



Universitat de Girona

DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES DE
PRECONCENTRACIÓ EMPRANT MEMBRANES
LÍQUIDES SUPORTADES I EXTRACCIÓ EN FASE
SÒLIDA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'HERBICIDA
GLIFOSAT I EL SEU METABÒLIT AMPA EN AIGÜES
NATURALS

Carolina RIOS LOSADA

ISBN: 84-688-8276-3
Dipòsit legal: GI-1058-2004



Universitat de Girona
Departament de Química
Unitat de Química Analítica

DESENVOLUPAMENT DE MÈTODES DE PRECONCENTRACIÓ
EMPRANT MEMBRANES LÍQUIDES SUPORTADES I EXTRACCIÓ EN
FASE SÒLIDA PER A LA DETERMINACIÓ DE L'HERBICIDA
GLIFOSAT I EL SEU METABÒLIT AMPA EN AIGÜES NATURALS

Carolina Rios Losada

Gener 2004

Manuela Hidalgo Muñoz, professora titular d'universitat de Química Analítica i **Victòria Salvadó Martín**, catedràtica d'universitat de Química Analítica de la Universitat de Girona,

CERTIFIQUEM:

Que els estudis recollits en aquesta memòria sota el títol "**Desenvolupament de mètodes de preconcentració emprant membranes líquides suportades i extracció en fase sòlida per a la determinació de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit AMPA en aigües naturals**", han estat realitzats sota la nostra direcció per **Carolina Rios Losada**, llicenciada en Química, per optar al grau de Doctor per la Universitat de Girona dins del programa de doctorat "Ciències: Química i Física de les molècules i els materials, Biotecnologia i Ciències de la Salut" que imparteix el Departament de Química de la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signem la present certificació.

Girona, 7 de gener del 2004

Dra. Manuela Hidalgo Muñoz

Dra. Victòria Salvadó Martín

Els estudis exposats en aquest treball han donat lloc a les següents publicacions (vegeu annex):

- C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane", *J. Membr. Sci.*, 203 (2002) 201.
- C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)", *Journal of Separation Science*, en revisió.
- C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Comparison of three chelating resins for the preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA by immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC)", en preparació.
- C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvadó, J. V. Sancho, F. Hernández, "Improved LC-LC method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in environmental waters", *Journal of Chromatography A*, acceptat.

Als meus pares

A les meves germanes

A en Josep

Aquest treball no hauria estat possible sense el recolzament de diverses persones que d'una manera o altra han contribuït a que aquesta tesi fos una realitat. A totes elles m'agradaria expressar el meu sincer agraïment.

En primer lloc gràcies a les meves directores de tesi, Dra. Victòria Salvadó i Dra. Manuela Hidalgo, per donar-me la oportunitat d'introduir-me en el món de la recerca universitària i per guiar-me durant tot aquest temps.

Gràcies també a tots els companys de l'àrea de química analítica amb qui he compartit moltes hores de laboratori i despatx i per sort també de cafès i sopars. Tots vosaltres heu fet que aquests 5 anys hagin estat inoblidables i m'hagin passat volant! Espero no deixar-me ningú (sinó perdó!): en Juanma, l'Enriqueta, en Tolo, la Clàudia i la Mònica (gràcies per deixar-me acaparar l'ordinador i per la vostra companyia diària al despatx), la Gemma, la Marta C. (ànims que ja et queda poc de glifosat), la Sònia, l'Eva, la Sara, la Marta S., la Mercè P. (gràcies per la vostra amistat i endavant amb les vostres tesis; no us desanimeu mai) la Sílvia, i les que ja heu marxat, Maribel, Mercè D., Roser i Pilar. I gràcies també als companys de les altres àrees i a l'Anna, la Vero i en Pepe.

A tots els organitzadors del NYM5 meeting (Tània, Jordy, Carles, César, Cristina, Clàudia, Marta, Àngels, Francesc, Montse, Anna i Lulu) per les bones estones passades junts i per fer que el congrés fos un èxit i una experiència molt enriquidora.

Als companys de Castelló i Brno per acceptar-me en els vostres grups com una més durant les meves estades. I gràcies Rosa pels mesos que vam compartir a Brno, sense tu no hauria estat el mateix.

A les companyes de llicenciatura i ara doctores Montse i Sílvia, i futures doctores Anna i Teia pels cafès compartits i per la vostra amistat que espero que mantinguem encara que ja no estiguem plegades a la universitat.

A les meves amigues de fa molts anys i desitjo que per molts més, les Martes, la Txell i l'Èlia, per distreure'm i no fer-me pensar en la tesi.

A la meva família, el meu pare, la meva mare i les meves germanes, Vero i Rebeca, per estar sempre al meu costat i fer-me riure i ser feliç. Un petó per tots.

I finalment gràcies a tu Josep amb qui ara sí que puc dir que comparteixo la meva vida. Simplement gràcies per estar amb mi i estimar-me.

Moltes gràcies a tots.

I a tu, siguis qui siguis, gràcies per mirar-te aquesta tesi, encara que només siguin els agraïments, perquè representa cinc anys de la meva vida.

ÍNDEX

ÍNDEX

Summary	1
Abreviacions	9
Capítol 1: Introducció	13
Els plaguicides	15
Els herbicides	17
L'herbicida glifosat	20
Propietats fisicoquímiques	21
Toxicitat.....	22
Efectes ambientals	23
Regulació	25
Anàlisi de glifosat i el seu metabòlit AMPA	27
Extracció i/o preconcentració.....	35
Referències	42
Objectius	45
Capítol 2: Disseny d'un sistema de membrana líquida per al transport de glifosat i AMPA	47
Introducció a les membranes líquides	49
Configuracions de les membranes líquides	51
Membranes líquides suportades (SLM)	53
Experimental.....	61
Reactius.....	61
Dissolucions.....	62
Aparells i material.....	62
Procediment experimental	63

Resultats i discussió	70
Disseny del sistema químic	70
Caracterització del transport de glifosat i AMPA.....	81
Estudis de preconcentració	86
Membranes líquides d'afinitat	91
Referències	95

Capítol 3: Preconcentració de glifosat i AMPA per cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC)..... 97

Introducció	99
Principis de la tècnica IMAC.....	101
Avantatges i limitacions de la tècnica IMAC	107
Aplicacions de la tècnica IMAC	108
Resines quelants utilitzades en aquest estudi.....	109
Experimental	113
Reactius	113
Dissolucions.....	113
Aparells i material.....	114
Procediment experimental	115
Resultats i discussió	119
Disseny del procediment IMAC amb la resina Spheron Oxine 1000.....	119
Aplicació del mètode IMAC a aigües naturals	128
Resina Iontosorb Oxin 100	131
Resina Spheron Thiol 1000	136
Comparació de les tres resines emprades	138
Referències	141

Capítol 4: Determinació de glifosat i AMPA mitjançant acoblament LC-LC, prèvia concentració amb una resina de bescanvi iònic	143
Introducció	145
Tècniques cromatogràfiques acoblades	145
Acoblament LC-LC	147
Preconcentració amb una resina de bescanvi iònic	157
Experimental	160
Reactius	160
Dissolucions.....	160
Aparells i material.....	161
Procediment experimental	161
Resultats i discussió.....	163
Anàlisi directa amb LC-LC-FD	163
Preconcentració	177
Referències	183
Discussió global dels resultats.....	185
Conclusions	191
Annex	197

RESUM

El glifosat, N-(fosfometil) glicina, és un dels herbicides més utilitzats arreu del món a causa de la seva baixa toxicitat i al seu ampli espectre d'aplicació. A conseqüència del gran ús que se'n fa, és necessari monitoritzar aquest compost i el seu principal metabòlit, l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), en vegetals i en el medi ambient. S'han descrit diversos mètodes instrumentals basats en cromatografia de gasos (GC) i de líquids (HPLC), sent aquesta darrera l'opció més favorable a causa del caràcter polar dels anàlits. Per assolir nivells de concentració baixos cal, però, la preconcentració dels anàlits.

En aquest treball s'estudien diferents alternatives amb aquest objectiu. S'ha avaluat la tècnica de membrana líquida suportada (SLM), que combina dues extraccions líquid-líquid en un sol pas. La membrana consisteix en una dissolució orgànica, que conté un transportador (en el nostre cas, un bescanviador d'anions comercial, Aliquat 336), que impregna un suport polimèric microporós que se situa entre dues solucions aquoses: la de càrrega, que conté els anàlits inicialment, i la receptora, on es retenen els anàlits després del seu transport a través de la membrana. S'ha estudiat la composició química de les diferents fases que formen el sistema, així com la geometria que proporciona els millors resultats. La fase orgànica més eficaç és la formada per Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4 % dodecanol. Les condicions d'extracció més adequades s'obtenen treballant en medi bàsic amb una dissolució de NaOH 0,1 M, on els anàlits estan en forma aniònica. Pel que fa a la retroextracció, s'assagen diferents solucions d'elució. Les majors recuperacions dels anàlits s'obtenen amb HCl 0,1 M o NaCl 0,5 M, la qual cosa indica que l'ió clorur és la força impulsora del transport.

Un cop dissenyat el sistema, es duen a terme experiments de preconcentració amb dues geometries diferents: un sistema de membrana laminar (LSLM) on recircula la fase receptora i un sistema de fibra buida (HFSLM). Els millors resultats s'obtenen amb el mòdul de fibra buida, amb factors de concentració de 25 i 3 per a glifosat i AMPA, respectivament, fent recircular durant 24 hores 100 ml de solució de càrrega i 4 ml de solució receptora. Per tant, el sistema proporciona bons resultats per a glifosat, però no per a AMPA, ja que el seu transport és més afectat per la competència d'altres anions presents a la dissolució de càrrega.

Per millorar els resultats, s'aplica una tècnica més selectiva, la cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC), basada en la interacció entre els anàlits i

un metall immobilitzat en una resina a través d'un grup funcional d'aquesta. En aquest estudi s'immobilitza pal·ladi al grup funcional 8-hidroxiquinoleïna de la resina amb matriu acrílica Spheron Oxine 1000 i s'avalua per a l'extracció i preconcentració de glifosat i AMPA. Per a ambdós anàlits l'adsorció és del 100 % i les recuperacions són superiors al 80 % i al 60 % per a glifosat i AMPA, respectivament, utilitzant HCl 0,1 M + NaCl 1 M com a eluent. També es fortifiquen aigües naturals de diferents procedències amb 1 i 10 µg/l de glifosat i AMPA, i en passar-les per la resina s'obtenen recuperacions que oscil·len entre el 80-90 % per a glifosat i el 60-80 % per a AMPA.

Aquests resultats es comparen amb els obtinguts amb dues resines més, també carregades amb pal·ladi: Iontosorb Oxin 100, que té el mateix grup funcional però matriu de cel·lulosa, i Spheron Thiol 1000, on el grup funcional és un tiol i la matriu també és acrílica. Per al glifosat els resultats són similars amb totes les resines, però per a l'AMPA la resina Spheron Thiol és la que proporciona els millors resultats, amb recuperacions superiors al 93 %.

Finalment, una altra opció estudiada és l'acoblament de dues columnes de cromatografia líquida (LC-LC). A la primera columna es duu a terme la purificació de la mostra i a la segona columna es produeix la separació dels anàlits. Amb aquest aacoblament es millora la selectivitat (a la segona columna no hi arriben els interferents) i la sensibilitat, gràcies a la introducció de volums grans de mostra, i es poden disminuir els límits de detecció (LOD). En l'estudi l'objectiu és millorar el mètode existent per a glifosat i AMPA en aigües naturals on el LOD era de 0,25 µg/l. El mètode consisteix en la derivatització precolumna amb el reactiu fluorescent FMOC i l'anàlisi amb l'acoblament LC-LC-fluorescència. Variant lleugerament les condicions de derivatització (volums i concentracions de les mostres i reactius implicats) s'aconsegueix quantificar 0,1 µg/l de glifosat i AMPA. Es fortifiquen aigües naturals (potable, subterrània i superficial) amb 0,1, 1 i 10 µg/l dels anàlits per validar el mètode. S'obtenen recuperacions d'entre el 85 % i el 100 %, amb desviacions estàndard relatives inferiors al 8 %.

Aplicant una tècnica de preconcentració prèvia a la derivatització i anàlisi utilitzant una resina de bescanvi aniónic, Amberlite®IRA-900, es millora la sensibilitat del mètode i s'assoleix un LOD per al glifosat de 0,02 µg/l.

RESUMEN

El glifosato, N-(fosfonometil) glicina, es uno de los herbicidas más utilizados en el mundo debido a su baja toxicidad y a su amplio espectro de aplicación. Como consecuencia de su gran utilización, es necesario controlar este compuesto y su principal metabolito, ácido aminometilfosfónico (AMPA), en vegetales y en el medio ambiente. Se han descrito varios métodos instrumentales basados en cromatografía de gases (GC) y de líquidos (HPLC), siendo esta última opción la más adecuada debido al carácter polar de los analitos. Pero para determinar concentraciones residuales es necesaria la preconcentración de los analitos.

En este trabajo se estudian diferentes alternativas con este objetivo. Se ha evaluado la técnica de membrana líquida soportada (SLM), que combina dos extracciones líquido-líquido en una sola etapa. La membrana consiste en una disolución orgánica, que contiene un transportador (en nuestro caso, un intercambiador de aniones comercial, Aliquat 336), que impregna un soporte polimérico microporoso que se sitúa entre dos soluciones acuosas: la de carga, que contiene inicialmente los analitos, y la receptora, donde éstos quedan retenidos después de su transporte a través de la membrana. Se ha estudiado la composición química de las diferentes fases que componen el sistema, así como la geometría que proporciona los mejores resultados. La fase orgánica más favorable es la formada por Aliquat 336 0,2 M en dodecano: 4 % dodecanol. Las condiciones de extracción más adecuadas se obtienen trabajando en medio básico con una disolución de NaOH 0,1 M, donde los analitos están en forma aniónica. Respecto a la retroextracción, se ensayan varias soluciones obteniéndose recuperaciones más elevadas de los analitos con HCl 0,1 M o NaCl 0,5 M, indicando que el ión cloruro es la fuerza impulsora del transporte.

Una vez diseñado el sistema, se llevan a cabo experimentos de preconcentración utilizando dos geometrías diferentes: un sistema de membrana laminar (LSLM) donde recircula la fase receptora y un sistema de fibra hueca (HFSLM). Los mejores resultados se obtienen con el módulo de fibra hueca, con factores de concentración de 25 y 3 para glifosato y AMPA, respectivamente, haciendo circular durante 24 horas 100 ml de solución de carga y 4 ml de solución receptora. Por lo tanto el sistema proporciona buenos resultados para glifosato, pero no para AMPA, ya que su transporte resulta más afectado por la competencia de otros aniones presentes en la solución de carga.

Para mejorar estos resultados, se aplica una técnica más selectiva, la cromatografía de afinidad con ión metálico inmovilizado (IMAC), que se basa en la interacción entre los analitos y un metal inmovilizado en una resina mediante un grupo funcional de ésta. En este estudio se inmoviliza paladio al grupo funcional 8-hidroxiquinolina de la resina con matriz acrílica Spheron Oxine 1000 y se evalúa para la extracción y preconcentración de glifosato y AMPA. Para ambos analitos la adsorción es del 100 % y las recuperaciones son superiores al 80 % y al 60 % para glifosato y AMPA, respectivamente, utilizando HCl 0,1 M + NaCl 1 M como eluyente. También se fortifican aguas naturales de diversos orígenes con 1 y 10 µg/l de glifosato y AMPA, y pasándolas por la resina se obtienen recuperaciones que oscilan entre el 80-90 % para glifosato y 60-80 % para AMPA.

Estos resultados se comparan con los obtenidos con dos resinas más, también cargadas con paladio: Iontosorb Oxin, que tiene el mismo grupo funcional pero matriz de celulosa, y Spheron Thiol 1000, donde el grupo funcional es un tiol y la matriz también es acrílica. Para glifosato se obtienen resultados similares con todas las resinas, pero para AMPA la resina Spheron Thiol es la que proporciona los mejores resultados, con recuperaciones superiores al 93 %.

Finalmente, otra opción estudiada es el acoplamiento de dos columnas de cromatografía líquida (LC-LC). En la primera columna se lleva a cabo la purificación de la muestra y en la segunda columna se produce la separación de los analitos. Con este acoplamiento se mejora la selectividad (los interferentes no acceden a la segunda columna) y la sensibilidad, gracias a la introducción de volúmenes grandes de muestra, y se pueden disminuir los límites de detección (LOD). En este estudio el objetivo es mejorar el método existente para glifosato y AMPA en aguas naturales donde el LOD era de 0,25 µg/l. El método consiste en la derivatización precolumna con el reactivo fluorescente FMOC y el análisis mediante acoplamiento LC-LC-fluorescencia. Variando ligeramente las condiciones de derivatización (volúmenes y concentraciones de las muestras y reactivos implicados) se consigue cuantificar 0,1 µg/l de glifosato y AMPA. Se fortifican aguas naturales (potable, subterránea y superficial) con 0,1, 1 y 10 µg/l de los analitos para validar el método. Se obtienen recuperaciones entre el 85 % y el 100 %, con desviaciones estándar relativas inferiores al 8 %.

Aplicando una técnica de preconcentración previa a la derivatización y análisis utilizando una resina de intercambio aniónico, Amberlite®IRA-900, se mejora la sensibilidad del método y se consigue un LOD para el glifosato de 0,02 µg/l.

SUMMARY

Glyphosate, N-(phosphonomethyl)glycine, is one of the most widely used herbicides in the world due to its low mammal toxicity. Therefore, there is a great interest in the monitoring of this compound and its major metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA), in plants and in environmental matrices. A great variety of methods based on gas chromatography (GC) and liquid chromatography (HPLC) have been applied for the determination of glyphosate and AMPA. HPLC is the most popular option due to the polar nature of both compounds. However, the analysis of these compounds at residue levels requires the use of preconcentration techniques.

In this work we have studied different alternatives to this aim. We have evaluated the supported liquid membrane (SLM) technique, which combines two liquid-liquid extractions in one step. The membrane consists of an organic solution, which contains the carrier (in this case a commercial anion exchanger extractant, Aliquat 336), that impregnates a microporous polymeric support placed between two aqueous solutions: the feed solution, which initially contains the analytes, and the stripping solution, where the analytes are retained after their transport through the membrane. The influence of the chemical composition of the system as well as the membrane geometry on the transport properties has been investigated. The best results were obtained when working with 0.2 M Aliquat 336 in dodecane modified with 4 % dodecanol. The best extraction conditions were achieved by working with a basic pH adjusted with NaOH 0.1 M, where the analytes are present in their anionic form. Among the different stripping solutions tested, a 0.1 M HCl or a 0.5 M NaCl solution gave the best results, indicating that the chloride ion is the responsible for the transport.

Under these chemical conditions some preconcentration experiments were run using two different geometries of the membrane: a laminar membrane system (LSLM) where the stripping solution can be recirculated and a hollow fiber liquid membrane (HFSLM). The best results were obtained for the liquid membrane system in HF configuration, with concentration factors of 25 and 3 for glyphosate and AMPA, respectively, after recirculation during 24 hours of 100 ml of feed solution and 4 ml of stripping solution. In conclusion, the system gives favourable results for glyphosate, but not for AMPA, which is more affected by the competence of other anions in the feed solution.

In order to improve these results, a more selective technique is applied, immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC), which is based on the interaction between the analytes and a metal immobilised in a resin through a functional group. In this work we have immobilised palladium through the chelating group 8-hydroxyquinoline of the acrylic resin Spheron Oxine 1000 and it has been evaluated for the preconcentration of glyphosate and AMPA. 100 % adsorption has been obtained for both analytes and the recoveries are higher than 80 % and 60 % for glyphosate and AMPA, respectively, using 0.1 M HCl + 1 M NaCl as eluent. Moreover, natural waters of different origin are spiked with 1 and 10 µg/l of glyphosate and AMPA and after processing them through the resin recoveries between 80-90 % are obtained for glyphosate and between 60-80 % for AMPA.

These results are compared with the results obtained working with two different resins also charged with palladium: Iontosorb Oxin 100, which has the same functional group but cellulose matrix, and Spheron Thiol 1000, which a thiol functional group and acrylic matrix. The results for glyphosate are similar with all the resins tested, but for AMPA the best results are obtained with Spheron Thiol with recoveries higher than 93 %.

Finally, another option studied is the coupling of two liquid chromatographic columns (LC-LC). In the first column takes place the clean-up of the sample and in the second column the analytes are separated. With this coupled-column LC system the selectivity is improved (because the interferences do not get to the second column), and also the sensibility due to the large volume injection of sample, and the limits of detection (LOD) can be decreased. In this work the objective is to improve the existing method for the analysis of glyphosate and AMPA in natural waters which had a LOD of 0.25 µg/l. The method consists of the pre-column derivatization with the fluorescent reagent FMOC and the analysis by LC-LC-fluorescence detection. The derivatization step has been slightly modified by changing parameters as the volume and/or the concentration of sample and reagents with the aim of decreasing the limits of quantification of glyphosate and AMPA down to 0.1 µg/l. Different water samples (drinking, surface and groundwater) spiked with glyphosate and AMPA at three concentration levels (0.1, 1, 10 µg/l) were analysed by the improved method yielding recoveries between 85-100 % with relative standard deviations lower than 8 %.

Additionally, the potential of an anion-exchange resin, Amberlite[®] IRA-900, for preconcentration of glyphosate, previously to the derivatization step, has been investigated. In this way the LOD of the parent compound has been lowered to 0.02 µg/l.

ABREVIACIONES

Abreviacions

AAS	Absorció atòmica de flama
Aliquat 336	Nom comercial del clorur de tricaprililmetilamoni
AMPA	Àcid aminometilfosfònic
AS	Autoinjector
C-1	Primera columna en un acoblament LC-LC
C-2	Segona columna en un acoblament LC-LC
CE	Electroforesi capil·lar
D2EHPA	Àcid di-(2-etilhexil)fosfòric
ECD	Detector de captura d'electrons (<i>electron capture detector</i>)
ELISA	Immunoassaig lligat a l'enzim (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EPA	Agència de Protecció del Medi Ambient dels Estats Units (<i>Environmental Protection Agency of the United States</i>)
F	Factor de concentració
FD	Detecció amb fluorescència
FMOC	Cloroformiat de 9-fluorenilmetil
FPD	Detector de fotometria de flama (<i>flame photometric detector</i>)
GC	Cromatografia de gasos
Gl	Glifosat
8-HOx	8-hidroxiquinoleïna
HV	Vàlvula d'alta pressió
IC	Cromatografia iònica
i.d.	Diàmetre intern
IMAC	Cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (<i>immobilized metal ion affinity chromatography</i>)
Kelex 100	7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinoleïna
LC o HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
LC-LC	Acoblament de dues columnes de cromatografia líquida
LC50	Concentració letal 50 (<i>lethal concentration 50</i>)
LD50	Dosi letal 50 (<i>lethal dose 50</i>)
LLE	Extracció líquid-líquid

LM	Membrana líquida
LOD	Límit de detecció
MIT	Transferència d'ió metàl·lic
MS.....	Espectrometria o espectròmetre de masses
NPD	Detector de nitrogen-fòsfor (<i>nitrogen-phosphorous detector</i>)
OPA-MERC	o-ftaladehid- 2-mercaptoetanol
P	Permeabilitat
ppb	Parts per bilió
ppm	Parts per milió
PS-DVB	Poliestirè-divinilbenzè
rpm.....	Revolucions per minut
RSD.....	Desviació estàndard relativa
SLM	Membrana líquida suportada
SPE	Extracció en fase sòlida
SPME.....	Microextracció en fase sòlida
TLA·HCl.....	Clorur de trilaurilamoni
TsCl.....	Clorur de <i>p</i> -toluensulfonil
UV-Vis.....	Detecció amb ultraviolat-visible

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

CONTINGUTS CAPÍTOL 1:

1.1. ELS PLAGUICIDES	15
1.2. ELS HERBICIDES	17
1.3. L'HERBICIDA GLIFOSAT	20
1.3.1. PROPIETATS FÍSICOQUÍMIQUES.....	21
1.3.2. TOXICITAT	22
1.3.3. EFECTES AMBIENTALS	23
1.3.4. REGULACIÓ.....	25
1.3.5. ANÀLISI DE GLIFOSAT I EL SEU METABÒLIT AMPA.....	27
1.3.5.1. <i>Mètodes cromatogràfics</i>	28
1.3.5.1.1. Cromatografia de gasos (GC).....	28
1.3.5.1.2. Cromatografia de líquids (LC)	30
1.3.5.1.3. Cromatografia iònica (IC)	33
1.3.5.2. <i>Mètodes no cromatogràfics</i>	33
1.3.5.2.1. Electroforesi capil·lar (CE).....	33
1.3.5.2.2. Immunoassaig (ELISA).....	34
1.4. EXTRACCIÓ I/O PRECONCENTRACIÓ	35
1.5. REFERÈNCIES	42
1.6. OBJECTIUS	45

1.1. ELS PLAGUICIDES

L'agricultura actual exigeix un esforç dirigit a estudiar, desenvolupar i valorar estratègies que assegurin i incrementin la productivitat per garantir el subministrament d'aliments de qualitat a la creixent població mundial.

En aquest sentit, la introducció de productes químics agrícoles, com els fertilitzants i els plaguicides, va revolucionar l'agricultura. En l'actualitat han arribat a ser indispensables fins al punt que estudis realitzats per l'Organització de les Nacions Unides per a l'Agricultura i l'Alimentació (FAO) consideren que una supressió total dels plaguicides provocaria pèrdues del rendiment dels conreus de més d'un 50 %, mentre que actualment se'n perd menys d'un 30 % [1].

Un plaguicida és una substància o mescla utilitzada per prevenir, destruir, repel·lir o mitigar qualsevol plaga [2]. Aquesta definició inclou també les substàncies que es fan servir com a reguladores del creixement de la planta, els defolians i els dessecants, però exclou els productes fertilitzants.

Actualment arreu del món s'utilitzen centenars de plaguicides de diferent naturalesa química majoritàriament en agricultura, per eliminar les males herbes, les plagues i els fongs dels cultius, tot i que també tenen aplicacions no agrícoles, com el control de males herbes en vies de ferrocarril, carreteres, camins i àrees industrials.

Malgrat que els beneficis obtinguts amb l'ús de plaguicides són nombrosos, la utilització a escala mundial de quantitats creixents d'aquests compostos ha donat origen a tot un seguit de problemes que afecten el medi ambient i la salut humana.

Pel que fa al medi ambient, com a conseqüència de la gran quantitat de plaguicides utilitzats, el seu ampli espectre d'aplicació i les seves propietats fisicoquímiques, s'ha produït un augment de la seva presència en l'aire, el sòl i l'aigua.

Cal esmentar que, després d'aplicar-lo, el plaguicida pot estar sotmès a diferents processos: volatilització, adsorció en sòls amb un contingut elevat de matèria orgànica o argiles, transport cap a aigües superficials i subterrànies i degradació química, microbiològica, tèrmica i fotolítica.

La presència de plaguicides en aigües subterrànies bàsicament depèn de les propietats físiques i químiques del compost implicat: solubilitat, persistència i lixiviació.

La contaminació de les aigües és un dels problemes que generen més preocupació entre els consumidors a causa dels riscos toxicològics que comporta. Per aquest motiu és molt important el desenvolupament de mètodes que permetin determinar la concentració de plaguicides presents a les aigües i especialment a les destinades al consum humà. Molts d'aquests mètodes impliquen una etapa de preconcentració, una etapa de purificació (*clean-up*) i una separació mitjançant cromatografia de gasos o de líquids.

Pràcticament totes les tècniques d'anàlisi de compostos orgànics són aplicables a la determinació dels plaguicides. Entre aquestes tècniques podem esmentar les tècniques espectrofotomètriques en les zones del visible, infraroig i ultraviolat, que presenten l'avantatge que no requereixen instrumentació gaire complexa i, per tant, poden ser utilitzades per molts laboratoris; o les tècniques electroquímiques com ara la polarografia, o altres tècniques com l'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear i l'espectrometria de masses, però aquestes dues últimes tenen l'inconvenient de requerir instruments costosos i personal tècnic especialitzat. Però, sens dubte, són les tècniques cromatogràfiques les que més s'utilitzen en la determinació de la major part d'aquests compostos.

Els plaguicides es poden classificar seguint diferents criteris: funcional, químic, toxicològic [2].

La classificació funcional es basa en l'organisme sobre el qual actuen. Les classes principals, la importància de les quals es pot mesurar pel valor comercial respectiu, són:

- herbicides (actuen sobre les males herbes)
- insecticides (sobre els insectes)
- fungicides (sobre els fongs)

La classificació química és interessant des del punt de vista sanitari, ja que els efectes sobre la salut són característics i diferents per a cada família de plaguicides. És important saber la composició química dels plaguicides per poder preveure els efectes que poden provocar en la salut humana i en el medi ambient i per elaborar tractaments eficaços per eliminar-los.

1.2. ELS HERBICIDES

Del volum total de plaguicides que s'utilitzen a Europa, la majoria són herbicides. Els herbicides s'apliquen bàsicament per eliminar les males herbes que competeixen amb els cultius. Per tant, per ser útil com a herbicida, el producte ha de ser selectiu per a les males herbes.

El control de les males herbes va aparèixer a principis de segle amb l'aplicació de sulfat de coure per eradicar les herbes presents als cultius [3]. Posteriorment van adquirir molta importància els productes orgànics de síntesi i actualment existeixen centenars d'herbicides que pertanyen a famílies de compostos químics molt diferents [1]:

- fenoxiàcids (2,4-D, MCPA)
- amides (alaclor)
- compostos piridínics (picloram) i bipiridínics (diquat, paraquat)
- carbamats i tiocarbamats (barban, profam)
- nitroanilines (nitralina)
- compostos fenòlics (pentaclorofenol)
- compostos s-triazínics (atrazina, simazina)
- derivats de la urea (linuron)
- derivats organofosforats (glifosat)

El glifosat és l'herbicida en el qual se centra aquesta tesi i per tant, les seves característiques es comentaran amb més detall en els apartats següents.

Basant-se en l'ús, les propietats fisicoquímiques i la persistència, es va establir una llista d'herbicides prioritaris en països mediterranis com França, Itàlia, Grècia i Espanya [4]. La llista (**Taula 1.1**) considera els herbicides que poden provocar la contaminació d'estuaris i costes. La selecció dels herbicides té en compte el seu ús i el seu temps de vida mitjà. Com es pot veure a la taula, el glifosat és un dels herbicides que s'hi han inclòs.

Taula 1.1. Herbicides problemàtics a la regió mediterrània

Alaclor	EPTC	Metribuzina
Amitrole	Etalfluralina	Molinat
Atrazina	Etofumetasa	Napropamida
Bentazona	Flamprop-M- isopropil	Neburon
Bromoxinil	Glifosat	Paraquat
Butilat	Isoproturon	Pendimetalin
Carbetamida	Linuron	Fenmedifan
Clortoluron	MCPA	Prometrina
2,4-D	Mecoporp	Simazina
Dial·lat	Metamitron	Àcid tricloracètic
Diclobenil	Metazaclor	Terbumeton
Diclofop- metil	Metabenztiазuron	Terbutilazina
Dinoterb	Metobromuron	Terbutrina
Diquat	Metolaclor	Trial·lat
Diuron	Metoxuron	Trifluralina
DNOC		

A més d'aquesta llista, en diferents països europeus també se n'han establert d'altres per així indicar quins plaguicides concrets s'han de monitoritzar a cada zona en funció de les dades existents sobre el seu ús, lixiviació, persistència, bioacumulació potencial, toxicitat i possibles efectes sobre el medi ambient. És important revisar aquestes llistes periòdicament a causa de la possible introducció de nous compostos que substitueixin els existents.

A més de la classificació dels herbicides en funció de la seva estructura química, també es poden fer altres classificacions en funció de diferents criteris, com es mostra a la **Taula 1.2**.

Taula 1.2. *Diferents criteris de classificació dels herbicides*

Criteri de classificació	Herbicida
Acció sobre les plantes	total (no selectiu) selectiu
Acció sobre les males herbes	de contacte sistèmic residual
Mode d'aplicació	de presembra o preplantació de preemergència de postemergència
Sistema d'aplicació	total dirigit

Es classifiquen com a *selectius* quan afecten les males herbes, però no el cultiu, i com a *no selectius* o *totals* quan ataquen tota la vegetació en general. Però, tot i ser no selectius poden aplicar-se de manera que només afectin les males herbes.

Segons el mode d'actuació, també es classifiquen en herbicides de *contacte*, *sistèmics* i *residuals*. Els primers actuen ràpidament i només destrueixen la zona de les males herbes on es produeix el contacte directe. Els *sistèmics* es desplacen per la planta i, per tant, poden destruir zones allunyades d'on s'ha fet l'aplicació, i els *residuals* s'apliquen al sòl abans que neixin les herbes o quan estan germinant.

Un altre mètode de classificació és en funció del moment de l'aplicació: uns dies abans de plantar el cultiu (*presembra* o *preplantació*), abans de l'aparició dels primers brots (*preemergència*) o després que comencin a sorgir les plantes, tant els cultius com les males herbes (*postemergència*).

Finalment, una altra classificació es basa en el sistema d'aplicació. Es poden aplicar de manera que només cobreixin la línia on hi ha el cultiu (*dirigit*), que incloguin tota la zona (*total*), o també es poden aplicar en zones molt concretes on hi ha les males herbes o directament sobre aquestes.

Cal esmentar que en els darrers anys s'estan dissenyant plantes mitjançant manipulació genètica que són resistents als herbicides, però els científics consideren que aquestes plantes en realitat poden arribar a triplicar l'ús dels herbicides, ja que alguns

agricultors, sabent que el seu cultiu és molt resistent, poden aplicar els herbicides en més quantitats.

És important destacar que el desenvolupament actual dels herbicides s'adreça a una selectivitat específica, de manera que siguin tan segurs com sigui possible per al cultiu, fent necessària la combinació de diferents compostos per destruir les diverses males herbes. A més, l'ús constant d'un mateix herbicida sobre un cultiu pot provocar el desenvolupament d'altres espècies resistents que abans no tenien cap mena de protagonisme.

En els darrers anys la creixent preocupació pels riscos toxicològics dels plaguicides ha obligat a utilitzar productes menys tòxics així com de menor persistència en el medi ambient, cosa que ha provocat un desplaçament en l'ús de compostos apolars per compostos més polars i més fàcilment degradables. Aquesta nova generació de plaguicides, on s'inclou el glifosat, presenta, no obstant això, una major mobilitat en el medi ambient, i els seus residus es poden trobar en diferents matrius ambientals (principalment sòls i aigües).

1.3. L'HERBICIDA GLIFOSAT

L'herbicida Roundup[®], amb el compost actiu glifosat, va ser introduït el 1974 per la companyia Monsanto[5].

El glifosat és un herbicida d'ampli espectre d'aplicació, no selectiu, que s'aplica en la zona de cultiu després de l'aparició dels brots i que actua sobre la majoria de plantes verdes. És un plaguicida d'ús general (GUP) i s'utilitza tant per a aplicacions agrícoles com no agrícoles (com eliminar les males herbes dels costats de camins, carreteres, vies de ferrocarrils, jardins, etc.). Quan s'aplica en concentracions baixes també pot actuar com a regulador del creixement.

Nombrosos estudis fisiològics, bioquímics i genètics han demostrat que el glifosat controla les males herbes inhibint un enzim present a les plantes, la 5-enolpiruvilxiquimat-3-fosfat sintasa (EPSPS). L'EPSPS és un enzim clau en la ruta de l'àcid xiquímic que només es troba en les plantes i en certs microorganismes, però no en els mamífers, cosa que contribueix a disminuir el risc per a aquests si es fa servir el producte de manera adequada. El 5-enolpiruvilxiquimat-3-fosfat (EPSP) es forma en el sisè pas de la ruta i és el

precursor de l'intermedi que necessiten les plantes per generar els seus metabòlits aromàtics, que inclouen els aminoàcids essencials com la fenilalanina, la tirosina i el triptòfan [6,7,8,9].

Per fer més efectives les formulacions, contenen una mescla de tensioactius, olis minerals i vegetals, emulsionants i sals que s'hi afegeixen per transportar més fàcilment el plaguicida fins a la planta o el sòl on ha d'actuar, i alhora protegir-lo de l'evaporació i el rentat per efecte de la pluja. En alguns casos es preparen mescles granulars que impedeixen la dispersió ràpida del compost i que afavoreixen una acció més duradora. En altres casos, els components secundaris del preparat comercial exerceixen una acció sinèrgica, cosa que permet l'ús de quantitats més petites del compost actiu.

En el cas del glifosat, les formulacions inclouen aigua i/o un agent tensioactiu, com es pot veure en alguns productes comercials com Roundup[®], Rodeo[®] i Accord[®], que tenen la composició següent:

- Roundup[®]: glifosat (41 %), tensioactiu polietoxilat tallowamina (15 %) i aigua (44 %)
- Rodeo[®]: glifosat (53,5 %) i aigua (46,5 %)
- Accord[®]: glifosat (41,5 %) i aigua (58,5 %) [10]

1.3.1. PROPIETATS FISICOQUÍMIQUES

Les propietats fisicoquímiques més importants del glifosat es recullen a continuació [11,12]:

Nom científic : N-(fosfometil) glicina

Fórmula molecular : C₃H₈NO₅P

Pes molecular : 169,1 g/mol

Solubilitat: en aigua: 12 g/l a 25 °C

en dissolvents orgànics (acetona, etanol): és molt poc soluble

Punt de fusió : 200 °C (és no volàtil)

L'estructura química del glifosat es mostra en la **Figura 1.1**.

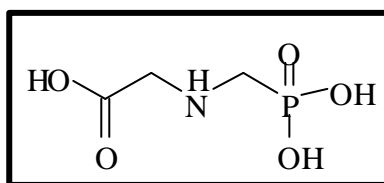


Figura 1.1. Estructura de l'herbicida glifosat

El glifosat és un herbicida amb caràcter hidrofílic que presenta les constants d'acidesa següents: $pK_{a1} < 2$ (primer fosfònic), $pK_{a2} 2,441$ (carboxílic), $pK_{a3} 5,518$ (segon fosfònic) i $pK_{a4} 10,083$ (amina)[13]. La ionització del glifosat es produeix segons les reaccions de la **Figura 1.2**.

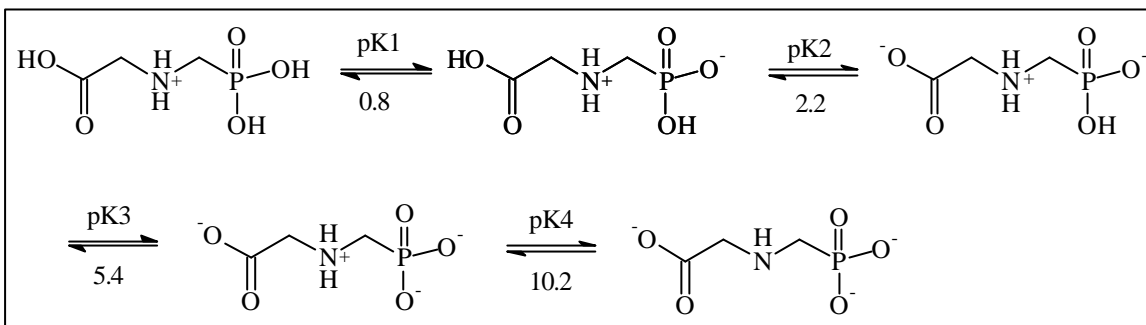


Figura 1.2. Equilibris àcid-base del glifosat amb els pK corresponents.

1.3.2. TOXICITAT

El glifosat i les seves sals són compostos moderadament tòxics classificats dintre de la classe II de toxicitat segons l'EPA (Agència de Protecció del Medi Ambient dels Estats Units)[11]. Per tant, els productes que en contenen han de portar la paraula *WARNING*, com es pot veure a la **Taula 1.3**.

Els paràmetres de toxicitat corresponents a la classe II on s'inclou el glifosat són:

- LD50 oral: >50-500 mg/kg
- LD50 dèrmica: >200-2.000 mg/kg
- LC50 inhalació: >0,2-2,0 mg/l
- Irritació ulls/pell: moderada

Taula 1.3. Classificació de toxicitat segons l'EPA

Classe	Toxicitat	Indicació
I	Altament tòxic	DANGER-POISON
II	Moderadament tòxic	WARNING
III	Lleugerament tòxic	CAUTION
IV	Pràcticament no tòxic	no

El glifosat és pràcticament no tòxic per ingestió ($LD_{50} = 5.600$ mg/kg en rates) i en contacte amb la pell ($LD_{50} > 5.000$ mg/kg), tot i que algunes formulacions provoquen més irritació que d'altres. Per inhalació és moderadament tòxic ($LC_{50} = 5-12$ mg/l en rates) [11].

Respecte d'altres efectes més greus, fins ara no hi ha evidència que tingui efectes carcinogènics, teratològics, mutagènics, ni que afecti la reproducció (excepte quan se n'utilitzen dosis molt elevades). S'han dut a terme experiments amb rates, ratolins, conills i gossos durant dos anys per determinar-ne els efectes crònics i només s'han observat efectes sobre els ronyons i fetge en alguns experiments. Finalment, cal comentar que el glifosat pràcticament no és adsorbit pel tracte digestiu i és fàcilment excretat pels mamífers en la seva forma original. El glifosat sembla que no té tendència a acumular-se en els teixits animals.

Es pot concloure que, si s'està exposat poc temps a concentracions per sobre dels límits permesos, els efectes poden ser congestió dels pulmons i augment del ritme respiratori i si l'exposició és de més llarga durada, pot provocar danys als ronyons o efectes sobre la reproducció [14].

1.3.3. EFECTES AMBIENTALS

El glifosat s'allibera al medi ambient quan és utilitzat com a herbicida per controlar les males herbes dels cultius i altres zones (aplicacions no agrícoles). Aquests llocs poden estar prop de zones humides, de manera que el glifosat pot arribar a les aigües. També pot ser alliberat al medi ambient durant la seva fabricació, formulació, transport, emmagatzematge, venda, neteja i abocament.

La gran efectivitat que presenta i el seu ampli espectre d'aplicació (en molts casos una sola aplicació és suficient) permeten als agricultors aplicar el producte en les quantitats necessàries i no de manera excessiva, fet que redueix la seva presència en les aigües i el sòl.

Com a avantatge cal destacar que el glifosat és fortament adsorbit per la majoria de sòls, fins i tot els que tenen un baix contingut en matèria orgànica i argiles i, per tant, la probabilitat que se'n produeixi la lixiviació cap a aigües subterrànies és molt baixa, malgrat la seva elevada solubilitat en aigua. A més, els microorganismes del sòl el degraden completament en poc temps fins i tot a temperatures baixes. Com a producte majoritari d'aquesta degradació s'obté l'àcid aminometilfosfònic (AMPA), tal com es pot

veure a la **Figura 1.3**. Aquest metabòlit també es biodegrada, però més lentament que el glifosat.

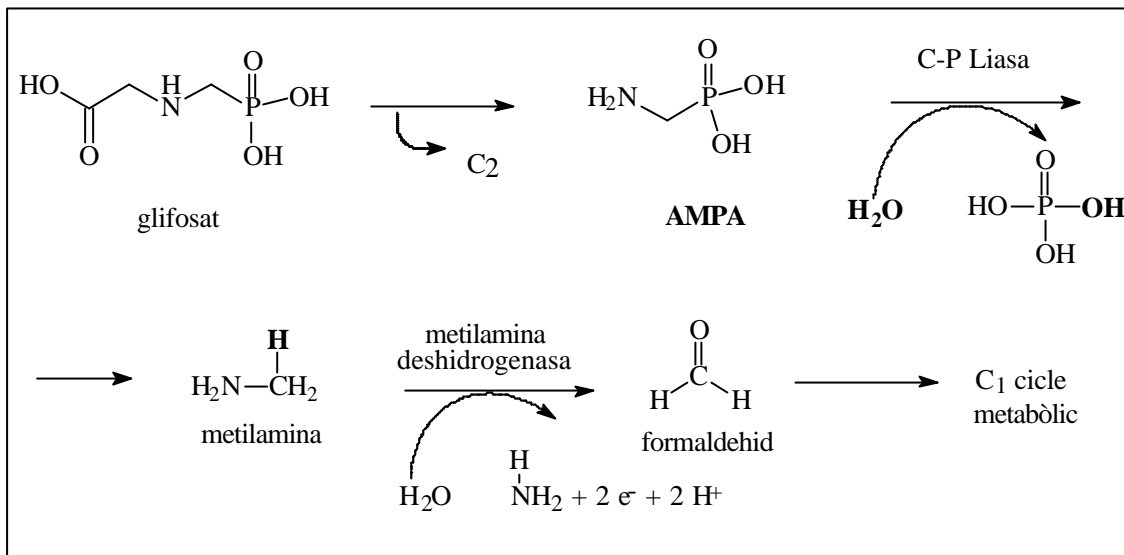


Figura 1.3. Possible via de degradació de glifosat a AMPA

Quan és present a les aigües el glifosat té tendència a adherir-se sobre les partícules de matèria orgànica en suspensió i sobre les partícules minerals i, igual que en el sòl, també és degradat pels microorganismes existents. Aquest compost no s'acumula en els organismes aquàtics.

El temps de vida mitjana de l'herbicida varia de 3 a 130 dies (la mitjana s'estima en 47 dies) [12]. El temps de vida mitjana o temps de semidegradació s'associa a la persistència del plaguicida en el medi. Quan un plaguicida resisteix els processos de transformació i a més no s'evapora, serà molt persistent, tindrà un temps de semidegradació molt llarg i un elevat potencial per contaminar les aigües subterrànies. Això és particularment cert si el mateix plaguicida és molt soluble en aigua i no s'adsorbeix al sòl. En general els plaguicides amb vides mitjanes superiors a 2-3 setmanes han de ser avaluats pel seu alt potencial de contaminació dels aqüífers.

El glifosat es considera que té una persistència moderada, tal com es veu a la classificació de la **Taula 1.4** [11].

Taula 1.4. *Persistència dels plaguicides en funció del temps de vida mitjana*

Persistència	Temps de vida mitjana
baixa	< 30 dies
moderada	30-100 dies
elevada	> 100 dies

1.3.4. REGULACIÓ

La presència de plaguicides al medi ambient i la preocupació pels seus efectes tòxics va forçar els organismes internacionals oficials a regular les concentracions màximes admissibles de plaguicides en aliments i també en les aigües, especialment les superficials i subterrànies, que són les que s'utilitzen en l'abastament per al consum humà. La Unió Europea, en la Directiva 80/778/EEC, va limitar la concentració per plaguicides individuals i productes de transformació tòxics a 0,1 µg/l i per la suma total de plaguicides a 0,5 µg/l, sense tenir en compte la seva diferent toxicitat. A més, es va establir una llista de contaminants prioritaris que s'han de monitoritzar, on s'inclouen diversos plaguicides (entre les quals no hi ha el glifosat per la seva baixa toxicitat), per protegir el medi ambient de l'impacte negatiu d'aquests compostos.

En canvi, als Estats Units, l'Agència de Protecció del Medi Ambient (EPA) va establir uns límits de concentració per cada plaguicida individualment en funció, bàsicament, de la seva toxicitat i persistència. A més, va establir una llista similar a l'europea basada en la quantitat utilitzada (>7.000 tones), la solubilitat en aigua (>30 mg/l) i el temps de vida mitjana d'hidròlisi (>25 setmanes) [15]. També es van incloure directament en la llista els plaguicides que havien estat detectats en programes de monitorització previs.

Cal dir que la llista de l'EPA és més completa i més lògica que l'europea, ja que també indica el mètode oficial d'anàlisi, i a més inclou els productes de degradació, mentre que a l'europea només s'hi fa referència lleugerament. Cal esmentar que tots els plaguicides venuts o distribuïts als Estats Units han d'estar registrats per l'EPA, basant-se en estudis

que mostrin que poden ser utilitzats de manera que no presentin un elevat risc per a la salut humana ni per al medi ambient. A més, els plaguicides han d'anar renovant el seu registre.

La regulació de glifosat als Estats Units es va fer efectiva el 1994 [14] i es va establir com a nivell màxim admissible 700 µg/l, atesa la seva baixa toxicitat. Entre el 1993 i el 1995 es van fer anàlisis freqüents de mostres d'aigua per determinar-ne la presència per sobre de 6 µg/l (que és el límit de detecció del mètode oficial). Si l'anàlisi era positiva es continuava monitoritzant.

La restrictiva regulació europea ha estat fortament criticada per diversos organismes, que consideren que el valor màxim admissible s'hauria de fonamentar en la toxicitat de cada plaguicida i aquest valor tan restrictiu només s'hauria d'aplicar a compostos dels quals no es té prou informació pel que fa a la seva toxicitat i la seva persistència en el medi. Els valors que la Unió Europea va establir per als plaguicides a l'aigua quasi sempre són inferiors als que han acceptat altres organismes internacionals, com l'Organització Mundial de la Salut (OMS) o l'EPA. Per exemple, en el cas del glifosat, el límit de la Unió Europea és de 0,1 µg/l (el mateix que per a qualsevol altre plaguicida) i el de l'OMS i l'EPA és de 700 µg/l.

Aquesta legislació europea provoca que calgui disposar de mètodes analítics prou sensibles que permetin detectar aquests compostos a nivells d'uns 0,02 µg/l (idealment 0,01 µg/l) per poder determinar-los amb prou fiabilitat al nivell exigít de 0,1 µg/l. A més, la Unió Europea també demana que com a màxim els errors (aleatoris + sistemàtics) siguin del 20 % [4]. Per aquesta raó s'han hagut de desenvolupar mètodes d'anàlisi prou sensibles i precisos per poder determinar els plaguicides als nivells exigits.

Finalment, es pot dir que, a causa de la gran utilització que se'n fa, el glifosat ha estat sotmès a diversos estudis de toxicitat i d'efectes sobre el medi ambient i les agències reguladores d'arreu del món han arribat a la conclusió que el glifosat no suposa un risc per a la salut humana ni per al medi ambient quan s'utilitza seguint les instruccions indicades al producte.

Aquestes propietats tan favorables han fet que el glifosat s'hagi convertit en un dels herbicides més utilitzats, tal com es mostra a la **Taula 1.5**, on es detallen els 10 herbicides més utilitzats arreu del món, als Estats Units i a Europa [16]. El 2000 i el 2001 va ser l'herbicida més utilitzat [17].

Taula 1.5. Els 10 herbicides més utilitzats al món, als Estats Units i a Europa als anys noranta

Herbicides	Ús al món	Estats Units	Europa
Glifosat	x	x	x
Alaclor	x	x	
Metolaclo	x	x	
Tiobencarb	x		
Paraquat	x		
2,4-D	x	x	
Atrazina	x	x	x
Propanil	x		
MCPA	x		x
Trifluralina	x	x	
Butilat		x	
EPTC		x	
Pentimetalina		x	
Cianazina		x	
Isoproturon			x
Clortoluron			x
MCPP			x
Maneb			x
Metam-sodi			x
Mancozeb			x
1,3- diclorpropè			x

1.3.5. ANÀLISI DE GLIFOSAT I EL SEU METABÒLIT AMPA

Les dificultats per establir mètodes senzills que permetin l'extracció i la determinació de glifosat i AMPA a nivells traça estan lligades a les seves propietats: elevada solubilitat en aigua, escassa solubilitat en dissolvents orgànics i capacitat complexant. Això ha fet que els mètodes per analitzar glifosat i el seu metabòlit siguin en general tediosos i complicats i que molts laboratoris no disposin de les tècniques adequades. En molts casos el que es fa és adequar un mètode per a la determinació d'aquest herbicida a l'anàlisi d'un tipus concret de mostres.

Des de la seva introducció fins a l'actualitat s'han publicat nombrosos articles en què es proposen diferents mètodes analítics per a la seva determinació en diferents matrius ambientals. Recentment, Stalikas et al. [8] han fet una revisió dels diferents mètodes publicats per a l'anàlisi de plaguicides que contenen grups fosfònics i grups aminoàcid, i que per tant inclouen glifosat i AMPA.

