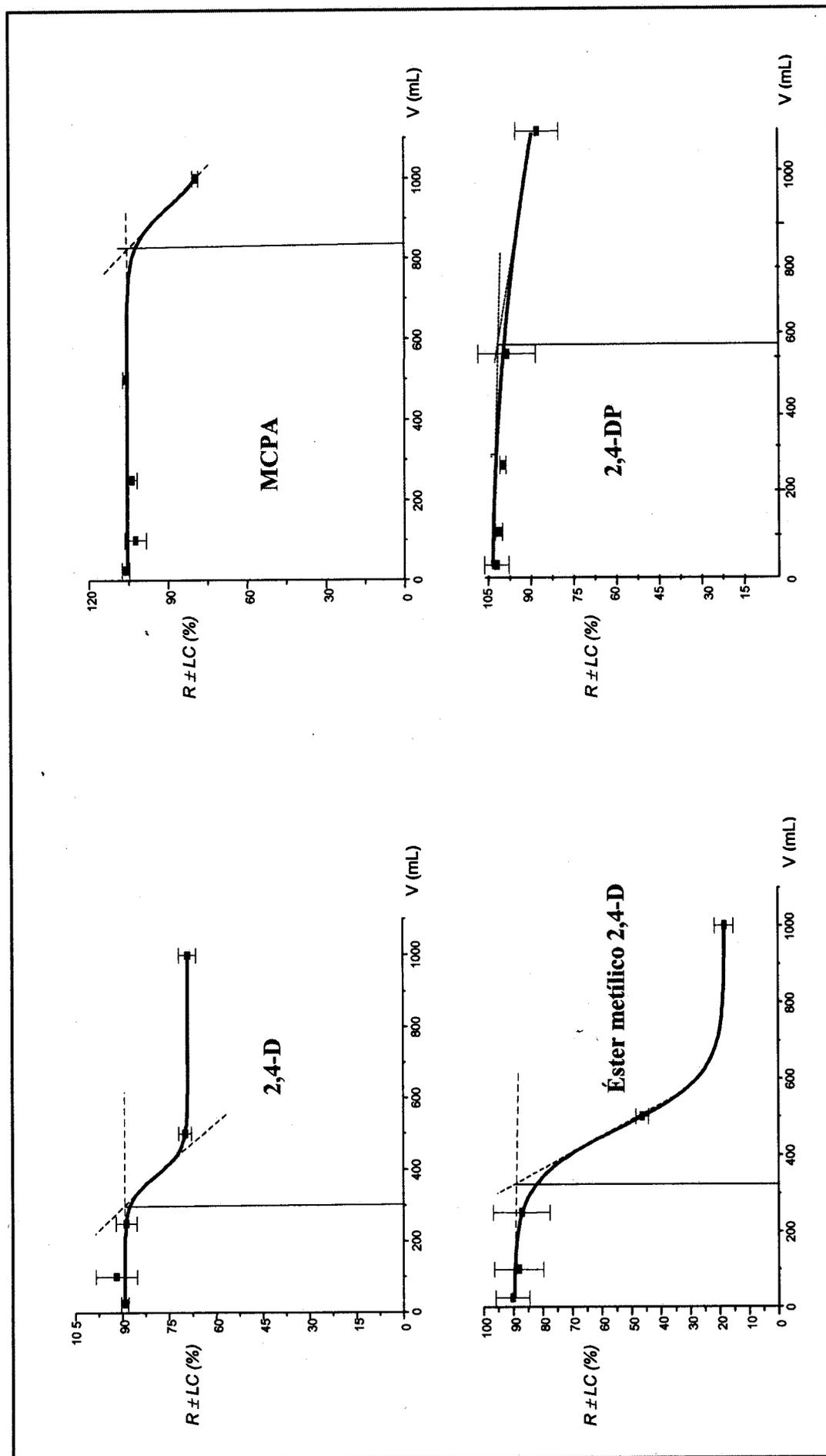
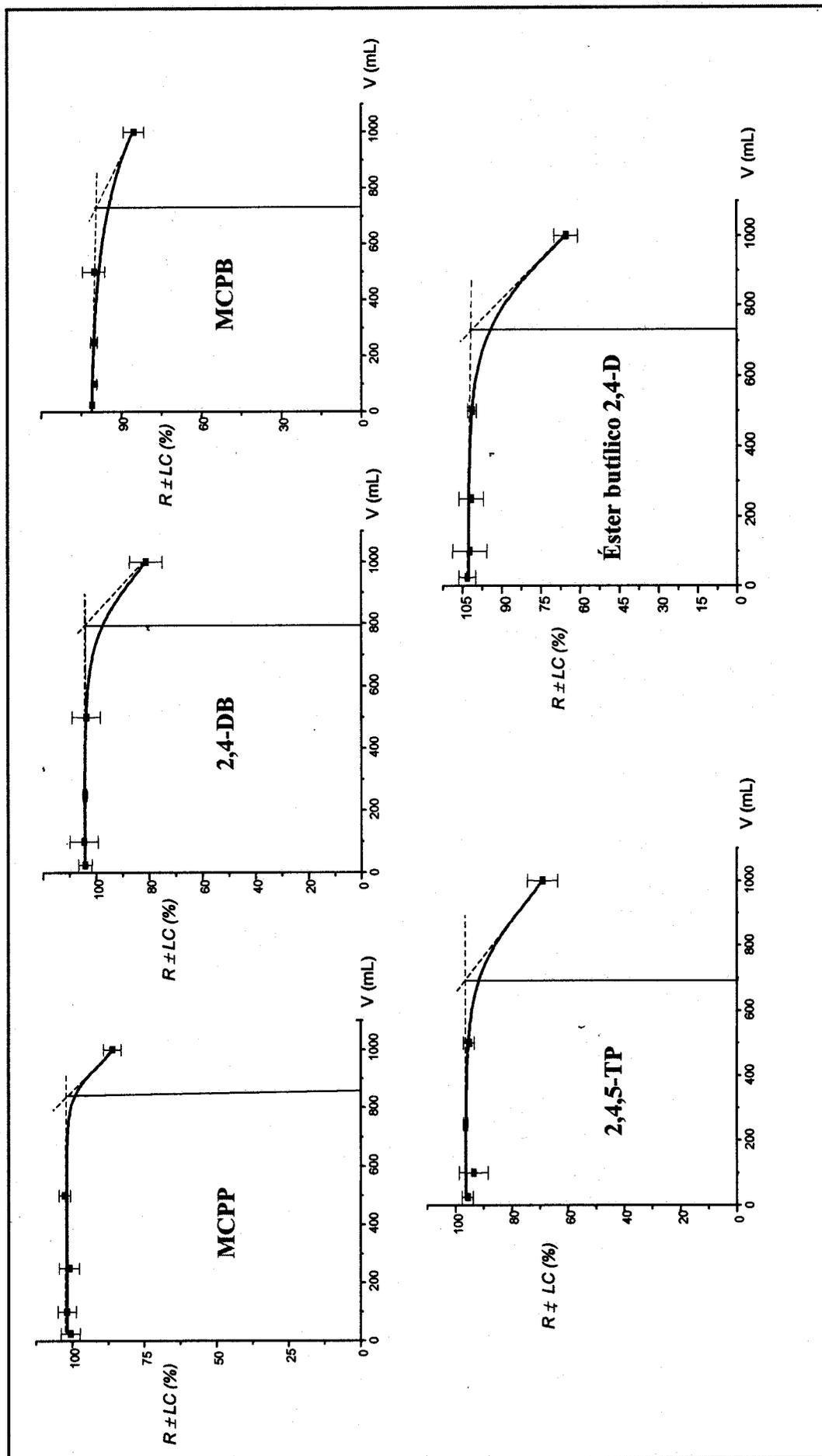


Figura 41 (cont). Curvas de ruptura en la condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente MFE® Polímero SAX.



□ *LIDA Sep-IC-OH*

En lo que respecta al adsorbente polimérico de intercambio de aniones Lida Sep-IC-OH, los estudios realizados previamente por S. Menor han mostrado volúmenes de ruptura para los fenoxiácidos en forma ácida entre 70 y 410 mL. De este modo, únicamente se ha evaluado la recuperación con el volumen de disolución preconcentrado para los ésteres metílico y butílico de 2,4-D.

Según el procedimiento de la sección experimental descrito en 3.1.3, se han introducido volúmenes de disolución a través del adsorbente en el intervalo de 10 a 750 mL, con cantidades de 0.30 y 1.5 μg del éster metílico y butílico de 2,4-D respectivamente. Como en casos anteriores, los volúmenes de ruptura se han estimado mediante las correspondientes curvas. Así, se ha obtenido un volumen de ruptura de 225 mL para el éster metílico de 2,4-D y de 370 mL para su éster butílico.

En general, los volúmenes de ruptura han sido mayores para todos los herbicidas en este adsorbente que en el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, a excepción del MCPP, que ha mostrado un volumen menor (70 mL). Respecto al adsorbente MFE[®] Polímero SAX, el volumen de disolución que se puede introducir sin pérdida de recuperación es considerablemente menor.

□ *OASIS[®] MCX*

En este adsorbente, los volúmenes de ruptura de los fenoxiácidos estudiados tanto en forma ácida como de ésteres, se han determinado siguiendo el procedimiento 3.1.4 de la sección experimental, mediante preconcentración de disoluciones acuosas con una cantidad del éster butílico de 2,4-D de 1.5 μg y cantidades del resto herbicidas de 0.30 μg . Los volúmenes de disolución han estado comprendidos entre 25.0-1000 mL.

La figura 42 muestra la variación de la recuperación en las condiciones óptimas de SPE, así como la estimación de los diferentes volúmenes de ruptura. En ella se puede apreciar que las recuperaciones de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D varían entre el 89 y 101% cuando se preconcentra un volumen de disolución de 1000 mL, por lo que al menos este volumen se puede introducir a través del adsorbente sin pérdida considerable de analito. Los herbicidas MCPA, 2,4-DB, MCPB y éster metílico de 2,4-D, han presentado recuperaciones en el intervalo 95-101% hasta un volumen de 500 mL, a partir del cual se ha producido una disminución considerable en la recuperación.

Figura 42. Curvas de ruptura en la condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente OASIS® MCX.

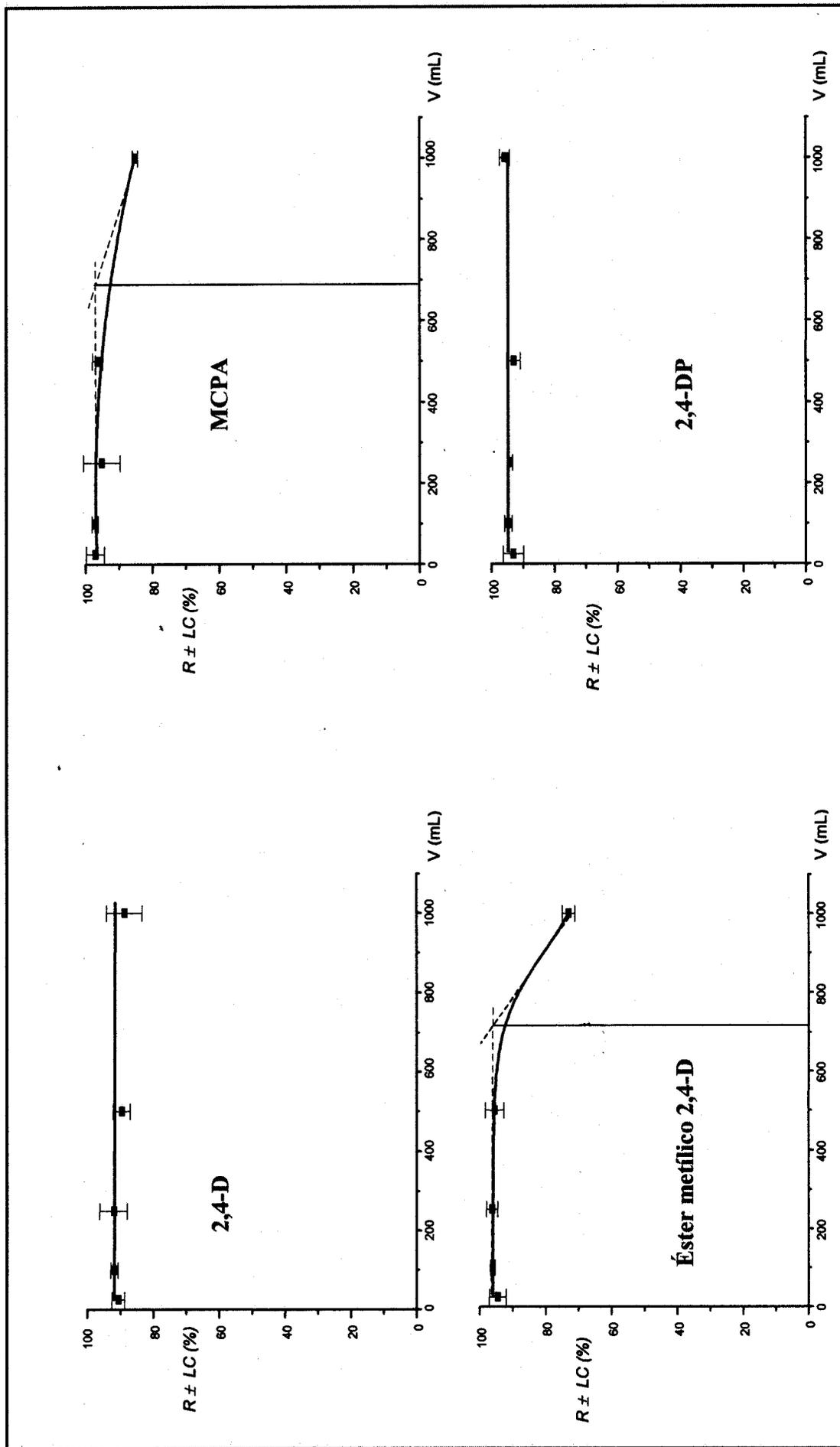
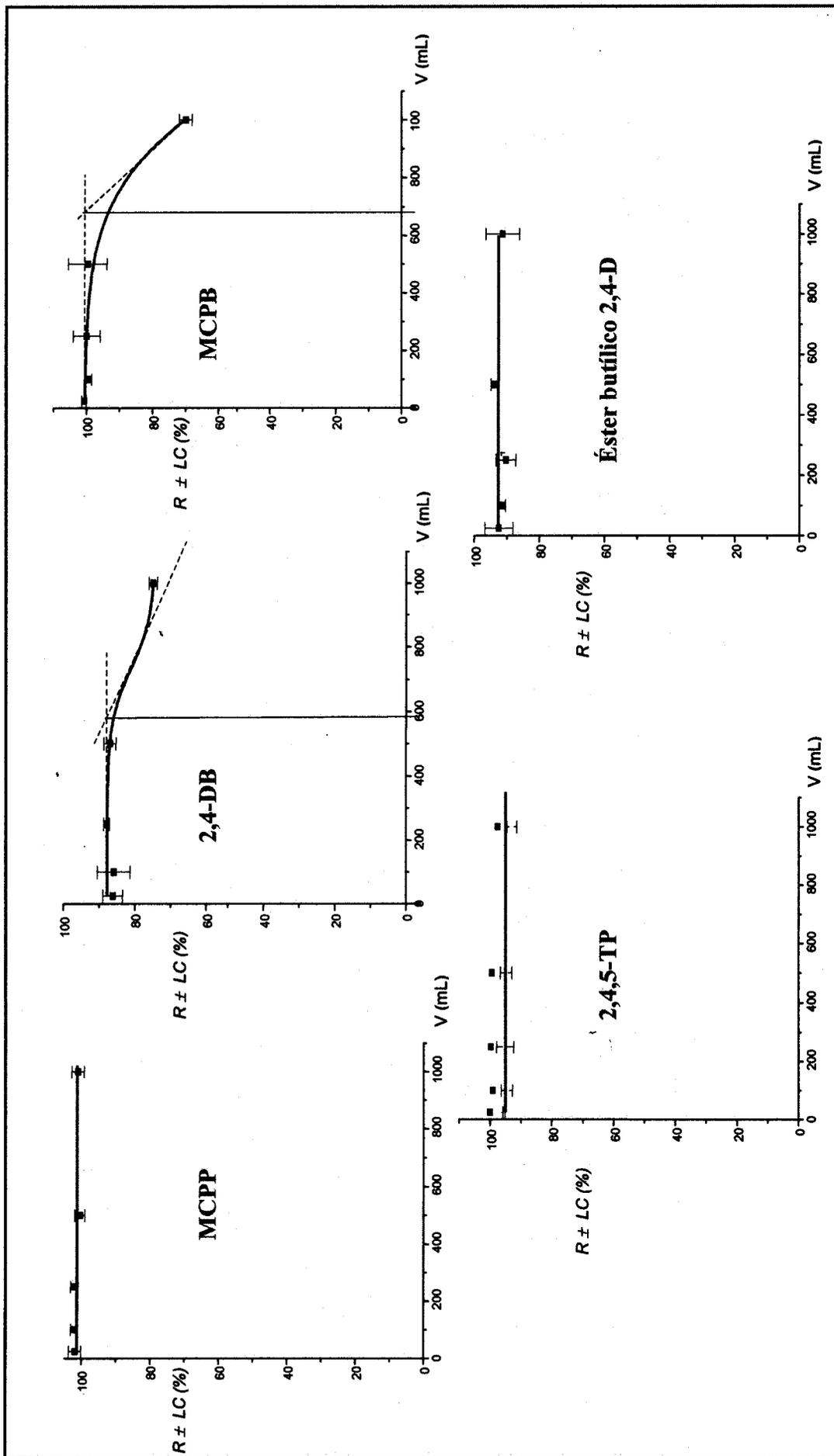


Figura 42 (cont). Curvas de ruptura en las condiciones óptimas de retención y elución en el adsorbente OASIS® MCX.



Los volúmenes de ruptura obtenidos a través de las curvas mostradas en la figura 45 se muestran en la tabla 51.

Tabla 51
Volúmenes de ruptura de los herbicidas fenoxiácido en el adsorbente polimérico OASIS® MCX

| <i>HERBICIDA</i> | <i>VOLUMEN DE RUPTURA (mL)</i> |
|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>2,4-D</i> | >1000 |
| <i>MCPA</i> | 685 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 715 |
| <i>2,4-DP</i> | >1000 |
| <i>MCPP</i> | >1000 |
| <i>2,4-DB</i> | 585 |
| <i>MCPB</i> | 675 |
| <i>2,4,5-TP</i> | >1000 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | >1000 |

Como se puede observar en la tabla anterior, los fenoxiácidos MCPA, 2,4-DB, MCPB y éster metílico de 2,4-D han presentado volúmenes de ruptura entre 585 y 715 mL, mientras que para el resto de analitos, no se ha observado pérdida de recuperación en el intervalo de volumen considerado, lo que indica la fuerte retención de todos ellos en este polímero de intercambio catiónico.

A través del estudio realizado de recuperación con el volumen de disolución, se puede deducir la utilidad de las curvas de ruptura para estimar la capacidad de retención de los distintos adsorbentes y el grado de dilución que puede presentar la muestra preconcentrada.

El adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS, ha mostrado los volúmenes de ruptura más pequeños para algunos de los herbicidas estudiados, como el MCPA, MCPB y 2,4-DB, que al ser los analitos peor retenidos presentan volúmenes de ruptura alrededor de 25 mL, lo que puede limitar los volúmenes tratados de muestra y los factores de preconcentración conseguidos.

La ruptura en el adsorbente Lida-Sep IC-OH se produce en un intervalo de volumen mayor que en el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, pero en general, sus volúmenes son menores que los determinados en los adsorbentes poliméricos MFE[®] Polímero SAX y OASIS[®] MCX, que entre todos los evaluados, han mostrado los mayores volúmenes de ruptura. Ambos poseen buena capacidad para la retención de herbicidas fenoxiácido, pero únicamente los cartuchos OASIS[®] MCX permiten introducir volúmenes mayores de 1000 mL para algunos de ellos.

Por otra parte, los volúmenes de ruptura de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D en cada uno de los adsorbentes, difieren de forma considerable respecto al volumen del herbicida 2,4-D, y en algunos casos, como en el adsorbente OASIS[®] MCX, también entre sí. Este hecho pone de manifiesto las distintas propiedades de retención y elución de los herbicidas en forma ácida y de ésteres.

En la tabla 52, se presenta un resumen del estudio llevado a cabo para caracterizar los diferentes adsorbentes en función del pH de retención, naturaleza del eluyente y volumen de elución. Las condiciones seleccionadas para la extracción en fase sólida de los herbicidas fenoxiácido en cada uno de ellos, también se incluyen en la tabla, así como los volúmenes de ruptura estimados en estas condiciones.

Tabla 52
Evaluación de adsorbentes en base gel de sílice y polimérica. Condiciones adecuadas para la SPE de herbicidas fenoxiácido

| ADSORBENTE | PARÁMETRO | | | | | | Volumen de ruptura (mL) |
|---------------------------|-----------------|--------------|--|--|--------------------------|--------------|---------------------------------|
| | pH de retención | | Naturaleza del disolvente de elución | | Volumen de eluyente (mL) | | |
| | Estudiado | Seleccionado | Estudiado | Seleccionado | Estudiado | Seleccionado | |
| LiChrospher® RP-18-ADS | 3.0-7.0 | 4.0 | MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ | MeOH-s.acuosa | 1.0-2.0 | 1.5 | 25-135 > 250 ^(a) |
| | | | MeOH-s.acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 90:10 (v/v) | 0.8% H ₃ PO ₄ | | | |
| | | | MeOH-s.acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 80:20 (v/v) | 90:10 (v/v) | | | |
| MFE® Polymer SAX | 0-11.0 | 3.0 | 90-40 % MeOH-s.acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ | MeOH-s.acuosa | 2.0-10.0 | 5.0 | 300-860 |
| | | | 90-20 % Acetonitrilo-s.acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ | 0.8% H ₃ PO ₄ 80:20 (v/v) | | | |
| Lida Sep-IC-OH | 1.0-10.0 | 1.0 | MeOH 60 mM HNO ₃ | MeOH 60 mM HNO ₃ | 1.0-3.0 | 2.0 | 70-410 |
| OASIS® MCX | 0-2.0 | 1.0 | MeOH-60 mM HCl MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ Acetonitrilo-60 mM HCl | MeOH 0.8% H ₃ PO ₄ | 1.0-2.0 | 1.5 | 585-715 ^(b) >1000 |

^(a) éster butílico 2,4-D, ^(b) MCPA, 2,4-DB, MCPB y éster metílico 2,4,-D

3.2. PRECONCENTRACIÓN EN LÍNEA CON EL ADSORBENTE MFE[®] POLÍMERO SAX Y DETERMINACIÓN MEDIANTE cLC

Como se ha visto en el apartado 3.1 de la sección de resultado, la elución de los fenoxiácidos retenidos en los adsorbentes LiChrospher[®] RP-18-ADS, OASIS[®] MCX y Lida Sep-IC-OH, se puede realizar con un volumen de eluyente de 1.5 ó 2.0 mL, que incluso después de la dilución necesaria a un volumen final de 10.0 mL para conseguir la focalización en cabeza de columna, permite alcanzar elevada sensibilidad en su determinación mediante cromatografía líquida capilar.

Por el contrario, el material de hidroxietilmetacrilato MFE[®] Polímero SAX ha presentado un volumen de elución de 5.0 mL, lo que obliga a una dilución mayor del extracto recogido con propósitos de focalización y puede producir pérdida de sensibilidad. Sin embargo, puesto que este adsorbente ha mostrado características adecuadas para la retención y elución y además, se encuentra empaquetado en columna, es presumible la posibilidad de acoplamiento en línea para incrementar la sensibilidad de la detección. En este sentido, la evaporación de parte del disolvente de la fracción eluida no es un procedimiento adecuado, puesto que tal y como se ha podido comprobar, se producen importantes pérdidas por degradación y/o volatilización tanto del herbicida 2,4-D como de sus ésteres metílico y butílico.

3.2.1. OPTIMIZACIÓN DEL ACOPLAMIENTO LC-cLC

Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, se ha procedido a optimizar el acoplamiento en línea de la columna empaquetada con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX (150 x 4.6 mm I.D.) y la columna capilar de fase inversa Hypersil C₁₈ BDS (150 mm x 0.3 mm I.D.), con objeto de transferir completamente los analitos de interés desde la columna de SPE a la columna analítica para su posterior separación y determinación cromatográfica. El acoplamiento de las columnas se ha realizado según las condiciones y el esquema descrito en el apartado 3.2 de la sección experimental (figura 18).

Para asegurar la trazabilidad del método de preconcentración en línea y debido a las características intrínsecas de los procedimientos basados en la técnica de columnas acopladas, resulta imprescindible un control estricto de los tiempos de operación, fundamentalmente de la etapa de purificación y de transferencia. Además de estos parámetros, se debe seleccionar cuidadosamente el disolvente de elución y cuando la determinación se realice mediante cLC, controlar la etapa de focalización para que sea efectiva y proporcione aceptable resolución.

La separación y determinación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D en la columna analítica, se ha llevado a cabo con la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 45:55 (v/v), utilizando el programa de temperatura descrito en el procedimiento 2.2.2.1 con una etapa isotérmica inicial a 20 °C durante un tiempo de 35 minutos.

□ *Naturaleza y composición del eluyente*

Cuando la preconcentración se realiza en línea con la determinación cromatográfica, el eluyente no sólo se debe elegir por su capacidad para la elución completa de los analitos retenidos en el adsorbente, sino también en función de su compatibilidad con la fase móvil utilizada en la separación. En el caso particular de la cromatografía líquida capilar, el eluyente también debe contribuir en la medida de lo posible a la focalización en cabeza de columna para evitar pérdida de resolución y obtener elevada sensibilidad.

La selección del eluyente, se ha llevado a cabo considerando los resultados obtenidos en el apartado 3.1.3.2 de resultados, correspondientes a la recuperación de los fenoxiácidos eluidos del adsorbente MFE[®] Polímero SAX, cuando la SPE se ha realizado fuera de línea utilizando como eluyente mezclas de MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄. Idealmente, la etapa de la elución se debería realizar con la propia fase móvil, MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 45:55 (v/v), pero como se puede observar en la tabla 46, contenidos de metanol inferiores al 60% proporcionan bajos o nulos porcentajes de recuperación para algunos de los herbicidas estudiados.

A través del compromiso entre la proporción de disolvente orgánico y la recuperación, se ha escogido la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 80:20 (v/v) como óptimo eluyente para la desorción de los analitos retenidos en el adsorbente durante la SPE en línea. Esta composición, proporciona recuperaciones aceptables para todos los herbicidas con el menor porcentaje de modificador orgánico y es por tanto, la más compatible o similar a la fase móvil utilizada para la separación analítica. Además, la fracción acuosa de la mezcla puede contribuir a la focalización en columna.

□ *Focalización en cabeza de columna*

Como se ha puesto de manifiesto en el apartado 1.2.2.4 de resultados, para focalizar los analitos se necesita que la fuerza eluotrópica de la disolución de inyección sea considerablemente menor que la de la fase móvil utilizada en la separación.

En este caso, si se transfiere directamente la fracción eluida del adsorbente polimérico, que contiene una proporción de metanol del 80%, a la columna analítica, donde se realiza la separación con una fase móvil que contiene un 45% de metanol, cabe pensar que no se producirá la separación de los herbicidas de interés, ya que el disolvente de inyección impide su retención en la columna cromatográfica.

Para solucionar este problema surge la necesidad de realizar una etapa de focalización, que permite concentrar los analitos en cabeza de columna e incrementar la sensibilidad de la determinación. Experimentalmente, esta etapa se ha llevado a cabo por inyección de un volumen de 20.0 μL de una mezcla agua-metanol 90:10 (v/v) a un tiempo de 1.50 minutos tras la etapa de purificación. La estimación del tiempo de focalización, que es el tiempo necesario para que los herbicidas alcancen el bucle de inyección, se ha realizado considerando la longitud y el diámetro del tubo que recorren los analitos desde la salida de la columna preparativa (MFE[®] Polímero SAX) hasta la cabeza de la columna analítica, calculando el volumen correspondiente a este recorrido y a través del caudal, el tiempo de operación.

En las figuras 43 y 44, se muestran respectivamente, los cromatogramas obtenidos con y sin focalización. En ellas se puede apreciar que cuando no hay focalización no se produce la separación de los herbicidas de interés, por lo que es una de las etapas limitantes del acoplamiento LC-cLC.

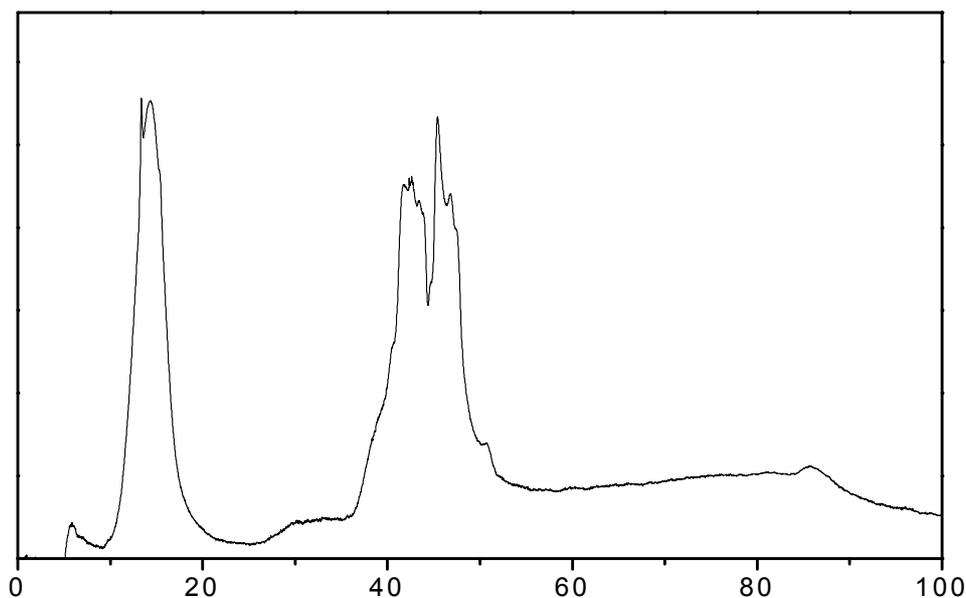


Figura 43. Cromatograma de una mezcla con 200 μg de 2,4-D y 50 μg del resto de herbicidas sin etapa de focalización en columna, con un tiempo de purificación de 4.6 min y un tiempo de transferencia de 1.0 min.

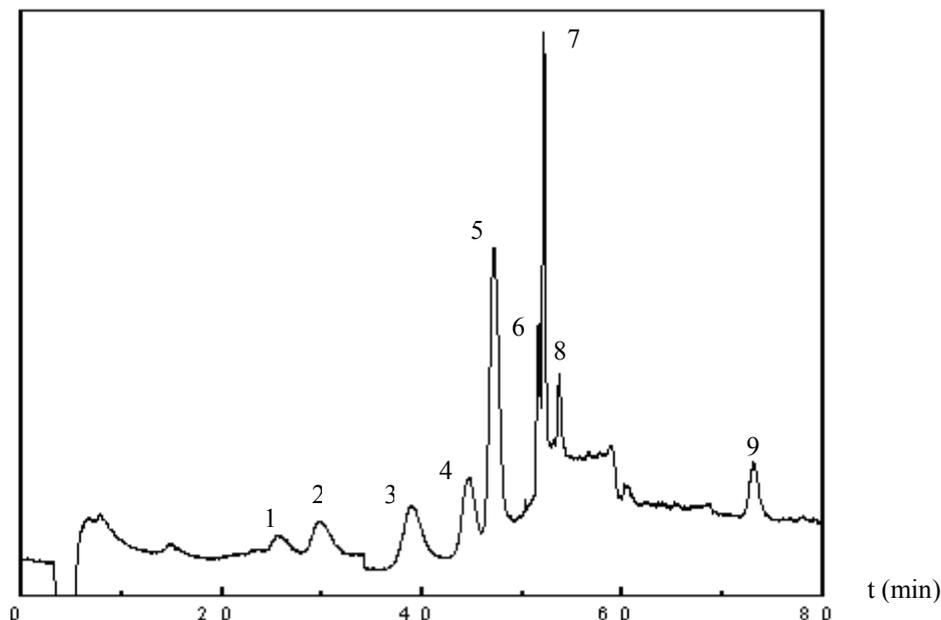


Figura 44. Cromatograma de una mezcla con 200 μg de 2,4-D y 50 μg del resto de herbicidas con focalización en cabeza de columna, un tiempo de purificación de 4.6 min y un tiempo de transferencia de 1.0 min. 1:2,4-D, 2:MCPA, 3:éster metílico 2,4-D, 4:2,4-DP, 5:MCP, 6:2,4-DB, 7:MCPB, 8:2,4,5-TP, 9:éster butílico 2,4-D.

□ *Volumen/tiempo de purificación*

El volumen máximo de purificación, que constituye otro parámetro importante del acoplamiento LC-cLC, se ha determinado conectando la salida de la columna preparativa a un detector UV/VIS (mod. Beckman) e introduciendo a través del adsorbente MFE[®] Polímero SAX, 25 mL de disoluciones acuosas con 2.0, 4.0 y 10 μg de cada uno de los herbicidas a un caudal de 2.0 mL min⁻¹. Después de la etapa de lavado y siguiendo el procedimiento experimental 3.2 (tabla 25), se ha monitorizado la elución a una longitud de onda de 232 nm. El tiempo del máximo registrado de absorbancia, corresponde al tiempo de purificación que se debe aplicar en el procedimiento.

En todos los casos, independientemente de la cantidad preconcentrada, se ha obtenido un valor de 4.6 minutos, que equivale a un volumen de purificación de 2.3 mL. Pequeñas variaciones de este tiempo, pueden producir que no se transfiera a la columna analítica la fracción correspondiente al máximo de absorbancia. Además, y puesto que los resultados de la transferencia de masa no siempre son reproducibles, resulta necesaria la utilización de un patrón interno, que al relativizar la respuesta obtenida, permite minimizar algunas de las causas que producen variación en los tiempos de operación.

El *patrón o estándar interno* tiene que cumplir determinados requisitos para su utilización. Debe ser un compuesto que no se encuentre habitualmente en las muestras junto con los fenoxiácidos, por lo que no puede ser ninguno de sus productos de degradación ni ningún otro pesticida. Además, se debe retener en la columna empaquetada con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX y desorber con el eluyente seleccionado. Del mismo modo, se debe retener en la columna utilizada para la separación y no interferir en la determinación cromatográfica con ninguno de los analitos de interés.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ha evaluado la capacidad del tribromofenol y del 2,6-di-isopropilfenol como patrón interno durante el procedimiento en línea de extracción, preconcentración y determinación cromatográfica. El tribromofenol es un fungicida empleado habitualmente en la madera aserrada mientras que el 2,6-di-isopropilfenol es un conocido anestésico, por lo que no cabe esperar su presencia en matrices con residuos de herbicidas fenoxiácido.

Previamente, para evaluar la retención y elución ambos patrones internos en la columna preparativa MFE[®] Polímero SAX, se ha preconcentrado fuera de línea 25.0 mL de una disolución acuosa a pH 3 con cantidades de cada uno de ellos en el intervalo comprendido entre 2.0 y 20 µg. La elución se ha realizado con 10.0 mL de la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 80:20 (v/v) y las fracciones recogidas se han analizado mediante HPLC convencional con la fase móvil MeOH-tampón fosfato 0.03 M pH 2.4 90:10 (v/v), según el procedimiento experimental 2.2.1. De esta forma, se ha comprobado que tanto el tribromofenol como el 2,6-di-isopropilfenol se retienen y eluyen del adsorbente en las condiciones seleccionadas para la SPE de los herbicidas estudiados.

La reproducibilidad del procedimiento de SPE se ha evaluado análogamente al caso anterior, con cantidades de cada uno ellos de 2.0, 5.0, 10 y 20 µg. La repetibilidad en cambio, se ha estimado para un total de tres determinaciones con una cantidad fija de patrón interno de 10 µg. A través de las áreas de pico cromatográfico, se han determinado parámetros estadísticos como la desviación estándar, el límite de confianza a un 95 % de probabilidad y el coeficiente de variación. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 53.

Tabla 53
Repetitividad y reproducibilidad de las áreas de pico cromatográfico en el proceso de retención/elución de tribromofenol y 2,6-di-isopropilfenol en el adsorbente MFE® Polímero SAX

| <i>tribromofenol</i> | | | | <i>2,6-di-isopropilfenol</i> | | | |
|------------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------|------------------------------|------------------------|-----------------------|---------------------|
| Repetitividad ^(a) | Reproducibilidad | | | Repetitividad ^(a) | Reproducibilidad | | |
| σ_{n-1} : 468 | m (μg) | Relación área/masa | σ_{n-1} : 160 | σ_{n-1} : 423 | m (μg) | Relación área/masa | σ_{n-1} : 55 |
| <i>LC</i> : 856 | 2 | 3900 | <i>LC</i> : 294 | <i>LC</i> : 776 | 2 | 459 | <i>LC</i> : 101 |
| | 5 | 3754 | | | 5 | 502 | |
| | 10 | 3736 | | | 10 | 545 | |
| <i>CV</i> : 1% | 20 | 3512 | <i>CV</i> : 4% | <i>CV</i> : 8% | 20 | 587 | <i>CV</i> : 11% |

^(a) para una cantidad de patrón interno de 10 μg

Como se deduce de la tabla anterior a través de la relación área/masa y de los coeficientes de variación, la sensibilidad de la detección, la repetibilidad y la reproducibilidad son mayores para el tribromofenol que para el 2,6-di-isopropilfenol. Sin embargo, cuando se ha llevado a cabo la preconcentración en línea de una mezcla de los herbicidas con una cantidad de 50 μg de tribromofenol, un tiempo de purificación de 4.6 min y un tiempo de transferencia de 1.0 min, se ha observado solapamiento entre los picos cromatográficos correspondientes al tribromofenol y al herbicida MCPP, por lo que su utilización no ha resultado adecuada.

A diferencia del tribromofenol, el 2,6-di-isopropilfenol se ha eluido de la columna analítica a un tiempo de retención intermedio entre el tiempo del 2,4,5-TP y el del éster butílico de 2,4-D, por lo que al no interferir en la separación cromatográfica y al permitir la determinación de todos los herbicidas estudiados, se ha escogido como patrón interno.

Para asegurar la transferencia de una porción del eluato con todos los analitos de interés a la columna de separación, se ha procedido a ajustar el tiempo de purificación determinado anteriormente de 4.6 min. Para ello, se ha manteniendo constante un tiempo de transferencia de 1.0 min y se han preconcentrado 25.0 mL de disoluciones acuosas con 200 μg de 2,4-D, 50 μg de 2,6-di-isopropilfenol y 50 μg del resto de herbicidas. Los tiempos aplicados de purificación han estado comprendidos en el intervalo de 4.4 a 5.1 min y los cromatogramas obtenidos para cada uno de ellos, se incluyen en la figura 45.

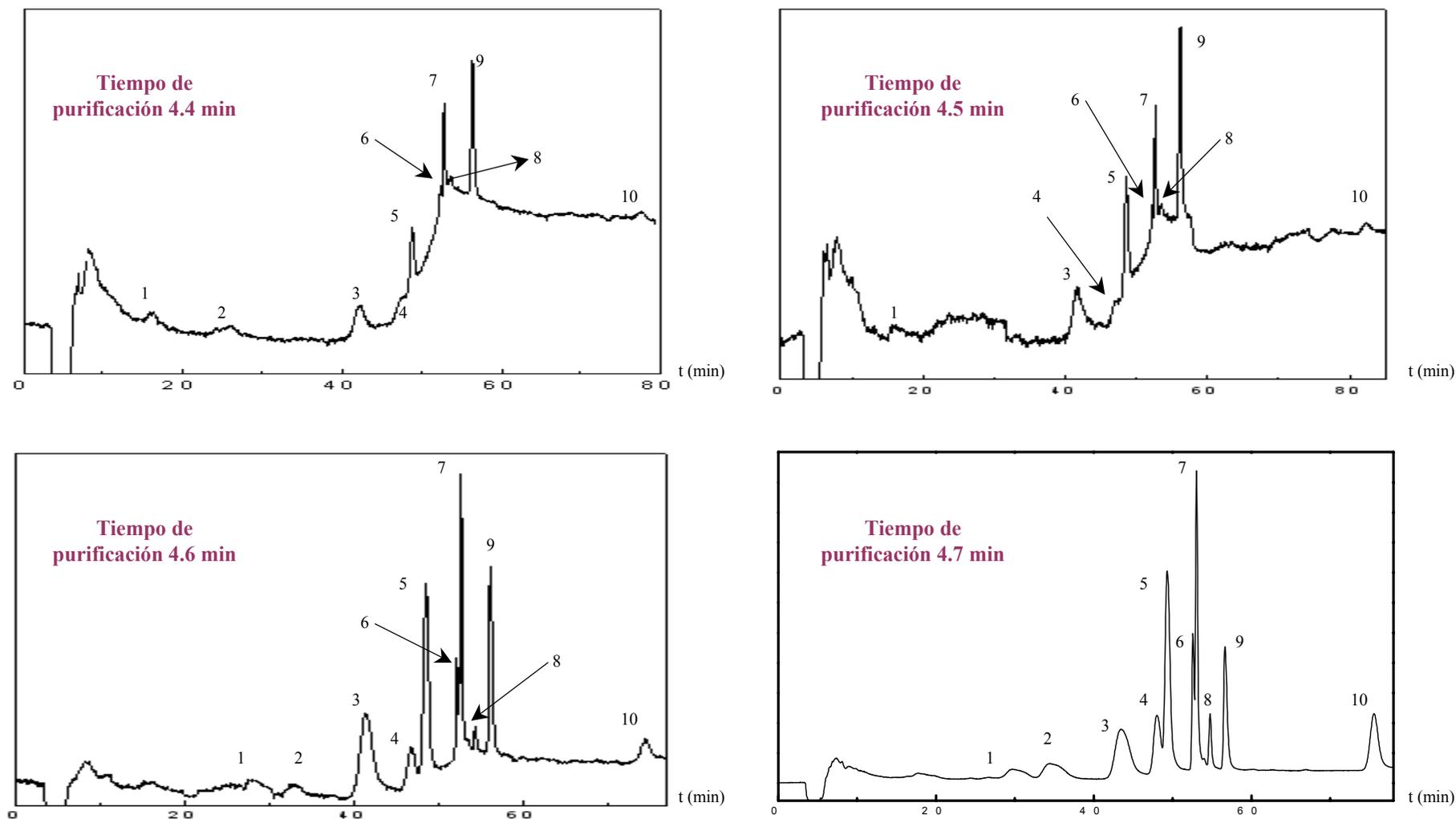


Figura 45. Influencia del tiempo de purificación en la determinación mediante LC-cLC. (1:2,4-D, 2:MCPA, 3:éster metílico 2,4-D, 4:2,4-DP, 5:MCPP, 6:2,4-DB, 7:MCPB, 8:2,4,5-TP, 9:patrón interno de 2,6-diisopropilfenol, 10:éster butílico 2,4-D).

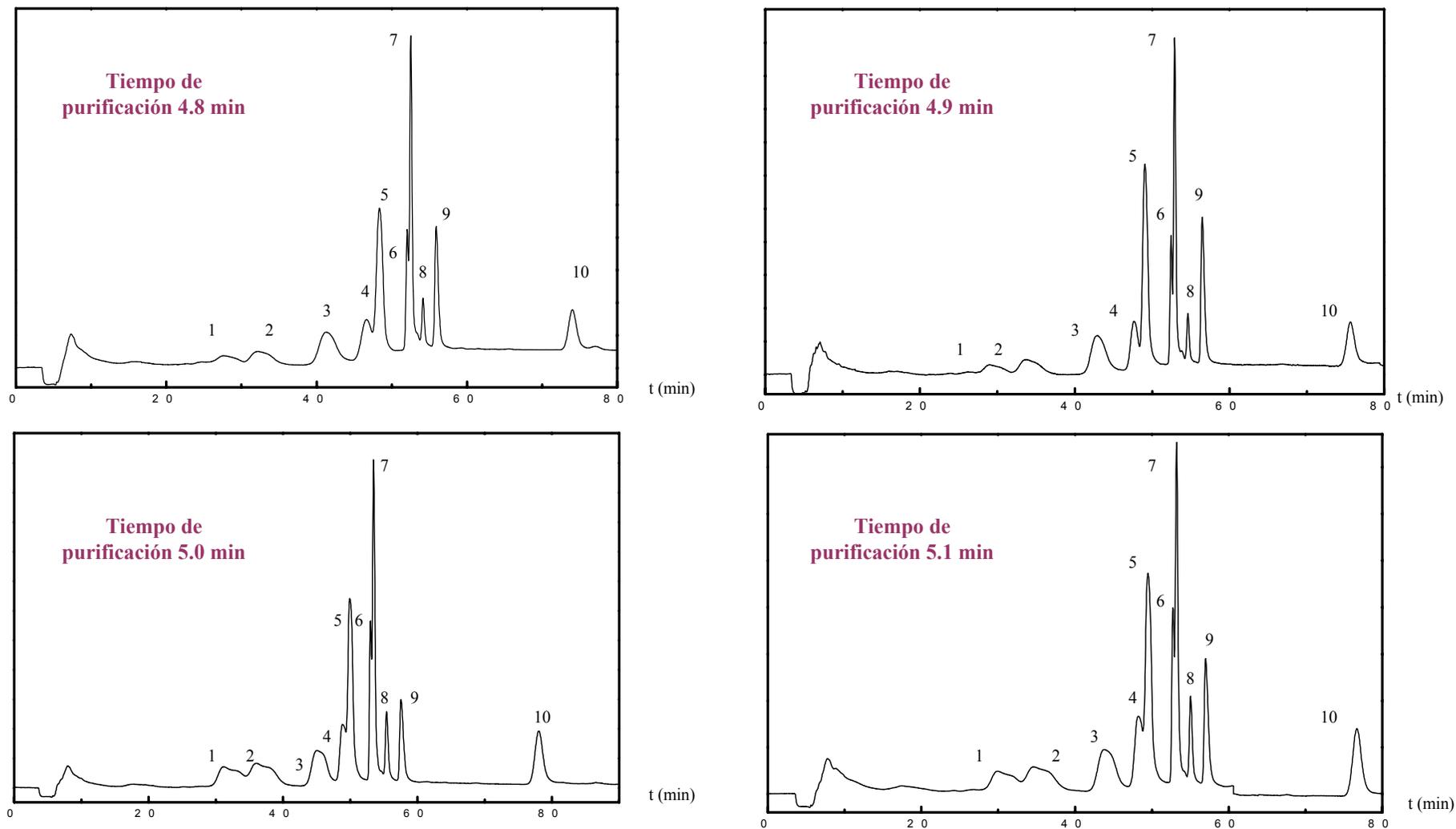


Figura 45 (cont). Influencia del tiempo de purificación en la determinación mediante LC-cLC. (1:2,4-D, 2:MCPA, 3:éster metílico 2,4-D, 4:2,4-DP, 5:MCPP, 6:2,4-DB, 7:MCPB, 8:2,4,5-TP, 9:patrón interno de 2,6-diisopropilfenol, 10:éster butílico 2,4-D).

Como se puede observar en los cromatogramas de la figura anterior, cuando el tiempo de purificación se establece en 4.4, 4.5 ó 4.6 min, los picos cromatográficos correspondientes a algunos de los herbicidas, como por ejemplo el 2,4-D y el MCPA, no se observan claramente y son muy difíciles de cuantificar. Mejores resultados se obtienen con los restantes tiempos de purificación, puesto que los herbicidas aparecen claramente identificados y se pueden cuantificar sin dificultad, aunque con los tiempos de 5.0 y 5.1 min, la asimetría y anchura de pico de los herbicidas 2,4-D y MCPA es considerable. Considerando el área de pico cromatográfico, y por tanto la sensibilidad, se ha seleccionado un tiempo óptimo para la etapa de purificación de 4.8 min, que corresponde a un volumen de 2.4 mL de eluyente.

□ *Volumen/tiempo de transferencia*

Las condiciones finales de acoplamiento LC-cLC, una vez determinado el volumen o tiempo óptimo de purificación, se han obtenido optimizando el tiempo de transferencia, que debe permitir la introducción de una cantidad adecuada de todos los analitos de interés en la columna analítica para su posterior separación. Cuanto mayor es su valor, mayor es la cantidad eluida del adsorbente y por tanto, la cantidad transferida a la columna analítica, obteniéndose elevada sensibilidad. Sin embargo, a medida que se incrementa el tiempo de transferencia, el solapamiento cromatográfico es mayor, debido al aumento en la anchura de pico.

Con el fin de obtener las mejores condiciones de acoplamiento, se ha evaluado la influencia del tiempo de transferencia en la separación y determinación cromatográfica, introduciendo a través del adsorbente una disolución acuosa de 25.0 mL al pH óptimo de retención (pH 3.0), con una cantidad de 200 μg de 2,4-D y 50 μg del resto de herbicidas. La elución se ha realizado a partir del tiempo correspondiente al volumen de purificación determinado anteriormente (4.8 min), a un caudal de 0.5 mL min^{-1} con el eluyente metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v), durante un tiempo de 1.0, 2.0 y 3.0 minutos, transfiriendo a la columna analítica un volumen de muestra de 10.0, 20.0 y 30.0 μL respectivamente.

Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 46.

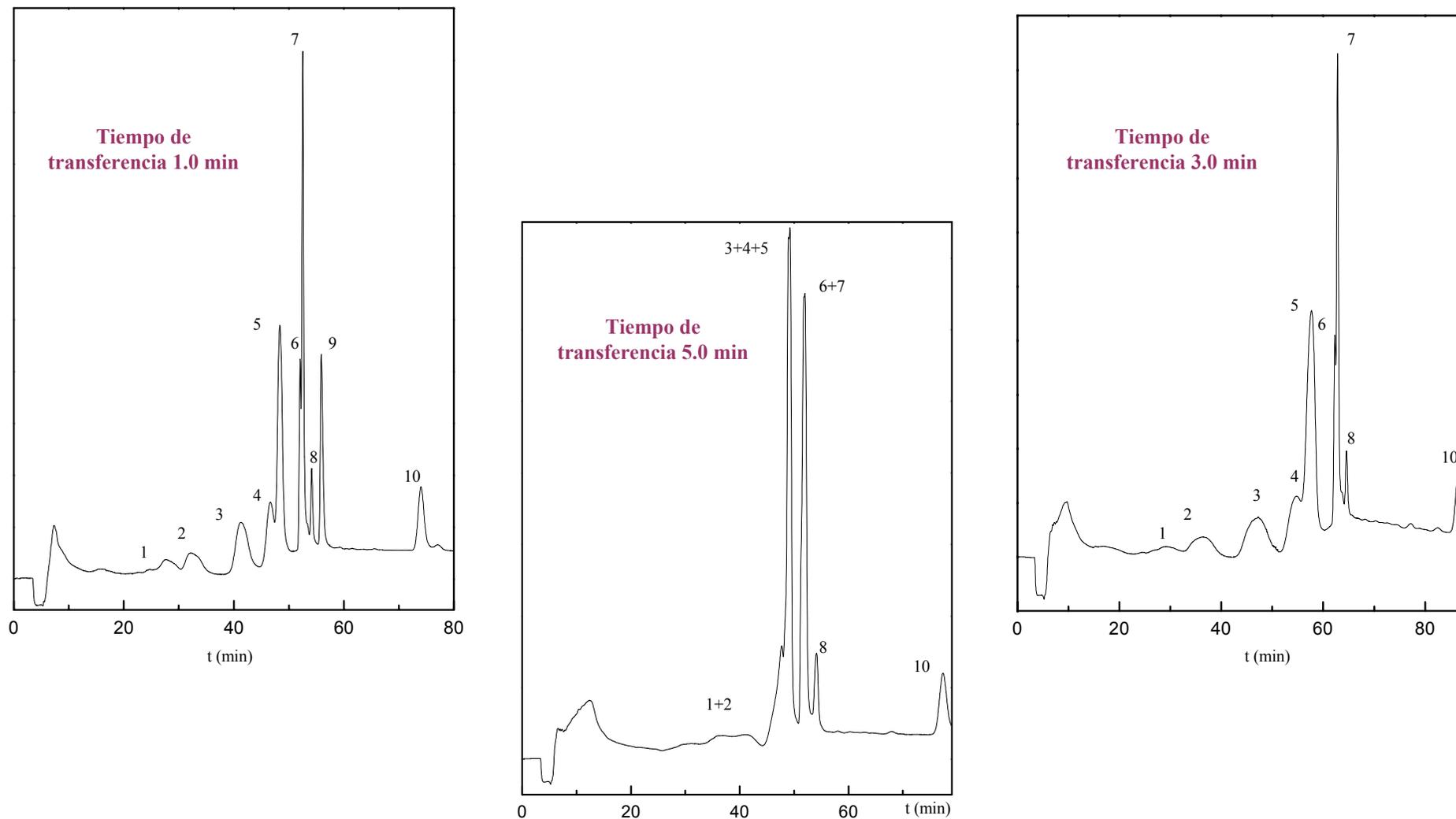


Figura 46. Influencia del tiempo de transferencia en determinación mediante LC-cLC. (1:2,4-D, 2:MCPA, 3:éster metílico 2,4-D, 4:2,4-DP, 5:MCPP, 6:2,4-DB, 7:MCPB, 8:2,4,5-TP, 9:patrón interno de 2,6-diisopropilfenol, 10:éster butílico 2,4-D).

Como se aprecia en el cromatograma de la figura 46, cuando la transferencia se realiza durante 1.0 min se obtienen picos relativamente estrechos, especialmente a partir del gradiente térmico aplicado para la separación. Con un tiempo de transferencia mayor, 3.0 min, se produce un ensanchamiento de pico considerable, que es más pronunciado para los primeros herbicidas eluidos, de forma que la detección y cuantificación de alguno de ellos como el 2,4-D, es claramente dificultosa. Por otro lado, cuando se fija un tiempo de transferencia de 5.0 min, no se consigue la separación completa de todos los analitos por el elevado grado de solapamiento entre ellos, por lo que el aumento del tiempo de transferencia afecta desfavorablemente a la separación.

A través del compromiso entre la anchura de pico, la resolución y la sensibilidad, se ha escogido como tiempo óptimo de transferencia 1.0 minuto. De este modo, los analitos retenidos en el adsorbente se transfieren a la columna analítica para su posterior separación en una fracción de 10.0 μL de eluyente.

Las condiciones finales del acoplamiento de la columna MFE[®] Polímero-SAX con la columna de fase inversa Hypersil C₁₈ BDS, según el esquema mostrado en la figura 18 (procedimiento experimental 3.2), se detallan en la tabla 54.

Tabla 54
Condiciones de extracción y preconcentración en línea para la determinación de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres mediante cLC

| <i>Etapa</i> | <i>Caudal (mL min⁻¹)</i> | <i>Posición de la válvula de intercambio</i> | <i>Tiempo de operación (min)</i> |
|---|---|--|--|
| Acondicionamiento de la columna preparativa con agua milli-Q a pH 3 | 2.0 | 2 | 10.0 |
| Retención de la muestra a pH 3 | 2.0 | 2 | 12.5 |
| Lavado con agua milli-Q | 2.0 | 2 | 2.50 |
| Purificación: elución con MeOH-dis. acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 80:20 (v/v) | 0.5 | 2 | 4.80 |
| Transferencia: elución con MeOH-dis. acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 80:20 (v/v) | 0.5 | 1 | 1.00 |
| Limpieza de la columna con HCl 60 mM en MeOH | 2.0 | 2 | 5.00 |

Durante la etapa de preconcentración en la columna preparativa, la columna analítica utilizada para la separación se ha estabilizado con la fase móvil MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 45:55 (v/v) en la posición 2 de válvula de intercambio. La etapa de purificación y de transferencia, se han controlado mediante la válvula de alta presión de seis vías LabPro Rheodyne mediante control remoto con la bomba Varian ProStar, que además de impulsar la fase móvil a través del sistema cromatográfico, envía los pulsos a la válvula para cambiar su posición según corresponda en cada una de las etapas del procedimiento. El programa utilizado por la bomba se muestra a continuación (tabla 55).

Tabla 55
Programación de las etapas del acoplamiento LC-cLC

| <i>Tiempo (min)</i> | <i>Caudal de fase móvil (mL min⁻¹)</i> | <i>Posición de la válvula</i> | <i>Operación</i> |
|---------------------|---|-------------------------------|--|
| 0-4.8 | 0.010 | 2 | Purificación. A un tiempo de 4.8 min se comienza a registrar el cromatograma correspondiente y se inicia el programa de temperatura utilizado para la separación mediante cLC. |
| 4.8-5.8 | 0.010 | 1 | Transferencia de la fracción eluida de herbicidas a la columna analítica para su posterior separación. |
| 5.8 | 0.010 | 2 | Cambio de la posición de la válvula |
| 6.3 | 0.010 | 2 | Focalización. Inyección de 20 µL de agua-metanol 90:10 (v/v) mediante la válvula de inyección manual del cromatógrafo de líquidos |

El eluyente utilizado para la desorción de los analitos retenidos en el adsorbente, MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 80:20 (v/v), se ha pasado a través de la columna preparativa a un caudal de 0.5 mL min⁻¹ utilizando la bomba Konik-Tech, justo al comienzo del programa descrito en la tabla anterior.

Una vez finalizada la etapa de transferencia y simultáneamente con el registro del cromatograma, se ha procedido a la limpieza y acondicionamiento de la columna preparativa así como a la preconcentración de la siguiente muestra, lo que constituye una ventaja importante en relación al tiempo de análisis.

3.2.2. CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Una vez optimizado el eluyente y las etapas de purificación, focalización y transferencia, se ha procedido a estudiar las características analíticas del método desarrollado para la SPE y determinación de herbicidas fenoxiácido en línea, en las condiciones de acoplamiento seleccionadas (tablas 54 y 55).

□ Límites de detección y cuantificación

La sensibilidad del procedimiento desarrollado con columnas acopladas se ha evaluado a través del límite de detección y de cuantificación. Para ello, se han preconcentrado 100 mL de disoluciones acuosas con cantidades decrecientes de cada uno de los herbicidas hasta encontrar aquella que proporciona un valor de relación señal/ruido de 3 (LD) y 10 (LQ) aproximadamente.

En la tabla 56 se muestran los valores obtenidos de estos parámetros para cada uno de los fenoxiácidos estudiados. En ella se puede apreciar, que los herbicidas determinados con menor sensibilidad son el 2,4-D y el MCPA, a diferencia del resto de analitos y en especial del MCPP, MCPB y 2,4-DB, que presentan límites de detección menores de 1.0 µg.

Tabla 56
Límites de detección y cuantificación del procedimiento de extracción, preconcentración y determinación con columnas acopladas

| <i>HERBICIDA</i> | <i>LD</i> | | <i>LQ</i> | |
|-----------------------------|----------------------------|-------------|----------------------------|-------------|
| | <i>(µg L⁻¹)</i> | <i>(µg)</i> | <i>(µg L⁻¹)</i> | <i>(µg)</i> |
| <i>2,4-D</i> | 63 | 6.3 | 208 | 21 |
| <i>MCPA</i> | 30 | 3.0 | 100 | 10 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 15 | 1.5 | 50 | 5.0 |
| <i>2,4-DP</i> | 16 | 1.6 | 52 | 5.2 |
| <i>MCPP</i> | 4.0 | 0.4 | 12 | 1.2 |
| <i>2,4-DB</i> | 8.0 | 0.8 | 25 | 2.5 |
| <i>MCPB</i> | 4.0 | 0.4 | 12 | 1.2 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 16 | 1.6 | 53 | 5.3 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 22 | 2.2 | 72 | 7.2 |

□ *Calibrado*

El calibrado de los herbicidas en las condiciones optimizadas, se ha realizado introduciendo a través del adsorbente polimérico disoluciones acuosas de 100 mL con diferentes cantidades de los herbicidas y una cantidad fija de 5.0 µg de 2,6-diisopropilfenol, anteriormente seleccionado como patrón interno.

Los intervalos de calibración se han definido considerando los valores correspondientes al límite de cuantificación. Así se han estudiado concentraciones en el margen de 0.250 a 1.50 mg L⁻¹ (2,4-D), 50-250 µg L⁻¹ (éster metílico de 2,4-D, 2,4-DP y 2,4,5-TP), 10-150 µg L⁻¹ (MCPP y MCPB), 25-150 µg L⁻¹ (2,4-DB), 75-250 µg L⁻¹ (éster butílico de 2,4-D) y 100-500 µg L⁻¹ (MCPA).

Para cada concentración estudiada, se ha determinado el área de pico cromatográfico y se ha calculado el factor de respuesta (R_f) según la siguiente ecuación:

$$R_f = (A_s \times C_{is}) / (A_{is} \times C_s)$$

donde A_s corresponde al área del pico del analito, A_{is} al área del compuesto utilizado como patrón interno y C_s - C_{is} , a sus concentraciones respectivas en la disoluciones inyectadas.

Una vez conocidos los factores de respuesta de los fenoxiácidos, la concentración de cada uno de ellos en las muestras se puede determinar fácilmente a través de la expresión:

$$C_s = (A_s \times C_{is}) / (A_{is} \times R_f)$$

Los factores de respuesta de cada herbicida se han obtenido como valor medio de un total de 5 determinaciones y límite de confianza a un 95 % de probabilidad. Como se puede observar en la tabla 57, han estado comprendidos en un intervalo de 0.25-2.24.

Tabla57
Factores de repuesta de los herbicidas fenoxiácido en el procedimiento de extracción, preconcentración y determinación con columnas acopladas

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Intervalo de concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)</i> | <i>$R_f \pm LC$</i> |
|-----------------------------|---|--------------------------------|
| <i>2,4-D</i> | 250-1500 | 0.25 ± 0.02 |
| <i>MCPA</i> | 100-500 | 0.89 ± 0.03 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 50-250 | 1.51 ± 0.05 |
| <i>2,4-DP</i> | | 0.64 ± 0.02 |
| <i>2,4,5-TP</i> | | 0.28 ± 0.03 |
| <i>MCPP</i> | 10-150 | 2.2 ± 0.2 |
| <i>MCPB</i> | | 2.2 ± 0.1 |
| <i>2,4-DB</i> | 25-150 | 0.96 ± 0.09 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 75-250 | 0.67 ± 0.03 |

(n=5)

□ *Reproducibilidad*

La reproducibilidad del proceso de extracción y preconcentración en línea con columnas acopladas, se ha determinado mediante la preconcentración de disoluciones acuosas de 100 mL con 125 μg de 2,4-D, 20 μg de MCPA, éster metílico del 2,4-D, 2,4-DP, 2,4,5-TP, éster butílico del 2,4-D y 8 μg de MCPP, MCPB y 2,4-DB, concentraciones que se encuentran comprendidas en el intervalo de calibración de cada uno de ellos.

Durante el mismo día, se han realizado tres determinaciones y con el valor medio y desviación estándar del área de pico cromatográfico, se ha estimado el coeficiente de variación para cada uno de los herbicidas estudiados, obteniéndose los resultados de la tabla 58.

Como se muestra en dicha tabla, la reproducibilidad, expresada como coeficiente de variación, ha variado entre el 1.1% correspondiente al 2,4-DB y el 7.8% del herbicida MCPA, coeficientes que en cualquier caso, han resultado aceptables para todos ellos.

Tabla 58
Reproducibilidad del procedimiento de extracción, preconcentración y
determinación con columnas acopladas

| <i>HERBICIDA</i> | <i>Concentración</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$) | <i>Valor medio del área</i> <i>de pico (n=3)</i> | S_{n-1} | <i>CV</i> (%) |
|-----------------------------|--|---|-----------|------------------|
| <i>2,4-D</i> | 1250 | 95261 | 2985 | 3.1 |
| <i>MCPA</i> | 200 | 95845 | 7428 | 7.8 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 200 | 186519 | 8764 | 4.7 |
| <i>2,4-DP</i> | 200 | 81463 | 3772 | 4.6 |
| <i>MCPB</i> | 80 | 110104 | 2216 | 2.0 |
| <i>2,4-DB</i> | 80 | 26478 | 2945 | 1.1 |
| <i>MCPB</i> | 80 | 89840 | 4506 | 5.0 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 200 | 37253 | 1425 | 3.8 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 200 | 55162 | 2118 | 3.8 |

(n=3)

De esta forma, se ha optimizado el acoplamiento para la extracción y preconcentración en línea con la separación y determinación mediante cromatografía líquida capilar con detección UV, de nueve herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres, en concentraciones del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$. Además de los valores correspondientes al tiempo de purificación y transferencia, la etapa de focalización ha resultado especialmente crítica, si bien, mediante un procedimiento sencillo de inyección de 20.0 μL de una mezcla agua-metanol 90:10 (v/v), se ha conseguido concentrar los analitos en cabeza de columna y separar en las condiciones cromatográficas seleccionadas.

Respecto al procedimiento realizado en discontinuo en la columna empaquetada con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, ha sido necesaria la modificación del programa de temperatura utilizado en la separación, de modo que la etapa isotérmica inicial a 20°C se ha prolongado desde 25 hasta 35 min, lo cual no ha influido considerablemente en el tiempo de análisis total. Por otra parte, el volumen necesario para eluir completamente a los herbicidas retenidos en el adsorbente durante la SPE en discontinuo ha sido de 5.0 mL, lo que implica una elevada dilución de los extractos recogidos con propósitos de focalización en cLC.

A través del procedimiento en línea, los analitos se han eluido en un volumen de 10.0 μL , que al transferirse directamente a la columna analítica, ha evitado dilución y pérdida de sensibilidad en la determinación.

Sin embargo, como se puede apreciar en la tabla 56 y en el cromatograma de la figura 49, obtenido con un tiempo de purificación de 4.8 min y un tiempo de transferencia de 1.0 min, el herbicida MCPA y en especial, el 2,4-D, han presentado límites elevados de detección que hacen que su determinación sea poco sensible, hecho que constituye la principal desventaja del método desarrollado para la preconcentración en línea de fenoxiácidos.

Para mejorar el acoplamiento, podría resultar conveniente la utilización de una columna empaquetada con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX de dimensiones capilares, lo que contribuiría a incrementar la sensibilidad de la detección optimizando adecuadamente parámetros como el tiempo de transferencia y purificación.

4. APLICACIONES Y DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA DETERMINACIÓN MULTIRESIDUAL DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE cLC EN MUESTRAS COMPLEJAS

Debido a su persistencia, naturaleza polar y solubilidad en agua, los herbicidas fenoxiácido se dispersan con facilidad en el medio ambiente, de modo que sus residuos y productos de degradación se encuentran presentes en gran variedad de matrices. Dependiendo de su forma química (ésteres, ácidos o sales de amina), su toxicidad y comportamiento físico-químico es muy variado, razón por la cual resulta interesante la determinación en sus diferentes formas.

En el presente estudio, con objeto de determinar herbicidas fenoxiácido tanto en forma ácida como de ésteres en muestras complejas, y ante la imposibilidad de llevar a cabo directamente el análisis cromatográfico, se han desarrollado metodologías de tratamiento de muestra que no alteran la forma química de las distintas especies, teniendo en cuenta que procesos como la hidrólisis de la matriz o la calefacción para la eliminación del disolvente de extracción, limitan los procedimientos de preparación de muestras con ésteres de los herbicidas.

Los métodos desarrollados incluyen etapas de extracción, para la eliminación de compuestos interferentes, de preconcentración, debido a los bajos niveles de existencia de los analitos en las muestras y a los límites máximos de residuo permitidos por ley, y de limpieza, para disminuir el efecto perturbador de la materia orgánica coextraída.

Aunque el principal inconveniente de las técnicas de separación y determinación basadas en cromatografía líquida capilar, cLC, es la pequeña cantidad de muestra susceptible de ser inyectada, sus ventajas se encuentran actualmente bien establecidas. En particular, su falta de sensibilidad, como ya se vio en el apartado 1.2.2.4 de resultados, se puede incrementar por inyección de grandes volúmenes de disolución de baja fuerza de elución, y por tanto, mediante procedimientos de focalización o preconcentración en cabeza de columna. De esta forma, en el análisis de trazas y debido a las características particulares de este tipo de cromatografía de líquidos, los métodos de SPE resultan más críticos que en HPLC convencional, puesto que se requieren disoluciones de muestra de baja fuerza eluotrópica con propósitos de focalización.

Por otro lado, también existe una limitación considerable en los procedimientos de evaporación y en los cambios del disolvente del extracto de elución, especialmente cuando se pretende la determinación de herbicidas en forma de ésteres, ya que el riesgo de pérdidas de analito aumenta considerablemente. Así, la etapa de preconcentración y la determinación mediante cLC deben ser altamente compatibles con las metodologías de focalización, y en consecuencia, los adsorbentes de SPE se deben evaluar cuidadosamente.

4.1. ESTUDIOS PREVIOS

Las características del medio en que se encuentran los herbicidas, y fundamentalmente el pH y la temperatura, condicionan sus procesos de transformación. Los metabolitos y productos de degradación pueden ser más tóxicos y persistentes que los compuestos de procedencia, de forma que también contribuyen a la contaminación ambiental y generan problemas de fitotoxicidad.

Los principales productos de degradación de los herbicidas fenoxiácido son clorofenoles como por ejemplo el 2-metil-4-clorofenol, que es un metabolito del MCPA o el 2,4-diclorofenol, que es el producto de descomposición del 2,4-D. Algunos de ellos como el 2,4-DB y los ésteres de 2,4-D se degradan e hidrolizan respectivamente a 2,4-D, el cual a su vez origina el diclorofenol correspondiente.

De este modo, para establecer el medio más adecuado de conservación y evitar la degradación de los herbicidas durante la preparación de la muestra, resulta imprescindible la evaluación de la estabilidad, y en especial, de los herbicidas en forma de ésteres.

En los procedimientos de SPE y como paso previo a la introducción de la muestra a través del adsorbente, resulta necesaria una etapa de filtración con el objeto de eliminar partículas sólidas en suspensión y evitar posibles taponamientos de las columnas o cartuchos de extracción empleados. Algunos autores han observado que los herbicidas fenoxiácido en su forma molecular son altamente hidrofóbicos y que se pueden adsorber a las paredes de los vasos, a la superficie de los filtros y a otros materiales que se encuentran en contacto con las disoluciones acuosas. De esta forma, para evitar pérdidas de los analitos de interés, se deben adoptar precauciones durante la preparación de la muestra, y en consecuencia, seleccionar adecuadamente los materiales de filtración y minimizar el número de recipientes para disminuir el riesgo de pérdidas por adsorción (59).

4.1.1. ESTABILIDAD DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN DISOLUCIONES ACUOSAS A TEMPERATURA AMBIENTE

Para separar y determinar mezclas de 2,4-D junto con sus ésteres metílico y butílico, y por tanto, para evitar la hidrólisis los herbicidas en forma de ésteres al ácido correspondiente, resulta necesario establecer las condiciones en que son estables estos analitos, con el fin de realizar un tratamiento de muestra que los mantenga inalterados. Del mismo modo, resulta interesante la determinación de aquellos medios que evitan la descomposición del 2,4-D a 2,4-diclorofenol, y puesto que el primer producto de degradación del 2,4-DB es el herbicida 2,4-D, también de este analito.

Con objeto de evaluar las mejores condiciones de conservación y estimar el tiempo de degradación, siguiendo el procedimiento experimental descrito en 4.1.1, se ha evaluado la estabilidad de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D en agua pura milli-Q, disolución de NaOH 0.1 M, disolución de HCl 0.1 M, tampón acético/acetato 0.1 M pH 4.8, tampón fosfato 0.1 M pH 7.2, tampón amonio/amoniaco 0.1 M pH 9.2 y disolución de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0), mediante cromatografía líquida capilar y espectrofotometría UV/VIS.

Los resultados obtenidos en disoluciones acuosas de HCl y NaOH 0.1 M, han mostrado que los herbicidas en forma ácida, 2,4-D y 2,4-DB, se mantienen estables durante un período de 24 horas. Sin embargo, los ésteres del 2,4-D se hidrolizan inmediatamente en ambos medios, por lo que no resultan adecuados para su conservación.

En agua pura milli-Q, y a través de las absorbancias registradas, se ha observado que los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB no se degradan en 48 horas, por lo que este medio resulta más adecuado para su conservación que la disolución ácida y básica evaluada anteriormente. La proporción hidrolizada de los ésteres de 2,4-D a lo largo del tiempo se ha determinado mediante cLC. Como se puede apreciar en la figura 47, la reacción de hidrólisis de ambos ésteres se produce en un tiempo de 4 horas, y al cabo de 3 días, se completa para el éster butílico del 2,4-D, mientras que para el éster metílico se observa un porcentaje de degradación del 87%.

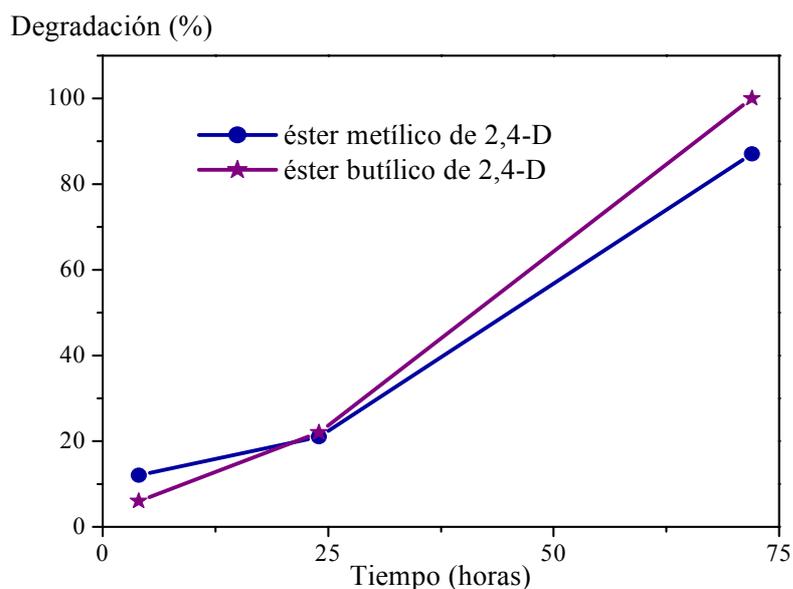


Figura 47. Degradación de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D a lo largo del tiempo en agua pura milli-Q.

También se ha evaluado la estabilidad en medios tamponados a pH 4.8, 7.2 y 9.2, valores correspondientes a la máxima capacidad de tamponamiento de las disoluciones reguladoras empleadas. Mediante cromatografía se pudo comprobar, que si bien estos medios resultan adecuados para la conservación de 2,4-D y 2,4-DB, la cantidad hidrolizada de los herbicidas en forma de ésteres al cabo de 24 horas es considerable en todos ellos, tal y como se puede observar en la tabla 59.

Tabla 59
Degradación de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D a lo largo del tiempo en medios tamponados a diferentes valores de pH

| <i>HERBICIDA</i> | <i>DEGRADACIÓN (%)</i> | | | | | |
|-----------------------------|------------------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|
| | <i>pH 4.8</i> | | <i>pH 7.2</i> | | <i>pH 9.2</i> | |
| | <i>4 h</i> | <i>24 h</i> | <i>4 h</i> | <i>24 h</i> | <i>4 h</i> | <i>24 h</i> |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 6 | 31 | 13 | 68 | 94 | 100 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 12 | 20 | 26 | 89 | 74 | 100 |

La velocidad de la reacción de hidrólisis y en consecuencia, la proporción hidrolizada de los ésteres de 2,4-D, es tanto mayor cuanto mayor el pH del medio, de forma que en tampón amonio/amoniaco (pH 9.2), la hidrólisis se ha completado para ambos en un período de 24 horas.

A través de la variación de la absorbancia registrada a lo largo del tiempo en la disolución acuosa de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0), se ha determinado que los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB se mantienen estables durante una semana. En lo que respecta a los ésteres metílico y butílico de 2,4-D, mediante cLC se ha observado que no se produce hidrólisis al ácido correspondiente en un tiempo de 24 horas, transcurrido el cual, la proporción hidrolizada de éster metílico y butílico de 2,4-D ha sido del 8 y 20% respectivamente. Al cabo de 72 horas, se han determinado porcentajes de degradación del 63 y 88% para los ésteres metílico y butílico de 2,4-D.

De este modo, los medios más adecuados para evitar la hidrólisis de los herbicidas en forma de ésteres son agua pura milli-Q, donde se mantienen estables durante 4 horas, y disolución acuosa de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0), que además de conservarlos en su forma original durante un periodo de 24 horas, es el medio que proporciona la mayor estabilidad a lo largo del tiempo de los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB. En disolución acuosa de HCl y NaOH 0.1 M, la reacción de hidrólisis del éster metílico y butílico de 2,4-D es inmediata, al contrario que en los medios tamponados con valores de pH comprendidos en el intervalo 4.8-9.2, donde la degradación se produce a las pocas horas, en una proporción que es mayor a medida que aumenta el pH de la disolución. Por otra parte, la hidrólisis ácida de los herbicidas en forma de ésteres es más rápida en medio HCl 0.1 M que en H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0), lo que probablemente esté en relación con la formación de clorhidratos en medio HCl.

Mediante este estudio se puede deducir, que para establecer los procedimientos adecuados de tratamiento de muestra cuando se pretende la determinación simultánea de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres, hay que tener en cuenta que en medios fuertemente ácidos y básicos, los ésteres de 2,4-D se hidrolizan inmediatamente, hecho que limita la procesos de hidrólisis para la destrucción de la matriz orgánica de la muestra. Además, se debe considerar, que en extractos de agua pura su estabilidad es de 4 horas aproximadamente, y que un medio adecuado para su conservación y para el acondicionamiento de las muestras puede ser H_2SO_4 5 mM (pH 2.0).

4.1.2. MATERIALES DE FILTRACIÓN DE MUESTRA

En general, los procedimientos de preparación de muestras complejas incluyen una etapa de filtración, que pretende eliminar partículas sólidas y contribuir a la limpieza de la matriz.

Con este objeto, se pueden utilizar materiales muy diversos, que si bien retienen y eliminan sustancias interferentes, en función de su naturaleza también pueden adsorber los analitos de interés o liberar sustancias orgánicas que interfieren en el análisis cuando se introducen disolventes orgánicos a su través. Así, para evitar los problemas de contaminación, una buena práctica es el lavado del filtro utilizado con disolventes orgánicos como metanol o con agua pura, mientras que para evitar los riesgos de pérdidas por adsorción durante el filtrado de la muestra, se debe seleccionar adecuadamente el material filtrante.

Según el procedimiento descrito en 4.1.2 en la sección experimental, se ha realizado un estudio de recuperación con disoluciones estándar de los herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres, para determinar aquellos materiales que al no retener los analitos de interés, pueden ser adecuados para la filtración de las muestras tratadas. De este modo, se ha evaluado la idoneidad del papel de análisis gravimétrico, placa de vidrio filtrante (G4) y de una amplia variedad de filtros de membrana. Para cada uno estos materiales, se han realizado tres determinaciones y se ha estimado la recuperación a través del valor medio y límite de confianza a un 95% de probabilidad, tal y como se puede observar en la tabla 60.

Tabla 60
Recuperación de herbicidas fenoxiácido después de la filtración de disoluciones acuosas a través de distintos materiales filtrantes (n=3)

| HERBICIDA | <i>R ± LC (%)</i> | | | | | |
|-----------------------------|-------------------------|---------------------------|------------------|---------------|------------------------|----------------------------------|
| | <i>Membranas</i> | | | | <i>Papel de filtro</i> | <i>Placa de vidrio filtrante</i> |
| | <i>Ésteres celulosa</i> | <i>Celulosa MicronSep</i> | <i>Poliéster</i> | <i>Nailon</i> | | |
| <i>2,4-D</i> | 97 ± 1 | 100 ± 2 | 100 ± 1 | 66 ± 2 | 98 ± 2 | 100 ± 6 |
| <i>MCPA</i> | 99 ± 2 | 89 ± 2 | 98 ± 2 | 72 ± 6 | 91 ± 2 | 94 ± 2 |
| <i>Éster metílico 2,4-D</i> | 86 ± 1 | 39 ± 5 | 99 ± 1 | 88 ± 2 | 98 ± 2 | 95 ± 1 |
| <i>2,4-DP</i> | 97 ± 4 | 97 ± 2 | 99 ± 2 | 70 ± 6 | 87 ± 2 | 90 ± 4 |
| <i>MCPB</i> | 98 ± 3 | 98 ± 2 | 97 ± 2 | 73 ± 3 | 98 ± 2 | 97 ± 1 |
| <i>2,4-DB</i> | 99 ± 4 | 73 ± 5 | 98 ± 2 | 64 ± 3 | 96 ± 4 | 101 ± 2 |
| <i>MCPB</i> | 100 ± 3 | 73 ± 2 | 99 ± 1 | 70 ± 4 | 100 ± 3 | 99 ± 3 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 100 ± 3 | 100 ± 1 | 98 ± 4 | 19 ± 8 | 100 ± 2 | 98 ± 3 |
| <i>Éster butílico 2,4-D</i> | 56 ± 3 | 9 ± 1 | 93 ± 2 | 79 ± 2 | 101 ± 2 | 97 ± 2 |

Como se puede deducir de los resultados mostrados en la tabla 60, la utilización de membranas de ésteres de celulosa no resulta adecuada para la filtración de mezclas con herbicidas en forma ácida y de ésteres, puesto que retiene de forma considerable al éster metílico del 2,4-D y en especial, a su éster butílico. Del mismo modo, no resulta adecuada la filtración con la membrana de celulosa MicronSep, ya que además de retener a los herbicidas MCPA, 2,4-DB y MCPB, la recuperación de los ésteres del 2,4-D es todavía menor. Por otra parte, las membranas de nailon han mostrado una adsorción considerable de todos los herbicidas y en mayor proporción el 2,4,5-TP.

Por ello, los únicos materiales que pueden resultar adecuados para la filtración de las muestras que contengan fenoxiácidos son papel de filtro, placa de vidrio filtrante de tamaño de poro controlado (G4) y membrana de poliéster (tamaño de poro 2 µm), puesto que no retienen apreciablemente ni producen pérdidas por adsorción de los analitos estudiados, incluyendo los ésteres del herbicida 2,4-D.

4.2. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO EN MATRICES COMPLEJAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR

Como se ha puesto de manifiesto anteriormente, los métodos de preparación de muestra se deben desarrollar de forma que resulten compatibles con la técnica utilizada para la determinación. En el caso particular de la cromatografía líquida capilar y con el fin de obtener elevada sensibilidad, el extracto con los analitos de interés debe permitir su focalización en cabeza de columna. Por ello, los resultados obtenidos del estudio de las condiciones de inyección (apartado de resultados 1.2.2.4), son especialmente útiles cuando se pretende analizar residuos de herbicidas fenoxiácido en muestras de distinta naturaleza, ya que los procedimientos utilizados en el tratamiento de matrices complejas se encuentran condicionados por la necesidad de obtener extractos de baja fuerza de elución que permitan la focalización y hagan compatible la etapa de extracción y/o preconcentración con la determinación mediante cLC.

Por otro lado, el tratamiento de muestra pueden influir considerablemente en la forma química de los analitos a determinar, produciendo degradaciones y/o transformaciones entre las distintas especies. Así, resulta imprescindible un control estricto del pH, para evitar reacciones de hidrólisis de los herbicidas en forma de ésteres a los ácidos correspondientes, de la temperatura y de los procesos de eliminación del disolvente de extracción, para minimizar la degradación y las pérdidas por volatilidad. Otros factores que pueden resultar especialmente críticos por contribuir a la baja recuperación de los herbicidas de las muestras, son los materiales utilizados para la filtración, que como se ha descrito en el apartado anterior 4.1.2 de resultados, si no se seleccionan adecuadamente pueden adsorber en su superficie a los analitos de interés.

En general, las metodologías desarrolladas en el presente estudio para muestras complejas constan de una etapa de extracción, preconcentración y limpieza antes del análisis cromatográfico, y se encuentran basadas fundamentalmente en métodos de SPE, cuyas ventajas son bien conocidas. El parámetro más importante a optimizar en estos procedimientos es el tipo adsorbente, que se debe elegir en función de la naturaleza de la muestra y de los analitos a determinar. Este adsorbente, debe permitir alcanzar en la medida de lo posible elevados factores de preconcentración, y contribuir a la limpieza de la muestra haciendo mínima la retención de los compuestos interferentes de la matriz, y por ello, proporcionando gran selectividad. De este modo, resulta imprescindible caracterizar los adsorbentes de SPE en función del volumen de ruptura, pH de retención, naturaleza del eluyente y volumen de elución.

Estos parámetros han sido evaluados previamente en el apartado 3.1 de resultados con fenoxiácidos en forma ácida y de ésteres en el material de acceso restringido en base gel de sílice C₁₈ LiChrospher[®] RP-18-ADS; en el copolímero de intercambio de aniones basado en hidroxietilmetacrilato MFE[®] Polímero SAX; en el adsorbente de intercambio de aniones de PS-DVB Lida Sep-IC-OH y en el copolímero de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona de intercambio de cationes OASIS[®] MCX, con objeto de compatibilizar la etapa de extracción, preconcentración y limpieza con los requisitos de las metodologías de inyección y focalización de las técnicas basadas en el empleo de columnas de pequeño diámetro.

Considerando los resultados obtenidos, la elución de los herbicidas retenidos en la mayoría de los materiales evaluados se puede realizar con 1.5 ó 2.0 mL de disolventes orgánicos, volúmenes que aún considerando la dilución necesaria para focalizar en cabeza de columna (volumen final 5.0 ó 10.0 mL), permiten alcanzar elevada sensibilidad en el análisis mediante cLC.

En el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, para eluir completamente los analitos de interés, se necesita un volumen de disolvente de 5.0 mL, de forma que se requiere una mayor dilución de los extractos para focalizar la muestra en cabeza de columna. Este hecho produce una disminución de la sensibilidad lo que en determinadas muestras y para alcanzar las bajas concentraciones permitidas, limita su aplicación como adsorbente de SPE cuando la determinación de los herbicidas se lleva a cabo mediante cLC. En este caso concreto, la sensibilidad no se puede incrementar evaporando parte del disolvente de la fracción recogida de elución, puesto que la calefacción favorece la degradación y/o volatilización tanto del 2,4-D como de sus ésteres metílico y butílico. Tampoco se obtiene una sensibilidad aceptable para los herbicidas 2,4-D y MCPA cuando la SPE y la determinación cromatográfica se realizan en línea mediante la técnica de columnas acopladas (apartado 3.2 de resultados). Así, debido a la incompatibilidad del proceso de SPE con la separación y determinación mediante cromatografía líquida capilar, la utilización de este adsorbente con muestras complejas no resulta adecuada.

Por otra parte, el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS ha mostrado volúmenes de ruptura de apenas 25 mL para los herbicidas MCPA, MCPB y 2,4-DB, lo que puede limitar su aplicación con determinados volúmenes de muestra.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se han desarrollado diferentes metodologías para la determinación de herbicidas fenoxiácido mediante cLC en una amplia variedad de matrices (ambientales, biológicas y alimentos), que se han seleccionado para obtener una problemática diversa de tratamiento de muestra. El análisis multiresidual se ha llevado a cabo en suelo de elevado contenido orgánico, zumo de manzana comercial, hojas frescas de menta y orina masculina humana (apartado 1.2.7 de la sección experimental), utilizando como adsorbentes para la etapa de SPE aquellos que contribuyen además a la limpieza de la matriz. A diferencia de las muestras de orina, en las que los fenoxiácidos se excretan únicamente en forma ácida, en el resto de matrices es recomendable la conservación de los ésteres de los herbicidas para su determinación como tal, debido a su mayor toxicidad.

Las muestras, una vez confirmado que no contienen residuos de los herbicidas estudiados, se han tratado previa adición de determinadas cantidades de analito. En productos vegetales como el zumo de manzana y las hojas de menta fresca, la adición se ha realizado para obtener concentraciones finales del orden de los máximos permitidos por las regulaciones españolas y europeas que establecen un nivel de 0.10 mg kg^{-1} para 2,4-D y MCPA y 0.05 mg kg^{-1} para el resto de herbicidas (56). Puesto que la mayoría de los métodos analíticos incluyen una etapa de hidrólisis previa, la legislación establece límites de residuos únicamente para las formas ácidas, por lo que para los ésteres de los herbicidas, se han utilizado los valores establecidos para sus ácidos correspondientes.

En orina, se han adicionado cantidades que corresponden a niveles de trabajadores expuestos, teniendo en cuenta que para monitorizar población general se requieren límites de detección de los métodos utilizados para su determinación de $1.0 \mu\text{g L}^{-1}$ o menores, que para personas ocupacionalmente expuestas se permiten valores mayores y que para casos de envenenamiento, los límites de detección pueden ser del orden de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (32). En las muestras de suelo, se han tomado como referencia las dosis normales de ácido equivalente para realizar la adición a diferentes niveles (5), que en el caso del 2,4-D y sus ésteres, varían entre 0.3 y 4.5 kg ha^{-1} .

4.2.1. MUESTRAS LÍQUIDAS

4.2.1.1. Zumo de manzana comercial

Para determinar los herbicidas fenoxiácido 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP, éster butílico y metílico de 2,4-D en la matriz de zumo de manzana, se ha desarrollado un método de SPE basado en la utilización del co-polímero de intercambio catiónico polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona (OASIS[®] MCX), que permite la retención de analitos de diversa polaridad en muestras con matrices muy polares. De acuerdo a los resultados obtenidos en el apartado 3.1 (tabla 52), se ha seleccionado para la etapa de retención en el adsorbente un valor de pH 1.0 y como eluyente, se ha utilizado metanol con una proporción de ácido fosfórico del 0.8%.

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo mediante HPLC convencional y cLC con gradiente de composición de fase móvil, con objeto de comparar los resultados obtenidos en esta matriz compleja en términos de sensibilidad y reproducibilidad.

Para el análisis mediante cromatografía líquida capilar, los herbicidas retenidos se han eluido en 1.5 mL y la fracción recogida de elución se ha llevado con agua a un volumen final de 10.0 mL con propósitos de focalización en cabeza de columna. La determinación se ha realizado según el procedimiento experimental descrito en 2.2.2.2.

En lo que respecta al análisis mediante cromatografía de líquidos convencional, el extracto metanólico recogido tras la etapa de elución del adsorbente (2.0 mL), se ha analizado directamente sin dilución previa siguiendo el procedimiento 2.2.1 descrito en la sección experimental, puesto que en esta técnica no resulta necesaria la inyección de disoluciones de baja fuerza eluotrópica.

□ *Tratamiento de muestra*

Previamente, con objeto de evitar la obstrucción de los cartuchos de extracción utilizados y eliminar la mayor cantidad de materia endógena co-extraída, se ha evaluado el material adecuado para la filtración de la muestra y las etapas de lavado necesarias antes de la elución de los analitos del adsorbente. Estos estudios, se han realizado mediante cLC con 6 g de zumo de manzana y cantidades adicionadas de herbicida a los niveles permitidos por las regulaciones españolas y europeas.

Como ya se puso de manifiesto en el apartado 4.1.2 de resultados, los únicos materiales de filtración que no retienen ni producen pérdidas apreciables de los herbicidas por adsorción, son papel de análisis gravimétrico, placa de vidrio filtrante de tamaño de poro controlado (G4) y membrana de poliéster (tamaño de poro 2 μm). Entre todos ellos, la placa de vidrio filtrante ha mostrado las menores recuperaciones para todos los herbicidas estudiados, mientras que las membranas de poliéster y el papel de filtro, han proporcionado recuperaciones mayores y similares entre sí. Sin embargo, únicamente las membranas de poliéster han permitido la eliminación de mayores cantidades de materia orgánica co-extraída y la determinación del éster butílico del herbicida 2,4-D.

Debido al efecto de limpieza adicional, las membranas de poliéster han resultado especialmente adecuadas para la filtración de las muestras de zumo de manzana antes de la etapa de SPE, por lo que se han escogido como el material adecuado de filtración.

Para minimizar el efecto perturbador de la materia orgánica co-extraída y evitar interferencias con los analitos de interés, se han realizado diferentes secuencias de lavado tras la etapa de retención y se ha evaluado la recuperación de cada herbicida en las fracciones recogidas de elución. En la etapa de lavado, se han empleado disoluciones acuosas con H_2SO_4 , 1% NH_4OH , 0.8% H_3PO_4 y diferentes proporciones de metanol, tomando como referencia protocolos de lavado propuestos por el suministrador de los cartuchos de extracción OASIS[®] MCX, para la SPE de pesticidas, incluidos algunos fenoxiácidos (270)

Los resultados obtenidos, expresados como valor medio de tres determinaciones y límite de confianza al 95% de probabilidad, se incluyen en la tabla 61. En ella se puede observar, que el lavado amoniacal produce importantes pérdidas para la mayoría de los herbicidas estudiados, por lo que no es efectivo ni resulta adecuado para este tipo de compuestos.

Tabla 61
Influencia de la etapa de lavado en la recuperación de herbicidas fenoxiácido durante el procedimiento de SPE en muestras de zumo de manzana

| Etapas por orden de lavado | Recuperación \pm LC (%) | | | | | | | | |
|----------------------------|---------------------------|------------|----------------------|------------|------------|-------------|------------|------------|----------------------|
| | HERBICIDA | | | | | | | | |
| | 2,4-D | MCPA | Éster metílico 2,4-D | 2,4-DP | MCPP | 2,4-DB | MCPB | 2,4,5-TP | Éster butílico 2,4-D |
| <i>A+B+C+D</i> | 32 \pm 4 | 29 \pm 4 | 90 \pm 4 | 30 \pm 2 | 27 \pm 3 | 86 \pm 1 | 99 \pm 4 | 77 \pm 3 | 92 \pm 4 |
| <i>A+B+C</i> | 34 \pm 3 | 38 \pm 7 | 95 \pm 4 | 30 \pm 4 | 30 \pm 4 | 83 \pm 2 | 97 \pm 1 | 79 \pm 4 | 90 \pm 5 |
| <i>A+B+D</i> | 93 \pm 2 | 89 \pm 4 | 90 \pm 2 | 94 \pm 3 | 90 \pm 4 | 100 \pm 5 | 99 \pm 4 | 97 \pm 3 | 92 \pm 6 |

A: 2.0 mL disolución acuosa pH 1 (H₂SO₄), **B:** 2.0 mL disolución acuosa 50% MeOH, **C:** 2.0 mL disolución acuosa 1% NH₄OH, **D:** 2.0 mL disolución acuosa 15% MeOH y 0.8% H₃PO₄.

De esta forma, la secuencia de lavado **A+B+D** al eliminar gran parte de la materia orgánica co-extraída, ha permitido reducir las interferencias de matriz y determinar con recuperaciones aceptables, entre el 90% y 100%, todos los analitos de interés.

Por otra parte, se ha evaluado la cantidad de muestra necesaria para determinar los herbicidas a los bajos niveles de residuos permitidos por ley mediante HPLC convencional y capilar. Para ello, y según el método optimizado de extracción y preconcentración descrito en la sección experimental (procedimientos 4.2.1.1), se han tratado cantidades de muestra comprendidas en el intervalo de 6 a 10 g. De acuerdo a la sensibilidad de cada una de las técnicas y a través del compromiso con la menor cantidad de muestra tratada para disminuir el efecto matriz, se ha seleccionado como tamaño adecuado para su determinación mediante cLC una cantidad de muestra de 6 g. Sin embargo, mediante cromatografía de líquidos convencional, los herbicidas fenoxiácido únicamente se han podido determinar al nivel permitido cuando se ha tratado una cantidad de 10 g de zumo. De esta forma, los análisis mediante cLC y HPLC convencional se han llevado a cabo con una cantidad de zumo de manzana de 6 y 10 g respectivamente.

□ *Características analíticas*

Una vez optimizado el tratamiento de muestra y el procedimiento adecuado de SPE, se han estudiado las características analíticas del método desarrollado para la determinación de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres en muestras de zumo de manzana comercial, siguiendo el procedimiento experimental 4.2.1.1.

Para determinar los límites de detección y cuantificación en la matriz de la muestra mediante cLC y HPLC convencional, se ha preparado un blanco con la cantidad adecuada de zumo en función de la técnica utilizada. Sobre los extractos libres de herbicidas, se han adicionado cantidades crecientes de los analitos hasta obtener una señal respuesta de tres (LD) y diez veces (LQ) mayores que la señal del ruido en las proximidades del pico cromatográfico. Considerando los límites de cuantificación obtenidos, los calibrados, en el intervalo adecuado de concentración, se han realizado también por adición de cantidades crecientes de los herbicidas a los extractos de zumo, suponiendo que tras cada adición el volumen de disolución ha permanecido constante.

La aplicabilidad del método de tratamiento de muestra basado en la SPE en el adsorbente OASIS[®] MCX, se ha evaluado con 6 y 10 g de zumo libre de herbicidas, adicionando las cantidades adecuadas de cada uno de ellos para obtener concentraciones finales del orden de los máximos permitidos por las regulaciones españolas y europeas en productos vegetales. Las muestras con herbicidas adicionados, se han estabilizado durante 20-30 min y se han tratado de acuerdo al método optimizado de filtración, extracción y preconcentración. Antes de la elución de los herbicidas retenidos en el adsorbente, la etapa de lavado se ha realizado según la secuencia descrita anteriormente.

El análisis mediante cLC, se ha realizado con 6 g de zumo, al que se han añadido cantidades de herbicida en los intervalos de 0.150-0.050 mg kg⁻¹ para 2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D; 0.100-0.025 mg kg⁻¹ para 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP; 0.150-0.075 mg kg⁻¹ para el éster butílico de 2,4-D. Así, se han realizado adiciones a tres niveles de concentración, uno por encima, otro por debajo y otro al valor del máximo permitido por ley.

En HPLC convencional, se ha necesitado una mayor cantidad de muestra, 10 gramos, para determinar los analitos a los niveles permitidos, que establecen 0.10 mg kg⁻¹ para 2,4-D y MCPA y 0.05 mg kg⁻¹ para el resto de herbicidas.