Un dels primers mètodes, proposat per Glass [19], és un mètode colorimètric on es mesura l'absorbància a 830 nm del fosfomolibdat després de la reacció d'oxidació del grup fosfat del glifosat amb peròxid d'hidrogen. Aquest mètode, però, només és aplicable a mostres que no contenen fòsfor.

Posteriorment la cromatografia ha esdevingut la tècnica més utilitzada. Inicialment es van proposar mètodes emprant la cromatografia en capa prima [20], però després es van començar a desenvolupar mètodes per cromatografia de gasos (GC) i líquids (LC), on era necessària una etapa de derivatització, per aconseguir la separació en GC i per millorar la detecció en LC tant amb ultraviolat-visible (UV-Vis) com amb fluorescència (FD).

Tot i que la major part de mètodes són cromatogràfics, també s'han descrit mètodes basats en noves tècniques, com l'electroforesi capil·lar (CE) i l'immunoassaig.

1.3.5.1. Mètodes cromatogràfics

1.3.5.1.1. Cromatografia de gasos (GC)

La cromatografia de gasos és una de les tècniques més utilitzades per a l'anàlisi de plaguicides en aigua. Molts mètodes oficials recomanen l'ús d'aquesta tècnica pel gran poder de resolució de les columnes capil·lars de GC, l'elevada selectivitat i sensibilitat dels detectors i la possibilitat d'acoblar el cromatògraf de gasos amb un espectròmetre de masses (MS) que permet alhora identificar i quantificar els plaguicides i, en molts casos, disminuir-ne els límits de detecció (LOD).

La tècnica és útil per a moltes classes de plaguicides, però té aplicacions més limitades quan es tracta de plaguicides que tenen caràcter polar, com el glifosat, ja que no són suficientment volàtils o no són tèrmicament estables. En aquests casos l'anàlisi directa no és possible i cal una etapa prèvia de derivatització. Per tant, el pas més crític per aconseguir un mètode reproducible i aplicable en GC és triar una reacció de derivatització robusta, simple i eficient.

S'han proposat diverses reaccions de derivatització per a la determinació de glifosat per cromatografia de gasos. A la **Taula 1.6** es pot veure una relació de diferents agents derivatitzants emprats per determinar l'herbicida i el seu metabòlit en diferents mostres ambientals.

Respecte al sistema de detecció, s'han fet servir el detector de fotometria de flama (FPD), de nitrogen-fòsfor (NPD), de captura d'electrons (ECD) i més recentment de

masses (MS). La detecció amb MS permet identificar i quantificar amb seguretat herbicides amb estructures similars i els seus metabòlits a nivell traça. Els mètodes d'ionització emprats han estat la ionització química (CI) i la ionització per impacte electrònic (EI) i els analitzadors de masses, el quadripol, la trampa iònica (*ion trap*) o l'acoblament MS-MS amb trampa iònica.

Taula 1.6. Mètodes per a la determinació de glifosat i AMPA mitjançant GC. MTBSTFA (*N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida); TFAA (anhídrid trifluoroacètic); HFB (2,2,3,3,4,4,4-heptafluoro-1-butanol); TFE (trifluoroetanol); TMOA (trimetil ortoacetat).

Agent derivatitzant	Mostra	Detector	LOD AMPA, GI	Ref.
MTBSTFA		FPD		[21]
	aigua	MS (ion trap)		[22]
TFAA-HFB	sòls, plantes, teixits animals, aigües	MS(EI), MS(CI)	0,01 mg/kg, 0,01 mg/kg	[23]
	aigua	MS-MS (ion trap)	0,05 µg/l, 0,05 µg/l	[24]
Isopropilcloroformat -diazometà	aigua, sòls, vegetals	FPD	0,8 mg/kg, 1,2 mg/kg	[25]
	aigua	FPD, NPD	10 µg/l	[26]
	plantes	NPD	0,01 mg/kg, 0,03 mg/kg	[27]
TFAA-TFE	sòls	ECD		[28]
	aigua	ECD, MS(EI)	0,09 µg/l, 0,36 µg/l	[29]
	aigua, sòls	MS(EI)	0,05 µg/l, 0,003 mg/kg	[30]
Àcid acètic-TMOA	aigua	MS(EI)	0,29 µg/l, 0,65 µg/l	[31]

1.3.5.1.2. Cromatografia de líquids (LC)

La cromatografia líquida (LC) és apropiada per a l'anàlisi de compostos polars. Per tant, és complementària a la cromatografia de gasos, ja que permet l'anàlisi de compostos làbils, no volàtils i de polaritat alta. En molts casos permet l'anàlisi multiresidual de plaguicides i dels seus productes de transformació sense derivatitzar. A més, si cal derivatització, tant es pot fer mitjançant una reacció precolumna com postcolumna, cosa que no és possible en el cas de GC. Tots aquests avantatges han contribuït al fet que la cromatografia de líquids hagi desplaçat en alguns casos la GC.

En el cas de la determinació de glifosat i AMPA, la cromatografia líquida ha estat la tècnica més utilitzada a causa de les característiques dels anàlits. Com a avantatges cal dir que permet treballar amb sistemes de separació cromatogràfica en fase reversa i a més la derivatització es pot dur a terme en solució aquosa.

La derivatització és necessària ja que el glifosat i l'AMPA no presenten grups cromòfors ni fluoròfors que en permetin la detecció espectrofotomètrica. La derivatització pot ser precolumna o postcolumna i això aporta més variabilitat de mètodes.

El mètode proposat per l'EPA per a l'anàlisi de glifosat en aigua potable (*EPA method 547*) es basa en una derivatització postcolumna i detecció per fluorescència, tal com es recull a la **Figura 1.4** [16].

EPA Method 547: Determinació de glifosat en aigua destinada al consum humà per injecció directa aquosa-LC, derivatització postcolumna i detecció per fluorescència.

- Injecció directa de mostres d'aigua filtrades (200 µl).
- Columna LC: columna LC d'intercanvi catiònic, 250 x 4,6 mm, Bio-Rad Aminex A-9, 65 °C, precolumna, empaquetament C₁₈.
- Fase mòbil: isocràtic, 0,005 M KH₂PO₄ i metanol, 96:4 v/v.
- Després de l'elució a 65 °C, oxidació amb hipoclorit càlcic; el producte (glicina) es barreja amb o-ftaldehid (OPA) i 2-mercaptoetanol (MERC) a 38 °C per obtenir un derivat altament fluorescent.
- Detecció amb fluorescència, excitació a 340 nm, i detecció i emissió mesurada a >455 nm
- LOD: 6,0 µg/l en aigua potable; 9,0 µg/l en aigua subterrània

Figura 1.4. Mètode proposat per l'EPA per a l'anàlisi de glifosat.

Diferents autors han proposat mètodes alternatius al recomanat per l'EPA per a la determinació de glifosat mitjançant una derivatització postcolumna. A la **Taula 1.7** es poden veure diferents agents derivatitzants que s'han fet servir. Entre aquests, el més emprat ha estat el mateix que proposa l'EPA en el seu mètode oficial, l'o-ftaldehid-2-mercaptoetanol (OPA-MERC).

Taula 1.7. Agents derivatitzants postcolumna que s'han utilitzat per a la determinació de glifosat i AMPA mitjançant HPLC. (FD fluorescència; ECL quimioluminiscència)

Agent derivatitzant	Mostra	Detecció	LOD AMPA, GI	Ref.
OPA-MERC	aigua, cultius	FD (340 nm, 455 nm)	0,05 mg/kg, 0,05 mg/kg	[32]
	aigua	FD (230 nm, 418 nm)	0,4 µg/l, 1 µg/l	[33]
	cultius	FD (230 nm, 418 nm)	0,05 mg/kg, 0,07 mg/kg	[34]
	aigua	FD (340 nm, 455 nm)	2 µg/l, 2 µg/l	[35]
	aigua	FD (330 nm, 465 nm)	4 µg/l, 2 µg/l	[36]
ninhidrina	sòls, sediments, plantes	UV-Vis (570 nm)		[37]
		UV-Vis (570 nm)	0,98 mg/l	[38]
Al ³⁺ - Morin	formulació	FD (400 nm, 480 nm)	14 mg/l, 40 mg/l	[39]
Tris(2,2'-bipiridil)-ruteni(II)		ECL	(només GI) 1,7 µg/l	[40]

Pel que fa a la derivatització precolumna, també ha estat àmpliament utilitzada (vegeu la **Taula 1.8**). El reactiu més emprat en aquest cas és el 9-fluorenilmetil cloroformat (FMOC). És un compost comercial, que reacciona amb els grups amino i que té una part no polar fluorescent. El compost glifosat-FMOC es forma fàcilment en medi alcalí i es pot detectar amb fluorescència a 315 nm.

Tot i que amb algun agent derivatitzant s'ha fet servir detecció UV-Vis, la detecció amb fluorescència ha estat el mètode més recomanat i emprat, ja que proporciona límits de detecció més baixos i més selectivitat. Això sí, també és interessant remarcar que en

general la resposta lineal d'un detector d'UV-Vis inclou més ordres de magnitud que en el cas d'un detector de fluorescència.

Com que els detectors emprats en HPLC no permeten identificar els anàlits, recentment s'han proposat mètodes amb LC-MS que permeten la confirmació de la presència o absència dels anàlits.

Taula 1.8. Agents derivatitzants precolumna que s'han utilitzat per a l'anàlisi de glifosat i AMPA mitjançant HPLC.

Agent derivatitzant	Mostra	Detecció	LOD AMPA, GI	Ref.
FMOOC		FD (270 nm, 315 nm)		[41]
	aigua, sòl	FD (254 nm, 313 nm)	(només GI) 10 µg/l, 5 mg/kg	[42]
	aigua	FD (270 nm, 315 nm)	5 µg/l, 10 µg/l	[43]
	sòl	FD (270 nm, 315 nm)	(només GI) 0,5 mg/kg	[44]
	aigua	FD(263 nm, 317 nm)	1 µg/l, 1 µg/l	[45]
	sòls	FD (263 nm, 317 nm)	10 µg/kg	[46]
	aigua residual	ESI/MS	0,03 µg/l, 0,03 µg/l	[47]
	cultius	FD(263 nm, 317 nm)	(només GI) 0,5 mg/kg	[48]
	aigua, plantes	ES/MS	0,3 µg/l, 0,06 µg/l 0,11 mg/kg, 0,53 mg/kg	[49]
1-fluoro-2,4-dinitrobenzè	sòls	UV-Vis (405 nm)	0,1 mg/kg, 0,05 mg/ kg	[50]
clorur de <i>p</i> -toluensulfonil	aigua, sòls	UV-Vis (240 o 280 nm)	8 µg/l, 10 µg/l	[51]
	sèrum	UV-Vis (240 nm)	0,2 mg/l, 0,3 mg/l	[52]

Sancho et al. [45] van proposar un mètode per a l'anàlisi de glifosat i AMPA amb injecció de volums grans i acoblament LC-LC. Aquest mètode havia estat optimitzat prèviament per a l'herbicida glufosinat [53], que té una estructura similar al glifosat, i després es va adaptar amb èxit per analitzar també glifosat i AMPA per separat o de

manera conjunta amb glufosinat (anàlisi multiresidual). Aquest mètode basat en LC-LC es comentarà més àmpliament en el **capítol 4**.

1.3.5.1.3. Cromatografia iònica (IC)

Des que es va introduir als anys setanta, la cromatografia iònica (IC) ha esdevingut una eina útil per determinar substàncies iòniques. Com que el glifosat presenta un grup fosfat fortament ionitzat com a conseqüència de les seves propietats àcid-base, alguns autors han proposat mètodes basats en aquesta tècnica, perquè és senzilla, ràpida i econòmica. Zhu et al. [54] determinen glifosat per IC amb supressió de conductivitat i detector electroquímic. El límit de detecció que s'obté és de 42 µg/l. Bauer et al. [55] també han descrit un mètode on determinen l'herbicida mitjançant l'acoblament IC-ES-MS i en aquest cas no és necessària una etapa de derivatització i el límit de detecció obtingut és d'1 µg/l.

1.3.5.2. Mètodes no cromatogràfics

1.3.5.2.1. Electroforesi capil·lar (CE)

L'electroforesi capil·lar en els seus inicis es va aplicar principalment per a l'anàlisi bioquímica, però recentment s'ha estès a tots els camps de l'anàlisi química. És una tècnica que permet separacions ràpides i eficients de compostos iònics, ionitzables i neutres i per tant pot ser complementària de GC i LC.

Dels diferents modes de treball que presenta la CE, els més habituals per a l'anàlisi d'herbicides són: l'electroforesi capil·lar de zona (CZE), la micel·lar (MEKC) i l'electrocromatografia (CEC).

Per a l'anàlisi de glifosat hi ha diversos mètodes publicats, en general molt recents. S'ha dut a terme l'anàlisi amb detecció indirecta tant amb UV-Vis [56] com amb fluorescència [57], ja que, com s'ha comentat, ni el glifosat ni l'AMPA no tenen grups cromòfors ni fluoròfors que absorbeixin. Altres autors proposen reaccions de derivatització dels anàlits amb reactius com clorur de *p*-toluensulfonil [58], on la detecció és amb UV a 240 nm, però s'obtenen límits de detecció de l'ordre dels mg/l o reactius com 5-(4,6-diclorotriazinilamino) fluoresceïna (DTAF) [59] on es fa servir un detector de fluorescència

induïda amb làser (LIF). Aquest darrer mètode proporciona LOD de 0,16 µg/l per a glifosat i 0,06 µg/l per a AMPA.

Molt recentment també s'ha descrit un mètode on s'ha acoblat CE-MS per determinar glifosat, glufosinat i els seus respectius metabòlits [60].

En conclusió, es pot dir que en els primers mètodes proposats els límits de detecció eren elevats (de l'ordre dels mg/l), però en els mètodes més actuals s'han aconseguit rebaixar fins a assolir l'ordre dels µg/l.

1.3.5.2.2. Immunoassaig (ELISA)

La immunoquímica inicialment es va fer servir en l'àmbit mèdic i biològic; la seva introducció en l'anàlisi ambiental és força recent a causa principalment de la dificultat d'aconseguir anticossos per molècules petites [61].

Actualment cada cop té més acceptació la determinació de plaguicides utilitzant mètodes immunoquímics perquè són una alternativa simple, ràpida i de cost baix als mètodes cromatogràfics, sobretot quan s'analitzen un nombre elevat de mostres i/o es fan anàlisis *in situ*.

El ràpid desenvolupament dels mètodes immunoquímics en la determinació de plaguicides és degut en part a l'obtenció d'anticossos monoclonals i policlonals per una gran varietat d'aquests compostos.

En el cas del glifosat els mètodes que fan ús de la tècnica ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) són molt recents, i tot i que en el primer mètode proposat els límits de detecció eren de l'ordre de mg/l [62], en els mètodes més recents s'han obtingut límits de l'ordre dels µg/l. Lee et al. [17] comparen dos mètodes: ELISA i SPE-HPLC-MS per a l'anàlisi de glifosat en aigua superficial i subterrània i arriben a la conclusió que els dos mètodes són molt adequats, ja que proporcionen límits de detecció molt baixos (< 0,1 µg/l), però que per ELISA, per a concentracions inferiors a 1 µg/l, es necessita confirmació per HPLC-MS. Això sí, el mètode ELISA és ràpid i, a més, el volum necessari de mostra és molt petit (200 µl).

Rubio et al. [63] recentment han proposat un altre mètode ELISA on també es compara la tècnica amb els resultats obtinguts amb HPLC-FD. Els LOD que obtenen també són molt baixos i dintre del que exigeixen les directives oficials, i a més demostren que la tècnica té un cost baix, és prou sensible i és un mètode eficient per a la determinació

de glifosat en mostres aquoses. A més, l'efecte matriu no afecta gaire, a diferència del que succeeix amb HPLC. En aquest cas, els LOD obtinguts són més elevats pel mètode HPLC que per l'ELISA.

En conclusió, cal dir que la tècnica ELISA és una eina molt valuosa que pot complementar mètodes analítics existents.

Per tant, cal destacar que s'han proposat molts mètodes diferents per a l'anàlisi de glifosat i AMPA. La majoria de les publicacions existents es basen en l'anàlisi mitjançant LC a causa de l'elevada polaritat d'aquests anàlits, que li confereix unes característiques on l'anàlisi per LC és més idònia que per GC. Actualment hi ha un augment dels mètodes amb acoblament amb espectrometria de masses, GC-MS, LC-MS i CE-MS, ja que aquesta ha esdevingut una tècnica que permet la identificació i quantificació dels compostos amb límits de detecció cada cop més baixos i és a l'abast de molts laboratoris.

Cal esmentar, però, que en molts casos és difícil arribar als nivells exigits per la normativa europea (0,1 µg/l) si només s'aplica la tècnica instrumental. Per això sovint és necessària una etapa de preconcentració prèvia a l'anàlisi cromatogràfica.

1.4. EXTRACCIÓ I/O PRECONCENTRACIÓ

El desenvolupament d'un mètode analític implica diferents etapes des de la presa de mostra i el seu tractament fins a la detecció dels anàlits d'interès. S'ha estimat que, del temps total de l'anàlisi, dos terços corresponen a la preparació i pretractament de la mostra abans de la determinació final, i a més és en aquestes etapes on es troben les principals fonts d'errors del procés analític.

La preconcentració dels anàlits és necessària quan la seva concentració és baixa o quan el volum de la mostra que pot ser introduït al sistema d'anàlisi és petit. D'aquesta manera es poden superar els límits dels sistemes de detecció.

Una altra etapa important sol ser la purificació de la mostra (*clean-up*) que s'ha de dur a terme quan cal eliminar compostos que poden interferir en la detecció dels anàlits d'interès (per exemple, si les interferències i els anàlits es coelueixen i es detecten a la mateixa longitud d'ona en un detector UV-Vis) o per eliminar compostos que poden afectar

el funcionament de l'instrument (per exemple, la ionització d'un anàlit en la interfase d'un espectròmetre de masses).

A més, els anàlits han d'estar en un dissolvent que sigui compatible amb el sistema analític, és a dir, en cromatografia de gasos el dissolvent ha de ser volàtil, i en cromatografia de líquids ha de ser miscible amb la fase mòbil.

En els mètodes proposats en la bibliografia i en molts mètodes oficials la majoria dels pretractaments de les mostres es basen en procediments manuals i llargs que s'han fet servir des de fa temps i que en general consumeixen quantitats importants de dissolvents orgànics tòxics. Per tant, cal el desenvolupament de nous mètodes de tractament de la mostra més ràpids, on hi hagi les mínimes etapes possibles, que es puguin automatitzar i que utilitzin la mínima quantitat possible de dissolvents tòxics.

Els mètodes per a l'extracció i preconcentració dels plaguicides són bàsicament l'extracció líquid-líquid (LLE) i l'extracció en fase sòlida (SPE), però recentment s'han desenvolupat altres tècniques com les membranes líquides (LM) i la microextracció en fase sòlida (SPME). La tècnica recomanada pels mètodes oficials durant molt de temps ha estat LLE a causa fonamentalment de la seva simplicitat.

L'extracció líquid-líquid es basa en la distribució dels compostos orgànics entre la mostra aquosa i un dissolvent orgànic immiscible. L'eficiència del solvent extractant depèn de l'afinitat de l'anàlit per aquest solvent (mesurada amb el coeficient de partició), de la relació de volums de les dues fases i del nombre d'extraccions. Un avantatge de LLE és la gran varietat de dissolvents orgànics existents, cosa que facilita el fet de trobar-ne un d'adient per a l'anàlit en qüestió. Això és especialment cert en el cas de tenir anàlits no polars o lleugerament polars. En aquests casos els dissolvents més utilitzats són l'hexà, el ciclohexà, el diclorometà i el cloroform, tot i que aquests dos últims presenten una toxicitat força elevada.

Per compostos polars com el glifosat la tècnica no és gaire adient per preconcentrar, perquè aquests compostos són difícils d'extreure a partir de mostres aquoses. Aquesta és una de les limitacions que presenta la tècnica. Cal recordar que el glifosat és molt soluble en aigua i insoluble en la majoria de dissolvents orgànics; per tant, l'extracció no es pot dur a terme amb els dissolvents adequats per a l'extracció líquid-líquid clàssica.

Per aconseguir una preconcentració elevada cal aplicar després de l'extracció una etapa d'evaporació, ja que, en el cas d'anàlisi de plaguicides, l'extracció es realitza amb un volum força elevat de dissolvent orgànic (el volum de la mostra aquosa inicial sol ser d'un litre).

En resum, es poden esmentar com a avantatges de la tècnica la seva simplicitat i que l'utilitat que es requereix és senzill i econòmic. A més, permet l'extracció dels contaminants tant de l'aigua com de la matèria orgànica en suspensió, ja que no cal filtrar abans de l'extracció.

Els principals inconvenients que presenta LLE són la possible formació d'emulsions que en alguns casos són difícils de trencar, la utilització de volums grans de dissolvents orgànics tòxics i/o inflamables, la dificultat d'automatització i les pèrdues que es poden produir durant les etapes de transferència i evaporació. Per tots aquests factors, l'extracció líquid-líquid es descriu com una tècnica tediosa, llarga, cara i que genera residus tòxics.

Per al glifosat, com ja s'ha comentat, l'aplicació de LLE en mostres aquoses no és possible a causa de la seva polaritat. En canvi, sí que existeixen diverses publicacions, recentment revisades [64], on s'ha aplicat extracció amb dissolvent a mostres d'aliments com cereals, fruits, vegetals, etc. En aquests casos l'extracció s'ha dut a terme amb aigua o aigua amb cloroform sovint a pH àcid. El problema és que també s'extreuen altres compostos solubles en aigua, com aminoàcids, que interfereixen en la determinació de glifosat. Per solucionar-ho cal aplicar una etapa de *clean-up* on es purifiquen els extractes mitjançant columnes de bescanvi iònic.

Una alternativa a l'extracció líquid-líquid tradicional és l'extracció i preconcentració mitjançant la tècnica de **membranes líquides**. En essència, es pot dir que és una tècnica que combina dues extraccions líquid-líquid en un sol pas. Proporciona factors de concentració elevats, així com un bon *clean-up*, i a més només es necessiten pocs mil·lilitres de dissolvent orgànic. Al **capítol 2** d'aquesta memòria es comentarà més extensament aquesta tècnica.

La tendència actual en l'extracció i purificació de plaguicides és utilitzar l'**extracció en fase sòlida (SPE)** per tot un seguit d'avantatges:

- Simplicitat i rapidesa
- Ús mínim de dissolvents orgànics
- Recuperacions i factors de concentració elevats (>1.000)
- Facilitat d'automatització i acoblament en línia amb les tècniques cromatogràfiques.

L'extracció en fase sòlida, o extracció sòlid-líquid, és un mètode de preparació de mostra que concentra i purifica els anàlits d'una solució mitjançant l'adsorció en un cartutx que conté una fase sòlida, seguit de l'elució de l'anàlit amb un dissolvent apropiat per a l'anàlisi instrumental.

En general, el volum necessari per aconseguir l'elució dels anàlits és molt inferior al volum de mostra aplicat i d'aquesta manera s'aconsegueixen factors de concentració elevats.

El volum de mostra tractat normalment es tria en funció de les necessitats del pas de la detecció instrumental, i com que en general s'ha millorat la sensibilitat dels detectors, els volums aplicats a SPE han disminuït. Cal esmentar que la quantitat que es pot processar depèn del volum de trencament del sorbent, la concentració de la matriu, el flux de pas i la massa de sorbent [65].

La tècnica va ser desenvolupada a mitjans dels anys setanta com una alternativa a l'extracció líquid-líquid. Les limitacions de LLE, com la formació d'emulsions, l'ús de volums elevats de dissolvents orgànics i la dificultat d'automatització, s'han superat amb SPE, com ja s'ha comentat.

No hi ha dubte que l'extracció en fase sòlida ha esdevingut el mètode triat per dur a terme simultàniament l'extracció i concentració de molts plaguicides en mostres aquoses. Tot i que, com s'ha dit, fa més de vint anys que es va introduir la tècnica i hi ha moltes publicacions des d'aleshores, ha estat la seva introducció en els mètodes oficials, sobretot per l'EPA, el que més n'ha afavorit el desenvolupament [16].

L'extracció en fase sòlida consisteix en 4 etapes que es mostren a la **Figura 1.5**: condicionament, adsorció, rentat i elució [66,67].

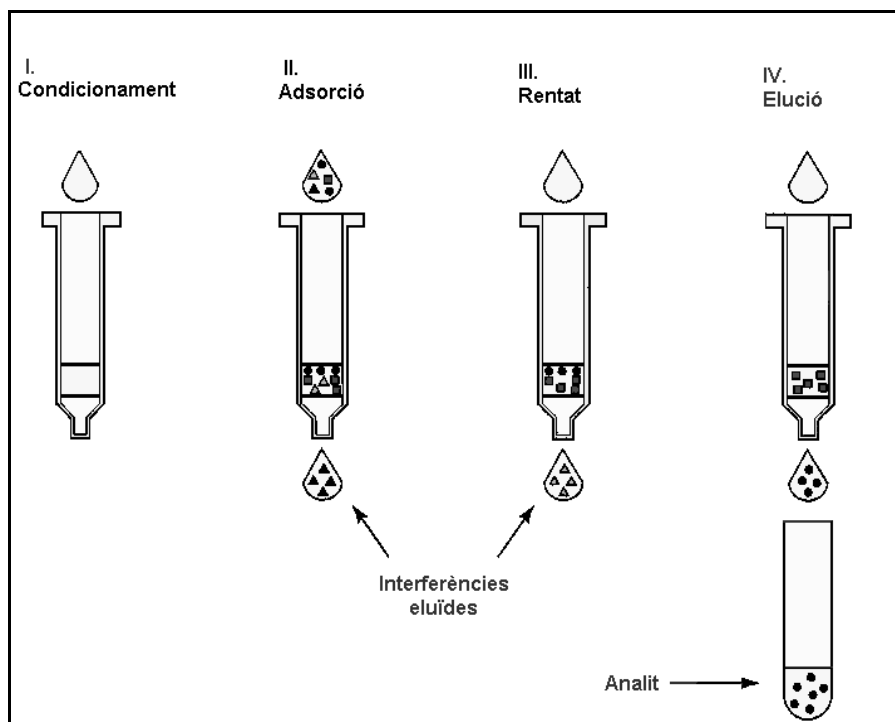


Figura 1.5. Etapes del procés d'extracció en fase sòlida (SPE).

El mecanisme que té lloc entre el sorbent i l'anàlit es pot classificar en: fase reversa, fase normal i bescanvi iònic.

La *fase reversa* implica la distribució dels soluts orgànics d'una fase mòbil polar, com aigua, en una fase no polar, el sorbent. La interacció són forces de Van der Waals (no polars). Els anàlits més hidrofòbics seran més retinguts en aquest tipus de sorbent. Per eluir els anàlits es fa servir un dissolvent com metanol, acetonitril o acetat d'etil, generalment. Si els anàlits són molt hidrofòbics, a vegades s'aplica una barreja 1:1 de clorur de metilè i acetat d'etil.

Els sorbents de fase reversa més habituals estan formats pels grups funcionals octil (C-8), octadecil (C-18), etil (C-2), ciclohexil i fenil lligats químicament al gel de sílice.

Els sorbents polimèrics com els copolímers d'estirè-divinilbenzè (PS-DVB) i els materials de carbó actiu i carbó grafititzat també són molt utilitzats, ja que tenen àrees superficials elevades (600-1200 m²/g), capacitat alta a causa de l'elevat percentatge de carboni i una superfície força hidrofòbica.

La *fase normal* implica l'adsorció dels anàlits, dissolts en una fase orgànica, en un sorbent de caràcter polar. En aquest cas les interaccions són bàsicament per ponts d'hidrogen i interaccions dipol-dipol. Per a l'elució dels anàlits cal triar l'eluent tenint en compte la seva força eluotròpica.

Els sorbents més emprats són la sílice, l'alúmina, el silicat de magnesi (Florisil) i els adsorbents que contenen grups funcionals del tipus cianopropil (CN), aminopropil (NH₂) i diol (COHCOH) units químicament al gel de sílice.

El *bescanvi iònic* consisteix en la interacció entre el solut orgànic carregat dissolt en un solvent polar o no polar i el sorbent de bescanvi iònic que presenta una càrrega oposada a la de l'anàlit. En general els ions bescanviabls del sorbent estan units als grups funcionals o grups actius d'aquest a través de forces electrostàtiques.

Els factors que afecten el bescanvi iònic són la càrrega de l'anàlit que s'intercanvia així com la càrrega dels ions que competeixen amb ell. Com més elevada és la càrrega més gran és la retenció que es produeix.

Existeixen molts tipus de bescanviadors, però destacarem les resines sintètiques de bescanvi iònic, utilitzades àmpliament per la seva elevada estabilitat química i mecànica, la gran capacitat que presenten, la seva alta velocitat de bescanvi i la seva versatilitat [68]. Aquestes resines es comentaran al **capítol 4**.

Una de les limitacions principals de les resines de bescanvi iònic és la manca de selectivitat. La millora en aquest aspecte es va aconseguir amb el desenvolupament de les *resines quelants* (o *coordinants*), que són polímers amb grups funcionals units covalentment a la matriu polimèrica i que contenen un o més àtoms donadors que poden coordinar-se amb ions metàl·lics o amb els seus complexos. D'aquestes resines se'n parlarà amb més profunditat al **capítol 3** de la present memòria.

Com a conseqüència de l'evolució de la tècnica de SPE han aparegut noves tècniques, com la **microextracció en fase sòlida** (SPME). Aquesta tècnica va ser desenvolupada per Pawliszyn el 1990 i actualment, a causa de la seva gran versatilitat, s'està aplicant per a l'anàlisi de diferents anàlits, entre els quals s'hi troben els plaguicides. La primera aplicació per als herbicides va ser descrita el 1995 i des de llavors s'han proposat diversos mètodes per a famílies diverses [69].

És una tècnica ràpida i simple que es basa en la distribució dels anàlits entre una fase adsorbent immobilitzada en una fibra de sílice fosa i la matriu de la mostra, seguit de la desorció tèrmica dels compostos adsorbits, una vegada s'ha assolit l'equilibri o després d'un temps establert, mitjançant l'exposició de la fibra al port d'injecció d'un GC o bé redissolent els compostos en un dissolvent orgànic si l'anàlisi es duu a terme amb LC [70].

SPME presenta com a avantatges la seva simplicitat, el baix cost, l'absència de dissolvents, la rapidesa i la sensibilitat en combinació amb GC. Requereix quantitats de mostra petites i per tant, es pot aplicar quan el volum de mostra de què es disposa és limitat. A més, l'automatització és fàcil i els límits de detecció que s'obtenen són baixos.

Una de les principals limitacions és que els tipus de fibres existents són limitats, sobretot en el cas de plaguicides amb caràcter polar. Per això probablement no es troba actualment a la bibliografia l'aplicació d'aquesta tècnica per a glifosat, tot i que els grans avenços que s'estan duent a terme constantment en la tecnologia de polímers fan previsible en un futur proper el desenvolupament de noves fases adsorbents que permetin aplicar SPME a l'anàlisi de glifosat i AMPA.

1.5. REFERÈNCIES

1. E. Pramauro. *Els pesticides i el medi ambient*. Servei de Publicacions Universitat de València (1990).
2. F. López Crespí, J. Obiols, P.J. Subías, "Plaguicidas agrícolas y salud", dins: I. Morell, L. Candela (ed.). *Plaguicidas. Aspectos ambientales, analíticos y toxicológicos*. Publicacions de la Universitat Jaume I (Castelló) (1998) 273.
3. R. De Prado, J. V. Jorrín (ed.), *Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI*, Servicio de Publicaciones de la Universidad de Córdoba (2001). II Symposium Internacional (2-6 abril 2001). Capítulo 1: "Historical development of herbicides in agriculture", R. Bulcke, 1.
4. D. Barceló, J. Chromatogr. A, 643 (1993) 117.
5. http://www.monsanto.com/monsanto/content/products/productivity/roundup/back_history.pdf (consultada el 28/08/03).
6. J. A. Sikorski, K. J. Gruys, Accounts.Chem.Res. 30 (1997) 2.
7. W. A. Shuttleworth, J. N. S. Evans, Biochemistry, 33 (1994) 7062.
8. A.M.Christensen, J.Schaefer, Biochemistry, 32 (1993) 2868.
9. M. R. Marzabadi, K. J. Gruys, P. D. Pansegran, M. C. Walker, H. K. Yuen, J. A. Sikorski, Biochemistry, 35 (1996) 4199.
10. <http://infoventures.com/e-hlth/pesticide/glyphos.html>(consultada el 28/08/03).
11. M.A. Kamrin. *Pesticide Profiles. Toxicity, Environmental Impact, and Fate*. Lewis Publishers (EUA) (1997).
12. A. G. Hornsby, R. D. Wauchope, A. E. Herner. *Pesticide properties in the environment*. Ed. Springer, Nova York (EUA) (1996), 122.
13. I. Marqués, V. Salvadó, M. Hidalgo. "A potentiometric study of the acid-base properties of glyphosate herbicide and its metabolic product, AMPA", comunicació presentada al XII Italian- Spanish Congress on Thermodynamics of Metal Complexes ISMEC, Parma (Italia) (2001)
14. http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw_contamfs/glyphosa.html (consultada el 05/05/03).
15. A. Martín-Esteban, P. Fernández, A. Fernández-Alba, C. Cámara, Quim. Anal., 17(2) (1998) 51.
16. D. Barceló, M.-C. Hennion, *Trace Determination of Pesticides and their Degradation Products in Water*, Elsevier Science, Amsterdam (Holanda) (1997).
17. E. A. Lee, L. R. Zimmerman, B. S. Bhullar, E. M. Thurman, Anal. Chem, 74 (2002) 4937.
18. C. D. Stalikas, C. N. Konidari, J. Chromatogr. A, 907 (2001) 1.
19. R. L. Glass, Anal. Chem., 53 (1981) 921.

20. J. C. Young, S. U. Khan, P. B. Marriage, *J. Agric. Food Chem.*, 25 (1977) 918.
21. H. A. Moye, C. L. Deyrup, *J. Agric. Food Chem.* 32 (1984) 192.
22. N. Tsunoda, *J. Chromatogr.* 637 (1993) 167.
23. P. L. Alferness, Y. Iwata, *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 2759.
24. A. Royer, S. Beguin, J. C. Tabet, S. S. Hulot, M. A. Reding, P. Y. Communal, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3826.
25. H. Kataoka, S. Ryu, N. Sakiyama, M. Makita, *J. Chromatogr. A*, 726 (1996) 253.
26. C.L. Deyrup, S. Chang, R.A. Weintraub, H.A. Moye, *J. Agric. Food Chem.* 33 (1985) 944.
27. S.K. Konar, D.N. Roy, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 277.
28. P. L. Eberbach, L. A. Douglas, *J. Agric. Food Chem.* 39 (1991) 1776.
29. C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, M. I. Karayannis, *Chromatographia* 51 (2000) 741.
30. E. Boerjesson, L. Torstensson, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 207.
31. C. D. Stalikas, G. A. Pilidis, *J. Chromatogr. A* 872 (2000) 215.
32. J. E. Cowell, J. L. Kunstman, P. J. Nord, J. R. Steinmetz, G. R. Wilson, *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 955.
33. Y.Y. Wigfield, M. Lanouette, *Anal. Chim. Acta*, 233 (1990) 311
34. Y.Y. Wigfield, M. Lanouette, *J. AOAC Int.* 74 (5) (1991) 842
35. M. P. Abdullah, J. Daud, K. S. Hong, C. H. Yew, *J. Chromatogr. A* 687 (1995) 363.
36. E. Mallat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 129.
37. D. G. Thompson, J. E. Cowell, R. J. Daniels, B. Staznik, L. M. McDonald, *J. AOAC Int.* 72 (1989) 355.
38. K. M. S. Sundaram, J. Curry, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 20 (1997) 511.
39. M. J. Lovdahl, D. J. Pietrzyk, *J. Chromatogr.* 602 (1992) 197.
40. J. S. Ridlen, G. J. Klopff, T. A. Nieman, *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 195.
41. H. A. Moye, A. J. Boning Jr., *Anal. Lett.* 12 (1979) 25.
42. R. L. Glass, *J. Agric. Food Chem.* 31 (1983) 280.
43. C. J. Miles, L. R. Wallace, H. A. Moye, *J. AOAC Int.* 69 (3) (1986) 458.
44. C. J. Miles, H. A. Moye, *J. Agric. Food Chem.* 36 (1988) 486.
45. J. V. Sancho, F. Hernandez, F. J. Lopez, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. Van Zoonen, *J. Chromatogr. A* 737 (1996) 75.
46. J. V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernandez, F. J. Lopez, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62 (1996) 53.
47. R. J. Vreeken, P. Speksnijder, I. Bobeldijk-Pastorova, Th. H. M. Noij, *J. Chromatogr. A* 794 (1998) 187.
48. E. A. Hogendoorn, F. M. Ossendrijver, E. Dijkman, R. A. Baumann, *J. Chromatogr. A* 833 (1999) 67.

49. L. Grey, B. Nguyen, P. Yang, J. AOAC Int. 84 (6) (2001) 1770
50. L. N. Lundgren, J. Agric. Food Chem. 34 (1986) 535.
51. S. Kawai, B. Uno, M. Tomita, J. Chromatogr. 540 (1991) 411.
52. M. Tomita, T. Okuyama, S. Watanabe, B. Uno, S. Kawai, J. Chromatogr. 566 (1991) 239.
53. J. V. Sancho, F. J. Lopez, F. Hernandez, E.A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, J. Chromatogr. A 678 (1994) 59.
54. Y. Zhu, F. Zhang, C. Tong, W. Liu, J. Chromatogr. A 850 (1999) 297.
55. K. H. Bauer, T. P. Knepper, A. Maes, V. Schatz, M. Voihsel, J. Chromatogr. A 837 (1999) 117.
56. M. G. Cikalo, D. M. Goodall, W. Matthews, J. Chromatogr. A 745 (1996) 189.
57. S. Y. Chang, C.-H., Liao, J. Chromatogr. A, 959 (2002) 309.
58. M. Tomita, T. Okuyama, Y. Nigo, B. Uno, S. Kawai, J. Chromatogr. 571 (1991) 324.
59. M. Molina, M. Silva, Electrophoresis, 23 (2002) 1096.
60. L. Goodwin, J. R. Startin, B. J. Keely, D. M. Goodall, J. Chromatogr. A, 1004 (2003) 107.
61. M. Bouzige, V. Pichon, Analisis, 26 (6) (1998) M112.
62. B. S. Clegg, G. R. Stephenson, J. C. Hall, J. Agric. Food Chem., 47 (1999) 5031.
63. F. Rubio, L. J. Veldhuis, B. S. Clegg, J. R. Fleeker, J. C. Hall, J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 691.
64. J. L. Tadeo, C. Sánchez-Brunete, R. A. Pérez, M. D. Fernández, J. Chromatogr. A, 882 (2000) 175.
65. C. F. Poole, Trac-Trends Anal. Chem., 22 (6) (2003) 362.
66. J. S. Fritz, *Analytical Solid-Phase Extraction*, Wiley-VCH, Nova York (EUA) (1999).
67. E. M. Thurman, M.S. Mills, *Solid-Phase Extraction. Principles and Practice*, John Wiley & Sons, INC., Nova York (EUA) (1998).
68. F. Helfferich, *Ion Exchange*, McGraw-Hill Book Company Inc., Nova York (EUA) (1962).
69. L. J. Krutz, S. A. Senseman, A. S. Sciumbato, J. Chromatogr. A, 999 (2003) 103.
70. J. Pawliszyn, *Solid-phase microextraction. Theory and practise*, Wiley, Nova York (EUA) (1997).

1.6. OBJECTIUS

Com s'ha comentat en la introducció, el glifosat és un herbicida molt utilitzat i, per tant, és de gran interès el seu control analític en les aigües naturals. Les baixes concentracions d'aquest compost i del seu metabòlit AMPA fan que sigui necessari dur a terme una etapa de preconcentració abans de la seva determinació per cromatografia líquida.

L'objectiu principal de la tesi doctoral és l'avaluació de diferents tècniques de preconcentració per a la determinació de l'herbicida i el seu metabòlit en aigües naturals.

Concretament, els estudis recollits en aquest treball s'han adreçat a la consecució dels objectius següents:

1. Dissenyar un sistema de membrana líquida suportada que permeti el transport i la preconcentració de glifosat i AMPA presents en mostres d'aigües naturals.
2. Avaluar l'aplicació de la tècnica de cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC) amb la resina Spheron Oxine 1000 carregada amb pal·ladi (II) en la purificació i preconcentració dels anàlits.
3. Estudiar la influència de la matriu i el grup funcional en la preconcentració de glifosat i AMPA amb la tècnica IMAC mitjançant la comparació entre les resines quelants Spheron Oxine 1000, Spheron Thiol 1000 i Iontosorb Oxin 100.
4. Optimitzar un mètode de determinació de glifosat i AMPA en aigües naturals amb acoblament de dues columnes de cromatografia líquida (LC-LC) per assolir concentracions inferiors a 0,1 µg/l. Aplicació a l'anàlisi d'aigües naturals prèvia concentració amb la resina de bescanvi iònic Amberlite® IRA-900.

CAPÍTOL 2

DISSENY D'UN SISTEMA DE MEMBRANA LÍQUIDA PER AL
TRANSPORT DE GLIFOSAT I AMPA

CONTINGUTS CAPÍTOL 2:

2.1. INTRODUCCIÓ A LES MEMBRANES LÍQUIDES	49
2.1.1. CONFIGURACIONS DE LES MEMBRANES LÍQUIDES	51
2.1.1.1. Membranes líquides de volum.....	52
2.1.1.2. Membranes líquides emulsionades.....	52
2.1.1.3. Membranes líquides suportades.....	52
2.1.2. MEMBRANES LÍQUIDES SUPORTADES (SLM)	53
2.1.2.1. Transportadors o extractants.....	54
2.1.2.2. Avantatges i limitacions de les SLM.....	55
2.1.2.3. Aplicacions de les membranes líquides suportades.....	57
2.2. EXPERIMENTAL.....	61
2.2.1. REACTIUS.....	61
2.2.2. DISSOLUCIONS	62
2.2.3. APARELLS I MATERIAL.....	62
2.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	63
2.2.4.1. Anàlisi de glifosat i AMPA.....	63
2.2.4.1.1. Mètode 1: detecció amb UV-Vis	63
2.2.4.1.2. Mètode 2: detecció amb fluorescència.....	65
2.2.4.2. Experiments de membranes líquides suportades.....	66
2.2.4.2.1. Membranes laminars	66
2.2.4.2.2. Fibra buida (<i>hollow fiber</i>)	68
2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	70
2.3.1. DISSENY DEL SISTEMA QUÍMIC.....	70
2.3.1.1. Composició de la fase de càrrega.....	72
2.3.1.2. Composició de la fase receptora.....	74
2.3.1.3. Composició de la fase orgànica.....	77
2.3.1.3.1. Extractant	77
2.3.1.3.2. Dissolvent orgànic.....	79
2.3.2. CARACTERITZACIÓ DEL TRANSPORT DE GLIFOSAT I AMPA.....	81
2.3.2.1. Influència de la concentració d'Aliquat 336.....	82
2.3.2.2. Efecte de la composició de la fase receptora sobre la permeabilitat.....	83
2.3.2.3. Influència de la concentració de NaOH a la fase de càrrega.....	84
2.3.3. ESTUDIS DE PRECONCENTRACIÓ	86
2.3.3.1. Membrana laminar de flux.....	86
2.3.3.2. Mòdul de fibra buida.....	87
2.3.4. MEMBRANES LÍQUIDES D'AFINITAT	91
2.4. REFERÈNCIES	95

2.1. INTRODUCCIÓ A LES MEMBRANES LÍQUIDES

Una membrana es descriu com una barrera semipermeable entre dues fases [1]. Aquesta barrera, que pot ser un sòlid, un líquid o un gas, restringeix el pas de molècules a través seu de manera molt selectiva per: exclusió per mida, diferències dels coeficients de difusió, càrrega elèctrica i diferències de solubilitat, entre altres mecanismes.

Es parlarà de membrana líquida quan la barrera sigui un líquid immiscible que separa dues fases normalment aquoses o a vegades gasoses [2].

En aquest estudi el sistema consisteix en: una fase aquosa anomenada *solució de càrrega* on inicialment hi són presents les espècies químiques que cal transportar (glifosat i AMPA en el nostre cas) i una segona fase aquosa, *receptora o de retroextracció*, on es recuperen els anàlits després del seu transport a través de la dissolució orgànica que és la membrana pròpiament dita. Per tant, en un sol pas es combinen l'extracció i la recuperació dels anàlits.

El transport i separació dels anàlits són deguts a una força impulsora i no a l'equilibri entre les fases. Aquesta força impulsora és una diferència de potencial químic del solut a les dues interfases de la membrana que sovint s'expressa com a gradient de concentració.

El transport a través de la membrana líquida es pot produir mitjançant els mecanismes de transport passiu i transport facilitat. El transport passiu es basa en processos de dissolució-difusió-dissolució de les espècies i per tant, és limitat. En el cas del transport facilitat, la membrana líquida està constituïda per una dissolució orgànica d'un reactiu transportador (*carrier*) que, mitjançant la formació d'un complex neutre amb l'espècie que s'ha de separar en la fase membrana, facilita el seu pas a la fase receptora. Mitjançant aquest mecanisme, l'espècie que s'ha de separar pot ser transportada a través de la membrana en contra del seu gradient de concentració.

El que interessa és trobar un transportador que sigui tan selectiu com sigui possible per a l'anàlit d'interès. D'aquesta manera el transportador ens proporcionarà un augment de la selectivitat i la permeabilitat.

La força impulsora per dur a terme el procés pot ser proporcionada pel flux acoblat d'una altra espècie a través de la membrana. Segons que aquest flux acoblat vagi en el mateix sentit que el de l'espècie que s'ha de separar o en sentit contrari, es parlarà de cotransport i contratransport, respectivament [3]. En la **Figura 2.1** s'esquematitzen aquests dos possibles mecanismes.

El paràmetre que caracteritza el procés de separació amb membranes líquides és l'**eficiència d'extracció** (E), que es defineix com la fracció de molècules d'anàlit que es recuperen a la fase receptora:

$$E = V_A C_A / V_S C_S$$

on V_A i C_A són el volum i la concentració a la fase receptora i V_S i C_S a la fase de càrrega.

En general, quan el cabal de la fase de càrrega augmenta, l'eficiència d'extracció disminueix perquè el contacte no és tan efectiu; però, per altra banda, si es té un cabal major, la quantitat d'anàlit que s'introdueix dintre del sistema també és més important i per tant s'obté un major transport d'anàlit.

És important remarcar que en general no és necessari obtenir un 100 % d'eficiència d'extracció, però sí que cal que aquesta sigui reproducible [2].

Un altre paràmetre útil és el **factor de concentració (F)**, definit com la relació entre la concentració de l'anàlit a la dissolució receptora i la carregada:

$$F = C_A/C_S = EV_S/V_A$$

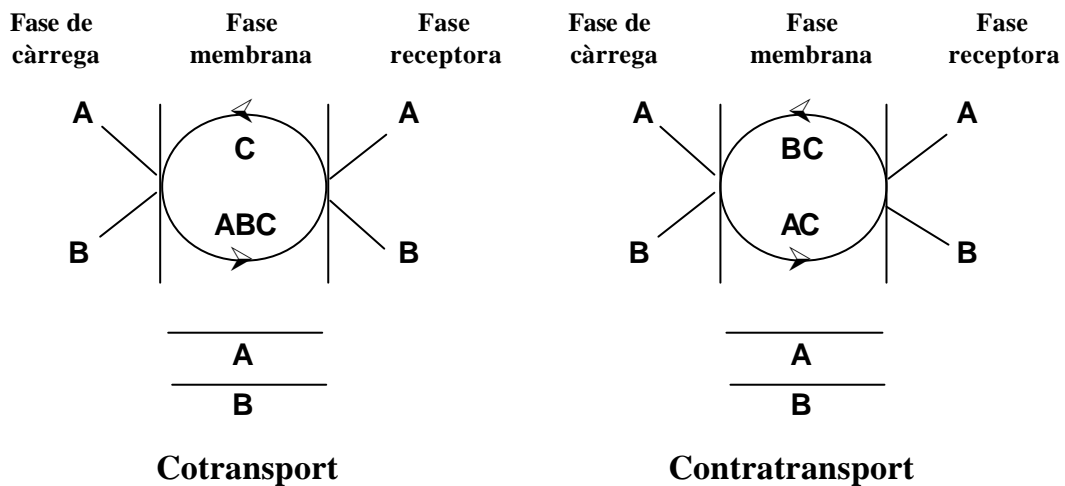


Figura 2.1. Mecanismes de transport facilitat: cotransport i contratransport. A: ànalit; B: espècie acoblada; C: transportador.

2.1.1. CONFIGURACIONS DE LES MEMBRANES LÍQUIDES

Aquest tipus de sistema en tres fases que constitueix una membrana líquida pot adoptar diferents configuracions, que donen lloc a tres tipus de membrana líquida: les membranes líquides de volum, les membranes líquides emulsionades i les membranes líquides suportades (**Figura 2.2**).

2.1.1.1. Membranes líquides de volum

En aquesta configuració les dissolucions de càrrega i retroextracció estan separades per la fase membrana, que és un líquid immiscible, contingut tot en un tub en forma de U o en vasos concèntrics. Es caracteritzen pel fet d'utilitzar un volum de fase orgànica relativament molt gran.

Normalment s'apliquen quan cal fer servir dissolvents orgànics molt volàtils i s'utilitzen dissenys adients per evitar pèrdues per volatilitat del dissolvent. També són de gran utilitat en el cas de sistemes on es produeix la formació d'una tercera fase perquè el sistema de transport no s'obturarà a causa del volum gran de fase orgànica i així no es produirà la interrupció del transport. Aquesta configuració també se sol utilitzar per estudiar les propietats de transport de noves molècules portadores [4].

2.1.1.2. Membranes líquides emulsionades

Es coneixen també amb el nom d'*emulsions dobles*. Aquest tipus de sistema es prepara afegint una solució aquosa a una solució orgànica que conté un tensioactiu adequat. D'aquesta manera es forma una emulsió *water-in-oil*, la qual es barreja amb una segona dissolució aquosa. Normalment la dissolució aquosa continguda a les gotes d'oli és la de retroextracció, que té un volum deu vegades inferior a la fase de càrrega.

El problema més gran és l'estabilitat de l'emulsió, que dificulta la recuperació del solut i és per això que les seves aplicacions són limitades.

2.1.1.3. Membranes líquides suportades

La dissolució orgànica, formada generalment pel dissolvent orgànic i un transportador, s'immobilitza mitjançant forces capil·lars en els porus d'un suport sòlid microporós. Aquesta estructura separa les dues dissolucions aquoses (la de càrrega i la de retroextracció).

A escala de laboratori una geometria molt emprada és la laminar, però a escala industrial són més adequades la geometria de fibra buida (*hollow fiber*) i l'espiral.

A la **Figura 2.2** s'esquematitzen aquestes tres configuracions.