Debido a la mayor cantidad de materia orgánica co-extraída, y por tanto, efecto matriz, no ha sido posible la detección y cuantificación de ninguno de los herbicidas estudiados a un nivel inferior. En este caso, aunque es presumible su determinación a un nivel superior al máximo permitido por la legislación, no se ha realizado la adición correspondiente, puesto que resulta de mayor interés la determinación a las máximas concentraciones permitidas y niveles inferiores a este nivel.

En las tablas 62 y 63 se incluyen las características analíticas de los fenoxiácidos y las recuperaciones de cada uno de ellos a los niveles adicionados en las muestras de zumo, mediante HPLC convencional y cromatografía líquida capilar respectivamente.

Tabla 62
Características analíticas y recuperaciones de los herbicidas fenoxiácido a los niveles adicionados en extractos de 10 g de zumo de manzana comercial mediante HPLC convencional

| HERBICIDA | Características analíticas | | | | Recuperación (%) ^(a) | |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|---|-------|---|-------------------|
| | LD (mg·kg ⁻¹) | LQ (mg·kg ⁻¹) | Linealidad ^(a) | | Nivel adicionado (mg kg ⁻¹) | Media ± RSD |
| | | | Intervalo de concentración (mg kg ⁻¹) | R | | |
| 2,4-D | 0.015 | 0.051 | 0.06-0.14 | 0.991 | 0.100 0.050 | 78±1 nd |
| MCPA | 0.017 | 0.056 | | 0.985 | 0.100 0.050 | 76± 1 nd |
| éster metílico 2,4-D | 0.018 | 0.060 | | 0.992 | 0.100 0.050 | 70 ± 1 nd |
| 2,4-DP | 0.011 | 0.037 | 0.04-0.14 | 0.981 | 0.050 0.025 | 85± 3 nd |
| MCPD | 0.012 | 0.040 | | 0.993 | 0.050 0.025 | 87± 3 nd |
| 2,4-DB | 0.011 | 0.038 | | 0.993 | 0.050 0.025 | 93 ± 2 nd |
| MCPB | 0.010 | 0.034 | | 0.990 | 0.050 0.025 | 65 ± 3 nd |
| 2,4,5-TP | 0.012 | 0.040 | | 0.985 | 0.100 0.050 | 66 ± 5 nd |
| éster butílico 2,4-D | 0.019 | 0.061 | 0.06-0.14 | 0.991 | 0.100 0.050 | 65 ± 3 nd |

^(a) n=5; nd, no detectado

Tabla 63
Características analíticas y recuperaciones de los herbicidas fenoxiácido a los niveles adicionados en extractos de 6 g de zumo de manzana comercial mediante cromatografía líquida capilar

| HERBICIDA | Características analíticas | | | | Recuperación (%) ^(a) | |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|---|-------|---|-------------------|
| | LD (mg·kg ⁻¹) | LQ (mg·kg ⁻¹) | Linealidad ^(a) | | Nivel adicionado (mg·kg ⁻¹) | Media ± RSD |
| | | | Intervalo de concentración (mg·kg ⁻¹) | R | | |
| 2,4-D | 0.007 | 0.023 | 0.03-0.17 | 0.996 | 0.150 | 98 ± 2 |
| | | | | | 0.100 | 100 ± 3 |
| | | | | | 0.050 | 84 ± 4 |
| MCPA | 0.010 | 0.033 | 0.03-0.17 | 0.999 | 0.150 | 94 ± 1 |
| | | | | | 0.100 | 92 ± 1 |
| | | | | | 0.050 | 92 ± 2 |
| éster metílico 2,4-D | 0.010 | 0.033 | 0.03-0.17 | 0.998 | 0.150 | 100 ± 2 |
| | | | | | 0.100 | 99 ± 3 |
| | | | | | 0.050 | 96 ± 2 |
| 2,4-DP | 0.010 | 0.033 | 0.02-0.12 | 0.999 | 0.100 | 95 ± 2 |
| | | | | | 0.050 | 97 ± 2 |
| | | | | | 0.025 | 60 ± 8 |
| MCPD | 0.010 | 0.033 | 0.02-0.12 | 0.998 | 0.100 | 86 ± 1 |
| | | | | | 0.050 | 86 ± 2 |
| | | | | | 0.025 | 85 ± 4 |
| 2,4-DB | 0.005 | 0.017 | 0.02-0.12 | 0.997 | 0.100 | 99 ± 2 |
| | | | | | 0.050 | 86 ± 5 |
| | | | | | 0.025 | 68 ± 3 |
| MCPB | 0.005 | 0.017 | 0.02-0.12 | 0.995 | 0.100 | 99 ± 1 |
| | | | | | 0.050 | 100 ± 2 |
| | | | | | 0.025 | 98 ± 2 |
| 2,4,5-TP | 0.005 | 0.017 | 0.02-0.12 | 0.996 | 0.100 | 88 ± 1 |
| | | | | | 0.050 | 85 ± 5 |
| | | | | | 0.025 | 83 ± 5 |
| éster butílico 2,4-D | 0.018 | 0.060 | 0.07-0.17 | 0.998 | 0.150 | 96 ± 3 |
| | | | | | 0.100 | 92 ± 2 |
| | | | | | 0.075 | 94 ± 2 |

^(a) n=5

Como se puede observar en las tablas 62 y 63, todos los analitos han mostrado buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado, con coeficientes de correlación para todas las medidas de área de pico cromatográfico en el intervalo de 0.985 a 0.999.

En relación a los límites de detección, el análisis mediante cromatografía líquida capilar con grandes volúmenes de inyección y disoluciones de baja fuerza eluotrópica, ha proporcionado mayor sensibilidad que la cromatografía de líquidos convencional para todos los herbicidas estudiados, tanto en forma ácida como de ésteres, incluso considerando la dilución necesaria tras el procedimiento de SPE para obtener la disolución de focalización, que contiene metanol y agua en proporción 15:85 (v/v).

Con el método propuesto para cLC, se han obtenido recuperaciones aceptables en el intervalo 60-100% con desviaciones entre el 1 y 8% para todos los fenoxiácidos. Los herbicidas MCPA, MCPP, MCPB, 2,4,5-TP y ésteres metílico y butílico de 2,4-D han mostrado recuperaciones similares en los tres niveles de adición. En el caso del 2,4-D, 2,4-DP y 2,4-DB, se ha observado una disminución considerable de la recuperación al nivel de menor concentración, por encontrarse próximo a sus límites de cuantificación. Las recuperaciones obtenidas al nivel permitido han oscilado entre 85 y 100%, con desviaciones en el intervalo del 1 al 5%.

Cuando se ha utilizado HPLC convencional, las recuperaciones a este nivel han sido menores, del 65 al 93%, si bien las desviaciones han sido similares a las obtenidas mediante cromatografía líquida capilar.

En ambas técnicas, no se ha podido incrementar la sensibilidad por evaporación de parte del disolvente de la fracción recogida de elución, puesto que se han producido considerables pérdidas tanto del 2,4-D como de sus ésteres metílico y butílico.

La figura 48, muestra los cromatogramas obtenidos para una muestra de 10 g de zumo de manzana comercial con y sin herbicidas adicionados al máximo nivel permitido por ley mediante HPLC convencional, así como los cromatogramas obtenidos de 6 g de muestra con y sin herbicidas adicionados también a este nivel, mediante cromatografía líquida capilar con inyección de grandes volúmenes de muestra (20.0 µL) en disoluciones de focalización con una fracción acuosa del 85%.

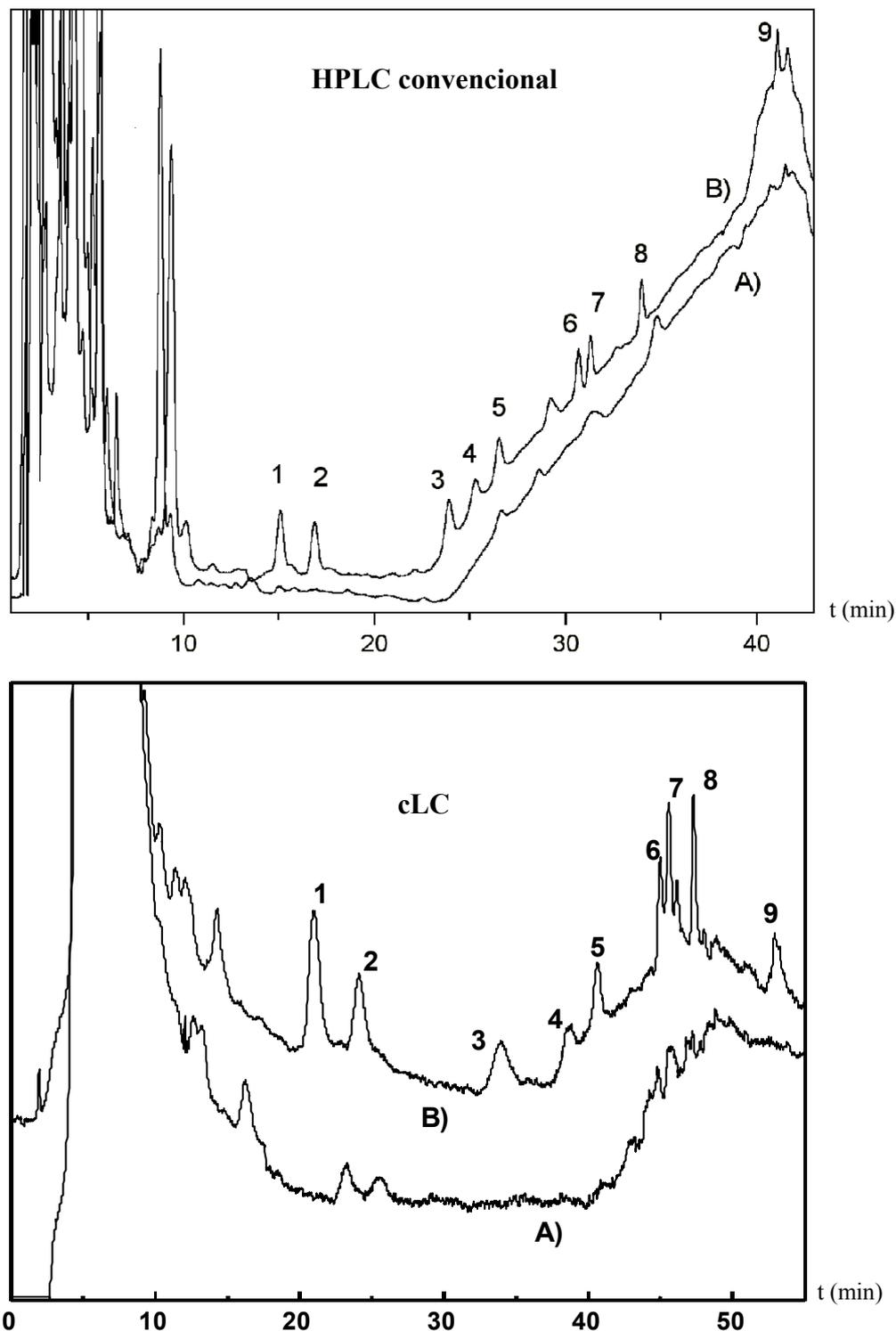


Figura 48. Cromatograma de un extracto de zumo de manzana sin (A) y con (B) herbicidas adicionados al máximo nivel permitido por ley; $0.100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para 2,4-D, MCPA, ésteres metílico y butílico de 2,4-D y $0.050 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ para el resto de herbicidas. (1. 2,4-D, 2. MCPA, 3. éster metílico de 2,4-D, 4. 2,4-DP, 5. MCPP, 6. 2,4-DB, 7. MCPB, 8. 2,4,5-TP, 9. éster butílico de 2,4-D).

De este modo, se ha desarrollado un método para el tratamiento de muestras complejas muy polares como es el caso del zumo de manzana comercial. El adsorbente OASIS[®] MCX ha resultado muy eficaz en la extracción y preconcentración de los herbicidas, así como en la limpieza de la matriz. La etapa de filtración con membrana de poliéster previa a la extracción en fase sólida, ha contribuido también de forma considerable a la eliminación de la materia orgánica co-extraída.

El método propuesto es rápido, sencillo, muy reproducible y permite el tratamiento de pequeñas cantidades de muestra. Puesto que no incluye ninguna etapa de hidrólisis, evaporación o calefacción, el análisis de los herbicidas fenoxiácido tanto en forma ácida como de ésteres, cuyas características fisicoquímicas, analíticas y de toxicidad se encuentran bien diferenciadas, se ha podido llevar a cabo mediante HPLC a los máximos niveles permitidos por las regulaciones españolas y europeas.

Como consecuencia de los menores límites de detección de la cromatografía líquida capilar (0.005-0.018 mg kg⁻¹), los herbicidas se han podido determinar mediante esta técnica con elevada reproducibilidad a los niveles permitidos por ley en 6 g de muestra, y se han obtenido recuperaciones entre el 85 y 100%. Debido a la menor cantidad de muestra tratada y por tanto menor efecto matriz, también ha permitido la determinación a concentraciones inferiores a las máximas permitidas, con recuperaciones aceptables en el intervalo 60-98%. Mediante HPLC convencional, se ha necesitado una mayor cantidad de zumo de manzana (10 g) para la determinación al nivel permitido. A este nivel, se han obtenido recuperaciones menores que en cLC, comprendidas entre el 65 y 93%.

Por todo ello, la cromatografía líquida capilar, combinada con técnicas de focalización en cabeza de columna, ha demostrado mayor sensibilidad que HPLC convencional para la determinación de herbicidas fenoxiácido en matrices complejas, con la ventaja adicional del menor consumo de fase móvil y cantidad de residuos generada, lo que justifica su utilización en el análisis de otro tipo de muestras.

4.2.1.2. Orina masculina humana

Incluso personas no expuestas ocupacionalmente a pesticidas, poseen un cierto nivel de exposición como consecuencia de los residuos presentes en alimentos y agua, el contacto dérmico o la inhalación, por lo que resulta esencial desarrollar métodos para su determinación en fluidos corporales.

Los herbicidas fenoxiácido se excretan principalmente por vía renal sin apreciable biotransformación, por lo que el análisis de muestras de orina puede proporcionar un índice de exposición a este tipo de compuestos en el medio ambiente. Por lo general, su análisis en esta matriz biológica se realiza mediante hidrólisis ácida, básica o enzimática, extracción con disolventes orgánicos, purificación en adsorbentes de sílice y determinación mediante GC previa derivatización (39).

Las nuevas posibilidades de SPE de herbicidas fenoxiácido en muestras biológicas se pueden encontrar en la utilización de materiales de acceso restringido, que debido a su superficie externa hidrofílica e interior hidrofóbico constituyen una barrera física o química para la permeación de macromoléculas, lo que puede permitir la determinación en fluidos biológicos con un mínimo tratamiento de muestra. Por ello, una vez evaluadas las características de retención y elución en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS (apartado 3.1 de resultados), se ha procedido a estudiar la idoneidad de este material de acceso restringido para la determinación de fenoxiácidos en pequeños volúmenes de orina masculina humana.

Así, se ha desarrollado un método de tratamiento de muestra sin hidrólisis y/o eliminación previa de proteínas, basado únicamente en el ajuste del pH de la orina para la adecuada retención de los analitos en el adsorbente. Las muestras, se han preparado y analizado mediante cLC con gradiente de composición de fase móvil, según el procedimiento descrito en 4.2.1.2 de la sección experimental.

□ *Optimización del procedimiento de SPE*

Puesto que los herbicidas en forma de ésteres se hidrolizan a los ácidos correspondientes en el organismo humano, únicamente se ha llevado a cabo la determinación de los fenoxiácidos en forma ácida, concretamente de 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP. Considerando los volúmenes de ruptura determinados en el adsorbente LiChrospher® RP-18-ADS (apartado 3.1.4.1 de resultados, tabla 49) y la cantidad de materia endógena co-extraída al tratar 25.0 mL de orina, se ha establecido como tamaño adecuado de muestra un volumen 10.0 mL.

Antes de la introducción en el material de acceso restringido de las fracciones de orina con una cantidad adicionada de 3.0 μg de cada uno de los herbicidas, se ha ensayado un paso previo de filtración utilizando una membrana de poliéster (tamaño de poro 2 μm), con el fin de eliminar parte de la materia orgánica de la matriz. Este material no ha contribuido a la obtención de extractos de muestra más limpios, por lo que en experimentos posteriores, la etapa de filtración se ha suprimido del procedimiento.

Para eluir a los herbicidas retenidos en el adsorbente, se han tenido en cuenta los resultados obtenidos en el apartado 3.1.3.1 de resultados y se ha seleccionado como eluyente la mezcla metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v). Como se puede observar en la figura 35, este eluyente proporciona recuperaciones aceptables para todos los fenoxiácidos en forma ácida y por su mayor contenido acuoso, además de disminuir la cantidad de materia orgánica co-eluida, contribuye a la focalización de los analitos en cabeza de columna.

Con objeto de minimizar el efecto matriz, se han ensayado diversas etapas de lavado antes de la elución, utilizando disoluciones acuosas con un contenido de metanol del 50% o un 15% de metanol-0.8% de ácido fosfórico. Las disoluciones de lavado se han analizado mediante cLC para determinar la cantidad de herbicida en cada una de las fracciones recogidas. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 64.

Tabla 64
Pérdidas de herbicidas fenoxiácido durante la etapa de lavado en el material LiChrospher® RP-18-ADS

| <i>HERBICIDA</i> | <i>DISOLUCIÓN ACUOSA DE LAVADO</i> | | |
|------------------|--|-------------------------------------|-------------------------------------|
| | <i>PÉRDIDA (%)</i> | | |
| | 15% MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ | | 50% MeOH |
| | 1 ^a Fracción (2.0 mL) | 2 ^a Fracción (2.0 mL) | 1 ^a Fracción (2.0 mL) |
| <i>2,4-D</i> | 0.8 | 1.3 | 78 |
| <i>MCPA</i> | nd | 0.4 | 69 |
| <i>2,4-DP</i> | 0.4 | 0.4 | 69 |
| <i>MCPP</i> | 0.2 | 0.2 | 71 |
| <i>2,4-DB</i> | 0.4 | 0.4 | 1 |
| <i>MCPB</i> | 0.2 | 0.3 | 1 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 0.3 | 0.3 | 16 |

nd; no se detecta

En la tabla anterior se pueden apreciar pérdidas considerables de 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP cuando la etapa de lavado se realiza con 2 mL de disolución acuosa con 50% de metanol, por lo que se ha eliminado del procedimiento de SPE.

De esta forma, tras la retención de los herbicidas en el adsorbente y antes de la elución, se han realizado dos etapas consecutivas de lavado que han permitido disminuir la cantidad de materia orgánica co-extraída; la primera con 4.0 mL de una disolución acuosa al pH adecuado de retención (pH 4.0) y la segunda, con 4.0 mL de una disolución acuosa con 0.8% de H₃PO₄ y 15% de metanol.

□ Características analíticas

La sensibilidad del método desarrollado se ha determinado a través de los límites de detección y cuantificación para cada uno de los fenoxiácidos estudiados en la matriz de orina. Como en el caso de las muestras de zumo de manzana, se han adicionado cantidades crecientes de los analitos a las fracciones eluidas del adsorbente y se ha considerado que tras cada adición, el volumen total de disolución ha permanecido constante. Tomando como referencia el LQ y por adición a los extractos de orina, se han obtenido los calibrados correspondientes en el intervalo adecuado de concentración.

La aplicabilidad del método propuesto, se ha evaluado adicionando cantidades de 1.5 µg de cada herbicida a 10.0 mL de orina y determinando su recuperación tras la etapa de tratamiento de muestra. Las características analíticas y las recuperaciones obtenidas al nivel adicionado se incluyen en la tabla 65.

Tabla 65
Características analíticas y recuperaciones de los herbicidas fenoxiácido al nivel adicionado en extractos de orina mediante cLC

| HERBICIDA | LD (µg L ⁻¹) | LQ (µg L ⁻¹) | Linealidad ^(a) | | R (%) ± R.S.D ^(b) |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------|---|-------|------------------------------|
| | | | Intervalo de concentración (µg·L ⁻¹) | R | |
| 2,4-D | 7.5 | 25.0 | 25-500 | 0.999 | 45 ± 6 |
| MCPA | 5.0 | 13.0 | | 0.999 | 74 ± 1 |
| 2,4-DP | 19.0 | 64.0 | 75-500 | 0.981 | 94 ± 2 |
| MCPP | 18.0 | 60.0 | | 0.997 | 87 ± 1 |
| 2,4-DB | 22.5 | 75.0 | | 0.986 | 35 ± 7 |
| MCPB | 22.5 | 75.0 | | 0.987 | 64 ± 1 |
| 2,4,5-TP | 6.0 | 20.0 | 25-500 | 0.999 | 64 ± 5 |

^(a) n=5, ^(b) n=3 a un nivel de 150 µg L⁻¹

Como se puede observar en la tabla 65, los límites de detección varían en el intervalo de 5.0 a 22.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos los herbicidas, lo que permite su determinación en muestras de orina a los niveles de concentración de personas ocupacionalmente expuestas (32). Además, todos los analitos han mostrado buena linealidad en el margen de concentraciones estudiadas, con coeficientes de correlación de las rectas de ajuste entre 0.981 y 0.999.

Las recuperaciones determinadas al nivel estudiado de adición, han estado comprendidas en el intervalo de 35 a 94%, y aunque para algunos de los herbicidas como el 2,4-D y 2,4-DB, han sido especialmente bajas, en todos los casos los resultados han sido muy reproducibles, con desviaciones estándar relativas entre el 1 y 7%. Las mayores recuperaciones se han observado para los herbicidas 2,4-DP y MCPP.

Los cromatogramas obtenidos para una muestra de orina sin y con herbicidas adicionados a un nivel de concentración de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$, se muestran en la figura 49.

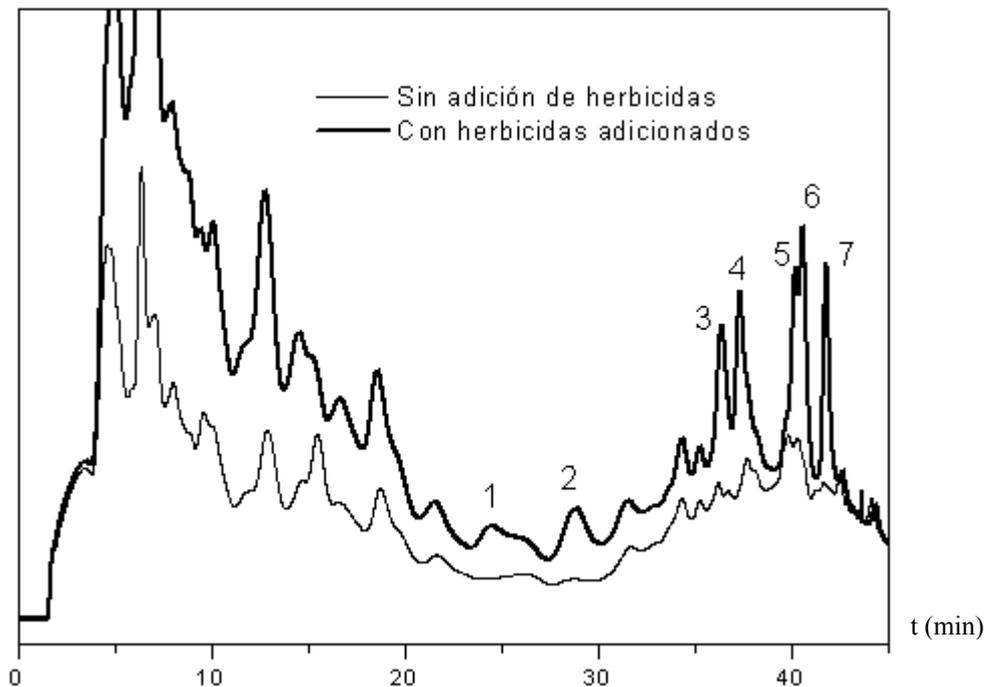


Figura 49. Cromatogramas obtenidos mediante cLC para una muestra de orina de 10.0 mL con y sin herbicidas adicionados a una concentración de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$. Herbicidas: (1) 2,4-D, (2) MCPA, (3) 2,4,-DP, (4) MCPP, (5) 2,4-DB, (6) MCPB, (7) 2,4,5-TP.

Mediante el estudio realizado, se ha desarrollado un método sencillo para el tratamiento de muestras de orina basado en la utilización del material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, adsorbente que ha permitido el tratamiento directo de pequeños volúmenes de muestra sin necesidad de etapas previas adicionales como hidrólisis, precipitación de proteínas o extracción con disolventes orgánicos, por lo que ha demostrado una gran eficacia en la limpieza de esta matriz biológica.

Por otra parte, la combinación del método desarrollado de tratamiento de muestra con la determinación mediante cLC utilizando grandes volúmenes de inyección y técnicas de focalización en cabeza de columna, ha permitido el control y la cuantificación de residuos de herbicidas fenoxiácido en orina masculina humana a niveles que permiten establecer el grado de contaminación de trabajadores que utilizan con asiduidad este tipo de pesticidas. Algunos de ellos, como el 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP se podrían determinar incluso a niveles inferiores de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$.

4.2.2. MUESTRAS SÓLIDAS

4.2.2.1. Suelo de elevado contenido orgánico

Debido a su persistencia, naturaleza polar y solubilidad en agua, los herbicidas fenoxiácido se dispersan con facilidad en el medio ambiente, y sus residuos, dependiendo de la naturaleza, acidez y contenido de materia orgánica del suelo, pueden permanecer en esta matriz durante un periodo de 6-8 semanas (5). Los herbicidas en forma de ésteres pueden resultar aun más persistentes debido a su menor solubilidad, y para determinarlos como tal, el procedimiento de tratamiento de muestra debe asegurar la conservación en su forma original, lo que puede no resultar fácil y en ocasiones posible. Por ello, los ésteres de los fenoxiácidos se suelen determinar habitualmente, previa etapa de hidrólisis, como sus ácidos correspondientes (77).

En el presente estudio, se ha desarrollado un método para la determinación de 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D en muestras de suelo, puesto que en muchos de los tratamientos de pre-emergencia, se utilizan este tipo de mezclas o similares. Para evitar la transformación y mantener inalterados los ésteres de los herbicidas, la preparación de la muestra se ha realizado mediante extracción en baño de ultrasonidos a temperatura ambiente.

Las muestras de suelo, con herbicidas adicionados, se han tratado y analizado mediante cLC según el procedimiento experimental descrito en 4.2.2.1.

□ *Estudio de la eficacia de extracción*

Las condiciones óptimas para la extracción de los herbicidas fenoxiácido de las muestras de suelo, se han establecido en función de parámetros como la naturaleza, volumen de disolvente y tiempo de extracción. Todos los experimentos se han realizado con 1 gramo de muestra y una cantidad adicionada de cada uno de los herbicidas de 2.5 mg kg⁻¹. En total se han realizado tres etapas de extracción, con volúmenes de disolvente de 5.0 mL y un tiempo de agitación en ultrasonidos de 5.0 min cada una de ellas. Como agentes extractantes se han utilizado MeOH, acetona, acetonitrilo y H₂SO₄ 5 mM (pH 2). Las recuperaciones obtenidas en cada caso se muestrasn en la tabla 66.

Tabla 66
Influencia del agente extractante en la eficacia de extracción de herbicidas fenoxiácido de muestras de suelo

| <i>Etapas de extracción con ultrasonidos ^(a)</i> | | | <i>Recuperación (%)</i> | | | |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| <i>1^a</i> | <i>2^a</i> | <i>3^a</i> | <i>2,4-D</i> | <i>éster metílico 2,4-D</i> | <i>2,4-DB</i> | <i>Éster butílico 2,4-D</i> |
| MeOH | MeOH | MeOH | 40 | 112 | 54 | 90 |
| AcN | AcN | AcN | 26 | 53 | 81 | 84 |
| H ₂ SO ₄ 5 mM | H ₂ SO ₄ 5 mM | H ₂ SO ₄ 5 mM | 97 | 70 | 80 | 50 |
| Acetona | Acetona | Acetona | nd | 92 | nd | 92 |
| H ₂ SO ₄ 5 mM | H ₂ SO ₄ 5 mM | MeOH | 124 | 99 | 86 | nd |
| MeOH | MeOH | H ₂ SO ₄ 5 mM | 73 | 74 | 80 | 46 |
| AcN | AcN | H ₂ SO ₄ 5 mM | 74 | 101 | 83 | 101 |
| H ₂ SO ₄ 5 mM | H ₂ SO ₄ 5 mM | AcN | 92 | 75 | 79 | 85 |

^(a) 5.0 mL de disolvente, tiempo de extracción 5.0 min;
nd, no se detecta en el extracto

Como se puede observar a través de los resultados de lixiviación incluidos en la tabla anterior, las mayores recuperaciones para todos los herbicidas se obtienen al realizar dos extracciones consecutivas con 5.0 mL de acetonitrilo y una extracción final con 5.0 mL de H₂SO₄ 5 mM (pH 2), disolución en la que tal y como se ha comprobado en el apartado 4.1.1 de la sección de resultados, todos ellos han mostrado una estabilidad considerable.

Con propósitos de focalización, el extracto recogido se ha llevado con agua purificada a un volumen de 100.0 mL. La disolución resultante ha permitido determinar los herbicidas con adecuada sensibilidad, por lo que la inyección de disoluciones acuosas con un contenido de acetonitrilo del 10%, también contribuyen a concentrar los analitos en cabeza de columna.

En relación al volumen de agente extractante, la utilización de 3.0 mL de disolvente en cada una de las etapas del procedimiento de extracción ha proporcionado bajas recuperaciones, mientras que el empleo de volúmenes mayores, 5.0 mL, si bien ha aumentado la recuperación, ha disminuido la sensibilidad por la mayor dilución necesaria para obtener la disolución de focalización adecuada.

Con objeto de reducir el volumen de los extractos de suelo recogidos, se han llevado a cabo diversos ensayos basados en la evaporación de parte del disolvente de extracción. Utilizando un dispositivo Kuderna-Danish, la evaporación se ha realizado hasta un volumen de 0.5 mL, que previamente a su análisis mediante cLC, se ha llevado con agua pura hasta un volumen final de 5 mL para focalizar los analitos. En estas condiciones, los cromatogramas registrados han mostrado una disminución considerable en las áreas de pico del éster metílico y butílico de 2,4-D, hecho que junto con el aumento en el área del pico correspondiente al 2,4-D, hace suponer además de pérdidas por volatilización, su correspondiente transformación. En la evaporación con rotavapor, los resultados obtenidos han sido muy similares, por lo que se ha seleccionado un volumen óptimo de extracción de 5.0 mL.

Una vez optimizada la naturaleza y el volumen del disolvente extractante, se ha evaluado la influencia del tiempo de extracción en la recuperación de los herbicidas. Para ello, cada una de las tres etapas de extracción se han realizado con el agente extractante adecuado durante tiempos de 2.0, 5.0 y 8.0 minutos.

Como se puede observar en la figura 50, la lixiviación del éster butílico de 2,4-D no se completa cuando la agitación ultrasónica se realiza durante 2.0 min. Con un tiempo de extracción de 8.0 min, las recuperaciones para todos los fenoxiácidos son similares a las obtenidas con un tiempo de 5.0 min, por lo que llegando a un compromiso entre el tiempo de análisis y la recuperación obtenida se ha seleccionado como el valor óptimo para cada etapa de extracción.

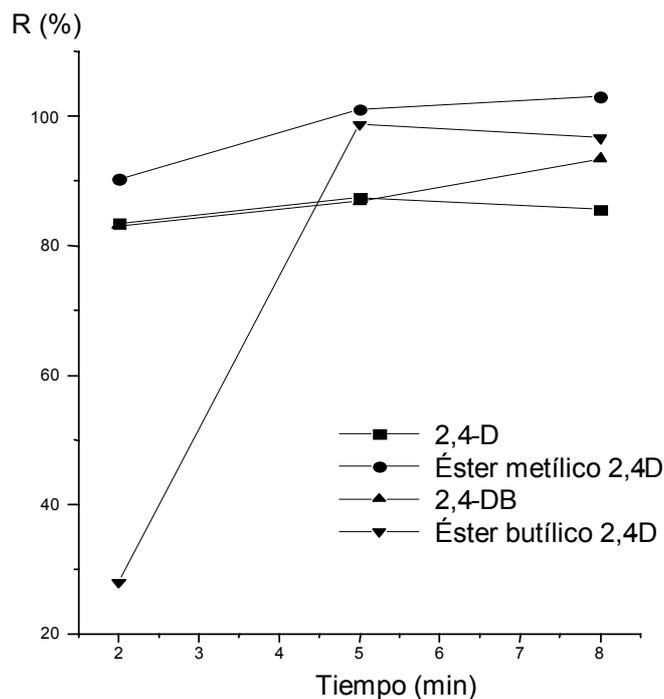


Figura 50. Influencia del tiempo en la eficacia de extracción con ultrasonidos.

□ *Características analíticas*

Una vez optimizado el tratamiento de muestra, se ha procedido al estudio de las características analíticas del método propuesto para la extracción con ultrasonidos de herbicidas fenoxiácido del suelo y su posterior determinación. El análisis de los extractos mediante cLC con temperatura programada y focalización en columna, se ha realizado según el procedimiento descrito en 2.2.2.1 en la sección experimental.

Para obtener los límites de detección, cuantificación y los calibrados en el intervalo adecuado de concentración, se han añadido cantidades crecientes de cada uno de los herbicidas sobre los extractos obtenidos tras el tratamiento de 1 gramo de suelo. Análogamente se ha evaluado la aplicabilidad del método desarrollado, determinando la recuperación de cada uno de ellos a diferentes niveles de adición; 2.5, 4.0 y 6.0 mg kg⁻¹.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 67, donde se puede observar que los límites de detección alcanzados para los extractos de suelo varían entre 0.3 (2,4-D) y 0.5 mg kg⁻¹ (éster butílico de 2,4-D). Todos los fenoxiácidos han mostrado buena linealidad en el intervalo de concentración de 1.5 a 7.0 mg kg⁻¹ y los coeficientes de correlación de las rectas de ajuste han estado comprendidos en el intervalo 0.994-0.998.

Tabla 67
Características analíticas y recuperaciones de los herbicidas fenoxiácido a los niveles adicionados en extractos de 1g de suelo mediante cLC

| HERBICIDA | Características analíticas | | | | Recuperación (%) ^(b) | |
|-------------------------|------------------------------|------------------------------|---|-------|---|------------------|
| | LD (mg·kg ⁻¹) | LQ (mg·kg ⁻¹) | Linealidad ^(a) | | Nivel adicionado (mg·kg ⁻¹) | Media ± SD |
| | | | Intervalo de concentración (mg·kg ⁻¹) | R | | |
| 2,4-D | 0.3 | 1.0 | 1.5-7.0 | 0.994 | 2.5 | 76 ± 4 |
| | | | | | 4.0 | 72 ± 3 |
| | | | | | 6.0 | 83 ± 2 |
| éster metílico 2,4-D | 0.4 | 1.2 | | 0.998 | 2.5 | 85 ± 2 |
| | | | | | 4.0 | 83 ± 2 |
| | | | | | 6.0 | 80 ± 1 |
| 2,4-DB | 0.3 | 1.0 | | 0.998 | 2.5 | 72 ± 1 |
| | | | | | 4.0 | 75 ± 1 |
| | | | | | 6.0 | 82 ± 1 |
| éster butílico 2,4-D | 0.5 | 1.5 | | 0.997 | 2.5 | 97 ± 1 |
| | | | | | 4.0 | 79 ± 3 |
| | | | | | 6.0 | 95 ± 3 |

^(a) n=5, ^(b) n=3 a un nivel de 150 µg L⁻¹

Como se aprecia en la tabla 67, las recuperaciones, en el intervalo 72-97%, han sido aceptables para todos los herbicidas en los tres niveles evaluados. Las mayores recuperaciones se han obtenido al nivel más alto de adición, aunque para el éster metílico del 2,4-D, han sido similares a todas las concentraciones ensayadas. Considerando la desviación estándar asociada a estos valores, se puede deducir la elevada reproducibilidad de los resultados.

Por tanto, el empleo de la cromatografía líquida capilar, con elución isocrática y gradiente de temperatura, combinada con la inyección de grandes volúmenes de muestra (20.0 µL), focalización en cabeza de columna y extracción con ultrasonidos, ha proporcionado un método eficaz y reproducible para la determinación simultánea de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres en muestras de suelo, a los bajos niveles de mg kg⁻¹.

El procedimiento desarrollado de tratamiento de muestra con extracción ultrasónica a temperatura ambiente, a diferencia de otros métodos utilizados por algunos autores en este tipo de muestras a temperaturas y/o presiones elevadas, es sencillo, rápido y no modifica la forma química de las especies presentes en las muestras, por lo que se puede utilizar para distinguirlas.

La figura 51, muestra a modo de ejemplo, el cromatograma obtenido con el método propuesto para un extracto de suelo sin herbicidas adicionados y con herbicidas adicionados al nivel de 4.0 mg kg^{-1} .

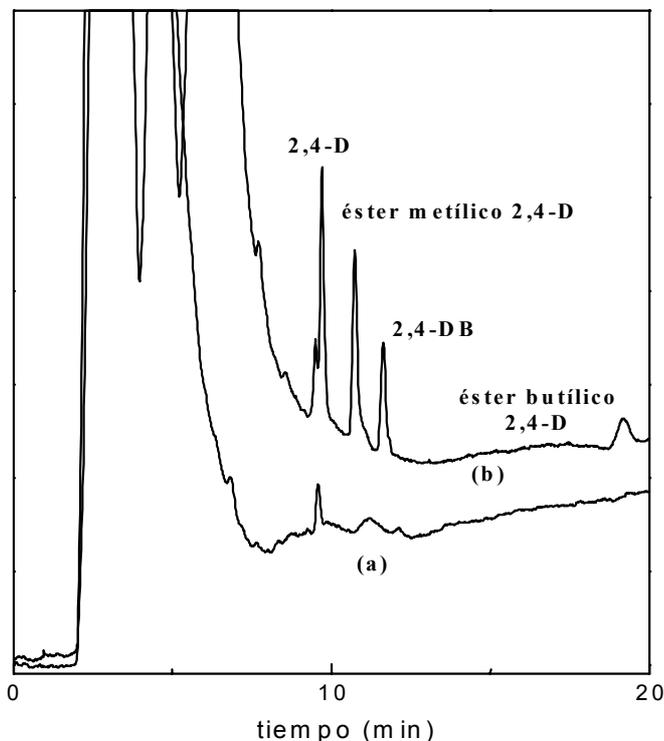


Figura 51. Cromatograma de un extracto de 1g de suelo sin (a) y con (b) herbicidas adicionados a un nivel de 4.0 mg kg^{-1} .

4.2.2.2. Hojas de menta fresca

El análisis de herbicidas fenoxiácido en cereales, frutas y matrices vegetales, ha sido llevado a cabo tradicionalmente previa hidrólisis ácida o básica, extracción con disolventes orgánicos y limpieza con fluorisil o alúmina antes de su determinación cromatográfica (58, 72, 95, 246, 247).

Una vez establecidas las características de retención y elución en el adsorbente de intercambio aniónico Lida Sep-IC-OH, en el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS y en el intercambiador catiónico OASIS[®] MCX (apartado 3.1 de resultados, tabla 52), se ha evaluado la idoneidad de estos materiales de SPE para el tratamiento de extractos de muestras de hojas de menta fresca y la determinación de este tipo de herbicidas mediante cLC en esta matriz compleja. Antes de la extracción, preconcentración y limpieza en estos adsorbentes, se han realizado diversos estudios con objeto de establecer los tratamientos de lixiviación más adecuados.

Para ello, se ha adicionado 4.0 µg de cada uno de los fenoxiácidos a una cantidad de 1g de hojas menta fresca y las muestras, con herbicidas adicionados, se han dejado interaccionar durante 20-30 min antes de realizar los correspondientes tratamientos de lixiviación.

Respecto al análisis mediante cLC, los extractos recogidos de los adsorbentes de extracción se han diluido con agua hasta un volumen de 10.0 mL con fines de focalización en cabeza de columna. La determinación se ha realizado con gradiente de composición de fase móvil, según el procedimiento 2.2.2.2 de la sección experimental.

□ *SPE con el adsorbente OASIS[®] MCX*

Utilizando los cartuchos de extracción OASIS[®] MCX, la retención de los herbicidas se ha efectuado pH 1 y antes de la elución con 1.5 mL de MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico, la etapa de lavado se ha realizado con 2.0 mL de agua a pH 1, 2.0 mL de disolución acuosa con 50% de MeOH y 2.0 mL de disolución acuosa con 15% de MeOH y 0.8% de ácido fosfórico, protocolo que ha sido establecido anteriormente para el tratamiento de muestras de zumo de manzana en este adsorbente polimérico (apartado 4.2.1.1 de resultados, tabla 61).

Inicialmente, se adicionaron a las muestras de menta 1.0 mL de disoluciones de los herbicidas en agua, metanol, acetonitrilo o acetona, y se realizaron tres extracciones consecutivas en ultrasonidos durante un tiempo de 15 min con 15 mL de agua a pH 1.0 cada una de ellas. En función de los resultados obtenidos, se ha podido determinar que la adición de los herbicidas a las muestras en disolventes orgánicos no resulta adecuada, debido a la gran cantidad de materia orgánica co-extraída que impide la detección de la mayoría de ellos. De esta forma, en todos los experimentos posteriores, se ha llevado a cabo la adición de 1.0 mL de disoluciones acuosas de los herbicidas.

Utilizando agua a pH 1.0 y una disolución saturada de hidróxido de calcio como agentes extractantes (94), se han llevado a cabo diferentes procedimientos de tratamiento de muestra con agitación en ultrasonidos durante un tiempo de 15 min, si bien ninguno de ellos, ha permitido la determinación de los herbicidas 2,4-D y 2,4-DP. Por ello, se han realizado una serie de extracciones con disoluciones acuosas de Ca(OH)₂, NaOH 0.1 M y 1.0 M, mediante calefacción en un baño de agua controlando la temperatura.

Los extractos de menta se han diluido a un volumen final de 20.0 mL, se han ajustado a pH 1.0 con H₂SO₄ concentrado, se han filtrado en papel de análisis gravimétrico y después de tres lavados con 10.0 mL de agua a pH 1.0, la disolución recogida se ha introducido a través del adsorbente en las condiciones óptimas de SPE (tabla 52).

Las recuperaciones obtenidas en cada uno de los procedimientos realizados se muestran en la tabla 68. En ella se puede apreciar que, ninguno de los ensayos realizados ha permitido determinar simultáneamente los nueve herbicidas fenoxiácido estudiados. De todos ellos, el único que ha permitido determinar los dos ésteres del 2,4-D con recuperaciones en torno al 50% ha sido la extracción con NaOH 0.1M a 75°C durante 30 min. En algunos casos, se han obtenido recuperaciones mayores del 100%, lo que probablemente indica el solapamiento de los picos de interés con la materia orgánica co-extraída. En general, la utilización de disoluciones de NaOH más concentradas, independientemente de la temperatura, no ha mejorado los resultados obtenidos y análogamente, la prolongación del tiempo de calefacción tampoco ha supuesto una mejora considerable.

Respecto a la determinación de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D, aunque la extracción de los herbicidas en forma ácida también se debe realizar con NaOH 0.1M, la temperatura y el tiempo de calefacción se deben incrementar a 95°C y 60 min respectivamente. Utilizando Ca(OH)₂ como agente extractante, no se ha podido determinar el éster butílico de 2,4-D y tampoco no se ha conseguido mejorar la extracción de los herbicidas en forma ácida, por lo que la disolución de NaOH 0.1 M ha resultado la más adecuada como disolvente para la lixiviación.

Tabla 68
Recuperación de herbicidas fenoxiácido de muestras de menta mediante extracción por calefacción en baño de agua y
preconcentración en el adsorbente OASIS[®] MCX

| PROCEDIMIENTO | | | HERBICIDA; Recuperación (%) ^(a) | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------|--------|--|------|----------------------|--------|------|--------|------|----------|----------------------|
| Disolvente | Tiempo (min) | T (°C) | 2,4-D | MCPA | Éster metílico 2,4-D | 2,4-DP | MCPP | 2,4-DB | MCPB | 2,4,5-TP | Éster butílico 2,4-D |
| 15 mL NaOH 0.1 M | 30 | 75 | 47 | nd | 53 | 12 | nd | nd | 29 | 27 | 53 |
| | 60 | | 100 | | 104 | 31 | 59 | nd | 55 | 38 | |
| | 30 | | 95 | | 69 | 44 | 22 | 20 | 92 | 47 | |
| | 60 | 143 | | 14 | nd | 35 | 31 | 62 | 63 | 55 | |
| | 90 | 100 | nd | 64 | 18 | 42 | 22 | 52 | 13 | | |
| 15 mL NaOH 1 M | 30 | 75 | nd | nd | 129 | nd | 11 | nd | 30 | nd | nd |
| | 60 | | 55 | 48 | 167 | 55 | 24 | | 44 | nd | |
| | 120 | | nd | nd | 117 | 70 | 34 | | 32 | 77 | |
| | 30 | 95 | nd | nd | 147 | nd | 29 | | 21 | nd | |
| | 60 | | 122 | 150 | 30 | 47 | 28 | | 55 | | |
| 15 mL Ca(OH) ₂ saturado | 20 | 75 | 72 | 26 | 70 | nd | nd | 84 | - | nd | |
| | 60 | | 48 | 40 | nd | | 18 | 33 | 45 | 31 | |
| | 90 | | nd | nd | | | nd | 21 | nd | 23 | nd |
| | 120 | 34 | | 39 | 48 | | | | | | |
| | 30 | 95 | nd | 24 | 58 | 27 | 34 | 69 | | | |
| | 60 | | | 28 | 19 | 39 | 58 | 110 | | | |

^(a) las recuperaciones se han calculado por comparación de las áreas de pico cromatográfico obtenidas en el extracto de menta y en el extracto enriquecido con cantidades de 4.0 µg de cada uno de los herbicidas; nd, no se detecta o solapa con materia orgánica.

Estos procedimientos, han presentado como principal desventaja la imposibilidad de determinar simultáneamente los herbicidas en forma ácida y de ésteres. En el caso de los herbicidas en forma ácida, se ha necesitado además un tiempo de extracción elevado (60 min) y la gran cantidad de materia orgánica co-extraída, ha interferido en la determinación del herbicida 2,4-D.

Para disminuir la cantidad de materia endógena y determinar conjuntamente todos los herbicidas estudiados, se han realizado varios tratamientos basados en la extracción con 20.0 mL de agua en ebullición sin agitación en ultrasonidos y en la extracción ultrasónica durante 15 min con 20.0 mL de agua a temperatura ambiente o agua en ebullición. Antes de la carga en el adsorbente, los extractos de menta se han filtrado en papel de análisis gravimétrico y el filtro se ha lavado tres veces con 5.0 mL de agua a pH 1.0. Estos procedimientos de extracción no han mejorado los resultados anteriores, puesto que la elevada cantidad de materia endógena co-extraída no ha permitido la determinación y cuantificación de la mayoría de los herbicidas.

De esta forma, el adsorbente OASIS[®] MCX no ha resultado adecuado para la extracción de herbicidas fenoxiácido de hojas de menta fresca, puesto que la complejidad de la muestra requiere una limpieza considerable antes de la determinación cromatográfica. Aún realizando etapas de lavado antes de la elución, debido a la gran cantidad de materia orgánica retenida junto con los herbicidas, el adsorbente no ha resultado eficaz en la limpieza de este tipo de matriz de vegetal, lo que ha limitado su aplicación y ha obligado a la utilización de otros adsorbentes que contribuyan a la mayor limpieza de muestra.

□ *SPE con el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS*

La evaluación de este adsorbente se ha realizado adicionando a cantidades de 1 g de muestra un volumen de 1.0 mL de una disolución acuosa con 4.0 µg de cada herbicida. Del mismo modo que los ensayos realizados en el adsorbente OASIS[®] MCX, antes de la etapa de retención en el material de acceso restringido se han realizado diversos procedimientos de hidrólisis con 15 mL de NaOH 0.1 M a 95°C durante 60 min, 15 mL NaOH 1 M a 95°C durante 30 min y 15 mL NaOH 1 M a 95°C durante 120 min. Los extractos de menta obtenidos, se han llevado con agua pura a un volumen final de 20 mL, se han ajustado a pH 4.0, se han filtrado en papel de análisis gravimétrico y después de tres lavados consecutivos con 5.0 mL de agua a pH 4.0, se han filtrado

nuevamente con una membrana de poliéster antes de la etapa de SPE en este adsorbente según el procedimiento descrito en 3.1.2 en la sección experimental. Antes de la elución con 1.5 mL de la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% H₃PO₄ 90:10 (v/v), se ha despreciado un volumen de desecho de 4.7 mL.

De los cromatogramas obtenidos, se ha podido determinar que el aumento de la concentración de NaOH y del tiempo de hidrólisis, aumenta de forma considerable la cantidad de materia orgánica co-extraída. Incluso con la disolución de NaOH 0.1 M, no ha sido posible la determinación y cuantificación de la mayoría de los herbicidas, por lo que al no resultar adecuado el tratamiento de muestra mediante hidrólisis básica, se han estudiado otros procedimientos basados en la extracción con 20.0 mL de agua a temperatura de ebullición sin agitación en ultrasonidos y en la extracción ultrasónica durante 15 min con 20 mL de agua a temperatura ambiente o agua en ebullición, análogamente a los ensayos realizados en el adsorbente OASIS[®] MCX.

Aunque en algunas de estas condiciones de extracción se ha disminuido la cantidad de materia endógena respecto a los procedimientos de hidrólisis, en general, no se ha observado una mejora considerable, por lo que este material, al no contribuir apreciablemente a la limpieza de la matriz, tampoco ha resultado adecuado en el tratamiento de muestras de menta.

□ *SPE con el adsorbente LIDA Sep-IC-OH*

Tal y como se ha podido observar en los adsorbentes OASIS[®] MCX y LiChrospher[®] RP-18-ADS, los procedimientos de hidrólisis básica contribuyen a la extracción de mayores cantidades de materia orgánica, por lo que en este adsorbente únicamente se han realizado tratamientos basados en la lixiviación con agua a temperatura ambiente o en ebullición y agitación ultrasónica. Para ello, los extractos obtenidos tras el tratamiento de 1 g de muestra con una cantidad adicionada de herbicidas de 4.0 µg, se han filtrado en papel de análisis gravimétrico y después de tres lavados consecutivos con 5.0 mL de agua a pH 1.0, se han ajustado al pH adecuado para la retención (pH 1.0), se han filtrado en membrana de poliéster y antes de la carga en el adsorbente, la membrana se ha lavado con tres volúmenes de 5.0 mL de agua a pH 1.0. Tras la retención, la elución se ha llevado a cabo según el procedimiento experimental 3.1.3, incluyendo una etapa de lavado con 2.0 mL de agua a pH 1.0.

Las recuperaciones, se han calculado por comparación de las áreas de pico cromatográfico obtenidas en el extracto de menta y en el extracto enriquecido con 4.0 µg de cada herbicida. Así, se han obtenido los resultados mostrados en la tabla 69.

Tabla 69
Recuperación de herbicidas fenoxiacido en extractos de 1 g de menta según el procedimiento de lixiviación

| <i>HERBICIDA</i> | <i>RECUPERACIÓN (%)</i> | | |
|--------------------------------|--------------------------|--|---|
| | 20 mL agua en ebullición | 20 mL agua a temperatura ambiente y lixiviación ultrasónica 15 min | 20 mL agua en ebullición y lixiviación ultrasónica 15 min |
| <i>2,4-D</i> | 32 | 80 | 70 |
| <i>MCPA</i> | 66 | 56 | 16 |
| <i>éster metílico 2,4-D</i> | 61 | 16 | 21 |
| <i>2,4-DP</i> | 21 | 66 | 18 |
| <i>MCPP</i> | 37 | 62 | 47 |
| <i>2,4-DB</i> | 71 | 88 | 23 |
| <i>MCPB</i> | nd | 92 | 15 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 65 | 64 | 47 |
| <i>éster butílico de 2,4-D</i> | 42 | 104 | 63 |

nd, no detectado

En la tabla 69 se puede apreciar, que la lixiviación con 20.0 mL de agua en ebullición no permite la determinación del herbicida MCPB y que respecto a los demás procedimientos estudiados, proporciona menores recuperaciones para el 2,4-D, MCPP y éster butílico de 2,4-D. En lo que se refiere a las lixivitaciones realizadas durante 15 min en ultrasonidos, comparada con la realizada utilizando agua en ebullición, el empleo de agua a temperatura ambiente ha disminuido la cantidad de materia orgánica co-extraída y ha permitido obtener mayores recuperaciones para la mayoría de los herbicidas. De este modo, llegando a un compromiso entre recuperación y extracción de materia endógena, el procedimiento más adecuado para el tratamiento de hojas de menta fresca ha sido el basado en la extracción ultrasónica con agua a temperatura ambiente.

En definitiva, el adsorbente Lida Sep-IC-OH ha demostrado ser muy eficaz en la limpieza de los extractos de menta y a diferencia del resto de adsorbentes evaluados, ha proporcionado extractos más limpios que han hecho posible la determinación de los herbicidas en forma ácida y de ésteres, por lo que se ha seleccionado como el óptimo para el tratamiento de este tipo de matriz.

Con objeto de eliminar una mayor cantidad de materia orgánica co-extraída, se ha realizado una etapa de lavado adicional antes de la elución de los herbicidas retenidos en el adsorbente, utilizando 2.0 mL de una mezcla de metanol-disolución acuosa 0.8% de ácido fosfórico 20:80 (v/v). Aunque no se han observado pérdidas de los analitos en las fracciones de lavado recogidas y analizadas, esta etapa no ha contribuido de forma apreciable a la limpieza de la matriz, por lo que se ha suprimido del método de tratamiento de muestra.

□ *Características analíticas con el adsorbente LIDA Sep-IC-OH*

De acuerdo a las condiciones descritas para el tratamiento de hojas de menta fresca en la sección experimental (procedimientos 4.2.2.4), se ha procedido a evaluar las características analíticas del método basado en la extracción mediante ultrasonidos con agua a temperatura ambiente y en la preconcentración y limpieza en el adsorbente polimérico de intercambio aniónico Lida Sep-IC-OH.

La sensibilidad del método se ha determinado a través de los límites de detección y cuantificación. Como en casos anteriores, se han adicionado cantidades crecientes de los herbicidas a los extractos de menta obtenidos tras la etapa de SPE en el adsorbente seleccionado. Los calibrados de cada uno de los fenoxiácidos en los intervalos adecuados de concentración se han obtenido de forma análoga.

Para evaluar la aplicabilidad del método desarrollado, y tomando como referencia los límites máximos de residuos establecidos por las regulaciones españolas y europeas en productos vegetales, que establecen una concentración máxima permitida de 0.10 mg kg⁻¹ para 2,4-D y MCPA y de 0.05 mg kg⁻¹ para el resto de herbicidas, se adicionaron las cantidades adecuadas de cada uno de ellos a 1 gramo de muestra para obtener concentraciones finales en los extractos de menta en las proximidades del máximo permitido por ley y ligeramente superiores a este nivel. Así, se adicionaron cantidades de 0.10 y 0.30 mg kg⁻¹ para 2,4-D, MCPA y éster metílico de 2,4-D, y de 0.05 y 0.30 mg kg⁻¹ para el resto de herbicidas.

Las características analíticas del método propuesto, así como las recuperaciones obtenidas a los diferentes niveles adicionados, se incluyen en la tabla 70.

Tabla 70
Características analíticas y recuperaciones de los herbicidas en extractos de 1 g de menta a los diversos niveles de adición

| HERBICIDA | Características analíticas | | | | Recuperación (%) ^(b) | |
|----------------------|------------------------------|------------------------------|---|-------|---|-------------------|
| | LD (mg·kg ⁻¹) | LQ (mg·kg ⁻¹) | Linealidad ^(a) | | Nivel adicionado (mg·kg ⁻¹) | Media ± RSD |
| | | | Intervalo de concentración (mg·kg ⁻¹) | R | | |
| 2,4-D | 0.009 | 0.030 | 0.03-1.0 | 0.997 | 0.30 0.10 | 55 ± 2 35 ± 5 |
| MCPA | 0.003 | 0.010 | 0.01-1.0 | 0.999 | 0.30 0.10 | 67 ± 3 23 ± 2 |
| éster metílico 2,4-D | 0.003 | 0.010 | | 0.998 | 0.30 0.10 | 16 ± 1 17 ± 2 |
| 2,4-DP | 0.002 | 0.007 | | 0.999 | 0.30 0.05 | 88 ± 1 21 ± 2 |
| MCPD | 0.003 | 0.010 | | 0.999 | 0.30 0.05 | 40 ± 2 - |
| 2,4-DB | 0.005 | 0.016 | | 0.991 | 0.30 0.05 | 38 ± 3 40 ± 1 |
| MCPB | 0.004 | 0.014 | 0.02-1.0 | 0.999 | 0.30 0.05 | 57 ± 1 49 ± 1 |
| 2,4,5-TP | 0.004 | 0.013 | | 0.999 | 0.30 0.05 | 39 ± 2 46 ± 1 |
| éster butílico 2,4-D | nd | nd | ne | ne | ne | ne |

(a) n=5 (b) n=4

nd, no detectado a niveles inferiores a 1.0 mg kg⁻¹

ne, no evaluado

Como se puede apreciar en la tabla 70, los límites de detección han estado comprendidos en el intervalo de 0.002 a 0.009 mg kg⁻¹, aunque la determinación y cuantificación del éster butílico del 2,4-D a niveles inferiores a 1 mg kg⁻¹ no ha sido posible debido al solapamiento con un pico correspondiente a materia endógena co-extraída de la matriz. Sin embargo, incluso considerando la dilución necesaria de los extractos tras la elución del adsorbente para obtener la disolución de focalización, que contiene un 80% de agua, se ha obtenido adecuada sensibilidad para determinar el resto de herbicidas. Por otra parte, todos los analitos han mostrado buena linealidad en el intervalo de concentración estudiado, con coeficientes de regresión superiores a 0.997.

En general, aunque algunos herbicidas como el 2,4-D, MCPA, éster metílico de 2,4-D y 2,4-DP han mostrado baja recuperación, especialmente al nivel de menor concentración, los resultados han sido muy reproducibles, con desviaciones estándar relativas entre el 1 y 5%. Recuperaciones similares a los dos niveles adicionados se han observado para el éster metílico del 2,4-D, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP y en el caso del MCPP, su determinación sólo ha sido posible a un nivel superior al máximo permitido. La figura 52, muestra el cromatograma obtenido para un extracto de menta con y sin herbicidas adicionados a un nivel ligeramente superior al máximo permitido por ley.

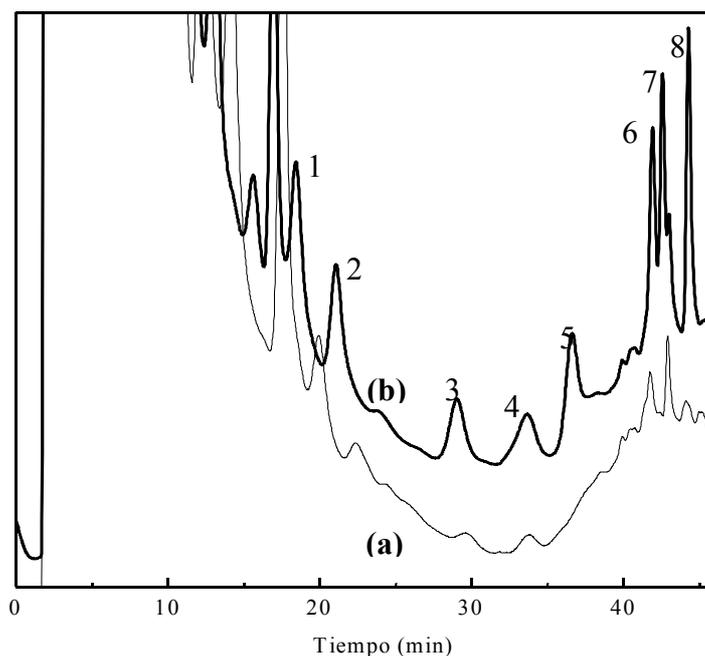


Figura 52. Cromatograma de un extracto de menta sin (a) y con (b) herbicidas adicionados a un nivel de 0.30 mg kg^{-1} . Herbicidas; (1) 2,4-D, (2) MCPA, (3) éster metílico 2,4,-D, (4) 2,4,-DP, (5) MCPP, (6) 2,4-DB, (7) MCPB, (8) 2,4,5-TP.

Por tanto, se puede decir que entre todos los materiales de SPE evaluados, el adsorbente de intercambio de aniones Lida Sep-IC-OH ha resultado muy selectivo y eficaz para la extracción de herbicidas fenoxiácido de muestras de menta fresca y la limpieza de esta matriz vegetal. El método de tratamiento basado en la extracción ultrasónica con agua, en la filtración de la muestra con papel de análisis gravimétrico y membrana de poliéster y en la SPE en este adsorbente, constituye una alternativa a los procedimientos tradicionales de análisis en matrices vegetales complejas y junto con la determinación mediante cLC, ha permitido la determinación de residuos de herbicidas en cantidades de 1 gramo de menta a los niveles permitidos por la legislación con adecuada sensibilidad y reproducibilidad.

5. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN QUIRAL DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS CON DETECCIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

En los últimos años el desarrollo de métodos cromatográficos para la separación de parejas de enantiómeros en mezclas racémicas ha recibido especial interés, y es que la actividad herbicida, tal y como se ha puesto de manifiesto en la revisión bibliográfica, depende únicamente de uno de los isómeros ópticos.

Las fases estacionarias quirales, CSP_s, empleadas en HPLC, suelen presentar distintos mecanismos de retención que no siempre son sencillos de explicar, por lo que se tiende a utilizar fases estacionarias de diversa naturaleza. Para conseguir enantioselectividad, además de utilizar la fase móvil adecuada, se debe elegir cuidadosamente la fase estacionaria quiral en función de las características y estructura química de los analitos a determinar.

De los nueve fenoxiácidos objeto de estudio, solamente los herbicidas 2,4-DP, MCP y 2,4,5-TP poseen un carbono asimétrico en su estructura y en consecuencia, presentan quiralidad. En este estudio, la separación enantiomérica de cada uno de ellos se ha evaluado mediante cromatografía de líquidos con columnas convencionales y columnas de diámetro interno reducido, empaquetadas con una amplia variedad de CSP_s que incluyen polisacáridos, ciclodextrinas y antibióticos macrocíclicos glicopeptídicos. Por lo que respecta a la fase móvil, se han utilizado tanto fases acuosas en fase inversa como orgánicas en fase normal.

5.1. SEPARACIÓN QUIRAL MEDIANTE HPLC CONVENCIONAL

El análisis de mezclas racémicas de los herbicidas 2,4-DP, MCP y 2,4,5-TP en forma ácida, se ha llevado a cabo mediante cromatografía de líquidos convencional según las condiciones descritas el procedimiento 5.1 de la sección experimental, con columnas empaquetadas de gel de sílice enlazada a diferentes ligandos como celulosa tris-(3,5-dimetil-fenilcarbamato) y β -ciclodextrina carboxipermetilada.

La separación se realizó principalmente en fase inversa, si bien debido a las características de columna CHIRALCEL[®] OD-H, el modo de separación ha sido fase normal.

5.1.1. FASE ESTACIONARIA DE FENILCARBAMATO DE CELULOSA

Utilizando esta fase estacionaria, la separación de los herbicidas de interés se ha llevado a cabo en fase normal y fase inversa. La composición de la fase móvil se ha optimizado considerando que con fases estacionarias de polisacáridos, los aditivos ácidos poseen un efecto considerable en la selectividad quiral (298).

En relación a los mecanismos de interacción, la capacidad de reconocimiento de los polisacáridos de fenilcarbamato se encuentra influenciada por los sustituyentes de las moléculas fenilo, que modifican la polaridad de los carbamatos. Este hecho sugiere, que los lugares de adsorción para la discriminación quiral en este tipo de fases estacionarias pueden ser los grupos polares carbamato (119).

□ *Separación en fase normal*

Utilizando la columna CHIRALCEL[®] OD-H (150 x 2.1 mm I.D., 5 µm) de fenilcarbamato de celulosa, se han evaluado diferentes composiciones de la fase móvil hexano-isopropanol para conseguir la separación individual de las parejas de enantiómeros. La mezcla hexano-3% de isopropanol-0.1% de TFA no ha permitido la separación de ninguno de los analitos estudiados, de forma que a una longitud de onda de 232 nm, los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP se han detectado como un solo pico cromatográfico a tiempos de retención de 7.6, 8.7 y 9.1 min respectivamente.

Para aumentar la retención en la fase estacionaria quiral, se ha disminuido la proporción de isopropanol en la mezcla al 1%. Aunque el herbicida 2,4-DP no se ha separado con esta composición de fase móvil, los enantiómeros del 2,4,5-TP y MCPP se han separado en un tiempo aproximado de 26 min con una resolución de 0.4 y 0.3 cada uno de ellos. La separación a línea base de estos herbicidas no ha sido posible empleando fases móviles con proporciones de isopropanol menores del 1%, ya que la baja viscosidad de este tipo de mezclas ha producido problemas en la presión del sistema cromatográfico y señal inestable del detector.

La utilización de otros disolventes orgánicos más viscosos como el n-heptano tampoco ha resultado satisfactoria, por lo que no se ha podido conseguir la enantioresolución de los tres herbicidas estudiados con la fase estacionaria quiral de carbamato de celulosa en las condiciones experimentales de trabajo.

□ *Separación en fase inversa*

Debido a los problemas observados en fase normal, se ha estudiado la separación quiral en fase inversa con la fase estacionaria de fenilcarbamato de celulosa, utilizando la columna CHIRALCEL[®] OD-RH (150 x 4.6 mm I.D., 5 μ m) e inyectando por separado disoluciones de cada uno de los herbicidas. Como fase móvil se han empleado mezclas de tampón NaH₂PO₄ 0.2 M pH 2 (H₃PO₄)-acetonitrilo, tal y como recomienda el suministrador, Daicel Chemical Industries, para muestras ácidas. Con la composición 40:60 (v/v), todos los herbicidas se han detectado como un único pico cromatográfico en un tiempo aproximado de análisis de 15 min. Disminuyendo la proporción de acetonitrilo a un 20%, tampoco se ha conseguido separar y resolver adecuadamente ninguno de ellos y los tiempos de retención se han incrementado hasta 100 min.

A través de los estudios realizados con la fase estacionaria de celulosa tris-(3,5-dimetil-fenilcarbamato, se puede deducir que esta fase no resulta enantioselectiva hacia los analitos de interés tanto en el modo de separación de fase normal como en el de fase inversa, razón por la cual, la separación quiral se ha evaluado con otro tipo de fase estacionaria

5.1.2. FASE ESTACIONARIA DE β -CICLODEXTRINA

La capacidad de esta fase para la enantioseparación de los fenoxiácidos, se ha estudiado con la columna ORpak CDBS-453 HQ (150 x 4.6 mm I.D., 5 μ m), rellena de una fase estacionaria de β -ciclodextrina carboxipermetilada.

Utilizando como fase móvil la mezcla MeOH-tampón NaH₂PO₄ 50 mM pH 3 (H₃PO₄) 50:50 (v/v), se han podido detectar los enantiomeros del MCPP y 2,4,5-TP a una longitud de onda de 240 nm, aunque los picos cromatográficos han mostrado una asimetría considerable y no se han resuelto en su totalidad.

La separación a línea base de los enantiomeros del MCPP se ha conseguido a tiempos de retención de 50.6 y 56.8 min, con la fase móvil AcN-disolución acuosa NaCl 0.2M 1.1% ácido acético 10:90 (v/v). Para disminuir el tiempo de análisis, se ha incrementado la proporción de acetonitrilo en la mezcla al 15%. En estas condiciones, los enantiomeros del MCPP y 2,4-DP se han separado con una resolución de 0.4 y 0.6 respectivamente, mientras que los del herbicida 2,4,5-TP se han resuelto a línea base a un tiempo de retención considerable, 66.0 y 72.6 min aproximadamente.

Mejores resultados se han obtenido con la fase móvil AcN-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% ácido acético 20:80 (v/v), que ha permitido resolver de forma aceptable los enantiómeros del MCPP con tiempos de retención de 16.7 y 18.5 min, del 2,4-DP con tiempos de 19.2 y 21.5 min y del 2,4,5-TP con tiempos de retención de 46.8 y 51.6 min. Así, esta composición de fase móvil podría resultar adecuada para la determinación por separado de MCPP y de 2,4-DP con resoluciones y tiempos de análisis razonables, si bien el tiempo necesario para conseguir la separación quiral del 2,4,5-TP continua siendo excesivamente largo. Análogamente, se podrían analizar mezclas de 2,4-DP y 2,4,5-TP o mezclas de MCPP y 2,4,5-TP en un tiempo de 55 min aproximadamente, pero como se puede observar en el cromatograma de la figura 53, la fase estacionaria de ciclodextrina no permite la enantioresolución en mezclas de los tres herbicidas estudiados.

El empleo de fases móviles de AcN-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% ácido acético de composición 10:90 (v/v), ha alargado excesivamente los tiempos de retención y no ha supuesto ninguna mejora respecto a la separación con la fase móvil anterior (composición 20:80 v/v).

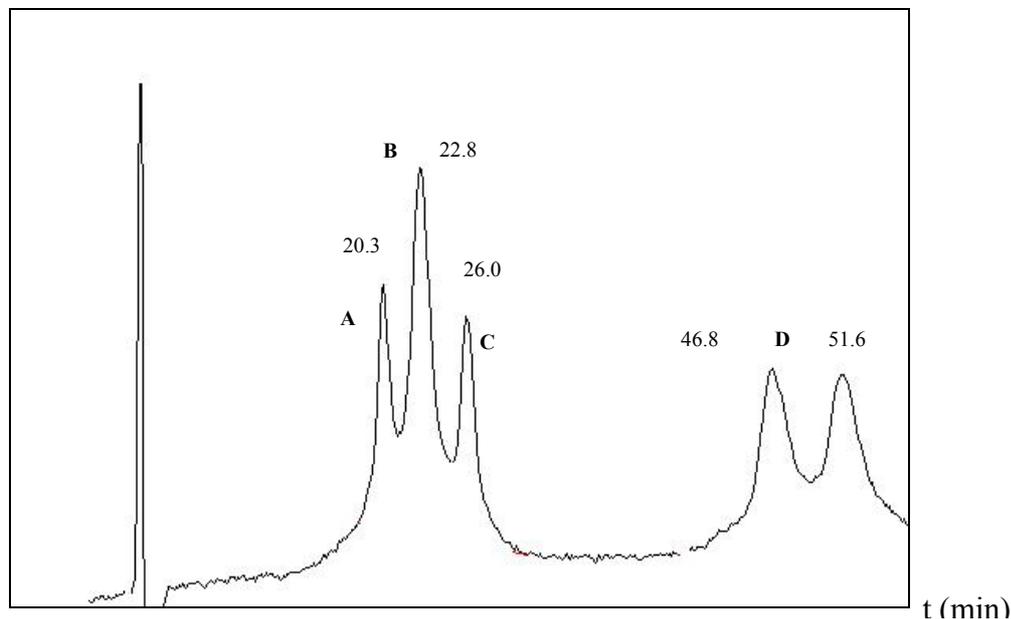


Figura 53. Separación quiral de una mezcla de herbicidas en concentración 0.5 mM cada uno de ellos a un caudal de 0.5 mL min^{-1} con la fase móvil AcN-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% ácido acético 20:80 (v/v), en la columna empaquetada de β -ciclodextrina carboxipermetilada: A (1^{er} enantiómero del 2,4-DP); B (2^o enantiómero de 2,4-DP + 1^{er} enantiómero de MCPP); C (2^o enantiómero del MCPP); D (enantiómeros del 2,4,5-TP).

5.2. SEPARACIÓN QUIRAL CON FASES ESTACIONARIAS DE ANTIBIÓTICOS MEDIANTE HPLC CON NANO-COLUMNAS Y COLUMNAS CAPILARES

Con objeto de encontrar una fase estacionaria universal adecuada para todos los fenoxiácidos estudiados, se ha evaluado la enantioselectividad de algunos antibióticos macrocíclicos glicopeptídicos como vancomicina y teicoplanina.

Este tipo de antibióticos son complementarios unos de otros, por lo que si se obtiene resolución parcial con uno de ellos, probablemente con otro se obtenga mejor separación. Además, suelen poseer un alto grado de selectividad con una amplia variedad de compuestos, lo que no es habitual con la mayoría de las fases estacionarias quirales utilizadas.

Por otra parte, pueden interactuar con los analitos por mecanismos hidrofóbicos, dipolo-dipolo, interacciones π - π , enlaces de hidrógeno y repulsión estérica, aunque una de las más importantes es la iónica o interacción entre cargas. Todos los antibióticos glicopeptídicos contienen grupos ionizables que controlan su carga y afectan al reconocimiento quiral, carga que está asociada al grupo glicopeptídico y viene dada por el pH del tampón de la fase móvil (122).

Utilizando como selector quiral vancomicina, los herbicidas fenoxiácido han sido separados previamente mediante electroforesis capilar (125, 213), pero no con técnicas de cromatografía líquida capilar o nano-LC. Con teicoplanina, aunque se han realizado separaciones mediante HPLC, siempre se han empleado columnas de diámetro interno convencional (4.6 mm) (126, 147, 148). Por esta razón, la separación quiral se ha estudiado con capilares empaquetados en el propio laboratorio de diámetro interno reducido, 320 μ m en el caso de la columna de teicoplanina (cLC) y 75 μ m en el de la columna de vancomicina (nano-LC).

Tal y como se ha puesto de manifiesto anteriormente en la revisión bibliográfica, la utilización de columnas de diámetro interno reducido resulta especialmente ventajosa, puesto que además de aumentar la eficacia de la separación, disminuye drásticamente el consumo de disolvente por los bajos caudales de fase móvil utilizados y en este caso en particular, la cantidad de la fase estacionaria quiral del empaquetamiento, fase que por lo general resulta muy costosa.

5.2.1. FASE ESTACIONARIA DE TEICOPLANINA

Tomando como referencia el herbicida MCPP en forma ácida, se ha evaluado la capacidad del antibiótico glicopeptídico macrocíclico de teicoplanina como selector quiral para la resolución enantiomérica de mezclas racémicas de los herbicidas fenoxiácido de interés. La separación, se ha realizado mediante cromatografía líquida capilar según el procedimiento descrito en el apartado 5.2.2.1 de la sección experimental, utilizando la columna empaquetada con la fase estacionaria de teicoplanina (5 μm , 0.320 mm I.D.) (figura 20).

Considerando las separaciones realizadas previamente por C. Guillaume y col. mediante cromatografía de líquidos convencional (126, 147, 148), se han empleado como fases móviles mezclas de metanol o acetonitrilo con tampón formiato o citrato a diferentes concentraciones y valores de pH.

Con la fase móvil MeOH-tampón formiato 5 mM pH 3.5 de composición 50:50 (v/v) y 30:70 (v/v), no se ha conseguido la separación enantiomérica del MCPP. Las mezclas de tampón formiato 5 mM pH 3.5 con proporciones del 20 y 10% de AcN, tampoco han permitido su enantioresolución y en general, se ha observado que el aumento del pH del tampón, al disminuir el tiempo de retención, no contribuye a la resolución. El incremento de la concentración del tampón favorece la retención, pero al igual que el aumento de pH, no permite distinguir entre los correspondientes enantiómeros.

Cambiando la naturaleza y pH del tampón, se han estudiado fases móviles de diferente composición. Con la mezcla AcN-tampón citrato 20 mM pH 5.5 40:60 (v/v) no se ha observado ni retención ni reconocimiento quiral. Utilizando AcN-tampón citrato 20 mM pH 4.5 ó pH 2.8 20:80 (v/v) y AcN-tampón citrato 20 mM pH 3.5 ó 2.8 10:90 (v/v), se ha producido retención en la fase estacionaria de teicoplanina, pero no enantioresolución.

Por tanto se puede deducir, que aunque en la mayoría de las condiciones de separación evaluadas se ha observado la retención del herbicida MCPP, la fase estacionaria quiral de teicoplanina no ha resultado enantioselectiva hacia los analitos de interés, puesto que los herbicidas fenoxiácido 2,4-DP y 2,4,5-TP, tampoco se han conseguido resolver con la amplia variedad de fases móviles utilizadas.

5.2.2. FASE ESTACIONARIA DE VANCOMICINA

Otro antibiótico estudiado como posible fase estacionaria para la enantioseparación de los fenoxiácidos quirales ha sido la vancomicina, que constituye uno de los principales antibióticos macrocíclicos.

Contiene en su estructura 18 centros asimétricos con grupos funcionales aromático, hidroxilo, amino, amido, carboxilo, etc, los cuales son responsables de las interacciones hidrofóbicas, electrostáticas y de enlace de hidrógeno que se ponen de manifiesto con los analitos. Su elevado poder de resolución hacia compuestos quirales con grupos carboxílicos en su estructura, como los herbicidas fenoxiácido en forma ácida, es debido probablemente a la presencia de los grupos amino, si bien, en este caso particular cabe suponer que la presencia de átomos de cloro influye de manera considerable en la interacción vancomicina-soluto.

La separación y determinación de las parejas de enantiómeros de los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP en forma ácida, se ha llevado a cabo individualmente para cada uno de ellos mediante HPLC siguiendo el procedimiento experimental 5.2.2.2, con la nano-columna empaquetada previamente de vancomicina-sílice modificada (5 μm , 0.075 mm I.D.) (figura 19). Como fases móviles, se han utilizado fundamentalmente mezclas de MeOH, agua y tampón acetato amónico 500 mM a diferentes valores de pH.

5.2.2.1. Optimización de las condiciones cromatográficas

Con objeto de establecer las mejores condiciones de análisis, se han evaluado parámetros cromatográficos como la anchura de pico ($w_{1/2}$), resolución (R_s), enantioselectividad (α), factor de retención (k), eficacia de la columna (N) y altura equivalente de plato teórico (HEPT). La selectividad y altura equivalente de plato teórico se han calculado de acuerdo a la expresión:

$$\alpha = k_2 / k_1$$
$$\text{HEPT} = L / N$$

siendo k_2 y k_1 los factores de retención del compuesto con mayor y menor retención respectivamente, L la longitud de columna y N el número de platos teóricos.

La separación cromatográfica, se ha optimizado en condiciones isocráticas en función de la composición y caudal de fase móvil, inyectando un volumen de 60 nL aproximadamente, de disoluciones estándar de los herbicidas de concentración 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en la fase móvil correspondiente.

El caudal a través de la columna se ha medido durante un tiempo de 15 minutos conectando el extremo final del capilar a través de un tubo de teflón a una jeringa de volumen 10 μL . Mediante una relación de división de aproximadamente 1/2000, el caudal inicial de la bomba de 0.2 y 0.1 mL min^{-1} , se ha reducido a un caudal en columna de 120 y 60 nL min^{-1} respectivamente. Para determinar el tiempo básico se ha inyectado metanol en el sistema cromatográfico.

Los resultados obtenidos en las distintas condiciones de separación ensayadas a una longitud de onda de detección de 195 nm, se incluyen en la tabla 71. En ella se puede apreciar que aunque el tiempo de análisis para todos los herbicidas a un caudal de 120 nL min^{-1} ha sido menor de 15 min, con las mezclas de fase móvil utilizadas no se ha conseguido separar adecuadamente ninguna de las parejas de enantiómeros. Disminuyendo el caudal a la mitad, 60 nL min^{-1} , la enantioresolución de todos ellos ha mejorado considerablemente, si bien se ha incrementado el tiempo de análisis.

Tabla 71. Parámetros experimentales de la separación enantiomérica con la fase estacionaria quiral de vancomicina mediante nano-LC

| <i>FM</i> ; 500 mM NH ₄ Ac (pH) H ₂ O-MeOH (%) | | 2% (4.5) 3-95 | | 5% (4.5) 0-95 | | 2% (4.5) 8-90 | | 2% (4.5) 8-90 | | 2% (4.5) 13-85 | | 2% (6.0) 13-85 | | 5% (4.5) 10-85 | |
|---|----------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| <i>Caudal</i> (nL min ⁻¹) | | 120 | | | | | | 60 | | | | | | | |
| <i>t_o</i> (min)(MeOH) | | 10.43 | | 10.38 | | 10.32 | | 20.58 | | 20.70 | | 20.11 | | 20.61 | |
| Enantiómero | | 1° | 2° | 1° | 2° | 1° | 2° | 1° | 2° | 1° | 2° | 1° | 2° | 1° | 2° |
| <i>t_R</i> (min) | 2,4-DP | 10.40 | 10.94 | 10.80 | 11.30 | 10.47 | 11.12 | 21.30 | 22.81 | 21.95 | 23.90 | 18.90 | 19.49 | 22.68 | 24.51 |
| | MCPP | 10.23 | 10.55 | 10.60 | 10.88 | 10.26 | 10.68 | 20.80 | 21.73 | 21.50 | 22.72 | 19.12 | | 22.33 | 23.58 |
| | 2,4,5-TP | 10.37 | 10.72 | 10.81 | | 10.40 | 10.77 | 21.09 | 21.94 | 21.88 | 23.01 | 19.05 | | 22.79 | 24.06 |
| <i>w_{1/2}</i> (min) | 2,4-DP | 0.28 | 0.28 | 0.27 | 0.29 | 0.27 | 0.30 | 0.41 | 0.52 | 0.50 | 0.53 | 0.42 | 0.49 | 0.45 | 0.52 |
| | MCPP | 0.41 | 0.43 | 0.65 | 0.62 | 0.30 | 0.33 | 0.40 | 0.44 | 0.46 | 0.49 | - | | 0.43 | 0.45 |
| | 2,4,5-TP | 0.43 | 0.47 | - | | 0.37 | 0.39 | 0.43 | 0.43 | 0.47 | 0.49 | - | | 0.47 | 0.51 |
| <i>k</i> | 2,4-DP | 0 | 0.05 | 0.04 | 0.09 | 0.01 | 0.08 | 0.04 | 0.11 | 0.06 | 0.16 | 0 | 0 | 0.10 | 0.19 |
| | MCPP | 0 | 0.01 | 0.02 | 0.05 | 0 | 0.04 | 0.01 | 0.06 | 0.04 | 0.10 | 0 | 0 | 0.08 | 0.14 |
| | 2,4,5-TP | 0 | 0.03 | | | 0.01 | 0.04 | 0.03 | 0.07 | 0.06 | 0.11 | 0 | 0 | 0.11 | 0.17 |
| <i>α</i> | 2,4-DP | - | | 2.2 | | 5.5 | | 3.1 | | 2.6 | | - | | 1.9 | |
| | MCPP | - | | 2.4 | | - | | 5.1 | | 2.5 | | - | | 1.7 | |
| | 2,4,5-TP | - | | - | | 5.6 | | 2.7 | | 2.0 | | - | | 1.6 | |
| <i>R_s</i> | 2,4-DP | 1.0 | | 0.9 | | 1.2 | | 1.7 | | 2.0 | | 0.7 | | 1.9 | |
| | MCPP | 0.4 | | 0.2 | | 0.6 | | 1.1 | | 1.4 | | - | | 1.4 | |
| | 2,4,5-TP | 0.4 | | - | | 0.5 | | 1.0 | | 1.2 | | - | | 1.3 | |
| <i>N</i> | 2,4-DP | 7756 | 8572 | 8794 | 8294 | 8388 | 7869 | 15027 | 10542 | 10681 | 11312 | 11054 | 8876 | 13942 | 12116 |
| | MCPP | 3519 | 3276 | 1456 | 1696 | 6484 | 5700 | 14984 | 13513 | 11997 | 12058 | - | - | 15014 | 15487 |
| | 2,4,5-TP | 3236 | 2845 | - | - | 4499 | 4335 | 13123 | 14204 | 11852 | 12163 | - | - | 13083 | 12327 |
| <i>HEPT</i> (μm) | 2,4-DP | 27.1 | 24.5 | 23.9 | 25.3 | 25.0 | 26.7 | 14.0 | 19.9 | 19.7 | 18.6 | 19.0 | 23.7 | 15.1 | 17.3 |
| | MCPP | 59.7 | 64.1 | 144.2 | 123.8 | 32.4 | 36.8 | 14.0 | 15.5 | 17.5 | 17.4 | - | | 14.0 | 13.6 |
| | 2,4,5-TP | 64.9 | 73.8 | - | | 46.7 | 48.4 | 16.0 | 14.8 | 17.7 | 17.3 | - | | 16.1 | 17.0 |

Utilizando un 2% de tampón acético/acetato (500 mM, pH 4.5) y proporciones de metanol del 85 ó 90% en la fase móvil, no se han observado diferencias importantes en los tiempos de retención y anchuras de pico, pero como se puede observar en la figura 54, se ha obtenido una resolución mayor y comprendida en el intervalo 1.2 a 2.0, para todos los herbicidas quirales con la fase móvil metanol-agua-tampón acetato amónico 500 mM pH 4.5-agua 85:13:2 (v/v/v). En estas condiciones, el tiempo de análisis ha sido de 23 min.

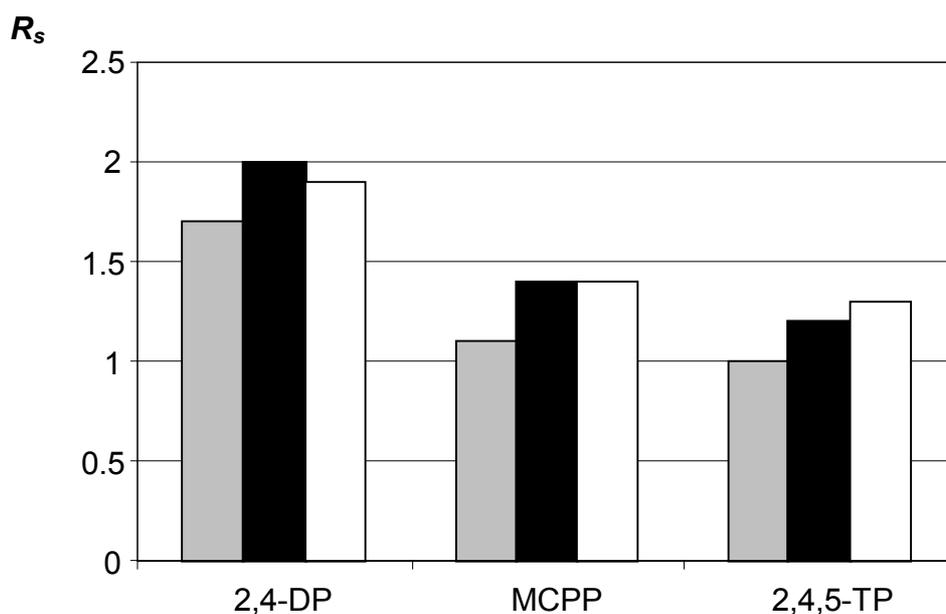


Figura 54. Efecto de la composición de fase móvil en la resolución enantiomérica a un caudal de 60 nL min⁻¹. Fase móvil: metanol-agua-tampón acetato amónico 500 mM pH 4.5. Gris 90/8/2 (v/v/v), negro 85/13/2 (v/v/v), blanco 85/10/5 v/v/v).

Incrementando la proporción de tampón en la fase móvil a un 5% pero manteniendo constante la de metanol a un 85%, se ha obtenido una resolución aceptable en el intervalo de 1.3-1.9, y como se muestra en la tabla 71, se ha mejorado la eficacia de la separación (HEPT) sin aumento considerable de los tiempos de retención.

Un efecto importante del pH se ha observado en la separación de cada par de enantiomeros, pero especialmente en el caso particular del MCP y 2,4,5-TP, cuando se ha utilizado como fase móvil la mezcla metanol-agua-tampón acetato amónico 500 mM pH 6.0 85/13/2 (v/v/v), puesto que en estas condiciones, únicamente ha sido posible la separación del herbicida 2,4-DP con una resolución de 0.7.

Los herbicidas fenoxiácidos quirales estudiados son compuestos ionizables con valores de pK_a comprendidos entre 3.0 y 3.8, por lo que el pH de la fase móvil constituye uno de los factores críticos de la separación. En este caso, el incremento de pH afecta de forma negativa a la enantioresolución, probablemente como consecuencia del alto grado de ionización de estos compuestos. La figura 55, representa la variación del logaritmo del factor de retención con el aumento de la proporción acuosa en la fase móvil. Claramente se observa un incremento de los valores de $\ln k$, lo que pone de manifiesto una típica interacción de fase inversa. Los mayores factores de retención se han obtenido con un proporción de tampón acético/acetato del 5%.

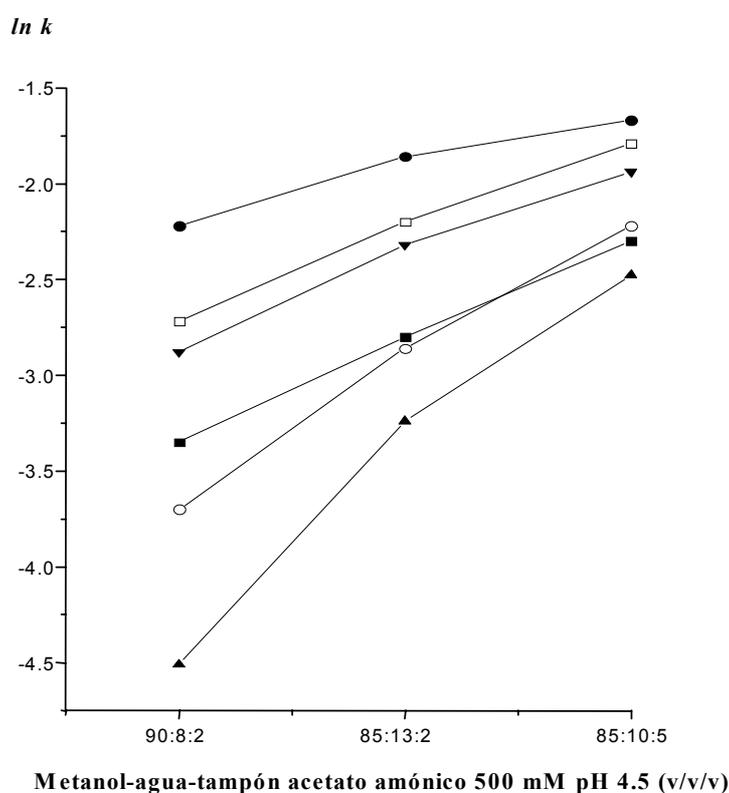


Figura 55. Efecto de la composición de fase móvil en el logaritmo del factor de retención. Primer (■) y segundo (●) enantiomero de 2,4-DP; primer (▲) y segundo (▼) enantiomero de MCP; primer (○) y segundo (□) enantiomero de 2,4,5-TP.

Buscando el compromiso entre resolución, factor de retención, eficacia y enantioselectividad, las mejores condiciones de separación encontradas han sido una composición de fase móvil metanol-agua-tampón acetato amónico 500 mM pH 4.5 85/10/5 (v/v/v) y un caudal de en columna de 60 nL min^{-1} , lo que ha permitido la separación individual cada una de las tres parejas de enantiomeros en un tiempo aproximado de 24 minutos.

En estas condiciones, como se puede observar en la tabla 71, se han obtenido factores de selectividad en todos los casos mayores de 1.6 y el 2,4-DP, con dos átomos de cloro en su estructura, ha mostrado la mayor resolución enantiomérica.

Los cromatogramas obtenidos en las condiciones óptimas de separación para los herbicidas 2,4-DP, MCP P y 2,4,5-TP, se muestran en la figura 56.

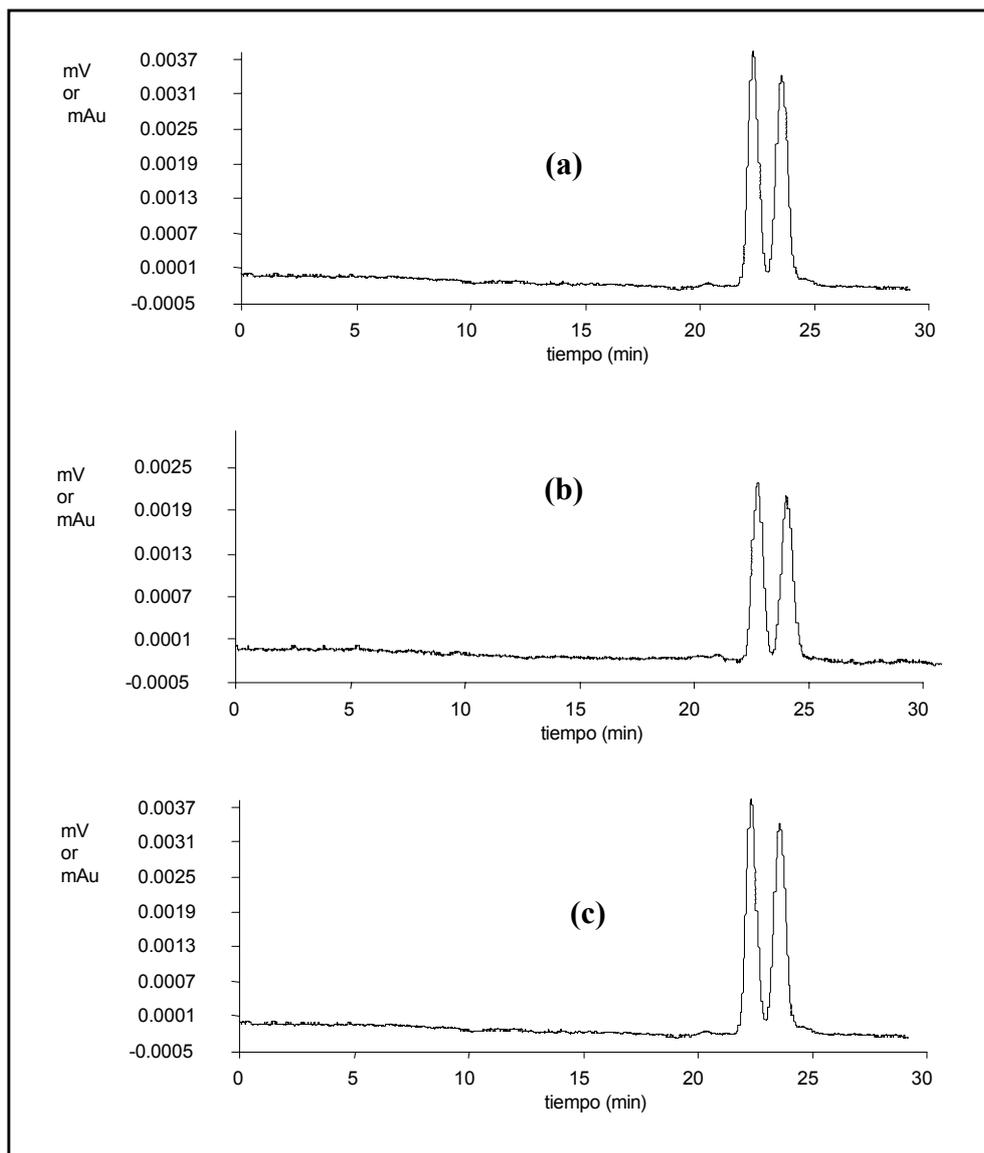


Figura 56. Cromatograma de una disolución estándar de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de 2,4-DP (a), 2,4,5-TP (b) y MCP P (c) en las condiciones óptimas de separación mostradas en la tabla 26 (procedimiento experimental 5.2.3).

5.2.2.2. Determinación y características analíticas

Las características analíticas del método propuesto para la separación quiral y determinación cromatográfica de los fenoxiácidos de interés, se han evaluado a través de la sensibilidad, intervalo lineal y reproducibilidad, siguiendo el procedimiento experimental 5.2.3.

Los *límites de detección y cuantificación*, se han determinado con disoluciones estándar de los herbicidas en la fase móvil seleccionada, a un caudal de 60 nL min⁻¹ y con un tiempo de inyección en el sistema cromatográfico de 10 segundos.

La tabla 72, muestra los valores obtenidos a dos longitudes de onda diferentes, 195 y 232 nm. En ella se puede apreciar una mayor sensibilidad para todos los herbicidas a una longitud de onda de medida de 195 nm, en cuyo caso, los límites de detección conseguidos para cada uno de los enantiomeros se han encontrado entre 1.4 y 4.2 µg mL⁻¹.

Tabla 72
Límites de detección y cuantificación de los herbicidas fenoxiácido quirales en forma ácida con la fase estacionaria de vancomicina mediante nano-LC

| λ (nm) | | 195 | | 232 | |
|----------------|-------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| HERBICIDA | Enantiomero | LD (µg mL ⁻¹) | LQ (µg mL ⁻¹) | LD (µg mL ⁻¹) | LQ (µg mL ⁻¹) |
| MCPP | 1° | 1.4 | 4.5 | 4.2 | 13.7 |
| | 2° | 1.4 | 4.7 | 4.5 | 14.9 |
| 2,4-DP | 1° | 3.5 | 11.6 | 5.0 | 16.7 |
| | 2° | 3.6 | 11.9 | 5.9 | 19.6 |
| 2,4,5-TP | 1° | 3.3 | 10.9 | 2.2 | 7.5 |
| | 2° | 4.2 | 13.8 | 5.7 | 19.0 |

La cuantificación se ha realizado mediante calibración externa y medida del área de pico cromatográfico a una longitud de onda de detección de 195 nm. Los gráficos del calibrado (n=5), se han obtenido en el margen de concentraciones de 15 a 75 µg mL⁻¹ para 2,4-DP y 2,4,5-TP, y de 5 a 75 µg mL⁻¹ para el herbicida MCPP.

Como se puede observar en la figura 57, todos los analitos han mostrado buena *linealidad* en los intervalos estudiados, con coeficientes cuadrados de correlación de las rectas de ajuste comprendidos entre 0.973 y 0.996.