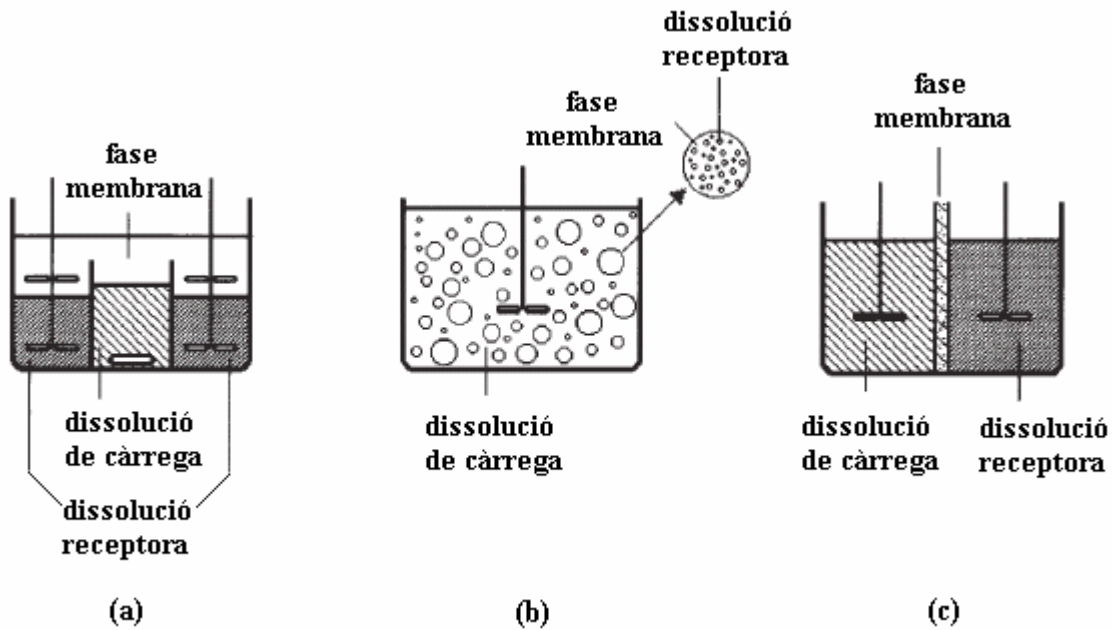


Figura 2.2. Configuracions de membranes líquides: a) membrana líquida de volum, b) membrana líquida emulsionada, c) membrana líquida suportada.

2.1.2. MEMBRANES LÍQUIDES SUPORTADES (SLM)

El transport dels anàlits des de la fase de càrrega fins a la fase receptora depèn de diversos factors que inclouen paràmetres físics i químics [5]. En el primer cas els paràmetres implicats són la velocitat d'agitació de les dues fases, l'àrea de contacte de la membrana líquida suportada i la seva geometria.

Pel que fa als paràmetres químics, es poden diferenciar els de les dues dissolucions aquoses i la fase membra. En el cas de les fases aquoses pot afectar el pH, la presència d'un tampó, la seva concentració i la força iònica. A més, en el cas de la dissolució de càrrega influeix el tipus de solut i la seva concentració; per a la dissolució receptora el tipus de coïo o contraïo present i la seva concentració.

I finalment, en el cas de la fase membra, l'afecten el tipus d'extractant i la seva concentració, el dissolvent orgànic, el modificador i el suport emprat.

Els dissolvents orgànics més utilitzats a les membranes líquides són els hidrocarburs de cadena llarga com l'undecà, el dodecà o el querosè i compostos més polars com l'èter dihexílic o el dioctil fosfat. Cal tenir en compte que el dissolvent orgànic

influeix de manera important en l'estabilitat de la membrana i també en la permeació del solut. En molts casos cal utilitzar modificadors (com per exemple alcohols com 1-dodecanol) que milloren les propietats de la fase orgànica de manera que augmenta la solubilitat de l'extractant o es varien les propietats interfacials [6].

Pel que fa al suport, aquest és un film sòlid polimèric de polipropilè, polisulfona, politetrafluoretilè o altres materials hidrofòbics amb mida de porus que oscil·la entre 0,02 a 1 μm [3]. Les característiques que hauria de tenir un bon suport polimèric són: elevada porositat, mida de porus petita, no ser gaire gruixut, resistència química, hidrofobicitat i baix cost [7].

Per tant, en dissenyar un sistema amb SLM caldrà tenir en compte la influència de tots els paràmetres esmentats, tant els físics com els químics.

2.1.2.1. Transportadors o extractants

Atès el paral·lelisme entre la tècnica de membrana líquida i l'extracció amb dissolvents, els reactius extractants utilitzats en aquests últims processos es poden aplicar com a transportadors en sistemes de membrana líquida.

Les característiques que hauria de tenir un bon extractant són [6]:

- gran capacitat d'extracció de l'anàlit
- selectivitat envers l'anàlit
- velocitats d'extracció i retroextracció acceptables
- extreure l'anàlit al pH desitjat
- ser soluble a la fase orgànica i relativament insoluble en les fases aquoses
- ser soluble en dissolvents alifàtics o aromàtics
- baixa volatilitat i toxicitat
- ser relativament econòmic

Però és difícil trobar extractants que compleixin tots aquests requeriments, ja que alguns són incompatibles entre si. El que és important és assolir un compromís.

Els extractants es poden classificar en tres grups principals: acídics, bàsics i solvatants.

Els **extractants acídics** inclouen dos tipus d'extractants: els acídics i els quelants. Els primers contenen grups com -COOH, -SO₃H, etc. i els segons contenen grups donadors capaços de formar complexos amb ions metàl·lics. Alguns exemples són, pel que fa als acídics, àcids carboxílics, àcids alquilfosfòrics, àcids alquilfosfònics, i pel que fa als quelants, hidroxioximes i derivats de 8-hidroxiquinoleïnes.

Un dels extractants acídics més utilitzats és l'àcid di-2-etilhexil fosfòric (D2EHPA), que és comercial i es caracteritza per la seva estabilitat química, cinètica ràpida en l'extracció i baixa solubilitat a la fase aquosa.

Els **extractants bàsics** són reactius orgànics que poden formar fàcilment una sal en contacte amb una fase aquosa àcida. Es tracta d'amines (primàries, secundàries i terciàries) i sals d'amoni quaternari (R₄N⁺). L'extracció es basa en un bescanvi aniònic.

Un inconvenient que presenten és la formació de terceres fases a causa dels problemes de solubilitat. Per evitar-ho s'afegeixen petites quantitats de modificadors, com alcohols alifàtics de cadena llarga (per exemple el dodecanol), al dissolvent. En general les amines que donen millors resultats són les alifàtiques.

Una amina quaternària molt utilitzada és el clorur de tricaprilmetilamoni, component actiu de l'extractant comercial Aliquat 336.

Els **extractants solvatants**, també anomenats extractants neutres, són reactius orgànics amb grups donadors que no contenen protons que es puguin dissociar. Com que no hi ha grups catiònics ni aniònics, les espècies s'extreuen de la fase aquosa en forma de complexos neutres.

Es diferencien dos grups: els reactius orgànics, que contenen oxigen unit a un carboni, com èters, èsters, cetones o alcohols, i els que contenen oxigen o sofre units a fòsfor, com alquilfosfats o alquiltiofosfats.

2.1.2.2. Avantatges i limitacions de les SLM

Els principals avantatges que presenten les membranes líquides suportades es poden resumir en [2,3]:

- Ús mínim de dissolvents orgànics.
- Risc de contaminació mínim. Per tant, es poden tractar substàncies perilloses.

- L'extracció i recuperació de l'anàlit té lloc en una única etapa.
- Fàcil automatització i connexió en línia amb un instrument analític.
- Graus de preconcentració grans: es poden tractar litres de mostra i concentrar en un volum inferior a 1 ml.
- Baixos costos de capital i d'operació i baix consum energètic.
- Es poden fer servir extractants de preu elevat, ja que s'utilitzen quantitats petites.
- Molt selectives i aptes per a processos de purificació. Per exemple, en algunes aplicacions [8] s'ha demostrat que es poden separar els anàlits de substàncies interferents com àcids húmics que estan presents a la mostra.

Per altra banda, la principal limitació que presenten és la baixa estabilitat de la membrana a causa de les diferències de pressió existents i de les pèrdues de dissolució orgànica per solubilització en les fases aquoses. Això provoca la contaminació de la fase de càrrega i de la receptora i a més es poden formar canals que permetin la lliure circulació de les espècies. Aquest fet en limita l'aplicació a escala industrial.

A més, en general, els temps són més llargs que en el cas d'aplicar LLE o SPE. Per això, quan s'apliquen a la determinació de plaguicides, cal assegurar-se que aquests no es degradin durant el procés.

Comparada amb altres tècniques, cal esmentar que la tècnica de SLM és semblant a la diàlisi i l'equipament emprat també. Però en la diàlisi els anàlits es dilueixen i en canvi amb les membranes líquides es pot aconseguir la preconcentració. La selectivitat és molt més elevada en el cas de SLM, ja que en la diàlisi se separen molècules petites d'anàlit de macromolècules, mentre que amb les SLM es pot aconseguir separar els anàlits en funció de les seves propietats químiques.

Si es compara la tècnica amb SPE, com a avantatges es pot esmentar que s'eviten o redueixen els problemes de saturació, trencament, sorció competitiva, especificitat i contaminació. A més, la quantitat de dissolvent orgànic que s'utilitza és molt petita.

Comparada amb LLE, cal dir que disminueix el risc de contaminació, es redueix el consum de dissolvent orgànic, és més fàcil d'automatitzar i els factors de concentració obtinguts són molt més elevats [9]. Es pot dir que l'extracció i la preconcentració

mitjançant la tècnica de membranes líquides és una bona alternativa a l'extracció líquid-líquid tradicional.

En resum, aquesta tècnica combina la selectivitat i preconcentració de la LLE amb l'eficiència en l'eliminació d'interferències de la matriu, característica de la tècnica de diàlisi.

2.1.2.3. Aplicacions de les membranes líquides suportades

Des de la seva aparició les membranes líquides s'han aplicat en camps ben diversos, com mostren diferents revisions que s'han fet [2,10].

Una aplicació molt important és en la *separació de metalls*, tal com es pot veure en la revisió feta per J. Gyves et al. [11], on es descriuen les aplicacions més recents de la tècnica de SLM per al transport de diferents espècies metàl·liques. La tècnica s'ha aplicat per a metalls tan diversos com Cu, Ni, Cd, Co, Zn [12], metalls del grup del platí (Rh, Pd i Pt) [13], Eu i Am [3], entre moltes altres aplicacions.

També cal destacar el camp de les *aplicacions biomèdiques*. Bàsicament s'han aplicat les membranes per a la determinació de drogues i d'altres compostos orgànics com fenols en fluids biològics (plasma i orina). En aquests casos no se sol obtenir un factor elevat de preconcentració, ja que el volum de mostra aplicat és petit, però és molt important la selectivitat que s'obté i la possibilitat d'automatitzar el procés. Per exemple, s'ha aplicat per determinar drogues bàsiques com l'amperozida en aigua [14] i plasma [15], o el bambuterol també en plasma [16], anestèsics [17] i fenols [18], entre altres. Una aplicació important és la separació d'aminoàcids que es comentarà més endavant.

També s'han descrit aplicacions en l'*anàlisi d'aliments*, com la determinació de triazines en suc [19] o en olis [20], o aplicacions en la *indústria petrolífera*, com la determinació de fenols en olis i fuels [21].

I finalment un camp molt important és el de l'*anàlisi mediambiental*. Les SLM són adequades per a l'extracció de compostos àcids i bàsics de manera senzilla a partir simplement de la variació del pH en molts casos. Això n'ha afavorit l'aplicació per a

diversos compostos que s'han extret i preconcentrat sobretot en aigües naturals superficials. S'ha descrit l'aplicació de la tècnica per a àcids carboxílics en aire [22] i sòls [23], per a anilines en aigües naturals [24] i per a derivats fenòlics com el 4-clorofenol o el 2,4,5-triclorofenol en aigües [25].

Dintre d'aquest camp també s'ha aplicat la tècnica per a la preconcentració d'alguns plaguicides determinats que es troben en concentracions molt baixes. La **Taula 2.1** mostra algunes d'aquestes aplicacions.

***Taula 2.1.** Aplicacions de les membranes líquides suportades per a la determinació de plaguicides en mostres ambientals.*

Mostra	Referència
- Fungicida metiltiofanat i derivats	[26]
- Herbicides sulfonilurees (metsulfuron, clorsulfuron)	[27,28]
- Herbicides fenilurees (fenuron, monolinuron, diuron) i triazines (simazina i propazina)	[29]
- Herbicides acídics (2,4-D, MCPA, etc.)	[30]
- s-triazines (atrazina, cianazina, etc.)	[31]
- Metoxi-s-triazines (simetona, atratona)	[8]
- Cloro-s-triazines, alquiltio-s-triazines i derivats de l'anilina	[32]

El transport de les triazines s'aconsegueix ajustant el pH de les fases de càrrega i receptora, de manera que en les condicions de pH bàsic de la primera, les triazines estan en forma neutra i, per tant, poden travessar la membrana líquida, que està formada simplement per una dissolució orgànica com n-undecà o èter dihexílic. El pH àcid de la fase receptora facilita la protonació de les triazines i el seu pas a la fase de retroextracció.

En el cas dels herbicides acídics com MCPA o 2,4-D, el mecanisme de transport és similar al de les triazines, però intercanviant el pH de les dissolucions: la dissolució de càrrega té un pH àcid i la receptora bàsic, ja que a pH àcid aquests herbicides es protonen i poden transportar-se a través de la membrana.

En aquestes aplicacions no es fa servir cap extractant que faciliti el transport dels anàlits, ja que només variant el pH, si es té com a membrana líquida un dissolvent orgànic adient, es produeix el transport dels anàlits.

En canvi, en el cas d'herbicides com glifosat, sí que és necessària la presència d'un extractant per facilitar-ne el transport. Aquest herbicida presenta una estructura similar a l'aminoàcid glicina, tal com es veu a la **Figura 2.3**.

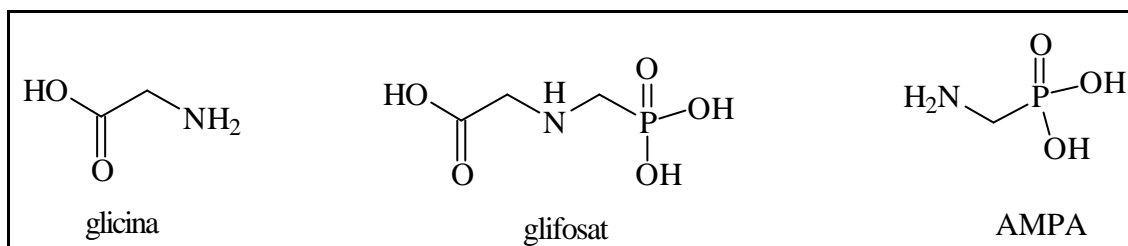


Figura 2.3. Estructures de l'aminoàcid glicina, de l'herbicida glifosat i del seu metabòlit AMPA.

A la bibliografia s'han descrit diversos sistemes de membrana per aminoàcids on s'utilitzen diferents extractants bescanviadors iònics.

Els aminoàcids són dels grups de compostos més importants existents a la natura, però estan en concentracions baixes en matrius complexes. A causa d'això el pretractament de la mostra és important i interessa assolir una preconcentració elevada dels anàlits. A la bibliografia hi ha descrits nombrosos processos d'extracció d'aminoàcids amb membranes líquides de volum [33,34] i membranes líquides emulsionades [35,36,37]. Però aquests dos tipus de configuracions presenten problemes com la baixa estabilitat de les emulsions. Per evitar-los s'han utilitzat membranes líquides suportades (SLM).

Amb SLM hi ha diferents aplicacions descrites utilitzant D2EHPA [38] o Aliquat 336 [39,40] com a transportadors, que són un bescanviador de cations i un d'anions, respectivament.

En el cas d'emprar Aliquat 336, els aminoàcids es transporten en forma aniònica a causa de la presència d'una força impulsora que és un gradient d'ions clorur en contracorrent des de la fase receptora fins a la donadora. La funció de l'extractant és facilitar el transport dels aminoàcids i dels clorurs en el sentit contrari. A la interfase entre la fase orgànica i la solució de càrrega, l'aminoàcid i les molècules dels transportadors

interaccionen electrostàticament formant un parell iònic neutre. Aquest parell iònic es difon a través de la membrana i a la interfase entre la membrana i la fase receptora, l'aminoàcid s'intercanvia per un ió clorur. L'aminoàcid es queda a la fase receptora i el parell transportador-ió clorur difon cap a la fase de càrrega. L'efecte global és el transport d'aminoàcids cap a la dissolució receptora i el transport d'ions clorur en sentit contrari.

Un factor important és el pH de la fase de càrrega. Si es fa servir un extractant com Aliquat 336, el pH ha de ser bàsic (pH > 9) per assegurar que els aminoàcids tinguin càrrega negativa. També és important la concentració de l'ió clorur perquè és la força impulsora del transport.

Com més hidrofòbic és l'aminoàcid més favorable és la seva extracció. Per això s'obtenen valors més alts de permeació per a la fenilalanina que per a altres aminoàcids [39].

A la **Figura 2.4** es mostra un esquema del procés que té lloc a la membrana líquida en el cas dels aminoàcids quan s'utilitza un bescanviador d'anions com Aliquat 336.

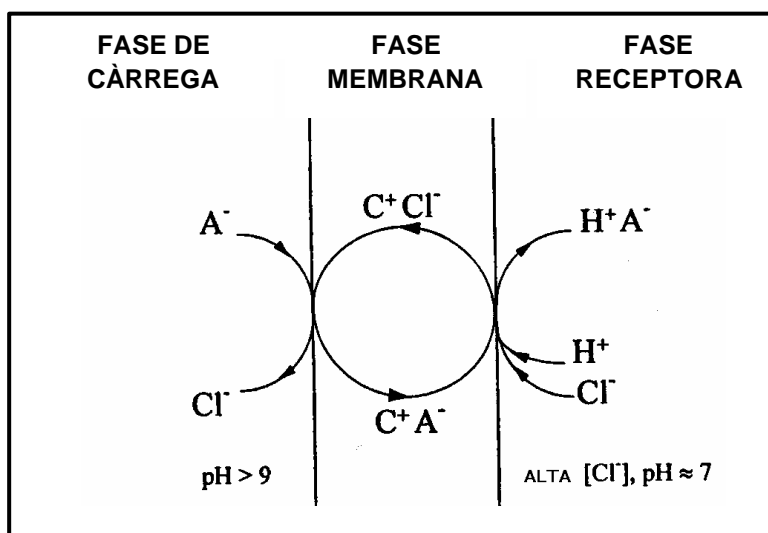


Figura 2.4. Transport d'aminoàcids (A⁻) mitjançant una membrana líquida suportada utilitzant Aliquat 336 (C⁺) com a transportador.

El glifosat, com ja s'ha indicat, té una estructura derivada de l'aminoàcid glicina i per aquest motiu s'intentarà aplicar el mateix sistema de membrana que per als aminoàcids, però el caràcter hidrofílic del glifosat pot dificultar-ne el transport a través de la fase orgànica.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. REACTIUS

- N-(fosfometil)glicina (glifosat): sòlid, 98 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanya
- Àcid aminometilfosfònic (AMPA): sòlid, 99 %, Lancaster Synthesis, Regne Unit
- Clorur de *p*-toluensulfonyl (TsCl): sòlid, 99+ % , Aldrich, Alemanya
- Cloroformiat de 9-fluorenilmetil (FMOC): sòlid, ≥ 99 %, PA, Fluka, Suïssa
- Àcid clorhídric (HCl): líquid, 35 %, PA, Panreac, Espanya
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Clorur de sodi (NaCl): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Àcid *o*-fosfòric (H₃PO₄): líquid, 85 %, PA, Panreac, Espanya
- Hidrogenfosfat de sodi (Na₂HPO₄·12H₂O): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Dihidrogenfosfat de sodi (NaH₂PO₄·2H₂O): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Tetraborat de sodi (Na₂B₄O₇·10 H₂O): sòlid, 99,5 % , PA, Panreac, Espanya
- Àcid cítric (C₆H₈O₇·H₂O): sòlid monohidratat puríssim, Merck, Alemanya
- Citrat sòdic (Na₃C₆H₅O₇·2H₂O): sòlid, PA, Scharlau, Espanya
- Nitrat sòdic (NaNO₃): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Àcid sulfúric (H₂SO₄): líquid, 96 %, PA, Panreac, Espanya
- Acetona: líquid, RS, >99,8 %, Carlo Erba, Itàlia
- Acetat d'etil: líquid, RS, >99,9 %, Romil Pure Chemistry, UK
- Acetonitril (CH₃CN): líquid, RS-Plus per HPLC, Carlo-Erba, Itàlia

- Isopropilbenzè (cumè): líquid, PS, Merck, Alemanya
- Decalina (C₁₀H₁₈): líquid, SIGMA, Alemanya
- Querosè: líquid, PA, Fluka, Suïssa
- n-dodecà: líquid, PS, Merck, Alemanya
- 1-dodecanol: líquid, PS, Merck, Alemanya
- trans-anetol: líquid, 99 %, Aldrich, Alemanya

- Clorur de tricaprilmetilamoni (Aliquat 336): Fluka, Suïssa
- Trilaurilamina (TLA): líquid, PS, Merck, Alemanya
- Àcid di-(2-etilhexil)fosfòric (D2EHFA): líquid, purificat 90,46 %, Aldrich, Alemanya

2.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolució estoc de glifosat (250 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua mil·liQ.
- Dissolució estoc d'AMPA (250 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua mil·liQ.
- Dissolució intermèdia de glifosat i AMPA de 2.500 µg/l per dilució dels estocs.
- Dissolucions de treball per dilució de la intermèdia (0,1-250 µg/l) o dels estocs (0,1-5 mg/l), respectivament.

- Tampó fosfat 0,4 M (pH = 11): es prepara una dissolució 0,4 M de dihidrogenfosfat sòdic i s'ajusta el pH a 11 amb hidròxid sòdic 2M.
- Dissolució de *p*-toluensulfonil (TsCl) 10 mg/ml: es dissol el pes corresponent en acetonitril.
- Tampó borat 0,025 M (pH = 9): es prepara una dissolució de tetraborat sòdic 0,025 M i s'ajusta el pH amb hidròxid potàssic 2 M.
- Dissolució de Fmoc 0,01 M: es dissol el pes corresponent en acetona.

- Isopropilbenzè (cumè): es purifica mitjançant rentats successius amb NaOH 0,5 M, aigua destil·lada, HCl 0,5 M i aigua destil·lada, fins a aconseguir reacció negativa de Cl amb Ag⁺.

2.2.3. APARELLS I MATERIAL

- Cromatògraf líquid Shimadzu que incorpora injector Rheodyne 7725 amb un bucle de 20 µl, 2 bombes LC-9A, detector UV-Visible SPD-6AV a 240 nm, registrador Chromatopac C-R6A i columna cromatogràfica Hypersil ODS 5 µm 20 x 0,46 cm.

- Cromatògraf líquid Spectra System de Thermofinnigan (USA) equipat amb un injector Rheodyne amb bucle de 100 µl, bomba P2000, desgasificador SCM1000, controlador SN4000, detector de fluorescència a 262 nm (excitació) i 316 nm (emissió), precolumna de tipus NH₂ i columna cromatogràfica Kromasil 100 NH₂ 5 µm 25 x 0,46 cm.

- Bomba peristàtica Minipuls 3 de GILSON

- Tacòmetre IKA-TRON DMZ1 Janke & Kunkel
- Font d'alimentació
- Ultrasons P. Selecta per desgasificar la fase mòbil
- Sistema de filtració amb membrana de niló de mida de porus 0,45 µm de Whatman
- Bany termostatitzat P. Selecta a 50 °C
- Agitador magnètic
- pHmetre GLP22 de Crison
- Balança analítica Sartorius Analytic amb precisió de ± 0,1 mg

Membranes:

- Laminar: MILLIPORE GVHP suport microporós de polidifluoroetilè amb un 75 % de porositat, 0,2 µm de mida de porus i 125 µm de gruix.
- Fibra tubular: és de polipropilè i té les característiques següents: diàmetre intern 0,3 mm, diàmetre extern 0,5 mm, mida de porus 0,2 µm, la porositat és del 75 % i la longitud de 57 cm.

2.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

2.2.4.1. Anàlisi de glifosat i AMPA

El glifosat i l'AMPA s'han analitzat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb dos mètodes diferents en funció de la disponibilitat dels instruments. Inicialment l'anàlisi es va dur a terme amb detecció UV-Vis i en aquest cas només es podia treballar amb mostres dins del rang dels mg/l. Posteriorment es va poder aplicar un mètode de detecció amb fluorescència i baixar el rang de treball fins a µg/l.

2.2.4.1.1. Mètode 1: detecció amb UV-Vis

El mètode d'anàlisi utilitzat és el que proposen Kawai et al. [41], que consisteix a derivatitzar glifosat i AMPA amb clorur de *p*-toluensulfonil (TsCl) sota condicions alcalines i injectar una alíquota de la barreja en el sistema cromatogràfic per on circula una fase mòbil formada per tampó fosfat 0,2 M (pH 2,30)-acetonitril (85:15, v/v) i detectar els anàlits a 240 nm.

Derivatització:

Com que ni el glifosat ni l'AMPA no absorbeixen a l'UV-Vis, cal derivatitzar-los abans d'introduir-los al sistema cromatogràfic. Per fer-ho s'agafa 1 ml de mostra i se li afegeixen 0,5 ml de tampó fosfat 0,4 M (pH 11) i 0,2 ml de TsCl (10 mg/ml en acetonitril). S'agita bé i s'escalfa durant 5 minuts a 50 °C en un bany termostatitzat per afavorir la reacció de tosilació.

Ja que la tosilació només és efectiva a pH bàsic, en el cas de tenir mostres a pH àcid o excessivament bàsic, es neutralitzen abans de l'addició del tampó fosfat 0,4 M afegint hidròxid sòdic i àcid clorhídric, respectivament.

Els patrons es preparen en el mateix medi que les mostres i es tracten de la mateixa manera que aquestes.

Anàlisi cromatogràfica:

La separació de glifosat i AMPA s'aconsegueix emprant com a fase mòbil una dissolució de tampó fosfat 0,06 M (pH = 2,30) i acetonitril en relació 85:15 (v/v) i un cabal d'1 ml/min a temperatura ambient.

Per preparar la dissolució de tampó fosfat s'afegeix el volum adient d'àcid fosfòric, es dilueix amb aigua mil·liQ i s'ajusta el pH a 2,30 amb hidròxid sòdic. La dissolució preparada es filtra a través d'un disc de niló de mida de porus 0,45 µm mitjançant una bomba de buit, per eliminar les partícules que podrien obturar el sistema cromatogràfic. Després es desgasifica durant 10-15 minuts en un bany d'ultrasons per evitar que entrin bombolles d'aire al sistema.

Al sistema cromatogràfic s'injecten alíquotes de 20 µl dels derivats tosilats preparats prèviament. La detecció dels anàlits té lloc mitjançant un detector UV-Vis a 240 nm. La concentració de glifosat i AMPA s'obté a partir de la interpolació en una recta de calibratge.

La **Figura 2.5** mostra un exemple d'un cromatograma obtingut a partir de les condicions proposades. A més dels pics de glifosat i AMPA també hi apareix un pic abans d'aquests que correspon a l'àcid *p*-toluensulfònic obtingut com a conseqüència de la hidròlisi del TsCl en solució alcalina [41].

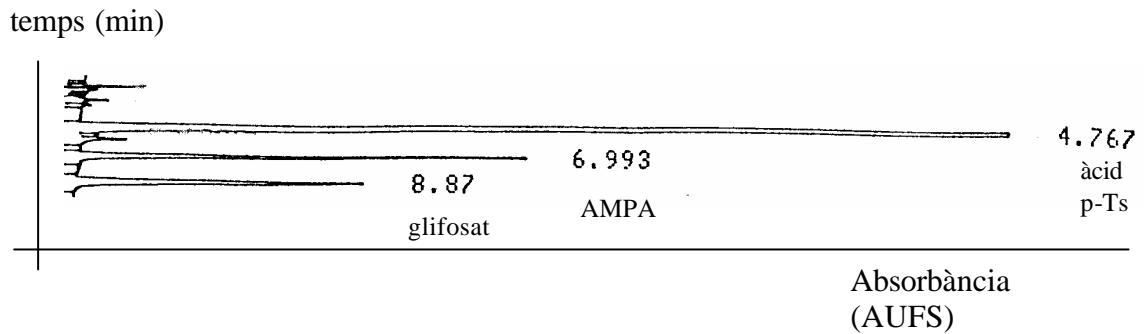


Figura 2.5. Cromatograma corresponent a una mostra que conté glifosat (4 mg/l) i AMPA (4 mg/l) quan les condicions són: injecció 20 μ l, detecció 240 nm, fase mòbil tampó fosfat 0,06 M (pH 2,30)-acetonitril (85:15, v/v).

El rang de treball d'aquest mètode es troba comprès entre 0,1-10 mg/l. Per a concentracions més elevades de 10 mg/l no s'ha determinat si és lineal.

2.2.4.1.2. Mètode 2: detecció amb fluorescència

El mètode es basa en el proposat per Miles et al. [42], on es fa servir un reactiu fluorescent per derivatitzar els anàlits abans d'introduir-los al sistema cromatogràfic.

Derivatització:

La derivatització es duu a terme amb cloroformat de 9-fluorenilmetil (FMOC). S'afegeixen 1,8 ml de tampó borat 0,025 M (pH 9), 1,8 ml de acetona i 0,2 ml de FMOC 0,01 M a 0,2 ml de mostra. S'agita la barreja i es deixa reaccionar durant mitja hora. A continuació s'elimina l'excés de reactiu derivatitzant amb 2 extraccions amb 2 ml d'acetat d'etil cada una.

En cas de tenir mostres amb pH molt extrem (pH <1 o pH >12) també cal neutralitzar-les prèviament a l'addició del tampó borat amb NaOH o HCl respectivament.

Anàlisi cromatogràfica

La fase mòbil utilitzada consisteix en tampó fosfat 0,05 M (pH 5,5) i acetonitril en relació 65:35 (v/v). Es prepara una dissolució de dihidrogenfosfat de sodi 0,05 M i s'ajusta el pH a 5,5 amb KOH 2 M. Es filtra i es desgasifica com s'ha comentat en el mètode anterior.

S'injecten 100 µl de la mostra al sistema cromatogràfic i la detecció es produeix mitjançant fluorescència a una longitud d'ona d'excitació de 262 nm i d'emissió a 316 nm.

Aquest mètode proporciona límits de detecció molt més baixos que en el cas anterior i més adequats per a l'anàlisi de plaguicides. La **Figura 2.6** mostra un cromatograma obtingut amb aquest mètode.

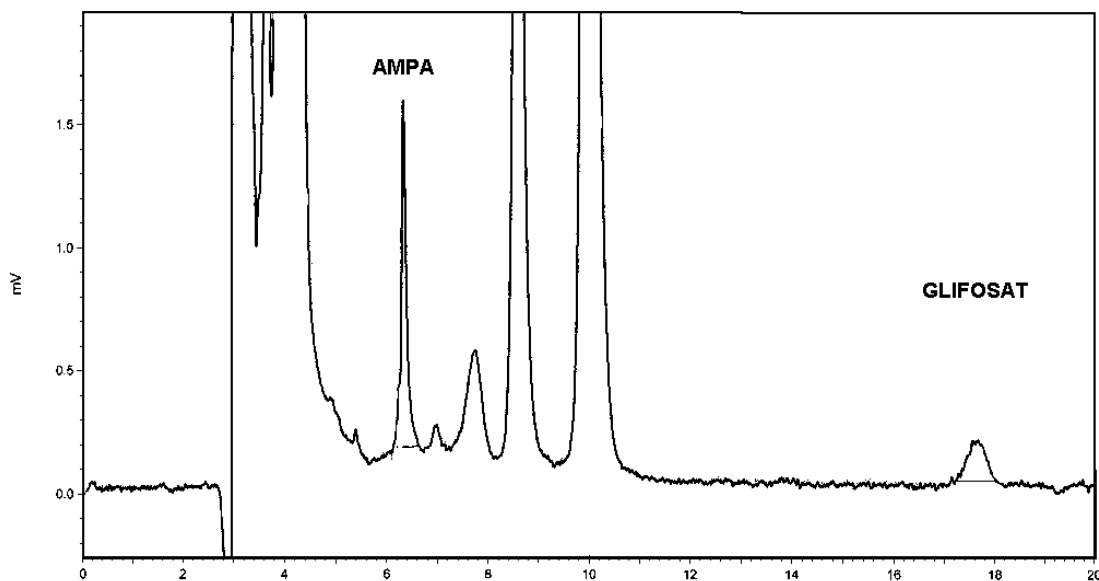


Figura 2.6. Cromatograma d'una mostra que conté 1 mg/l de glifosat i AMPA. Injecció: 100 µl; fase mòbil: 0,05 M tampó fosfat (pH 5,5): acetonitril 65:35 (v/v); $I_{exc} = 262$ nm, $I_{em} = 316$ nm.

Per aquest mètode el rang de treball varia entre 1-500 µg/l per a glifosat i 0,5-200 µg/l per a AMPA.

2.2.4.2. Experiments de membranes líquides suportades

S'han utilitzat dos tipus de geometries: membranes laminars i fibra buida (*hollow fiber*).

2.2.4.2.1. Membranes laminars

Els experiments s'han dut a terme en una cel·la de metacrilat (**Figura 2.7**) que consta de dos compartiments de 200 cm³ de capacitat cada un separats per una finestra circular de 3,8 cm de diàmetre on es col·loca la membrana.

La membrana líquida consisteix en una dissolució orgànica de l'extractant (Aliquat 336 en gairebé tots els experiments) retinguda en els porus d'un suport inert. Un cop impregnat el suport es col·loca a la cel·la i s'hi introdueixen les dissolucions de càrrega i de retroextracció, en ambdós casos 200 ml.

El sistema d'agitació consisteix en unes pales de tefló accionades per uns motors que es connecten amb unes pinces a una font d'alimentació per aconseguir que rotin. Per controlar la velocitat de rotació s'utilitza un tacòmetre. Es considera el temps igual a zero en el moment que s'inicia l'agitació.

Per fer el seguiment de l'extracció i retroextracció de glifosat i AMPA es prenen mostres periòdicament dels dos compartiments. Aquestes mostres es derivatitzen i s'analitzen segons el procediment descrit anteriorment (mètode 1: detecció amb UV-Vis).

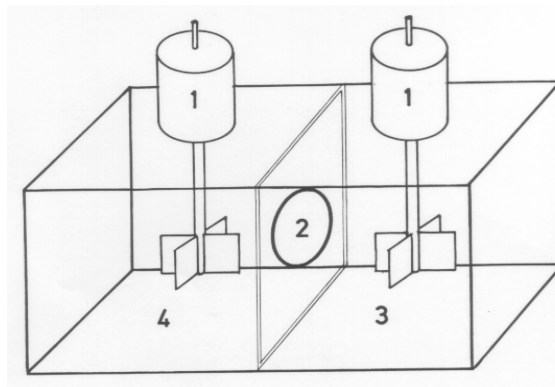


Figura 2.7. Esquema de la cel·la emprada en els experiments amb membranes líquides suportades. 1. Motors, 2. Membrana, 3. Dissolució receptora, 4. Dissolució de càrrega.

S'han estudiat els diferents paràmetres que afecten el sistema per establir les condicions òptimes de retroextracció conjunta de glifosat i AMPA. S'han provat diverses composicions per a les dissolucions de partida, la receptora i l'orgànica (transportadors i dissolvents) per caracteritzar el sistema químic.

La cel·la descrita anteriorment no permet fer una concentració dels anàlits d'interès. Per tant, amb les millors condicions obtingudes s'ha intentat aconseguir la preconcentració de glifosat i AMPA a partir de la configuració que es mostra a la **Figura 2.8**.

A cada compartiment s'introdueixen 200 ml de solució de càrrega i en el compartiment central limitat per dues membranes impregnades amb la dissolució orgànica de l'extractant és on es recircula la solució receptora de volum inferior a la de càrrega (40 ml) per aconseguir així la preconcentració. En aquest cas cal utilitzar una bomba peristàltica per fer recircular la dissolució receptora.

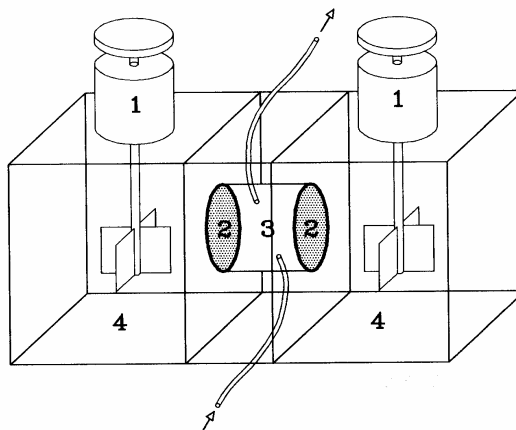


Figura 2.8. Esquema de la cel·la utilitzada en els experiments de preconcentració. 1. Motors. 2. Membranes. 3. Dissolució receptora. 4. Dissolució de càrrega.

2.2.4.2.2. Fibra buida (*hollow fiber*)

Una altra configuració per assolir la preconcentració és la que es representa a la **Figura 2.9**, on el suport sòlid és una fibra buida que té una longitud de 57 cm i està enrotllada en una vareta central; aquesta fibra s'impregna amb la solució orgànica d'extractant, que es fa passar pel seu interior amb l'ajuda d'una bomba peristàltica. Un cop impregnada es fa circular aigua bidestil·lada, tant per l'interior com per l'exterior de la fibra, per eliminar les possibles restes de solució orgànica. Aleshores s'introdueixen les solucions de càrrega i receptora, que es fan recircular durant tot l'experiment. Un cop finalitzat, per netejar la fibra es passa etanol per l'interior de la fibra i aigua per l'exterior per assegurar l'eliminació de l'extractant, i després s'asseca la fibra passant-hi nitrogen.

Es pot utilitzar la mateixa fibra diferents vegades fins que se n'observa el deteriorament.

Treballant amb volums més grans per a la dissolució de càrrega que per a la dissolució receptora, es pot assolir una preconcentració elevada per glifosat i per AMPA.

En aquest cas, a més d'estudiar els paràmetres químics que ja s'han caracteritzat prèviament mitjançant les membranes laminars, també s'optimitzen les condicions hidrodinàmiques del sistema, és a dir, el cabal.

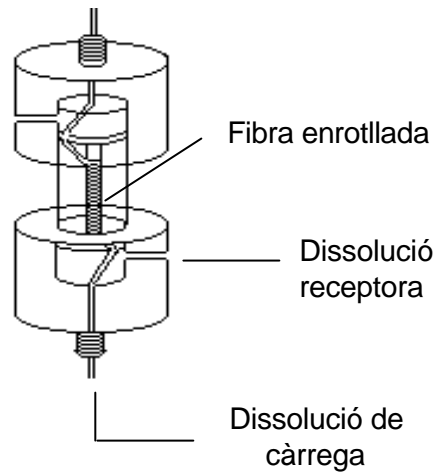


Figura 2.9. Mòdul de fibra buida (hollow fiber) emprat en els experiments de preconcentració.

2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

En uns primers experiments s'escolliran les condicions químiques que permetin el transport de glifosat des d'una dissolució aquosa de càrrega fins a una dissolució aquosa receptora a través d'una fase orgànica (membrana líquida), i un cop trobades les condicions adients per al transport, s'acabarà d'estudiar la influència dels diferents paràmetres del sistema a partir del seu efecte sobre la permeabilitat.

En aquests experiments preliminars l'objectiu és el disseny del sistema, i un cop caracteritzat aquest, es duran a terme experiments de preconcentració.

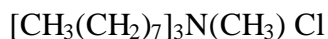
2.3.1. DISSENY DEL SISTEMA QUÍMIC

L'objectiu de l'estudi és la preconcentració de glifosat i AMPA mitjançant membranes líquides per aconseguir un sistema senzill que sigui aplicable a l'anàlisi d'aquests compostos en aigües naturals. Però prèviament cal dissenyar el sistema químic i per aconseguir-ho es treballa amb la cel·la de la **Figura 2.7**. En aquests experiments no és possible la preconcentració dels anàlits perquè es duen a terme amb volums iguals de la dissolució de càrrega i de la dissolució receptora.

El caràcter hidrofílic del glifosat determina que sigui necessària la presència d'un extractant a la membrana que faciliti el pas de glifosat de la fase aquosa a la fase orgànica, com ja s'ha comentat anteriorment.

La similitud del glifosat i AMPA amb els aminoàcids va fer pensar en la possibilitat de triar algun sistema de membrana líquida dels descrits a la bibliografia per a aminoàcids i adaptar-lo per al transport de glifosat i AMPA. En els sistemes descrits per aminoàcids es treballa amb bescanviadors d'anions com Aliquat 336 [39,40] i en d'altres casos amb bescanviadors de cations com D2EHPA [38] en funció de la càrrega de l'espècie de l'anàlit d'interès present en la dissolució.

Si el pH del medi és elevat, el glifosat està en forma aniònica, motiu pel qual inicialment es va triar com a extractant un bescanviador aniònic comercial, el clorur de tricaprilmetilamoni (Aliquat 336), que és una amina quaternària de fórmula:



Perquè es produís el transport, el sistema havia de consistir en una dissolució de càrrega a pH bàsic per així tenir el glifosat com un anió i en una dissolució receptora a pH àcid perquè el glifosat sigui neutre o catiònic, tal com es pot veure en el diagrama de distribució del glifosat que es mostra a la **Figura 2.10**.

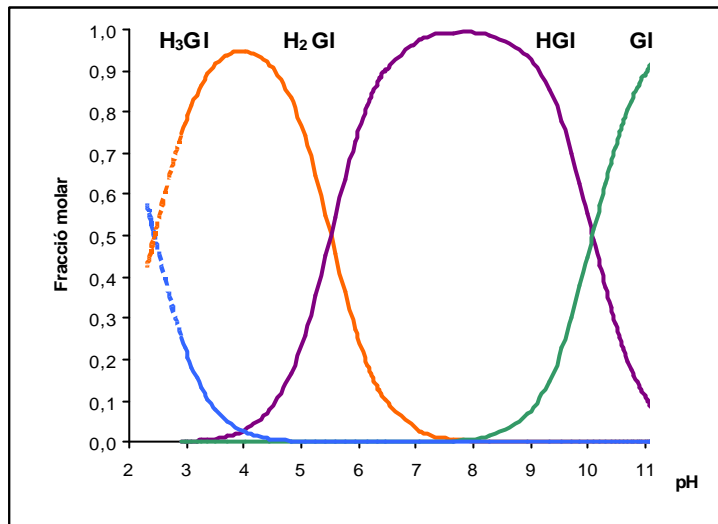


Figura 2.10. Diagrama de distribució del glifosat (GI correspon al compost totalment desprotonat). $[\text{glifosat}] = 1,93 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

La membrana consisteix en una dissolució d'Aliquat 336 en un dissolvent orgànic com cumè, dodecà:dodecanol, etc., que intercanvia el seu clorur per glifosat. Així, el glifosat passa a la solució orgànica i en contacte amb la dissolució receptora es protona, deixa de ser un anió i l'Aliquat 336 l'allibera. A més, com que hi ha altres anions a la dissolució receptora (Cl^- , PO_4^{3-}), es produeix el seu intercanvi amb el glifosat i el pas de glifosat a la fase aquosa receptora es veu més afavorit.

Un cop escollit l'extractant, s'assajaran diferents dissolvents perquè les seves propietats també poden influir significativament en el transport de l'anàlit. A més, caldrà determinar quina és la composició de la dissolució de càrrega que dona lloc a una més efectiva extracció de glifosat i quina és la dissolució receptora que afavoreix més la retroextracció.

Abans d'iniciar els experiments es fa una prova en blanc, és a dir, sense Aliquat 336 a la fase orgànica, per comprovar que realment és l'Aliquat 336 el que dona lloc a l'extracció i que, per tant, la presència d'un extractant a la fase orgànica és imprescindible. Les condicions de l'experiment són les següents:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i 5 ppm d'AMPA en NaOH 0,1 M (200 ml)
- Fase receptora: HCl 0,1 M (200 ml)
- Fase orgànica: dodecà: 4 % dodecanol

Efectivament, en aquest cas no s'observa transport de glifosat i AMPA a través de la membrana, tal com s'esperava.

A continuació es va estudiar de manera sistemàtica l'efecte dels diferents paràmetres químics: la composició de la fase de càrrega, la de la fase receptora i la de la fase orgànica (extractant i dissolvent orgànic), en primer lloc només per glifosat.

2.3.1.1. Composició de la fase de càrrega

En aquesta sèrie d'experiments s'han assajat diferents reactius a la dissolució de càrrega per ajustar el pH: una dissolució d'hidròxid sòdic i dues dissolucions tampó fosfat a pH 7 i pH 11, respectivament.

El glifosat és un derivat de l'aminoàcid glicina i perquè aquest estigui en forma aniónica s'ha de treballar a $\text{pH} > 9$. El diagrama de distribució del glifosat (**Figura 2.10**) indica que a pH superior a 11 l'herbicida té tres càrregues negatives i cap de positiva. Per tant, es decideix començar a provar amb una dissolució de NaOH 0,1 M ($\text{pH} > 11$). Com a dissolució receptora es tria una dissolució de citrat perquè, com que es tracta d'un anió de mida considerable, és més hidrofòbic i la retroextracció s'hauria d'afavorir.

En la **Taula 2.2** es mostren els resultats de diferents experiments en els quals es va variar la composició de la fase de càrrega; en alguns casos s'afegeix un electròlit (NaCl o NaNO_3) per ajustar la força iònica del sistema i evitar diferències de pressió osmòtica entre les dues dissolucions aquoses, que originarien un transport d'aigua.

Taula 2.2. Percentatge de recuperació de glifosat per diferents dissolucions de càrrega. Fase de càrrega: solució de 5 ppm de glifosat en el medi indicat. Fase receptora: solució de citrat 0,1 M. Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en cumè. Velocitat d'agitació: 1000 rpm. Temps: 3 h

Dissolució de càrrega	% recuperació
NaOH 0,1 M	37
NaOH 0,1 M + NaCl 0,5 M	0
NaOH 0,1 M + NaNO ₃ 0,5 M	0
NaOH 0,6 M	1
Tampó fosfat 0,4 M (pH=7)	0
Tampó fosfat 0,4 M (pH=11)	0
Aigua mil·liQ	4

Podem observar que els percentatges de recuperació de glifosat són pràcticament nuls en presència d'una concentració elevada d'anions a la dissolució de càrrega; això es pot explicar tenint en compte que l'Aliquat 336 és un extractant no selectiu i per tant, els altres anions presents a la dissolució competeixen amb el glifosat. També competeixen els ions OH⁻ i, per tant, si n'augmentem la concentració disminueix l'extracció de glifosat.

Els millors resultats s'obtenen amb una concentració de NaOH de 0,1 M en la dissolució de càrrega.

Com que l'objectiu és aplicar el sistema per a aigües naturals, s'assaja una dissolució de càrrega de pH = 7. En aquests experiments, per fixar el pH s'utilitza una dissolució tampó fosfat 0,4 M (pH = 7). En els resultats obtinguts s'observa que no es produeix transport de glifosat. Es decideix augmentar el pH de la dissolució de càrrega fins a 11 i treballar igualment amb un tampó fosfat per veure si el transport no s'ha produït perquè el pH no és prou elevat per tenir el glifosat totalment desprotonat i a més, per determinar si el sistema funciona amb una altra sal que no sigui l'hidròxid sòdic. No s'obtenen bons resultats com a conseqüència de la competència de l'ió fosfat amb el glifosat, que és més important que en el cas de tenir ions hidroxils [39], ja que a més els experiments s'han realitzat a concentracions més elevades d'ió fosfat.

Es fa una darrera prova amb aigua mil·liQ per comprovar si cal tenir un pH elevat a la dissolució per aconseguir el transport del plaguicida, i la recuperació obtinguda és només del 4 %. El pH de l'aigua mil·liQ està entre 5-6 i no és suficient per tenir el glifosat totalment desprotonat, factor que determina el baix transport del compost.

Amb tots aquests experiments es fixa la fase de càrrega com una dissolució de 5 ppm de glifosat en NaOH 0,1 M.

Una vegada s'ha fixat la composició de la fase de càrrega, es passa a estudiar les altres dues fases, començant per la receptora.

2.3.1.2. Composició de la fase receptora

Es proven diferents dissolucions receptores per trobar quina és la que dona lloc a una major retroextracció. Es trien HCl i H₃PO₄ com a àcids en la dissolució receptora perquè poden protonar el glifosat i, a més, intercanviar l'anió, Cl i PO₄³⁻, respectivament, i també s'assaja el citrat sòdic, que encara que no ens proporciona un pH àcid, conté un anió més hidrofòbic que els anteriors. En el cas de l'àcid fosfòric s'afegeix NaCl per igualar la força iònica dels dos costats de la membrana. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 2.3**.

***Taula 2.3.** Recuperació de glifosat utilitzant diferents dissolucions receptores. Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en NaOH 0,1 M. Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en cumè. Velocitat d'agitació: 1000 rpm. Temps: 3 h.*

Dissolució receptora	% recuperació
HCl 0,1 M	52
H ₃ PO ₄ 0,1 M	1
H ₃ PO ₄ 0,1 M + NaCl 0,075 M	48
Citrat 0,1 M	36
Citrat 0,015 M	22

A partir dels resultats obtinguts s'observa que la retroextracció és més elevada quan s'utilitza un àcid que no pas amb citrat, ja que, en protonar-se el glifosat, s'afavoreix el seu pas a la fase receptora i, a més, s'intercanvia l'anió per glifosat. En el cas del citrat, l'únic efecte present és aquest últim.

S'estudia la influència del pH en el cas del citrat per veure si influeix en els resultats perquè el citrat forma espècies diferents en funció del pH del medi, tal com s'observa en el seu diagrama de distribució (**Figura 2.11**).

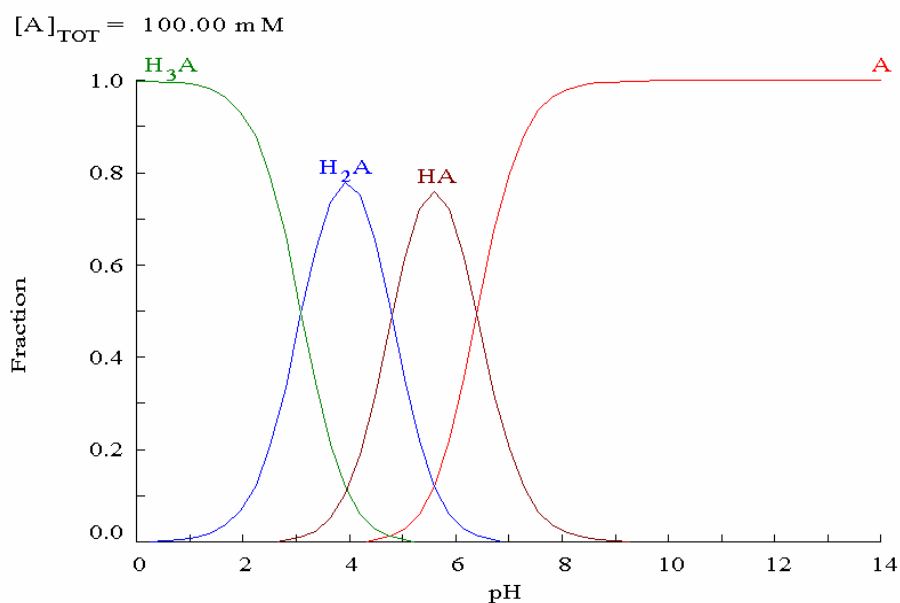


Figura 2.11. Diagrama de distribució de l'àcid cítric. H_3A correspon a l'àcid cítric totalment protonat i A és la seva base conjugada.

Els resultats obtinguts utilitzant citrat com a dissolució receptora a diferents pH es mostren a la **Taula 2.4**.

Aquests resultats indiquen que ja s'estava treballant en unes condicions de pH adequades (pH = 7,5), ja que si el pH s'augmenta o es disminueix, la recuperació de glifosat també decreix. L'inconvenient de la dissolució de pH 11 és que a aquest pH el glifosat està totalment desprotonat i, en passar a la fase receptora, no quedarà

completament retingut en aquesta, ja que encara està en forma aniònica i, per tant, l'Aliquat 336 el pot tornar a intercanviar i transportar novament cap a la fase de càrrega.

En el cas de la dissolució amb àcid cítric de pH = 4, tampoc no és adequada perquè hi ha un gran percentatge de citrat protonat i que, per tant, no està en forma aniònica i l'Aliquat 336 no el pot intercanviar pel glifosat que transporta.

Taula 2.4. Percentatge de recuperació de glifosat en variar el pH de la dissolució receptora de citrat. Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en NaOH 0,1 M. Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en cumè. Velocitat d'agitació: 1000 rpm. Temps: 3 h.