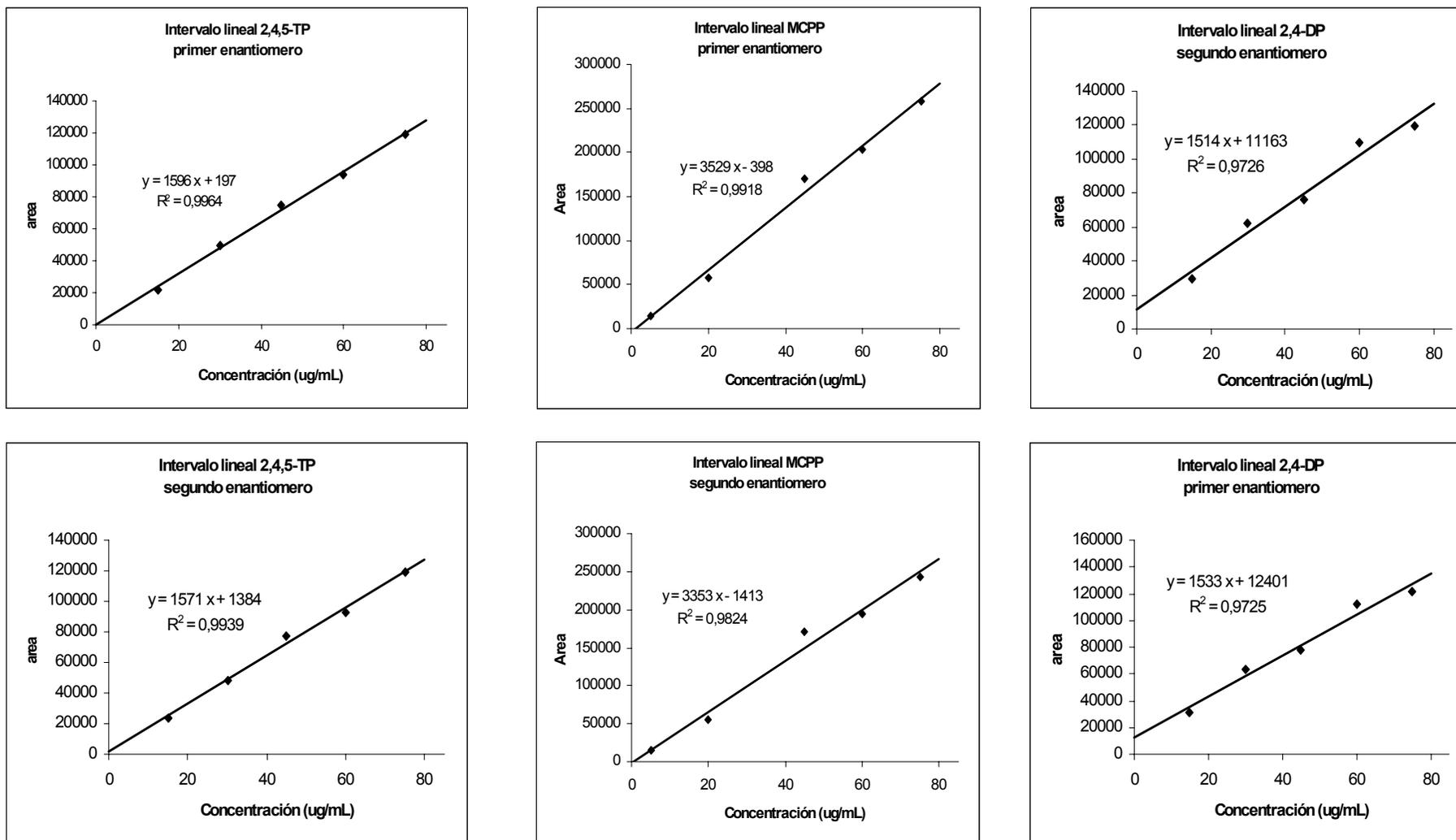


Figura 57. Gráficos y ecuaciones del calibrado de las parejas de enantiomeros separadas con la fase estacionaria quiral de vancomicina.

La *reproducibilidad* del método de separación se ha estimado con disoluciones estándar de cada uno de los herbicidas de concentración $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ en las condiciones de análisis óptimas. A través del tiempo de retención y área de pico cromatográfico medidos para un total de cinco inyecciones durante el mismo día y tres durante días consecutivos, se han determinado los valores de coeficiente de variación mostrados en la tabla 73.

Tabla 73
Reproducibilidad del método de separación

| <i>HERBICIDA</i> | <i>ENANTIOMERO</i> | <i>Mismo día</i> <i>(n=5)</i> | | <i>Días diferentes</i> <i>(n=3)</i> | |
|------------------|--------------------|----------------------------------|---------------------|--|---------------------|
| | | <i>CV (%)</i> | | | |
| | | <i>t_R</i> | <i>área de pico</i> | <i>t_R</i> | <i>área de pico</i> |
| <i>MCP</i> | 1° | 0.4 | 7.0 | 0.2 | 15 |
| | 2° | 0.4 | 6.0 | 0.2 | 15 |
| <i>2,4-DP</i> | 1° | 0.3 | 20 | 0.2 | 11 |
| | 2° | 0.4 | 20 | 0.1 | 11 |
| <i>2,4,5-TP</i> | 1° | 0.2 | 11 | 0.1 | 10 |
| | 2° | 0.4 | 10 | 0.2 | 8.0 |

Como se puede observar en la tabla anterior, los resultados obtenidos para los tiempos de retención han sido bastante buenos, con valores de coeficiente de variación comprendidos en el intervalo de 0.2-0.4%. En lo que se refiere a las áreas de pico los resultados han sido menos satisfactorios, tal y como cabe esperar por la incertidumbre asociada a la inyección, que se realiza durante un tiempo de 10 segundos y que corresponde aproximadamente a un volumen de 60 nL, el cual puede variar ligeramente por la falta de exactitud en la medida del tiempo de inyección.

La reproducibilidad también se ha estudiado para inyecciones en diferentes días, a través de los mismos parámetros cromatográficos que en el caso de las inyecciones consecutivas en el mismo día. En este caso, se han realizado determinaciones en tres días diferentes y se han obtenido coeficientes de variación entre 0.1 y 0.2% en los valores de tiempo de retención, y en el intervalo 8-15% para las áreas de pico.

En definitiva, los resultados experimentales obtenidos demuestran, a diferencia del antibiótico de teicoplanina, la elevada capacidad de la vancomicina como fase estacionaria para el reconocimiento quiral de los enantiomeros de los fenoxiácidos estudiados, lo que pone de manifiesto la importancia de la naturaleza de la fase estacionaria en la interacción con los solutos y por tanto en la enantioselectividad.

El método de separación y determinación cromatográfica desarrollado con el sistema de nano-LC y detección UV/VIS, ha permitido la enantioresolución de 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP y ha proporcionado elevada reproducibilidad, por lo que se podría utilizar para establecer la pureza enantiomérica de formulaciones comerciales.

Su principal desventaja, baja sensibilidad, probablemente se podría incrementar por modificación del sistema de inyección, por utilización de técnicas de focalización en cabeza de columna y por acoplamiento a técnicas de detección más sensibles como la espectrometría de masas, desarrollando las interfases adecuadas.

Respecto a los resultados obtenidos con la fase estacionaria quiral de β -ciclodextrina, la utilización de vancomicina ha supuesto una mejora considerable para todos los herbicidas fenoxiácido en cuanto a resolución se refiere, pero además ha permitido la separación de los enantiomeros del 2,4,5-TP en un tiempo de análisis menor. De este modo, la fase estacionaria de vancomicina ha resultado más adecuada como selector quiral para la separación de las mezclas racémicas, si bien tampoco ha permitido la enantioresolución en disoluciones estándar con los tres herbicidas estudiados.

CONCLUSIONES

En esta tesis doctoral, se ha puesto de manifiesto la utilidad, eficacia y sensibilidad de la cromatografía líquida capilar para el análisis de herbicidas fenoxiácido a niveles muy bajos de concentración en muestras biológicas, medioambientales y alimentos, con la ventaja adicional del menor consumo de disolventes orgánicos y cantidad de residuos generada que presentan los sistemas capilares utilizados.

Las metodologías analíticas desarrolladas, han permitido la determinación de este tipo de compuestos en forma ácida y de ésteres en matrices de diversa naturaleza, así como la separación y resolución enantiomérica de aquellos herbicidas, que como el 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP, presentan quiralidad.

Los resultados más relevantes del trabajo que se presenta en esta Memoria se pueden resumir en las siguientes conclusiones.

1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA

- La separación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante cromatografía de líquidos convencional no se ha podido realizar en condiciones isocráticas por el elevado tiempo de análisis. El gradiente de elución; MeOH-dis. acuosa 0.8% ác. fosfórico 55:45 (v/v) durante 20 min, incremento lineal a 80% MeOH en un tiempo de 20 min y etapa isocrática con esta composición de fase móvil hasta el final del cromatograma, ha permitido la resolución de una mezcla de los herbicidas en un tiempo de 40 minutos.
- Con objeto de obtener la máxima sensibilidad en cromatografía líquida capilar, se han introducido grandes volúmenes de muestra y para evitar la pérdida de resolución, se han empleado técnicas de focalización en cabeza de columna. De esta manera, utilizando disoluciones de inyección de fuerza eluotrópica menor que la de la fase móvil, se ha aumentado considerablemente la sensibilidad de determinación de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, ésteres metílico y butílico de 2,4-D, cuando se ha inyectado 20 µL de una disolución agua-metanol 90:10 (v/v) con dichos analitos.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA SEPARACIÓN

□ Debido al pequeño diámetro interno de las columnas capilares, la transferencia de calor es muy efectiva y la influencia de la temperatura en la retención es considerable. La aplicación de programas de temperatura reduce los tiempos de análisis y es una buena alternativa a los gradientes de composición de fase móvil, que pueden resultar difíciles de controlar por los bajos caudales de fase móvil utilizados con este tipo de columnas.

La separación de mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D mediante cromatografía líquida capilar, ha resultado eficaz con la fase móvil MeOH-dis. acuosa 0.8% de ác. fosfórico 56:44 (v/v) y el siguiente programa de temperatura: etapa isotérmica inicial a 20°C durante 6 min, incremento lineal a 65°C en un tiempo de 5 min y etapa isotérmica a 65°C hasta el final del cromatograma. En estas condiciones, se ha conseguido la resolución total de los herbicidas en un tiempo de 21 minutos aproximadamente.

□ La separación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP mediante cLC en fase inversa con detección UV, se ha realizado tanto en modo isoterma como temperatura programada, grandes volúmenes de inyección y técnicas de focalización. A través de este estudio se ha podido comprobar la considerable influencia de la temperatura en la retención, anchura de pico y eficacia cromatográfica.

En el intervalo estudiado de 20 a 65°C, no se han observado síntomas de degradación de los herbicidas y el orden de elución, no se ha modificado con el aumento de la temperatura de la columna.

□ La influencia de la temperatura en la retención se ha evaluado mediante la ecuación de Van't Hoff en condiciones isocráticas con la fase móvil MeOH-dis. acuosa 0.8% ác. fosfórico 45:55 (v/v). Todos los herbicidas han mostrado una relación lineal entre el logaritmo del factor de retención y la inversa de la temperatura, por lo que en el intervalo de 20 a 65°C no se modifica el mecanismo de retención. La pendiente positiva de las rectas indica una transferencia entálpica favorable desde la fase móvil a la fase estacionaria. Para un mismo cambio de temperatura, los factores de retención menos afectados son aquellos de los compuestos más fuertemente retenidos, y en este caso particular el del éster butílico del 2,4-D.

□ La dependencia de la retención con la temperatura es negativa, por lo que su aumento favorece la desorción de los analitos de la fase estacionaria y disminuye los tiempos de retención. A temperaturas de 65°C, se han producido pérdidas importantes de resolución. Aunque las separaciones isotérmicas a 20, 40 y 50°C han permitido obtener una resolución aceptable para los nueve herbicidas de interés, el tiempo de análisis ha sido excesivamente largo.

□ Los cambios de temperatura afectan considerablemente a la anchura de pico, que disminuye con el aumento de temperatura, si bien esta disminución es más acusada al incrementar la temperatura de 20 a 40°C. A temperaturas mayores, la disminución ha sido más suave para todos los herbicidas, excepto para el éster butílico del 2,4-D, cuya variación en la anchura de pico ha sido muy acusada en todo el intervalo.

La disminución de anchura también afecta a la resolución entre picos, sobre todo en lo que se refiere al 2,4,5-TP y éster butílico de 2,4-D.

□ El incremento observado en el número de platos teóricos con el aumento de temperatura para todos los herbicidas, es consecuencia de la disminución de su anchura de pico, si bien, en el caso del 2,4-D, la mayor eficacia a 65°C no se puede explicar únicamente por el cambio de temperatura y se debe considerar la influencia del equilibrio ácido-base. Este efecto no se ha puesto de manifiesto en el resto de herbicidas con características ácidas, probablemente porque poseen valores de pK_a más elevados.

En el caso del éster butílico del 2,4-D, que es el compuesto más apolar y por ello retenido en la columna, se ha observado un fuerte aumento en el número de platos teóricos a 40 y 65°C respecto al resto de herbicidas.

□ En modo isoterma, los mejores resultados para la separación de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido se han obtenido con la fase móvil MeOH-dis. acuosa 0.8% ác. fosfórico 45:55 (v/v) a una temperatura de 50°C. En estas condiciones, el elevado tiempo de retención del éster butílico del 2,4-D (≈ 89 min) ha incrementado excesivamente el tiempo de separación. Utilizando el siguiente programa de temperatura; etapa isotérmica inicial a 20°C durante 25 min, incremento lineal a 30°C en un tiempo de 10 min, incremento lineal a 65°C durante 7 min y etapa isotérmica hasta el final del cromatograma a 65°C, se ha disminuido el tiempo de análisis a 70 min y se ha conseguido la resolución a línea base de todos los analitos.

GRADIENTES DE ELUCIÓN

- Con gradiente de composición de fase móvil y a una temperatura constante de 25°C, las mejores condiciones encontradas para la separación de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido han sido; MeOH-dis. 0.8% ác. fosfórico 40:60 (v/v) durante 25 min, incremento lineal hasta un 70% de MeOH en un tiempo de 15 min y a continuación, etapa isocrática final a dicha composición. Utilizando este gradiente de elución, se ha obtenido una resolución aceptable para todos los analitos en un tiempo de 55 min, lo que ha supuesto una ventaja considerable respecto a los modos de separación isocrático/isotermo e isocrático/temperatura programada.

- La utilización de fases estacionarias monolíticas en base gel de sílice permite una gran permeabilidad de los analitos y una mayor velocidad de la separación, que se traduce en una importante reducción de los tiempos de análisis. Sin embargo, la elevada asimetría y cola de pico cromatográfico disminuye la resolución de algunos pares de herbicidas e influye negativamente en su cuantificación, por lo que este tipo de columnas resultan menos adecuadas que las particuladas en esta aplicación.

CONDICIONES DE INYECCIÓN

- En cromatografía líquida capilar, el volumen de inyección y el modo en el cual se transfiere a la columna afecta de manera considerable a la sensibilidad y eficacia del proceso de separación, por lo que la etapa de inyección ha resultado especialmente crítica. Las condiciones adecuadas de inyección se deben establecer en función del volumen del bucle de inyección y del efecto de la composición de la disolución de focalización sobre diversos parámetros como el tiempo o factor de retención, área y anchura de pico cromatográfico.

- Utilizando bucles de 100 nL ó 2.0 µL, la inyección se puede realizar utilizando disolventes orgánicos puros como metanol o acetonitrilo, pero con volúmenes mayores de inyección, resulta necesario el empleo de disoluciones de contenido acuoso elevado para favorecer la concentración en cabeza de columna. Con volúmenes de 100 nL la concentración de herbicidas debe ser de mg L⁻¹, mientras que con bucles de 20.0 µL se pueden inyectar concentraciones del orden de los µg L⁻¹, lo que implica para algunos herbicidas un factor de preconcentración mayor de 400.

- Con disoluciones de inyección de contenido acuoso elevado, la sensibilidad o área de pico cromatográfico se incrementa con el aumento del volumen de inyección, aunque también se elevan los tiempos de retención.
- Debido a las propiedades ácido-base de los fenoxiácidos estudiados, su retención en cabeza de columna es función del pH de la disolución de inyección. La presencia de medio ácido (ácido fosfórico al 0.8%) en la disolución de inyección con bucles de volumen entre 5.0 y 20.0 μL , influye de manera importante en las áreas de pico cromatográfico, aunque su efecto también depende de la proporción disolución acuosa/modificador orgánico utilizada en la inyección. Los tiempos de retención al igual que las anchuras de pico, son muy similares para todos los herbicidas con y sin medio ácido en la disolución de inyección.
- Para evaluar cómo afecta al tiempo de retención, área y anchura de pico cromatográfico, el volumen del bucle de inyección, la proporción de modificador orgánico y el medio ácido en la disolución de focalización se ha realizado un diseño factorial, con bucles de volumen 2.0, 5.0, 10.0 y 20.0 μL y mezclas de metanol-agua en diferente proporción como disoluciones de inyección. Los resultados de este diseño experimental nos indican que el tiempo y factor de retención, el área y la anchura de pico cromatográfico dependen en gran medida tanto del volumen de inyección como de la naturaleza de la disolución de inyección.
- Las superficies de respuesta experimentales representando los valores de área, en función del volumen de inyección y composición de la disolución de focalización, han constituido una herramienta útil para evaluar la compleja interacción entre variables y la influencia en la sensibilidad de la separación.
- La presencia de ácido de fosfórico al 0.8% en la disolución de focalización posee un efecto muy acusado sobre el volumen de inyección que se traduce en una mayor deformidad de las superficies de respuesta. Con algunos herbicidas como el 2,4,5-TP, la relación entre el volumen inyectado y la proporción de agua en la disolución focalizadora ha sido más pronunciada, tanto en medio ácido como en agua pura.

- En general, se han obtenido relaciones lineales entre el volumen de inyección y la composición de la disolución de focalización (metanol-agua o metanol-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico) para los compuestos menos retenidos como el 2,4-D. En el caso de los herbicidas más retenidos en columna, las interacciones entre las variables han sido más complejas, puesto que son los más afectados por la focalización.
- Para el éster butílico del 2,4-D, la mayor sensibilidad se ha obtenido en ausencia de ácido fosfórico al 0.8%, lo que condiciona que la inyección de mezclas de los nueve herbicidas estudiados se deba realizar en agua pura.
- En todos los medios acuosos evaluados sin ajuste de pH, el bucle de inyección de 20.0 μL ha proporcionado las mayores áreas de pico cromatográfico para todos los herbicidas de interés. Con este volumen de inyección y una disolución de focalización de agua pura con una proporción del 10% de metanol, no se han observado diferencias considerables de sensibilidad para todos ellos, por lo que estas condiciones de inyección se pueden considerar como un compromiso para obtener máxima sensibilidad en cromatografía líquida capilar.

2. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

- La determinación de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido mediante HPLC convencional se ha realizado en la columna Atlantis dC_{18} con gradiente de composición de fase móvil. En las condiciones óptimas de separación se han obtenido límites de detección de 30.0 a 102 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los calibrados han sido lineales para todos los herbicidas estudiados en el intervalo de concentración de 300-1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el éster butílico de 2,4-D, 250-1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para 2,4-DP, 2,4-DB, MCPB y 2,4,5-TP y 150-1200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de herbicidas. La reproducibilidad de las áreas de pico cromatográfico, expresada como coeficiente de variación, ha oscilado entre el 1.4 y 13%.
- La determinación de mezclas de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D se ha llevado a cabo mediante cLC con elución isocrática, temperatura programada y la metodología optimizada de inyección y focalización.

En estas condiciones, los límites de detección han estado comprendidos para todos los herbicidas en el intervalo de 1.6 a 3.2 $\mu\text{g L}^{-1}$ y las ecuaciones del calibrado han mostrado linealidad en el intervalo de 15 a 70 $\mu\text{g L}^{-1}$. La reproducibilidad ha estado comprendida entre el 1.9 y 4.0%.

□ La determinación de 2,4-D, MCPA, éster metílico y butílico de 2,4-D, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP, se ha llevado a cabo en diferentes modos de separación, isocrático/temperatura programada y gradiente/isotermo con procedimientos de focalización, inyectando un volumen de 20.0 μL .

□ Utilizando gradiente térmico, se han obtenido límites de detección comprendidos entre 2.0 y 10 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los calibrados han sido lineales en el intervalo de 30 a 70 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el éster butílico de 2,4-D y entre 10–50 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el resto de herbicidas. La reproducibilidad ha oscilado entre el 3.1 y 9.4%.

□ Con gradiente de composición de fase móvil, la determinación de los herbicidas se ha llevado a cabo a 25°C y se han obtenido límites de detección de 1.0 y 11.0 $\mu\text{g L}^{-1}$. Los calibrados han mostrado comportamiento lineal en el intervalo de concentración estudiado y la reproducibilidad ha oscilado entre 0.4 y 7.3%.

□ Los menores límites de detección obtenidos mediante cLC respecto a los determinados mediante HPLC convencional, han puesto de manifiesto el importante incremento de sensibilidad que se puede llegar a conseguir al disminuir el diámetro interno de la columna y al utilizar grandes volúmenes de inyección junto con técnicas de focalización. Además de la mayor sensibilidad, la reproducibilidad mediante cromatografía líquida capilar es considerablemente mayor.

La determinación mediante cLC presenta como ventaja adicional el pequeño caudal de fase móvil, 8.0 $\mu\text{L min}^{-1}$, en comparación con el caudal de 1.0 mL min^{-1} de la separación en la columna convencional.

□ La determinación de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido mediante cLC con temperatura programada y con gradiente de elución, no ha mostrado diferencias apreciables en cuanto a la sensibilidad de la detección. Sin embargo, la separación con gradiente de composición de fase móvil ha disminuido el tiempo de análisis y ha proporcionado mayor reproducibilidad en las áreas de pico cromatográfico.

A través del compromiso entre resolución, tiempo de análisis y características analíticas, la determinación de herbicidas estudiados mediante cLC resulta más adecuada en el modo gradiente/isotermo.

□ Los estudios realizados de cuantificación mediante cLC, han demostrado que los herbicidas fenoxiácido se pueden determinar en concentraciones del orden de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ y $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, para aquellos herbicidas que como el éster butílico de 2,4-D presentan menor sensibilidad. Puesto que estos valores son muy superiores a las concentraciones permitidas por ley en una amplia variedad de matrices, resulta necesario llevar a cabo una etapa de preconcentración previa al análisis cromatográfico.

3. PRECONCENTRACIÓN EN DISCONTINUO

□ Se han utilizado adsorbentes de extracción en fase sólida en base polimérica y en base gel de sílice, que presentan mecanismos mixtos de retención basados en partición, intercambio iónico y exclusión por tamaño. La evaluación y caracterización de estos adsorbentes para la preconcentración de mezclas de nueve herbicidas fenoxiácido se ha realizado en términos del pH de retención, de la naturaleza del eluyente, volumen de elución y volumen de ruptura.

CONDICIONES DE RETENCIÓN

□ Debido al carácter ionizable de los herbicidas fenoxiácido, el pH de la disolución preconcentrada afecta de forma considerable a la retención. La naturaleza y volumen de eluyente, al condicionar la focalización en cabeza de columna son dos parámetros especialmente críticos cuando la determinación se realiza mediante cLC.

□ Los estudios de recuperación realizados a diferentes valores de pH, sugieren que la preconcentración en los adsorbentes evaluados se debe realizar a pH ácido. En el caso del material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS en base gel de sílice, se ha determinado como pH óptimo de retención un valor de pH 4.0. En estas condiciones, las recuperaciones han sido mayores del 94% para todos los herbicidas.

En el adsorbente MFE[®] Polímero SAX, funcionalizado con grupos amonio cuaternario, se ha observado la hidrólisis alcalina de los ésteres metílico y butílico de 2,4-D para

producir su ácido correspondiente (2,4-D) a valores de pH superiores a 7.0. Como pH adecuado para la etapa de retención se ha determinado un valor de pH 3.0 y se han obtenido recuperaciones en el intervalo 83-95%.

La preconcentración utilizando los cartuchos de extracción Lida Sep-IC-OH de PS-DVB funcionalizado con grupos amonio cuaternario se ha llevado a cabo a pH 1.0, sin observar hidrólisis apreciable de los ésteres de 2,4-D. Las recuperaciones han estado comprendidas entre el 80y 97%.

El pH seleccionado para la retención de herbicidas fenoxiácido en el copolímero de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona OASIS[®] MCX, funcionalizado con grupos ácido sulfónico, ha sido pH 1.0. En este adsorbente y a un valor de pH 0, se ha observado un proceso de hidrólisis ácida del éster metílico y butílico de 2,4-D a su ácido correspondiente.

□ Salvo el material de acceso restringido en base gel de sílice LiChrospher[®] RP-18-ADS, que presenta estabilidad en el intervalo de pH 2.0-7.5, el resto de adsorbentes estudiados, intercambiadores catiónicos o aniónicos fuertes, poseen una excelente resistencia química debido a su base polimérica y a los grupos funcionales ácido sulfónico o amonio cuaternario, que permite utilizarlos prácticamente en el intervalo entero de pH, sin degradación ni pérdida de su capacidad iónica.

□ En general, todos los adsorbentes han mostrado una fuerte de retención en medio ácido. Las mayores recuperaciones en los adsorbentes Lida Sep-IC-OH y OASIS[®] MXC, se han obtenido a pH 1.0. Puesto que a este pH los herbicidas fenoxiácido son moléculas neutras, es probable que la retención se encuentre basada exclusivamente en un mecanismo de partición.

En el caso del intercambiador aniónico MFE-Polímero[®] SAX algunos herbicidas se encuentran disociados al pH de retención, pH 3.0, por lo que existe un mecanismo mixto de retención, interacciones π - π e intercambio iónico.

Por su naturaleza, y a diferencia de los adsorbentes poliméricos, el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS en base gel de sílice, no permite la retención a pH fuertemente ácido. Este adsorbente combina mecanismos de partición y exclusión por tamaño, aunque con disoluciones estándar de los herbicidas, la retención se encuentra basada exclusivamente en el de partición.

CONDICIONES DE ELUCIÓN

□ Para desorber completamente a los fenoxiácidos retenidos en los adsorbentes de SPE, los eluyentes empleados deben contener una proporción elevada de disolvente orgánico. Las condiciones seleccionadas de elución, junto con las recuperaciones obtenidas en cada uno de los casos, se muestran en la siguiente tabla.

| <i>ADSORBENTE</i> | <i>ELUYENTE</i> | | <i>Rec.(%)</i> |
|---------------------------------------|---|---------------------|----------------|
| | <i>COMPOSICIÓN</i> | <i>VOLUMEN (mL)</i> | |
| LiChrospher [®] RP-18-ADS | MeOH-dis. acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 90:10 (v/v) | 1.5 | 93-99 |
| MFE [®] Polímero SAX | MeOH-dis. acuosa 0.8% H ₃ PO ₄ 80:20 (v/v) | 5.0 | 83-98 |
| LIDA Sep-IC-OH | HNO ₃ 60 mM en MeOH | 2.0 | 81-97 |
| OASIS [®] MCX | MeOH-0.8% H ₃ PO ₄ | 1.5 | 86-101 |

□ Los eluyentes utilizados con los adsorbentes LiChrospher[®] RP-18-ADS y MFE[®] Polímero SAX, al contener una fracción acuosa del 10 y 20% respectivamente, contribuyen a la focalización de los analitos en la cabeza de la columna capilar.

□ La desorción completa de los analitos retenidos en la mayoría de los adsorbentes se puede conseguir con un volumen de 1.5 ó 2.0 mL de los eluyentes orgánicos seleccionados, que incluso después de la dilución necesaria a un volumen final de 10.0 mL para conseguir la focalización en cabeza de columna, permite alcanzar elevada sensibilidad en su determinación mediante cLC. Con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX se necesita un volumen 5.0 mL, lo que implica una mayor dilución de los extractos para conseguir disoluciones adecuadas de focalización y una pérdida de la sensibilidad.

VOLUMEN DE RUPTURA

□ El volumen de ruptura constituye una buena indicación de la capacidad de retención en un determinado adsorbente y el grado de dilución que puede presentar la muestra preconcentrada. Su valor puede estimar gráficamente a través de curvas que muestran la variación de la recuperación con el volumen de disolución que se introduce a través del material adsorbente.

Los volúmenes determinados para cada herbicida en los distintos adsorbentes evaluados se resumen a continuación.

| <i>HERBICIDA</i> | <i>ADSORBENTE</i> | | | |
|----------------------|--------------------------------|-----------------------------------|----------------|------------------------|
| | MFE-Polímero SAX | LiChrospher [®] RP18 ADS | Lida Sep IC-OH | OASIS [®] MCX |
| | <i>VOLUMEN DE RUPTURA (mL)</i> | | | |
| 2,4-D | 300 | 25 | 115 | >1000 |
| MCPA | 830 | 25 | 160 | 685 |
| Éster metílico 2,4-D | 325 | 60 | 225 | 715 |
| 2,4-DP | 575 | 75 | 160 | >1000 |
| MCPP | 860 | 130 | 70 | >1000 |
| 2,4-DB | 800 | 35 | 220 | 585 |
| MCPB | 730 | 25 | 140 | 675 |
| 2,4,5-TP | 690 | 135 | 410 | >1000 |
| Éster butílico 2,4-D | 730 | >250 | 370 | >1000 |

□ Entre todos los adsorbentes evaluados, los materiales poliméricos MFE[®] Polímero SAX y OASIS[®] MCX, han mostrado los mayores volúmenes de ruptura para los nueve herbicidas estudiados. Únicamente los cartuchos de extracción OASIS[®] MCX han permitido introducir volúmenes mayores de 1000 mL para algunos de ellos.

4. ACOPLAMIENTO LC-cLC

□ Se ha puesto a punto un método de preconcentración en línea acoplado a cromatografía líquida capilar con detección UV utilizando el adsorbente de intercambio aniónico MFE[®] Polímero SAX, para la determinación de nueve herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres en concentraciones del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando técnicas de focalización en cabeza de columna y temperatura programada para la separación cromatográfica.

□ En el acoplamiento entre dos sistemas cromatográficos, el eluyente de la primera columna debe ser lo más compatible posible con la fase móvil utilizada para la separación en la segunda columna. En el caso concreto de la cLC, el eluyente también debe contribuir en la medida de lo posible a la focalización en cabeza de columna para evitar pérdida de resolución y obtener elevada sensibilidad.

□ Como eluyente de los herbicidas retenidos en la columna preparativa se ha utilizado la mezcla MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v) y como fase móvil en la columna analítica MeOH-disolución acuosa 0.8% ácido fosfórico 45.55 (v/v). El eluyente seleccionado para la columna de preconcentración no ha permitido la focalización de los herbicidas en la columna capilar, por lo que ha sido necesario la inyección de 20.0 μL de una disolución acuosa con un contenido del 10% de MeOH.

□ La etapa de focalización se debe realizar cuando los herbicidas alcanzan el bucle de inyección, tiempo que se ha estimado en 1.50 minutos tras la etapa de purificación. Las mayores recuperaciones para todos los herbicidas se han obtenido con tiempos de purificación entre 4.7 y 4.9 minutos, que corresponden a volúmenes de 2.35 y 2.45 mL. El tiempo de purificación óptimo ha sido de 4.8 minutos, correspondiente a un volumen de eluyente de 2.40 mL.

□ El tiempo de transferencia que permite obtener recuperaciones adecuadas de todos los herbicidas en un volumen mínimo es de 1 minuto, que corresponde a un volumen de elución de 10 μL . Este volumen se transfiere directamente a la columna analítica, lo que evita la dilución y pérdida de sensibilidad en la determinación del procedimiento en discontinuo. Pequeñas variaciones del tiempo de transferencia pueden producir grandes variaciones en la respuesta por falta de reproducibilidad, hecho que se puede mejorar mediante la utilización de patrones internos. En este caso en particular, el 2,6-diisopropilfenol ha resultado un compuesto adecuado como estándar interno durante el procedimiento de preconcentración, al no interferir en la determinación cromatográfica de ninguno de los herbicidas estudiados.

□ En las condiciones seleccionadas como óptimas para el acoplamiento LC-cLC, se han determinado límites de detección entre 0.4 y 6.3 μg cuando se han preconcentrado disoluciones acuosas de 100.0 mL. Los herbicidas determinados con menor sensibilidad han sido el 2,4-D y el MCPA.

Los calibrados han mostrado linealidad en el intervalo de concentración 10.0-150 $\mu\text{g L}^{-1}$ para sustancias como el MCPP y el MCPB, y 250-1500 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el 2,4-D.

La reproducibilidad expresada como coeficiente de variación ha oscilado entre el 1.1% para el 2,4-DB y el 7.8% para el herbicida MCPA.

□ La principal desventaja del acoplamiento LC-cLC desarrollado es la baja sensibilidad de la determinación del herbicida MCPA y en especial del 2,4-D, debido a sus elevados límites de detección.

Para mejorar el acoplamiento e incrementar la sensibilidad, la utilización de una columna empacada con el adsorbente MFE[®] Polímero SAX de menor dimensión, podría resultar adecuada.

5. DETERMINACIÓN DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE cLC EN MUESTRAS COMPLEJAS

□ Para evitar la degradación de los herbicidas durante la preparación de la muestra, resulta imprescindible la evaluación de su estabilidad en diferentes medios. Para prevenir la hidrólisis de los herbicidas en forma de ésteres, los medios más adecuados de conservación son agua purificada y disolución acuosa de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0). En medios fuertemente ácidos o básicos los ésteres del 2,4-D se hidrolizan rápidamente, hecho que limita la procesos de hidrólisis para la destrucción de la matriz orgánica de la muestra. En medios tamponados, la velocidad de la reacción de hidrólisis es tanto mayor cuanto mayor es el pH de la disolución

□ Previa extracción de los analitos de una matriz líquida, resulta necesaria una etapa de filtración para eliminar partículas sólidas en suspensión y contribuir a la limpieza de la matriz. Para evitar pérdidas por adsorción de los analitos de interés, el material de filtración se debe seleccionar adecuadamente. Entre todos los materiales evaluados para la filtración de la muestra, los únicos que no retienen apreciablemente ni producen pérdidas por adsorción de los herbicidas estudiados son papel de análisis gravimétrico, placa de vidrio filtrante de tamaño de poro controlado (G4) y membrana de poliéster (tamaño de poro 2.0 µm).

□ Para determinar los herbicidas fenoxiácido mediante cLC en matrices complejas, se han desarrollado diferentes metodologías de tratamiento de muestra. El análisis multiresidual, se ha llevado a cabo en suelo de elevado contenido orgánico, zumo de manzana comercial, hojas frescas de menta y orina masculina humana.

En los procedimientos de SPE se han utilizado aquellos adsorbentes que además de ser eficaces para la extracción y preconcentración de los herbicidas, contribuyen a la limpieza de la matriz.

□ A excepción de las muestras de orina, matriz en la que los fenoxiácidos se excretan en forma ácida sin biotransformación apreciable, la conservación de los herbicidas en forma de ésteres durante la etapa de preparación de la muestra para su determinación como tal resulta de especial interés, debido a su mayor toxicidad.

ZUMO DE MANZANA

□ La determinación de los herbicidas 2,4-D, MCPA, 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB, 2,4,5-TP, éster butílico y metílico de 2,4-D en muestras de zumo de manzana comercial se ha llevado a cabo mediante cLC y HPLC convencional utilizando el intercambiador catiónico de polidivinilbenceno-co-N-vinilpirrolidona, OASIS[®] MCX, como adsorbente de SPE. Según la sensibilidad de cada una de las técnicas y a través del compromiso con la menor cantidad de muestra tratada para disminuir el efecto matriz, se ha seleccionado como tamaño adecuado para la determinación mediante cLC una cantidad de 6 g de muestra, mientras que en HPLC convencional se ha necesitado una cantidad de 10 g de zumo para detectar los niveles permitidos por ley.

□ La retención de los herbicidas en el adsorbente OASIS[®] MCX se ha realizado a pH 1.0 y como eluyente, se ha utilizado MeOH con una proporción de H₃PO₄ del 0.8%. La filtración de la muestra en membrana de poliéster ha contribuido a eliminar parte de la materia endógena de la matriz. Antes de la etapa de elución, para minimizar el efecto perturbador de la materia orgánica co-extraída y evitar interferencias con los analitos de interés, se ha realizado una etapa de lavado con 2.0 mL de una disolución acuosa pH 1.0, 2.0 mL de una disolución acuosa con una proporción de 50% MeOH y 2.0 mL de una disolución acuosa con 15% MeOH y 0.8% H₃PO₄.

□ Para el análisis mediante HPLC convencional con gradiente de elución, el extracto metanólico recogido tras la etapa de elución (2.0 mL) se ha analizado directamente sin dilución previa, mientras que en cLC, los herbicidas retenidos se han eluido en un volumen de 1.5 mL y la fracción recogida de elución se ha llevado con agua a un volumen final de 10.0 mL con propósitos de focalización en cabeza de columna.

□ En relación a los límites de detección, el análisis mediante cLC con grandes volúmenes de inyección y disoluciones de baja fuerza eluotrópica, ha proporcionado mayor sensibilidad que la cromatografía de líquidos convencional para todos los herbicidas estudiados tanto en forma ácida como de ésteres, incluso considerando la dilución necesaria tras el procedimiento de SPE para obtener la disolución de focalización, que contiene metanol y agua en proporción 15:85 (v/v).

□ El adsorbente OASIS[®] MCX ha resultado muy eficaz en la extracción y preconcentración de los herbicidas, así como en la limpieza de la matriz de zumo de manzana. El método propuesto para la SPE de los herbicidas fenoxiácido de muestras zumo es rápido, sencillo, muy reproducible y permite el tratamiento de pequeñas cantidades de muestra. Puesto que no incluye ninguna etapa de hidrólisis, evaporación o calefacción, el análisis de los herbicidas fenoxiácido tanto en forma ácida como de ésteres, cuyas características fisicoquímicas, analíticas y de toxicidad se encuentran bien diferenciadas, se ha podido llevar a cabo mediante HPLC a los máximos niveles permitidos por las regulaciones españolas y europeas.

Mediante cLC, se han obtenido recuperaciones en el intervalo 85-100% con desviaciones entre el 1 y el 5% al máximo nivel permitido. Cuando se ha utilizado HPLC convencional, las recuperaciones a este nivel han sido menores, del 65 al 93%, si bien las desviaciones han sido similares a las obtenidas mediante cromatografía líquida capilar. Sin embargo, el empleo de la cLC, ha permitido, debido a la menor cantidad de muestra tratada y por tanto menor efecto matriz, la determinación a concentraciones inferiores a las máximas permitidas, con recuperaciones aceptables de entre 60 y 98%.

ORINA MASCULINA HUMANA

□ Se ha desarrollado un método de tratamiento de muestra para la determinación de herbicidas fenoxiácido en forma ácida en orina masculina humana basado únicamente en el ajuste del pH de la muestra para la retención de los analitos en el material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS. Estudios previos han permitido establecer como tamaño adecuado de muestra un volumen de orina de 10 mL.

La retención se ha realizado a pH 4.0 y la elución con 1.5 mL de la mezcla metanol-dis. acuosa 0.8% ácido fosfórico 80:20 (v/v).

Antes de la etapa de elución, se han realizado dos etapas consecutivas de lavado que han permitido disminuir la cantidad de materia orgánica co-extraída. El análisis de los extractos recogidos se ha realizado mediante cLC con gradiente de composición de fase móvil, previa dilución con agua purificada un volumen final de 5.0 mL para permitir la focalización de los analitos en cabeza de columna.

□ Los límites de detección en la matriz de orina han oscilado en el intervalo de 5.0 a 22.5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos los herbicidas estudiados, lo que ha permitido su determinación a los niveles de concentración de personas expuestas ocupacionalmente. Las recuperaciones obtenidas un nivel de adición de 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ han estado comprendidas en el intervalo de 35 a 94% con desviaciones estándar relativas entre el 1 y 7%.

□ El material de acceso restringido LiChrospher[®] RP-18-ADS, ha permitido el tratamiento directo de pequeños volúmenes de muestra sin necesidad de etapas previas adicionales como hidrólisis, precipitación de proteínas o extracción con disolventes orgánicos, por lo que ha demostrado una gran eficacia en la limpieza de esta matriz biológica. El método desarrollado, puede permitir el control y la cuantificación de residuos de herbicidas fenoxiácido en orina masculina humana a niveles que permiten establecer el grado de contaminación de trabajadores que utilizan con asiduidad este tipo de productos.

SUELO DE ELEVADO CONTENIDO ORGÁNICO

□ La determinación de los herbicidas 2,4-D, 2,4-DB, éster metílico y butílico de 2,4-D mediante cLC en muestras de suelo, se ha llevado a cabo previa extracción con baño de ultrasonidos a temperatura ambiente, para evitar la transformación y mantener inalterados los ésteres de los herbicidas. Sobre una cantidad de 1 g de muestra, se han realizado dos extracciones consecutivas con 5.0 mL de acetonitrilo y una extracción final con 5.0 mL de H₂SO₄ 5 mM (pH 2.0) con un tiempo de agitación de 5.0 min cada una de ellas. Con propósitos de focalización, el extracto de suelo recogido se ha llevado con agua pura a un volumen de 100.0 mL.

El análisis se ha realizado mediante cLC con temperatura programada. Los límites de detección han estado comprendidos entre 0.3 y 0.5 mg kg^{-1} para el 2,4-D y su éster butílico respectivamente. Las recuperaciones obtenidas a niveles de adición de 2.5, 4.0 y 6.0 mg kg^{-1} han sido muy reproducibles y han oscilado en el intervalo 72-97%.

El empleo de la cromatografía líquida capilar, con elución isocrática y gradiente de temperatura, combinada con la inyección de grandes volúmenes de muestra (20.0 μL), focalización en cabeza de columna y extracción con ultrasonidos a temperatura ambiente, ha proporcionado un método sencillo, rápido, eficaz y reproducible para la determinación simultánea de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres en muestras de suelo, a los bajos niveles de mg kg^{-1} .

HOJAS DE MENTA FRESCA

□ Se ha puesto a punto un método para la determinación de herbicidas fenoxiácido en forma ácida y de ésteres en hojas de menta fresca. De entre todos los materiales evaluados, únicamente el adsorbente Lida Sep-IC-OH ha permitido su detección y cuantificación, al no retener grandes cantidades de la materia orgánica de la matriz.

□ Se han realizado tratamientos basados en la lixiviación de una cantidad de 1 g de muestra, con agua a temperatura ambiente o en ebullición y agitación ultrasónica. Entre todos ellos, la extracción ultrasónica con 20.0 mL de agua a temperatura ambiente durante un tiempo de 15 min, ha permitido obtener recuperaciones aceptables para todos los analitos y disminuir de forma considerable la cantidad de materia orgánica co-extraída de la matriz, por lo que ha resultado un tratamiento eficaz.

La retención en el adsorbente, se ha llevado a cabo a pH 1.0 y antes de la elución con 2.0 mL de ácido nítrico 60 mM en metanol, se ha realizado una etapa de lavado con 2.0 mL de una disolución acuosa a pH 1.0. Los extractos de muestra se han analizado mediante cLC con gradiente de elución, previa dilución con agua hasta un volumen de 10.0 mL con fines de focalización.

Los límites de detección obtenidos con el método desarrollado, han estado comprendidos entre 0.002-0.009 mg kg^{-1} . La determinación y cuantificación del éster butílico del 2,4-D a niveles inferiores a 1.0 mg kg^{-1} no ha sido posible debido a la considerable interferencia de la materia endógena co-extraída de la matriz. El herbicida MCPP, solo se ha podido determinar a niveles ligeramente superiores al máximo permitido por ley.

□ A la máxima concentración permitida por la legislación, los porcentajes de recuperación de los herbicidas han estado comprendidos entre el 17 y 49%.

Las recuperaciones han sido muy reproducibles, con desviaciones estándar relativas entre el 1 y 5, por lo que el adsorbente Lida Sep-IC-OH ha resultado muy selectivo y eficaz en la extracción de herbicidas fenoxiácido de muestras de menta fresca y en la limpieza de esta matriz vegetal.

6. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN QUIRAL DE HERBICIDAS FENOXIÁCIDO MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS

□ Se han evaluado diversas fases estacionarias quirales para la resolución enantiomérica de mezclas racemicas de los herbicidas 2,4-DP, MCPP y 2,4,5-TP.

□ La fase estacionaria de fenilcarbamato de celulosa no ha permitido el reconocimiento quiral de los analitos de interés tanto en fase normal como en fase inversa, por lo que no ha resultado enantioselectiva. Con la fase estacionaria de β -ciclodextrina carboxipermetilada y la fase móvil AcN-disolución acuosa NaCl 0.1M 2.4% ácido acético 20:80 (v/v) se han podido resolver de manera aceptable los enantiomeros del MCPP, 2,4-DP y 2,4,5-TP, si bien el tiempo de retención de herbicida 2,4,5-TP ha sido excesivamente largo. Esta fase estacionaria, de polisacárido no ha permitido la enantioresolución en mezclas de los tres herbicidas estudiados.

□ Se han estudiado como fases estacionarias quirales antibióticos macrocíclicos glicopeptídicos del tipo vancomicina y teicoplanina, que contienen grupos ionizables que controlan su carga y afectan al reconocimiento quiral. Estas fases estacionarias necesitan control de pH para ser enantioselectivas.

Entre todas las fases estacionarias quirales de antibióticos estudiadas, únicamente la vancomicina ha permitido obtener adecuada enantioselectividad. El antibiótico de teicoplanina no ha resultado adecuado como selector quiral para la resolución enantiomérica de los fenoxiácidos de interés, aunque si ha mostrado retención de los herbicidas. Con esta fase estacionaria, el aumento del pH del tampón, al disminuir los tiempos de retención, no ha contribuido a la resolución y aunque el incremento de su concentración ha favorecido la retención, tampoco ha permitido distinguir entre los correspondientes enantiomeros.

- La separación y determinación de las parejas de enantiómeros de los herbicidas 2,4-DP, MCP y 2,4,5-TP en forma ácida, se ha llevado a cabo individualmente para cada uno de ellos utilizando un capilar de 0.075 mm I.D. empaquetado con una fase estacionaria quiral de sílice modificada con vancomicina (5 μm).
- Con vancomicina, las mejores condiciones de separación encontradas a través del compromiso entre resolución, factor de retención, eficacia y enantioselectividad, han sido una composición de fase móvil metanol-agua-tampón acetato amónico 500 mM pH 4.5 85/10/5 (v/v/v) y un caudal de en columna de 60 nL min^{-1} , que ha permitido la separación individual de cada una de las tres parejas de enantiómeros en un tiempo aproximado de 24 minutos. En estas condiciones, se han obtenido factores de selectividad en todos los casos mayores de 1.6 y el 2,4-DP, con dos átomos de cloro en su estructura, ha mostrado la mayor resolución enantiomérica. Este hecho hace suponer una importante influencia de los átomos de cloro en la interacción vancomicina-soluto.
- Los límites de detección determinados a 195 nm se han encontrado entre 1.4 y 4.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Los calibrados han sido lineales en el margen de concentraciones de 15 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para 2,4-DP y 2,4,5-TP y de 5.0 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para el herbicida MCP. La reproducibilidad se ha determinado para inyecciones en diferentes días y se han obtenido coeficientes de variación entre 0.1 y 0.2% en los valores de tiempo de retención, y en el intervalo 8-15% para las áreas de pico cromatográfico.
- El método de separación y determinación cromatográfica desarrollado con el sistema de nano-LC y detección UV/VIS, ha permitido la enantioresolución de 2,4-DP, MCP y 2,4,5-TP y ha proporcionado elevada reproducibilidad, por lo que no sólo permite el control de los residuos, sino que también permitiría determinar la pureza enantiomérica y cantidad de cada uno de los isómeros en las formulaciones comerciales.
- La utilización de vancomicina ha supuesto una mejora considerable en la resolución de todos los herbicidas fenoxiácido respecto a la fase estacionaria quiral de β -ciclodextrina, pero además ha permitido la separación de los enantiómeros del 2,4,5-TP en un tiempo de análisis menor. De este modo, ha resultado más adecuada como selector quiral para la separación de las mezclas racémicas que la de β -ciclodextrina, aunque tampoco ha permitido la enantioresolución en disoluciones estándar con los tres herbicidas.

Como conclusión final cabe destacar que con el presente trabajo se han desarrollado diversas metodologías para la determinación multiresidual de herbicidas fenoxiácido en muestras complejas, y que se ha abordado el estudio de la influencia de la temperatura y de las condiciones de inyección, proporcionando alternativas a los métodos tradicionales de HPLC que posibilitan, además de un consumo mínimo de disolventes, una generación mínima de residuos.

Por otro lado, la aproximación a la separación de enantiómeros con nanocromatografía abre nuevas posibilidades para este tipo de separación.