Dissolució receptora	pH	% recuperació
citrat 0,1 M	7,5	36
citrat 0,1 M	11	26
cítric 0,1 M	4	8

Sabent que la retroextracció té lloc mitjançant un bescanvi de l'anió, també es proven com a possibles dissolucions receptores tiocianat i perclorat, ja que són anions més hidrofòbics i en principi haurien de tenir més tendència a passar a la fase orgànica que els ions clorur.

En el cas del tiocianat no es pot determinar la recuperació de glifosat, ja que en analitzar la dissolució receptora s'obté un pic amb cua a l'inici del cromatograma i a més surten dos pics encavalcats al voltant del temps de retenció corresponent al glifosat. Per tant, no es pot determinar la concentració del plaguicida a la dissolució receptora amb el mètode cromatogràfic utilitzat. Per poder saber si es produeix transport, es mesura la variació de la concentració a la dissolució de càrrega inicial i final i es veu que aquesta no ha variat; per tant, no s'ha produït transport de glifosat.

En el cas del perclorat, els resultats obtinguts no són satisfactoris tampoc, ja que, a més de no observar-se transport, sembla que el suport utilitzat per la membrana líquida pateix alguna variació.

Com a conseqüència de tots aquests resultats, s'escull una dissolució 0,1 M d'àcid clorhídric com a fase receptora.

Un cop optimitzades les composicions de les dues dissolucions aquoses del sistema de membrana líquida, es passa a estudiar la fase orgànica, també anomenada *fase membrana*.

2.3.1.3. Composició de la fase orgànica

La fase membrana està formada per l'extractant i per un dissolvent orgànic, que és el que es fa servir per dissoldre l'extractant i que també influeix de manera important en el transport dels anàlits. S'estudiaran, per tant, aquests dos paràmetres.

2.3.1.3.1. Extractant

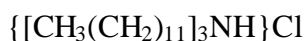
En principi s'havia triat Aliquat 336 com a extractant a causa de les seves propietats bescanviadores envers els anions, ja que si el pH és bàsic, el glifosat està en forma aniònica. Tot i això, també es van assajar altres extractants per millorar els resultats. Els extractants que es trien per fer els experiments són també bescanviadors, però un és aniònic i l'altre catiònic i, per tant, en aquest segon cas, caldrà variar la composició de la dissolució per tenir el glifosat en forma catiònica perquè el transport pugui tenir lloc. Els bescanviadors triats són:

- Clorur de trilaurylamoni (TLA·HCl)
- Àcid di-2-etilhexil fosfòric (D2EHPA)

Extractant TLA·HCl

Aquest extractant és, igual que l'Aliquat 336, un clorhidrat d'amina que actua com a bescanviador d'anions.

Per utilitzar aquest extractant, com que no és comercial, primer cal preparar el clorhidrat de l'amina protonant la trilaurylamina amb HCl. La fórmula del compost és:



Aquest extractant es dissol en cumè, ja que no va ser possible dissoldre'l en dissolvents alifàtics.

Per fer aquests experiments es redueix el pH de la dissolució de càrrega ja que, treballant a pH = 12,5, es desprotonaria el grup amino de l'extractant.

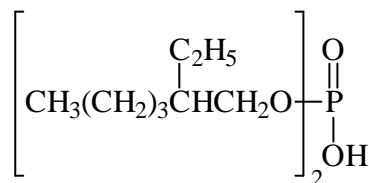
Per tant, les condicions dels experiments realitzats s'estableixen com a:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en aigua de riu (pH = 8,5)
- Fase receptora: HCl 0,1 M
- Fase orgànica: TLA·HCl 0,2 M i 0,05 M en cumè

En aquestes condicions no s'observa transport de glifosat.

Extractant D2EHPA

A causa de les propietats àcid-base que presenta el glifosat, també es pot protonar i ser present en la dissolució en la seva forma catiònica en comptes d'aniónica, com s'havia treballat fins ara. Per aquest motiu es decideix provar amb el D2EHPA, que és un bescanviador de cations comercial que també s'ha utilitzat per al transport d'aminoàcids en membranes líquides. La seva fórmula és:



La forma catiònica del glifosat és predominant en la dissolució a un pH àcid (2-3), tal com es pot observar en el diagrama de distribució del glifosat en funció del pH (**Figura 2.10**). El sistema funciona de manera diferent que en el cas d'Aliquat 336. El D2EHPA intercanvia el seu protó per l'anàlit en forma catiònica i després, en contacte amb la fase receptora, que té un pH més àcid que la fase de càrrega, el D2EHPA es torna a protonar i allibera l'anàlit. Aquests experiments es van dur a terme en les següents condicions:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en HCl 0,01 M (pH = 2)
- Fase receptora: HCl 0,1 M (pH = 1) i 1 M (pH ≈ 0)
- Fase orgànica: dissolució de D2EHPA 0,2 M en querosè

Igual que amb TLA·HCl, quan l'extractant és D2EHPA, en les condicions provades no s'obté transport de glifosat.

Per tant, es continua treballant amb Aliquat 336 com s'ha fet fins ara, però s'estudia quin és el dissolvent orgànic més adequat per obtenir un transport de glifosat més efectiu.

2.3.1.3.2. Dissolvent orgànic

El dissolvent orgànic influeix en la solubilitat de les espècies presents a la membrana, és a dir, l'extractant i les espècies formades entre l'extractant i l'anàlit. Per tant, és important triar un dissolvent adequat.

En aquests experiments es proven diferents dissolvents aromàtics i alifàtics i també barreges d'aquests per veure'n la influència en l'extracció i retroextracció de glifosat.

Les diferents fases del sistema tenen la composició següent:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en NaOH 0,1 M.
- Fase receptora: citrat 0,1 M.
- Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en el dissolvent orgànic indicat.

Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 2.12**.

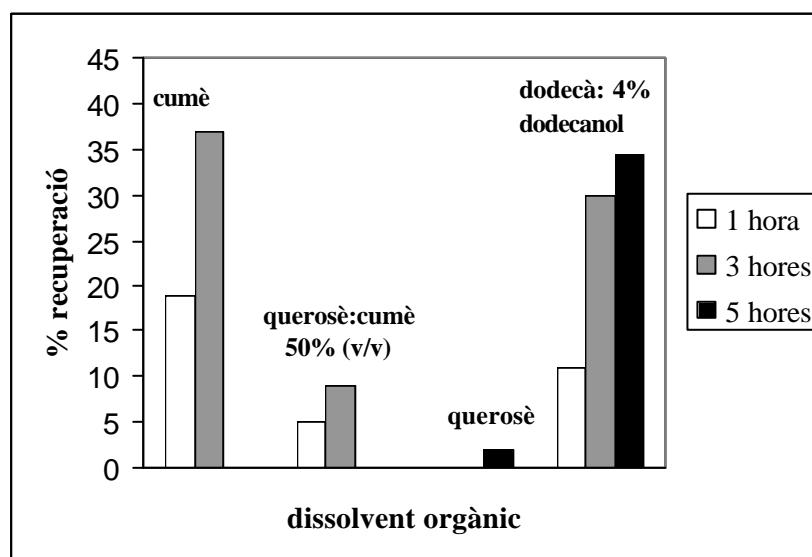


Figura 2.12. Comparació del percentatge de recuperació de glifosat a diferents temps pels dissolvents orgànics emprats.

En els experiments utilitzant cumè com a dissolvent a la membrana els temps es van limitar a 3 hores, ja que s'ha comprovat que aquest dissolvent pot atacar el suport de la membrana i augmentar la mida dels porus, la qual cosa provocaria pèrdues de dissolució orgànica [43,44].

El dodecà és un dissolvent alifàtic al qual s'afegeix el dodecanol com a modificador per facilitar la solubilització de l'extractant.

Es tria dodecà amb 4% de dodecanol com a dissolvent orgànic perquè la solubilitat de l'Aliquat 336 és bona i a més no afecta al suport polimèric i com es pot veure a la gràfica, dóna un bon percentatge de recuperació.

En conclusió es pot dir que les condicions experimentals que han donat els millors resultats són:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat en NaOH 0,1 M
- Fase receptora: HCl 0,1 M
- Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en dodecà amb 4 % dodecanol

Un cop estudiats els diferents paràmetres que afecten el transport de glifosat, s'introdueix el seu metabòlit AMPA en els experiments, ja que l'objectiu és aconseguir un sistema vàlid per als dos anàlits. En primer lloc es duen a terme experiments només amb AMPA i posteriorment s'estudia el transport conjunt de glifosat i AMPA.

El problema que presenta l'AMPA és que encara és més hidrofílic que el glifosat, ja que és una molècula més petita a causa de la pèrdua del grup HOOC-CH_2 . Es duen a terme experiments amb les millors condicions trobades per glifosat, però per l'AMPA només s'obtenen recuperacions inferiors a un 10 %. Aquests resultats s'expliquen si tenim en compte que l'AMPA té caràcter força hidrofílic i per tant té poca tendència a passar a la membrana hidrofòbica. A més, l'Aliquat 336 és un bescanviador d'anions no selectiu i per tant, si hi ha d'altres ions a la dissolució de càrrega, competiran amb l'AMPA i en dificultaran l'extracció.

Quan es duen a terme els experiments de transport conjunt dels dos anàlits s'obtenen les mateixes recuperacions que quan eren independents a la dissolució de càrrega. Per tant, el transport d'AMPA no millora i el fet d'haver-hi AMPA a la dissolució de càrrega no afecta el transport de glifosat.

Per acabar de caracteritzar el sistema s'estudien els diferents paràmetres que el conformen i s'expressen els resultats en funció de la permeabilitat obtinguda.

2.3.2. CARACTERITZACIÓ DEL TRANSPORT DE GLIFOSAT I AMPA

Els resultats s'expressaran en forma de coeficient de permeabilitat, que es defineix com a:

$$P = \frac{-J}{[\text{glifosat}]} = \frac{d[\text{glifosat}]}{dt} \times \frac{V}{A} \times \frac{1}{[\text{glifosat}]} \quad (\text{I})$$

on J representa el flux de glifosat a través de la membrana; [glifosat] és la concentració de l'herbicida a la fase de càrrega; V és el volum de la dissolució de càrrega (200 ml), i A és l'àrea efectiva de la membrana (àrea geomètrica corregida considerant la porositat del suport), que té un valor de 8,5 cm² en els experiments realitzats. Per tant, les unitats de la permeabilitat són cm/min.

Si s'integra l'equació de la permeabilitat (I) s'obté l'equació d'una recta:

$$\ln \frac{[\text{glifosat}]}{[\text{glifosat}]_0} = \frac{A}{V} \times m \times t \quad (\text{II})$$

on [glifosat]₀ és la concentració inicial de glifosat a la dissolució de càrrega.

Si es representa el ln respecte al temps (II), es pot calcular el valor del coeficient de permeabilitat a partir del pendent obtingut (m):

$$P = \frac{m \times V}{A} \quad (\text{III})$$

Els diferents experiments es realitzen amb una dissolució de càrrega que conté 5 ppm de glifosat i 5 ppm d'AMPA, però en la majoria dels experiments amb AMPA no és possible determinar la permeabilitat perquè les diferències de concentració al llarg del

temps són molt petites i el mètode d'anàlisi no té prou sensibilitat per poder detectar les variacions. Per tant, les dades de permeabilitat només es donaran per glifosat.

S'ha determinat la influència en la permeabilitat del sistema dels paràmetres que s'indiquen a continuació:

- Concentració de l'extractant Aliquat 336.
- Composició de la fase de càrrega.
- Composició de la fase receptora.

2.3.2.1. Influència de la concentració d'Aliquat 336

En aquests experiments es va variar la concentració d'Aliquat 336 entre 0,05 i 0,3 M i es van mantenir constants la resta de paràmetres:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i 5 ppm d'AMPA en NaOH 0,1 M.
- Fase receptora: HCl 0,1 M.
- Fase orgànica: Aliquat 336 en dodecà: 4 % dodecanol.

Els resultats obtinguts es poden expressar gràficament i es pot representar la permeabilitat respecte de la concentració d'Aliquat 336, tal com es veu a la **Figura 2.13**.

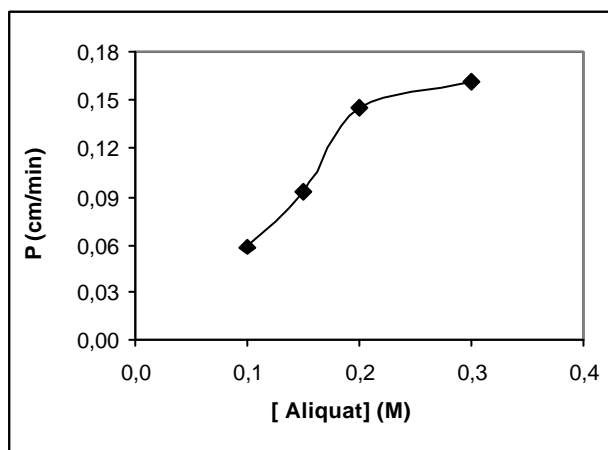


Figura 2.13. Efecte de la concentració d'Aliquat 336 sobre la permeabilitat

En el cas de la concentració de 0,05 M no és possible seguir la variació de concentració al llarg del temps amb el mètode d'anàlisi emprat, ja que les diferències són molt petites. Però amb aquesta concentració la permeabilitat és molt baixa.

S'observa que, com més concentrada és la dissolució d'extractant, més gran és la permeabilitat. En el rang de concentracions estudiades gairebé s'ha arribat a la zona que indica la saturació de la membrana, ja que la diferència de permeabilitat quan la concentració d'Aliquat 336 és 0,2 M i 0,3 M és mínima. Aquest és el comportament típic en un sistema de membrana líquida amb transport facilitat.

En augmentar la concentració de l'extractant millora la permeabilitat, però també varien les propietats de la fase orgànica i augmenta la resistència a la difusió de les espècies. Per aquest motiu la concentració escollida és 0,2 M, perquè així s'assegura un equilibri entre aquests dos factors.

2.3.2.2. Efecte de la composició de la fase receptora sobre la permeabilitat

Anteriorment s'havien provat diversos àcids com a dissolucions receptores i es va veure que el més favorable era l'àcid clorhídric. Es decideix estudiar el sistema en el cas de tenir HCl i citrat per veure si són els ions clorur els que afavoreixen la retroextracció o si el factor més important és el fet de tenir un àcid que protoni el glifosat .

Les condicions experimentals són:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i 5 ppm d'AMPA en NaOH 0,1 M.
- Fase receptora: HCl 0,1 M o citrat sòdic 0,1 M.
- Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4 % dodecanol.

Si es representa el ln de la variació de la concentració de glifosat al llarg del temps per a les diferents dissolucions receptores s'obté la **Figura 2.14**.

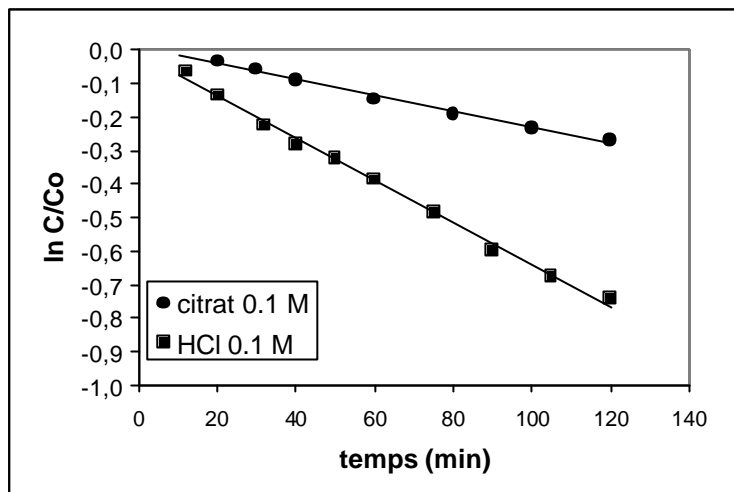


Figura 2.14. Representació de la variació de la concentració de glifosat per a les diferents dissolucions receptoras en funció del temps.

A partir del pendent de les rectes es pot trobar la permeabilitat. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 2.5**. A partir dels valors obtinguts de permeabilitat es pot concloure que el transport és més efectiu quan la dissolució receptora és HCl 0,1 M, com ja s'havia comprovat en els experiments previs.

Taula 2.5. Coeficients de permeabilitat obtinguts utilitzant diferents dissolucions receptoras.

Dissolució receptora	P (cm/min)
Citrat 0,1 M	0,0506
HCl 0,1 M	0,1447

2.3.2.3. Influència de la concentració de NaOH a la fase de càrrega

Com ja s'ha vist anteriorment, la fase de càrrega més favorable s'obté amb una dissolució d'hidròxid sòdic que dona lloc a un pH elevat i suficient per tenir els anàlits totalment desprotonats.

En aquests experiments es varia la concentració de NaOH i es disminueix per veure si l'extracció millora, ja que no hi haurà tanta competència dels ions OH⁻ amb glifosat.

Les condicions experimentals són:

- Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i 5 ppm d'AMPA en NaOH
- Fase receptora: HCl 0,1 M
- Fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4 % dodecanol

Si es representa el ln de la variació de la concentració de glifosat al llarg del temps en els dos casos s'obté la gràfica de la **Figura 2.15**.

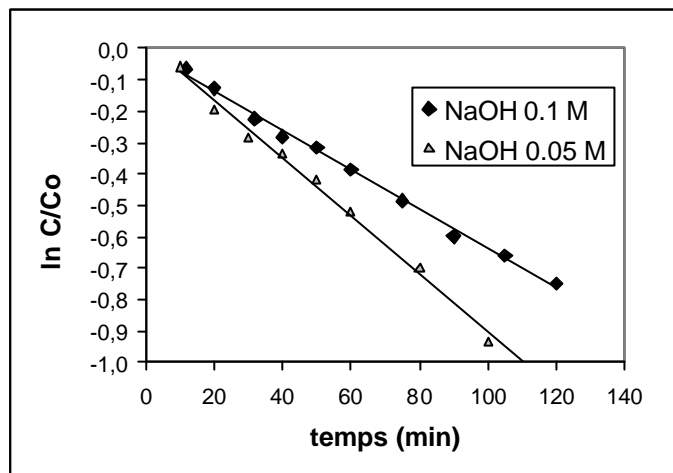


Figura 2.15. Transport de glifosat per diferents concentracions de la dissolució de càrrega de NaOH.

A partir dels pendents de les rectes es pot determinar la permeabilitat. Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 2.6**.

Taula 2.6. Coeficients de permeabilitat en variar la concentració de la dissolució de càrrega.

[NaOH] M	P (cm/min)
0,05	0,2412
0,1	0,1447

Per tant, en disminuir la concentració de NaOH a la fase de càrrega millora el transport de glifosat a causa de la menor competència dels anions OH⁻.

2.3.3. ESTUDIS DE PRECONCENTRACIÓ

Paral·lelament al disseny del sistema de membrana laminar s'han realitzat experiments de preconcentració de glifosat i AMPA.

El paràmetre que es farà servir per quantificar la preconcentració és el **factor de concentració**, que es defineix com a:

$$F = \frac{[\text{anàlit}]_{\text{final}} \text{ a la dissolució receptora}}{[\text{anàlit}]_{\text{inicial}} \text{ a la dissolució de càrrega}}$$

Si aquest factor és elevat, indica que la preconcentració és alta i que per tant el transport de l'anàlit ha estat important.

Els experiments de preconcentració tenen una durada de 24 hores en tots els casos per donar temps suficient perquè la dissolució de càrrega recirculi diverses vegades.

Els estudis de preconcentració s'han dut a terme emprant dues configuracions diferents:

- Sistema de membrana laminar on recircula la dissolució receptora (Figura 2.8).
- Mòdul de fibra buida (*hollow fiber*) (Figura 2.9).

2.3.3.1. Membrana laminar de flux

Es tracta d'un sistema que consta de dues membranes que limiten un compartiment central on hi ha la dissolució receptora que recircula utilitzant una bomba (**Figura 2.8**). En el cas de la dissolució de càrrega, hi ha dos compartiments de 200 ml de capacitat cadascun. Per tant, el volum total de la dissolució de càrrega és de 400 ml i per a la dissolució receptora s'utilitza un volum de 40 ml.

Condicions del sistema:

- Fase de càrrega: dissolució de glifosat i AMPA en NaOH 0,1 M, pH=12,5, V= 400 ml.
- Fase receptora: HCl 0,1 M, V= 40 ml.
- Fase orgànica: dissolució d'Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4% dodecanol.

- Cabal de recirculació: 0,85 ml/min.
- Temps de durada de l'experiment: 24 h.

A la **Taula 2.7** es mostren els resultats obtinguts amb aquest tipus de configuració.

Taula 2.7. Factor de preconcentració per a glifosat i AMPA a diferents concentracions inicials amb la membrana laminar de flux.

C_o fase de càrrega (ppm)	[AMPA] (ppm) d° receptora	F_{AMPA}	[glifosat] (ppm) d° receptora	$F_{glifosat}$
5	2,0	0,4	37,0	7,4
2	0,7	0,3	15,4	7,7
0,5	0,5	0,9	4,0	8,0

Per a les concentracions estudiades els resultats indiquen que, en variar la concentració inicial d'herbicida i de metabòlit a la dissolució de càrrega, la preconcentració assolida pràcticament no canvia, ja que només augmenta lleugerament en disminuir la concentració inicial. Per a l'AMPA no s'obté preconcentració (el factor de preconcentració és inferior a 1).

Es podria intentar disminuir més la concentració inicial, però el mètode cromatogràfic emprat en l'anàlisi (mètode 1: detecció UV-Vis) no permet detectar amb fiabilitat concentracions tan baixes, ja que no és prou sensible.

L'inconvenient de la configuració de membrana laminar on recircula la dissolució receptora és que no permet incrementar el volum de fase de càrrega, ja que les cel·les tenen uns compartiments de volum fix. I per a la dissolució receptora el volum mínim està al voltant de 25 ml, ja que és el volum necessari perquè la dissolució ompli el compartiment i recirculi. Per tant, no es poden aconseguir valors de preconcentració més elevats variant el volum, cosa que sí que es pot fer amb el mòdul de fibra buida.

2.3.3.2. Mòdul de fibra buida

El primer paràmetre estudiat és el cabal de circulació de les dissolucions, ja que les condicions hidrodinàmiques tenen una influència important en el funcionament del sistema

de membrana en aquest tipus de configuració. Si el cabal és elevat, el volum de la dissolució de càrrega pot ser més gran i, a més, passarà més vegades per l'interior de la fibra si la dissolució de càrrega es fa recircular. Però l'inconvenient és que, en augmentar el cabal, el contacte entre la dissolució de càrrega i la dissolució orgànica és menys efectiu. Per tant, cal determinar quin és el cabal òptim en el qual s'arriba a un compromís entre aquests dos factors.

En els experiments realitzats no hi ha preconcentració, ja que tant la dissolució de càrrega com la receptora tenen un volum de 200 ml. Així es pot comparar el resultat obtingut amb el mòdul de fibra buida amb el resultat que s'obtenia treballant amb les membranes laminars. Els resultats es mostren a la **Taula 2.8**.

Taula 2.8. Efecte de les condicions hidrodinàmiques (cabal) en la recuperació de glifosat i AMPA. Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i AMPA en NaOH 0,1 M (200 ml). Fase receptora: HCl 0,1 M (200 ml). Fase membrana: Aliquat 336 0,2M en dodecà: 4% dodecanol; temps: 24 h.

Cabal (ml/min)	% recuperació glifosat	% recuperació AMPA
0,35	75,6	9,4
0,45	82,8	13,6
0,60	82,0	14,6
0,85	87,2	15,8
1,00	81,7	16,4

En augmentar el cabal els resultats milloren significativament, sobretot en el cas de l'AMPA, però, com que també s'ha de tenir en compte que amb un cabal més elevat el temps de vida de la fibra és menor, s'opta per treballar amb un cabal intermedi de 0,6 o 0,85 ml/min.

Per decidir quin és el cabal que dona una millor preconcentració es fan experiments treballant amb un volum de la dissolució de càrrega de 250 ml i un volum de la dissolució receptora de 10 ml. També es proven dues concentracions d'Aliquat 336 diferents. Els resultats obtinguts es detallen a la **Taula 2.9**.

Taula 2.9. Efecte de la variació de la concentració d'Aliquat 336 i del cabal. Fase de càrrega: 5 ppm de glifosat i AMPA en NaOH 0,1 M (250 ml); fase receptora: HCl 0,1 M (10 ml); temps: 24 h.

[Aliquat 336] (M)	Cabal (ml/min)	F _{glifosat}	F _{AMPA}
0,1	0,60	11,4	0,46
0,2	0,60	14,2	1,2
0,2	0,85	19,4	2,5

Amb aquests experiments s'observa que els resultats són més favorables en augmentar la concentració d'Aliquat 336 de 0,1 a 0,2 M i si s'augmenta el cabal de 0,6 a 0,85 ml/min.

Amb aquestes condicions, Aliquat 336 0,2 M en la fase membrana i un cabal de 0,85 ml/min, es realitzen experiments tot variant la concentració inicial a la dissolució de càrrega. Els resultats obtinguts es detallen a la **Taula 2.10**.

Taula 2.10. Factors de concentració per a diferents concentracions inicials amb Aliquat 336 0,2 M i cabal de 0,85 ml/min. Fase de càrrega: glifosat i AMPA en NaOH 0,1 M (250 ml). Fase receptora: HCl 0,1 M (10 ml); temps: 24 h. ⁽¹⁾ Detecció amb el mètode de fluorescència.

C ₀ d ^o de càrrega (ppm)	[AMPA] (ppm) d ^o receptora	F _{AMPA}	[glifosat] (ppm) d ^o receptora	F _{glifosat}
5	12,3	2,6	97,0	18,7
2	6,7	2,4	23,5	9,9
0,5	1,1	2,2	4,0	8,1
0,01 ⁽¹⁾	<1	<1	0,032	3,2

En disminuir la concentració inicial a la dissolució de càrrega el factor de concentració també disminueix. Aquest resultat s'explica per la caiguda de concentració al llarg de la fibra.

Amb aquest tipus de configuració els millors factors de concentració obtinguts són de l'ordre de 19 per a glifosat i 2,5 per a AMPA.

Aquests resultats encara podrien ser més positius si s'incrementés la relació de volums entre la fase de càrrega i la fase receptora (el volum mínim de fase receptora amb què es pot treballar en aquest mòdul és de 3 ml si se la fa circular per la part exterior *shell*, i inferior en el cas de circular per la part interior de la fibra *lumen*).

Atès que s'havia comprovat que la concentració del NaOH afectava de manera important el sistema i que el NaCl donava més bons resultats que el HCl [45], es van variar les condicions següents:

- Fase de càrrega: 10 µg/l glifosat i AMPA en NaOH 0,05 M (250 ml).
- Fase receptora: NaCl 0,1 M (10 ml).

I els factors de concentració obtinguts van ser de 18,5 i <1, respectivament. Per tant, per al glifosat es millorava molt el resultat.

Per afavorir encara més el transport es va disminuir el volum de la dissolució de càrrega fins a 100 ml, ja que d'aquesta manera en el mateix temps la dissolució circulava més vegades per l'interior de la fibra. El volum de la dissolució receptora es va establir en 4 ml perquè la relació de volums que s'havia fet servir fins a aquell moment es mantingués. A més, es va augmentar la concentració de la dissolució de NaCl de 0,1 a 0,5 M. Els factors obtinguts en aquest cas van ser de 24,5 i 2,1 per a glifosat i AMPA, respectivament.

La **Taula 2.11** mostra una comparació dels resultats obtinguts en els diferents experiments esmentats. En tots la concentració dels anàlits és de 10 µg/l.

Taula 2.11. Factors de concentració per a glifosat i AMPA. Concentracions inicials: 10 µg/l; fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4 % dodecanol; cabal: 0,85 ml/min; temps: 24 h.

Fase de càrrega	Fase receptora	F glifosat	F AMPA
NaOH 0,1 M (250 ml)	HCl 0,1 M (10 ml)	3,2	<1
NaOH 0,05 M (250 ml)	NaCl 0,1 M (10 ml)	18,5	<1
NaOH 0,05 M (100 ml)	NaCl 0,5 M (4 ml)	24,5	2,1

El sistema es va aplicar per a diferents concentracions inicials dels anàlits i, a més, també es va fortificar una mostra d'aigua de riu a la qual es va ajustar el pH a 11 amb NaOH.

Els resultats obtinguts (vegeu la **Taula 2.12**) indiquen que la membrana líquida proposada és adequada per a la preconcentració de glifosat i s'obtenen factors de concentració elevats depenent de la relació de volums utilitzada.

Taula 2.12. Factors de concentració obtinguts per a glifosat i AMPA. Fase de càrrega: 100 ml. Fase receptora: NaCl 0,5 M (4 ml); fase orgànica: Aliquat 336 0,2 M en dodecà: 4% dodecanol; cabal: 0,85 ml/min.

Concentració inicial (mg/l)	Fase de càrrega	F glifosat	F AMPA
1	NaOH 0,05 M	23,1	3,0
1	aigua de riu a pH 11	25,0	3,4
10	NaOH 0,05 M	24,5	2,1
10	aigua de riu a pH 11	21,0	2,7
25	NaOH 0,05 M	21,6	2,7

Per intentar millorar aquests resultats, sobretot en el cas de l'AMPA, s'han assajat diversos compostos de pal·ladi com a possibles transportadors més selectius dels anàlits.

2.3.4. MEMBRANES LÍQUIDES D'AFINITAT

En el cas dels aminoàcids, per aconseguir-ne el transport també s'han aplicat complexos metàl·lics com a transportadors. Per exemple, aminoàcids com el triptòfan [46], fenilalanina, leucina, valina [47] o la glicina [48] poden interaccionar amb un metall com el pal·ladi de manera que s'aconsegueix el transport selectiu de l'aminoàcid. En el nostre cas, l'objectiu és aconseguir un extractant basat en pal·ladi que permeti una extracció més selectiva de glifosat i AMPA, ja que, com s'ha demostrat en el cas de fer servir Aliquat 336, la presència d'anions a la dissolució de càrrega afecta negativament l'extracció dels anàlits, ja que competeixen amb ells per les molècules del transportador.

En aquests experiments s'assagen dos tipus de compostos:

- 1- Complexos de pal·ladi formats durant el procés d'extracció líquid-líquid de pal·ladi amb una dissolució orgànica que conté un agent extractant de Pd (per exemple: Kelex 100, sulfur de trifenilfosfina, etc.).
- 2- Complexos de pal·ladi comercials o sintètics obtinguts en col·laboració amb el Grup de Catàlisi i Bioinorgànica del Departament de Química de la Universitat de Girona.

En el nostre grup de recerca s'havia treballat àmpliament amb diferents extractants que contenien àtoms de sofre, oxigen, nitrogen o fòsfor que formaven complexos amb pal·ladi i altres metalls preciosos. Els extractants estudiats eren: sulfur de trifenilfosfina (TPPS) [49], sulfur de triisobutilfosfina (Cyanex 471) [50], 7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinoleïna (Kelex 100) [51] i benzil(2-metoxi-3-difenilfosfino)propil èter (BPOMe) [52].

L'objectiu, en el nostre cas, és estudiar l'eficiència dels complexos de Pd formats com a transportadors de glifosat i AMPA en un sistema de membrana líquida d'afinitat.

Els corresponents complexos s'obtenen a partir d'una extracció líquid-líquid on la fase aquosa és una dissolució de Pd(II) en medi àcid i la fase orgànica un dels extractants esmentats en cumè: querosè (20:80 v/v) excepte per al BPOMe, que ja està dissolt en decalina. En aquestes condicions, després de 24 hores s'observa l'aparició de terceres fases en els experiments amb Cyanex 471 i TPPS; en canvi, els resultats són satisfactoris amb Kelex 100 i BPOMe, però les concentracions dels complexos de pal·ladi són baixes. Les estructures d'aquests dos extractants es mostren a la **Figura 2.16**.

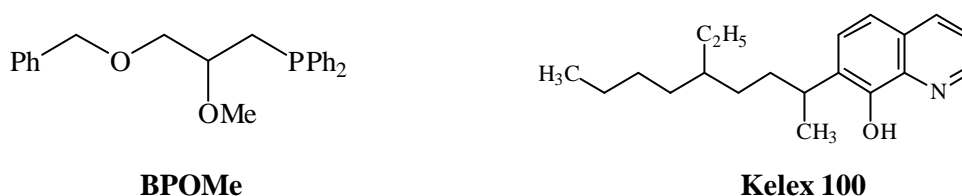


Figura 2.16. Estructures dels extractants BPOMe i Kelex 100

La fase orgànica que conté el complex de Pd s'utilitza per dur a terme els experiments amb glifosat. Amb aquesta solució s'impregna el suport i es constitueix la membrana líquida. Les condicions dels experiments de SLM són:

- Fase de càrrega: 5 mg/l de glifosat en NaOH 0,1 M o tampó fosfat a pH 9.
- Fase receptora: HCl 0,1 M.
- Temps: 24 hores.

En aquestes condicions no s'observa transport de glifosat en cap cas. Per determinar-ne la causa es realitzen proves d'extracció líquid-líquid en les quals la fase aquosa és una dissolució de glifosat de 5 mg/l en tampó fosfat a pH 9 i la fase orgànica la dissolució que conté el complex de Pd-Kelex 100 en cumè: querosè. S'obtenen extraccions entre 30-50% de glifosat després de 24 hores. En canvi, en realitzar proves de retroextracció amb àcids com HCl, HNO₃ i H₃PO₄, les recuperacions són inferiors al 5 % en tots els casos. A partir d'aquests resultats es dedueix que el pas problemàtic és la recuperació de glifosat en la fase receptora.

Una altra estratègia emprada ha estat la utilització de compostos de pal·ladi comercials o sintètics, de manera que la dissolució orgànica que constitueix la membrana es prepara per dissolució directa del complex de Pd en el dissolvent escollit. Els compostos de pal·ladi assajats es mostren a la **Figura 2.17**.

El problema principal que presenten aquests compostos és la seva baixa solubilitat en els dissolvents emprats per a la preparació de les membranes líquides. Tots són insolubles en dissolvents alifàtics com querosè, dodecà o decalina i només es solubilitzen parcialment (< 5 mM) en dissolvents aromàtics com cumè o anetol. Com ja s'ha esmentat anteriorment, l'inconvenient d'aquests darrers dissolvents és que poden fer malbé el suport polimèric on s'impregna la membrana.

Es fan diversos experiments amb SLM amb els compostos de pal·ladi esmentats, però no s'obtenen resultats positius.

Com que amb l'extractant Pd-Kelex 100 basat en 8-hidroxiquinoleïna s'observa una certa extracció de glifosat, es decideix immobilitzar el pal·ladi en una resina on també és present aquest grup funcional. D'aquesta manera es pot aconseguir augmentar la quantitat de pal·ladi que pot interaccionar amb glifosat. En aquest cas, els resultats obtinguts són satisfactoris, tal com es pot veure al **capítol 3** d'aquesta memòria.

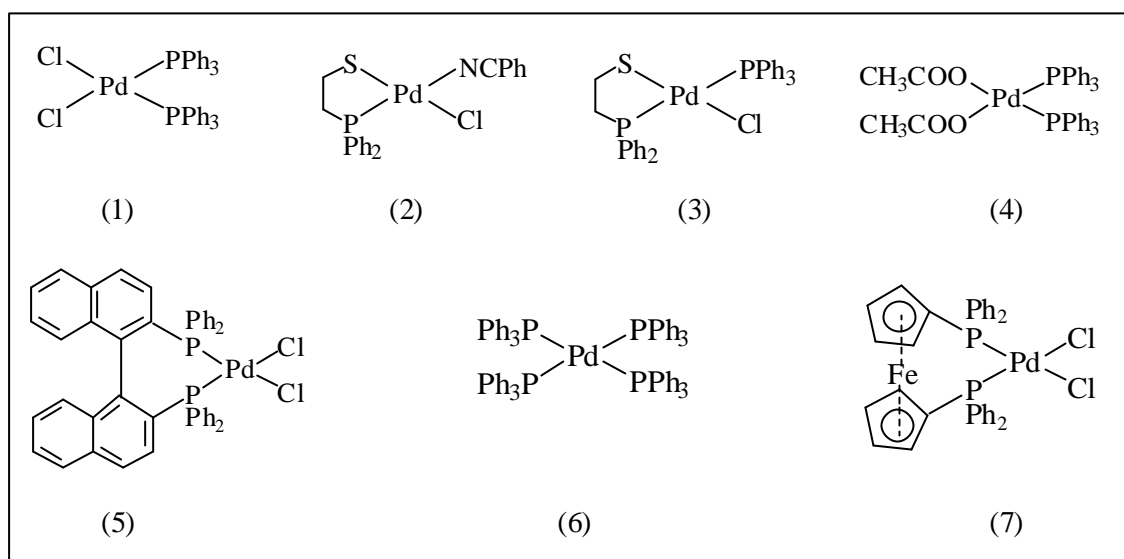


Figura 2.17. Compostos de pal·ladi comercials o sintètics assajats per a l'extracció de glifosat.

- (1) diclorobis(trifenilfosfina)pal·ladi(II);
- (2) cloro2(difenilfosfino)etanotiolato(benzonitril)pal·ladi(II)
- (3) cloro2(difenilfosfino)etanotiolato(trifenilfosfina)pal·ladi(II)
- (4) [diacetatobis(trifenilfosfina)pal·ladi(II)
- (5) dicloro[R-(+)-2,2'-Bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil]pal·ladi(II)
- (6) [tetrakis(trifenilfosfina)]pal·ladi(0)
- (7) dicloro[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocè]pal·ladi(II)

2.4. REFERÈNCIES

1. R. D. Noble, *Sep. Sci. Technol.*, 22 (2&3) (1987) 731.
2. J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 205.
3. P. R. Danesi, *Sep. Sci. Technol.*, 19 (11&12) (1984-85) 857.
4. R.W. Baker, I. Blume, *Coupled Transport Membranes in Handbook of Industrial Membrane Technology*, M.C. Porter Ed., Noyes Publication, Nova Jersey (1990) 511.
5. D. E. Barnes, G. D. Marshall, J. F. Van Staden, *Sep. Sci. Technol.*, 17 (9) (1982) 1183.
6. L. L. Tavlarides, J.H. Bae, C.K. Lee, *Sep. Sci. Technol.*, 22 (2&3) (1987) 581.
7. R. A. Bartsch (ed.), J. Douglas Way (ed.), *Chemical Separations with Liquid Membranes*, ACS Symposium Series n° 642, Washington (1996), cap. 25, B. M. Misra, J. S. Gill (Supported liquid membranes in metal separations).
8. N. Megersa, T. Solomon, J. A. Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 830 (1999) 203.
9. J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 11 (3) (1992) 106.
10. B. Moreno Cordero, J. L. Pérez Pavón, C. García Pinto, M. E. Fernández Laespada, R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 195.
11. J. De Gyves, E. Rodríguez de San Miguel, *Ind. Eng. Chem. Res.*, 38 (1999) 2182.
12. M. Papantoni, N. Djane, K. Ndung'u, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Analyst*, 120 (1995) 1471.
13. C. Fontàs, *Disseny i caracterització de sistemes de membrana líquida per al transport de metalls del grup del platí. Aplicacions a la separació de Rh, Pd i Pt* (tesi doctoral) Universitat de Girona (2001).
14. J. A. Jönsson, L. Mathiasson, B. Lindegard, J. Trocewicz, A.M. Olsson, *J. Chromatogr. A*, 665 (1994) 259.
15. B. Lindegard, H. Bjork, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, A.M. Olsson, *Anal. Chem.*, 66 (1994) 4490.
16. S. Palmarsdottir, E. Thordarson, L.E. Edholm, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem.*, 69 (1997) 1732.
17. Y. Shen, J.A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 946.
18. J. Norberg, J. Emneus, J. A. Jönsson, L. Mathiasson, E. Burestedt, M. Knutsson, G. Marko-Varga, *J. Chromatogr. B*, 701 (1997) 39.
19. M. Khrolenko, P. Dzygiel, P. Wiczorek, *J. Chromatogr. A*, 975 (2002) 219.
20. R. Carabias Martínez, E. Rodríguez Gonzalo, E. Hernández Fernández, J. Hernández Méndez, *Anal. Chim. Acta*, 304 (1995) 323.
21. M.E. Fernández Laespada, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 852 (1999) 395.
22. L. Grönberg, Y. Shen, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 655 (1993) 207.

23. Y. Shen, V. Obuseng, L. Grönberg, J. A. Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 725 (1996) 189.
24. J. Norberg, A. Zander, J.A. Jönsson, *Chromatographia*, 46 (9/10) (1997) 483.
25. M. Knutsson, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *Chromatographia*, 42 (3/4) (1996) 165.
26. M. Sandahl, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 975 (2002) 211.
27. G. Nilvé, M. Knutsson, J.A. Jönsson, *J. Chromatogr. A*, 688 (1994) 75.
28. J. Chao, J. Liu, M. Wen, J. Liu, Y. Cai, G. Jiang, *J. Chromatogr. A*, 955 (2002) 183.
29. J. Trocewicz, *J. Chromatogr. A*, 725 (1996) 121.
30. M. Knutsson, G. Nilvé, L. Mathiasson, J. A. Jönsson, *J. Agric. Food Chem.*, 40 (1992) 2413.
31. N. Megersa, L. Chimuka, T. Solomon, J.A. Jönsson, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 567.
32. L. Chimuka, N. Megersa, J. Norberg, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 3906.
33. S. Takeshima, S. Wada, H. Sakurai, *Sep. Sci. Technol.*, 29 (16) (1994) 2117.
34. C. V. Uglea, C. V. Zanoaga, *J. Membr. Sci.*, 47 (1989) 285.
35. M. Teramoto, T. Yamashiro, A. Inoue, A. Yamamoto, H. Matsuyama, Y. Miyake, *J. Membr. Sci.*, 58 (1991) 11.
36. H. Itoh, M.P. Thien, T. A. Hatton, D.I.C. Wang, *Biotechnol. Bioeng.*, 35 (1990) 853.
37. S-A. Hong, J-W. Yang, *J. Membr. Sci.*, 86 (1994) 181.
38. P. Wieczorek, J. A. Jönsson, L. Mathiasson, *Anal. Chim. Acta*, 346 (1997) 191.
39. R. Molinari, L. Bartolo, E. Drioli, *J. Membr. Sci.*, 73 (1992) 203.
40. P. Dzygiel, P. Wieczorek, L. Mathiasson, J.A. Jönsson, *Anal. Lett.*, 31 (7) (1998) 1261.
41. S. Kawai, B. Uno, M. Tomita, *J. Chromatogr.* 540 (1991) 411.
42. C. J. Miles, L. R. Wallace, H.A. Moye, *J. AOAC Int.* 69 (3) (1986) 458.
43. R. Molinari, E. Drioli, G. Pantano, *Sep. Sci. Technol.*, 24 (1989) 1015.
44. C. Fontàs, V. Salvadó, M. Hidalgo, *J. Membr. Sci.*, 223 (2003) 39.
45. P. Dzygiel, P. Wieczorek, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 93.
46. J. A. Calzado, C. Palet, J. A. Jonsson, M. Valiente, *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 159.
47. J.A. Calzado, C. Palet, M. Valiente, *J. Sep. Sci.* 24 (2001) 533
48. S. Diez, P. Zhou, S. Daunert, M. Valiente, *Anal. Chim. Acta*, 315 (1995) 339.
49. E. Anticó, M. Hidalgo, A. Masana, V. Salvadó, M. Valiente, *React. Funct. Polym.*, 28 (2) (1996) 103.
50. M. Hidalgo, A. Masana, V. Salvadó, M. Muñoz, M. Valiente, *Talanta*, 38 (5) (1991) 483.
51. E. Anticó, M. Hidalgo, A. Masana, V. Salvadó, J. Havel, M. Valiente, *Anal. Chim. Acta*, 278 (1993) 91.
52. C. Fontàs, L. Compañó, A. Polo, V. Salvadó, M. Hidalgo, *Solvent Extr. Ion Exch.* 19 (2001) 329.

CAPÍTOL 3

**PRECONCENTRACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA PER CROMATOGRÀFIA
D'AFINITAT AMB IÓ METÀL·LIC IMMOBILITZAT (IMAC)**

CONTINGUTS CAPÍTOL 3:

3.1. INTRODUCCIÓ	99
3.1.1. PRINCIPIS DE LA TÈCNICA IMAC.....	101
3.1.1.1. <i>Immobilització de l'ió metàl·lic</i>	102
3.1.1.1.1. Elecció de l'ió metàl·lic	102
3.1.1.1.2. Grup quelant.....	102
3.1.1.1.3. Suport polimèric	104
3.1.1.2. <i>Procés d'adsorció</i>	105
3.1.1.3. <i>Procés d'elució</i>	106
3.1.1.4. <i>Regeneració de la columna IMAC</i>	106
3.1.2. AVANTATGES I LIMITACIONS DE LA TÈCNICA IMAC.....	107
3.1.3. APLICACIONS DE LA TÈCNICA IMAC.....	108
3.1.4. RESINES QUELANTS UTILITZADES EN AQUEST ESTUDI.....	109
3.1.4.1. <i>Spheron Oxine 1000 i Spheron Thiol 1000</i>	110
3.1.4.2. <i>Iontosorb Oxin 100</i>	111
3.2. EXPERIMENTAL.....	113
3.2.1. REACTIUS	113
3.2.2. DISSOLUCIONS.....	113
3.2.3. APARELLS I MATERIAL.....	114
3.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	115
3.2.4.1. <i>Determinació de glifosat i AMPA</i>	115
3.2.4.2. <i>Determinació dels ions metàl·lics Pd (II) i Cu(II)</i>	115
3.2.4.3. <i>Preconcentració amb el mètode IMAC</i>	115
3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	119
3.3.1. DISSENY DEL PROCEDIMENT IMAC AMB LA RESINA SPHERON OXINE 1000	119
3.3.1.1. <i>Estudi del procés d'elució de glifosat</i>	122
3.3.1.2. <i>Influència del pH de la fase de càrrega</i>	125
3.3.1.3. <i>Estudi del cabal de càrrega i d'elució</i>	126
3.3.1.4. <i>Volum de trencament</i>	126
3.3.2. APLICACIÓ DEL MÈTODE IMAC A AIGÜES NATURALS.....	128
3.3.3. RESINA IONTOSORB OXIN 100	131
3.3.3.1. <i>Determinació de la capacitat de Iontosorb Oxin per a Pd i Cu</i>	132
3.3.3.2. <i>Preconcentració de glifosat i AMPA amb Pd-Iontosorb Oxin</i>	133
3.3.3.3. <i>Preconcentració de glifosat i AMPA amb Cu-Iontosorb Oxin</i>	135
3.3.3.4. <i>Aplicació de Iontosorb Oxin per a aigües naturals fortificades</i>	135
3.3.4. RESINA SPHERON THIOI 1000.....	136
3.3.5. COMPARACIÓ DE LES TRES RESINES EMPRADES	138
3.4. REFERÈNCIES	141

3.1. INTRODUCCIÓ

En cromatografia la distribució del solut entre les dues fases és deguda a diferents fenòmens fisicoquímics que depenen de la naturalesa intrínseca del solut i de les fases [1]. D'aquí es deriven diferents tipus de cromatografia:

- Cromatografia de repartiment: el solut es reparteix entre la fase mòbil i la fase estacionària, que és un líquid suportat en un sòlid inert.

- Cromatografia d'adsorció: on el sòlid (fase estacionària) adsorbeix el solut que inicialment era a la fase mòbil.
- Cromatografia de bescanvi iònic: la fase estacionària sòlida és un bescanviador d'ions.
- Cromatografia d'exclusió molecular (filtració per gel): la fase estacionària és un gel format per polímers no iònics porosos que retenen les molècules de solut segons la seva mida.
- Cromatografia d'afinitat: és un tipus especial de cromatografia d'adsorció, utilitzada especialment en bioquímica, en la qual la fase estacionària sòlida està enllaçada amb un lligand d'afinitat, que pot ser, per exemple, un inhibidor enzimàtic o un anticòs.

La base d'aquest darrer tipus de cromatografia és la que s'ha utilitzat en aquest estudi, on s'ha desenvolupat un mètode de preconcentració per a glifosat i AMPA basat en la tècnica de **cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC)**.

El 1975 Porath et al. [2] van introduir un nou tipus de cromatografia i li van donar el nom de *cromatografia d'afinitat de quelat metàl·lic*, però posteriorment va passar a anomenar-se *cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC)*. Els autors indicaven que la tècnica era adequada per a la separació i l'aïllament de proteïnes gràcies a la seva diferent afinitat per a ions metàl·lics que formen part d'una substància quelant immobilitzada en un suport (resina).

Com que la interacció entre el metall i la proteïna tenia un caràcter reversible, es podia aconseguir l'adsorció de les proteïnes i la seva posterior elució en condicions que no provoquessin la desnaturalització de les proteïnes.

IMAC és un tipus especial de cromatografia de bescanvi de lligand (*ligand-exchange chromatography*, LEC) introduïda per Helfferich [3] el 1961 per a la separació de molècules petites.

A la **Taula 3.1** es compara la tècnica IMAC amb altres tècniques basades en adsorció com la cromatografia d'afinitat i la cromatografia de bescanvi iònic (IEC). IMAC se situa entre la veritable cromatografia d'afinitat i les altres tècniques d'adsorció i en molts casos n'és complementària.

Taula 3.1. Comparació d'IMAC amb altres tècniques d'adsorció [4]

Propietat	IMAC	Afinitat	Bescanvi iònic
Capacitat	Mitjana-alta	Baixa	Alta
Recuperació	Alta	Mitjana	Alta
Càrrega	Moderada	Moderada	Moderada
Elució	Moderada	Complexa	Moderada
Regeneració	Completa	Incompleta	Completa
Selectivitat	Mitjana-alta	Alta	Baixa-mitjana
Cost	Baix	Alt	Baix

3.1.1. PRINCIPIS DE LA TÈCNICA IMAC

IMAC és una tècnica de separació basada en la immobilització d'un ió metàl·lic apropiat en un suport polimèric, mitjançant un grup actiu quelant, que permet la interacció selectiva entre les espècies d'interès i aquest metall immobilitzat.

IMAC bàsicament s'ha aplicat per a la separació de biomolècules en solució com aminoàcids, pèptids i proteïnes.

A la **Figura 3.1** es mostra un esquema bàsic del fonament de la tècnica IMAC.

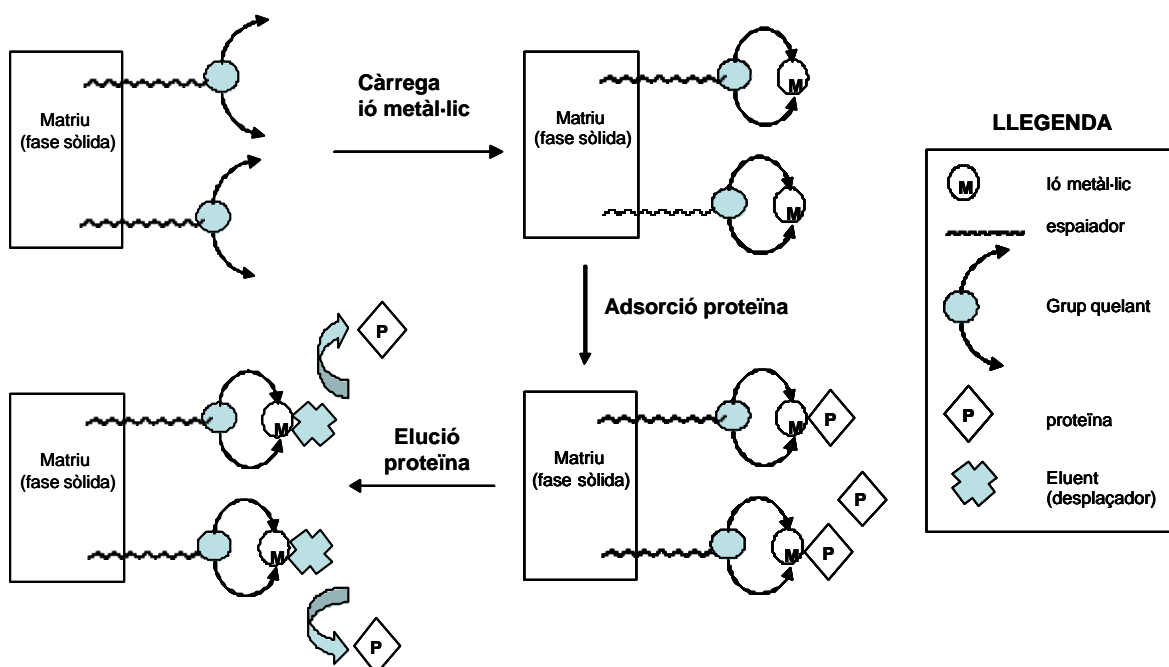


Figura 3.1. Diagrama dels mecanismes implicats en l'adsorció i elució de proteïnes en el procés IMAC.