Parte del trabajo recogido en esta Memoria ha dado lugar a varias publicaciones (anexos I-IV) y comunicaciones a congresos internacionales.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) X. Domenech, "*Química Ambiental*". Miraguano Ediciones (2ª Ed), Madrid (1997) 48.
- (2) J.A.R. Lockhart, A. Samuel, M.P. Greaves, "*The evolution of Weed Control in British Agriculture*", Eds. R.J. Hance, K. Holly, British Crop Protection Council (8th Ed), Farnham, UK (1990) 43.
- (3) L.G. Copping, H.G. Hewitt, "*Chemistry and Mode of Action of Crop Protection Agents*", The Royal Society of Chemistry, Cambridge (1998).
- (4) L. García-Torres, C. Fernández-Quintana, "*Fundamentos Sobre Malas Hierbas y Herbicidas*", Ed. Mundi Prensa, Madrid (1991) 205.
- (5) L. Dextroux, J. Gostinchar, "*Los Herbicidas y su Empleo*", (1ª Edición española), Ed. Oikos-tau, Barcelona,(1967) 108.
- (6) Primo Yúfera, "*Química Agrícola II*". Ed. Alhambra, Madrid (1977) 455.
- (7) K.A. Hassall, "*The Biochemistry and Uses of Pesticides*", (2ª Ed), Ed. Mac. Millan Press, Hong Kong (1990).
- (8) D. Gómez de Barreda, D. Gómez de Barreda Feraz, A. Gamon, A. Sáez, "*Características Fisicoquímicas y Biológicas que definen el Comportamiento de los Fitosanitarios*", SEMh-Ediciones y Promociones LAV, S.L. Valencia (1998) 98.
- (9) C. Baird, "*Química Ambiental*". Ed. Reverté S.A, Barcelona (2001) 334.
- (10) M. Locke, Ch. Bryson, *Weed Res.* 45 (1997) 320.
- (11) P. Millar, P. Westra, "*Herbicide Behaviour in Soils*", Colorado State University, Publication 0.562 (1998).
- (12) O. Pozo, E. Pitarch, J. V. Sancho, F. Fernández, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 75.
- (13) L. Renberg, *Anal. Chem.* 46 (1974) 459.
- (14) C. Barberá, "*Pesticidas Agrícolas*", Ed. Omega, Barcelona (1989).
- (15) J. Kanasazawa, *Environ. Toxicol. Chem.*, 8 (1989) 477.
- (16) S. S. Prasad, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 75 (1992) 916.
- (17) C. D. S. Tomlin, "*The Pesticide Manual*". Ed. British Crop Protection Council, Londres (1997).
- (18) W. H. Ahrens, "*Herbicide Handbook*", Ed. Weed Science Society of America, 7th Edition, Illinois (1994).

- (19) E. Grabinska-Sota, E. Wisniowska, J. Kalka, *Crop Protection*, 22 (2003) 355.
- (20) R. A. Larson, E. J. Weber, "Reaction Mechanisms in Environmental Organic Chemistry", CRC Press, Boca Raton, FI (1994).
- (21) R. P. Scharzenbach, P. M. Gschwend, D. M. Imboden, "Environmental Organic Chemistry", 2nd Edition, Ed. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey (2003).
- (22) E. E. Kenaga, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 4 (1980) 26.
- (23) D. Barceló, *Analyst* 116 (1991) 681.
- (24) Y. I. Skurlatov, R. J. Zeep, G. L. Baughnan, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 1065.
- (25) "The Agrochemicals Handbook", 3rd Edition, Royal Society of Chemistry, Cambridge (1991).
- (26) R. K. Juhler, S. R. Sorensen, L. Larsen, *Water Resol.* 35 (2001) 1371.
- (27) A. E. Smith, *Weed Res.* 18 (1978) 275.
- (28) K. Kirkland, J. D. Fryer, *Weed Res.* 12 (1972) 90.
- (29) J. D. Altom, J. F. Stritzke, *Weed Sci.* 21 (1973) 556.
- (30) R. J. Hance, *Pestic. Sci.* 19 (1979) 89.
- (31) A. E. Smith, B. J. Hayden, *Weed Res.* 21 (1981) 179.
- (32) R. W. Bovey, A. L. Young, "The Science of 2,4,5-T and Associated Phenoxy Herbicides", Ed. John Wiley & Sons, New York (1980).
- (33) F. Sánchez-Rasero, M. B. Matallo, G. Dios, E. Romero, A. Peña, *J. Chromatogr. A* 799 (1998) 355.
- (34) E. Romero, M. B. Matallo, A. Peña, F. Sánchez-Rasero, Ph. Schmitt-Kopplin, G. Dios, *Environ. Pollution* 111 (2001) 209.
- (35) J. M. Schneiderheinze, D. W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality* 11 (1999) 330.
- (36) J. M. Pozzebon, S. C. N. Queiroz, L. F. C. Melo, M. A. Kapor, I. C. S. F. Jardim, *J. Chromatogr. A* 987 (2003) 381.
- (37) T. E. Arbuckle, S. M. Schrader, D. Cole, J. C. Hall, C. M. Bancej, L. A. Turner, P. Claman, *Reproductive Toxicol.* 13 (1999) 421.
- (38) A. V. Lyubimov, V. F. Garry, R. E. Carlson, D. B. Barr, S. E. Baker, *J. Lab. Clin. Med.* 136 (2000) 116.

- (39) C. Aprea, C. Colosio, T. Mammone, C. Minoia, M. Maroni, *J. Chromatogr. A* 769 (2002) 191.
- (40) J. P. Seiler, *Mutation Research* 55 (1978) 197.
- (41) M. A. Lucas-Delfa, L. V. Pérez-Arribas, F. Navarro-Villoslada, M. E. León-González, L. M. Polo-Díez, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 23 (2000) 755.
- (42) C. Cox, *J. Pestic. Reform*, Spring Vol. 24 No. 1 (2004) 10.
- (43) C. E. Balagué, C. S. De Ruiz, R. Rey, A. M. E. De Duffard, M. E. Nader-Macías, *Toxicology* 177 (2002) 143.
- (44) R. C. Bonet, “*Manual Toxicológico de Productos Fitosanitarios para uso Sanitario*”, Instituto Nacional de Toxicología, Madrid (1998).
- (45) C. Cox, *J. Pestic. Reform*, Spring Vol. 19 No. 1 (1999) 14.
- (46) C. Cox, *J. Pestic. Reform*, Summer Vol.19 No. 2 (1999) 14.
- (47) C. Cox, *J. Pestic. Reform*, Fall Vol.19 No. 3 (1999) 14.
- (48) National Institute of Occupational Safety and Health; *Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*. Department of Health and Human Services. Cincinnati, Oh, US (1978).
- (49) S. Hatrik, J. Tekel, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 117.
- (50) Application Note 100, Supelco, Bellefonte, PA (1996).
- (51) P. Padiglioni, C. M. Polcaro, S. Marchero, M. Sinibaldi, M. Flieger, *J. Chromatogr. A* 756 (1996) 119.
- (52) E. R. Brower, S. Kofman, U. A. Th Brinkman, *J. Chromatogr. A* 17 (1994) 2667.
- (53) C. M. Torres, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 301.
- (54) *Aguas potables de consumo público. Límites máximos y control de los residuos de plaguicidas*. Ministerio de la Presidencia R. D 1138/1990 14 Septiembre. B.O.E nº226, 20 Septiembre (1990).
- (55) E. R. Brower, S. Kofman, U. A. Th Brinkman, *J. Chromatogr. A* 705 (1995) 167.
- (56) *Productos vegetales. Límites máximos y control de los residuos de plaguicidas*; Ministerio de la Presidencia R. D 280/1994. B.O.E nº58, 2004 (1994). Trasposición de las directivas 90/642/CEE; 93/57/CEE; 93/58/CEE y 79/700/CEE.

- (57) N. Blessington, J. Crabb, *J. Chromatogr. A* 454 (1988) 450.
- (58) J. L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R. A. Pérez, M. D. Fernández, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
- (59) L. E. Vera-Ávila, P. C. Padilla, M. G. Hernández, J. L. Meraz, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 115.
- (60) J. V. Sancho-Llopis, F. Fernández-Hernández, E. A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 287.
- (61) M. C. Hennion, V. Pichon, D. Barceló, *Trends Anal. Chem.* Vol 13, No 9, (1994) 361.
- (62) W. Liu, J. Kee Le, *Talanta* 45 (1998) 631.
- (63) M. A. Hernández-Mateos, L. V. Pérez-Arribas, F. Navarro-Villoslada, M. E. León-González, L. M. Polo-Díez, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 22 (1999) 695.
- (64) N. Blessington, J. Crabb, J. O'Sullivan, *J. Chromatogr. A* 396 (1987) 177.
- (65) A. Braithwaite, F. J. Smith, "Chromatographic Methods", 5th Edition, Kluwer Academic Publishers (1996), The Netherlands, 1.
- (66) H. S. Rathore, T. Begun, *J. Planar Chromatogr.* 4 (1991) 451.
- (67) J. Tekel, J. Kovacicová, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 291.
- (68) J. Kovac, J. Tekel, M. Kurucova, Z. Lebensm, *Unters-Forsch* 184 (1987) 96.
- (69) M. Kurucova, E. Minarova, J. Kovac, *Agrochemia* 29 (1989) 48.
- (70) R. Cremlym, *Pesticide*, SNTL (Praga) (1985).
- (71) E. Macutkiewicz, M. Rompa, B. Zygmunt, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 33 (2003) 1.
- (72) J. L. Tadeo, C. Sanchez-Brunete, A. I. García-Valcarcel, L. Martínez, R. A. Pérez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 347.
- (73) A. Balinova, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 125.
- (74) P. R. Beer, C. Smith, L. P. Van Duk, *Chemosphere* 24 (1992) 719.
- (75) M. Isabel-Catalina, J. Dallüge, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 877 (2000) 153.
- (76) A. M. Fogarty, S. J. Traina, O. H. Tuovien, *J. Liq. Chromatogr.* 17 (1994) 2667.
- (77) I. S. Kim, F. I. Sasinos, R. D. Stephens, J. Wang, M. A. Brown, *Anal. Chem.* 63 (1991) 819.

- (78) E. A. Hogendoorn, E. A. Hoogerbrugge, R. A. Baumann, H. D. Meiring, A. P. J. M de Jong, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 49.
- (79) Y. Y. Wigfield, M. Lanoutte, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 84.
- (80) S. J. Richman, S. Karthikeyan, D. A. Bennet, A. C. Chung, S. M. Lee, *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 2924.
- (81) C. Russo, C. M. Lanza, F. Tomaselli, G. Lanza, E. Di Martino-Aleppo, *Italian J. Food Sci* 3 (1991) 231.
- (82) W. Hsien-Ding, C. Hung-Liu, S. P. Yeh, *J. Chromatogr. A* 896 (2000) 111.
- (83) A. J. Cessna, *Pestic. Sci* 30 (1990) 141.
- (84) A. E. Smith, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67 (1984) 794.
- (85) I. Liska, J. Slobodnik, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 235.
- (86) C. Sánchez-Brunete, A. I. García-Valcárcel, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 213.
- (87) T. Heberer, S. Butz, H. J. Stan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 77 (1994) 1587.
- (88) J. Beltran, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 389.
- (89) T. Hereber, H. J. Stan, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 79 (1996) 1428.
- (90) H. Tsuji, N. Henmi, Y. Kaneda, *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health* 41 (1995) 292 (Current Contents Research ®).
- (91) C. M. Polcaro, C. Marra, C. Desiderio, S. Fanali, *Electrophoresis* 20 (1999) 2420.
- (92) A. M. Szmigielska, J. J. Schoenau, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 151.
- (93) M. J. Santos-Delgado, E. Crespo-Corral, L. M. Polo-Díez, *Talanta* 53 (2000) 367.
- (94) T. Tsukioka, T. Murakami, *J. Chromatogr.* 469 (1989) 351.
- (95) A. J. Cessna, *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1154.
- (96) L. Clark, J. Gomme, S. Hennings, *Pestic. Sci.* 32 (1991) 15.
- (97) C. Sánchez-Brunete, S. Pérez, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr.* 552 (1991) 235.
- (98) P. D. Johnson, D. A. Rimmer, R. H. Brown, *J. Chromatogr. A* 765 (1997) 3.
- (99) T. Cserhádi, E. Forgács, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 157.

- (100) V. López-Ávila, N. S. Dodhiwala, W. F. Beckert, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2038.
- (101) M. Vink, J. M. van der Poll, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 331.
- (102) S. Butz, T. Hereber, H. J. Stan, *J. Chromatogr. A* 677 (1994) 63.
- (103) T. Hereber, S. Butz, H. J. Stan, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 58 (1995) 43.
- (104) R. Alcaraz, J. Caixach, J. García-Raurich, I. Espalader, J. Rivera, *Quim. Anal.* 13 (1994) 55.
- (105) G. W. Bruns, S. Nelson, D. G. Erickson, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 74 (1991) 3.
- (106) T. A. Ternes, W. Bauman, R. Nagel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 237.
- (107) J. J. Kirland, *J. Chromatogr. Sci.* 31 (1993) 493.
- (108) L. R. Snyder, J. J. Kirland, J. L. Glajch, "Practical HPLC Method Development", 2nd Edition, Ed. John Wiley & Sons New York (1997).
- (109) J. W. Dolan, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 195.
- (110) S. J. Marin, B. A. Jones, W. Felix, J. Clark, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 255.
- (111) L. K. Moore, R. E. Synovec, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2663.
- (112) T. Greibrokk, T. Andersen, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 743.
- (113) J. W. Dolan, *LC-GC Europe* 13 (2000) 220.
- (114) J. W. Dolan, L. R. Snyder, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 1.
- (115) J. W. Dolan, L. R. Snyder, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 857 (1999) 21.
- (116) J. W. Dolan, L. R. Snyder, N. M. Djordjevic, D. W. Hill, D. L. Saunders, L. Van Heukelem, T. J. Waeghe, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 1.
- (117) T. Tanaka, H. I. Kobayashi, K. Nakanishi, H. Minakuchi, *Anal. Chem.* 1 (2001) 421A.
- (118) B. A. Persson, S. Andersson, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 195.
- (119) E. Yashima, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 105.
- (120) S. Fanali, *J. Chromatogr. A* (1997) 227.

- (121) D. W. Armstrong, Y. Tang, S. Chen, Y. Zhou, C. Bagwill, L. R. Chen, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1473.
- (122) T. J. Ward, A. B. Farris, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 73.
- (123) A. Berthod, T. Yu, J. P. Kullman, D. W. Armstrong, F. Gasparri, I. D'Acquarica, D. Misiti, A. Carotti, *J. Chromatogr. A* 897 (2000) 113.
- (124) A. Berthod, B. L. He, T. E. Beesley, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 205.
- (125) C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 37.
- (126) Y. C. Guillaume, L. Ismaili, T. T. Truong, L. Nicod, J. Millet, M. Thomassin, *Talanta* 58 (2002) 951.
- (127) F. Gasparri, D. Misiti, C. Villani, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 35.
- (128) N. M. Maier, P. Franco, W. Lindner, *J. Chromatogr. A* 906 (2001) 3.
- (129) R. Winstersteiger, B. Goger, H. Krautgartner, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 349.
- (130) B. D. McGarvey, *J. Chromatogr. A* 659 (1994) 243.
- (131) A. M. García-Campaña, J. J. Aaróm, J. M. Bosque-Sendra, *Talanta* 55 (2001) 531.
- (132) J. Suzuki, S. Watanabe, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 75 (1992) 720.
- (133) E. A. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 435.
- (134) M. C. Hennion, V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 665 (1994) 269.
- (135) F. Fernández, J. V. Sancho, O. Pozo, A. Lara, E. Pitarch, *J. Chromatogr. A* 939 (2001) 1.
- (136) E. A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbugge, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 23.
- (137) S. Chiron, S. Papilloud, W. Haerdi, D. Barceló, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1637.
- (138) G. D'Ascenzo, A. Gentili, S. Marchese, A. Matino, D. Pret, *Chromatographia* 48 (1998) 497.
- (139) C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R. M. Marce, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 147.
- (140) P. G. M. Kienhuis, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 249.
- (141) P. G. M. Kienhuis, R. B. Geerdink, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 460.

- (142) C. Aguilar, F. Borrull, R. M. Marcé, *J. Chromatogr. A* (1998) 127.
- (143) J. J. Jiménez, J. L. Bernal, M. J. del Nozal, M. T. Martín, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 83 (2000) 756.
- (144) D. Barceló, G. Durand, R. J. Vreeken, G. J. De Jong, H. Lingeman, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.* 553 (1991) 311.
- (145) A. Cappiello, G. Famiglioni, P. Palma, A. Berloni, F. Bruner, *Environ. Sci. Technol.* 29 (1995) 2295.
- (146) G. S. Davy, P. D. Francis, *J. Chromatogr.* 394 (1987) 323.
- (147) Y. C. Guillaume, T. T. Truong, J. Millet, L. Nicod, C. Guinchard, J. F. Robert, M. Thomassin, *Chromatographia* 55 (2002) 143.
- (148) C. André, Y. C. Guillaume, *Chromatographia* 58 (2003) 201.
- (149) V. Vinkovic, D. Kontrec, V. Sunjic, L. Navarini, F. Zanetti, O. Azzolina, *Chirality* 587 (2001) 581.
- (150) W. H. Pirkle, W. Lee, C. J. Welch, *Enantiomer* 2 (1997) 423.
- (151) A. Balinova, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 319.
- (152) R. B. Geerdink, S. van Tol-Wildenburg, W. M. A. Niessen, U. A. Th. Brinkman, *Analyst* 122 (1997) 889.
- (153) J. Frebortová, *Fresenius Environ. Bull* (1995) 209.
- (154) S. Menor-Higueruelo, L. V. Pérez-Arribas, M. E. León-González, L. M. Polo-Díez, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 25 (2002) 445.
- (155) A. Loconto, *J. Liq. Chromatogr.* 14 (1991) 1297.
- (156) A. DiCorcia, M. Marchetti, R. Samperi, *Anal. Chem.* 63 (1991) 580.
- (157) M. C. Genaro, D. Giacosa, C. Baglietto, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19 (1996) 911.
- (158) C. Crescenzi, D. D'Ascenzo, A. DiCorcia, M. Nazzari, S. Marchese, R. Samperi, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2157.
- (159) V. Gökmen, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19 (1996) 1917.
- (160) R. B. Geerdink, M. Anita, B. C. Graumans, J. Viveen, *J. Chromatogr.* 547 (1991) 478.
- (161) M. J. I. Mattina, *J. Chromatogr.* 542 (1991) 385.

- (162) E. A. Hogendoorn, W. F. de Graaf, M. Tna, P. V. Van Zoonen, *Med. Landbouww. Univ. Gent.* 58/2a (1993) 165.
- (163) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya, N. Tanaka, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1275.
- (164) J. E. MacNair, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 69 (1997) 983.
- (165) J. E. MacNair, K. D. Patel, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.* 71 (1999) 700.
- (166) J. P. C. Vissers, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.
- (167) J. P. Chervet, M. Ursem, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1507.
- (168) Y. Gou, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 2774.
- (169) T. Andersen, P. Molander, R. Trones, D. R. Hegna, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 221.
- (170) P. Molander, A. Tomasen, L. Kristoffersen, T. Greibrokk, E. Lundanes, *J. Chromatogr. B* 766 (2002) 77.
- (171) J. C. Kraak, *Pure & Appl. Chem.* 69 (1997) 157.
- (172) Z. J. Tan, V. T. Remcho, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 99.
- (173) Y. Quo, L. A. Colón, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2511.
- (174) T. Takeuchi, S. Tatsumi, S. Masuoka, K. Hirose, H. Uzu, J. Y. Jin, C. Fujimoto, K. Ohta, K. P. Lee, J. J. Ryoo, S. H. Choi, *J. Chromatogr. A* 1021 (2003) 55.
- (175) N. Tanaka, H. Kobayashi, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Hosoya, T. Ikegami, *J. Chromatogr. A* 965 (2002) 35.
- (176) F. Svec, *Recent Developments in LC Column Technology*, Junio (2003) 2.
- (177) J. Grafnetter, P. Coufal, E. Tesarová, J. Suchánková, Z. Bosáková, J. Sevcík, *J. Chromatogr. A* 1049 (2004) 43.
- (178) D. Lee, F. Svec, J. M. Frechet, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 53.
- (179) H. Oberacher, A. Premstaller, C. G. Huber, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 201.
- (180) D. Moravcova, P. Jandera, J. Urban, J. Planeta, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 789.
- (181) X. Huang, Q. Wang, H. Yan, Y. Huang, B. Huang, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 183.
- (182) A. Prüß, C. Kempter, T. Jira, J. Gysler, *J. Chromatogr. A* 1016 (2003) 129.

- (183) J. P. C. Vissers, A. H. de Ru, M. Ursem, J. P. Chervet, *J. Chromatogr. A* 746 (1996) 1.
- (184) A. Prüß, C. Kempter, J. Gysler, T. Jira, *J. Chromatogr. A* 1030 (2004) 167.
- (185) S. Ito, S. Yoshioka, I. Ogata, A. Takeda, E. Yamashita, K. Deguchi, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 19.
- (186) S. R. Bakalyar, C. Phipps, B. Spruce, K. Olsen, *J. Chromatogr. A* 762 (1997) 167.
- (187) H.A. Claessens, M.A.j. Kuyken, *Chromatographia* 23(5) (1987) 331.
- (188) E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 907 (2001) 165.
- (189) E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, A.G. Hulst, U.A.Th. Brinkman, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1199.
- (190) E.W.J. Hooijschuur, C.E. Kientz, J. Dijksman, U.A.Th. Brinkman, *Chromatographia* 54 (5-6) (2001) 295.
- (191) A. Cappiello, G. Famiglini, A. Berloni, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 215.
- (192) P. Molander, K. Haugland, D. R. Hegna, E. Ommundsen, E. Lundanes, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 864 (1999) 103.
- (193) P. Molander, A. Holm, E. Lundanes, D.R.E. Hegna, E. Ommundsen, T. Greibrokk, *Analyst* 127 (7) (2002) 892.
- (194) A. Holm, S.R. Wilson, P. Molander, E. Lundanes, t. Greibrokk, *J. Sep. Sci.* 27 (13) (2004) 1071.
- (195) A. Cappiello, F. Bruner, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1251.
- (196) N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez, *J. Chromatogr. A* 1081 (2005) 114.
- (197) J. E. Battersby, V. R. Mukku, R. S. Clark, W. S. Hancock, *Anal. Chem.* 57 (1995) 447.
- (198) R. Straub, M. Linder, R. D. Voyksner, *Anal. Chem.* 66 (1994) 3651.
- (199) M. Hong-Chen, C. Horváth, *J. Chromatogr. A* 788 (1997) 51.
- (200) P. Molander, T. E. Gundersen, C. Haas, T. Greibrokk, R. Blomhoff, E. Lundanes, *J. Chromatogr. A* 847 (1999) 59.
- (201) S. Fanali, G. D'Orazio, M. G. Quaglia, A. Rocco, *J. Chromatogr. A* 1051 (2004) 247.

- (202) S. Fanali, E. Camera, B. Chankvetadze, G. D'Orazio, M. G. Quaglia, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 331.
- (203) G. D'Orazio, Z. Aturki, M. Cristalli, M. G. Quaglia, S. Fanali, *J. Chrom. A* disponible en línea (02-03-2005).
- (204) P. Molander, K. Haugland, G. Fladseth, E. Lundanes, S. Thorud, Y. Thomassen, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 67.
- (205) T. Andersen, I. L. Skuland, A. Holm, R. Trones, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 1029 (2004) 49.
- (206) N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez, *Anal. Chim. Acta* 470 (2002) 147.
- (207) M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez, C. Panis, M. P. San Andrés, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 29.
- (208) F. Houdlere, P. W. Fowler, N. M. Djordjevic, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2589.
- (209) P. A. D'Agostino, J. R. Hancock, L. R. Provost, *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 291.
- (210) T. S. Kephart, P. K. Dasgupta, *Talanta* 56 (2002) 977.
- (211) Y. Mechref, Z. El Rassi, *J. Chromatogr. A* 757 (1997) 263.
- (212) O. Zerbinati, F. Trotta, C. Giovannoli, *J. Chromatogr. A* 875 (2000) 423.
- (213) C. Desiderio, C.M. Polcaro, P. Padiglioni, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 503.
- (214) C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* 807 (1998) 37.
- (215) A. Berthod, B. Lingfeng-He, T. E. Beesley, *J. Chromatogr. A* 1060 (2004) 205.
- (216) N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, G. D'Orazio, S. Fanali, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 1303.
- (217) N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, L. M. Polo-Díez, *J. Chromatogr. A* 1076 (2005) 202.
- (218) M. Ye, H. Zou, Z. Liu, Z. Lei, J. Ni, *J. Chromatogr. Sci.* 38 (2000) 517.
- (219) B. Mayr, G. Holz, K. Eder, M. R. Buchmeiser, C. G. Huber, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6080.
- (220) B. Barroso, L. Lubda, R. Bischoff, *J. Proteome Res.* 2 (2003) 633.

- (221) W. Walcher, H. Oberacher, S. Troiani, G. Holz, P. Oefner, L. Zolla, C. G. Huber, *Anal. Technol. Life Sci.* 782 (2002) 111.
- (222) Z. Chen, K. Uchiyama, T. Hobo, *J. Chromatogr. A* 942 (2002) 83.
- (223) B. Chankvetadze, C. Yamamoto, N. Tanaka, K. Nakanishi, Y. Okamoto, *J. Sep. Sci.* 27 (2004) 905.
- (224) F. E. Ahmed, *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 649.
- (225) M. Miura, Y. Tersita, K. Funazo, M. Tanaka, *J. Chromatogr. A* 846 (1999) 359.
- (226) D. W. Armstrong, M. P. Gasper, K. L. Rundlett, *J. Chromatogr. A* 689 (1995) 285.
- (227) K. L. Rundlett, M. P. Gasper, E. Y. Zhou, D. W. Armstrong, *Chirality* 8 (1996) 88.
- (228) Q. Wu, H. A. Claessens, C. A. Cramers, *Chromatographia* 34 (1992) 25.
- (229) Ph. Schmitt, A. W. Garrison, D. Freitag, A. Kettrup, *J. Chromatogr. A* 792 (1997) 419.
- (230) A. S. Rathore, A. P. MvKeown, M. R. Euerby, *J. Chromatogr. A* 1010 (2003) 105.
- (231) K. Mistry, I. Krull, N. Grinberg, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 935.
- (232) Y. Merchref, Z. El Rassi, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1771.
- (233) F. M. Lancas, S. R. Rissato, M. S. Galhiane, *Chromatographia* 50 (1999) 15.
- (234) M. W. F. Nielen, *J. Chromatogr.* 637 (1993) 81.
- (235) K. Otsuka, C. J. Smith, J. Grainger, J. R. Barr, D. G. Patterson, N. Tanaka, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 75.
- (236) J. A. Starky, S. Abrantes, Y. Mechref, M. V. Novotny, *J. Sep. Sci.* 26 (2003) 1635.
- (237) C. N. A. Razak, F. Salam, K. Ampon, M. Basri, A. B. Salleh, N. Y. Ann, *Acad. Sci* 864 (1998) 479.
- (238) F. García-Sánchez, A. Navas Díaz, A. F. González-Díaz, S. A. Eremin, *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999) 177.
- (239) F. García-Sánchez, A. Navas, F. Alfonso, J. Lovillo, *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2215.
- (240) S. Kroger, S. J. Setford, A. P. F. Turner, *Anal. Chem.* 70 (1998) 5047.

- (241) A. V. Kabashin, V. E. Kochergin, A. A. Neloglazov, P. I. Nikitin, *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 1263.
- (242) P. L. Buldini, L. Ricci, J. L. Sharma, *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 47.
- (243) V. López-Avila, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 195.
- (244) J. Field, K. Monohan, R. Reed, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1956.
- (245) K. C. Ting, P. K. Kho, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 81 (1998) 93.
- (246) J. Tekel, S. Hatrík, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 397.
- (247) V. Gökmen, J. Acar, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19 (1996) 1917.
- (248) H. Sabik, R. Jeannot, B. Rondeau, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 217.
- (249) J. L. Ezzel, B. E. Ritcher, W. D. Felix, S. R. Black, J. E. Meikle, *LC-GC* 13 (1995) 390.
- (250) J. S. Fritz, M. Macka, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 137.
- (251) W. G. Johnson, T. L. Lavy, S. A. Senseman, *J. Environ. Qual.* 23 (1994) 1027.
- (252) K. Monohan, I. J. Tinsley, S. F. Shepherd, J. A. Field, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 2418.
- (253) M. J. M. Wells, L. Zhou-Yu, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 237.
- (254) M. E. León-González, L. V. Pérez-Arribas, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 3.
- (255) N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borrull, *Trends Anal. Chem.* 17 (1998) 384.
- (256) J. S. Fritz, "Analytical Solid Phase Extraction", Ed. Willey-Vch, New York, (1999).
- (257) S. Lindsay, "HPLC", Ed. John Wiley and Sons, Londres (2001).
- (258) F. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *Environ. Sci. Technol.* 30 (1997) 2071.
- (259) S. Guenu, M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 15.
- (260) D. Puig, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 371.
- (261) I. Ferrer, D. Barceló, *Trend Anal. Chem.* 18 (1999) 180.
- (262) I. Ferrer, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 778 (1997) 161.
- (263) M. Galia, F. Svec, J. M. J. Frechet, *J. Polym. Sci. Polym. Chem* 32 (1994) 2169.

- (264) V. Pichon, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 195.
- (265) N. Masqué, R.M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 257.
- (266) N. Masqué, M. Galia, R. M. Marcé, F. Borrull, *J. Chromatogr. A* 803 (1998) 147.
- (267) N. Masqué, M. Galia, R. M. Marcé, F. Borrull, *Analyst* 122 (1997) 425.
- (268) H. Sabik, R. Jeannot, *J. Chromatogr. A* 818 (1998) 197.
- (269) P. J. Dumont, J. S. Fritz, *J. Chromatogr. A* 691 (1995) 123.
- (270) <http://www.waters.com/watersdivision/ContentD.asp?ref=JDRS%2D5M2MTK>, Oasis[®] Sample Extraction Products, Waters Corporation (15-03-2005).
- (271) C. F. Poole, *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 362.
- (272) L. Bovanová, E. Brandsteterová, *J. Chromatogr. A* 880 (2000) 149.
- (273) D. T. Rossi, N. Zhang, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 97.
- (274) D. Stevenson, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 154.
- (275) L. Mondello, A. C. Lewis, K. D. Bartle, “*Multidimensional Chromatography*”, Ed. John Wiley & Sons Ltd Winchester(2002).
- (276) C. Aguilar, I. Ferrer, F. Borrull, R. M. Marce, D. Barceló, *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 237.
- (277) M. E. Baez, M. Rodríguez, O. Lastra, P. O. Contreras, *J. High Resol. Chromatogr.* 20 (1997) 591.
- (278) J. Triska, *Chromatographia* 40 (1995) 712.
- (279) B. D. Eitzer, A. Chevalier, *Bull of Environ. Contam. and Toxicol.* 62 (1999) 420.
- (280) M. C. Hennion, *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 73.
- (281) M. Peruzzi, G. Bartolucci, F. Cicni, *J. Chromatogr. A* 867 (2000) 169.
- (282) C. Baggiani, G. Giraidini, C. Giovannoli, F. Trotta, A. Vanni, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 116.
- (283) C. Baggiani, C. Giovannoli, L. Anfossi, C. Tozzi, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 35.
- (284) M. C. Buzzoniti, C. Sarzanini, E. Mentasti, *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 289.
- (285) J. Beltrán, F. J. López, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* (2000) 389.

- (286) G. Famigliani, H. Trufelli, E. Pierini, E. De Simoni, F. Mangani, A. Cappiello, *J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int.* 86 (2003) 941.
- (287) Y Shintani, X. Zhou, M. Furuno, H. Minakuchi, K. Nakanishi, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 351.
- (288) K. Jinno, T. Muramatsu, Y. Saito, Y. Kiso, S. Magdic, J. Pawliszyn, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 137.
- (289) M. R. Lee, R. J. Lee, Y. W. Lin, C. M. Chen, B. H. Hwang, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1963.
- (290) T. Nilsson, D. Baglio, I. Galdo-Minguez, J. Ogaard-Madsen, S. Fachetti, *J. Chromatogr. A* 826 (1998) 211.
- (291) E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J. V. Sancho, O. Pozo, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 113.
- (292) R. B. Geerdink, A. Connie, A. van Balkom, J. B. Hendrik, *J. Chromatogr.* 481 (1989) 271.
- (293) F. Hernández, C. Hidalgo, *Quim. Anal.* 20 (2001) 81.
- (294) E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J. V. Sancho, O. Pozo, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 926 (2001) 113.
- (295) N. Rosales-Conrado, M. E. León-González, L. V. Pérez- Arribas, L. M. Polo-Díez “On line preconcentration of chlorophenoxy acid herbicides and their esters. Determination by capillary liquid chromatography with temperature gradient and UV detection”, Poster communication PS, Euroanalysis 12, (2002), Dortmund, Alemania.
- (296) C. Desiderio, Z. Aturki, S. Fanali, *Electrophoresis* 22 (2001) 535.
- (297) S Menor, “Estudio de la preconcentración de herbicidas fenoxiácidos en cartuchos cambiadores de aniones. Determinación mediante cromatografía líquida”. Tesina presentada en el Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Diciembre 2000.
- (298) Y. K. Ye, R. W. Stringham, M. J. Wirth, *J. Chromatogr. A* 1057 (2004) 75.

ANEXO I

Determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil by capillary high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, using large volume injection and temperature gradient

N. Rosales-Conrado, M.E. León-González*, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez

Dpto. Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Received 28 February 2002; received in revised form 19 July 2002; accepted 1 August 2002

Abstract

A simple method for the simultaneous determination of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in soil is presented. Compounds studied are: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 4-(2,4-dichlorophenoxy)butanoic acid (2,4-DB), 2,4-dichlorophenoxyacetic-1-butyl ester (2,4-D-1-butyl ester), and 2,4-dichlorophenoxyacetic-1-methyl ester (2,4-D-1-methyl ester).

The chromatographic analysis was carried out by HPLC, after ultrasonic extraction, on a C₁₈ packed capillary column with temperature gradient, large injection volumes and UV detection at 232 nm. Samples were spiked with amounts between 2.5 and 6.0 $\mu\text{g g}^{-1}$ of each herbicide; recoveries obtained were between 72 and 97% ($n = 3$ for each spiked level) and detection limits were between 0.3 and 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$.

Application of this procedure to the analysis of herbicides in ester and acid forms showed the effectiveness of the methodology proposed.

© 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Chlorophenoxy acid and esters; Herbicides; Capillary liquid chromatography; Temperature gradient; Soil

1. Introduction

Chlorophenoxy acids are selective and translocated herbicides used to control the growth of broad-leaved weeds. Their stability, persistence in the environment and penetration in the plant depends on how they are formulated. The more frequently used formulations are amine or alkaline salts, alkyl esters or free carboxylic acids [1]. The esters, emulsified in oil,

are commonly used because of their higher herbicide activity, penetration power and low vapour pressure. However, losses by volatility can damage sensitive crops in the neighbourhood, especially in hot climates. Due to their persistence, polar nature and water solubility, the phenoxy acids are dispersed in the environment, and their residues and transformation products are present in several matrices like water, soil, cereals and other vegetable products. In soil, their persistence is generally 6–8 weeks, depending on the nature, acidity and amount of organic matter. The herbicides in ester form are more persistent than the acid forms because they are less soluble in water and hence

* Corresponding author. Tel.: +34-913944196;

fax: +34-913944329.

E-mail address: leongon@quim.ucm.es (M.E. León-González).

are less susceptible to be stripped away by the rain [2].

The level of toxicity of these herbicides depends on the chlorophenoxy acids chemical form. For example, LD₅₀ oral for rats (mg kg⁻¹ body mass) is 375 for 2,4-D and 150 for 2,4-D-1-butyl ester [3]. According to the classification of pesticides by hazard recommended by WHO [4], 2,4-D is moderately hazardous, while 2,4-D-1-butyl ester is highly hazardous.

Different methods have been proposed to determine these products in acid form [4,5], but no method seems to exist for the determination of the ester forms, either alone or in combination with the acid ones. Determination of the different chemical forms is complex due to the need to preserve the phenoxy acids in their original form, and preparation of the sample requires a previous extraction step that can modify the chemical form of the species [6,7].

Several procedures for the extraction of herbicides from solid samples have been reported [8]. Techniques used include Soxhlet extraction, ultrasonic extraction, supercritical fluid extraction (SFE), microwave-assisted solvent extraction (MAE) [9] and accelerated solvent extraction (ASE) [10]. Extraction of chlorophenoxy acids in acid form from soil by SFE, ASE and MAE is carried out at elevated temperatures and/or pressures [9,11,12] and, in some cases, low recoveries have been obtained. Ultrasonic extraction can be made at room temperature, which would allow to analyse herbicides without altering them [8]. When chlorophenoxy acids in ester form have been analysed in soil, a previous hydrolysis step has been performed [13].

Currently, chromatographic techniques are the most widely used ones to determine chlorophenoxy acids. Standard methods for the analysis of these organic pollutants require derivatization prior to gas chromatography (GC) [13–16]. High performance liquid chromatography (HPLC) is preferred because it allows direct analysis of phenoxy acids and their esters without previous derivatization. Detectors, such as UV [17], diode array [18] or mass spectrometry [19–21] are used.

The use of capillary columns in HPLC increases the sensitivity and efficiency of separation. Moreover, consumption of organic solvents is very low and smaller amounts of sample are required [22,23]. The loss of sensitivity derived from the small vol-

umes injected can be avoided with on column focusing techniques [24]. In addition, the relatively low heat capacity and the small diameter of the column allow to use temperature programming [25,26].

The aim of the present study is to simultaneously determine phenoxy acids and their esters in soil samples. To achieve this, a rapid and simple method has been developed for their extraction from soil by ultrasonic extraction at room temperature, thus preventing transformation. Determination is carried out by capillary liquid chromatography with on-column focusing techniques, temperature gradient and UV detection.

2. Experimental

2.1. Equipment

The chromatographic determination of the chlorophenoxy acids and their esters was carried out in a HPLC system with a gradient Beckman 125 S Solvent Module SYSTEM GOLD (Beckman, Fullerton, CA). The injector employed was a Rheodyne valve (Beckman) with stainless steel external loops of different volumes. A Beckman UV programmable variable wavelength 166 Detector System Gold with a microcell (35 nl, 8 mm pathlength) was used as detector. All components were interfaced to a DELL computer equipped with a MMX Pentium Processor and containing Gold Nouveau Chromatography Workstation Software (Version 1.6) for Windows (Beckman). A 150 mm × 0.3 mm i.d. LC Packings Analytical Column packed with 3 μm Hypersil C₁₈ BDS was used in the chromatographic separation (LC Packings, Baajserweg, Amsterdam). The temperature gradient was achieved with a MISTRAL programmable oven (Spark-Holland BV, Aj Emmem, The Netherlands).

Extraction of the herbicides from the soil was carried out with a P-Selecta ultrasonic bath (Selecta, Barcelona). The extracts were separated from the solid residue with a P-Selecta centrifuge (Selecta). A Kuderna–Danish apparatus with a thermostatic bath (Selecta) or a rotary evaporator (Heidolph, Schwabach, Germany) were used to eliminate the organic solvent.

2.2. Chemicals

All chemicals used were analytical grade: 2,4-D (99% pure) was obtained from Aldrich; 2,4-DB (97% pure) and 2,4-D-1-methyl ester (97% pure) from Sigma; 2,4-D-1-butyl ester (98.3% pure) from Riedel-de-Haën. Methanol, acetonitrile and acetone were HPLC grade from Scharlau (Barcelona, Spain). Purified water was obtained from a Milli-Q apparatus from Millipore (Bedford, MA, USA). Stock solutions of the chlorophenoxy acids and their esters (200 mg l^{-1}) were prepared in methanol and stored in the dark at 4°C .

2.3. Procedure

2.3.1. Capillary chromatographic determination of chlorophenoxy acids

The mobile phase flow rate through the column was $10 \mu\text{l min}^{-1}$, and the injected volume of both the herbicide stock solutions and the samples was $20 \mu\text{l}$. Isocratic elution of the analytes was made with a 56/44 (v/v) mixture of methanol and 0.8% H_3PO_4 aqueous solution.

The column temperature was maintained at 20°C for 6 min, then a linear increase to 65°C over 5 min and then another isothermal step at 65°C till the end of the chromatogram. The detection wavelength was 232 nm.

Detection and quantitation limits were estimated by decreasing the concentration of chlorophenoxy acids down to the smallest detectable peak; this concentration was multiplied by 3 to obtain the detection limit and by 10 for quantitation limit. Calibrations graphs were obtained in the $15\text{--}70 \mu\text{g l}^{-1}$ range.

2.3.2. Determination of chlorophenoxy acids and their esters in soil samples

Soil samples (1 g) were spiked with each herbicide in a concentration range between 2.5 and $6.0 \mu\text{g g}^{-1}$ and were left to stabilise for 20–30 min. Spiked samples were extracted at room temperature in an ultrasonic bath in three steps of 5 min each. The two first extractions were carried out with 5 ml of acetonitrile each, and the last one with 5 ml of a H_2SO_4 in 5 mM solution. Liquid extracts were separated from the soil by centrifugation at 4000 rpm for 5 min, collected in a volumetric flask and diluted to 100 ml,

for focusing purposes, with Milli-Q water. A total of $20 \mu\text{l}$ of the resulting solution were injected in the LC system through a PTFE filter with $0.20 \mu\text{m}$ pore size, and determined under the conditions described above.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation

In order to set up the best chromatographic conditions for the separation of the chlorophenoxy acid herbicides, studies of the mobile phase composition, temperature and injection volume were carried out.

3.1.1. Mobile phase

The chromatographic method used is based on the one proposed by Lucas-Delfa et al. [7]. Different

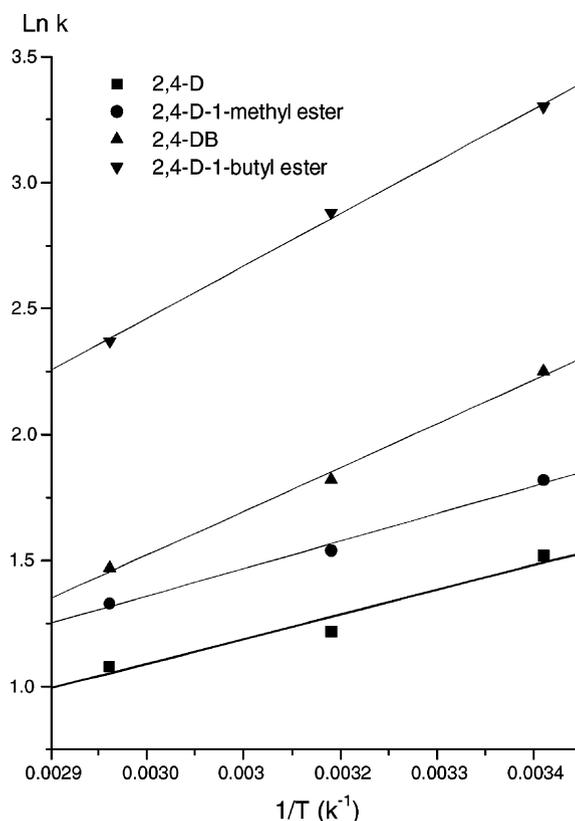


Fig. 1. Plots of the logarithmic retention factors vs. the inverse of the absolute temperature.

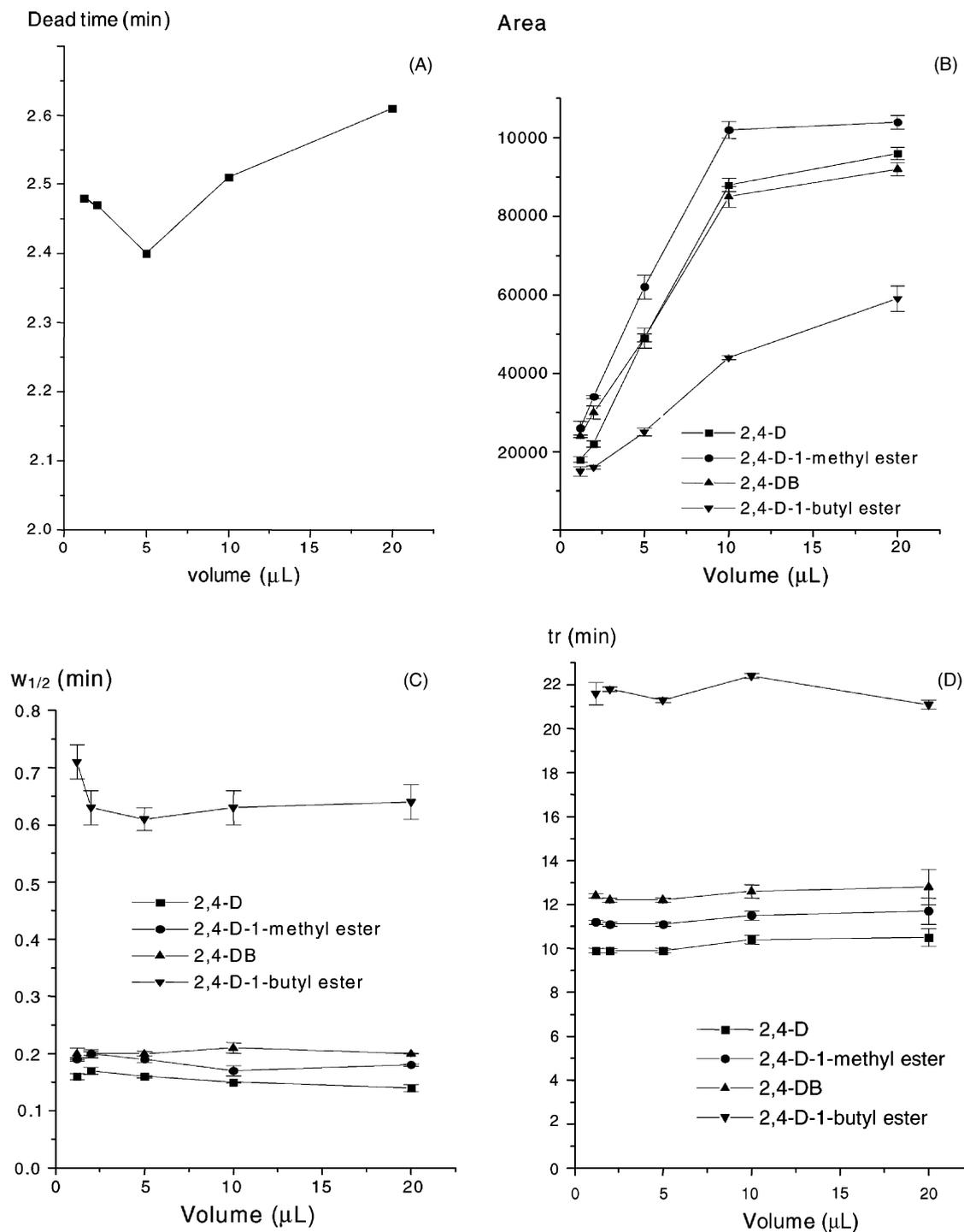


Fig. 2. Influence of injection volume on the chromatographic parameters: (A) dead time; (B) area; (C) $w_{1/2}$; and (D) retention time. Concentration of herbicides 0.20 mg l^{-1} . The dead volume was calculated from the first change of detector signal corresponding to the water.

mixtures of methanol and H₃PO₄ 0.8% aqueous solution for isocratic separation were tested as mobile phases at 20 °C. The methanol ratios studied were between 45 and 60%. Mobile phase with 56% of methanol was selected as the best, because it allowed the chromatographic separation with total resolution in a time of 35 min.

3.1.2. Influence of temperature

Temperature also could be an important factor due to the low diameter of the column. Changes in the temperature affect the mobile phase viscosity and the degree of ionisation of the acid form of the chlorophenoxy acids. When temperature increases, desorption of the chlorophenoxy acids from the stationary phase occurs very quickly and retention times decrease (negative temperature dependence). The Van't Hoff plots of the data are almost linear, as shown in Fig. 1, but the slope is different for each herbicide. The retention time more affected by temperature changes is that of 2,4-D-1-butyl ester. Because selectivity and analysis time depend on temperature changes, several temperature gradients were programmed in an attempt to reduce the analysis time while maintaining the quality of separation. The best conditions found were: an initial step at 20 °C for 6 min, then a linear increase to 65 °C in 5 min, and then another isothermal step at 65 °C till the end of the chromatogram. This temperature program decreased the analysis time to 21 min with acceptable resolution of all the peaks.