En general la tècnica IMAC consta de dues etapes fonamentals (adsorció i elució de la proteïna o proteïnes d'interès) on tenen lloc cinc operacions bàsiques fàcilment automatitzables: immobilització del metall i equilibratge de la columna, introducció de la mostra (adsorció), rentat per eliminar la fracció no enllaçada, elució i regeneració.

3.1.1.1. Immobilització de l'ió metàl·lic

Cal triar l'ió metàl·lic adequat, així com el lligand quelant i la matriu o suport polimèric.

3.1.1.1.1. Elecció de l'ió metàl·lic

Les diferències en l'afinitat de les proteïnes per un metall concret es pot explicar, en part, mitjançant la teoria d'àcids i bases forts i febles, tal com descriu Pearson [5]. Aquesta teoria postula que, quan dos àtoms s'uneixen, un actua com a àcid de Lewis i l'altre com a base de Lewis. La força d'aquesta unió està governada per la duresa o debilitat dels àtoms implicats. La teoria indica que unions entre àtoms amb duresa similar, per exemple àcid fort amb base forta, són les més fortes. Ions metàl·lics com K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} i Fe^{3+} es classifiquen com a àcids de Lewis forts, mentre que ions com Ag^+ , Cu^+ i els metalls del grup del platí com Pt^{2+} i Pd^{2+} són àcids de Lewis febles. Els ions metàl·lics de transició, com Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} i Ni^{2+} , són considerats de duresa intermèdia. Aquests darrers ions són els més utilitzats en IMAC; en canvi, els febles han estat poc estudiats com a centres actius d'adsorbents per a proteïnes.

L'afinitat de les proteïnes per als ions metàl·lics que formen un quelat i estan immobilitzats al suport es pot predir amb la teoria d'àcids i bases forts i febles. Es consideren bases dures els lligands que contenen oxigen (com un grup carboxílic), nitrogen alifàtic (per exemple: asparagina i glutamina) i fòsfor (per exemple: aminoàcids fosforilats). Són febles les que contenen sofre, com per exemple la cisteïna, i són intermèdies les que contenen nitrogen aromàtic (com histidina i triptòfan) [6].

Per tant, els ions metàl·lics durs interaccionen bàsicament amb oxigen, els febles amb sofre i els intermedis amb nitrogen, però també poden fer-ho amb oxigen i sofre.

3.1.1.1.2. Grup quelant

La majoria dels grups quelants utilitzats en IMAC són compostos multidentats. Aquests grups quelants s'uneixen a la superfície d'un sorbent mitjançant espaiadors (grups

enllaçants) que poden variar en llargada i estructura. L'estructura final metall-grup quelant ha de contenir posicions de coordinació lliures en l'ió metàl·lic perquè les proteïnes s'hi puguin enllaçar. El nombre de posicions lliures explica moltes vegades per què les proteïnes tenen diferents afinitats per als diversos quelats.

Els grups quelants més utilitzats en IMAC són: àcid iminodiacètic (IDA), àcid nitrilotriacètic (NTA), àcid aspàrtic carboximetilat (CM-Asp) i triscarboximetil etilendiamina (TED). Les estructures d'aquests quelants es mostren a la **Figura 3.2**. Aquests lligands donen lloc a complexos tridentats (IDA), tetradentats (NTA, CM-Asp) i pentadentats (TED) amb el metall.

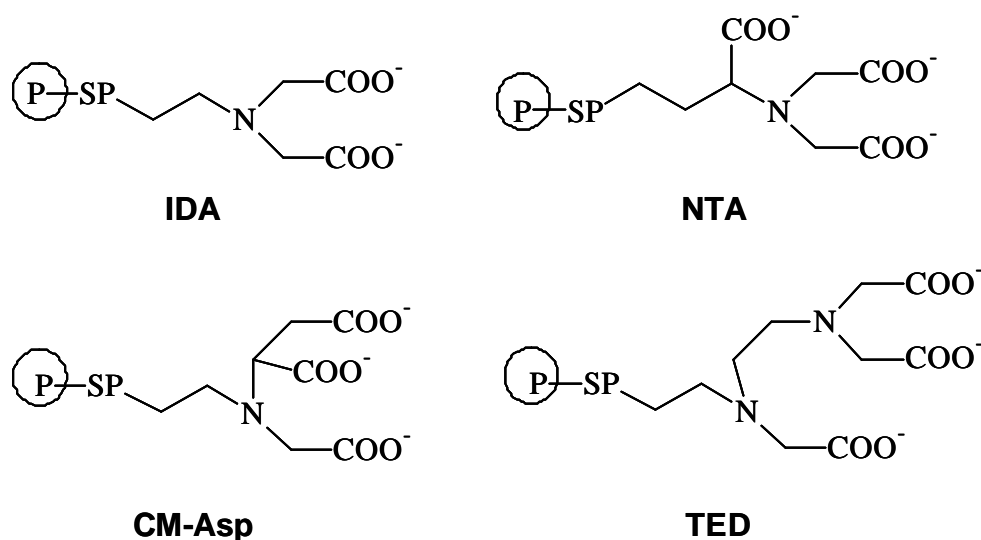


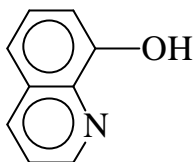
Figura 3.2. Estructures de diversos lligands quelants. SP = espaciador; P = matriu

L'IDA és el lligand que més s'ha utilitzat en IMAC. Els tetradentats tenen més afinitat per l'ió metàl·lic, però no es coordinen tan bé amb les proteïnes, a causa de la pèrdua d'un lloc de coordinació. Aquest efecte s'accentua encara més amb el quelant pentadentat, ja que només hi queda un lloc de coordinació lliure per on pugui enllaçar-se la proteïna. Per tant, l'afinitat d'aquests adsorbents per a les proteïnes sol seguir el següent ordre (M representa el metall):



Aquest ordre és exactament l'invers a l'afinitat que té el grup quelant per al metall.

També s'han sintetitzat altres lligands quelants que no es basen en carboximetilamines, que s'han aplicat satisfactòriament per a la separació de diverses proteïnes; entre aquests hi ha: O-fosfoserina (OPS) i 8-hidroxiquinoleïna (8-HOx). Aquest darrer és un lligand bidentat i un dels utilitzats en aquest estudi:



3.1.1.1.3. Suport polimèric

El suport polimèric ha de presentar unes característiques fisicoquímiques concretes per ser adequat per a IMAC. El suport ideal es caracteritzaria pel fet de [6]:

- Ser fàcil de derivatitzar.
- No exhibir adsorció no específica.
- Tenir estabilitat física, mecànica i química.
- Elevada porositat per afavorir l'accessibilitat del lligand.
- Permetre l'ús de cabals alts.
- Ser estable als eluents, incloent-hi, per exemple, els compostos desnaturalitzadors.
- Permetre la regeneració de la columna sense degeneració de la matriu.
- Proporcionar un llit estable sense pèrdues ni inflament durant el procés cromatogràfic.

Les fases estacionàries clàssiques es basen en matrius gel com agarosa o dextrà [7]. Els adsorbents inorgànics com el gel de sílice presenten propietats mecàniques excel·lents, però exhibeixen adsorció irreversible no específica de proteïnes i, per tant, no són adequats. La seva combinació amb polisacàrids ha donat lloc a l'aparició de diferents suports per a IMAC.

Altres adsorbents difosos comercialment combinen agarosa amb quars i dextrà, per exemple, i aconsegueixen una distribució de partícules ben definida.

També han esdevingut importants les matrius basades en cel·lulosa, que s'han aplicat molt en configuració de membranes (membranes d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat).

En general, les noves fases estacionàries utilitzades tenen més capacitat per coordinar-se amb el metall i per retenir les proteïnes.

Per al procediment d'immobilització del metall no existeix un protocol estàndard. La immobilització se sol fer en medi tamponat, en aigua desionitzada o en medi àcid. Per eliminar l'excés de metall que no s'ha enllaçat al grup quelant també es fa en condicions diverses, com ara rentant en presència de glicina o imidazole, tampó, aigua desionitzada, medi àcid, etc. A continuació s'equilibra l'adsorbent, procés que es fa en general amb tampons com fosfat sòdic, Tris, acetat sòdic, etc., depenent del tipus de metall emprat (fort, intermedi, feble).

Un cop carregada la resina amb el metall i equilibrada, ja es pot procedir a passar-hi la mostra que conté les biomolècules (aminoàcids, pèptids o proteïnes).

3.1.1.2. Procés d'adsorció

L'adsorció depèn de les propietats de la proteïna implicada, però també del tipus d'ió metàl·lic (fort, intermedi, feble). Altres paràmetres que poden influir en aquest procés són la força iònica i el pH. Modificadors com agents quelants, detergents i dissolvents orgànics també es poden afegir a la solució tamponada per millorar la selectivitat cromatogràfica. En general la disminució de la temperatura millora l'adsorció, però provoca l'eixamplament de la banda [8].

Depenent del tipus de mostra que s'aplica, existeixen quatre possibilitats de dur a terme el procés IMAC [4]:

- La proteïna d'interès es coordina amb l'ió metàl·lic immobilitzat (IMAC normal).
- La proteïna conté un metall a la superfície (per exemple, les metal·loproteïnes) i s'enllaça a un grup quelant immobilitzat en un suport (IMAC reversa).
- La proteïna d'interès no es coordina amb l'ió metàl·lic i passa per la columna sense quedar retinguda (adsorció negativa).
- La proteïna es coordina amb el metall, provoca el trencament de l'enllaç metall·ligand quelant i el grup proteïna-metall passa sense quedar retingut a la columna (transferència d'ió metàl·lic MIT).

En general interessa tenir el procés d'IMAC normal, però per a algunes aplicacions l'adsorció negativa pot ser útil.

3.1.1.3. Procés d'elució

Típicament l'elució de les proteïnes es pot aconseguir de tres maneres diferents: protonació, bescanvi de lligand, destrucció del quelat [9].

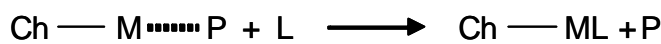
La **protonació** és el mètode més utilitzat per aconseguir l'elució. En disminuir el pH es protona algun grup (per exemple els nitrògens de les cadenes laterals de les histidines), es trenca l'enllaç proteïna-metall i s'allibera la proteïna.



on Ch és el lligand quelant, M el metall, P la proteïna i H els protons.

Cal tenir en compte que el quelat ha de ser estable a pH baix i que a la proteïna no l'ha d'afectar aquesta disminució del pH, ni ha de precipitar a l'interior de la columna.

Amb **bescanvi de lligand** l'elució es pot aconseguir afegint un lligand quelant (com l'imidazole) que competeix amb el complex existent.



on L és el lligand afegit.

La **destrucció del quelat** s'aconsegueix si s'afegeix un agent quelant fort com EDTA. Aquest tipus d'elució només és aconsellable si l'elució no es pot aconseguir amb cap altre mecanisme i si la proteïna d'interès és l'única retinguda a la columna, ja que, si no, s'aconseguirà recuperar però no es purificarà. Cal tenir present que algunes proteïnes poden perdre els metalls que tenen a l'estructura i, per tant, quedar inactivades.



3.1.1.4. Regeneració de la columna IMAC

Un cop finalitzat el procés IMAC es pot regenerar l'adsorbent i reutilitzar-lo. És important remarcar que els adsorbents IMAC tenen propietats de regeneració molt favorables.

Una opció possible és extreure el metall de forma gairebé quantitativa mitjançant un agent quelant fort com EDTA i aleshores rentar l'adsorbent sota condicions estrictes i esterilitzar-lo. Això no sol ser possible quan es fa servir cromatografia d'afinitat.

L'adsorbent es pot recarregar amb el metall novament i reutilitzar-lo en un elevat nombre d'experiments.

3.1.2. AVANTATGES I LIMITACIONS DE LA TÈCNICA IMAC

La tècnica IMAC presenta avantatges únics i atractives característiques [6]:

- Possibilitat de purificació en una única etapa.
- La capacitat d'enllaçar proteïnes és força elevada comparada amb altres tècniques d'afinitat (0,1-10 $\mu\text{M}/\text{ml}$ gel).
- Els ions metàl·lics es poden extreure de la resina mitjançant un agent quelant fort com EDTA. Així es poden provar diferents ions metàl·lics amb la mateixa resina per avaluar quin és el que proporciona els millors resultats per a una proteïna concreta.
- Es pot utilitzar per concentrar proteïnes.
- És compatible amb diversos tampons que tenen forces iòniques elevades.
- En general no afecta negativament l'estructura de les proteïnes.
- La resina IMAC es pot regenerar centenars de vegades sense pèrdua de les característiques cromatogràfiques.
- És factible aplicar la tècnica a la indústria amb resultats reproduïbles.

També presenta, però, un seguit d'inconvenients:

- El procés MIT (on la proteïna queda carregada amb el metall) pot afectar-la negativament i provocar la pèrdua de la seva bioactivitat. En altres casos, però, aquest procés pot servir per carregar la proteïna amb un metall determinat. Si es vol fer servir la proteïna amb finalitats terapèutiques cal assegurar-se que no està carregada amb cap metall tòxic.

- Les pèrdues d'ió metàl·lic provoquen que el producte final acabi contaminat amb el metall (problema greu si es tracta de medicaments). Per solucionar-ho s'utilitza una altra columna que conté un agent quelant que reté el metall. El problema és l'increment del cost i la generació d'un residu que conté el metall.
- Alguns ions metàl·lics immobilitzats a la resina poden tenir reaccions redox i cal utilitzar condicions oxidatives per evitar-ho.

3.1.3. APLICACIONS DE LA TÈCNICA IMAC

La tècnica IMAC bàsicament s'ha aplicat per a biomolècules com aminoàcids, pèptids i proteïnes.

A les primeres aplicacions descrites de la tècnica l'objectiu era introduir el nou concepte d'IMAC i, per tant, no es basaven en problemes concrets de separació de proteïnes. Porath et al. [2] el 1975 van descriure'n l'aplicació amb proteïnes del sèrum com a model emprant coure i zinc. Aquests dos ions metàl·lics, juntament amb el níquel, eren els més utilitzats a l'inici. Porath i Olin [10] també van ser dels primers a introduir el ferro com a metall per a IMAC i diferenciar entre l'afinitat obtinguda amb metalls intermedis com el coure, el zinc i el níquel i metalls durs com el ferro.

Posteriorment una aplicació important de la tècnica ha estat la separació de polipèptids recombinants a partir de la inserció d'una cadena curta d'histidines a l'N-terminal o el C-terminal d'un pèptid o proteïna [11,12].

Una de les aplicacions més interessants és la separació i purificació de proteïnes. Per exemple, s'han descrit aplicacions on se separen insulines a partir de la seva retenció en fases estacionàries tetrafenilporfirines, on s'ha immobilitzat zinc o coure[12]; o es purifica lactat deshidrogenasa de múscul de pit de pollastre a partir de la seva interacció amb cobalt [14]; o s'estudia la selectivitat de metalls com coure, crom, manganès, cobalt, zinc i níquel [15] o metalls durs com alumini, calci, ferro, etc. [16] per retenir lisozima blanca d'ou de gallina, citocrom C i mioglobina de cavall i proteïnes del sèrum. També s'ha aplicat per purificar l'hormona del creixement humà mitjançant la seva interacció amb coure (II) immobilitzat en una resina de matriu de cel·lulosa [17] i per separar completament albúmina d'hemoglobina, ja que aquesta darrera es coordina amb Zn immobilitzat a una resina i l'albúmina no interacciona [18].

També cal destacar els nombrosos estudis que s'han fet per introduir lligands quelants adequats per a la separació de proteïnes amb la tècnica IMAC com 8-hidroxiquinoleïna [19], O-fosfoserina [20] o, més recentment, N-(2-piridilmetil)aminoacetat [21].

Altres aplicacions existents fan referència al fraccionament i la caracterització d'àcids húmics a partir de la seva afinitat per una resina on hi ha immobilitzat coure [22] o ferro [23], o la purificació de DNA i oligonucleòtids o com a tècnica de prefraccionament en el camp de la proteòmica.

Més recentment també s'han descrit aplicacions on es fa servir un metall feble com el pal·ladi. Per exemple, s'ha aplicat per adsorbir selectivament aminoàcids com el triptòfan o la tirosina [24], o també per a la glicina [25]. També s'han estudiat les estructures de diferents complexos que es poden formar entre el pal·ladi i diversos pèptids [26].

També se n'ha descrit l'aplicació per immobilitzar acetilcolinesterasa a través de Ni-NTA-sílíce en un biosensor dissenyat per determinar plaguicides organofosforats com paraoxó, diclorvós i clorpirifos etil oxon [27].

Concretament, per a l'herbicida glifosat s'ha fet servir una resina quelant, Chelex-100, on s'ha immobilitzat ferro per purificar les mostres. Aquesta resina s'acobla a una altra de bescanvi iònic [28,29] per així millorar la purificació dels extractes.

3.1.4. RESINES QUELANTS UTILITZADES EN AQUEST ESTUDI

En aquesta tesi doctoral s'han utilitzat tres resines quelants que s'han carregat amb pal·ladi: Spheron Oxine 1000, Spheron Thiol 1000 i Iontosorb Oxin 100.

La selecció d'aquestes resines i el metall es basa en l'experiència prèvia del nostre grup de recerca, que havia estudiat àmpliament la interacció de l'ió metàl·lic Pd(II) amb resines de matriu acrílica que contenen com a grups funcionals 8-hidroxiquinoleïna i tiol (resines comercials Spheron) [30,31].

Les característiques del glifosat i l'AMPA suggereixen que és possible la seva coordinació amb pal·ladi.

A més, la selecció també es basa en l'estudi proposat per Díez et al. [25], on s'aplica la resina Spheron Oxine 1000 carregada amb pal·ladi per a la separació de l'aminoàcid glicina. Com s'ha esmentat en capítols anteriors, el glifosat té una estructura similar a

aquest aminoàcid i, per tant, es creu que el mateix sistema podria ser adequat per determinar-lo.

3.1.4.1. Spheron Oxine 1000 i Spheron Thiol 1000

Les resines Spheron consisteixen en una matriu d'un copolímer d'hidroxietilmetacrilat i etilendimetacrilat (**Figura 3.3**).

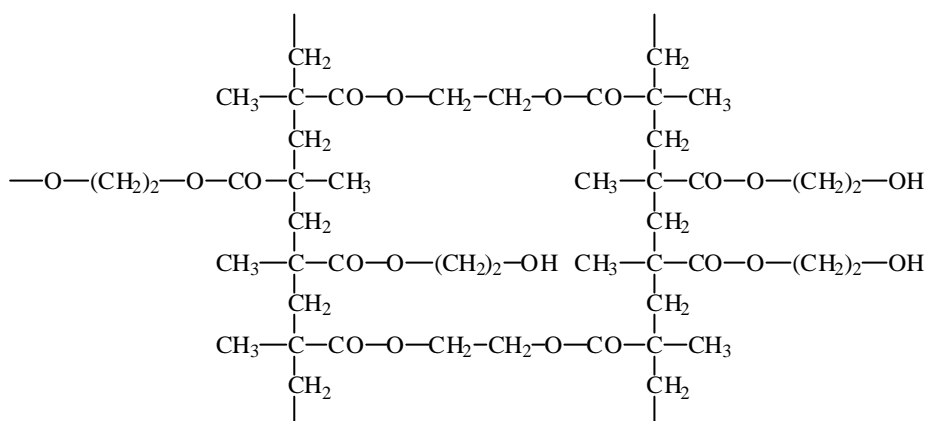


Figura 3.3. Matriu acrílica de les resines Spheron.

En la resina Spheron Oxine 1000 el grup funcional 8-hidroxiquinoleïna s'uneix a la matriu acrílica per mitjà d'un enllaç azo i una cadena lateral flexible. L'estructura del grup funcional quelant d'aquesta resina es mostra a la **Figura 3.4**.

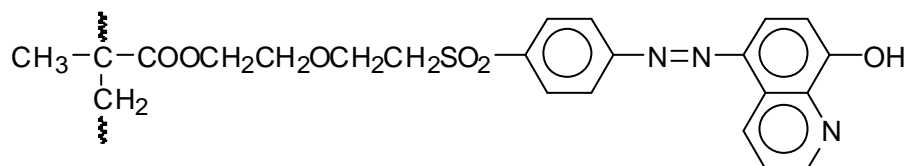


Figura 3.4. Estructura del grup funcional quelant de la resina Spheron Oxine 1000.

La mida de partícula oscil·la entre 40 i 63 μm i la mida de porus mitjana entre 37 i 50 nm. Presenten una àrea superficial interna gran i els gels no perden la seva estructura quan s'assequen; a més, la porositat no queda modificada quan s'asseca i es mulla la resina diverses vegades.

Presenta un grau d'inflament petit i els canvis de volum són molt petits per a valors diferents de pH i de força iònica de les solucions en contacte amb la resina.

Tenen gran rigidesa mecànica i són tèrmicament molt estables, ja que descomponen a temperatures superiors als 200 $^{\circ}\text{C}$. També tenen gran estabilitat química i són estables dins del rang de pH de 0 a 12.

Una propietat molt important és que presenta una cinètica d'adsorció ràpida a causa de la matriu amb caràcter hidrofílic i del grup quelant amb àtoms de nitrogen i oxigen.

Els grups hidroxil de les cadenes laterals de la matriu acrílica en permeten la modificació química i s'obtenen altres resines quelants com Spheron Thiol 1000, que presenta com a grup funcional un tiol. La seva estructura s'esquemmatitza a la **Figura 3.5**.

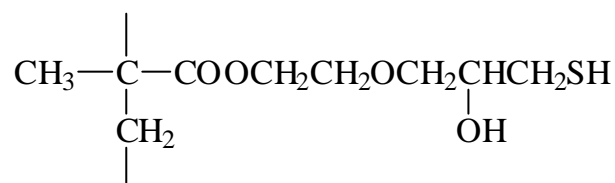


Figura 3.5. Estructura del grup funcional quelant de Spheron Thiol 1000.

3.1.4.2. Iontosorb Oxin 100

La resina Iontosorb Oxin es basa en una matriu de cel·lulosa (**Figura 3.6**), a diferència de les Spheron, que tenen una matriu acrílica.

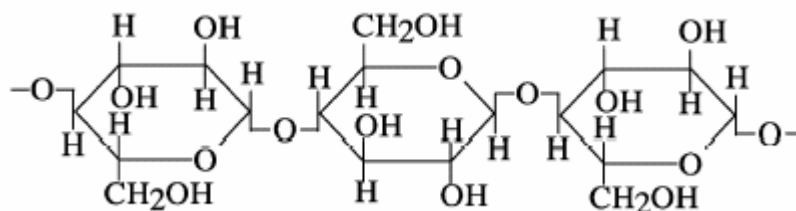


Figura 3.6. Estructura de la cel·lulosa

És un sorbent quelant que conté el grup funcional 8-hidroxiquinoleïna unit covalentment mitjançant grups azo a les cadenes laterals d'un llit de cel·lulosa modificada, tal com es mostra a la **Figura 3.7**.

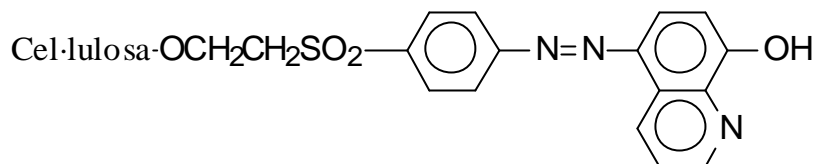


Figura 3.7. Estructura del grup funcional quelant de la resina Iontosorb Oxin 100.

A part dels grups quelants, la resina només conté grups hidroxil neutres, per tant, la selectivitat és determinada exclusivament pel grup funcional 8-hidroxiquinoleïna. La concentració del grup actiu és de 0,2 mmol/g com a mínim.

La mida de partícula de la resina utilitzada en aquest estudi oscil·la entre 30-50 µm, tot i que comercialment hi ha disponibles mides superiors.

Les característiques de la resina es detallen a la **Taula 3.2**

Taula 3.2. Característiques de la resina Iontosorb Oxin 100 [32].

Paràmetre mesurat	Valor
Humitat	59,28 %
Matèria seca	40,72 %
Capacitat d'inflament	1,4558 g H ₂ O/g sorbent sec
Volum del llit	6,5402 ml/g de sorbent sec

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. REACTIUS

- N-(fosfonometil)glicina (glifosat): sòlid, 98 %, Dr. Ehrenstorfer GmbH, Alemanya
- Àcid aminometilfosfònic (AMPA): sòlid, 99 %, Lancaster Synthesis, Regne Unit
- Clorur de p-toluensulfonil (TsCl): sòlid, 99+ %, Aldrich, Alemanya
- Cloroformiat de 9-fluorenilmetil (Fmoc): sòlid, ≥ 99 %, PA, Fluka, Suïssa
- Àcid clorhídric (HCl): líquid, 35 %, PA, Panreac, Espanya
- Hidròxid sòdic (NaOH): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Clorur de sodi (NaCl): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Àcid *o*-fosfòric (H_3PO_4): líquid, 85 %, PA, Panreac, Espanya
- Hidrogenfosfat de sodi ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Dihidrogenfosfat de sodi ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$): sòlid, PA, Panreac, Espanya
- Tetraborat de sodi ($Na_2B_4O_7 \cdot 10 H_2O$): sòlid, 99,5 % , PA, Panreac, Espanya
- Acetona: líquid, RS, >99,8 %, Carlo Erba, Itàlia
- Acetat d'etil: líquid, RS, >99,9 %, Romil Pure Chemistry, Regne Unit
- Acetonitril (CH_3CN): líquid, RS-Plus per HPLC, Carlo-Erba, Itàlia
- Àcid húmic: sòlid, Fluka, Suïssa
- Clorur de pal·ladi ($PdCl_2$): sòlid, Sigma, Alemanya

- Resina Spheron Oxine 1000 (mida de partícula 40-63 μm): sòlid, Lachema, Rep. Txeca
- Resina Spheron Thiol 1000 (mida de partícula 63-100 μm): sòlid, Lachema, Rep. Txeca
- Resina Iontosorb Oxin 100 (mida de partícula 30-50 μm): sòlid, Iontosorb, Rep. Txeca

3.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolució estoc de glifosat (250 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua mil·liQ.
- Dissolució estoc d'AMPA (250 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua mil·liQ.
- Dissolució intermèdia de glifosat i AMPA de 2.500 $\mu g/l$ per dilució de les estocs.
- Dissolucions de treball per dilució de la intermèdia (0,1-250 $\mu g/l$) o dels estocs (0,1-5 mg/l), respectivament.

- Tampó fosfat 0,4 M (pH = 11): es prepara una dissolució 0,4 M de dihidrogenfosfat sòdic i s'ajusta el pH a 11 amb hidròxid sòdic 2 M.
- Dissolució de TsCl 10 mg/ml: es dissol el pes corresponent en acetonitril.
- Tampó borat 0,025 M (pH = 9): es prepara una dissolució de tetraborat sòdic 0,025 M i s'ajusta el pH amb hidròxid potàssic 2 M.
- Dissolució de Fmoc 0,01 M: es dissol el pes corresponent en acetona.
- Dissolució de Pd(II) en HCl 0,1 M: es prepara dissolent el sòlid PdCl₂ en aigua havent afegit la quantitat de HCl necessària.
- Patrons de Pd per mesurar amb l'absorció atòmica de flama (AAS): es preparen per dilució de la dissolució estoc d'AAS de 1.000 ppm de Pd.

3.2.3. APARELLS I MATERIAL

- Cromatògraf líquid Shimadzu que incorpora injector Rheodyne 7725 amb un bucle de 20 µl, dues bombes LC-9A, detector UV-visible SPD-6AV a 240 nm, registrador Chromatopac C-R6A i columna cromatogràfica Hypersil ODS 5 µm 20 x 0,46 cm.
- Cromatògraf líquid Spectra System de Thermofinnigan (EUA) equipat amb un injector Rheodyne amb bucle de 100 µl, bomba P2000, desgasificador SCM1000, controlador SN4000, detector de fluorescència a 262 nm (excitació) i 316 nm (emissió), precolumna de tipus NH₂ i columna cromatogràfica Kromasil 100 NH₂ 5 µm 25 x 0,46 cm.
- Absorció atòmica de flama (AAS) de Varian (Austràlia) per determinar la concentració de Pd(II) i Cu(II) en les dissolucions aquoses.
- Bomba peristàtica Minipuls 3 de GILSON.
- Ultrasons P. Selecta per desgasificar la fase mòbil.
- Sistema de filtració amb membrana de niló de mida de porus 0,45 µm de Whatman.
- Bany termostatitzat P. Selecta a 50 °C.
- Agitador magnètic.
- pHmetre GLP22 de Crison.
- Balança analítica Sartorius Analytic amb precisió de ± 0,1 mg.
- Columna de vidre de 30 cm de llargada i 0,48 cm de diàmetre intern.

3.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

3.2.4.1. Determinació de glifosat i AMPA

El glifosat i l'AMPA s'han determinat mitjançant cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) amb dos mètodes diferents en funció de la disponibilitat dels instruments. Inicialment l'anàlisi de les mostres es va dur a terme amb detecció UV-Vis i en aquest cas només es podia treballar amb mostres dins del rang dels mg/l. Posteriorment es va poder aplicar un mètode de detecció amb fluorescència i baixar el rang de treball fins a µg/l.

Els dos mètodes estan descrits al capítol 2 de la tesi doctoral, a l'apartat 2.2.4.1.

3.2.4.2. Determinació dels ions metàl·lics Pd (II) i Cu(II)

La determinació de Pd (II) en les diferents fraccions aquoses utilitzades en aquest estudi s'ha dut a terme mitjançant la tècnica d'absorció atòmica de flama (AAS). A partir d'una dissolució estoc de 1.000 ppm de Pd(II) en àcid, es preparen patrons de Pd(II) de concentracions entre 0,2-25 ppm mesurats amb una longitud d'ona de 247,6 nm o patrons entre 4-75 ppm mesurats a 340,5 nm, depenent de les concentracions de les mostres que cal determinar.

El coure (II) es determina amb AAS mesurant a 327,4 nm (patrons de 0,1-25 ppm) i 217,9 nm (0,2-60 ppm).

3.2.4.3. Preconcentració amb el mètode IMAC

El procediment experimental inclou fonamentalment tres etapes:

1. Immobilització de l'ió metàl·lic a la resina.
2. Adsorció dels anàlits (glifosat i AMPA) a la resina carregada amb Pd.
3. Elució dels anàlits.

Immobilització de l'ió metàl·lic a la resina

La capacitat teòrica i experimental de les resines Spheron per al pal·ladi havia estat determinada en un estudi previ [30]. Per Spheron Oxine la capacitat experimental és de 57,02 mg Pd/ g resina seca i per Spheron Thiol 100,94 mg Pd/ g resina seca.

En el cas de la resina Iontosorb Oxin, se'n determina la capacitat per a pal·ladi posant en tubs de vidre quantitats iguals de resina humida equivalents a 25 mg de resina

seca (com que la seva matriu és de cel·lulosa, s'opta per no assecar-la i es calcula la quantitat que cal pesar tenint en compte que la resina Iontosorb Oxin té un contingut en matèria seca del 40,72 % segons el fabricant). A cada tub s'afegeixen 20 ml de dissolucions de Pd (II) de concentracions entre 70-800 ppm preparades en medi HCl 0,1 M i es col·loquen els tubs en un agitador rotatori durant 24 hores. Finalment es filtra al buit el contingut de cada tub i es determina la concentració de pal·ladi que queda a la dissolució per AAS. La diferència entre el Pd(II) inicial i l'analitzat a la dissolució indica el pal·ladi que ha quedat retingut a la resina. La capacitat experimental obtinguda és de 125-130 mg Pd/g resina seca.

També es determina la capacitat de la resina Iontosorb Oxin vers el coure seguint el mateix procediment que per a pal·ladi. Les dissolucions de coure (II) oscil·len entre 10-300 ppm i es preparen en medi clorhídric a pH 2 i en medi acètic a pH 4,5.

Un cop conegudes les capacitats de les resines vers l'ió metàl·lic, s'hi immobilitza el metall mitjançant un procediment en discontinu. Primerament s'asseca la resina a 105 °C (exceptuant la Iontosorb Oxin). Es pesen 0,5 g de resina seca, o l'equivalent a aquesta quantitat tenint en compte el tant per cent d'humitat en el cas de la resina Iontosorb Oxin, i es posen en contacte amb un cert volum de dissolució de Pd(II) en HCl 0,1 M, de manera que se superi la capacitat que té la resina per al metall, per assegurar que la càrrega de la resina amb el metall és la màxima possible. Es deixa equilibrar en un agitador orbital durant 12 hores.

Finalment es diposita la resina a la columna de vidre i la dissolució sobrant es recupera, mitjançant una bomba peristàltica, per determinar el pal·ladi present. És important no deixar assecar la resina en cap moment per evitar la formació de canals preferencials. La resina es renta amb HCl 0,01 M i aigua per assegurar que no quedin restes de pal·ladi adsorbit físicament a la resina ni a les parets de la columna de vidre. Les diferents fraccions que es recullen s'analitzen també per AAS i es comprova que no existeix cap quantitat apreciable de Pd a la sortida de la columna.

Adsorció dels anàlits (glifosat i AMPA) a la resina carregada amb Pd

Quan la resina s'ha rentat amb HCl i aigua, es passa la dissolució que conté glifosat i AMPA a un cabal de 2,5 ml/min i es recullen fraccions de 5 ml que s'analitzen amb el mètode descrit per cromatografia líquida per determinar la quantitat de glifosat i AMPA adsorbits.

A continuació es renta la resina amb 25 ml d'aigua mil·liQ per eliminar les restes d'anàlits no adsorbits i possibles interferents. També es recullen fraccions de 5 ml que s'analitzen per HPLC.

Elució dels anàlits

Els anàlits adsorbits a la resina s'elueixen amb diferents dissolucions de HCl, H₃PO₄ i NaCl amb un cabal d'1 ml/min. Es recullen fraccions de 5 ml que s'analitzen per HPLC per determinar el percentatge d'anàlit eluït.

Un cop finalitzat l'experiment, la resina es renta amb HCl i es pot reutilitzar, comprovant primer que no hi quedin restes dels anàlits.

A la **Figura 3.8** s'esquematitza el procediment global que es produeix, des de la càrrega amb pal·ladi fins a l'elució dels anàlits.

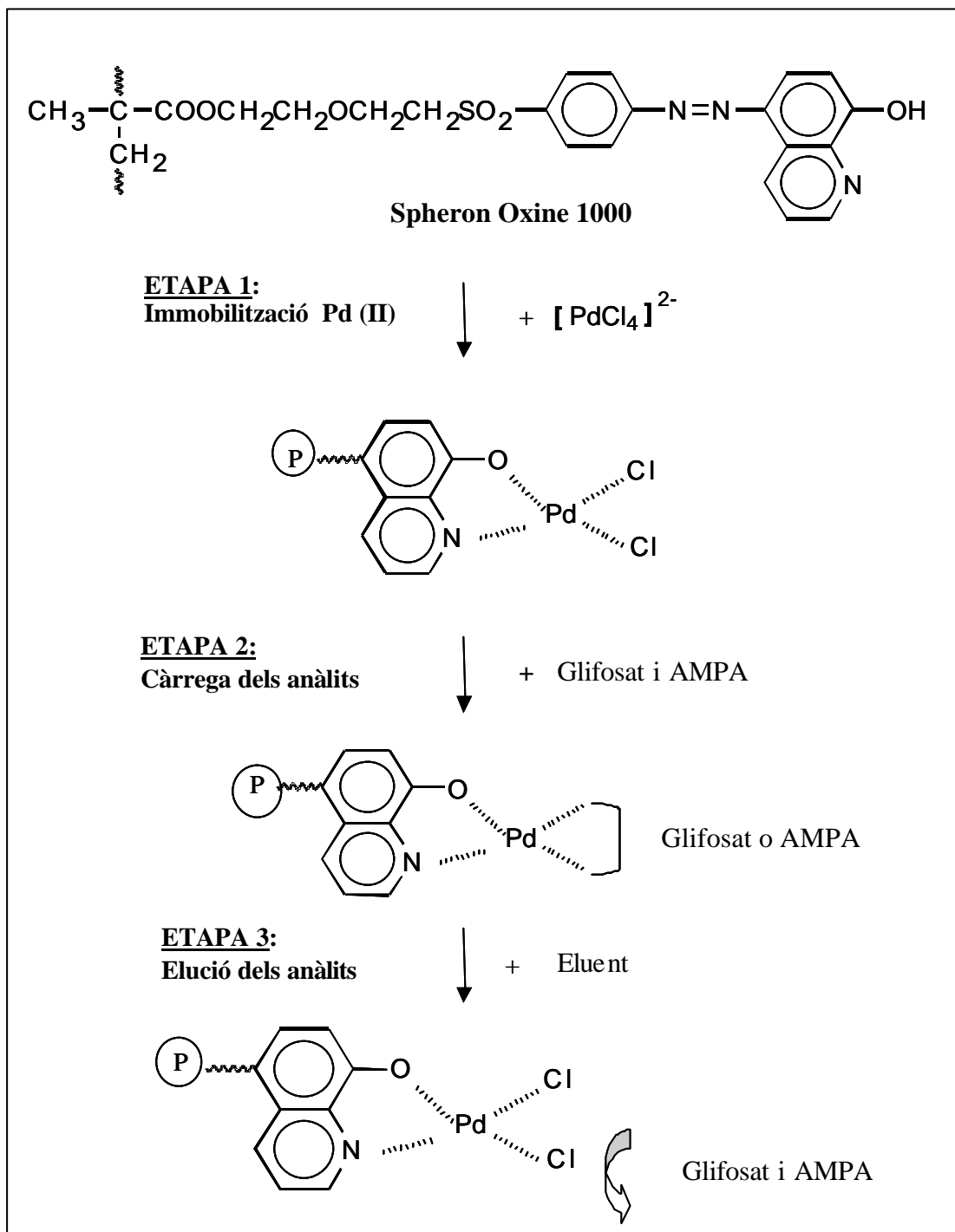


Figura 3.8. Esquema del procediment global per a la preconcentració de glifosat i AMPA amb la resina carregada amb pal·ladi.

3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

La tècnica IMAC per a glifosat i AMPA s'ha aplicat en primer lloc immobilitzant pal·ladi en la resina Spheron Oxine 1000, perquè aquesta resina ha estat estudiada àmpliament en el grup de recerca [0,31] i perquè, a més, havia estat aplicada per a l'aminoàcid glicina [25], que té una estructura similar al glifosat.

Una vegada estudiats els diferents paràmetres que afecten tant la càrrega com l'elució dels anàlits, es comparen els resultats obtinguts amb aquesta resina amb dues resines més: Spheron Thiol 1000, que presenta la mateixa matriu (acrílica), però diferent grup funcional (grup tiol), i Iontosorb Oxin 100, que té una matriu diferent (cel·lulosa), però el mateix grup funcional (8-hidroxiquinoleïna). D'aquesta manera es pot avaluar la influència de la matriu i del grup funcional en la retenció i l'elució de l'herbicida i el seu metabòlit.

3.3.1. DISSENY DEL PROCEDIMENT IMAC AMB LA RESINA SPHERON OXINE 1000

Com s'ha comentat anteriorment, Spheron Oxine 1000 és una resina amb matriu acrílica i que té com a grup funcional una oxina, 8-hidroxiquinoleïna.

Primerament cal avaluar com interacciona la resina amb el metall per establir les millors condicions per carregar la resina amb pal·ladi.

La capacitat de la resina havia estat estudiada prèviament i s'havia obtingut un valor de 57,02 mg de Pd/g resina seca o 0,536 mmol Pd/g resina seca [30]. Els experiments s'havien dut a terme a pH 2 i força iònica 0,1 M durant 24 hores. En aquest estudi també s'havia avaluat la capacitat de la resina per a coure i s'havien obtingut valors molt inferiors (16 mg Cu/g resina seca). Com que l'objectiu és tenir la màxima quantitat possible de metall retingut, es tria el pal·ladi com a metall que s'ha d'immobilitzar per realitzar el procés IMAC amb glifosat i AMPA.

També s'havia investigat quin tipus de complex es formava entre el pal·ladi i la resina i s'havien establert bàsicament dos complexos possibles en funció de la quantitat de pal·ladi present a la dissolució i de les característiques del grup espaiador de la resina [25]. Els dos possibles complexos es mostren a la **Figura 3.9**.

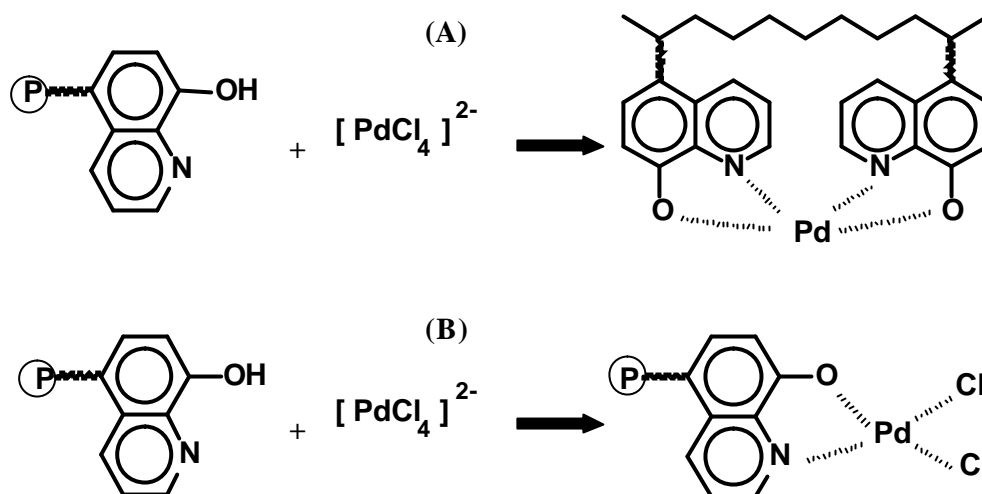


Figura 3.9. Representació esquemàtica dels possibles complexos formats entre el Pd i Spheron Oxine 1000. (A) Complex Pd-oxina 1:2 (B) Complex Pd-oxina 1:1.

En el complex Pd-oxina 1:2, el pal·ladi es coordina amb dos grups oxina de la resina a través del nitrogen i l'oxigen d'aquesta, i, per tant, les quatre posicions de coordinació del pal·ladi estan ocupades pel grup funcional de la resina. Perquè es formi aquest complex cal que el grup espaiador existent entre el grup funcional i la matriu polimèrica de la resina sigui prou flexible.

Perquè es formi el complex Pd-oxina 1:1 cal que la quantitat present de pal·ladi sigui suficient. En aquest cas queden dues posicions de coordinació del Pd ocupades per clorurs que poden ser intercanviats.

Per tant, és el complex Pd-oxina 1:1 el que ens interessa tenir per dur a terme el procés IMAC, ja que els anàlits es coordinaran amb el Pd a través de les dues posicions ocupades pels clorurs.

Per immobilitzar el metall en la resina es posarà en contacte una quantitat de l'adsorbent amb una quantitat de Pd superior a la capacitat de la resina, per assegurar que el complex format és Pd-oxina 1:1.

La quantitat de metall retingut en aquest estudi per Spheron Oxine és de 65 mg Pd/g resina seca.

Inicialment es fan un seguit d'experiments preliminars només amb glifosat i a concentracions de l'ordre de mg/l per determinar el funcionament i les característiques del sistema. Es passen 50 ml d'una dissolució que conté 1 mg/l de glifosat en tampó fosfat 0,01 M (pH 6,5) amb un cabal d'1 ml/min. En l'estudi de Díez et al. [25] amb l'aminoàcid glicina com a dissolució de càrrega s'utilitza el tampó esmentat, ja que s'indica que la formació del complex pal·ladi-glicina s'afavoreix en condicions neutres.

Es recullen diferents fraccions per avaluar la retenció de glifosat a la resina carregada amb Pd(II). Es comprova que amb les condicions esmentades l'herbicida és adsorbit quantitativament.

El complex que es forma entre el glifosat i el Pd carregat a la resina no ha estat determinat en aquest estudi, però dades existents de diferents complexos de glifosat amb metalls del grup del platí (on s'inclou el pal·ladi) indiquen que el glifosat es coordina amb el metall a partir del nitrogen i de l'oxigen donor del grup carboxílic [34].

A més, en l'estudi amb glicina s'havia demostrat, mitjançant la determinació dels clorurs alliberats amb una tècnica potenciomètrica i confirmant-ho amb l'anàlisi elemental, que aquesta molècula reemplaçava fins a dos clorurs. La similitud del glifosat amb l'aminoàcid glicina fa pensar que el mecanisme pot ser el mateix.

Es pot suggerir, doncs, que el glifosat es coordina amb el pal·ladi i ocupa les dues posicions dels clorurs, tal com es mostra a la **Figura 3.10**.

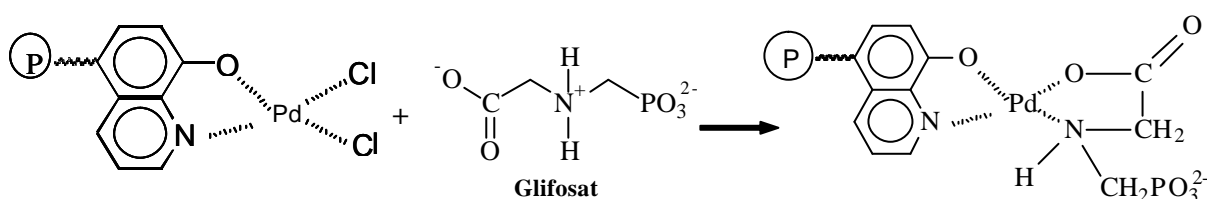


Figura 3.10. Representació esquemàtica del complex que es podria formar entre la resina Spheron Oxine carregada amb pal·ladi i el glifosat.

Abans de dur a terme l'elució de glifosat, es renta la resina amb 25 ml d'aigua mil·liQ per eliminar les restes de la dissolució de càrrega i possibles interferents. A continuació ja s'avaluen diferents solucions com a possibles eluents de glifosat.

3.3.1.1. Estudi del procés d'elució de glifosat

En l'etapa d'elució és important tenir present que l'eluent triat ha de ser capaç d'alliberar el glifosat retingut sense eluir també el pal·ladi immobilitzat a la resina. A l'estudi previ d'Anticó et al. [30], on l'objectiu sí que era aconseguir l'elució de pal·ladi, s'havia demostrat que amb HCl 4 M només un 5 % de Pd (II) era eluït. Calien dissolucions d'agents complexants de Pd com tiocianat sòdic 0,5 M o tiourea 0,5 M per aconseguir l'elució del metall, amb les quals s'obtenien recuperacions del 31 % i 77 %, respectivament.

Com ja s'ha esmentat en capítols anteriors, el glifosat és una molècula que té propietats àcid-base i que, per tant, presenta càrregues diferents en funció del pH. Les constants de dissociació del glifosat, determinades en el nostre grup, són: $pK_{a1} < 2$ (no determinable), $pK_{a2} = 2,441$, $pK_{a3} = 5,518$, $pK_{a4} = 10,083$ [33].

Es va creure que l'elució seria favorable si es convertia el glifosat a la seva forma àcida, és a dir, si hi tenia lloc la seva protonació. Per aquest motiu els eluents provats van ser solucions de HCl de concentracions 0,01 M i 0,1 M, que també havien donat resultats positius en l'elució de l'aminoàcid glicina [25] i H_3PO_4 0,1 M. Un altre possible mecanisme que podia afavorir l'elució és el bescanvi del glifosat per ions clorur presents en l'eluent; per aquesta raó es varen assajar solucions de NaCl 1 M i una barreja de HCl i NaCl per comprovar quin és el mecanisme d'elució, és a dir, si realment només cal la forma àcida del glifosat per aconseguir-ne l'elució. Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 3.11**.

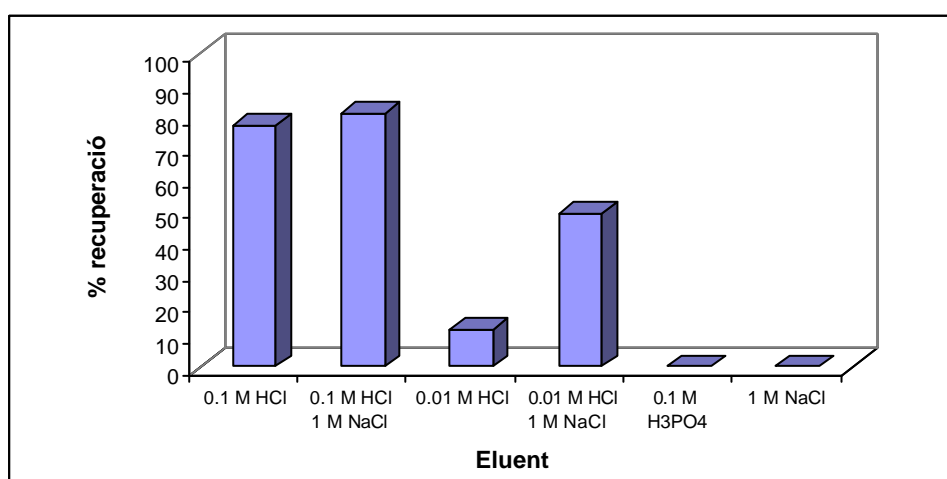


Figura 3.11. Comparació dels eluents avaluats per a la recuperació de glifosat adsorbit a Spheron Oxine carregada amb pal·ladi. Solució de càrrega: 50 ml de glifosat d'1 ppm en tampó fosfat 0,01 M (pH 6,5); $V_{elució}$: 15 ml; cabal = 1 ml/min.

L'eluent més efectiu és la barreja de HCl 0,1 M i NaCl 1 M, cosa que indica que el procés d'elució s'afavoreix amb la protonació del glifosat i la presència d'ions clorur. En aquesta etapa la resina allibera el glifosat i les dues posicions que ocupava tornen a quedar ocupades per ions clorur.

La importància dels clorurs es demostra perquè, en augmentar-ne la concentració, millora la recuperació del glifosat. Això sobretot s'observa si es comparen els resultats obtinguts amb HCl 0,01 M i la barreja HCl 0,01 M + NaCl 1 M, on les recuperacions respectives són del 12 % i 50 %.

Però sí que és necessària també la protonació del glifosat per aconseguir-ne l'elució, tal com es veu quan es fa servir NaCl 1 M com a eluent.

La presència d'un altre àcid com H_3PO_4 no és suficient per aconseguir l'elució, probablement perquè els ions fosfat no tenen una capacitat de coordinació amb el pal·ladi tan favorable com els clorurs.

Les fraccions recollides per l'eluent HCl 0,1 M + NaCl 1 M també s'analitzen amb AAS per detectar si s'han produït pèrdues de Pd. Es determina que el sumatori de les pèrdues és inferior a l'1 % i, per tant, es pot considerar que aquesta dissolució és adequada.

Un cop determinat que són els protons i els ions clorur els que afavoreixen l'elució, es prova d'incrementar la concentració d'àcid clorhídric a 1 M ja que per a la glicina s'havia determinat que la seva recuperació millorava fins a obtenir-se recuperacions properes al 100 % [25], però tot i que s'aconsegueix l'elució de glifosat, la seva anàlisi per HPLC és molt més complicada, a causa de l'elevada acidesa de la mostra, que obliga a neutralitzar-la (i en provoca la dilució) abans de dur a terme la reacció de derivatització amb FMOC, que és favorable entre pH 5-9. A causa d'aquesta major complicació s'opta per treballar amb HCl 0,1 M + NaCl 1 M, que ja proporciona una bona recuperació de glifosat i no cal ajustar el pH de la mostra abans de la derivatització.