3.1.3. Influence of injection volume

The typical injection volume recommended for a 0.3 mm i.d. packed capillary column (100 nl) is usually delivered by a specific injector valve equipped with an internal loop, but larger volumes can be deliv-

ered through external loops. The step of focalisation on column [22] was carried out using an aqueous solution containing 0.20 mg l⁻¹ of each chlorophenoxy acid and 0.20 mg l⁻¹ of each ester with 10% of organic modifier (acetonitrile) as the injection solution. This way, herbicides were concentrated on the column head before elution by the mobile phase, because the sample solvent has lower eluent strength. Several injection volumes were tested in an attempt to improve sensitivity; Fig. 2 shows the results obtained with these loops. Another parameter related to separation quality, such as $w_{1/2}$, decreased for 2,4-D-1-butyl ester, the last compound eluted. As can be seen, for all the herbicides studied, the sensitivity increases with the injection volume due to the larger peak areas obtained. The 20 µl loop provided the highest sensitivity and, as shown in Fig. 2B it can be considered as the saturation volume. In fact, the difference between the 10 and the 20 µl loops only was significant for the last compound eluted (2,4-D-1-butyl ester). The 20 µl loop was selected because sensitivity was improved and retention times and peak widths ($w_{1/2}$) were not increased significantly.

3.2. Analytical characteristics

The calibration plots for chlorophenoxy acids and their esters were found to be linear in the range 15–70 µg l⁻¹.

Detection limits were calculated by injecting progressively smaller amounts of each herbicide, until the response obtained had a peak height three times larger than the average height of noise around the peak. The detection and quantitation limits obtained for the different analytes after focusing, when the capillary chromatographic elution is performed under the proposed conditions are shown in Table 1.

Table 1
Detection and quantitation limits

| Herbicide | Detection limits | | Quantitation limits | |
|----------------------|---------------------------------------|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|
| | Distilled water (µg g ⁻¹) | Soil (µg g ⁻¹) | Distilled water (mg g ⁻¹) | Soil (mg g ⁻¹) |
| 2,4-D | 1.8 | 0.3 | 6.0 | 1.0 |
| 2,4-D-1-methyl ester | 1.6 | 0.4 | 5.3 | 1.2 |
| 2,4-DB | 1.9 | 0.3 | 6.3 | 1.0 |
| 2,4-D-1-butyl ester | 3.2 | 0.5 | 10.7 | 1.5 |

Table 2
Influence of extracting reagent on extraction efficiency

| Extraction $v = 5$ ml | | | Recovery (%) | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------------|----------------------|--------------|---------------------|
| First | Second | Third | 2,4-D | 2,4-D-1-methyl ester | 2,4-DB | 2,4-D-1-butyl ester |
| Methanol | Methanol | Methanol | 40 | 112 | 54 | 90 |
| Acetonitrile | Acetonitrile | Acetonitrile | 26 | 53 | 81 | 84 |
| H ₂ SO ₄ (5 mM) | H ₂ SO ₄ (5 mM) | H ₂ SO ₄ (5 mM) | 97 | 70 | 80 | 50 |
| Acetone | Acetone | Acetone | ^a | 92 | ^a | 92 |
| H ₂ SO ₄ (5 mM) | H ₂ SO ₄ (5 mM) | MeOH | 124 | 99 | 86 | ^a |
| Methanol | Methanol | H ₂ SO ₄ (5 mM) | 73 | 74 | 80 | 46 |
| Acetonitrile | Acetonitrile | H ₂ SO ₄ (5 mM) | 74 | 101 | 83 | 101 |
| H ₂ SO ₄ (5 mM) | H ₂ SO ₄ (5 mM) | Acetonitrile | 92 | 75 | 79 | 85 |

^a No extraction occurred.

Detection limits achieved for herbicides in distilled water were between 1.8 and 3.2 $\mu\text{g l}^{-1}$, and between 0.3 and 0.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ when herbicides were spiked in soil samples.

3.3. Extraction efficiency studies for soil

All experiments were carried out with soil samples spiked with 2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$ of each herbicide.

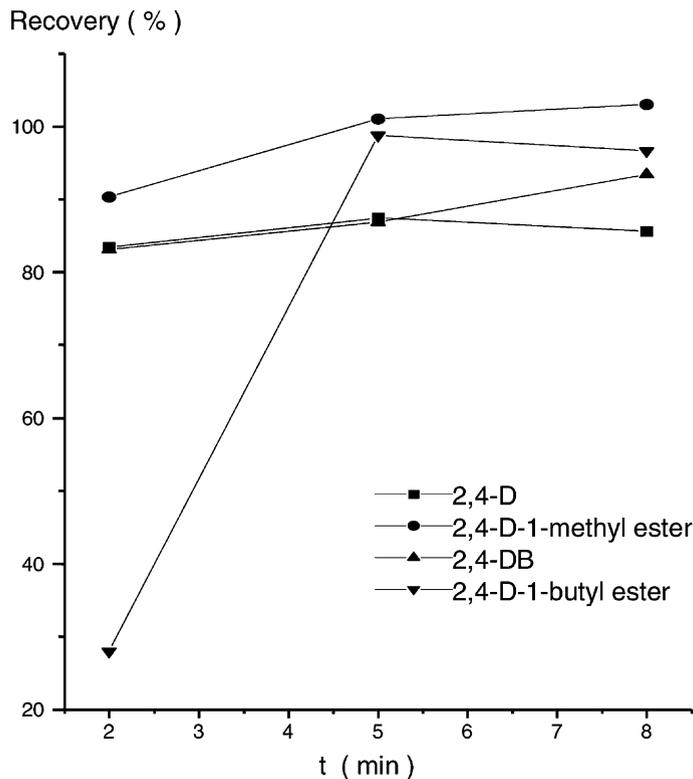


Fig. 3. Influence of time on extraction efficiency.

To establish the extracting reagent, three extractions were carried out with 5 ml of different solvents. Mixtures containing methanol, acetone, acetonitrile and H₂SO₄ 5 mM (pH 2) solution were tested for the extraction of chlorophenoxy acids from the soil. Table 2 shows the results obtained. As can be seen, the best recovery was obtained extracting twice with 5 ml of acetonitrile and once with 5 ml of H₂SO₄ in 5 mM solution. The extract was then made up to 100 ml with distilled water for focusing purposes. The resulting solution, containing 10% of organic modifier, allowed the focalisation of the herbicides on the column head, providing the highest sensitivity.

Several volumes of the extracting solvent were studied. Extracting volumes of 3 ml or lower did not lead to higher recoveries. When 5 ml or higher volumes were studied, recoveries achieved were higher, but the necessary dilution to obtain the focusing solution was higher, which led to a loss of sensitivity. Several attempts were made to evaporate the extract. In the first one, the extract was evaporated in a Kuderna–Danish apparatus to a volume of ca. 0.5 ml, which was then made up to 5 ml with distilled water. In these conditions, chromatographic peak areas of esters decrease, while that of 2,4-D increases. Similar results were obtained when a rotary evaporator was used. Therefore, 5 ml and three extractions were used for further studies.

After the volume was optimised, the extraction time was tested. Each of the three extractions was

carried out for 2, 5 and 8 min. Fig. 3 shows the results obtained. As can be seen, the extraction was not complete for 2,4-D-1-butyl ester shaking 2 min in an ultrasonic bath. With a time of 8 min, recovery was similar to that achieved at 5 min for all analytes, and no further improvement was obtained. Hence, the extraction time selected was 5 min, in an attempt to reduce the analysis time while maintaining quality of extraction.

3.4. Determination of chlorophenoxy acid herbicides residues in soil samples

To evaluate the applicability of the proposed method, soil samples were spiked with 2.5, 4.0 and 6.0 µg g⁻¹ for each herbicide (Table 3). The extraction was carried out in the optimum conditions and the

Table 3
Recovery of chlorophenoxy acids added to soil samples

| Herbicide | Added (µg g ⁻¹) | Recovery (mean ± S.D.) ^a |
|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| 2,4-D | 2.5 | 76 ± 4 |
| | 4.0 | 72 ± 3 |
| | 6.0 | 83 ± 2 |
| 2,4-D-1-methyl ester | 2.5 | 85 ± 2 |
| | 4.0 | 83 ± 2 |
| | 6.0 | 80 ± 1 |
| 2,4-DB | 2.5 | 72 ± 1 |
| | 4.0 | 75 ± 1 |
| | 6.0 | 82 ± 1 |
| 2,4-D-1-butyl ester | 2.5 | 97 ± 1 |
| | 4.0 | 79 ± 3 |
| | 6.0 | 95 ± 3 |

^a n = 3.

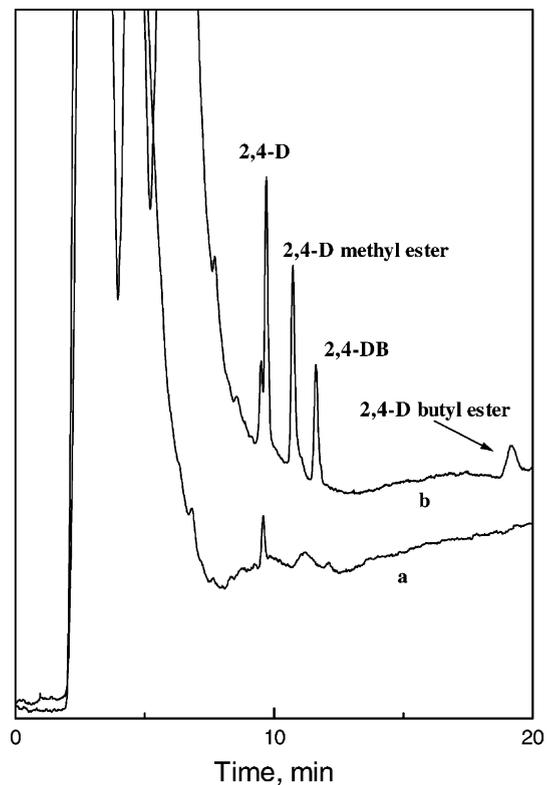


Fig. 4. LC chromatogram of (a) unspiked soil; (b) soil spiked with 4.0 µg g⁻¹ of chlorophenoxy acids. Column: LC Packing Hypersil C₁₈ BDS, 3 µm, 150 mm × 0.3 mm i.d. Mobile phase: MeOH/H₃PO₄ 0.8% aqueous solution (56/44 (v/v)). Flow rate in column: 10 µl min⁻¹. Temperature gradient from 20 to 65 °C at 9 °C min⁻¹. Injection volume: 20 µl.

chromatographic separation was made as described in Section 2.

For reproducibility studies, the concentrations were kept constant throughout the three determinations made for each spiked amount of each herbicide, and the results, mean of three analyses, are listed in Table 3. As can be seen, in general, acceptable recoveries for all herbicides, between 72 and 97% with standard deviations between 1 and 4, were achieved. Fig. 4 shows a typical chromatogram obtained from a soil sample spiked with $4.0 \mu\text{g g}^{-1}$ of each herbicide and for another unspiked soil sample.

4. Conclusions

Capillary liquid chromatography with isocratic elution and temperature gradient, combined with focalisation on column and ultrasonic extraction, provides an effective and reproducible method for the determination of chlorophenoxy acid herbicides in acid and ester forms, at low ($\mu\text{g g}^{-1}$) levels in soil samples. The sample preparation developed by ultrasonic extraction at room temperature is simple, rapid and does not alter the chemical form of the species found in the samples.

Acknowledgements

Authors wish to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Dirección General de Investigación) for financial support (project BQU2000-0654).

References

- [1] P. Yúfera, *Química Agrícola II*, Alhambra, Madrid, 1977, pp. 455–491.
- [2] L. Dextroux, J. Gostinchar, *Los Herbicidas y su Empleo*, Oikos-tau, Barcelona, 1967, pp. 108–135.
- [3] C.D.S. Tomlin, *The Pesticide Manual*, British Crop Protection Council, London, 1977.
- [4] J.F. Copplestone, *Bull. Who* 66 (1998) 545–551.
- [5] J.L. Tadeo, C. Sánchez Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 175.
- [6] L.E. Vera-Ávila, P.C. Padilla, M.G. Hernandez, J.L.L. Meraz, *J. Chromatogr. A* 731 (1996) 115.
- [7] M.A. Lucas-Delfa, L.V. Pérez-Arribas, F. Navarro-Villoslada, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, *J. Liquid Chromatogr. Rel. Technol.* 23 (2000) 755.
- [8] V. Lopez-Avila, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 29 (1999) 195.
- [9] E.A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbrugge, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 23.
- [10] A. Laganà, G. Fago, A. Marino, V.M. Penazzi, *Anal. Chim. Acta* 415 (2000) 41.
- [11] J.A. Field, K. Monohan, R. Reed, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1956.
- [12] C. Crescenzi, G. D'Ascenzo, A. Di Corcia, M. Nazzari, S. Marchese, R. Samperi, *Anal. Chem.* 71 (1999) 2157.
- [13] I.S. Kim, F.I. Sasinos, R.D. Stephens, J. Wang, M.A. Brown, *Anal. Chem.* 63 (1991) 819.
- [14] C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, J.L. Tadeo, *J. Chromatogr. A* 675 (1994) 213.
- [15] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, A.I. García-Valcárcel, R.A. Pérez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 347.
- [16] T. Heberer, S. Butz, H.-J. Stan, *J. AOAC Int.* 77 (1994) 1587.
- [17] J.V. Sancho-Llopis, F. Hernández-Hernández, *Anal. Chim. Acta* 283 (1993) 287.
- [18] E.R. Brouwer, S. Kofman, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 167.
- [19] I. Liska, J. Slobodník, *J. Chromatogr. A* 733 (1996) 235.
- [20] J. Slobodnik, B.L.M. van Baar, U.A.Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 81.
- [21] O. Pozo, E. Pitarch, J.V. Sancho, F. Hernández, *J. Chromatogr. A* 923 (2001) 75.
- [22] W. Liu, H. Kee Lee, *Talanta* 45 (1998) 631.
- [23] A. Cappiello, F. Bruner, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1281.
- [24] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 1.
- [25] M.E. León-González, L.V. Pérez Arribas, L.M. Polo Díez, C. Panis, M.P. San Andrés, *Anal. Chim. Acta* 445 (2001) 29.
- [26] M.P. San Andrés, M.E. León-González, L.V. Pérez Arribas, L.M. Polo Díez, *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 367.

ANEXO II

Noelia Rosales-Conrado^{1,2}
 M^a Eugenia León-González²
 Giovanni D'Orazio¹
 Salvatore Fanali¹

¹Instituto di Metodologie Chimiche
 del Consiglio Nazionale delle
 Ricerche, Via Salaria km 29,300,
 00016 Monterotondo Scalo
 (Roma) Italy

²Dpto. Química Analítica,
 Facultad de Ciencias Químicas,
 Universidad Complutense,
 28040 Madrid, Spain

Enantiomeric separation of chlorophenoxy acid herbicides by nano liquid chromatography-UV detection on a vancomycin-based chiral stationary phase

Enantiomeric separation of mecoprop, dichlorprop, and fenoprop herbicides in their acid form, commonly used to control the growth of broad-leaved weeds, was carried out by nano-liquid chromatography (nano-LC) at a flow rate of 60 nL/min, using a packed capillary column with vancomycin-modified silica particles of 5 μm . The length of chiral stationary phase was 21 cm, while the total and effective lengths were 43 and 33 cm, respectively. Inner diameter was 0.075 mm. Separated peaks were detected at 195 nm. Several mixtures of methanol, water, and 500 mM ammonium acetate buffer at different pH's were tested as mobile phase, and experimental parameters such as resolution (R_s), capacity factor (k), efficiency (N/m), and enantioselectivity factor (α) were measured under all the test conditions. Baseline enantiomeric separation was obtained for the three studied herbicides with α in the range 1.6–1.9, using as the mobile phase aqueous solutions containing 85% methanol, 5% of 500 mM ammonium acetate pH 4.5 buffer, and 10% water. Experimental results show that the vancomycin stationary phase presents a great enantio-recognition capability towards chlorophenoxy acid herbicides on using nano-LC.

Key Words: Chiral separation; Vancomycin; Nano-liquid chromatography; Chlorophenoxy acid herbicides

Received: July 30, 2004; revised: August 31, 2004; accepted: August 31, 2004

DOI 10.1002/jssc.200401896

1 Introduction

Many agrochemicals used in the world (about 25%) are chiral compounds applied to the environment as racemates, in which one enantiomer is significantly more active than the other and produces the desired effect. Only a small fraction of them is manufactured and used in the form of a pure enantiomer [1]. The use of the pure enantiomer rather than the racemate causes less environmental damage because it avoids the unnecessary introduction of 50% of the pesticide into the environment [2, 3].

Phenoxyalkanoic herbicides are selective and translocated herbicides widely used for broad leaf weed control in cereal crops. Due to their persistence, polar nature, and water solubility, the chlorophenoxy acids are mobile in the

environment, and their residues are often found in a variety of matrices. Mecoprop, dichlorprop, and fenoprop present an asymmetric carbon in their chemical structure. Their enantiomers exhibit different biological and physiological properties, toxicity [4], and herbicide activity, the R -(+) form being responsible for the auxin activity [5].

Several analytical methods have been used for the enantiomeric purity control of herbicide formulations and, among them, chromatographic and electromigration methods seem to be the most useful in this field. Special emphasis has been placed on chromatographic techniques, which together with CE, are the major field of development in the resolution of enantiomers. Chlorophenoxy acid herbicides have been determined by capillary electrophoresis using, as chiral selectors, alkylglucoside surfactants [6], different cyclodextrins [7] and antibiotics such as vancomycin [8, 9] for their enantiomeric separation. Chiral stationary phases based on α -acid glycoprotein or Pirkle ionic [10, 11], and terguride [12], have been used for the chiral high performance liquid chromatography analysis of phenoxy herbicide mixtures; however, as far as we know the enantiomeric separation by capillary or nano-liquid chromatography (nano-LC) has not been reported to date. Nano-LC is a nanoscale sep-

Correspondence: Salvatore Fanali, Instituto di Metodologie Chimiche del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Salaria km 29,300, 00016 Monterotondo Scalo (Roma) Italy.
 Phone: +39 0690672256. Fax: +39 0690672269.
 E-mail: fanali@imc.cnr.it

Abbreviations: CE, capillary electrophoresis; 2,4-DP, 2-(2,4-dichlorophenoxy)-propanoic acid; MCPP, 2-(4-chloro-2-methyl)-phenoxypropanoic acid; 2,4,5-TP, 2-(2,4,5-trichlorophenoxy)-propanoic acid; Van-CSP, Vancomycin chiral stationary phase.

aration technique, recently introduced by Karlsson and Novotny [13], which showed that, by reducing the internal diameter of the packed capillary column, higher efficiency can be achieved. Additionally the use of capillary columns with ID lower than 100 μm can offer lower detection limits than columns usually employed in conventional HPLC. Last but not least, it worthy of mention that the use of nano-scale techniques allows the use of extremely small volumes of mobile phase due to the low flow applied (nL/min). However, the main drawback of the nano-techniques is the relatively low injected volumes of samples, which can reduce the sensitivity. Other obvious advantages include the reduction of solvent due to the low flow rates employed, and the lower amount of sample required [14, 15] The loss of sensitivity due to the small volumes injected can be avoided with on-column focusing techniques [16].

The aim of the present study was to explore the ability of a vancomycin-based chiral stationary phase for the enantiomeric separation of chlorophenoxy acid herbicides using nano-liquid chromatography with UV detection.

2 Experimental

2.1 Reagents and standards

All reagents and solvents were of analytical reagent grade. HPLC grade methanol and glacial acetic acid (99.8% pure) were purchased from Carlo Erba (Milan, Italy). Ammonia solution (max. 33% NH_3) extra pure was obtained from Riedel-de-Häen (Seelze, Germany). LiChrospher[®] 100 C_{18} silica phase (5 μm particle diameter) was from Merck (Darmstadt, Germany). Double distilled water was used for solution preparation.

Mobile phases were prepared by mixing the appropriate volumes of methanol, ammonium acetate 500 mM pH 4.5 buffer, and water.

Dichlorprop (2,4-DP, 99% pure), mecoprop (MCP, 98.5% pure), and fenoprop (2,4,5-TP, 97% pure), as racemic standard compounds, were purchased from Lab-Service Analytica (Anzola Emilia, Bologna, Italy).

Stock solutions were prepared by dissolving 1 mg of each herbicide in 1 mL of methanol; the solutions were stored at 4°C in the dark for three months maximum. Working standard solutions were prepared in the mobile phase solution by diluting the stock solutions as required and were injected for nano-LC analysis. In order to prevent the influence of the possible degradation of pesticides on the results, the working solutions were prepared daily.

2.2 Instrumentation

Experiments were carried out using the following system purchased from Thermo Separation Products (San Jose, CA, USA): a gradient pump Spectra System P2000, a

SCM 1000 vacuum membrane degasser, and a Spectra Focus UV/VIS detector. The pump and the capillary column were connected to a modified Rheodyne injector. All components were interfaced to a COMPAQ ProLinea 433 computer equipped with a Spectra System Software PC1000 (Operating System OS/2 Warp IBM, version 3.0) (Fremont, California, USA).

Chromatographic separation of the herbicide enantiomers was carried out in a vancomycin-modified silica 5 μm packed capillary column, 43 cm total length (effective length 33 cm) \times 0.075 mm ID, 21 cm length of the packed chiral stationary phase.

2.3 Procedure

2.3.1 Vancomycin immobilization and preparation of packed capillary column

Fused silica capillaries, 75 μm ID \times 375 μm OD, were purchased from Composite Metal Services (Hallow, Worcestershire, UK) and packed in our laboratory with vancomycin-modified silica 5- μm particles. The Van-CSP was synthesized following a previously published method [17].

For the preparation of the packed capillary column, 5 μm LiChrospher[®] 100 RP-18 particles suspended in acetone were packed into the column (about 10 cm) and flushed with water for 30 min. The frit was prepared with a heated wire at about 700°C for 5 s. The excess of stationary phase was eliminated by flushing the column with water. Then the capillary was packed (21 cm) with the vancomycin chiral stationary phase suspended in an acetone-water mixture (1:1, v/v); again 5 μm LiChrospher[®] 100 RP-18 particles were packed (about 10 cm), flushed with water, and the end frit was prepared using the method described above. The excess of stationary phase was eliminated by flushing with water. The capillary column was cut at 43 cm and the outside of the outlet frit was coated with a layer of epoxy resin. The detector window was prepared at a distance of 10 cm from the outlet end of the capillary.

2.3.2 Chromatographic determination of chlorophenoxy acid herbicides

The LC separation of the herbicides was performed using the vancomycin-modified silica packed capillary column at a flow rate of 60 and 120 nL/min. The injected volume of stock solutions was about 60 nL. Isocratic elution was carried out using several mixtures of methanol, water, and ammonium acetate 500 mM pH 4.5 or pH 6.0 buffer. Detection of chromatographic peaks was done at a wavelength of 195 nm. All the experiments for the optimization of separation conditions were carried out using solutions of 50 $\mu\text{g/mL}$ of each studied herbicides in the corresponding mobile phase.

Table 1. Experimental parameters of the enantiomeric separation by nano-LC.

| Mobile phase | 500 mM NH ₄ Ac (pH) | 2% (4.5) | | 2% (4.5) | | 2% (6.0) | | 5% (4.5) | |
|----------------------------|--------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | H ₂ O MeOH | 8% 90% | | 13% 85% | | 13% 85% | | 10% 85% | |
| Flow [nL/min] | 60 | | | | | | | | |
| Dead time [min] (MeOH) | 20.58 | | 20.70 | | 20.11 | | 20.61 | | |
| Retention time [min] | | <i>t</i> _{R1} | <i>t</i> _{R2} |
| | 2,4-DP | 21.30 | 22.81 | 21.95 | 23.90 | 18.90 | 19.49 | 22.68 | 24.51 |
| | MCPPP | 20.80 | 21.73 | 21.50 | 22.72 | 19.12 | | 22.33 | 23.58 |
| | 2,4,5-TP | 21.09 | 21.94 | 21.88 | 23.01 | 19.05 | | 22.79 | 24.06 |
| Selectivity (α) | 2,4-DP | 3.1 | | 2.6 | | – | | 1.9 | |
| | MCPPP | 5.1 | | 2.5 | | – | | 1.7 | |
| | 2,4,5-TP | 2.7 | | 2.0 | | – | | 1.6 | |
| H [μ m] ^{a)} | 2,4-DP | 14.0 | 19.9 | 19.7 | 18.6 | 19.0 | 23.7 | 15.1 | 17.3 |
| | MCPPP | 14.0 | 15.5 | 17.5 | 17.4 | | | 14.0 | 13.6 |
| | 2,4,5-TP | 16.0 | 14.8 | 17.7 | 17.3 | | | 16.1 | 17.0 |

a) Plate height.

Detection and quantitation limits (LOD and LOQ, respectively) were estimated by decreasing the concentration of chlorophenoxy acids down to the smallest observed peak; this concentration was multiplied by three to obtain the detection limit and by ten for the quantitation limit. Quantitation of the herbicides was by external calibration and peak area measurement. Calibration graphs ($n = 5$) under the optimum conditions for the separation were obtained in the range 15–75 μ g/mL for 2,4-DP and 2,4,5-TP and 5–75 μ g/mL for MCPPP. Repeatability of retention time (t_R) was determined for each herbicide at a concentration of 50 μ g/mL.

3 Results and discussion

Vancomycin is a macrocyclic antibiotic containing in its structure 18 asymmetric centers with several functional groups such as hydroxyl, amino, amide, carboxylic, aromatic, etc., responsible for the hydrogen bonds, hydrophobic, and electrostatic stereoselective interactions. It has been demonstrated that vancomycin is a very effective chiral selector with high resolution power for the enantio-recognition of analytes with carboxylic groups in their structure, probably due to the presence of the amine groups [9, 18]. This antibiotic has been used as chiral selector to separate the enantiomers of the herbicides derived from aryloxyphenoxypropionic acid (mecoprop, dichlorprop, and fenoprop) in the free acid form. The chemical structures and pK_a 's of the studied herbicides are shown in **Figure 1**.

In this work, chlorophenoxy acid herbicide enantiomers were studied by nano-LC employing a vancomycin sta-

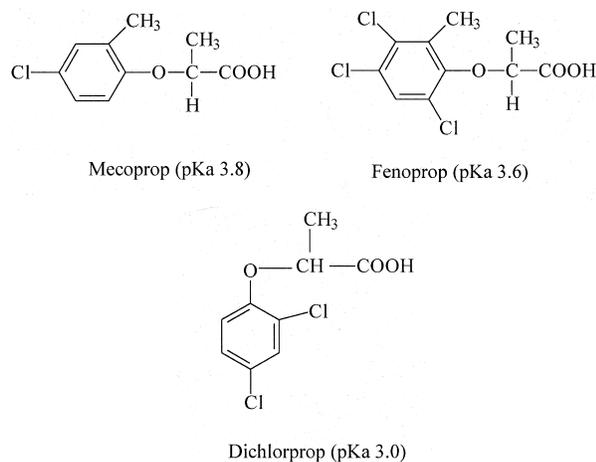


Figure 1. Chemical structures of chiral chlorophenoxy acid herbicides.

tionary phase. Mobile phase composition and flow rate were modified in order to find the optimum experimental conditions.

3.1 Chromatographic separation

Mobile phases containing different ratios of methanol, water, and ammonium acetate 500 mM buffer pH 4.5 were tested for the enantiomeric resolution of each herbicide separately. Preliminary experiments were carried out at a flow rate of 200 μ L/min that was split at about 1/2000 and thus reduced to about 120 nL/min. The flow rate was measured by connecting the end of the capillary column to a microliter syringe through a teflon tube and measuring the flow rate for 15 min. On separate elution of the ana-

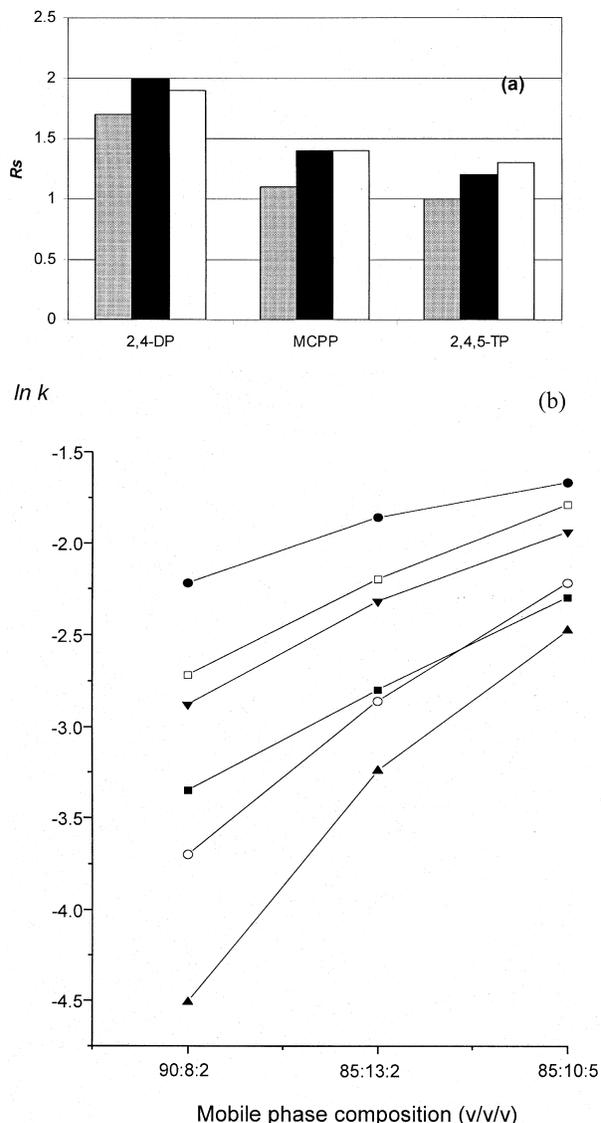


Figure 2. Effect of mobile phase used for separation of chlorophenoxy acid herbicide standard compounds: (a) resolution for each pair of enantiomers. Mobile phase was methanol/water/ammonium acetate 500 mM pH 4.5: grey, 90/8/2 (v/v/v); black, 85/13/2 (v/v/v); white, 85/10/5 (v/v/v). (b) logarithm of retention factor. ■, first enantiomer 2,4-DP; ●, second enantiomer 2,4-DP; ▲, first enantiomer MCP; ▼, second enantiomer MCP; ○, first enantiomer 2,4,5-TP; □, second enantiomer 2,4,5-TP.

lyzed racemic mixtures with mobile phases containing 90 or 95% MeOH/2% buffer and water, the analytes were recorded in less than 12 min; no resolution was observed for any of them.

The flow rate of the mobile phase through the capillary column was decreased to 60 nL min^{-1} in order to improve the enantioresolution. At this flow rate, different mixtures were tested as mobile phase and several experimental parameters such as retention factor (k), peak width, selec-

tivity (α), resolution (R_s), and plate height (H) were calculated. The results obtained are reported in Table 1.

With 2% of ammonium acetate buffer (500 mM, pH 4.5), no significant differences were observed in retention times and peak widths using 90 or 85% of methanol in the mobile phase, but, as can be seen in Figure 2.b, higher resolution (between 1.2 and 2.0) was obtained for all the studied herbicides 85% methanol–2% ammonium acetate 500 mM buffer pH 4.5–13% water as the mobile phase. Under these conditions, the analysis time was about 23 min.

A considerable effect of pH was observed on the enantiomeric separation, especially for mecoprop and fenoprop, when 85% of organic modifier and 2% of 500 mM ammonium acetate pH 6.0 were used in the mobile phase. Only on using such conditions was it possible to achieve the enantiomeric separation of dichlorprop with a resolution factor of 0.7. Phenoxy acid herbicides are ionizable compounds with pK_a 's between 3.0 and 3.8; therefore, a critical parameter for the separation is the pH of the mobile phase. The increase of the pH negatively affected the enantiomeric separation, probably due to the high degree of dissociation of the studied compounds.

On increasing the percentage of ammonium acetate 500 mM buffer pH 4.5 to 5% while keeping the proportion of methanol constant at 85%, good resolution between 1.3 and 1.9 was observed (Figure 2.a), and the efficiency of the separation (H) was improved without considerable increase in the retention times. Figure 2.b shows the variation of $\ln k$ with the increase of the aqueous ratio in the mobile phase. A linear increase of this parameter, typical of a reversed phase interaction, was observed, and the higher retention factors were obtained with a 5% of ammonium acetate buffer.

As a compromise between resolution, capacity factor, efficiency, and enantioselectivity of separation, the best conditions found were 85% methanol–5% ammonium acetate 500 mM buffer pH 4.5–10% water. This isocratic elution allowed the enantiomeric separation of all the herbicides studied in a time of 24 min.

As can be seen in Table 1, a selectivity higher than 1.6 was obtained under the conditions studied. The chromatograms obtained under these optimum conditions for mecoprop, dichlorprop, and fenoprop are shown in Figure 3. As can be observed, dichlorprop, with two chlorine atoms in the molecule, exhibited the highest enantiomeric resolution.

3.2.1 Analytical characteristics of standards

The calibration curves were based on the analysis of herbicide solutions in mobile phase, under optimum conditions. All analytes showed a good linearity in the concen-

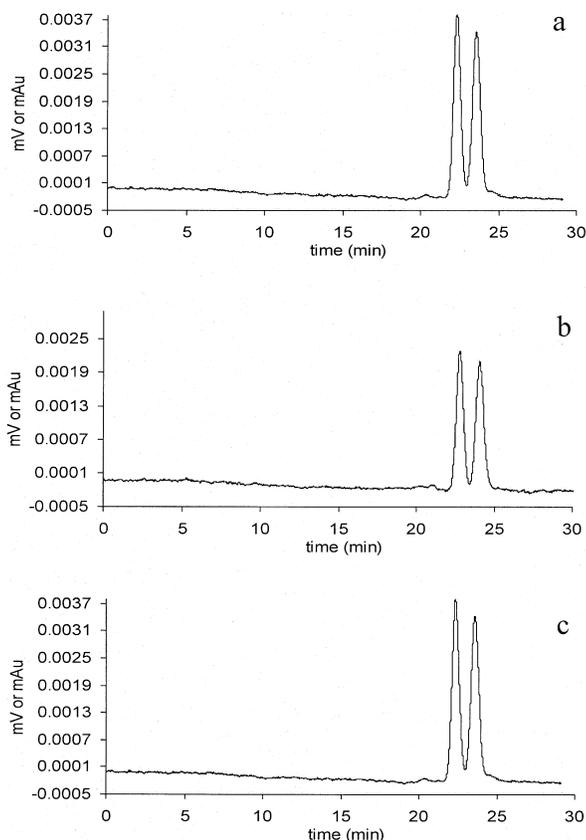


Figure 3. Chromatogram of a standard solution of dichlorprop (a), fenoprop (b), and mecoprop (c), corresponding to a concentration of $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ obtained by nano-LC analysis under the optimum conditions described in Section 2.

Table 2. Analytical characteristics for standards^{a)}.

| Herbicide | LOD ^{b)} [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$] | LOQ ^{c)} [$\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$] |
|-----------|---|---|
| 2,4-DP | 3.5 | 11.6 |
| | 3.6 | 11.9 |
| MCP | 1.4 | 4.5 |
| | 1.4 | 4.7 |
| 2,4,5-TP | 3.3 | 10.9 |
| | 4.2 | 13.8 |

a) Injection time 10 s, flow rate 60 nL/min.

b) Detection limit (signal/noise 3).

c) Quantitation limit (signal/noise 10).

tration range investigated. The correlation coefficients for all the peak area measurements were in the range 0.986–0.998.

Detection and quantitation limits were measured at a wavelength of 195 nm and 232 nm. Higher sensitivity was observed for all the studied herbicides using 195 nm, and detection limits between 1.4 and $4.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ were achieved for all analytes. Detection and quantitation limits are shown in **Table 2**.

The repeatability of the separation method was verified for each herbicide ($n = 5$) under the optimum conditions. Good results were obtained for retention times (RSD%, 0.2 and 0.4 for fenoprop, 0.4 for mecoprop, 0.3 and 0.4 for dichlorprop). As expected, less satisfactory results were achieved for peak area, viz. 10%, 6%, and 20% for fenoprop, mecoprop, and dichlorprop, respectively. The inter-day repeatability for retention time ($n = 3$) was in the range of 0.1–0.2%.

4 Concluding remarks

The results achieved in this study show that nano-liquid chromatography with UV detection at 195 nm can be used for the enantiomeric separation of the herbicides mecoprop, fenoprop, and dichlorprop, by employing a capillary column of $75 \mu\text{m}$ ID packed with vancomycin-modified silica. Good resolution was obtained with a mixture of 85% methanol–5% ammonium acetate 500 mM buffer pH 4.5–water as mobile phase. The procedure developed provides high repeatability and, compared with conventional HPLC, requires lower volumes of both sample and mobile phase.

From our results it was shown that vancomycin exhibited great potential as chiral selector for chlorophenoxy acid herbicides and it can be supposed that chlorine atoms in their structure have an important influence on the vancomycin-analyte interaction. The proposed method can probably be applied to the analysis of commercial samples containing herbicides. Further work will be done in order to increase the sensitivity of the nano-LC method, investigating the focusing pre-concentration and coupling the nano-scale instrument to the mass spectrometer.

Acknowledgements

The authors wish to thank to Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Dirección General de Investigación, project BQU-2003-00667) and Instituto di Metodologie Chimiche del Consiglio Nazionale delle Ricerche (Roma) for financial support. Noelia Rosales wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship and, especially, Dr. Salvatore Fanali (Institute of Chemical Methodologies) for the stay in his Research Unit.

References

- [1] A. Williams, *Pestic. Sci.* **1996**, *46*, 3–9.
- [2] R. Renner, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, *34*, 9A–10A.
- [3] L.A. Spangler, M. Mikalojczyk, E.L. Burdge, P. Kielbasinski, H.C. Smith, P. Lyzwa, J.D. Fisher, J. Omelanczuk, *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 318–321.
- [4] B. Blessington, N. Crab, J. O'Sullivan, *J. Chromatogr.* **1987**, *396*, 177–195.
- [5] J.M. Schneiderheinze, D.W. Armstrong, A. Berthod, *Chirality* **1996**, *11*, 330–337.

- [6] Y. Mechref, Z. El Rassi, *J. Chromatogr. A* **1997**, *757*, 263–273.
- [7] O. Zerbini, F. Trotta, C. Giovannoli, *J. Chromatogr. A* **2000**, *875*, 423–430.
- [8] C. Desiderio, C.M. Polcaro, P. Padiglioni, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* **1997**, *781*, 503–513.
- [9] C. Desiderio, S. Fanali, *J. Chromatogr. A* **1998**, *807*, 37–56.
- [10] B. Blessington, B. Crabb, *J. Chromatogr.* **1988**, *454*, 450–454.
- [11] B. Blessington, *J. Chromatogr.* **1987**, *396*, 177–182.
- [12] P. Padiglioni, C.M. Polcaro, S. Marchese, M. Sinibaldi, M. Flieger, *J. Chromatogr. A* **1996**, *756*, 119–127.
- [13] K.-E. Karlsson, M. Novotny, *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 1662–1665.
- [14] W. Liu, H.K. Lee, *Talanta* **1998**, *45*, 631–639.
- [15] A. Cappiello, F. Bruner, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 1281–1287.
- [16] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, *J. Chromatogr. A* **1997**, *779*, 1–28.
- [17] C. Desiderio, Z. Aturki, S. Fanali, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 535–543.
- [18] D.W. Armstrong, U.B. Nair, *Electrophoresis* **1997**, *18*, 2331–2442.

ANEXO III

Short communication

Capillary liquid chromatography of chlorophenoxy acid herbicides and their esters in apple juice samples after preconcentration on a cation exchanger based on polydivinylbenzene-*N*-vinylpyrrolidone

N. Rosales-Conrado, M.E. León-González*, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez

Departamento Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Ciudad Universitaria s/n, E-28040 Madrid, Spain

Received 27 December 2004; received in revised form 7 March 2005; accepted 12 April 2005

Abstract

A capillary liquid chromatography (cLC) method with gradient elution has been used to determine chlorophenoxy acid herbicides: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid, 2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid, 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid, 4-(2,4-dichlorophenoxy)butanoic acid, 4-(4-chloro-2-methylphenoxy)butanoic acid, 2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propanoic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic-1-methyl ester and 2,4-dichlorophenoxyacetic-1-butyl ester in spiked apple juice samples with amounts between 0.025 and 0.150 mg kg⁻¹ of each herbicide. Clean-up and preconcentration of acid and esters were carried out in an Oasis MCX polymer. Detection limits obtained by cLC, between 0.005 and 0.018 mg kg⁻¹, allowed the determination of chlorophenoxy acids and their esters in apple juice samples around the levels permitted by the European Regulations, with recoveries in the range 84–99% and RSDs between 1 and 4%.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Chlorophenoxy acid herbicides; Capillary high performance liquid chromatography; Apple juice; Solid phase extraction; Cation exchanger polymer

1. Introduction

Chlorophenoxy acid herbicide formulations, alkyl esters and free carboxylic acids, are widely applied to get rid of unwanted plants. Due to their toxicity, which depends on their chemical form, the European Community has established legal directives to restrict the use and to control their maximum residue levels in several matrices [1].

A number of papers have reported multi-residue methods for the determination of phenoxy acid herbicides in various matrices. High-performance liquid chromatography (HPLC) methods are generally preferred over gas chromatography (GC) ones [2,3], because HPLC can be used without derivatization. Among all the detection techniques, ultraviolet detection (UV) continues to be the most common one [4–8]. Moreover, HPLC allows the simultane-

ous determination of herbicides in acid and ester forms, which is an important advantage because herbicides in ester form are more hazardous than their acid forms [9].

The scale down of analytical liquid chromatography methods from conventional size LC columns (3.0–4.6 mm I.D.) to capillary columns of 0.15–0.30 mm I.D. promises several advantages, such as significant reduction in the consumption and disposal of solvents. The lack of sensitivity due to the small injection volumes required can be overcome by using larger injection volumes of samples in low elution strength solutions [9–15].

Regarding to clean-up and sample preconcentration, the recently introduced macroporous copolymer poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) can be suitable to preconcentrate these analytes which included quite strong acids and low polarity esters. It has been used for the solid phase extraction of phenoxy acids and other herbicides from water samples [16]. This polymeric sorbent exhibits both

* Corresponding author. Tel.: +34 913944196; fax: +34 913944329.
E-mail address: leongon@quim.ucm.es (M.E. León-González).

hydrophilic and lipophilic retention characteristics, remains wetted by water.

The aims of the present study are to explore the determination of phenoxy acid herbicides in acid and ester form by cLC and to assess the capability of commercial cartridges packed with poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) macroporous copolymer and functionalized with sulfonic acid groups for their SPE from apple juice samples.

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

All reagents and solvents were of analytical reagent grade. HPLC grade methanol and acetonitrile were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain), and purified water was obtained from a Milli-Q system from Millipore (Bedford, MA, USA). Pesticides were of a purity between 95 and 99%. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2-(2,4,5-trichlorophenoxy)propanoic acid (2,4,5-TP), 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid (MCPA) were supplied by Aldrich; 2-(2,4-dichlorophenoxy)propanoic acid (2,4-DP), 2,4-D-1-methyl ester, 4-(2,4-dichlorophenoxy)butanoic acid (2,4-DB) were from Sigma and finally 2-(4-chloro-2-methylphenoxy)propanoic acid (MCP), 4-(4-chloro-2-methylphenoxy)butanoic acid (MCPB) and 2,4-D-1-butyl ester were supplied by Riedel-de-Häen.

Stock solutions were prepared by dissolving 20 mg of each herbicide in 100 mL of methanol. These solutions were stored at 4 °C in the dark for 3 months maximum. Working standard solutions were prepared in methanol by diluting the stock solutions as required. In order to prevent the influence of the possible degradation of pesticides on the results, the working solutions were prepared daily.

2.2. SPE and filtration materials

Solid phase extraction was carried out with Oasis MCX cartridges ([poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone)] functionalized with sulfonic acid groups) (60 mg–3 mL, 30–60 μm particle size, 0.80–1.20 mequiv./g, 7.3–8.9 nm pore size), supplied by Waters (Milford, MA, USA) Material for sample filtering was Osmonics polyester membranes (2.0 μm pore size) from Scharlab (Barcelona, Spain).

2.3. Instrumentation

The SPE procedure was carried out by means of a vacuum manifold supplied by Varian (Harbor City, CA, USA) and connected to a Selecta membrane vacuum pump (Selecta, Barcelona). Simultaneous extraction of twenty samples can be performed.

The cLC system used was an Agilent Model 1100 Series (Agilent Technologies, Spain), which was equipped with

a solvent delivery system composed of a binary capillary pump G1376 A and a degasser G1379 A, a Beckman UV detector with programmable variable wavelength 166 Detector System Gold, and a microcell (35 nL, 8.0 mm path-length) (Beckman, Fullerton, CA, USA). An analytical Column packed with 3 μm Hypersil C₁₈ BDS 150 mm × 0.3 mm I.D. (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) was employed for the analyses. All components were interfaced to a Dell computer equipped with a MMX Pentium Processor and Gold Nouveau Chromatography Workstation Software (version 1.6) for Windows (Beckman).

2.4. Procedure

2.4.1. SPE preconcentration

The Oasis MCX cartridge was conditioned with 1.5 mL of methanol to solvate the functional groups of the sorbent, and further with 1.5 mL of purified water. Once the conditioning step had ended, the evaluation of the SPE sorbent to retain the phenoxy acid herbicides was made by passing through the cartridge 25 mL of an aqueous solution containing a mixture of 1.5 μg of 2,4-D-1-butyl ester and 0.3 μg of all the other analytes, at a flow rate of 2 mL min⁻¹. For the retention step, pH was adjusted below 2 by addition of few drops of concentrated H₂SO₄. After loading, elution was accomplished with 1.5 mL of 0.8% phosphoric acid in methanol. The eluate was diluted to 10 mL with purified water to decrease its solvent strength for focusing purposes.

2.4.2. Chromatographic determination of chlorophenoxy acids

A total volume of 20 μL of both standard and samples solutions containing only 15% of methanol for focusing purposes was injected into the LC system and determined under selected chromatographic conditions. Separation of the herbicides was performed using the C₁₈ analytical column at a flow rate of 8 μL min⁻¹. For gradient elution, the aqueous component of the mobile phase was 0.8% H₃PO₄ and the organic one was methanol. The following multistep gradient was employed: 40:60 (v/v) methanol:0.8% H₃PO₄ aqueous solution for 25 min, then a linear increase to 70% methanol for another 15 min, and a final isocratic mode at 70% methanol till the end of the chromatogram. This gradient allows the separation in 55 min. UV detection was at 232 nm for all the herbicides with the exception of 2,4-D-1-butyl ester, which was detected at a wavelength of 283 nm.

2.4.3. Preparation of apple juice samples

Six grams of commercial apple juice samples were spiked with the target analytes in a concentration range between 0.025 and 0.150 mg kg⁻¹; then they were left to stabilize for 20–30 min and were diluted to 20 mL with purified water. The resulting solution was adjusted to pH 1 with concentrated H₂SO₄ and filtered through a polyester membrane. The filtered residue was carefully washed three times with 5 mL of pH 1 aqueous solution each, and the resulting final

solutions (around 50 mL) were then percolated through the preconditioned SPE cartridge at 2 mL min^{-1} . A washing step was carried out as follows: 2 mL of the pH 1 aqueous solution, then 2 mL of the 50% methanol aqueous solution, and finally 2 mL of an aqueous solution containing 15% methanol and 0.8% phosphoric acid. The pesticides were eluted with 1.5 mL of methanol containing 0.8% phosphoric acid and diluted to 10 mL for focusing purposes with purified water before the chromatographic analysis by cLC.

3. Results and discussion

3.1. Solid phase extraction of standards

Chlorophenoxy acid herbicides are ionizable compounds (pK_a values 2.7–4.8) that exist in the ionic state at most environmental pH values. Retention on the copolymer sorbent was studied at pH values between 0–2. In this range, the analytes showed recoveries between 80 and 100%. At pH 0, 2,4-D yielded recoveries around 140%, whereas its butyl and methyl esters yielded around 35 and 55%, respectively. This fact was attributed to the hydrolysis of the herbicides in the ester form at strongly acidic media. As a compromise between high recoveries and slow hydrolysis reaction of the esters, pH 1 was the optimum for the retention procedure. At this pH, all phenoxy acid herbicides are neutral molecules and presumably the predominant retention mode is exclusively based on a reversed-phase mechanism [17].

The elution of the retained herbicides at pH 1 was accomplished with 1.5 mL of methanol–60 mM HCl, acetonitrile–60 mM HCl and methanol–0.8% phosphoric acid. As can be observed in Fig. 1, when the elution was made with 60 mM HCl in acetonitrile, low recoveries were obtained for some of them, especially for 2,4-D-1-butyl ester. By using 60 mM HCl in methanol, better recoveries were observed, but only 0.8% phosphoric acid in methanol allowed to achieve recoveries higher than 90% for 2,4-D and their esters. When the elution was made with 2 mL of this solvent, significant differences in the recoveries were found for 2,4-DP only.

With the aim to establish the maximum aqueous volume that can be percolated through the Oasis MCX sorbent, volumes between 25 and 1000 mL containing $1.5 \mu\text{g}$ of 2,4-D-1-butyl ester and $0.3 \mu\text{g}$ of all the other herbicides were passed through the cartridges. Breakthrough volumes found were around 700 mL for MCPA, MCPB and 2,4-D-1-methyl ester, and 600 mL for 2,4-DB. For the other herbicides, breakthrough volumes were higher than 1000 mL. This data shows the very strong retention of all the studied compounds.

3.2. Determination of chlorophenoxy acid herbicide residues in apple juice samples

The ability of the Oasis MCX cartridge for extraction and preconcentration of phenoxy acid herbicides and their esters

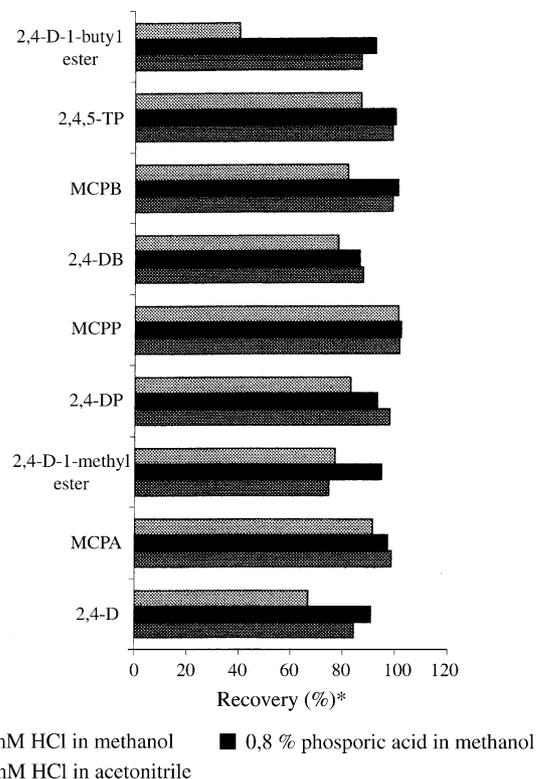


Fig. 1. Influence of solvent on the elution process. (*) Mean of three determinations, volume of solvent 1.5 mL.

was firstly evaluated by passing 6 g of un-spiked and spiked apple juice samples at the levels established by the Spanish and European regulations (0.10 mg kg^{-1} for 2,4-D and MCPA, and 0.05 mg kg^{-1} for all the other herbicides) [1]. In order to avoid clogging of the cartridges, a previous filtration step of the spiked sample was necessary. When nylon, cellulose ester and MicronSep cellulosic membranes were employed, considerable losses of some of herbicides were observed and the recoveries achieved were between 9 and 70%. On the contrary, polyester membranes, showed negligible retention, and a matrix clean-up effect, and thus, this was used for sample filtering. Several amounts of samples were tested in the range between 6 and 10 g in order to achieve the lower limits required and finally, 6 g of apple juice were chosen as suitable sample size. To minimize the effect of co-extracted organic matter, several washing sequences with 2 mL of aqueous solutions containing different ratios of methanol, ammonium hydroxide solution and phosphoric acid were tested. The best results were achieved by the procedure described in Section 2.4.3, allowing to obtain acceptable recoveries for all the studied herbicides.

Analytical characteristics such as detection limits (LODs) and linearity range expressed as mg kg^{-1} were determined in the extracts of 6 g of apple juice. Calibration plots were obtained by preconcentration of free herbicide apple juice samples. The extracts were spiked with increasing amounts of the pesticides assuming that solution volume remained constant after each herbicide addition. The analytical characteristics

Table 1
Analytical characteristics and recoveries of chlorophenoxy acid herbicides added to apple juice samples

| Herbicide | LOD (mg kg ⁻¹) | Linearity range ^a (mg kg ⁻¹) | Added ^b (mg kg ⁻¹) | Recovery (%) ± RSD (%) ^c |
|----------------------|----------------------------|---|---|-------------------------------------|
| 2,4-D | 0.007 | 0.03–0.17 | 0.050–0.150 | 94 ± 3 |
| MCPA | 0.010 | | 0.050–0.150 | 93 ± 2 |
| 2,4-D-1-methyl ester | 0.010 | | 0.050–0.150 | 98 ± 2 |
| 2,4-DP | 0.010 | 0.02–0.12 | 0.025–0.100 | 84 ± 4 |
| MCPP | 0.010 | | 0.025–0.100 | 86 ± 2 |
| 2,4-DB | 0.005 | | 0.025–0.100 | 84 ± 3 |
| MCPB | 0.005 | | 0.025–0.100 | 99 ± 1 |
| 2,4,5-TP | 0.005 | | 0.025–0.100 | 85 ± 4 |
| 2,4-D-1-butyl ester | 0.018 | 0.07–0.17 | 0.075–0.150 | 84 ± 2 |

6 g of apple juice. Injected volume 20 µL.

^a Five determinations.

^b Three levels spiked at five determinations for each level.

^c *n* = 15.

achieved can be observed in Table 1. All analytes showed good linearity in the concentration range investigated, and the correlation coefficients for all the peak area measurements were in the range 0.992–0.999. Regarding LODs, cLC with large injection volumes and focusing solutions provided suitable sensitivity for all the herbicides, even taking into account the dilution needed after SPE to obtain this focusing solution, which contains 85% of water.

To evaluate the applicability of the proposed method, apple juice samples were spiked at various levels, one at the maximum level allowed, another one above it and a third one below it. Since most of the analytical methods involve a previous hydrolysis step, the European and Spanish regulations established limits for these herbicides expressed as their acid forms in vegetable samples; therefore, we have taken the same limits for the ester forms. As can be seen in Table 1,

acceptable recoveries between 84 and 99% with RSD in the range 1–4%, were obtained. Similar recoveries for the three studied spiking levels were found for MCPA, 2,4-D-1-methyl ester, MCPP, MCPB, 2,4,5-TP and 2,4-D-1-butyl ester. In the case of 2,4-DP and 2,4-DB, a considerable decrease in the recovery was observed at the lower spiking level. Fig. 2 shows the cLC chromatogram obtained from a standard solution of chlorophenoxy acid herbicides and for an apple juice sample with and without spiked herbicides at the maximum level allowed.

4. Conclusions

Solid phase extraction on poly(divinylbenzene-co-*N*-vinylpyrrolidone) copolymer combined with cLC allows the determination of residues of chlorophenoxy acid and ester herbicides in commercial apple juice samples spiked at levels around the maximum ones permitted by the European regulations, with recoveries between 84 and 99% and reproducibilities between 1 and 4%. The cLC method has provided good LODs in a complex matrix such as apple juice, in addition it involves a lower consumption of hazardous organic solvents and produces fewer residues.

Acknowledgements

Authors wish to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Dirección General de Investigación) for financial support (project BQU-2003-00667). N.R.-C. wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship.

References

- [1] Ministerio de la Presidencia, R.D. 280/1994. Productos vegetales Límites Máximos y control de los residuos de plaguicidas B.O.E. No. 58, 2004 (1994). (Transposition of the Directives of the European Council numbers 90/642/CEE; 93/57/CEE; 93/58/CEE and 79/700/CEE).

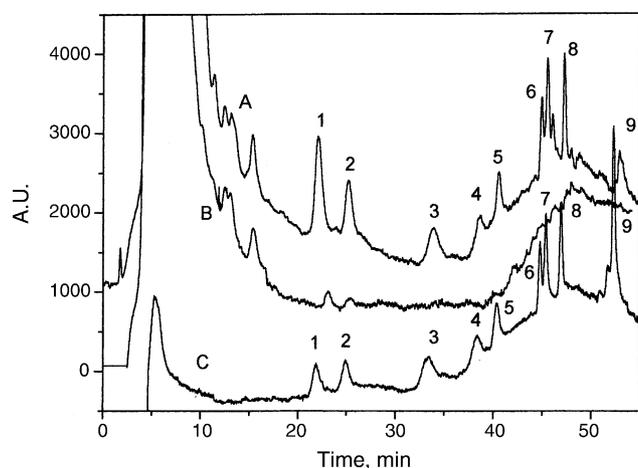


Fig. 2. Chromatograms obtained by cLC under the optimum conditions described in Section 2. (A) Apple juice spiked at the level permitted by regulations (0.10 mg kg⁻¹ for 2,4-D and MCPA, and 0.05 mg kg⁻¹ for all the other herbicides); (B) apple juice without spiked chlorophenoxy acids, (C) standard solution corresponding to concentrations of 300 µg L⁻¹ for 2,4-D-1-butyl ester and 30 µg L⁻¹ for all the other herbicides. (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) 2,4-D-1-methyl ester; (4) 2,4-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB; (7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) 2,4-D-1-butyl ester.

- [2] T. Cserhádi, E. Forgács, J. Chromatogr. B 717 (1998) 157.
- [3] J.L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R.A. Pérez, M.D. Fernández, J. Chromatogr. A 882 (2000) 175.
- [4] L.E. Vera-Ávila, P.C. Padilla, M.G. Hernández, J.L. Meraz, J. Chromatogr. A 731 (1996) 115.
- [5] E.A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbugge, J. Chromatogr. A 938 (2001) 23.
- [6] R.B. Geerdink, S. van Tol-Wildenburg, W.M.A. Niessen, U.A.Th. Brinkman, Analyst 122 (1997) 889.
- [7] J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro, J. Chromatogr. A 959 (2002) 25.
- [8] L. Zhu, K.H. Ee, L. Zhao, H.K. Lee, J. Chromatogr. A 963 (2002) 335.
- [9] T. Heberer, S. Butz, H.J. Stan, J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern. 77 (1994) 1587.
- [10] G. Nilve, C. Andersson, J.A. Jönsson, J. Chromatogr. A 708 (1997) 215.
- [11] A. Capiello, G. Famiglini, A. Berloni, J. Chromatogr. A 768 (1997) 215.
- [12] Y. Gou, J. Pawliszyn, Anal. Chem. 72 (2000) 2774.
- [13] P. Molander, A. Tomasen, L. Kristoffersen, T. Greibrokk, E. Lundanes, J. Chromatogr. B 766 (2001) 77.
- [14] N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, Anal. Chim. Acta 470 (2002) 147.
- [15] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, C. Panis, M.P. San Andrés, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 29.
- [16] M. Peruzzi, G. Bartolucci, F. Cicni, J. Chromatogr. A 867 (2000) 169.
- [17] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, J. Chromatogr. A 902 (2000) 3.

ANEXO IV

Effect of temperature on the separation of chlorophenoxy acids and carbamates by capillary high-performance liquid chromatography and UV (or diode array) detection

N. Rosales-Conrado, M.E. León-González*, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Available online 26 January 2005

Abstract

In this work, the effect of temperature in isothermal and programmed modes on several chromatographic parameters such as retention factor, selectivity, resolution and plate number has been discussed. A critical comparison of isocratic/isothermal, gradient/isothermal and isocratic/program temperature modes has been made. Two representative families of pesticides have been selected for this study. One includes ionisable chlorophenoxy acids and two of their esters, some of which show similar polarities. The other one contains several weakly polar carbamates. Analysis was carried out using a reversed-phase capillary high-performance liquid chromatography (HPLC) system and focusing technique with UV or diode array detection (DAD).

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Temperature effects; Programmed temperature; Chlorophenoxy acids; Carbamates; Pesticides

1. Introduction

In the last few decades, application of pesticides on agricultural crops for pest control has progressively increased, and their residues are present in quite different matrices. Thus, analysis of pesticide residues at the levels established by legal directives continues to be important in the field of method development. Usual procedures for separation and quantitation of pesticides involve chromatographic techniques. For carbamates [1,2] and chlorophenoxy acid residues [3], the use of GC is limited because of their thermolability, polar nature and/or low volatility, while liquid chromatography (LC) techniques can be used without derivatisation and a wide variety of reversed-phase LC methods have been proposed.

The use of LC packed capillary columns with inner diameters between 100 and 350 μm and sorbent packing particles with diameter ranging from 3 to 10 μm has received special attention during recent years to improve chromatographic

separations. Packed capillary columns exhibit properties of both packed and open tubular columns [4]. Compared to conventional LC [5,6], packed capillary LC increases the sensitivity because it reduces chromatographic dilution, requires lower sample volumes and reduces both the amount of stationary phase and the consumption of mobile phase. Main disadvantages of capillary columns include the loss of sensitivity due to the small volumes or masses required [7] and difficulties to control gradient elution at the required flow rates. These problems could be overcome by the use of the so-called on-column focusing modes by injections of larger sample volumes, and by elution with temperature programs. In fact, the small inner diameter of capillary columns allows the use of temperature programs without previous heating of the solvents, giving rapid response to temperature changes due to favourable geometry, minimised radial temperature gradients and relatively low heat capacity [3,4,8,9]. In conventional high-performance liquid chromatography (HPLC), column temperature has been adjusted to optimise resolution with many samples [10]; temperature controls both retention (k) and resolution (R_s), and also it affects intrinsically many parameters of the chromatographic systems, such as

* Corresponding author. Tel.: +34 913944196; fax: +34 913944329.
E-mail address: leongon@quim.ucm.es (M.E. León-González).

pK_a values of both sample and buffer [11]. Temperature increases the analyte diffusion and decreases the viscosity of mobile phase; consequently, the lower backpressure allows higher flow rates, the use of stationary phases with smaller particles sizes for increased efficiency [12] or longer columns containing higher plate numbers [13]. The increased mass transfer rate between mobile and stationary phases, usually resulting in narrow peaks and improved column efficiency.

In the last few years, the development of more stable stationary phases has allowed the use of higher temperature in LC, and actually, temperature programs combined with packed capillary columns seems to be a feasible alternative to commonly used gradient elution [14,15]. Moreover, from an instrumental point of view, thermal gradients are easier to engineer than gradient elution for small diameter columns, and require less maintenance [16]. In addition, the effects observed by changes in temperature or mobile phase can be complementary and more or less orthogonal to each other [10], and often it is possible combine changes on temperature and solvent strength. Temperature programs offer several advantages with some detectors such as MS and NMR [13]. Separations based on temperature programs have been used with capillary columns to analyse phenols [9], chlorobenzenes [11], β -lactoglobulins [17] and high-molecular weight hindered amine light stabilisers [18]. Using on column focusing with a low eluting strength and temperature program, several compounds such as chlorophenoxy acids [3], retinoids [4], triazines [8], antidepressants [14] and isocyanates derivatives [19] have been successfully separated.

Although temperature program with capillary columns in LC has been found to be a promising alternative to gradient elution, it has been scarcely investigated by research groups; hence, it continues to be essential for the development of separation methods, especially in combination with on-column focusing modes. Consequently, the aim of the present study is to explore the influence of temperature on reversed-phase separations when capillary columns are employed, by comparison on the retention of ionised and non-ionised solutes (Fig. 1). We use the on-column focusing technique that we have successfully employed for the determination of acid herbicides [3] and carbamate pesticides [20].

2. Experimental

2.1. Materials and reagents

Acetonitrile and methanol of HPLC quality were supplied by Scharlab (Barcelona, Spain). Analytical grade sodium acetate was obtained from Probus (Badalona, Spain), phosphoric acid (85% pure) and hydrochloric acid (35% pure) were purchased from Panreac (Barcelona, Spain). Deionised water from a Milli-Q system was used in all procedures (Millipore, Bedford, MA, USA).

Pesticides included in the study were of the following purity: 2,4-D (99%), 2,4,5-TP (97%) and MCPA (95%)

provided by Aldrich; 2,4-DP (95%), 2,4-D-1-methyl ester (97%) and 2,4-DB (97%) from Sigma; MCPP (99%), MCPB (99%), 2,4-D-1-butyl ester (98.3%) and carbaryl (99.7%) from Riedel-de Haen. Aminocarb (98%), propoxur (99%), carbofuran (99%) and methiocarb (98.5%) purchased from Chem Service.

Names, structural formulas, pK_a values and $\log K_{o/w}$ [21] of chlorophenoxy acid herbicides and carbamate pesticides are shown in Fig. 1.

2.2. Preparation of standard solutions

Stock solutions of chlorophenoxy acid herbicides were prepared by dissolving 20 mg of each herbicide in 100 mL of methanol, while those of carbamates were prepared by dissolving 10 mg of each one in 10 mL of acetonitrile and then diluting to 50 mL with purified water. These one stock solutions were stored in the dark at 4 °C for 2 months maximum. Standard mixtures of pesticides for focusing purposes were prepared by diluting the stock solutions in an aqueous solution containing 10% of methanol. In order to prevent the influence of the possible analyte degradation on the results, the standard solutions were prepared daily.

2.3. Packed capillary LC instrumentation

The capillary LC system used for the separation of chlorophenoxy acid herbicides by isocratic elution at constant or programmed temperature consisted of a Beckman 125 S Solvent Module System Gold (Beckman, Fullerton, CA, USA) pump, and a Beckman UV programmable variable wavelength 166 Detector System Gold with a microcell (35 nL, 8 mm pathlength). The components were interfaced to a Dell computer equipped with a MMX Pentium processor and a Gold Nouveau Chromatography Workstation Software (version 1.6) for Windows (Beckman). Mobile phase was continuously degassed with helium.

The micro (μ) HPLC instrument used for the separation of chlorophenoxy acids by gradient elution under isothermal conditions, and carbamates by isocratic elution with constant or programmed temperature was an Agilent Model 1100 Series (Agilent Technologies, Spain), which was equipped with a solvent delivery system composed of a binary capillary pump G1376 A, a degasser G1379 A and a diode array detector G1315B with a 500-nL flow cell (10 mm pathlength), coupled with a HP computer containing a Pentium 4 processor, an Agilent Chemstation Software for LC systems G2170AA and a spectral evaluation module G2180AA for Microsoft Windows XP Professional operating system.

In all cases, injections were performed with a Rheodyne injection valve (Beckman, Fullerton, CA, USA) with a stainless steel external loop of 20 μ L, and temperature programs were achieved with a MISTRAL programmable oven (Spark-Holland, Emmem, The Netherlands). Separations of pesticides were carried out on a 15 cm \times 300 μ m i.d. LC Packings

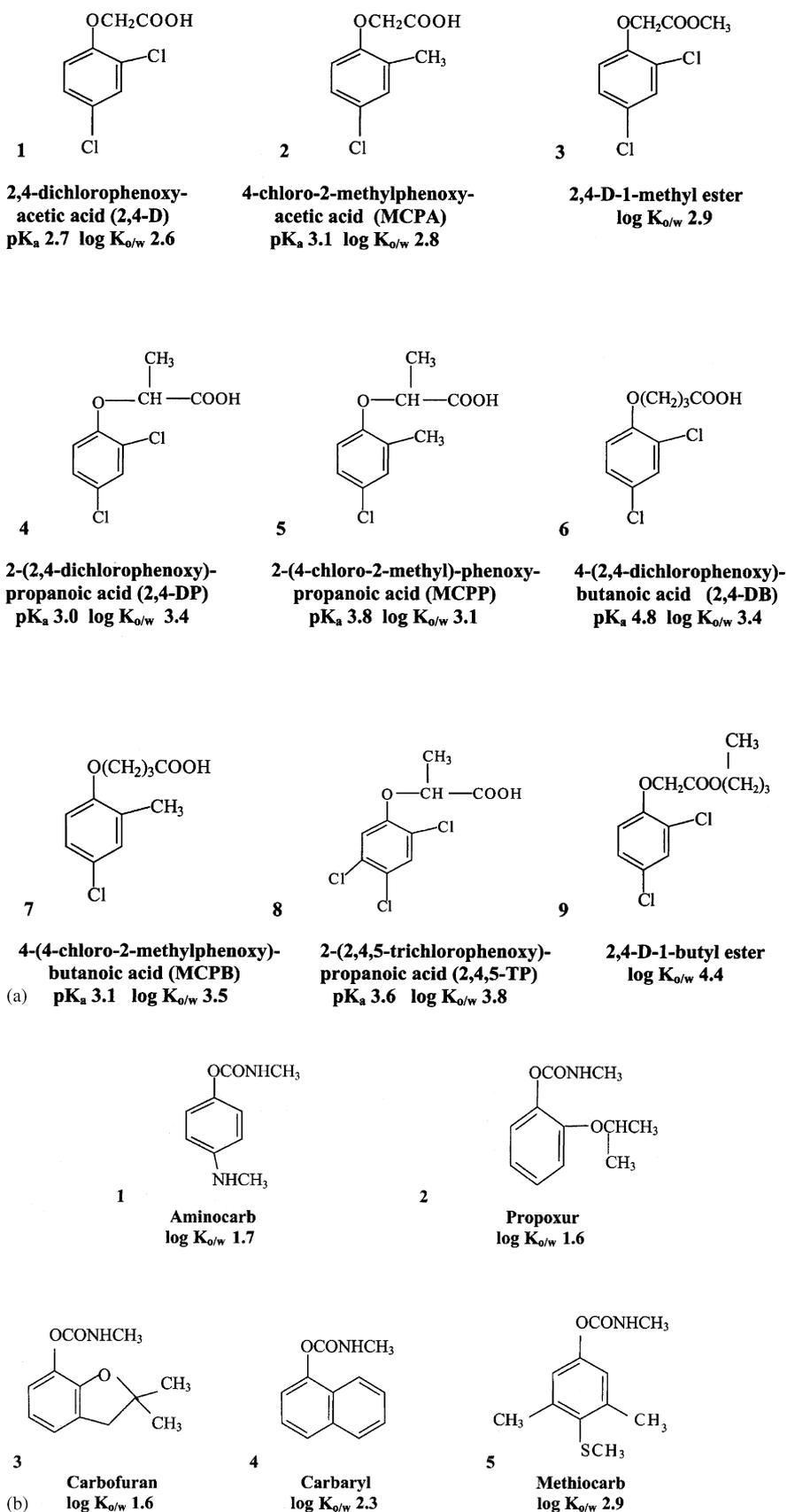


Fig. 1. Names, structural formulas, pK_a values and partition coefficient between *n*-octanol and water ($K_{o/w}$, as the log value) of chlorophenoxy acid (a) and carbamate (b) pesticides.

Analytical Column packed with 3 μm Hypersil C₁₈ BDS (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands).

2.4. Chromatographic conditions

Different chromatographic conditions were used for carbamate and chlorophenoxy acids analysis. The mobile phase flow rate through the column was 8 $\mu\text{L min}^{-1}$ for chlorophenoxy acids separation and 8 or 10 $\mu\text{L min}^{-1}$ for carbamate mixtures. Injections of pesticides were performed at an initial temperature column of 20 °C in a low eluting strength solution (10% methanol) for focusing purposes.

Isocratic elution of chlorophenoxy acid herbicides was carried out with a mixture of methanol–0.8% aqueous phosphoric acid solution (45:55) as mobile phase. For separations under isothermal conditions, temperature column was maintained at 20, 40, 50 and 65 °C. Gradient elution was made by a mobile phase composition methanol–0.8% aqueous phosphoric acid (40:60) solution for 25 min, then a linear increase to 70% methanol over 15 min and final isocratic step till the end of the chromatogram. The optimum conditions found for the separation with programmed temperature were: an initial step at 20 °C during 25 min, then a linear increase to 30 °C in 10 min, another linear increase to 65 °C in 7 min, and finally, an isothermal step at 65 °C till the end of the chromatogram.

Regarding to carbamate pesticides, separation was made in isocratic elution mode using acetonitrile—acetic acid/sodium acetate 20 mM pH 5.5 buffer (30:70) as mobile phase. Isothermal separations were carried out at 20, 30, 40 and 50 °C. For separation by temperature program, an isothermal step at the initial temperature for 7 min was made, following by a linear increase to 50 °C for 5 min, then another isothermal step at 50 °C for 5 min, and finally, return to the initial temperature in a time of 5 min.

Wavelength for UV detection or diode array detection (DAD) was fixed at 232 nm for chlorophenoxy acids and at 220 nm for carbamates.

3. Results and discussion

Advantages and disadvantages of employing temperature programs are discussed by comparing separations achieved by the isothermal mode with those achieved by the gradient elution mode. Experimental parameters such as peak width ($w_{1/2}$), resolution, retention factor and column efficiency (N) have been measured in all tested conditions. To decide about optimum separation, a compromise based on the reasonable analysis time, narrow peaks and acceptable resolution was taken.

First, isocratic elution conditions were established. Several mixtures of acetonitrile or methanol–water were tested. For chlorophenoxy acid herbicides separation, only mixtures of methanol–water with methanol ratios between 45 and 50% allowed good resolution. The best conditions found are shown in Section 2. On the contrary, mixtures of acetonitrile–water

provided better results for carbamates separation. Ratios of acetonitrile were studied in the range of 27–30%. Selected conditions are described in Section 2.4.

3.1. Temperature behaviour

The influence of temperature on the retention is given by the well known Van't Hoff equation:

$$\ln k = \frac{-\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} + \ln \beta$$

where ΔH is the standard enthalpy change due to the transfer of the solute between stationary and mobile phase, ΔS is the entropy change, R is the thermodynamic molar gas constant and T is the absolute temperature. The phase ratio of the column, β , was not considered for discussion because the same column was used in all the experiments. In reversed-phase HPLC, a column temperature increase usually leads to a decrease in retention times and higher column efficiencies.

In the working temperature ranges, not degradation symptoms were observed for both chlorophenoxy acid and carbamate pesticides.

Graphs of the logarithm of the retention factor versus the inverse of temperature are shown in Fig. 2. As can be seen in Fig. 2a, the Van't Hoff plots for all chlorophenoxy acid herbicides fit into a linear curve (R^2 0.960–0.988), indicating that the retention mechanism does not change throughout the whole temperature interval. The slope is positive but different for each herbicide. This fact suggests a negative change in enthalpy and, therefore, an enthalpically favourable transfer from mobile to stationary phase. For the same temperature change, solutes with higher ΔH will be more strongly affected. Solute with small ΔH changes will not suffer significant variation in the retention factor when temperature is modified. Retention factors less affected by temperature are those of the more strongly retained compounds. This is the case of 2,4-D-1-butyl ester.

Van't Hoff plots for carbamate pesticides can be observed in Fig. 2b. A linear behaviour (R^2 0.970–0.994) and a positive slope were also obtained for all of them with the exception of aminocarb, again indicating a negative enthalpy change and thus an exothermic transfer to the stationary phase. As can be observed in this graph, the slope of the critical pair propoxur–carbofuran is similar. For aminocarb, the retention factor remains virtually constant during the studied temperature interval, thus it was not affected by temperature changes up to 50 °C, while methiocarb was the most significantly affected by temperature.

For all the studied pesticides, differences in slopes allows exploring the use of temperature changes to control resolution and to estimate the ranges that might be useful for temperature programming. The convenience of isothermic steps, especially at higher temperatures, is also apparent from these Van't Hoff graphs.

Tables 1 and 2 show the values of several chromatographic parameters at different temperatures under isocratic elution

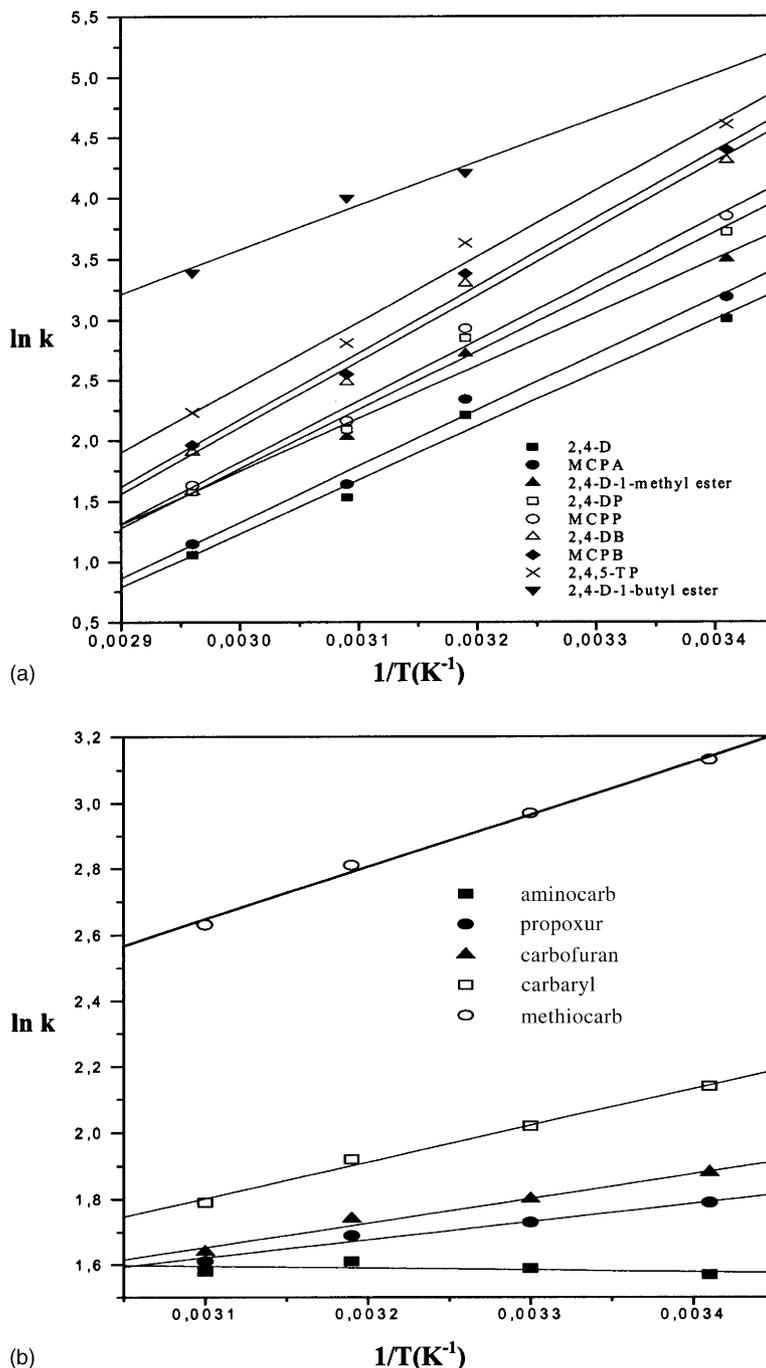


Fig. 2. Van't Hoff plots of the chlorophenoxy acid herbicides (a) and carbamate pesticides (b), illustrating effect of temperature on retention factor (k).

conditions for chlorophenoxy acids and carbamates, respectively. For chlorophenoxy acid herbicides, acceptable resolution was obtained working isothermally at temperatures of 20, 40 and 50 °C but the analysis time was unacceptable long and the later eluted peaks were broadened at 40 and specially at 20 °C. As can be observed in Table 1, for the most retained and non polar compound, the 2,4-D-1-butyl ester, a strongly increase in the plate number was observed at 65 °C, according with its lower peak width. Higher efficiencies, lower retention times and lower peak widths were observed in all cases

when temperature increased. But in the case of 2,4-D, which is the most acidic compound, the increase of efficiency at 65 °C could not be only explained by temperature changes, and the acid-basic equilibrium must be involved.

For carbamates, Table 2 shows that a temperature increase also reduces the retention time (negative temperature dependence) and peak widths, yielding narrow and very sharp peaks. Efficiency for aminocarb and carbofuran was strongly increased from 20 to 50 °C, although high-column plate numbers were observed in general for all of them. A

Table 1
Influence of temperature on the chromatographic parameters for chlorophenoxy acid herbicides capillary LC separation

| Herbicide | Temperature (°C) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------------|----------|----------------------------------|----------------------|--|
| | 20 | | | | | 40 | | | | | 50 | | | | | 65 | | | | | Programmed temperature ^a | | | | |
| | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>R_s</i> | |
| 2,4-D | 34.4 | 20.3 | 1.5 | 3076 | | 16.3 | 9.1 | 0.6 | 3829 | | 9.0 | 4.6 | 0.4 | 3663 | | 6.3 | 2.9 | 0.2 | 4986 | | 16.3 | 2.4 | 1.0 | | |
| MCPA | 40.8 | 24.4 | 1.7 | 3229 | 2.4 | 18.4 | 10.4 | 0.7 | 4056 | 1.9 | 9.9 | 5.1 | 0.4 | 3394 | 1.3 | 6.7 | 3.2 | 0.3 | 3679 | 1.1 | 18.8 | 2.9 | 1.0 | 2.5 | |
| 2,4-D-1-methyl ester | 54.7 | 33.0 | 2.2 | 3520 | 4.2 | 26.2 | 15.3 | 1.0 | 3960 | 5.5 | 13.4 | 7.6 | 0.5 | 3541 | 5.1 | 9.4 | 4.8 | – | – | 2.8 | 24.3 | 4.1 | 1.3 | 4.7 | |
| 2,4-DP | 68.1 | 41.3 | 2.7 | 3659 | 3.3 | 29.3 | 17.2 | 0.10 | 4952 | 1.9 | 14.7 | 8.1 | 0.5 | 4262 | 0.9 | 9.4 | 4.8 | – | – | 0 | 28.6 | 5.0 | 1.5 | 3.1 | |
| MCPD | 77.0 | 46.8 | 2.9 | 4004 | 1.9 | 31.8 | 18.8 | 1.1 | 4715 | 1.4 | 15.6 | 8.7 | 0.6 | 3292 | 0.9 | 9.8 | 5.1 | 0.4 | 4343 | 0.7 | 31.3 | 5.5 | 1.5 | 1.8 | |
| 2,4-DB | 121.4 | 74.4 | 4.8 | 3604 | 6.9 | 45.5 | 27.2 | 1.6 | 4594 | 6.0 | 20.9 | 12.0 | 0.8 | 3781 | 4.4 | 12.4 | 6.7 | 0.4 | 4607 | 3.9 | 40.5 | 7.4 | 0.6 | 9.1 | |
| MCPB | 133.1 | 81.7 | 5.0 | 4022 | 1.4 | 49.0 | 29.4 | 1.8 | 3972 | 1.2 | 22.3 | 12.8 | 0.9 | 3401 | 1.0 | 13.1 | 7.1 | 0.5 | 3385 | 0.8 | 41.5 | 7.6 | 0.7 | 1.6 | |
| 2,4,5-TP | 162.7 | 100.0 | 5.9 | 4199 | 3.2 | 62.5 | 37.8 | 2.1 | 4815 | 4.0 | 28.5 | 16.7 | 1.1 | 3719 | 3.7 | 16.6 | 9.3 | 0.6 | 4103 | 3.6 | 44.3 | 8.2 | 0.6 | 4.3 | |
| 2,4-D-1-butyl ester | – | – | – | – | – | 110.2 | 67.4 | 8.9 | 860 | 5.1 | 89.3 | 54.5 | 3.4 | 3937 | 15.8 | 49.2 | 29.5 | 1.6 | 5238 | 17.3 | 69.0 | 13.4 | 0.3 | 5.6 | |

Mobile phase composition: methanol–0.8% aqueous phosphoric acid solution (45:55). Flow rate 8 $\mu\text{L min}^{-1}$. Concentration of pesticide 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Injection volume 20 μL . Focusing solution: methanol–water (10:90).

^a Conditions explained in Section 2.4.

Table 2
Influence of temperature on the chromatographic parameters for carbamate pesticides capillary LC separation

| Pesticide | Temperature (°C) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------|----------|----------------------------------|----------|----------------------|-------------------------------------|----------|----------------------------------|----------------------|--|
| | 20 | | | | | 30 | | | | | 40 | | | | | 50 | | | | | Programmed temperature ^a | | | | |
| | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>N</i> | <i>R_s</i> | <i>t_R</i> (min) | <i>k</i> | <i>w</i> _{1/2} (min) | <i>R_s</i> | |
| Aminocarb | 8.7 | 4.4 | 0.3 | 4363 | | 7.9 | 4.4 | 0.3 | 5115 | | 7.6 | 4.4 | 0.3 | 5120 | | 7.0 | 4.3 | 0.2 | 7520 | | 6.8 | 2.0 | 0.4 | | |
| Propoxur | 10.3 | 5.4 | 0.3 | 5084 | 2.9 | 8.9 | 5.0 | 0.3 | 5597 | 2.1 | 8.2 | 4.8 | 0.3 | 5511 | 1.3 | 7.3 | 4.4 | 0.2 | 6100 | 0.7 | 8.0 | 2.5 | 0.4 | 3.0 | |
| Carbofuran | 10.9 | 5.9 | 0.4 | 4114 | 1.1 | 9.3 | 5.3 | 0.3 | 4680 | 0.9 | 8.5 | 5.0 | 0.3 | 5491 | 0.7 | 7.5 | 4.6 | 0.2 | 7066 | 0.6 | 8.5 | 2.7 | 0.4 | 1.3 | |
| Carbaryl | 13.7 | 7.6 | 0.5 | 3998 | 3.5 | 11.2 | 6.6 | 0.4 | 4134 | 3.0 | 9.8 | 5.9 | 0.3 | 4603 | 2.5 | 8.4 | 5.2 | 0.3 | 4986 | 2.1 | 10.4 | 3.5 | 0.4 | 4.5 | |
| Methiocarb | 34.0 | 20.4 | 1.3 | 3971 | 13.5 | 27.0 | 17.3 | 0.10 | 4205 | 13.3 | 22.2 | 14.7 | 0.7 | 5124 | 13.6 | 17.9 | 12.4 | 0.6 | 5099 | 12.9 | 19.5 | 7.5 | 0.8 | 14.4 | |

Mobile phase: acetonitrile-acetic acid/sodium acetate 20 mM pH 5.5 buffer (30:70). Flow rate 8 $\mu\text{L min}^{-1}$. Concentration of pesticide 0.2 mg L^{-1} for carbaryl and 0.5 mg L^{-1} for the rest. Injection volume 20 μL . Focusing solution: methanol–water (10:90).

^a Conditions explained in Section 2.4.

loss in resolution was observed for the critical pair formed by propoxur and carbofuran at temperatures higher than 20 °C. To increase resolution, the separation was made at 10 or 15 °C, but, due to overpressure problems even at a flow rate of 8 $\mu\text{L min}^{-1}$, temperatures lower than 20 °C were not suitable. Consequently, both flow and composition of mobile phase were readjusted to optimise the separation and resolution of the critical pair. At this temperature and a flow of 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, changing the organic ratio solvent to 28% of acetonitrile led to a greater resolution for the critical pair (R_s 1.5); however, as can be observed in Fig. 3, analysis time is unfortunately not practical.

3.2. Gradient elution for chlorophenoxy acid herbicides

Separation at isothermal temperature was optimised using gradient elution. Several gradient steepness were tested

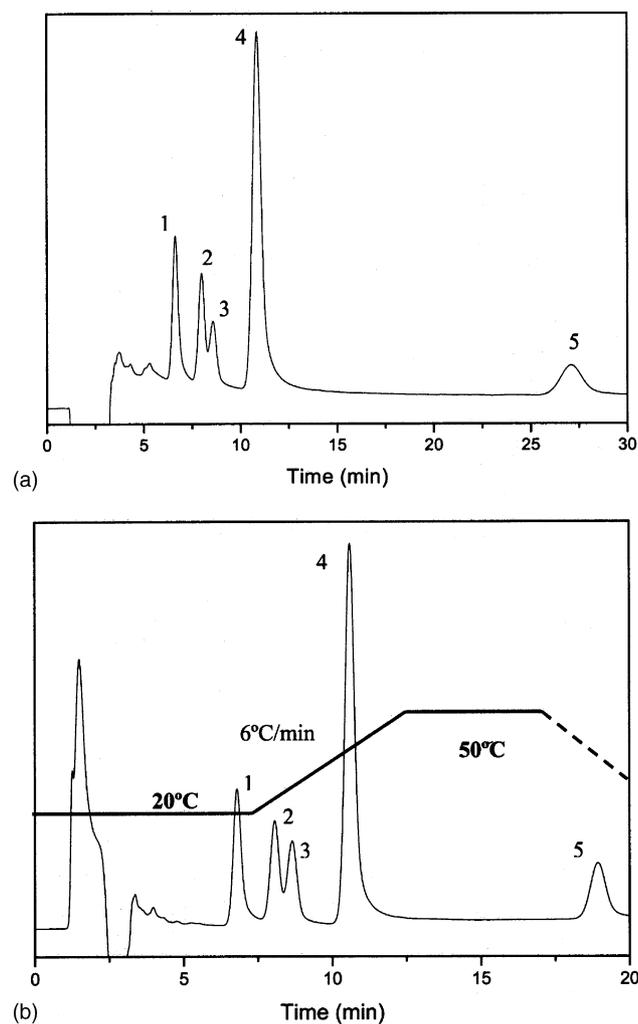


Fig. 3. Capillary HPLC chromatograms of carbamates standard working solution. (a) Isocratic elution with the mobile phase acetonitrile-acetic acid/sodium acetate 20 mM pH 5.5 (28:72) at 20 °C. (b) Temperature program from 20 to 50 °C. Peaks: (1) aminocarb; (2) propoxur; (3) carbofuran; (4) carbaryl; (5) methiocarb. Amount injected 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ for carbaryl and 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ for all the other pesticides. Flow rate 10 $\mu\text{L min}^{-1}$.

at 25 °C using a mixture of methanol–0.8% aqueous phosphoric acid solution as the elution solvent. Initial and final ratios of methanol were 40 and 70%, respectively, and the best conditions found for the mobile phase composition are described in Section 2.4. As can be seen in Fig. 4a, analysis time was 55 min and the resolution obtained was reasonable for all the herbicides studied, including the critical pair of 2,4-DB and MCPB (R_s 1.4). Besides the decrease in peak dispersion of the analytes with the elution time, narrow and sharp peaks were observed for the last eluted herbicides, specifically for 2,4-DP, MCPP, 2,4-DB, MCPB and 2,4,5-TP. However, for the first eluted peaks, 2,4-D, MCPA and 2,4-D-1-methyl ester, relatively high values of the retention factors were in the range between 4.3 and 7.0 were obtained, thus, to decrease the retention factor of these analytes while main-

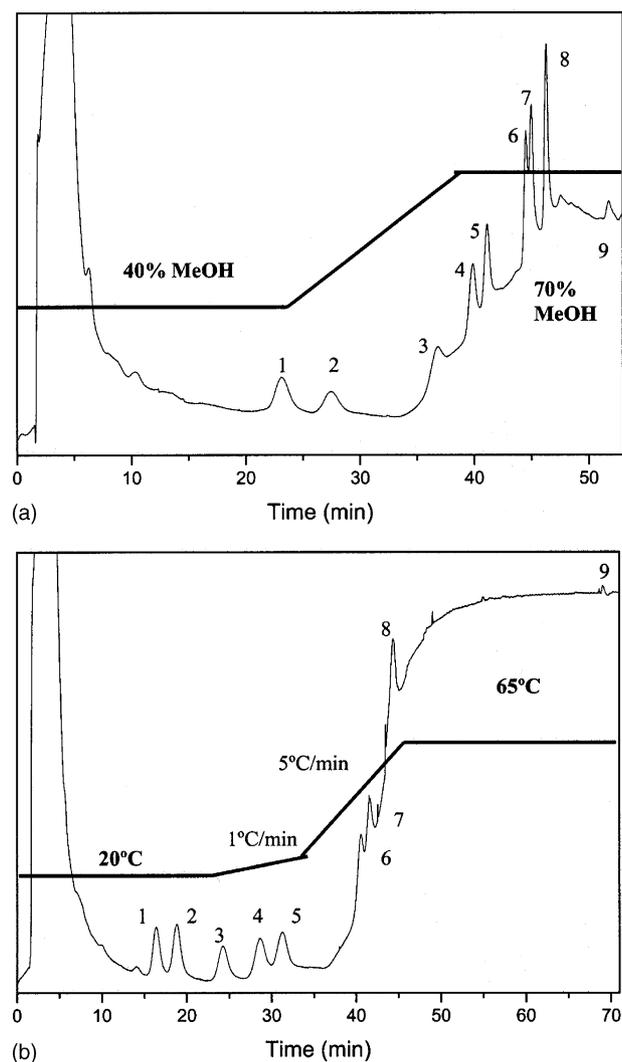


Fig. 4. Capillary HPLC chromatograms of chlorophenoxy acids standard solution. (a) Gradient elution at 25 °C. (b) Isothermal elution with the mobile phase methanol–0.8% aqueous phosphoric acid solution (45:55) and temperature program from 20 to 65 °C. Peaks: (1) 2,4-D; (2) MCPA; (3) 2,4,-D-1-methyl ester; (4) 2,4,-DP; (5) MCPP; (6) 2,4-DB; (7) MCPB; (8) 2,4,5-TP; (9) 2,4-D-1-butyl ester. Amount injected 25 $\mu\text{g L}^{-1}$. Flow rate 8 $\mu\text{L min}^{-1}$.

taining the resolution, the effect of temperature program was studied.

3.3. Temperature program for elution purposes

Working in the isocratic conditions described above (Section 2.4), different temperature programs were explored from 20 to 65 °C to improve separation of chlorophenoxy acid herbicides. Fig. 4b shows the chromatogram obtained for the best temperature program. As can be observed in Table 1, the temperature program decreased the analysis time with respect to that of the isothermal separation at 40 °C; in addition, acceptable resolution including the critical pair formed by 2,4-DB and MCPB was obtained. Although retention factors (see Table 1) for the last eluted peaks were similar to those obtained by gradient elution, the first eluted peaks showed lower *k* values. In spite of this, the retention time for 2,4-D-1-butyl ester was unacceptable long because it is the least affected by temperature changes.

In the case of carbamate compounds, although several elution gradients at 20 °C in isothermal mode were tested to decrease the analysis time, results were not significantly improved; therefore, to reduce this time while maintaining the quality of the separation, temperature programs were tried. For all the cases, initial column temperature was 20 °C ending at 50 °C with a gradient rate of 6 °C min⁻¹, using a mixture of acetonitrile—acetic acid/sodium acetate 20 mM pH 5.5 buffer (28:72) as mobile phase. The optimum conditions for the program are described in Section 2.4. As can be seen in the chromatogram shown in Fig. 3b, analysis time was reduced to 20 min and a quite stable baseline was achieved. Separation of the critical pair propoxur—carbofuran was possible with slightly improved resolution, as can be observed in Table 2. Moreover, high-sensitivity and less peak widths with respect to the isothermal separation were obtained for all the carbamates studied, especially for methiocarb, the last eluted compound.

4. Conclusions

The usefulness of temperature programs, which makes the effect of increasing elution strength on separation of chlorophenoxy acid and carbamate pesticides by capillary LC, has been established. Temperature effects on chromatographic parameters such as retention factor, peak width, resolution and plate number has been taken as a basis to select temperature programs.

Temperature programming allows finer changes on elution strength than their equivalent gradients in mobile phase composition do. This leads to wider *k* ranges, starting from

lower values, and it involves improvements in the resulting chromatographic parameters.

Combining isocratic optimisation with temperature programs, chromatographers have another tool to control resolution and efficiency in capillary LC separations, as has been clearly proved for the separation of the carbamates studied group.

Acknowledgements

Authors wish to thank the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Dirección General de Investigación) for financial support (project BQU-2003-00667). N.R. wishes to thank the Complutense University for support through a predoctoral fellowship.

References

- [1] G.S. Nunes, D. Barceló, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 99.
- [2] R.M. García-Blázquez, L.V. Pérez-Arribas, M.E. León-González, L.M. Polo-Díez, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 21 (1998) 1173.
- [3] N. Rosales-Conrado, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, Anal. Chim. Acta 470 (2002) 147.
- [4] P. Molander, T.E. Gundersen, C. Haas, T. Greibrokk, R. Blomhoff, E. Lundanes, J. Chromatogr. A 847 (1999) 59.
- [5] W. Liu, H. Kee-Lee, Talanta 45 (1998) 631.
- [6] A. Capiello, F. Bruner, Anal. Chem. 65 (1993) 1281.
- [7] J.P.C. Vissers, H.A. Claessens, C.A. Cramers, J. Chromatogr. A 779 (1997) 1.
- [8] M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, C. Panis, M.P. San Andrés, Anal. Chim. Acta 445 (2001) 29.
- [9] M.P. San Andrés, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, L.M. Polo-Díez, J. High Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 367.
- [10] J.W. Dolan, J. Chromatogr. A 965 (2002) 195.
- [11] F. Houdlere, P.W.J. Fowler, N.M. Djordjevic, Anal. Chem. 69 (1997) 2589.
- [12] S.J. Marin, B.A. Jones, W. Felix, J. Clark, J. Chromatogr. A 1030 (2004) 255.
- [13] T. Greibrokk, T. Andersen, J. Chromatogr. A 1000 (2003) 743.
- [14] P. Molander, A. Thomassen, L. Kristoffersen, T. Greibrokk, E. Lundanes, J. Chromatogr. B 766 (2001) 77.
- [15] P. Molander, K. Haugland, D.R. Hegna, E. Ommundsen, E. Lundanes, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 804 (1999) 103.
- [16] L.K. Moore, R.E. Synovec, Anal. Chem. 65 (1993) 2663.
- [17] M. Hong-Chen, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 788 (1997) 51.
- [18] T. Andersen, I.L. Skuland, A. Holm, R. Trones, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 1029 (2004) 49.
- [19] P. Molander, K. Haugland, G. Fladseth, E. Lundanes, S. Thorud, Y. Thomassen, T. Greibrokk, J. Chromatogr. A 892 (2000) 67.
- [20] L.M. Polo-Díez, C. Grande-Vicente, M.E. León-González, L.V. Pérez-Arribas, Presented at Euroanalysis 12, Dortmund, 2002. poster P2-133.
- [21] C.D.S. Tomlin, The Pesticide Manual, British Crop Protection Council, London, 1977.