Una vegada seleccionada la composició de la dissolució d'elució es duen a terme experiments també amb AMPA. Es passen 50 ml d'una dissolució que conté 1 ppm de cadascun dels anàlits, i a partir de l'anàlisi de les diferents fraccions recollides es determina que l'adsorció és favorable tant per a glifosat com per a AMPA, i s'obté un 100 % de retenció en tots dos casos.

Pel que fa a l'elució, s'assaja amb HCl 0,1 M + NaCl 1 M i s'obté un 80 % per al glifosat i un 65 % per a l'AMPA, amb 15 ml de la solució eluent. Aquest resultat indica que la resina reté més fortament AMPA que glifosat.

Un cop finalitzat l'experiment, la resina es renta amb HCl 0,1 M per reutilitzar-la. Es recullen fraccions d'aquest rentat que s'analitzen per comprovar que no queden restes dels anàlits a la resina.

Un cop determinat que la tècnica IMAC emprada és adequada per a l'extracció de glifosat i AMPA, s'avalua si realment és el pal·ladi el responsable del funcionament de la tècnica. Es duu a terme l'experiment sense carregar la resina amb pal·ladi. Es pesen 0,5 g de resina seca i es posen en contacte amb 100 ml de dissolució d'HCl 0,1 M durant 12 hores. Després es col·loca la resina en la columna de vidre i se segueix el procediment descrit per quan estava carregada amb pal·ladi, és a dir, el rentat amb HCl 0,01 M i aigua abans de passar la dissolució que conté els anàlits.

Es passen 50 ml de dissolució de glifosat i AMPA d'1 mg/l i es recullen diferents fraccions per determinar el percentatge dels anàlits retingut per la resina. Després es renta amb aigua fins que a les fraccions analitzades no es detecta ni glifosat ni AMPA, i finalment es passa HCl 0,1 M i NaCl 1 M per eluir la part dels anàlits que ha quedat retinguda. Els resultats es mostren a la **Taula 3.3**.

Taula 3.3. Resultats obtinguts amb Spheron Oxine sense pal·ladi. Solució de càrrega: 50 ml de glifosat i AMPA 1 ppm en tampó fosfat 0,01 M (pH 6,5); eluent: HCl 0,1 M + NaCl 1 M; cabal: 1 ml/min.

Fracció	V fracció (ml)	% glifosat	% AMPA
càrrega	50	73	86
rentat 1	5	8	6
rentat 2	5	3	1
rentat 3	5	0	0
% no retingut		84	93
elució 1	5	12	3
elució 2	5	3	1
elució 3	5	0	0
% retingut		15	4

Les dades obtingudes indiquen que la resina, quan no està carregada amb pal·ladi, només reté al voltant d'un 15 % de glifosat i un 4-7 % d'AMPA. Per tant, el pal·ladi és fonamental per aconseguir el 100 % d'adsorció.

Aquests resultats demostren que el procés d'adsorció té lloc a través d'un mecanisme de coordinació entre el pal·ladi i els anàlits.

A continuació s'estudien els diferents paràmetres que poden influir en l'extracció de glifosat i AMPA per la resina carregada amb pal·ladi: la composició de la fase de càrrega (pH), el cabal de càrrega i d'elució, el volum de mostra i la concentració dels anàlits.

3.3.1.2. Influència del pH de la fase de càrrega

Inicialment les mostres que es passaven per la resina estaven a un pH de 6,5, aconseguit amb tampó fosfat 0,01 M, i donaven un 100 % de retenció. Com s'ha comentat, s'havia triat aquesta dissolució inicialment perquè va ser la utilitzada en el cas de la glicina.

S'assagen altres pH superiors, ja que l'objectiu és aplicar la tècnica IMAC per a la preconcentració en mostres naturals d'aigua de diferents característiques i aquestes mostres normalment presenten un pH més bàsic. A més, també es prova amb aigua mil·liQ directament (pH 5,5). Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 3.4**.

Taula 3.4. Comparació de diferents composicions de la dissolució de càrrega que conté glifosat i AMPA. *V mostra = 50 ml; C anàlits = 1 mg/l; eluent: HCl 0,1 M + NaCl 1 M (15 ml); cabal = 1 ml/min.*

Matriu de la fase de càrrega	Glifosat		AMPA	
	% adsorció	% elució	% adsorció	% elució
Aigua mil·liQ pH 5,5	100	86	100	61
Tampó fosfat 0,01 M pH 6,5	100	81	100	63
Tampó fosfat 0,01 M pH 8,5	100	82	100	58
Tampó borat 0,01 M pH 9	100	80	100	65

Els resultats obtinguts indiquen que, en el rang de pH entre 5,5-9, el pH de la fase de càrrega no influeix en l'adsorció de glifosat i AMPA i que, per tant, no caldrà ajustar-lo en el cas de treballar amb mostres que tinguin el pH dins d'aquest interval, que sol ser l'habitual en aigües naturals.

Com es pot observar, la presència d'aquests tampons tampoc no afecta l'elució dels anàlits, ja que s'obtenen en tots els casos recuperacions entre 80-85 % per a glifosat i 60-65 % per a AMPA. En els experiments següents s'opta per treballar amb dissolucions de càrrega en aigua mil·liQ.

3.3.1.3. Estudi del cabal de càrrega i d'elució

Fins ara s'havia treballat amb un cabal d'1 ml/min, però és interessant determinar si es pot incrementar, ja que d'aquesta manera la quantitat de mostra que es pot passar a través de la resina és major en el mateix temps.

S'assagen cabals de càrrega entre 1-5 ml/min i en tots els experiments s'obtenen adsorcions quantitatives dels dos anàlits, cosa que indica que el mecanisme de complexació que es produeix és de cinètica ràpida. Com a efecte negatiu s'observa que amb un cabal més gran la resina s'asseca més fàcilment perquè es formen bombolles d'aire a la part inferior de la columna. Per tant, s'opta per treballar amb un cabal de càrrega de 2,5 ml/min, que és prou elevat.

Pel que fa al cabal d'elució, també s'avaluen cabals d'entre 0,5-5 ml/min i s'observa que la recuperació dels anàlits decreix lleugerament en augmentar el cabal. Com que a 0,5 ml/min tampoc no s'obtenen recuperacions més elevades, es decideix mantenir el cabal d'elució a 1 ml/min, ja que, com que el volum d'elució és de 15 ml, no implica un augment del temps gaire important.

En conclusió, el cabal de càrrega es fixa en 2,5 ml/min i el d'elució en 1 ml/min.

3.3.1.4. Volum de trencament

També s'estudia quin és el volum de trencament de la resina per determinar la quantitat de mostra que es pot processar.

Per determinar-lo es passen diferents volums de mostra que contenen 1 mg/l de glifosat i AMPA. Els resultats es mostren a la **Taula 3.5**.

Taula 3.5. Percentatge d'adsorció i recuperació de glifosat i AMPA per diferents volums de mostra. Solució de càrrega: 1 ppm de glifosat i AMPA en aigua mil·liQ; eluent: HCl 0,1 M + NaCl 1M (15 ml); cabal de càrrega: 2,5 ml/min; cabal d'elució: 1 ml/min.

V càrrega (ml)	Glifosat		AMPA	
	% adsorció	% recuperació	% adsorció	% recuperació
50	100	86	100	61
100	100	82	100	72
250	100	87	100	67

Amb tots els volums de mostra passats per la resina s'obtenen retencions del 100 % per als dos anàlits. Per tant, no s'ha assolit el volum de trencament de la resina. No s'assagen volums més grans perquè la concentració d'1 mg/l és molt elevada, tenint en compte que es tracta de l'anàlisi de residus de plaguicides, i per tant, no es processaran mostres reals que continguin concentracions tan elevades.

Una vegada estudiats els diferents paràmetres que poden afectar l'adsorció i elució dels anàlits amb Spheron Oxine carregada amb pal·ladi, es disminueixen les concentracions de glifosat i AMPA, que es processen amb la resina per avaluar si aquest procediment és vàlid a concentracions més baixes, que seran les que es trobaran en mostres reals.

Les condicions dels experiments són:

- Càrrega: 50 ml de glifosat i AMPA (10 µg/l) en aigua mil·liQ.
- Elució: 15 ml HCl 0,1 M + NaCl 1 M.
- Cabal de càrrega 2,5 ml/min i d'elució 1 ml/min.

S'obtenen recuperacions del 82 % i el 63 % per al glifosat i l'AMPA, respectivament, i amb desviacions estàndards relatives del 3 % i 4 % per a $n = 3$.

Un cop dissenyat el sistema s'analitzen les mostres d'aigües naturals fortificades amb els anàlits a diferents concentracions.

3.3.2. APLICACIÓ DEL MÈTODE IMAC A AIGÜES NATURALS

Es realitza el mostreig d'aigües naturals de diferents procedències i es caracteritzen a partir de la determinació dels paràmetres següents: oxidabilitat amb permanganat, anions (clorurs, sulfats, fosfats) mitjançant electroforesi capil·lar, cations (sodi, potassi, calci i magnesi) mitjançant ICP-AES, pH i conductivitat. Les procedències i característiques més rellevants d'aquestes aigües naturals es detallen a la **Taula 3.6**.

Taula 3.6. Característiques de les aigües naturals.

Tipus de mostra	codi	origen	conduct. mS/cm	oxidabilitat ppm	SO ₄ ²⁻ ppm	Cl ⁻ ppm	Ca ppm	Mg ppm
Subterrània	GW	àrea de Begur	1.269	88	172	218	122	40
Superficial	RW	riu Ter	689	132	120	101	101	14
Superficial	SW	àrea de Pals	1.155	113	146	276	97	35

Totes les aigües processades són de la província de Girona. També s'analitzen les aigües sense fortificar per determinar si ja estan contaminades amb glifosat i/o AMPA.

Abans de dur a terme la fortificació, es passen les aigües naturals directament per la resina, és a dir, es fa un blanc. En aquests experiments es fa servir resina nova (no reutilitzada) per assegurar que no es produeixi contaminació de les mostres.

Després de condicionar la resina carregada amb pal·ladi amb HCl 0,01 M i aigua mil·liQ, es passen 50 ml d'aigua natural, es renta amb 25 ml d'aigua mil·liQ i finalment s'elueix amb 10 ml de HCl 0,1 M + NaCl 1 M. En analitzar la fracció d'elució amb el mètode de HPLC descrit, a l'aigua del riu Ter (codi RW) es detecta la presència d'AMPA a una concentració de < 0,5 ppb. A la **Figura 3.12** es mostra el cromatograma obtingut per a l'aigua del riu Ter sense fortificar passada per la resina.

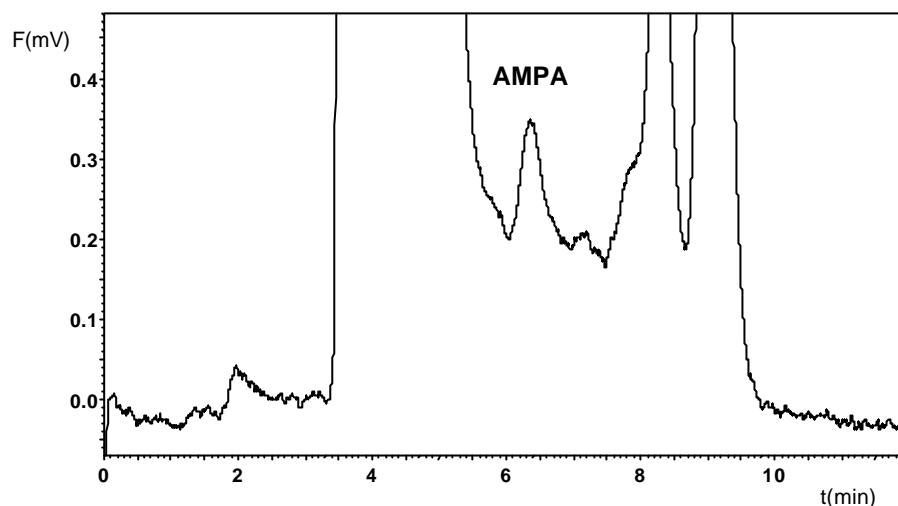


Figura 3.12. Cromatograma obtingut per a l'aigua superficial (RW) sense fortificar i passada per la resina.

Un cop caracteritzades les aigües, es fortifiquen a tres nivells de concentració: 1, 10 i 100 µg/l. Aquesta fortificació es duu a terme amb l'aigua subterrània (GW) i la del riu Ter (RW). Els resultats obtinguts es mostren a la **Taula 3.7**.

Taula 3.7. Recuperacions i desviacions estàndard relatives (RSD) ($n = 3$) obtingudes per a mostres d'aigües naturals fortificades a diferents concentracions de glifosat i AMPA. Solució de càrrega: 50 ml aigua natural fortificada (tenen $\text{pH} = 8$); elució: 15 ml HCl 0,1 M + NaCl 1 M; cabal de càrrega 2,5 ml/min i d'elució 1 ml/min.

Codi mostra	1 mg/L		10 mg/L		100 mg/L	
	Glifosat	AMPA	Glifosat	AMPA	Glifosat	AMPA
GW	90 (4)	64 (11)	92 (7)	64 (16)	90	80
RW	81 (13)	120 (22)	80 (7)	65 (11)	89	79

En tots els casos s'obtenen adsorcions del 100 % per al glifosat i l'AMPA. Les recuperacions per al glifosat oscil·len entre 80-92 % amb $\text{RSD} < 15$ %.

En canvi, per a l'AMPA els resultats no són tan favorables. Per a la mostra del riu Ter (RW) fortificada amb 1 ppb s'obté una recuperació igual al 120 % pel fet que l'aigua ja contenia AMPA, tal com s'ha comentat anteriorment.

La **Figura 3.13** mostra el cromatograma corresponent a l'aigua subterrània (GW) fortificada amb 1 ppb de glifosat i AMPA i passada per la resina.

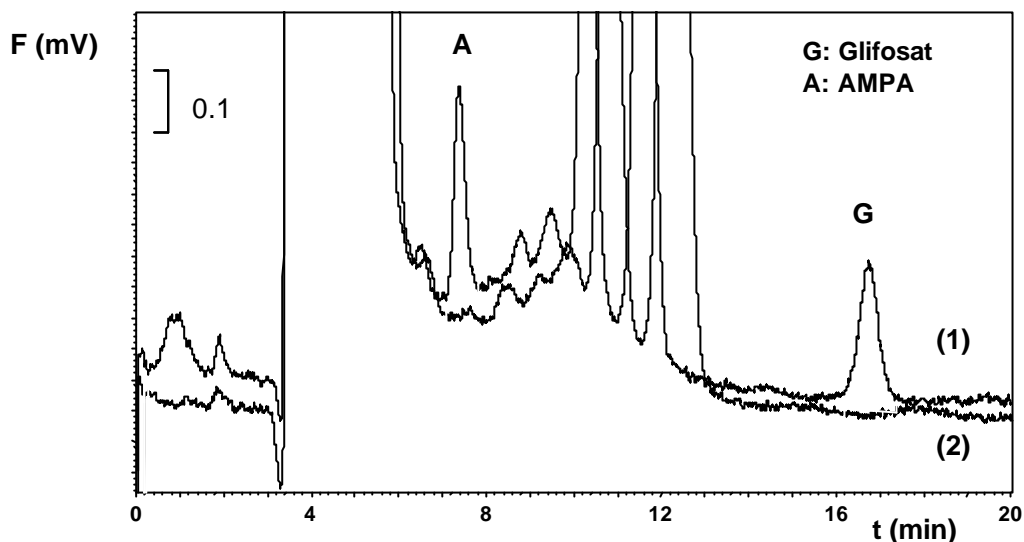


Figura 3.13. Cromatograma corresponent a l'aigua subterrània fortificada amb 1 ppb de glifosat i AMPA i passada per la resina Spheron Oxine 1000 (1) juntament amb el blanc (mostra d'aigua sense fortificar) (2)

Per analitzar mostres de concentració inferior caldria augmentar el volum de mostra processat, ja que el mètode d'anàlisi amb HPLC- FD utilitzat té un límit de detecció de l'ordre d'1 ppb.

La mostra de l'àrea de Pals (SW) es fortifica amb 4 ppm d'àcid húmich comercial per determinar l'efectivitat de la resina en presència d'aquest tipus de compostos que solen ser presents a diferents concentracions a les aigües naturals i que generalment interfereixen en la determinació dels anàlits. La dissolució de càrrega consisteix en 50 ml d'aigua procedent de l'àrea de Pals fortificada amb 10 ppb de glifosat i 10 ppb d'AMPA i 4 ppm d'àcid húmich. Es recullen fraccions de 10 ml per determinar si la presència de l'àcid húmich afecta la retenció dels anàlits. En analitzar-les per HPLC es comprova que els anàlits han estat retinguts quantitativament per la Spheron Oxine carregada amb pal·ladi.

Abans de procedir a l'elució es renta amb 25 ml d'aigua mil·liQ i tot seguit s'elueix amb 15 ml de HCl 0,1 M + NaCl 1 M. Les recuperacions obtingudes són 81 ± 10 % per a glifosat i 74 ± 14 % per a AMPA (per a $n = 3$). A la **Figura 3.14** es mostra el

cromatograma obtingut. Per tant, l'àcid húmic no interfereix en l'extracció i la recuperació dels anàlits de la mostra d'aigua natural.

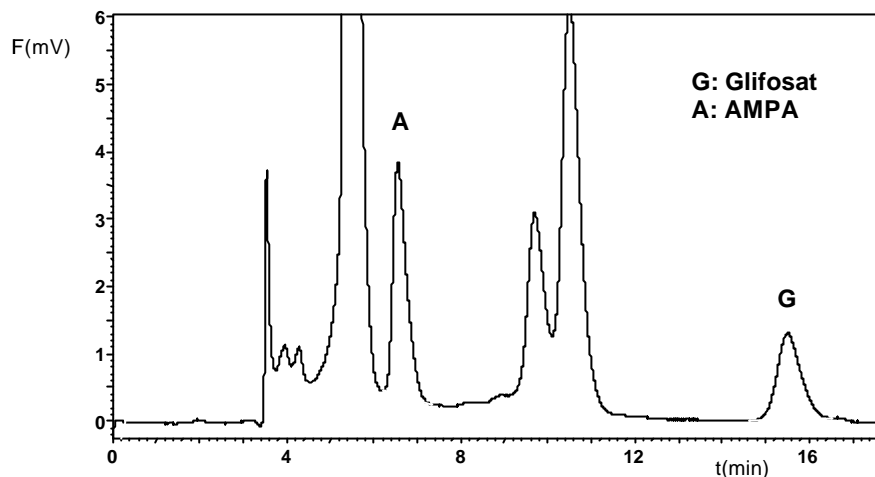


Figura 3.14. Cromatograma corresponent a l'aigua procedent de Pals (SW) fortificada amb 10 ppb de glifosat i AMPA i 4 ppm d'àcid húmic després de ser processada amb la resina.

En conclusió, el mètode IMAC proposat amb la resina Spheron Oxine 1000 carregada amb pal·ladi proporciona bons resultats per a la preconcentració de glifosat i AMPA en aigües naturals fortificades.

A continuació es proposa avaluar el mètode per a dues resines més, Iontosorb Oxin 100, que, com s'ha vist, presenta el mateix grup funcional, és a dir, 8-hidroxiquinoleïna, però té una matriu de cel·lulosa i Spheron Thiol 1000 formada per una matriu acrílica igual que Spheron Oxine, però amb un grup funcional diferent, un grup tiol.

3.3.3. RESINA IONTOSORB OXIN 100

Iontosorb Oxin 100 és una resina que presenta una matriu de cel·lulosa en comptes d'acrílica i, per tant, l'objectiu és avaluar si la matriu afecta la preconcentració dels anàlits.

Aquesta resina, a diferència de les Spheron, no havia estat estudiada en el nostre grup de recerca per aconseguir l'extracció de pal·ladi. Per tant, es desconeix la capacitat que presenta per a aquest metall. Primerament es decideix determinar-ne la capacitat tant

per a pal·ladi com per a coure, ja que eren els dos metalls caracteritzats amb Spheron Oxine.

3.3.3.1. Determinació de la capacitat de Iontosorb Oxin per a Pd i Cu

Per determinar la capacitat de la resina envers el pal·ladi es preparen dissolucions de pal·ladi (II) de diferents concentracions a partir del clorur de pal·ladi sòlid, com s'ha esmentat. Les dissolucions es preparen en medi clorhídric per evitar que el metall precipiti en forma d'òxids o hidròxids. L'objectiu és avaluar la capacitat a pH 1 i a pH 2, però amb aquest darrer pH no s'aconsegueix la dissolució completa del PdCl_2 a concentració elevada. Per tant, només s'avalua a pH 1.

Es mesuren les concentracions de pal·ladi inicials i després de passades 24 hores, i així es determina la quantitat de pal·ladi adsorbit a la resina. Es representen els mg de Pd per gram de resina seca respecte a la concentració inicial de pal·ladi i s'obté la gràfica de la **Figura 3.15**.

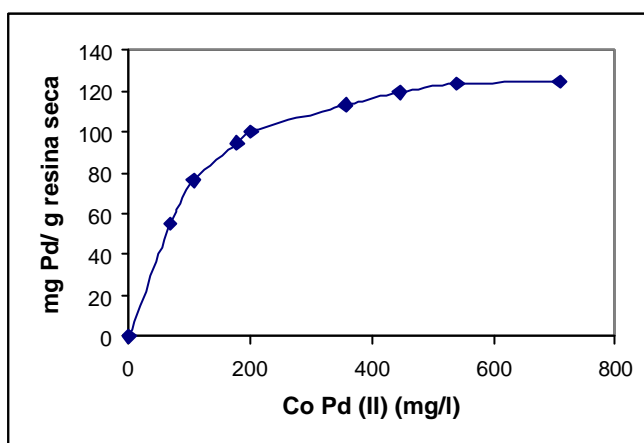


Figura 3.15. Capacitat de la resina Iontosorb Oxin per a pal·ladi a pH 1.

S'arriba a la saturació de la resina quan la quantitat de metall adsorbit per gram de resina seca no augmenta en augmentar la concentració de la dissolució inicial posada en contacte amb la resina. Aquest punt indicaria la capacitat de la resina, definida com la quantitat màxima de metall que pot adsorbir per gram de resina seca.

A partir de la gràfica de la **Figura 3.15** es determina la capacitat en 125-130 mg Pd/g resina seca. Aquest valor dóna una idea de la quantitat de pal·ladi que s'ha de posar en contacte amb la resina per saturar-la i poder processar les mostres de glifosat i AMPA.

Per al coure també s'avalua la capacitat de la resina a dos pH diferents: a pH 2 (medi àcid clorhídric) i a pH 4,5 (tampó acètic: acetat), ja que la retenció del coure s'afavoreix a pH no tan àcid. Els resultats obtinguts es mostren a la **Figura 3.16**.

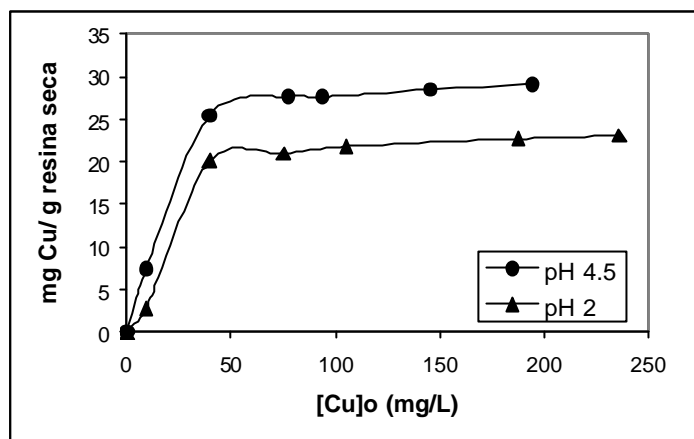


Figura 3.16. Capacitat de la resina Iontosorb Oxin per a coure a pH 2 i pH 4,5.

Les capacitats experimentals són de 29 i 23 mg Cu/g resina seca a pH 4,5 i pH 2, respectivament. Igual que passava amb Spheron Oxine, la resina té molta menys capacitat per a coure que per a pal·ladi.

A continuació s'estudia l'ús de la resina Iontosorb Oxin per a la preconcentració de glifosat i AMPA immobilitzant prèviament el metall. En aquests experiments previs la resina es carrega amb pal·ladi tal com s'havia fet amb Spheron Oxine, i també s'avalua amb coure per determinar si amb aquest metall la tècnica IMAC també és efectiva per a aquest herbicida. Estudis de complexació entre glifosat i coure indiquen que sí que és favorable la interacció [35].

3.3.3.2. Preconcentració de glifosat i AMPA amb Pd-Iontosorb Oxin

La immobilització de pal·ladi a la resina es duu a terme pesant 1,23 g de resina humida (equivalen a 0,5 g de resina seca) que s'equilibren durant 12 hores amb una dissolució de Pd(II) de 800 ppm en HCl 0,1 M en un agitador orbital. En aquestes condicions la quantitat de metall retinguda és de 90 mg Pd/g resina seca. Per tant, és superior a l'obtinguda amb Spheron Oxine (65 mg Pd/g resina seca). La matriu de cel·lulosa influeix de manera positiva en la retenció del metall.

Un cop carregada la resina amb pal·ladi, es renta amb HCl 0,01 M i aigua, com s'havia descrit per a la resina Spheron Oxine, i amb les millors condicions trobades anteriorment, es duen a terme experiments a diferents concentracions de glifosat i AMPA en aigua mil·liQ, per avaluar si el sistema és efectiu de la mateixa manera amb Iontosorb Oxin.

Les condicions dels experiments són:

- Càrrega dels anàlits: 50 ml de glifosat i AMPA en aigua mil·liQ (pH 5,5).
- Rentat amb 25 ml d'aigua mil·liQ.
- Elució amb 15 ml de HCl 0,1 M + NaCl 1 M.
- Cabal: càrrega 2,5 ml/min; elució 1 ml/min.

En analitzar les fraccions obtingudes durant la càrrega dels anàlits es comprova que la retenció és del 100 %. Pel que fa a l'elució, les recuperacions obtingudes per als diversos nivells de concentració es detallen a la **Taula 3.8**.

Taula 3.8. *Recuperacions obtingudes per al glifosat i l'AMPA en aigua mil·liQ amb la resina Iontosorb Oxin carregada amb Pd.*

Co (mg/l)	% glifosat	% AMPA
1	86	68
10	87	72
100	89	80

S'obtenen recuperacions entre 86-89 % i 68-80 % per a glifosat i AMPA, respectivament. Per tant, les recuperacions són de l'ordre de les obtingudes amb Spheron Oxine, tant per a glifosat com per a AMPA. S'observa que l'AMPA queda més retingut a la resina que el glifosat i per tant, és més difícil aconseguir-ne l'elució, problema que també s'havia detectat amb Spheron Oxine.

També es comprova que el mecanisme d'adsorció depèn de la interacció amb el metall realitzant una prova sense carregar la resina amb el metall. Es determina que sense pal·ladi la resina només reté un 4 % de glifosat i un 2 % d'AMPA.

3.3.3.3. Preconcentració de glifosat i AMPA amb Cu-Iontosorb Oxin

Com que les capacitats per al coure a pH 2 i pH 4,5 obtingudes eren similars, els experiments IMAC es duen a terme a pH 2, és a dir, en medi clorhídric. La resina es carrega amb coure seguint el mateix procediment descrit per a pal·ladi. Després de la immobilització del coure es determina que han quedat retinguts 15,2 mg Cu/g resina seca en aquestes condicions. Per tant, la quantitat de coure present a la resina és molt baixa comparada amb la retinguda quan s'immobilitza pal·ladi (90 mg Pd/g resina seca).

En aquest cas el rentat es duu a terme amb aigua mil·liQ perquè els complexos de coure amb 8-hidroxiquinoleïna són menys estables que amb Pd(II) i així s'eviten pèrdues de coure com a conseqüència de la seva elució en medi àcid. A continuació es passen 50 ml de mostra que conté 1 ppm de glifosat i AMPA en aigua mil·liQ i es recullen fraccions per determinar la retenció dels anàlits a la resina. Es renta amb aigua mil·liQ per eliminar interferents i restes dels anàlits no retingudes i s'elueix amb HCl 0,01 M, ja que, com s'ha dit, amb una solució de caràcter més àcid com l'eluent que s'utilitza quan es treballa amb Pd (HCl 0,1 M + NaCl 1 M) s'eluiria també el coure i, per tant, la resina no es podria reutilitzar.

Els resultats obtinguts indiquen que la resina Iontosorb Oxin carregada amb coure només reté un 10 % d'AMPA i un 85 % de glifosat. Per tant, no s'assoleixen retencions quantitatives com s'obtenen quan la resina està carregada amb pal·ladi.

També s'observa que per al glifosat l'elució amb HCl 0,01 M no proporciona la recuperació total de l'herbicida, ja que es passen fins a 40 ml d'eluent i només s'obté un 25 % de recuperació.

En eluir posteriorment amb HCl 0,1 M + NaCl 1 M es detecta la presència de glifosat, cosa que indica que aquest encara estava retingut per la resina. Per tant, cal un medi àcid fort per eluir el glifosat, però en aquestes condicions també es dissocia el complex Cu-8-hidroxiquinoleïna i, per tant, la resina no es pot reutilitzar.

En conclusió, es decideix aplicar la tècnica IMAC carregant la resina amb pal·ladi. Igual com s'havia fet amb Spheron Oxine, es fortifiquen aigües naturals de procedències diferents per avaluar la resina Iontosorb Oxin per a mostres reals.

3.3.3.4. Aplicació de Iontosorb Oxin per a aigües naturals fortificades

Les aigües naturals emprades en aquest estudi (superficial i subterrània) presenten característiques similars a les utilitzades amb la Spheron Oxine 1000.

Primer s'analitzen directament les aigües per determinar si estan contaminades amb els anàlits i es passen 50 ml d'aquestes mostres sense fortificar per la resina carregada amb pal·ladi. El procés d'elució es duu a terme amb 10 ml d'HCl 0,1 M + NaCl 1 M. En analitzar la fracció eluïda es comprova que no conté ni glifosat ni AMPA. Per tant, es pot procedir a fortificar-les.

Les aigües naturals es fortifiquen a dos nivells: 1 i 10 µg/l, i es processen 50 ml d'aquestes mostres directament. Les recuperacions obtingudes juntament amb les desviacions estàndard relatives (RSD) es detallen a la **Taula 3.9**.

Taula 3.9. Recuperacions i RSD obtingudes (n = 3) per a aigües naturals fortificades processades amb la resina Iontosorb Oxin.

Aigua natural	Glifosat		AMPA	
	1 ppb	10 ppb	1 ppb	10 ppb
Superficial	98 (8)	91 (10)	94 (10)	82 (9)
Subterrània	104 (3)	102 (4)	79 (4)	72 (4)

Per a glifosat s'obtenen recuperacions superiors al 90 % i per a AMPA les recuperacions oscil·len entre 70-95 %, amb RSD < 10 en tots dos casos.

Els resultats obtinguts són de l'ordre dels que s'havien aconseguit amb la resina Spheron Oxine 1000.

3.3.4. RESINA SPHERON THIOL 1000

La resina Spheron Thiol té una matriu acrílica com Spheron Oxine, però el grup funcional és un tiol, com ja s'ha comentat. Per tant, l'objectiu és avaluar la influència del grup funcional en la immobilització del metall i en la posterior preconcentració de glifosat i AMPA.

Aquesta resina també havia estat estudiada en el nostre grup de recerca per a l'extracció i recuperació de pal·ladi [30]. La capacitat teòrica i experimental havien estat determinades i s'havien obtingut valors de 2,01 mmol Pd/g resina seca per a la teòrica i

0,949 mmol Pd/g resina (100,94 mg Pd/g resina seca) per a l'experimental. Aquestes diferències entre la capacitat teòrica i l'experimental indicaven que probablement l'estequiometria del complex format entre el pal·ladi i el grup tiol de la resina era 1:2, és a dir, dos grups tiol per a cada pal·ladi retingut.

La capacitat per a pal·ladi és més elevada amb Spheron Thiol que amb Spheron Oxine, cosa que indica que el grup tiol té més afinitat per a pal·ladi que el grup 8-hidroxiquinoleïna. Aquest fet és favorable per després aplicar la tècnica IMAC per a glifosat i AMPA, ja que hi haurà més quantitat de metall disponible per interaccionar amb els anàlits, igual com passava amb la resina Iontosorb Oxin.

Un altre avantatge de Spheron Thiol respecte a Spheron Oxine és que l'elució del metall també és més complicada. Amb HCl 4 M no s'obtenia elució del metall, i amb agents complexants com tiourea o tiocianat les recuperacions del metall també són inferiors que amb la resina Spheron Oxine.

En conclusió, la resina Spheron Thiol presenta característiques més favorables per dur a terme el procés IMAC ja que té més capacitat per a pal·ladi i a més hi està més fortament retingut.

La resina es carrega amb pal·ladi seguint el procés en discontinu descrit anteriorment i es determina la quantitat de metall retingut en aquestes condicions; s'obté un valor de 96 mg Pd/g resina seca, que és similar al determinat en l'estudi d'Anticó et al. [30].

Un cop immobilitzat el pal·ladi, s'avalua l'efectivitat de Spheron Thiol per a la preconcentració de glifosat i AMPA. Primerament amb mostres en aigua mil·liQ i tot seguit amb aigües naturals fortificades. Es processen mostres de concentracions diferents dels anàlits en aigua mil·liQ i es determina que la resina carregada amb Pd(II) reté el 100 % dels anàlits, tal com passava amb les altres dues resines. Les recuperacions obtingudes són superiors al 85 % tant per a glifosat com per a AMPA, i es millora la recuperació d'aquest darrer.

Igual que amb les altres dues resines, també es comprova que el funcionament del sistema és degut a la presència de pal·ladi mitjançant un experiment on la resina no està carregada amb el metall. La retenció dels anàlits és inferior al 10 %.

Vist que el sistema és efectiu, es fortifiquen aigües naturals amb 1 i 10 ppb de glifosat i AMPA. Les aigües són les mateixes que en el cas de Iontosorb Oxin.

Amb les aigües naturals l'adsorció també és quantitativa per als dos anàlits i les recuperacions obtingudes es mostren a la **Taula 3.10**.

Taula 3.10. *Recuperacions i RSD obtingudes (n = 3) per a aigües naturals fortificades processades amb la resina Spheron Thiol.*

Aigua natural	Glifosat		AMPA	
	1 ppb	10 ppb	1 ppb	10 ppb
Superficial	99 (11)	84 (4)	93 (7)	93 (13)
Subterrània	103 (9)	99 (13)	102 (6)	97 (7)

Per a glifosat les recuperacions són superiors al 80 % i per a AMPA superiors al 90 %, cosa que suposa una millora respecte a les altres dues resines, amb les quals en general no s'obtenien recuperacions superiors al 90 % per a AMPA.

3.3.5. COMPARACIÓ DE LES TRES RESINES EMPRADES

Per establir la comparació entre les tres resines estudiades ens podem basar en la seva afinitat respectiva per a pal·ladi i la seva eficàcia en el mètode IMAC per a glifosat i AMPA.

Si les comparem respecte a l'afinitat per a pal·ladi (vegeu la **Taula 3.11**) es veu que Iontosorb Oxin i Spheron Thiol són les que mostren una major afinitat per al metall. Per tant, en el cas de tenir una matriu acrílica, el pal·ladi es coordina millor amb el grup tiol que amb 8-hidroxiquinoleïna. En canvi, si es comparen les dues resines amb el mateix grup funcional es pot concloure que la matriu sí que afecta la retenció del metall, i és més favorable en el cas de la matriu de cel·lulosa.

Pel que fa a la seva eficàcia en el mètode IMAC per preconcentrar glifosat i AMPA, cal dir que les tres resines adsorbeixen quantitativament els dos anàlits. Les diferències es troben en el procés d'elució.

Taula 3.11. Comparació de la quantitat de metall retingut a les resines

	Metall retingut (mg Pd/g resina seca)
Spheron Oxine 1000	65
Iontosorb Oxin 100	90
Spheron Thiol 1000	96

A la **Taula 3.12** es mostren els resultats obtinguts per les tres resines per a glifosat, havent fortificat dues mostres d'aigües naturals de diferents característiques amb 1 i 10 ppb.

Taula 3.12. Comparació de les recuperacions obtingudes per a glifosat per les tres resines estudiades.

Glifosat		Spheron Oxine	Iontosorb Oxin	Spheron Thiol
1 ppb	Superficial	81 (13)	98 (8)	99 (11)
	Subterrània	90 (4)	104 (3)	103 (9)
10 ppb	Superficial	80 (7)	91 (10)	84 (4)
	Subterrània	92 (7)	102 (4)	99 (13)

Els resultats són satisfactoris per a les tres resines, ja que en tots els casos s'obtenen recuperacions superiors al 80 %. Per tant, les tres resines són aptes per a la preconcentració de glifosat, ja que no s'obtenen diferències importants entre si.

Pel que fa a l'AMPA, es mostren els resultats obtinguts per les tres resines a la **Taula 3.13.**

Taula 3.13. Comparació de les recuperacions obtingudes per a AMPA amb les tres resines d'aquest estudi. (* La mostra d'aigua ja contenia AMPA.)

	AMPA	Spheron Oxine	Iontosorb Oxin	Spheron Thiol
1 ppb	Superficial	120 (22) *	94 (10)	93 (7)
	Subterrània	64 (11)	79 (4)	102 (6)
10 ppb	Superficial	65 (11)	82 (9)	93 (13)
	Subterrània	64 (16)	72 (4)	97 (7)

En aquest cas sí que s'observen diferències per a les tres resines. La que proporciona els millors resultats és la resina Spheron Thiol 1000, ja que s'obtenen recuperacions superiors al 90 %. En canvi, amb Iontosorb Oxin i Spheron Oxine les recuperacions obtingudes oscil·len entre el 60-80 %.

Per tant, entre les resines que presenten com a grup funcional 8-hidroxiquinoleïna no s'observen diferències significatives pel que fa a la preconcentració de glifosat i AMPA. Però respecte a la resina Spheron Thiol sí que hi ha diferències. Aquest fet es pot explicar si es té en compte que l'enllaç entre el pal·ladi i el grup tiol és més fort que l'enllaç entre el pal·ladi i el grup 8-HOx, per tant en el cas del Pd-tiol les altres dues posicions de coordinació, que és on s'enllacen el glifosat i l'AMPA, presenten un caràcter més làbil i per tant es facilita l'elució dels anàlits que és el pas crític del procés, ja que com s'ha comprovat totes les resines retenen ambdós anàlits al 100%.

3.4. REFERÈNCIES

1. M. Valcárcel, A. Gómez, *Técnicas analíticas de separación*, Ed. Reverté, Barcelona (1988).
2. J. Porath, J. Carlsson, I. Olsson, G. Belfrage, *Nature*, 258 (1975) 598.
3. F. Helfferich, *Nature*, 189 (1961) 1001.
4. G. S. Chaga, *J. Biochem. Biophys. Methods* 49 (2001) 313.
5. R. G. Pearson, *Coord. Chem. Rev.*, 100 (1990) 403.
6. E. K. M. Ueda, P. W. Gout, L. Morganti, *J. Chromatogr. A*, 988 (2003) 1.
7. V. Gaberc-Porekar, V. Menart, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 49 (2001) 335.
8. J. Porath, *Trends Anal. Chem.*, 7(7) (1988) 254.
9. E. Sulkowski, *Trends Biotechnol.*, 3(1) (1985) 1.
10. J. Porath, B. Olin, *Biochemistry*. 22 (1983) 1621.
11. E. Hochuli, H. Döbeli, A. Schacher, *J. Chromatogr.* 411 (1987) 177.
12. R. C. Hockney, *Trends Biotechnol.* 12 (1994) 456.
13. M. Biesaga, J. Orska, D. Fiertek, J. Izdebski, M. Trojanowicz, *Fresenius J. Anal. Chem.* 364 (1999) 160.
14. G. Chaga, J. Hopp, P. Nelson, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29 (1999) 19.
15. W. Jiang, B. Graham, L. Spiccia, M. T. W. Hearn, *Anal. Biochem.* 255 (1998) 47.
16. M. Zachariou, M. T. W. Hearn, *Biochemistry*, 35 (1996) 202.
17. J. Liesiene, K. Racaityte, M. Morkeviciene, P. Valancius, V. Bumelis, *J. Chromatogr. A*, 764 (1997) 27.
18. B-L. Yang, S. Goto, *Sep. Sci. Technol.* 26 (5) (1991) 637.
19. M. Zachariou, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 599 (1992) 171.
20. M. Zachariou, I. Traverso, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr.* 646 (1993) 107.
21. H. Chaouk, M. T. W. Hearn, *J. Chromatogr. A* 852 (1999) 105.
22. FC. Wu, RD. Evans, PJ. Dillon, *Anal. Chim. Acta* 452 (2002) 85.
23. P. Burba, B. Jakubowski, R. Kuckuk, K. Kullmer, KG. Heumann, *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (7) (2000) 689.
24. G. Marquès, J.L. Bourdelande, M. Valiente, *React. Funct. Polym.* 41 (1999) 77.
25. S. Díez, P. Zhou, S. Daunert, M. Valiente, *Anal. Chim. Acta*, 315 (1995) 339.
26. M. S. Ward, R. E. Shepherd, *Inorg. Chim. Acta* 311 (2000) 57.
27. S. Andreescu, L. Barthelmebs, J-L. Marty, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 171.
28. E. Börjesson, L. Torstensson, *J. Chromatogr. A* 886 (2000) 207.
29. A. Royer, S. Beguin, J.C. Tabet, S. Hulot, M.A. Reding, P.Y. Communal, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3826.

30. E. Anticó, A. Masana, V. Salvadó, M. Hidalgo, M. Valiente, *Anal. Chim. Acta*, 296 (1994) 325.
31. E. Anticó, A. Masana, V. Salvadó, M. Hidalgo, M. Valiente, *J. Chromatogr. A*, 706 (1995) 159.
32. Certificat analític de la resina Iontosorb Oxin 100 proporcionat per Oldrich Tokar-IONTOSORB (Rep. Txeca) (2002).
33. I. Marqués, V. Salvadó, M. Hidalgo. "A potentiometric study of the acid-base properties of glyphosate herbicide and its metabolic product, AMPA". Pòster presentat al XII Italian-Spanish Congress on Thermodynamics of Metal Complexes ISMEC 2001 (Parma).
34. T. G. Appleton, J. R. Hall, I. J. McMahon, *Inorg. Chem.* 25 (1986) 726.
35. P. G. Daniele, C. De Stefano, E. Prenesti, S. Sammartano, *Talanta*, 45 (1997) 425.

CAPÍTOL 4

**DETERMINACIÓ DE GLIFOSAT I AMPA MITJANÇANT
ACOBLEMENT LC-LC, PRÈVIA CONCENTRACIÓ
AMB UNA RESINA DE BESCANVI IÒNIC**

CONTINGUTS CAPÍTOL 4:

4.1. INTRODUCCIÓ	145
4.1.1. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES ACOBLADES.....	145
4.1.2. ACOBLAMENT LC-LC	147
4.1.2.1. <i>Etapas de l'anàlisi</i>	148
4.1.2.2. <i>Selecció de les condicions d'acoblament</i>	151
4.1.2.2.1. <i>Optimització del volum de purificació</i>	151
4.1.2.2.2. <i>Optimització del volum de transferència</i>	152
4.1.2.3. <i>Avantatges i limitacions de l'acoblament LC-LC</i>	153
4.1.2.4. <i>Aplicacions de l'acoblament LC-LC</i>	154
4.1.3. PRECONCENTRACIÓ AMB UNA RESINA DE BESCANVI IÒNIC.....	157
4.1.3.1. <i>Aplicacions de resines bescanviadores per a glifosat i AMPA</i>	159
4.2. EXPERIMENTAL.....	160
4.2.1. REACTIUS	160
4.2.2. DISSOLUCIONS.....	160
4.2.3. APARELLS I MATERIAL	161
4.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL	161
4.2.4.1. <i>Anàlisi de glifosat i AMPA</i>	161
4.2.4.2. <i>Preconcentració amb Amberlite[®] IRA-900</i>	162
4.2.4.3. <i>Fortificació d'aigües naturals</i>	162
4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ	163
4.3.1. ANÀLISI DIRECTA AMB LC-LC-FD.....	163
4.3.1.1. <i>Condicions de purificació i de transferència</i>	164
4.3.1.2. <i>Condicions de l'acoblament LC-LC</i>	166
4.3.1.3. <i>Característiques analítiques</i>	171
4.3.1.4. <i>Aplicació a l'anàlisi d'aigües naturals fortificades</i>	173
4.3.2. PRECONCENTRACIÓ.....	177
4.4. REFERÈNCIES	183

4.1. INTRODUCCIÓ

L'estudi que s'exposa en aquest capítol té com a objectiu el desenvolupament d'un mètode d'anàlisi per a glifosat i AMPA aplicant una tècnica cromatogràfica acoblada basada en l'acoblament de dues columnes de cromatografia líquida i la preconcentració dels anàlits mitjançant una resina de bescanvi iònic.

4.1.1. TÈCNiques CROMATOGRÀFIQUES ACOBLADES

Les tècniques cromatogràfiques acoblades fan servir dos o més sistemes cromatogràfics per aconseguir separacions que no es poden obtenir amb un de sol. Al primer sistema es duu a terme la purificació i/o preconcentració de la mostra de manera totalment automatitzada, i després es transfereix en línia, mitjançant una interfase

adequada, una fracció molt petita que conté els anàlits cap al segon sistema cromatogràfic, on se separen.

La cromatografia multidimensional es troba entre les tècniques més sensibles i selectives disponibles actualment per a la determinació de residus de plaguicides en mostres mediambientals. Les més utilitzades són la cromatografia líquida acoblada a cromatografia líquida (LC-LC) i la cromatografia líquida acoblada a cromatografia de gasos capil·lar (LC-GC). No obstant això, existeixen diverses modalitats en funció de si a la primera columna es fa preconcentració (SPE) o si se separen interferents i anàlits (LC); es diferencien els sistemes següents: SPE-LC, LC-LC, SPE-GC i LC-GC.

A la **Figura 4.1** es presenta un esquema bàsic d'una tècnica cromatogràfica acoblada on s'utilitzen dues columnes d'alta resolució.

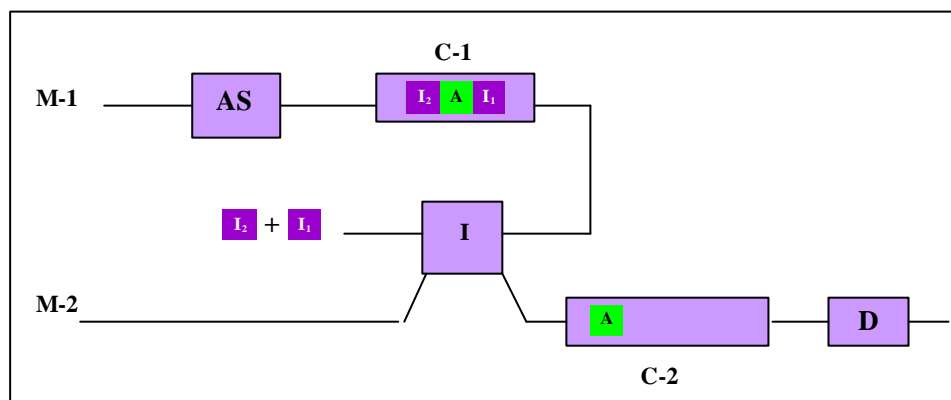


Figura 4.1. Representació esquemàtica d'un sistema cromatogràfic acoblat. M-1 i M-2, fases mòbils; AS, sistema d'injecció o autoinjector; C-1 i C-2, primera i segona columnes; I, interfase; D, sistema de detecció; A, anàlits; I₁ i I₂, interferents de la mostra.

En aquests procediments amb columnes acoblades es distingeixen quatre etapes [1]:

- Introducció d'un volum de mostra relativament gran a la columna del primer sistema, de manera que es produeix una millora important de la sensibilitat global del procediment analític. En combinació amb una compressió apropiada del pic durant la transferència (tercera etapa), els volums es poden augmentar de microlitres a

mil·lilitres, amb la qual cosa es produeix un guany de sensibilitat d'uns quants ordres de magnitud.

- Preseparació d'una gran part dels interferents de la mostra dels anàlits d'interès a la primera columna, fet que millora la selectivitat del procediment, ja que s'eliminen la major part dels interferents. Això és cert sobretot si el mecanisme de separació a les dues columnes és força diferent, cosa que passa amb LC-GC.
- Transferència de la fracció d'interès al segon sistema cromatogràfic mitjançant una tècnica de compressió del pic, de manera que augmenti la selectivitat i es minimitzi el volum de transferència i la sensibilitat. D'aquesta manera millora la forma del pic cromatogràfic. Per comprimir el pic es fa un refredament (*cold trapping*) a la columna GC en el cas de l'acoblament LC-GC, i gradients esglaonats durant la transferència a LC-LC.
- Anàlisi de la mostra transferida a la segona columna, de manera que es duu a terme una separació i detecció convencionals dels anàlits d'interès.

A més d'un guany de selectivitat i sensibilitat, les tècniques cromatogràfiques acoblades permeten integrar la preparació de la mostra, la separació i la detecció en un sol sistema cromatogràfic, cosa que ofereix un alt grau d'automatització per al procediment analític global.

Com ja s'ha dit anteriorment, hi ha diversos sistemes d'acoblament que s'han aplicat per a l'anàlisi de residus de plaguicides, però en aquesta tesi doctoral només es comentarà l'acoblament LC-LC perquè és el mètode que s'ha utilitzat.

4.1.2. ACOBLAMENT LC-LC

Un aspecte important de l'acoblament LC-LC és que ofereix la possibilitat d'integrar la preparació i la purificació de la mostra en el procediment cromatogràfic de manera totalment automatitzada, tal com s'esquematitza a la **Figura 4.2**, on es presenta un esquema bàsic de l'acoblament LC-LC.

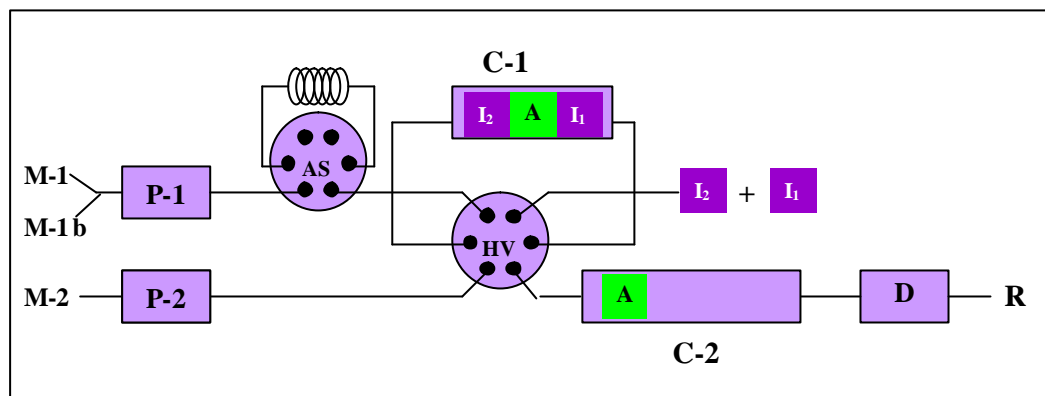


Figura 4.2. Representació esquemàtica d'un acoblament LC-LC. C-1 i C-2, primera i segona columnes separadores; AS, autoinjector; P-1 i P-2, bombes de LC; HV, vàlvula d'alta pressió; D, detector; A, fracció que conté els anàlits; I₁ i I₂, interferents de la mostra de cap i de cua, respectivament; M-1, fase mòbil per a la purificació en C-1; M-1b, fase mòbil per a l'eliminació dels interferents més retinguts en C-1; M-2, fase mòbil de C-2; R, residu.

Un aspecte que cal destacar de l'acoblament LC-LC és la millora en selectivitat respecte a altres mètodes. És important indicar que la primera columna (C-1) exerceix un paper rellevant, ja que ha de permetre la separació eficaç dels anàlits i interferents de la mostra.

Les primeres aplicacions de la tècnica per a l'anàlisi de residus de plaguicides feien ús de petites precolumnes (2-10 mm de longitud i 2-3 mm de diàmetre intern, amb partícules C₁₈ 5-10 µm) amb l'objectiu de preconcentrar anàlits en mostres aquoses [2,3]. Aquestes columnes, però, tenien un poder de separació baix, de manera que no s'aconseguia la purificació de la mostra perquè no se separaven els anàlits dels interferents. Posteriorment Hogendoorn i Goewie [4] van establir l'ús de precolumnes més llargues, de manera que la primera columna sí que era útil com a separadora, a més de permetre la preconcentració.

4.1.2.1. Etapes de l'anàlisi

En tot mètode analític que es basi en l'acoblament LC-LC es poden distingir una sèrie d'etapes que s'esquematitzen en la **Figura 4.3** i que es comenten a continuació:

1. **Injecció de la mostra** (Figura 4.3 A)

Durant aquesta etapa la mostra o el seu extracte s'introdueix a l'equip cromatogràfic mitjançant un injector automàtic o manual i s'omple el bucle (*loop*) corresponent. Mentrestant, la fase mòbil M-1 circula per la columna C-1 i la fase mòbil M-2 circula per la columna C-2.

2. **Purificació** (Figura 4.3 B)

Una vegada emplenat el *loop*, s'activa la vàlvula de l'autoinjector (vàlvula de sis vies) de manera que la fase mòbil M-1 passa per l'interior del *loop* i s'emporta la mostra cap a la columna C-1, on es produeix la primera separació cromatogràfica. Els interferents menys retinguts (I_1) són eliminats i els anàlits (A) i els interferents més retinguts (I_2) es van desplaçant al llarg de la columna C-1. Quan el primer anàlit comença a eluir de la columna C-1, s'activa la vàlvula HV, que actua com a interfase dels dos sistemes, de manera que finalitza l'etapa de purificació i comença la de transferència.

3. **Transferència** (Figura 4.3 C)

Una vegada activada la vàlvula HV, la fase mòbil M-2 passa a través de la columna C-1 i elueix la fracció de mostra que conté els anàlits fins a la columna C-2. Quan l'anàlit més retingut ja ha estat transferit, s'activa novament la vàlvula HV i finalitza l'etapa de transferència.

4. **Anàlisi i rentat** (Figura 4.3 D)

En aquesta etapa els anàlits que han estat transferits de la columna C-1 a la columna C-2 se separen mitjançant la fase mòbil M-2, i la columna C-1 es va netejant amb una fase mòbil adient per eliminar-ne els interferents més retinguts (I_2). Si cal fer servir una fase mòbil amb major poder d'elució que M-1 (M-1b), la columna s'ha de condicionar posteriorment amb M-1 abans de realitzar la injecció següent.

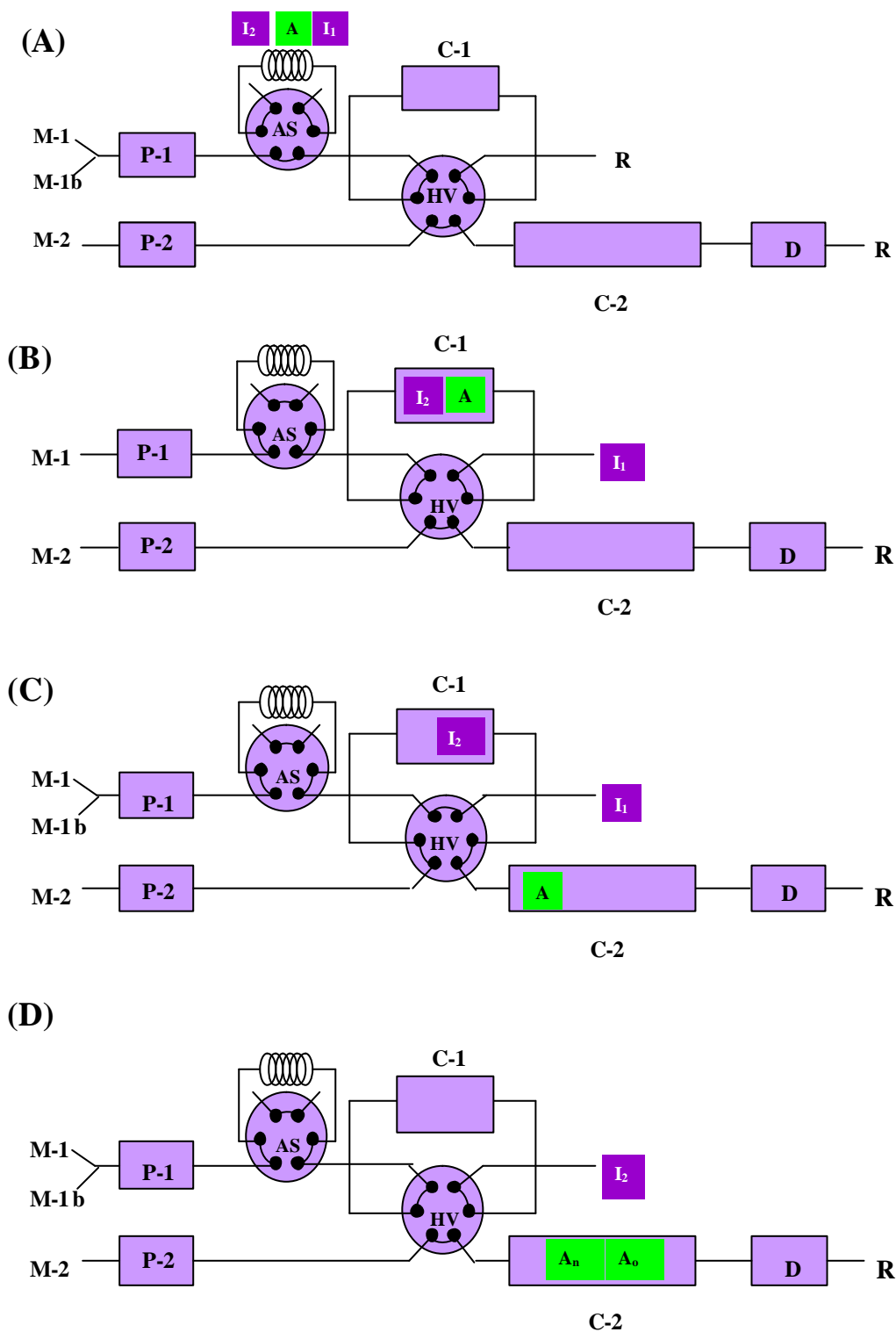


Figura 4.3. Etapes d'un procediment amb acoblament LC-LC. (A) Injecció; (B) purificació; (C) transferència; (D) anàlisi i rentat. C-1 i C-2, primera i segona columnes separadores; AS, autoinjector o injector manual; P-1 i P-2, bombes de LC; HV, vàlvula d'alta pressió de sis vies; D, detector; A, fracció que conté els anàlits (A_0 , A_n , anàlits); I_1 i I_2 , interferents de la mostra de cap i de cua, respectivament; M-1, fase mòbil per a la purificació en C-1; M-1b, fase mòbil per a l'eliminació dels interferents més retinguts en C-1; M-2, fase mòbil de C-2; R, residu.

4.1.2.2. Selecció de les condicions d'acoblament

Per dissenyar un mètode d'anàlisi basat en LC-LC els dos paràmetres més rellevants que s'han de tenir en compte són la selecció de la primera columna (C-1) i l'optimització de la força eluotròpica de la fase mòbil utilitzada durant la purificació (M-1) [5].

➤ Selecció de la columna C-1

Per determinar plaguicides moderadament polars amb LC en fase inversa s'ha comprovat que és adequada una columna C-1 amb fase estacionària C₁₈ i mides 1,5 x 0,32 cm id. com a mínim (per a anàlits més polars cal incrementar les mides). Amb una fase mòbil adequada (M-1) es poden separar bé els anàlits dels interferents.

➤ Selecció de M-1

La força eluotròpica de la fase mòbil M-1 és fonamental en qualsevol procés LC-LC per aconseguir la purificació de la mostra. Cal arribar a un compromís ja que, per una banda, la força eluotròpica ha de ser suficientment baixa perquè es puguin injectar volums grans de mostres aquoses (uns quants ml) sense que es produeixi un eixamplament de la banda dels anàlits, i per l'altra, la força eluotròpica ha de ser suficient per aconseguir una bona resolució entre anàlits i interferents.

Una vegada s'han seleccionat la columna C-1 i la fase mòbil M-1, s'han d'optimitzar les condicions de l'acoblament, és a dir, el volum de purificació i el volum de transferència.

4.1.2.2.1. Optimització del volum de purificació

El volum de purificació es determina connectant la columna C-1 directament al detector utilitzat, tal com es mostra a la **Figura 4.4**, i injectant l'anàlit menys retingut (A₀). Aquest anàlit es desplaça a través de la columna C-1 mitjançant la fase mòbil M-1. El temps que passa des que s'activa la vàlvula d'injecció fins que comença a eluir l'anàlit menys retingut (A₀) a la columna C-1 és el temps de purificació, i el volum de fase mòbil M-1 necessari és el volum de purificació. Per tant, en el moment que A₀ surt és quan s'haurà d'iniciar la transferència cap a la columna C-2, fent servir la fase mòbil M-2.

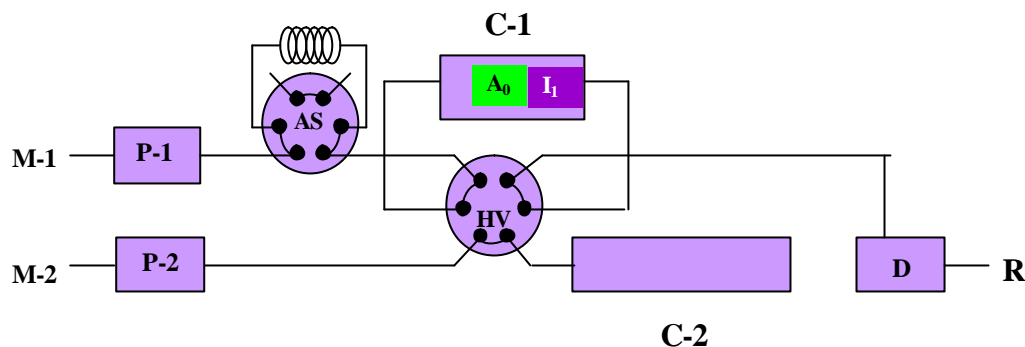


Figura 4.4. Representació esquemàtica del disseny necessari per a la determinació experimental del volum de purificació.

C-1 i C-2, primera i segona columnes separadores; AS, autoinjector o injector manual; P-1 i P-2, bombes de LC; HV, vàlvula d'alta pressió de sis vies; D, detector; A_0 , anàlit menys retingut; I_1 , interferent de la mostra de cap; M-1, fase mòbil per a la purificació en C-1; M-2, fase mòbil de C-2; R, residu.

4.1.2.2.2. Optimització del volum de transferència

Es determina connectant la columna C-1 al detector, igual que per al volum de purificació, però ara s'injecta l'anàlit més retingut (A_n). Després que la fase mòbil M-1 actuï durant el temps de purificació que s'ha determinat anteriorment, s'activa la vàlvula HV (vegeu la **Figura 4.5**) i s'elueix l'anàlit A_n amb un volum determinat de la fase mòbil M-2 que correspon al volum de transferència. El temps transcorregut des que finalitza la purificació fins que s'elueix tot l'anàlit A_n és el temps de transferència.

A més, és interessant que aquest volum sigui tan petit com sigui possible, ja que així es minimitzarà l'eixamplament de les bandes i s'eliminaran un major nombre d'interferents. Aquesta és una de les limitacions que presenta l'acoblament LC-LC quan es vol aplicar per a la determinació multiresidual de plaguicides, ja que, com que tenen retencions molt diverses a la columna C-1, el volum de transferència s'incrementarà.

Cal tenir en compte que periòdicament s'han de comprovar els volums de purificació i transferència per assegurar que no han variat, ja que, si no, es produirien pèrdues dels anàlits i, per tant, hi hauria errors importants en la seva anàlisi.

A més de les condicions d'acoblament, també s'han d'optimitzar les condicions cromatogràfiques perquè es produeixi la separació dels anàlits a la columna C-2, que és la veritable columna analítica, així com les condicions de detecció.

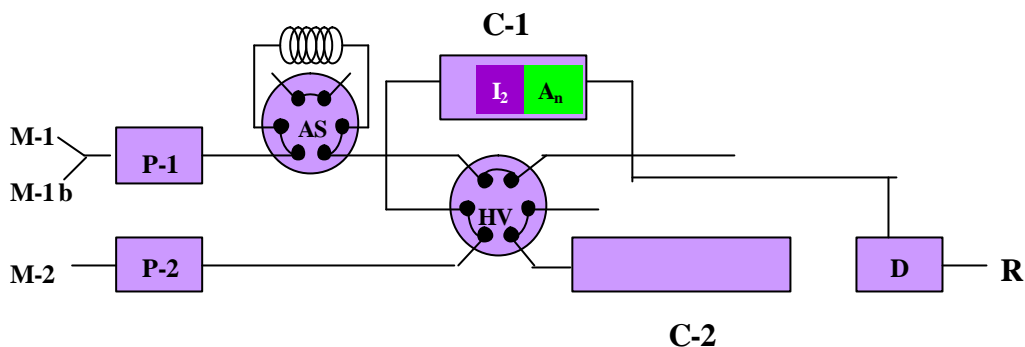


Figura 45. Representació esquemàtica del disseny necessari per a la determinació del volum de transferència.

C-1 i C-2, primera i segona columnes separadores; AS, autoinjector o injector manual; P-1 i P-2, bombes de LC; HV, vàlvula d'alta pressió de sis vies; D, detector; A_n, anàlit més retingut; I₂, interferent de la mostra de cua; M-1, fase mòbil per a la purificació en C-1; M-1b, fase mòbil per a l'eliminació dels interferents més retinguts en C-1; M-2, fase mòbil de C-2; R, residu.

4.1.2.3. Avantatges i limitacions de l'acoblament LC-LC

Una vegada comentat el funcionament del sistema, es pot concloure que els avantatges més importants de l'acoblament LC-LC són: una major selectivitat, un augment de la sensibilitat en comparació amb els procediments basats en LC convencional i la possibilitat d'automatització, cosa que fa que aquesta tècnica tingui un futur prometedor en l'anàlisi de residus de plaguicides.

No obstant això, cal comentar que el seu major potencial no es troba en el camp de l'anàlisi multiresidual a causa de les dificultats per obtenir condicions experimentals adequades per a un ampli rang de compostos. S'aplica sobretot per a l'anàlisi de compostos *difícils*, com són plaguicides i altres contaminants polars en mostres aquoses, en les quals no resulta fàcil aconseguir aïllar-los i preconcentrar-los.

Respecte a les millores en sensibilitat, cal destacar que es poden injectar grans volums de mostra aquosa (fins a alguns ml), com ja s'ha comentat anteriorment, cosa que suposa una millora considerable dels nivells de determinació en comparació amb els mètodes de LC convencional, on s'injecten com a màxim 100-200 µl.

Un altre avantatge és que els procediments desenvolupats presenten un pretractament mínim de la mostra i l'anàlisi per LC-LC és ràpida, de manera que diàriament es poden analitzar un gran nombre de mostres (de 30 a 50).

Respecte a la millora de selectivitat, ja s'ha comentat que la mostra es purifica automàticament, ja que a la primera columna s'eliminen la majoria dels interferents. A més, així també es protegeix la segona columna (la C-2), ja que només hi passarà una petita fracció de la mostra. Per tant, en general, s'allargarà el seu temps de vida.

Pel que fa a les limitacions, cal comentar que, en comparació amb els mètodes *off-line*, cal fer una inversió en equipament i que, a més, cal una major formació i experiència que en LC convencional per poder posar a punt un mètode de LC-LC. Probablement per aquest motiu l'acoblament LC-LC ha estat poc aplicat.

Una altra limitació és el temps de vida de la primera columna, ja que, com s'ha dit, s'injecten volums grans de mostres sense purificar. És una columna d'elevada resolució amb partícules de mida petita, cosa que provoca que, després d'uns dies d'ús, es produeixin augments importants de pressió i s'hagi de substituir.

I finalment, com ja s'ha indicat anteriorment, cal dir que les condicions d'acoblament, és a dir, el volum de purificació i el de transferència, s'han de comprovar sovint per assegurar-se que no s'han modificat, ja que, si no, hi hauria pèrdues d'anàlits.

4.1.2.4. Aplicacions de l'acoblament LC-LC

Com s'ha esmentat, la necessitat de disposar de mètodes analítics molt sensibles ha potenciat el desenvolupament de la cromatografia multidimensional.

A la bibliografia hi ha descrites nombroses aplicacions de l'acoblament LC-LC per a anàlits i matrius diversos, com compostos fenòlics en olis de piròlisi [6,7], esteroides en sèrum [8], drogues com el salbutamol i el clenbuterol en sèrum [9] o la benzodiazepina [10], hidrocarburs aromàtics policíclics en peixos [11], pèptids [12] i proteïnes [13], entre d'altres.

Ens centrarem en les aplicacions descrites per a l'anàlisi de residus de plaguicides, revisades extensament per Hogendoorn i van Zoonen [1,14,15].

La primera aplicació real de l'acoblament LC-LC on s'introdueix el concepte de purificació i transferència d'una fracció adequada des de la precolumna (C-1) fins a la columna separadora (C-2) va ser proposada per Goewie et al. [16] i es determinaven residus de N-metilcarbamats (propoxur, carbofuran, carbaril, bendiocarb i tiofanox) en mostres d'aliments. Els límits de detecció eren de 0,5 µg/l per als diversos anàlits.

Els mateixos autors van demostrar també els avantatges de fer servir l'acoblament LC-LC per a l'anàlisi d'herbicides com el bromacil i el diuron i el principal metabòlit d'aquest darrer, la 3,4-dicloroanilina, en mostres d'aigua subterrània. Els límits de detecció eren de 0,2, 0,01 i 0,02 µg/l, respectivament [17].

Des d'aquestes aplicacions inicials se n'han descrit d'altres per analitzar plaguicides de polaritats força elevades. En general, les aplicacions descrites són per a plaguicides concrets i problemàtics, i no per a anàlisi multiresidual, ja que, com s'ha comentat, és difícil aconseguir condicions experimentals vàlides per a un gran nombre de plaguicides, sobretot si presenten característiques diferents. A la **Taula 4.1** es descriuen algunes d'aquestes aplicacions.

L'acoblament LC-LC també ha estat aplicat per determinar *l'herbicide glifosat* i el seu metabòlit AMPA en diferents matrius. Sancho et al. [33] van optimitzar un mètode amb acoblament LC-LC per determinar l'herbicide fosfònic glufosinat en aigua. Després van adaptar el mètode per a la determinació conjunta de glufosinat, glifosat i AMPA, així com per a la seva anàlisi independent [34].

La determinació consisteix en la derivatització precolumna amb el reactiu fluorescent 9-fluorenilmetilcloroformiat (FMOC) per obtenir els corresponents derivats fluorescents. El mètode implica l'ús d'una columna C-1 (5 µm C₁₈ 3 x 0,46 cm) acoblada a una columna C-2 (5 µm NH₂ 25 x 0,46 cm) per on circula una fase mòbil que consisteix en tampó fosfat 0,05 M (pH 5,5)-acetonitril (65:35 v/v). La columna C-1 permet la injecció d'un volum gran de mostra (2 ml) gràcies al qual es pot millorar la sensibilitat del mètode. Després de la derivatització de la mostra amb FMOC i tampó borat 0,025 M, cal diluir-la quatre vegades per al glufosinat i l'AMPA i vuit vegades per al glifosat amb tampó borat a causa de la presència d'acetonitril en el medi (és el dissolvent del FMOC), ja que si no provoca un eixamplament dels pics a la primera columna i dificulta el procés de transferència. Els límits de detecció obtinguts per a la determinació conjunta dels tres anàlisis són de l'ordre d'1 µg/l i per a la seva anàlisi independent disminueixen fins a 0,25 µg/l.

Posteriorment el mètode es va aplicar per determinar glifosat i AMPA en mostres de sòls i es van aconseguir límits de 5-50 µg/kg depenent del tipus de sòl [35]. I també s'ha determinat el glifosat en mostres de cereals amb LOD = 0,5 mg/kg [36].

Més recentment el mètode s'ha adaptat per analitzar glifosat en mostres vegetals com olives i tomates [37] i s'ha obtingut LOD de 0,01 mg/kg. En aquest cas ha estat

necessari augmentar lleugerament la concentració del FMOC i variar els volums de mostra, tampó borat i FMOC en dur a terme la derivatització a causa d'una major presència d'interferents.

Taula 4.1. Determinació de plaguicides per LC-LC

Anàlits	Matriu	Detecció	LOD (ppb)	Ref.
Metil isotiocianat (MITC)	aigua	UV-Vis	1 0,1 (amb LLE i SPE)	[18]
<i>Herbicides</i> : imazetapir i imazapir	sòls	UV-Vis	3	[19]
<i>Herbicides</i> : bromacil i diuron	aigua	UV-Vis	0,1	[20]
Carbendazim (metabòlit fungicida)	sòl aigua de llac	MS	100 0,025	[21]
<i>Herbicides àcids</i> : metsulfuron-metil, bentazona, bromoxinil, MCPA, MCPP	aigua	UV-Vis MS/MS	0,4	[22] [23]
<i>Herbicides àcids</i> : metsulfuron metil, bentazona, bromoxinil, 2,4-D, MCPA, MCPP, 2,4-DP, 2,4,5-T, 2,4-DB, MCPB	sòls	UV-Vis	5-50	[24]
<i>Triazines</i> : - simazina, atrazina, terbutilazina, terbutrina	aigua	UV-Vis	0,1-0,5	[25]
- simazina, atrazina, terbutilazina, terbutrina i metabòlits deisopropilatrazina, deetilatraxina, hidroxiatrazina			0,02-0,05 (amb SPE)	[26]
<i>Fungicides</i> : triadimefon, triadimenol, tetraconazol	orina sèrum	UV-Vis UV-Vis	1,5-3,5 1,5-3	[27] [28]
<i>Herbicides fenilurees</i> : monuron, monolinuron, isoproturon, diuron, linuron, metabenziazuron, metoxuron, fluometuron	aigua	UV-Vis MS	0,1 0,01-0,2	[29]
<i>N-metilcarbamats</i> : aldicarb i metabòlits (aldicarb-sulfòxid, aldicarb-sulfona) i carbofurà i metabòlit (3-OH-carbofurà)	aigua	UV-Vis	0,01-0,04 (amb SPE)	[30]
<i>Insecticida</i> : clorpirifos i 3,5,6-tricloro-2-piridinol (metabòlit) (TCP)	sèrum orina	MS/MS	1,5 0,5	[31]
4-nitrofenol i 3-metil-4-nitrofenol (metabòlits del paration i el fenitrotion)	orina	MS/MS	1	[32]

Com es pot veure en les diferents aplicacions descrites per a glifosat, el mètode existent no permet determinar l'herbicida i el seu metabòlit en aigües naturals a concentracions $< 0,1 \mu\text{g/l}$, que són les exigides per la normativa europea.

En aquest treball s'aplica l'acoblament LC-LC per determinar glifosat i AMPA a concentracions baixes i en algunes mostres també es duu a terme prèviament preconcentració *off-line* amb una resina de bescanvi iònic per disminuir encara més els límits de detecció del sistema.

4.1.3. PRECONCENTRACIÓ AMB UNA RESINA DE BESCANVI IÒNIC

El glifosat i AMPA es preconcentren amb una resina sintètica de bescanvi iònic, concretament Amberlite[®] IRA-900. En un estudi previ [38] s'havien optimitzat les característiques d'aquest sistema.

Les resines sintètiques estan formades per una matriu polimèrica insoluble i un grup ionogen. La matriu es fa insoluble introduint un agent encreuador que connecta diverses cadenes d'hidrocarburs. Inicialment les resines de bescanvi estaven formades per grups funcionals aniònics o catiònics lligats a gel de sílice. Posteriorment es van desenvolupar resines de bescanvi iònic formades per grups bescanviadors hidrofílics adherits a l'esquelet del copolímer estirè-divinilbenzè (PS-DVB) (vegeu la **Figura 4.6**). Aquestes resines polimèriques, entre les quals s'inclou la resina Amberlite[®] IRA-900, tenen més capacitat bescanviadora i un rang de pH de treball més ampli que els materials basats en sílice [39].

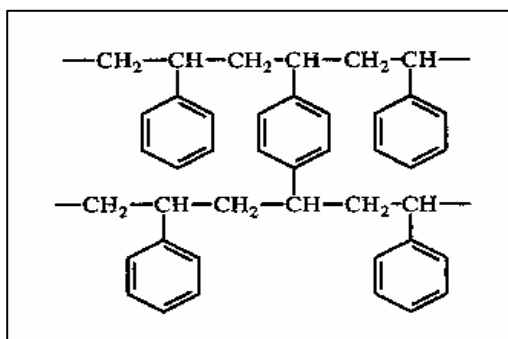


Figura 4.6. Estructura d'un adsorbent de poliestirè-divinilbenzè (PS-DVB).

Les resines sintètiques es poden classificar, segons l'estructura de la seva xarxa polimèrica, en:

- *Resines tipus gel o microporoses*: són resines formades per una xarxa homogènia de naturalesa elàstica, que no és porosa, però que té canals resultants del procés d'inflament o *swelling*.
- *Resines macroporoses o macroreticulars*: tenen una matriu porosa i àrees internes grans. Són molt uniformes pel que fa a la forma externa i presenten una gran estabilitat mecànica (la resina Amberlite® IRA-900 pertany a aquest tipus).
- *Resines isoporoses*: en aquestes resines el creuament i l'estructura porosa s'han modificat per obtenir polímers amb una mida de porus substancialment uniforme.

En funció del grup ionogen que presenten les resines, les podem classificar en catióniques o anióniques.

Les resines de bescanvi catiònic contenen grups fixos aniónics i, per tant, els ions bescanviables són cations. En funció de si presenten una càrrega fixa permanent o si la seva càrrega varia en modificar el pH, parlarem de bescanviadors d'àcid fort o d'àcid feble, respectivament. En el primer cas, el sorbent més típic conté un grup funcional d'àcid sulfònic (-SO₃H) que té un protó com a contraió, i en el segon cas el més emprat és el sorbent amb grups àcid carboxílic (-COOH).

Les resines de bescanvi aniónic contenen grups fixos catiónics i, per tant, els ions que poden bescanviar són anions. Les resines de base forta contenen grups amoni quaternari (-NR₃⁺OH) principalment, i les de base feble, grups amino mono o disubstituits (-NH₂ o -NH-).

Amberlite® IRA-900 és una resina de bescanvi aniónic de base forta que té com a contraió un ió clorur. Per tant, pot bescanviar l'ió clorur per a glifosat o AMPA en forma aniónica. Les característiques de la resina es detallen a la **Taula 4.2**.

Taula 4.2. Característiques de la resina Amberlite[®] IRA-900 [40,41].

Característica	Amberlite [®] IRA-900 (Cl)
Aparença	perles beix
Porositat	macroporosa o macroreticular
Mode bescanvi	aniònica de base forta
Grup funcional	tipus I: trialkilbenzil amoni PS-DVB- N ⁺ (CH ₃) ₃
Capacitat total	1,0 meq/ml 4,2 meq/g
Humitat	60 %
Densitat	700 g/l
Temperatura màxima de treball	77 °C
Rang pH de treball	0-14
Mida de partícula	16-50 µm

4.1.3.1. Aplicacions de resines bescanviadores per a glifosat i AMPA

La majoria dels mètodes de purificació de glifosat i AMPA es basen en cromatografia d'intercanvi iònic a causa de la forma iònica que presenten.

L'ús d'una columna d'intercanvi iònic en els passos de preconcentració o purificació (*clean-up*) sembla molt efectiva i és el motiu pel qual gairebé tots els mètodes proposats es basen en l'ús de resines bescanviadores aniòniques o catiòniques per aïllar els anàlits de les interferències de la matriu.

S'han fet servir cartutxos LiChrolut EN per a glifosat i AMPA. Si s'acobla amb una columna d'intercanvi aniònic fort (Amberlita IRA 410-OH⁻), aquesta resina polimèrica pot solucionar els problemes referents a interferents orgànics i inorgànics i al mateix temps aïllar els anàlits quantitativament [42]. L'elució dels anàlits és efectiva si s'utilitza un tampó de citrat a pH 5, eluent proposat també per altres autors [43,44].

També s'ha fet servir bescanvi catiònic [44,45,46]. En molts casos és freqüent l'ús de dos sorbents pels quals es fa passar la mostra de manera consecutiva.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. REACTIUS

- N-(fosfonometil)glicina (glifosat): sòlid, 99 %, Riedel-de-Häen, Alemanya.
- Àcid aminometilfosfònic (AMPA): sòlid, 99 %, Sigma, Alemanya.
- Cloroformiat de 9-fluorenilmetil (FMOC): sòlid, >99 %, HPLC, Fluka, Suïssa.
- Tetraborat decahidrat de sodi: sòlid, 99,5 %, PA, Scharlau, Espanya.
- Dihidrogenfosfat de potassi: sòlid, mín. 99,5 %, per HPLC, Scharlau, Espanya.
- Hidròxid de potassi: sòlid, 85 %, PA, Scharlau, Espanya.
- Clorur sòdic: sòlid purificat a 300 °C, mín. 99,8 %, PA, Scharlau, Espanya.
- Acetonitril: líquid, 99,98 %, per HPLC, Scharlau, Espanya.
- Metanol: líquid, per HPLC, Scharlau, Espanya.
- Aigua qualitat HPLC: preparada desmineralitzant aigua amb un sistema Nanopure II de Barnstead, Estats Units.
- Amberlite[®]IRA-900: resina en forma de perles, Fluka, Suïssa.

4.2.2. DISSOLUCIONS

- Dissolució estoc de glifosat (500 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua qualitat HPLC. Es conserva en congelador.
- Dissolució estoc d'AMPA (500 mg/l): es pesa el sòlid i s'arrasa amb aigua qualitat HPLC. Es conserva en congelador.
- Dissolucions de treball de glifosat i AMPA: es preparen per dilució dels estocs i es conserven en frigorífic.
- Tampó borat 0,025 M i 0,05 M (pH = 9): es prepara una dissolució de tetraborat sòdic 0,025 M o 0,05 M que ja té un pH = 9.
- Dissolució de FMOC de 1.000 o 2.000 ppm: es pesa el sòlid i s'arrasa amb acetonitril.

4.2.3. APARELLS I MATERIAL

- Cromatògraf líquid que consisteix en:
 - ♦ Un processador automàtic de mostra (ASPEC XL) de Gilson (França) equipat amb dues vàlvules Rheodyne controlades pel mostrejador, una de les quals amb un bucle de 2 ml per poder injectar un volum gran i l'altra utilitzada per aconseguir l'acoblament.
 - ♦ Una bomba de HPLC ternària model 9013 (Varian) i una altra bomba de LC isocràtica model 2150 (LKB Bromma, Suècia)
 - ♦ Un detector de fluorescència 1046A (Hewlett-Packard) a 263 nm (λ_{exc}) i 317 nm (λ_{em})
 - ♦ Una primera columna (C-1) de 10 μ m Kromasil 100 (Scharlau) de 3 x 0,46 cm i.d. i una segona columna (C-2) empaquetada amb 5 μ m Hypersil APS (Scharlau) de 25 x 0,46 cm i.d.
 - ♦ Hewlett-Packard Chemstation per LC per registrar els cromatogrames.

- Bomba peristàltica Minipuls 3 de Gilson
- pH-metre MicropH 2001 de Crison (Espanya).
- Balança analítica AE200 de Mettler (Espanya).
- Micropipetes de Mettler Toledo de 1.000 i 5.000 μ l.

4.2.4. PROCEDIMENT EXPERIMENTAL

4.2.4.1. Anàlisi de glifosat i AMPA

El mètode d'anàlisi optimitzat consisteix en la derivatització precolumna dels anàlits que es descriu a continuació i la seva determinació mitjançant LC-LC.

Derivatització precolumna:

Es pipetegen 1,5 ml de mostra aquosa en un tub de vidre i se li afegixen 0,5 ml de tampó borat 0,05 M (pH=9) i 0,5 ml del reactiu FMOC (2000 mg/l en acetonitril). S'agita la barreja i es deixa reposar 30 minuts a temperatura ambient. Finalment s'hi afegixen 7,5 ml de tampó borat 0,025 M per diluir la solució abans d'introduir-la al sistema cromatogràfic.

Anàlisi amb LC-LC:

La fase mòbil utilitzada per a les dues columnes consisteix en una barreja de tampó fosfat 0,05 M (pH 5,5 ajustat amb KOH 2M) – acetonitril 65:35 (v/v). El cabal és d'1 ml/min.

S'injecten 2 ml de la dissolució obtinguda amb la derivatització a la primera columna C-1. Després de passar 24 ml de fase mòbil per aquesta columna (volum de purificació), es giren les vàlvules de manera que es connecten les dues columnes durant 0,9 min (temps de transferència). En aquest moment es produeix la transferència dels anàlits de la C-1 a la C-2. Després de la transferència es giren novament les vàlvules de manera que la C-1 queda independent de la C-2. La C-1 es va netejant amb la fase mòbil i s'elimina el FMOG, que havia quedat en excés després de la reacció de derivatització i d'altres interferents presents a la mostra. Mentrestant a la C-2 es produeix la separació de glifosat i AMPA i la seva detecció amb fluorescència (FD).

Els anàlits es quantifiquen mitjançant calibratge extern amb patrons preparats en aigua de qualitat HPLC.

4.2.4.2. Preconcentració amb Amberlite[®] IRA-900

La resina Amberlite[®] IRA-900 s'asseca a 65 °C abans del seu ús fins a pes constant. Es pesen 0,5 g de resina seca i s'empaqueten en una columna de vidre (llargada: 14 cm, diàmetre intern: 0,5 cm). La resina es renta amb aigua de qualitat HPLC.

Es passen 50 ml de mostra que conté glifosat a 1 ml/min mitjançant una bomba peristàltica. Després es renta la resina amb 10 ml d'aigua i finalment s'elueix el glifosat amb 10 ml de NaCl 1 M. La resina es renta amb més NaCl i aigua per reutilitzar-la.

Es determina el contingut de glifosat present a la mostra amb el mètode de LC-LC-FD descrit anteriorment.

4.2.4.3. Fortificació d'aigües naturals

Per validar el mètode es fortifiquen a diferents nivells de concentració diverses mostres d'aigües potables, superficials i subterrànies de la zona de Castelló (Comunitat Valenciana, Espanya). Per a l'anàlisi directa de mostres d'aigües es fortifiquen amb 0,1, 1 i 10 µg/l de glifosat i AMPA.

Per als experiments on prèviament s'aplica preconcentració amb la resina d'intercanvi iònic, es fortifiquen les aigües bàsicament amb 0,02 i 0,1 µg/l de glifosat.

4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Inicialment es parteix del mètode proposat per Sancho et al. [34] per a l'anàlisi de glifosat i AMPA en aigües naturals. S'apliquen les condicions proposades en aquesta publicació per dur a terme la derivatització precolumna i posterior anàlisi amb LC-LC-FD.

L'objectiu és millorar aquest mètode perquè sigui adequat per mesurar concentracions de l'herbicida i el seu metabòlit inferiors a 0,1 µg/l, que és el límit establert per la Unió Europea per als plaguicides, com ja s'ha comentat. Per aconseguir-ho es variaran lleugerament les condicions de la reacció de derivatització i alguns paràmetres de l'instrument i a més s'aplicarà una tècnica de preconcentració mitjançant una resina d'intercanvi iònic, Amberlite® IRA-900.

4.3.1. ANÀLISI DIRECTA AMB LC-LC-FD

Com s'ha comentat, s'aplica la reacció de derivatització proposada per Sancho et al. que s'esquemmatitza a la **Figura 4.7**.

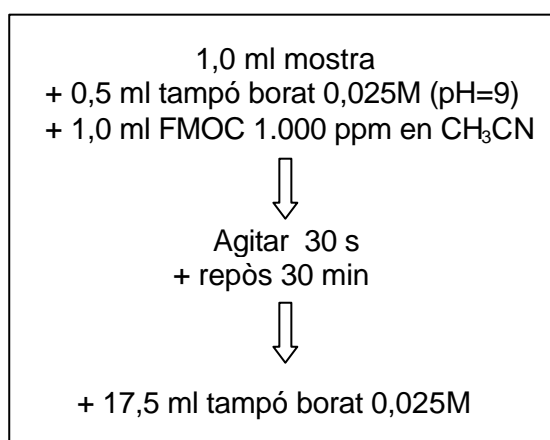


Figura 4.7. Reacció de derivatització proposada per Sancho et al.[34].

El reactiu derivatitzant utilitzat és FMOc, que interacciona amb els grups amino del glifosat i l'AMPA per donar compostos fluorescents. La reacció és efectiva en medi bàsic i per aquest motiu s'hi afegeix tampó borat de pH 9.

Un cop obtinguts els derivats fluorescents, cal fer una dilució de la mostra abans de dur-ne a terme la injecció, per disminuir el contingut d'acetonitril (provinent de la dissolució de FMOc). Sancho et al. [34] van determinar que aquesta dilució era necessària, tot i provocar una pèrdua de sensibilitat, per aconseguir la suficient compressió dels pics a

la columna C-1, ja que, en injectar un volum gran de mostra (2 ml), aquesta actua com una primera fase mòbil. Si la compressió dels pics no és l'adequada, es dificulta l'etapa de transferència. Per a l'AMPA van concloure que una dilució de quatre vegades (10 % acetonitril present a la mostra) era suficient, però per al glifosat calia diluir vuit vegades (5 % d'acetonitril). Per tant, si es volia fer la determinació conjunta, calia diluir vuit vegades la mostra i per tant s'afegien 17,5 ml de tampó borat. Així es podien transferir simultàniament glifosat i AMPA de la columna C-1 a la C-2. Amb tot, per a l'AMPA les condicions no són les òptimes, però tot i així el mètode continua sent més sensible que per glifosat.

El primer que cal optimitzar són les condicions de purificació i transferència.

4.3.1.1. Condicions de purificació i de transferència

Per optimitzar les condicions es connecta la columna C-1 directament al detector, tal com es descriu a l'apartat 4.1.2.2 d'aquest capítol, i es determinen els temps de retenció dels dos anàlits a la primera columna. Primer s'injecta un patró de 5 mg/l de glifosat i s'obté el cromatograma que es mostra a la **Figura 4.8**, on el glifosat té un temps de retenció de 2,6 min. *El temps de purificació* és el temps que tarda a arribar al detector l'anàlit menys retingut, que en aquest cas és el glifosat. Aquest temps és de 24 minuts, que corresponen a 2,4 ml, ja que el flux és d'1 ml/min.

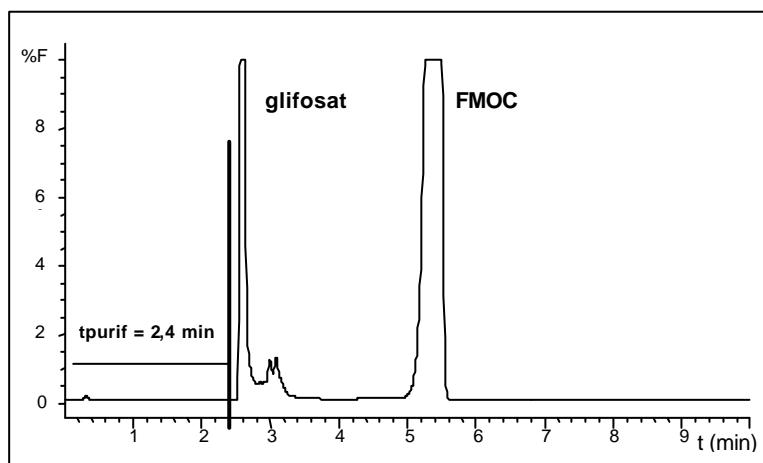


Figura 4.8. Cromatograma enregistrat amb la C-1 connectada al detector de fluorescència per a un patró de glifosat de 5 mg/l derivatitzat amb Fmoc.

Condicions: columna C_{18} (3x0,46 cm, 10 mm) fase mòbil KH_2PO_4 0,05 M (pH 5,5); CH_3CN (65:35 v/v); V injecció = 2 ml; detecció I_{exc} = 263 nm i I_{em} = 317 nm; cabal 1 ml/min.

A continuació s'injecta un patró d'AMPA de 5 mg/l i s'obté com a temps de retenció 2,9 min, tal com es veu al cromatograma de la **Figura 4.9**.

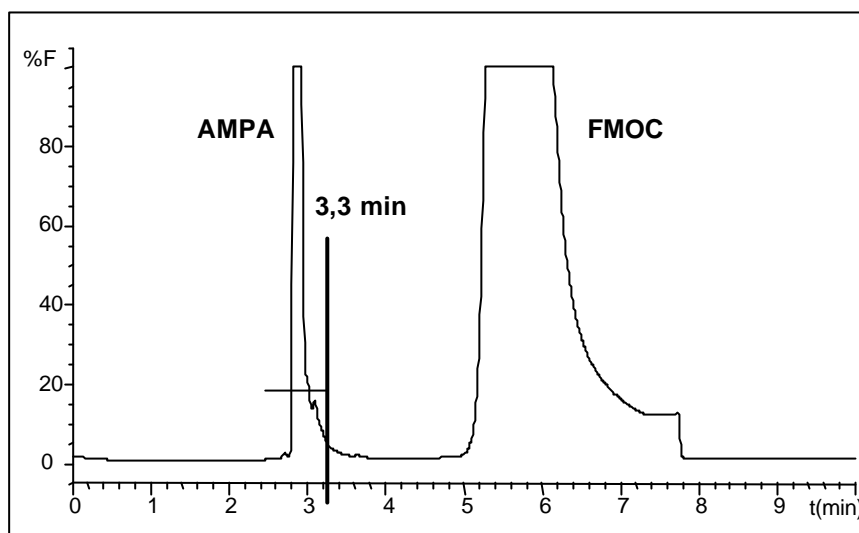


Figura 4.9. Cromatograma enregistrat amb la C-1 connectada al detector de fluorescència per un patró d'AMPA de 5 mg/l derivatitzat amb FMOc. Condicions: columna C₁₈ (3x0,46 cm, 10 mm); fase mòbil KH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,5): CH₃CN (65:35 v/v); V injecció = 2 ml; detecció I_{exc} = 263 nm i I_{em} = 317 nm; cabal 1 ml/min.

El temps de transferència serà el temps que la C-1 ha d'estar connectada a la C-2 perquè passi tota la fracció que conté els anàlits (glifosat i AMPA).

A partir de la **Figura 4.9** es determina quin és el temps que tarda a passar per la C-1 l'anàlit més retingut, que en aquest cas és l'AMPA. Aquest temps és de 3,3 min. Per tant, el temps de transferència serà:

$$3,3 \text{ min} - 2,4 \text{ min} = \mathbf{0,9 \text{ min.}}$$

És interessant ajustar al màxim possible el temps de purificació i el de transferència per així aconseguir que bàsicament passi només a la columna C-2 la fracció que conté els anàlits. Així, la primera columna C-1 té una gran utilitat com a purificació i, a més, s'allarga el temps de vida de la columna C-2, que és menys robusta.

En el cas del glifosat i l'AMPA, i a diferència d'altres anàlits menys polars, la purificació real es produeix a partir dels 3,3 minuts, ja que la major part dels interferents

queden més retinguts que els anàlits a la C-1 a causa de la major polaritat d'aquests darrers, que provoca la seva baixa afinitat per la columna C₁₈.

Els temps de purificació i de transferència es comproven setmanalment per assegurar que tota la fracció d'anàlits passa a la columna C-2. S'observa que són molt reproduïbles.

Un cop s'han optimitzat les condicions de purificació i transferència es duu a terme l'acoblament de les dues columnes de LC.

4.3.1.2. Condicions de l'acoblament LC-LC

Les condicions de treball utilitzades són les següents:

- C-1: 3 x 0,46 cm i.d., Kromasil 100, 10 µm (tipus C₁₈)
- C-2: 25 x 0,46 cm i.d., Hypersil APS, 5 µm (tipus amino)
- M-1= M-2 = KH₂PO₄ 0,05 M (pH 5,5): CH₃CN (65:35)
- Cabal = 1 ml/min

L'ús de la mateixa fase mòbil per a les dues columnes evita distorsions de la línia base, tal com s'havia determinat en treballs anteriors.

Amb aquestes condicions s'injecta un patró que conté els dos anàlits i es determina la retenció de glifosat i AMPA a la columna C-2, i per tant, el temps total de l'anàlisi. La columna C-2, que és de tipus amino, es degrada fàcilment, cosa que provoca la disminució de la retenció dels anàlits en poc temps.

S'injecten patrons de diferents concentracions i es comprova que realment el temps de purificació i transferència són correctes si es varien lleugerament i es determina si l'àrea obtinguda és la mateixa.

La **Figura 4.10** mostra el cromatograma LC-LC que s'obté per a un patró que conté 1 µg/l de glifosat i AMPA. Els pics addicionals que apareixen són deguts a la reacció de derivatització, ja que també hi són presents si s'injecta un blanc.

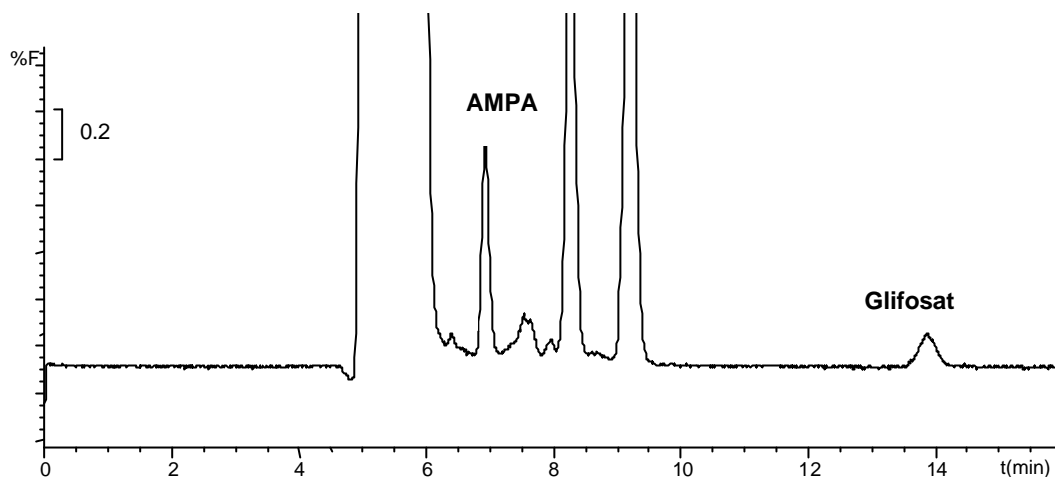


Figura 4.10. Cromatograma LC-LC-FD d'un patró de glifosat i AMPA d'1 mg/l. Purificació: 2,4 min; transferència: 0,9 min.

Condicions: prederivatització amb FMOC; V injecció = 2 ml; fase mòbil KH_2PO_4 0,05 M (pH 5,5); CH_3CN (65:35 v/v); detecció $I_{exc} = 263 \text{ nm}$ i $I_{em} = 317 \text{ nm}$; cabal 1 ml/min.

Com es pot veure a la figura, per a l'AMPA s'obté més intensitat de fluorescència, cosa que indica que el mètode és més sensible per a AMPA que per a glifosat.

Per determinar el límit de detecció (LOD) del mètode (definit com tres vegades el soroll de fons) s'injecten patrons de concentració més baixa. A la **Figura 4.11** es mostra el cromatograma obtingut per a un patró de glifosat de 0,25 µg/l. Aquest és el límit de detecció del glifosat. Per a l'AMPA encara es pot disminuir més.

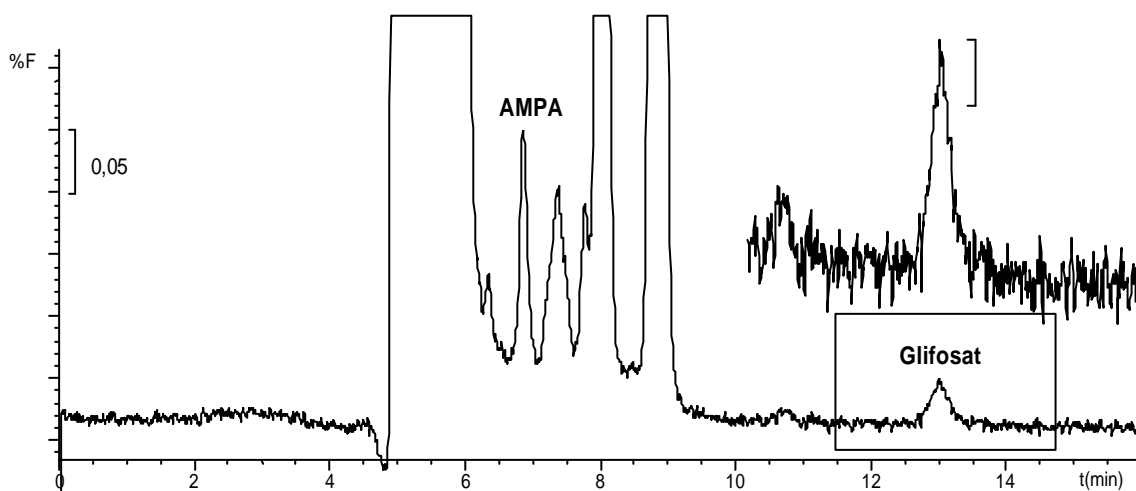


Figura 4.11. Cromatograma LC-LC-FD d'un patró de glifosat i AMPA de 0,25 mg/l. Condicions: prederivatització amb FMOC; V injecció = 2 ml; fase mòbil KH_2PO_4 0,05 M (pH 5,5); CH_3CN (65:35 v/v); detecció $I_{exc} = 263 \text{ nm}$ i $I_{em} = 317 \text{ nm}$; cabal 1 ml/min.

Per disminuir el límit de detecció del glifosat es varien alguns paràmetres del detector, com la freqüència i el guany del tub fotomultiplicador (*PMT gain*).

Pel que fa a la freqüència, les possibilitats que ofereix el detector són: 55, 110 i 220 Hz. En general, com més freqüència millor relació senyal/soroll (S/N), però també disminueix el temps de vida de la làmpada. Per tant, cal arribar a un compromís. La **Figura 4.12** mostra els cromatogrames obtinguts per al glifosat per un patró de 0,25 µg/l a diferents freqüències.

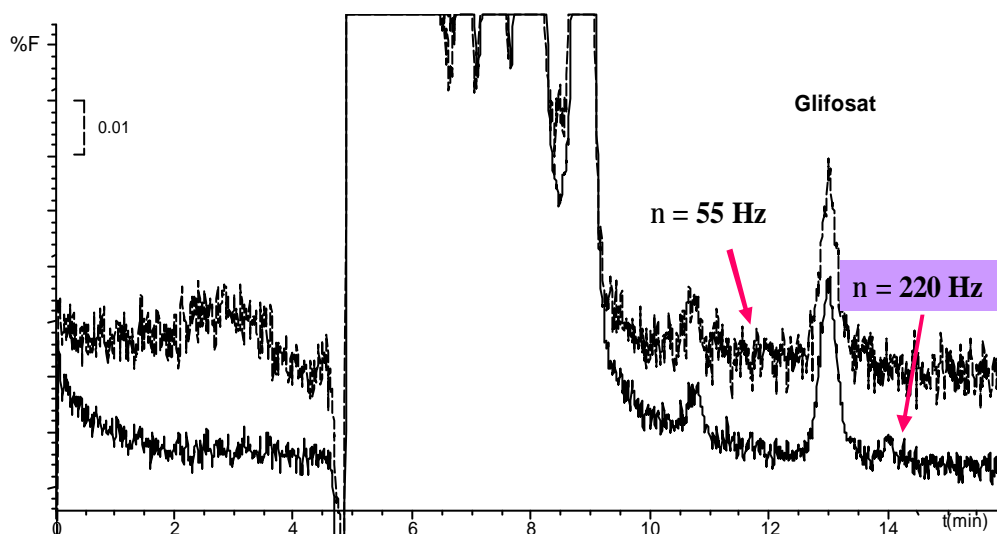


Figura 4.12. Cromatograma LC-LC-FD d'un patró de 0,25 µg/l de glifosat a freqüències de 55 i 220 Hz del detector.

Com que l'objectiu és abaixar el límit de detecció al màxim possible, es fixa com a freqüència 220 Hz, ja que millora molt la relació S/N.

Pel que fa al guany de PMT, cal indicar que, en augmentar-lo (implica un augment de voltatge), augmenta el senyal, però també el soroll; per tant, caldrà arribar a un compromís. A la **Figura 4.13** es veu el cromatograma corresponent a un patró de 0,25 µg/l, amb una freqüència de 220 Hz i diferents valors de guany de PMT (*PMT gain*).

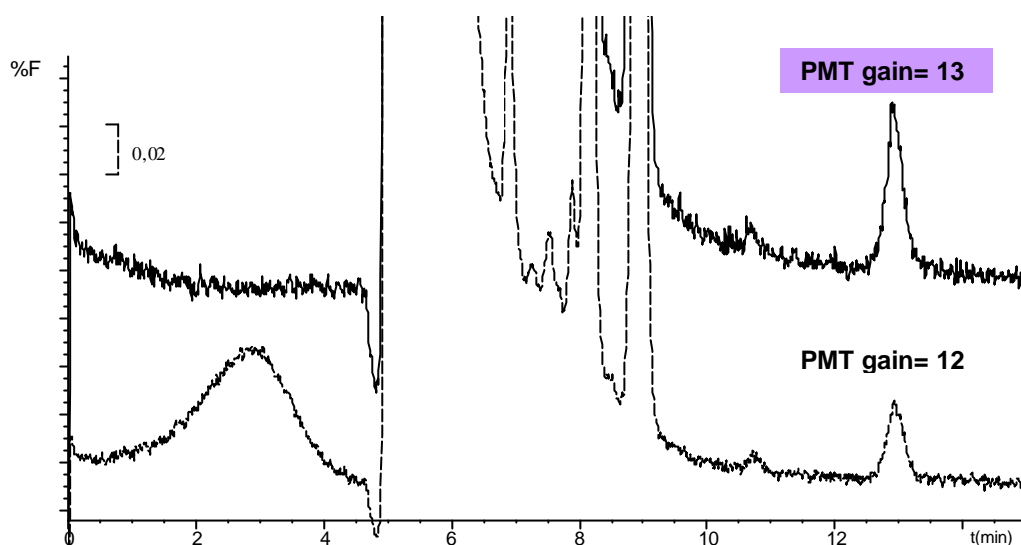


Figura 4.13. Cromatograma LC-LC-FD d'un patró de glifosat de 0,25 $\mu\text{g/l}$ amb PMT gain de 12 i 13.

Es decideix treballar amb *PMT gain* 13 perquè, tot i haver augmentat el soroll de fons, la relació S/N s'ha millorat.

Per obtenir límits de detecció encara més baixos, es modifica lleugerament el mètode de derivatització. L'objectiu és diluir menys la mostra aquosa. Es prenen 1,5 ml de mostra i se li afegixen 0,5 ml de tampó borat 0,05 M (pH 9) i 0,5 ml de FMOC 2000 mg/l en acetonitril. Com que s'ha augmentat la quantitat de mostra en 0,5 ml, per compensar-ho es duplica la concentració de tampó borat i la de FMOC. Com que la quantitat d'acetonitril (provinent de la dissolució de FMOC) ara només és d'un 20 %, només caldrà diluir la mostra quatre vegades en comptes de vuit per tenir un 5 % d'acetonitril, i per tant caldrà afegir 7,5 ml de tampó borat 0,025 M, en comptes de 17,5 ml.

Les característiques del mètode de derivatització original i del mètode millorat es resumeixen a la **Figura 4.14**.

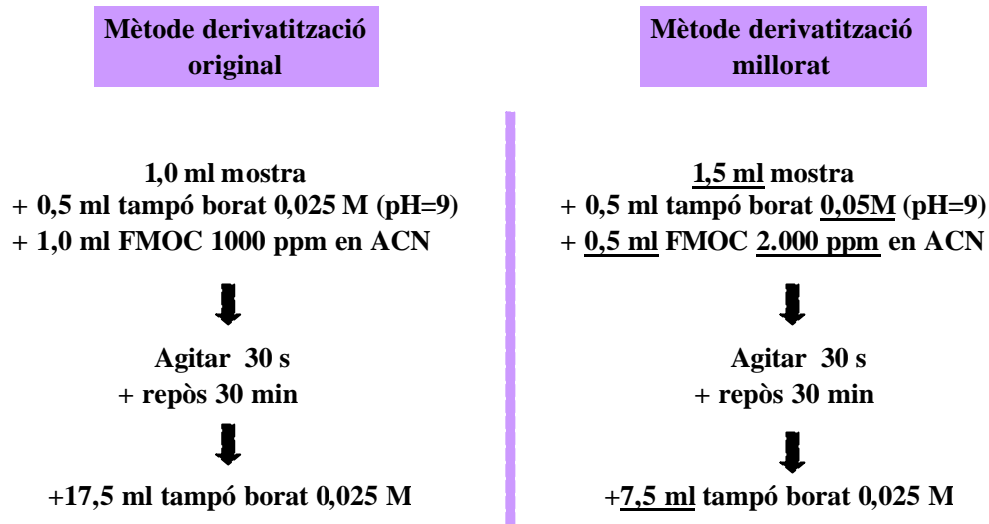


Figura 4.14. Comparació de les característiques dels mètodes de derivatització original i modificat.

L'augment de sensibilitat aconseguit es mostra al cromatograma de la **Figura 4.15**, corresponent a un patró de 0,25 µg/l.

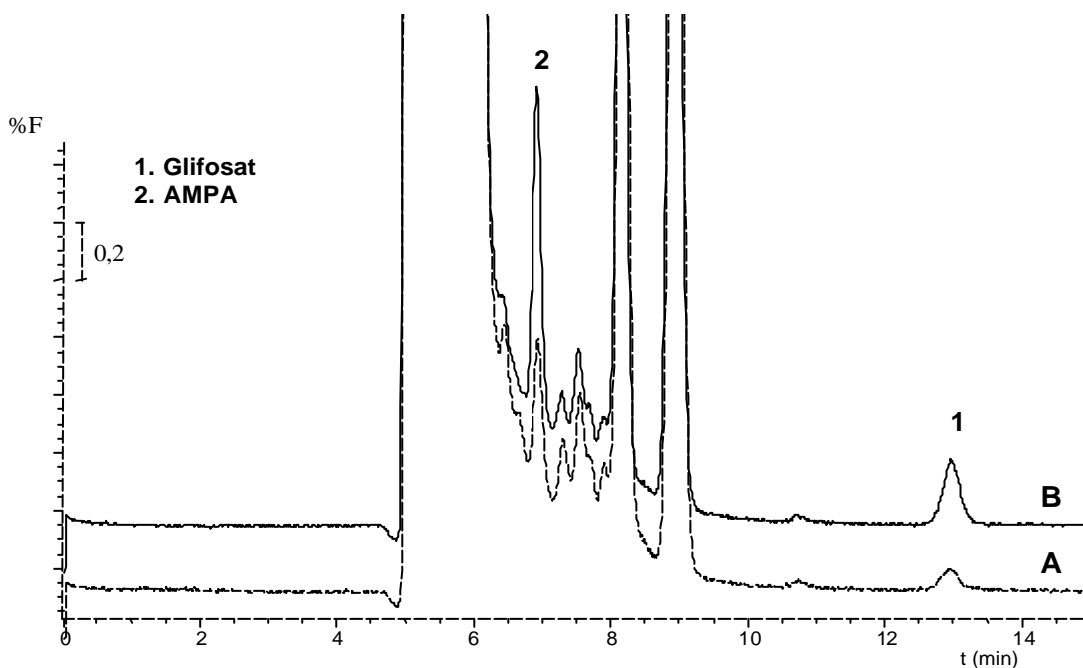


Figura 4.15. Cromatograma LC-LC-FD corresponent a un patró de 0,25 µg/l derivatitzat mitjançant el procediment de Sancho et al. [34] (A) i el procediment optimitzat (B).

Amb totes les condicions millorades s'injecta un patró de 0,1 µg/l i es comprova que el mètode sí que és adequat per treballar a aquest nivell de concentració (vegeu la **Figura 4.16**).

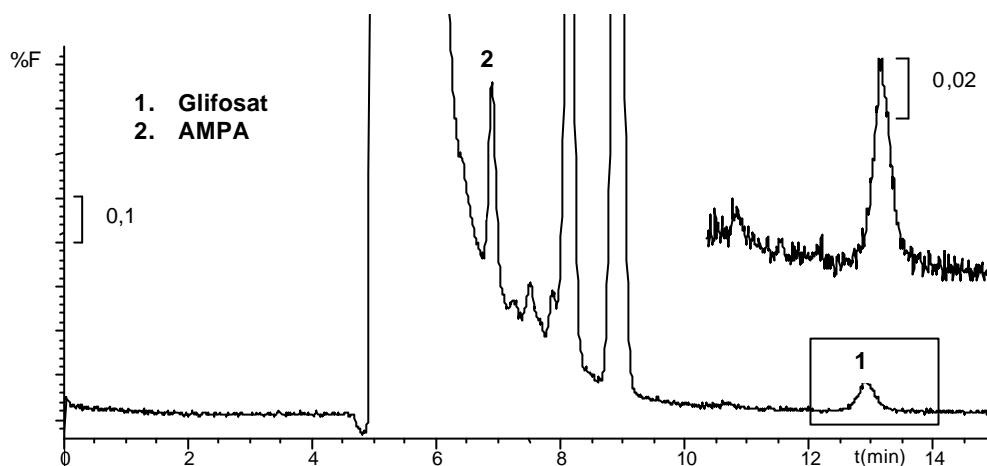


Figura 4.16. Cromatograma LC-LC-FD per a un patró de glifosat i AMPA de 0,1 µg/l derivatitzat amb el mètode millorat i amb freqüència de 220 Hz i PMT gain de 13.

4.3.1.3. Característiques analítiques

S'estudien les característiques analítiques del procediment respecte linealitat i reproductibilitat.

Recta de calibratge

S'estableix la linealitat del mètode en el rang de treball. S'injecten per duplicat sis patrons de concentracions entre 0,1 a 10 µg/l. Les rectes de regressió juntament amb els coeficients de regressió es mostren a la **Figura 4.17**.

Com es pot veure a partir de les rectes, el mètode és més sensible per a AMPA que per a glifosat, i per a tots dos anàlits és lineal per aquestes concentracions.

Resposta

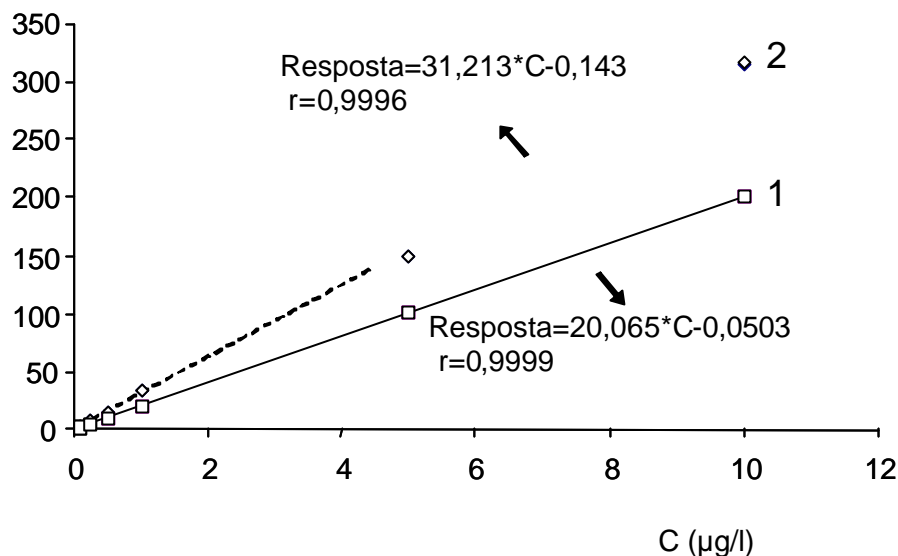


Figura 4.17. Rectes de regressió per a glifosat (1) i AMPA (2)

Reproductibilitat

Per establir la reproductibilitat del mètode s'injecta un mateix patró set dies diferents. En aquest cas s'han injectat patrons de 0,1 i 0,5 ppb de glifosat i AMPA. Els resultats obtinguts (àrees mitjanes i coeficients de variació -CV-) es mostren a la **Taula 4.3**.

Taula 4.3. Reproductibilitat del mètode optimitzat per a la injecció de patrons (n=7) de glifosat i AMPA.

Anàlit	0,1 ppb		0,5 ppb	
	Àrea mitjana	CV (%)	Àrea mitjana	CV (%)
Glifosat	2	3	8	2
AMPA	3	6	15	2

Un cop determinades les característiques del mètode, es comprova si és adequat per a l'anàlisi de l'herbicida i del seu metabòlit en aigües naturals. Es valida el mètode a partir de la fortificació amb glifosat i AMPA d'aigües naturals de diferents característiques.

4.3.1.4. Aplicació a l'anàlisi d'aigües naturals fortificades

Les aigües naturals fortificades provenen de diferents zones del País Valencià (Espanya) (vegeu la **Taula 4.4**).

Taula 4.4. *Característiques de les aigües naturals fortificades.*

Codi del laboratori	Tipus de mostra	Origen
1	Subterrània	Província de Castelló
2	Potable	Aigua comercial (<i>El Portell</i>)
3	Superficial	Embassament de M. Cristina (Castelló)
4	Superficial	Estany d'Almenara (Castelló)
5	Superficial	Albufera de València

Aquestes aigües es fortifiquen a diferents nivells de concentració per comprovar que el mètode funciona per a un rang ampli de concentracions.

Es fortifiquen a nivell de 0,1 µg/l l'aigua potable, la subterrània i també una de les superficials (la de M. Cristina), ja que és el límit establert per la normativa europea per a aigües destinades al consum humà. S'analitzen les aigües sense fortificar (blancs) i després s'injecten les mostres fortificades. Per determinar les recuperacions obtingudes es comparen les àrees dels pics que s'obtenen amb les àrees dels pics d'un patró de la mateixa concentració. Els resultats es mostren a la **Taula 4.5**. Com es pot veure, s'obtenen resultats satisfactoris que inclouen recuperacions que oscil·len entre el 86 % i el 110 % i desviacions estàndards relatives (RSD) no superiors a un 7 %.

A la **Figura 4.18** es mostren els cromatogrames obtinguts per a les diferents aigües fortificades amb 0,1 µg/l i els seus respectius blancs (aigües naturals sense fortificar).

Com que les recuperacions són satisfactòries, la precisió és inferior al 10 % i a més, aquest nivell de concentració s'inclou a la recta de calibratge, es pot considerar per tant que 0,1 µg/l és el nivell de quantificació del mètode millorat.

Taula 4.5. Recuperacions i desviació estàndard relativa (RSD) obtingudes per a diferents aigües naturals fortificades amb 0,1 mg/l. Codi mostra: X- codi del laboratori indicat a la Taula 4.4; Y- número de la rèplica.

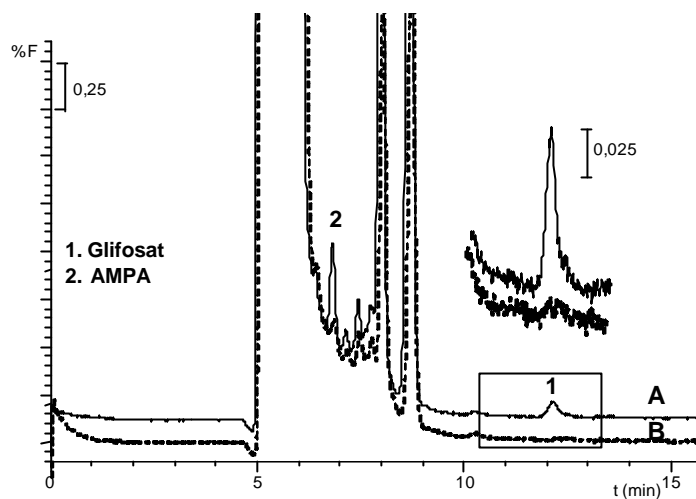
Codi mostra (X-Y)	Glifosat (%)	AMPA (%)
1-1	101	109
1-2	94	102
1-3	87	100
2-1	99	103
2-2	101	100
2-3	100	97
2-4	96	104
2-5	94	99
2-6	92	104
3-1	86	106
3-2	86	110
3-3	88	105
3-4	87	104
Mitjana (%)	93	103
RSD (%)	7	4

També es fortifiquen les aigües amb 1 i 10 µg/l. Per a aquest darrer nivell només es fortifiquen les aigües superficials, que són les més problemàtiques perquè contenen un nombre més alt d'interferents. Aquests podrien afectar de manera negativa la reacció de derivatització o interferir en l'anàlisi per LC-LC. Els resultats es mostren a la **Taula 4.6**.

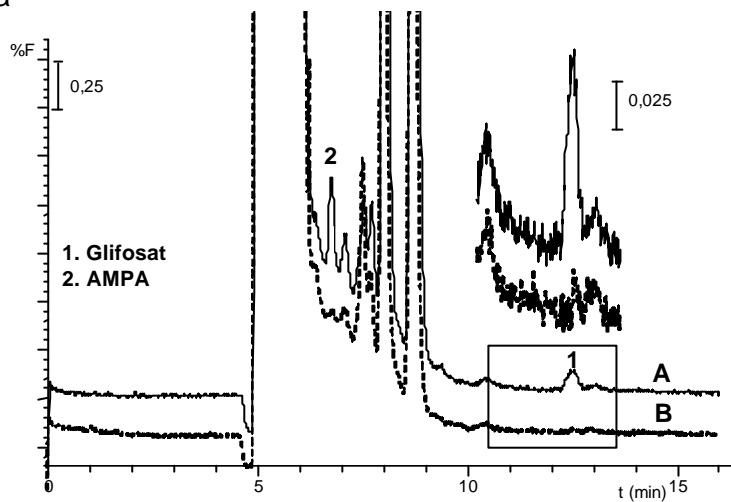
Taula 4.6. Recuperacions i desviació estàndard relativa (RSD) obtingudes per a diferents aigües naturals fortificades amb 1 i 10 mg/l. Codi mostra: X- codi del laboratori indicat a la Taula 4.4; Y- número de la rèplica.

1 mg/l			10 mg/l		
Codi mostra (X-Y)	Glifosat (%)	AMPA (%)	Codi mostra (X-Y)	Glifosat (%)	AMPA (%)
1-1	101	102	3-1	101	106
1-2	100	100	3-2	100	109
1-3	101	101	3-3	97	98
2-1	99	97	3-4	94	94
2-2	98	97	4-1	99	101
2-3	98	96	4-2	97	102
3-1	104	98	5-1	92	97
3-2	100	100	5-2	95	99
4-1	100	100	5-3	96	109
4-2	101	96	Mitjana (%)	97	102
5-1	98	101	RSD (%)	3	5
5-2	96	103			
Mitjana (%)	100	99			
RSD (%)	2	2			

Aigua potable



Aigua subterrània



Aigua superficial

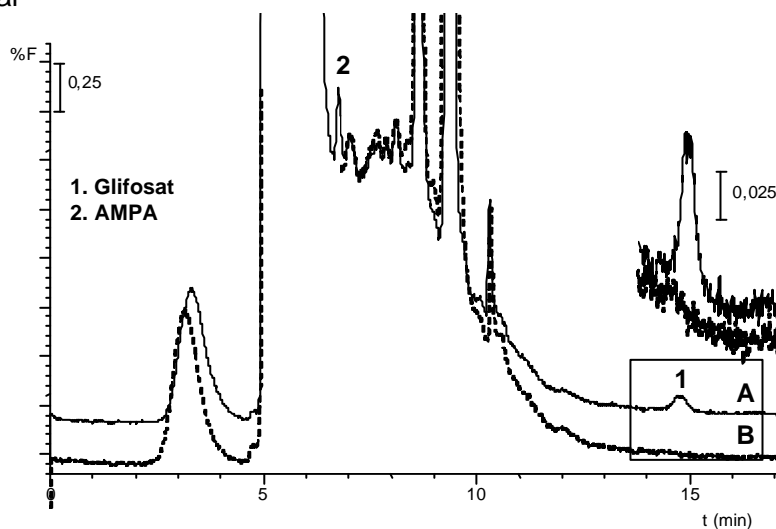


Figura 4.18. Cromatogrames LC-LC-FD corresponents a les aigües naturals fortificades amb 0,1 mg/l de glifosat i AMPA(A), juntament amb els blancs (B).

Igual que per al nivell de 0,1 µg/l, les recuperacions obtingudes i les desviacions estàndard relatives són molt acceptables, ja que oscil·len entre el 92 % i el 109 % i són inferiors a un 5 %, respectivament.

En alguna de les mostres d'aigua s'ha detectat la presència d'algun interferent que dona un pic encavalcat amb el glifosat o molt proper, sobretot en perdre eficiència la columna C-2. Aquest interferent es pot separar a partir d'una lleugera modificació del pH del tampó de la fase mòbil, variant-lo de 5,5 a 5,2. Amb aquesta variació el glifosat queda més retingut a la columna amino (C-2), i en canvi l'interferent s'elueix abans, de manera que se'n produeix la separació i per tant, la millora del cromatograma, tal com es pot veure a la **Figura 4.19**.

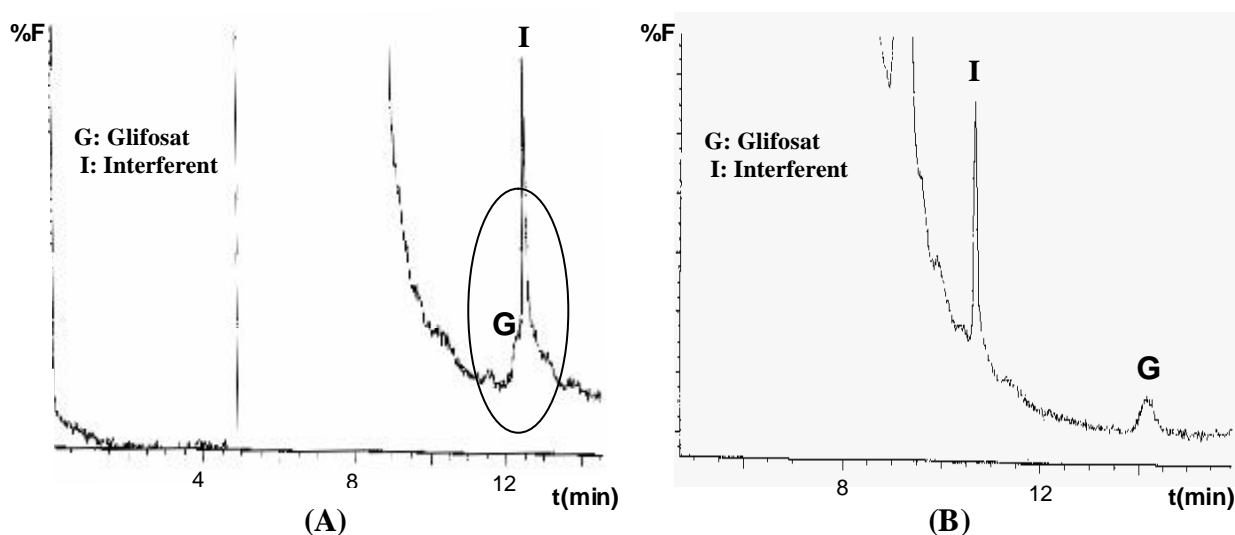


Figura 4.19. Cromatogrames LC-LC-FD d'una mostra d'aigua superficial fortificada amb 0,1 ppb de glifosat: (A) amb tampó de la fase mòbil a pH 5,5 (B) amb tampó de la fase mòbil a pH 5,2.

El mètode també s'ha aplicat per a una aigua superficial de la zona coneguda com el Clot de la Mare de Déu (Burriana, Castelló), on s'aplica sovint glifosat als arbres fruiters de la zona.

En aquesta mostra s'ha trobat glifosat i AMPA en fer l'anàlisi directa amb el mètode LC-LC-FD proposat. Les concentracions obtingudes són de 7,5 i 1 ppb, respectivament,

amb RSD de l'1 % i 3 % (per a tres rèpliques). A la **Figura 4.20** es mostra el cromatograma obtingut per a una de les rèpliques.

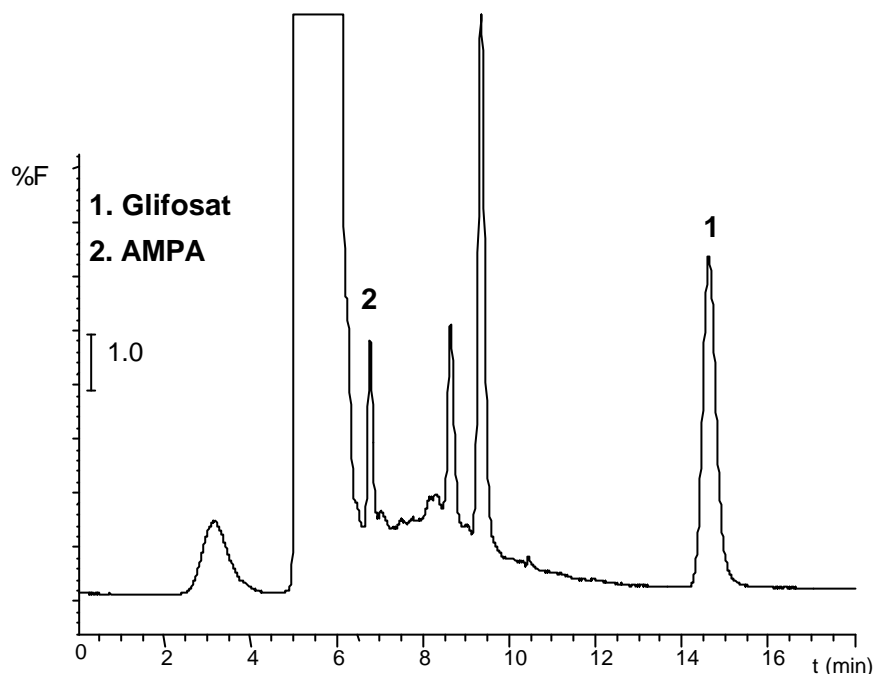


Figura 4.20. Cromatograma LC-LC-FD corresponent a l'aigua superficial del Clot de la Mare de Déu.

A partir d'aquests resultats es pot concloure que s'ha desenvolupat un mètode vàlid per determinar glifosat i AMPA a concentracions de 0,1 ppb en aigües naturals. A més, el mètode proporciona una selectivitat elevada gràcies a l'acoblament LC-LC, ja que amb la primera columna s'eliminen part dels interferents presents a les mostres.

Per disminuir els límits de detecció fins a concentracions inferiors a 0,1 ppb, es proposa aplicar una tècnica de preconcentració abans de l'anàlisi mitjançant LC-LC-FD.

4.3.2. PRECONCENTRACIÓ

Com que tant el glifosat com l'AMPA poden ser presents en forma aniònica en un ampli rang de pH, es proposa utilitzar una resina de bescanvi iònic com a mètode de preconcentració.

En un estudi previ [38] s'havien avaluat dues resines d'intercanvi iònic, una de microporosa Amberlite® IRA-416 i una altra de macroporosa Amberlite® IRA-900, i un cartutx de bescanvi iònic, ISOLUTE-NH₂ en la forma protonada, per aconseguir l'extracció i preconcentració de glifosat i AMPA en aigües naturals.

Es va determinar la influència del cabal, el pH de la mostra, l'eluent, el volum de mostra i la concentració dels anàlits. El glifosat era adsorbit quantitativament en un rang de 0,1-500 ppb, en tots els sorbents provats, mentre que l'AMPA només era adsorbit al 100 % per la resina Amberlite® IRA-900.

Es va determinar que el cabal de treball podia ser elevat (5 ml/min) tant per a la càrrega com per a l'elució, ja que la reacció d'intercanvi és molt ràpida.

Respecte al pH, cal tenir en compte que és necessari tenir els anàlits en forma aniònica perquè es produeixi el bescanvi. Això s'aconsegueix treballant amb pH superiors a 2,5. Es va comprovar que el pH no influïa en l'adsorció si era superior a aquest valor.

L'elució dels anàlits també s'havia optimitzat i s'havia vist que calien 15 ml per aconseguir recuperar els anàlits. Com a eluents s'havien provat dissolucions de citrat sòdic 0,4 M, tampó fosfat 0,4 M, àcid clorhídric 0,1 M i clorur sòdic 0,1 M i 1 M. Els millors eluents van ser els que presentaven clorurs com a anions, ja que s'obtenia una recuperació lleugerament millor amb NaCl 1 M. L'elució es basa en lintercanvi de glifosat i AMPA retinguts a la resina pels clorurs de l'eluent.

La resina que es tria per a aquest treball és Amberlite® IRA-900, ja que en aquest estudi previ amb diferents resines de bescanvi iònic i cartutxos de SPE, va ser la que va proporcionar els millors resultats.

La resina Amberlite® IRA-900 s'asseca a 65 °C fins a pes constant i després es pesen 0,5 g de resina que es col·loquen dins d'una columna de vidre de 14 cm de llargada i 0,5 cm de diàmetre intern. En l'estudi previ s'havia determinat que, com més quantitat de resina, millors resultats s'obtenien, i es treballava amb 1 o 2 grams. En aquest cas, però, cal treballar amb menys quantitat perquè la columna de vidre utilitzada per contenir la resina és de dimensions menors.

Un cop dins de la columna es renta la resina amb aigua de qualitat HPLC. No cal activar-la amb cap reactiu especial, perquè el contraió que té la resina comercial és un clorur i ja és adequat per dur a terme el bescanvi iònic.

Inicialment s'estableixen les condicions de treball fent experiments amb patrons d'1 ppb preparats amb aigua de qualitat HPLC. Com a eluent es fa servir NaCl 1M i es baixa el cabal de càrrega i d'elució fins a 1 ml/min en comptes de 5 ml/min, per afavorir el contacte, ja que es treballa amb menys quantitat de resina. Es comprova que realment el glifosat queda retingut al 100 %; per a l'AMPA com a mínim hi ha un 90 % de retenció. Pel que fa a l'elució amb 10 ml de NaCl 1 M, es recupera un 85 % d'AMPA i un 94 % de glifosat i el tant per cent restant s'elueix amb 5 ml més. Per obtenir recuperacions del 100 % cal eluir amb 15 ml.

Es determina si augmentant la concentració de NaCl fins a 2 M millora la recuperació dels anàlits, ja que l'objectiu és eluir amb el mínim volum possible, però no millora. Per tant, l'eluent que es farà servir serà NaCl 1 M. També es comprova si baixant el cabal d'elució a 0,5 ml/min millora la recuperació amb els primers 10 ml, però no és així; per tant, s'estableix com a cabal 1 ml/min tant per a la càrrega com per a l'elució.

Finalment, es fan diversos experiments amb concentracions inicials de 0,1 i 0,05 ppb i es comprova que el mètode funciona, ja que s'obtenen recuperacions d'entre el 60 % i el 80 % per a AMPA i superiors a un 70 % per al glifosat.

El procediment de treball és el següent:

- Aplicació de la mostra: es passen 50 ml d'aigua fortificada amb glifosat i AMPA.
- Rentat: amb 10 ml d'aigua HPLC.
- Elució: s'elueix amb 15 ml de NaCl 1 M. El cabal és d'1 ml/min en tot el procediment.

Un cop s'ha determinat que la resina és adequada per dur a terme la preconcentració, s'aplica per a mostres d'aigües naturals fortificades a diferents concentracions.

Inicialment es fortifica aigua potable (codi 2 a la Taula 4.4) amb 1 ppb de glifosat i AMPA i es determina la retenció i l'elució dels anàlits. Per al glifosat la retenció és del 100 %, en canvi per a l'AMPA, com ja s'havia observat en experiments anteriors, no hi ha una retenció completa i en general més d'un 50 % no queda retingut. Per tant, es decideix dur a terme els experiments de preconcentració només per a glifosat. Cal indicar que per a AMPA el límit de detecció ja és inferior a 0,1 ppb, i és per al glifosat que és necessari disminuir-lo.

A continuació es passen per la resina mostres d'aigua fortificada amb concentracions inferiors de glifosat i es comprova que eluint amb 10 ml s'obtenen recuperacions superiors a un 85 %. Per tant, es decideix eluir amb 10 ml en comptes de 15 ml, ja que així la preconcentració obtinguda és més gran. El factor de concentració és de cinc vegades.

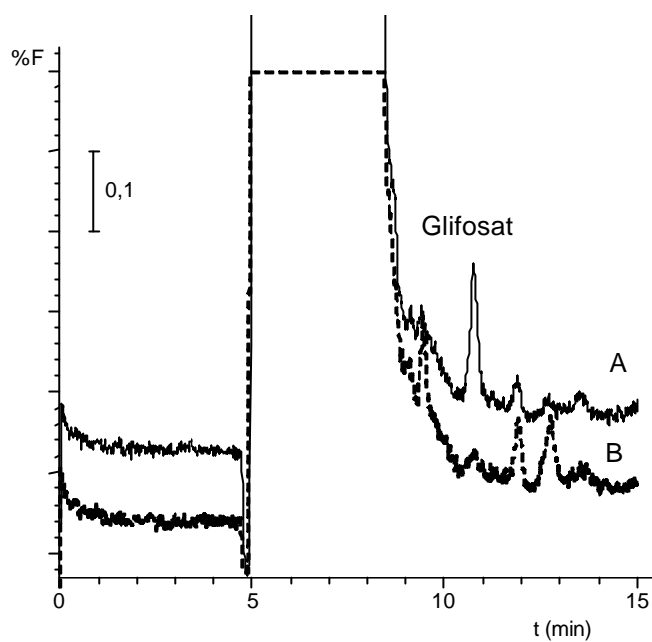
La preconcentració s'aplica per a mostres fortificades amb 0,02 i 0,1 ppb de glifosat i es determinen les recuperacions respectives per comparació amb patrons de les concentracions esperades (0,1 i 0,5 ppb, respectivament, ja que el factor de preconcentració és de 5). També es fortifica una mostra d'aigua subterrània (codi 1) amb les mateixes concentracions, 0,02 i 0,1 ppb. Els resultats obtinguts per a les dues aigües fortificades es mostren a la **Taula 4.7**.

Taula 4.7. *Recuperacions i desviacions estàndard (RSD) obtingudes per al glifosat aplicant la tècnica de preconcentració prèvia a l'anàlisi amb LC-LC-FD. Codi mostra: X- codi del laboratori indicat a la Taula 4.4; Y- número de rèplica.*

codi mostra (X-Y)	Glifosat (%)	
	0,02 µg/l	0,1 µg/l
1-1	98	101
1-2	96	99
1-3	98	92
2-1	110	95
2-2	106	90
2-3	109	99
2-4	96	92
Mitjana (%)	102	95
RSD (%)	6	4

A la **Figura 4.21** es mostren els cromatogrames obtinguts per a l'aigua potable i l'aigua subterrània fortificades amb 0,02 µg/l de glifosat. També s'inclouen els blancs respectius, és a dir, les aigües naturals sense fortificar, que també han estat passades per la resina.

Aigua potable



Aigua subterrània

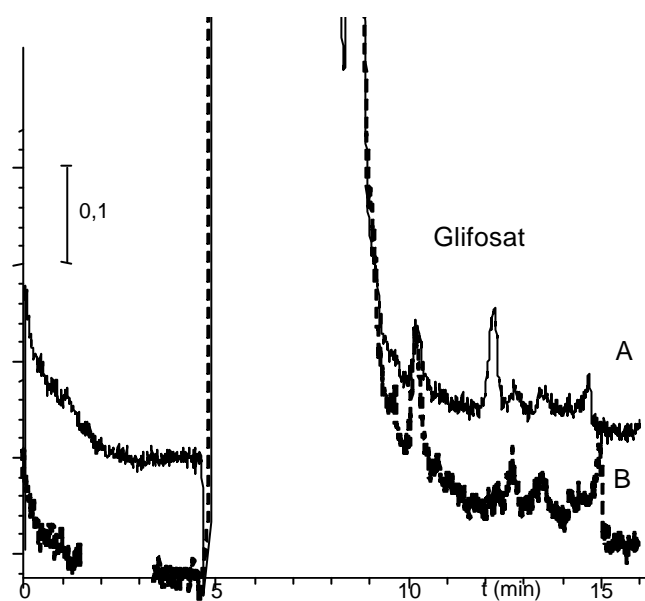


Figura 4.21. Cromatogrames LC-LC-FD corresponents a les mostres d'aigües naturals fortificades amb 0,02 mg/l de glifosat després de la preconcentració amb la resina Amberlite[®] IRA-900 (A) juntament amb els blancs respectius (B).

Per tant, el mètode és vàlid per analitzar mostres que continguin fins a 0,02 ppb de glifosat.

També es fortifica una mostra d'aigua superficial (embassament de M. Cristina) amb 0,1 ppb i es comprova que el mètode de preconcentració és efectiu per a aquesta mostra, que presenta més interferents que l'aigua potable i la subterrània (vegeu la **Figura 4.22**).

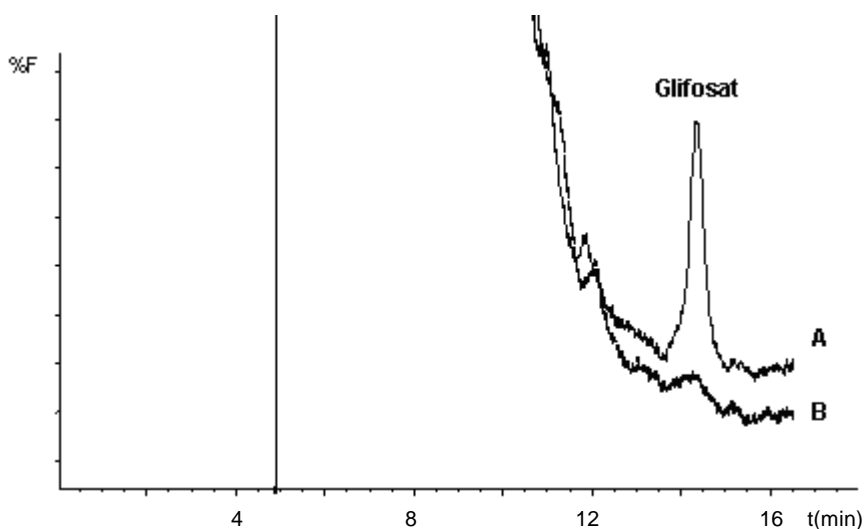


Figura 4.22. Cromatograma LC-LC-FD obtingut per a una mostra d'aigua superficial fortificada amb 0,1 $\mu\text{g/l}$ de glifosat després de la preconcentració amb la resina Amberlite[®] IRA-900 (A) i el blanc respectiu (B).

Per a les aigües superficials no és tan important disposar d'un mètode que permeti assolir nivells tan baixos de determinació, ja que no són aigües que s'utilitzin directament per al consum humà i la normativa europea estableix el límit de 0,1 ppb només per a les aigües de consum humà.

4.4. REFERÈNCIES

1. P. Van Zoonen, E. A. Hogendoorn, G. R. van der Hoff, R. A. Baumann, *Trac-Trends Anal. Chem.*, 11(1) (1992) 11.
2. C. E. Goewie, U. A. Th. Brinkman, R. W. Frei, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 2072.
3. C. E. Goewie, P. Kwakman, R. W. Frei, U. A. TH. Brinkman, W. Maasfeld, T. Seshadri, A. Kettrup, *J. Chromatogr. A*, 284 (1984) 73.
4. E. A. Hogendoorn, C. E. Goewie, *Analytical Methods for Residues of Pesticides in Foodstuffs*, P.A. Greve (ed.), SDU Publishers, l'Haia (Països Baixos) (1988) 158.
5. E. A. Hogendoorn, C. E. Goewie, P. van Zoonen, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 348.
6. T. Andersson, T. Hyötyläinen, M-L. Riekkola, *J. Chromatogr. A*, 896 (2000) 343.
7. T. Hyötyläinen, T. Andersson, M. Jussila, S. K. Wiedmer, M. Rautiainen, M-L. Riekkola, *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 544.
8. P. Appelblad, T. Jonsson, T. Bäckström, K. Irgum, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 5002.
9. E. A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, A. Poletini, G. Marrubini Bouland, M. Montagna, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1362.
10. M. L. Nedved, S. Habibi-Goudarzi, B. Ganem, J. D. Henion, *Anal. Chem.* 68 (1996) 4228.
11. S. Moret, L. Conte, D. Dean, *J. Agric. Food Chem.* 47 (1999) 1367.
12. G. J. Opiteck, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2283.
13. G. J. Opiteck, K. C. Lewis, J. W. Jorgenson, R. J. Anderegg, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1518.
14. E. A. Hogendoorn, P. Van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 703 (1995) 149.
15. E. A. Hogendoorn, R. Hoogerbrugge, R. A. Baumann, H. D. Meiring, A. P. J. M. de Jong, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 754 (1996) 49.
16. C. E. Goewie, E. A. Hogendoorn, *J. Chromatogr.*, 404 (1987) 352.
17. C. E. Goewie, E. A. Hogendoorn, *J. Chromatogr.*, 410 (1987) 211.
18. E. A. Hogendoorn, C. Verschraagen, U. A. Th. Brinkman, P. van Zoonen, *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 205.
19. O. Nováková, *Chromatographia*, 39 (1994) 62.
20. J. V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 761 (1997) 322.
21. K. A. Bean, J. D. Henion, *J. Chromatogr. A*, 791 (1997) 119.
22. E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, B. Baumann, C. Hidalgo, J.V. Sancho, F. Hernandez, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1111.
23. E. Dijkman, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, E. Hogendoorn, J.V. Sancho, O. Pozo, F. Hernández, *J. Chromatogr. A*, 926 (2001) 113.

24. E. A. Hogendoorn, R. Huls, E. Dijkman, R. Hoogerbrugge, *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 23.
25. C. Hidalgo, J. V. Sancho, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta*, 338 (1997) 223.
26. F. Hernández, C. Hidalgo, J. V. Sancho, F. J. López, *J. Chromatogr. A*, 778 (1997) 171.
27. J. Martínez Fernández, J. L. Martínez Vidal, P. Parrilla Vázquez, A. Garrido Frenich, *Chromatographia*, 53 (2001) 503.
28. P. Parrilla Vázquez, J. Martínez Fernández, M. D. Gil García, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 25 (19) (2002) 3045.
29. E. van der Heeft, E. Dijkman, R. A. Baumann, E. A. Hogendoorn, *J. Chromatogr. A*, 879 (2000) 39.
30. J. L. Martínez Vidal, P. Parrilla Vázquez, J. Martínez Fernández, *Chromatographia*, 51 (2000) 187.
31. J. V. Sancho, O. J. Pozo, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14 (2000) 1485.
32. J. V. Sancho, O. J. Pozo, F. J. López, F. Hernández, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 639.
33. J. V. Sancho, F. J. Lopez, F. Hernandez, E. A. Hogendoorn, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 678 (1994) 59.
34. J. V. Sancho, F. Hernández, F. J. López, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, P. van Zoonen, *J. Chromatogr. A*, 737 (1996) 75.
35. J. V. Sancho, C. Hidalgo, F. Hernandez, F. J. Lopez, E. A. Hogendoorn, E. Dijkman, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 62 (1996) 53.
36. E. A. Hogendoorn, F. M. Ossendrijver, E. Dijkman, R. A. Baumann, *J. Chromatogr. A*, 833 (1999) 67.
37. F. Hernández, C. Hidalgo, J. V. Sancho, *J. AOAC Int.* 83 (3) (2000) 728.
38. M. Corbera, "Estudi de l'extracció i preconcentració de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit AMPA amb fases sòlides bescanviadores d'anions", *Treball de Recerca, Universitat de Girona* (2002).
39. C. F. Poole, *Trac-Trends Anal. Chem.* 22(6) (2003) 362.
40. http://www.sigmaaldrich.com/aldrich/brochure/al_pp_ionx.pdf. (Consultada el 24/10/03).
41. <http://www.cwg.hu/english/r-wtcomp.html#gyanta>. (Consultada el 24/10/03).
42. E. Mallat, D. Barceló, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 129.
43. M. P. Abdullah, J. Daud, K. S. Hong, C. H. Yew, *J. Chromatogr. A* 687 (1995) 363.
44. Y. Y. Wigfield, M. Lanouette, *J. AOAC Int.* 74 (5) (1991) 842.
45. M. J. Lovdahl, D. J. Pietrzyk, *J. Chromatogr. A* 602 (1992) 197.
46. S. K. Konar, D. N. Roy, *Anal. Chim. Acta*, 229 (1990) 277.

DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS

Els mètodes analítics que actualment s'utilitzen per a la determinació directa de l'herbicida glifosat i el seu metabòlit AMPA en mostres ambientals no posseeixen, en general, la sensibilitat requerida per la legislació vigent. Serà necessari, per tant, introduir etapes de preconcentració i purificació prèvies a la determinació cromatogràfica. Moltes de les tècniques emprades per a l'extracció i enriquiment d'altres plaguicides a partir de mostres aquoses no són aplicables per a glifosat i AMPA, a causa de l'elevada polaritat i solubilitat en aigua d'aquests compostos. Per aquest motiu en aquesta memòria s'han avaluat diverses alternatives amb l'objectiu d'assolir la preconcentració i purificació de glifosat i AMPA. S'han assajat tècniques diferents i amb aplicabilitat en camps ben diversos, com la tècnica de membrana líquida suportada (capítol 2), l'extracció en fase sòlida amb una resina de bescanvi iònic (capítol 4) o amb una resina quelant amb un metall immobilitzat (capítol 3) i l'acoblament de dues columnes de cromatografia líquida, acoblament LC-LC (capítol 4). En tots els casos la determinació final de glifosat i AMPA es basa en la derivatització amb clorur de tosil o amb el reactiu fluorescent FMOC i l'anàlisi per cromatografia líquida amb detector ultraviolat-visible i fluorescència, respectivament.

En les dues primeres tècniques esmentades el mecanisme d'extracció de glifosat i AMPA de mostres aquoses es fonamenta en el bescanvi iònic. Les propietats àcid-base dels anàlits, que comporten que aquests presentin càrregues diferents en funció del pH, va fer pensar en la possibilitat d'utilitzar metodologies basades en aquest mecanisme caracteritzat per la seva simplicitat, però que presenta com a inconvenient la manca de selectivitat.

El transport de glifosat i AMPA a través de la membrana líquida suportada (SLM) s'aconsegueix gràcies a la presència d'un transportador a la fase membrana que facilita el pas dels anàlits a través d'aquesta, ja que la hidrofilitat d'aquests compostos dificulta la seva solubilització a la fase membrana. Entre els diferents transportadors assajats, ha estat el més eficient un bescanviador aniònic comercial, l'Aliquat 336. Es tracta d'una amina quaternària que presenta com a contraió un ió clorur que pot ser bescanviat per un altre anió. En el cas de la resina de bescanvi iònic, s'ha utilitzat l'Amberlite® IRA-900 que conté un grup funcional molt similar al transportador emprat en el sistema de membrana líquida i per tant actua segons el mateix mecanisme.

El sistema de membrana líquida suportada es caracteritza perquè en una sola etapa s'aconsegueix l'extracció i recuperació dels anàlits; en canvi amb la resina de bescanvi iònic les etapes d'extracció i d'elució es produeixen de manera seqüencial. En el primer sistema cal que la mostra estigui a pH elevat i per això s'ajusta el seu pH amb hidròxid sòdic; en canvi amb la resina el pH no és tan crític i es treballa directament amb les aigües naturals. Pel que fa a la recuperació dels anàlits, en el sistema de SLM es fa servir una solució d'àcid clorhídric 0,1 M o clorur sòdic 0,5 M per aconseguir la retroextracció de glifosat i AMPA i amb la resina la solució d'elució emprada és NaCl 1 M, però també es pot eluir amb HCl, tot i que implica ajustar el pH abans de la derivatització de les mostres.

Utilitzant SLM en configuració de fibra buida, s'obtenen recuperacions de glifosat properes al 100 %; en canvi, per a l'AMPA són molt inferiors després d'operar el mòdul durant 24 hores recirculant tant la solució de càrrega com la de retroextracció. El pas crític es troba en l'extracció de l'AMPA, no en la retroextracció. Amb la resina de bescanvi iònic s'observa el mateix problema, per al glifosat l'extracció és quantitativa (100 %) i en canvi l'AMPA no hi queda completament retingut. En canvi l'elució és efectiva per tots dos anàlits. Això s'explica per la baixa selectivitat del bescanvi iònic ja que l'AMPA presenta un caràcter més hidrofílic i una mida més reduïda de la molècula que el glifosat i aquests factors provoquen que es vegi més afectat per la competència d'altres compostos aniònics presents a la mostra.

Un altre aspecte a destacar són els factors de concentració obtinguts i el temps necessari per dur a terme la preconcentració. Amb SLM, amb mostres naturals d'aigua fortificades amb 1 µg/l dels anàlits s'obtenen factors de concentració de 25 i 3 per a glifosat i AMPA, respectivament, amb 100 ml de solució de càrrega i 4 ml de solució receptora, després de 24 hores d'operació. Els factors d'enriquiment per a glifosat i AMPA disminueixen a 12 i 2,5 si el temps és de 5 hores. Aquests factors de concentració es podrien incrementar de manera considerable ja que aquest tipus de mòdul permet la variació dels volums de la solució de càrrega i de la receptora. En canvi quan s'utilitza la resina de bescanvi, el factor de concentració és de 5 perquè es treballa amb 50 ml de mostra i s'elueix amb 10 ml. Aquest factor es podria augmentar incrementant el volum de la mostra processada, però també implicaria un augment del temps, que en aquestes condicions és d'una hora. L'inconvenient és que el volum d'elució no es pot reduir perquè si no també disminueix la recuperació.

En conclusió, en el cas de la preconcentració de glifosat s'ha assolit de forma satisfactòria amb les dues metodologies; en canvi, en el cas de l'AMPA els resultats han estat menys favorables a causa de la baixa selectivitat del mecanisme de bescanvi iònic degut a què el metabòlit és una molècula més petita i més hidrofílica.

Per millorar aquests resultats s'assaja una tècnica que es caracteritza per una major selectivitat: la cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC). Aquesta metodologia ha estat àmpliament aplicada per a la separació de biomolècules com aminoàcids, pèptids i proteïnes gràcies a la interacció d'aquestes amb el metall immobilitzat en una resina quelant. S'han immobilitzat metalls ben diversos a diferents suports quelants, però en aquest estudi només s'ha treballat amb suports que tenen matriu polimèrica (resines Spheron) o de cel·lulosa (resina Iontosorb Oxin) amb grups funcionals 8-hidroxiquinoleïna i tiol immobilitzant-hi coure i pal·ladi, metalls que ja havien estat estudiats anteriorment al nostre grup de recerca. S'ha comprovat que la fortalesa del complex entre el metall i el grup funcional de la resina influeix de manera important en la seva aplicació per preconcentrar glifosat i AMPA, obtenint-se millors resultats amb pal·ladi que amb coure, i sobretot en el cas que aquest estigui immobilitzat a través d'un grup tiol, ja que la interacció Pd-tiol és més forta i per tant les dues posicions de coordinació amb els anàlits presenten un caràcter més làbil i és més fàcil recuperar-los.

A l'igual que amb la resina de bescanvi iònic, en el procés IMAC les etapes d'extracció i d'elució dels anàlits són seqüencials. A més, cal una etapa prèvia per immobilitzar el metall a la resina que consisteix en deixar en contacte la resina amb la dissolució de metall durant 12 hores, però aquesta es pot reutilitzar diverses vegades després d'un procés de rentat en el qual s'eliminen els residus existents dels anàlits i es condiciona la resina amb àcid clorhídric. Per tant, un cop carregada la resina amb el metall, el temps necessari per dur a terme la preconcentració és només lleugerament superior amb IMAC que amb la resina de bescanvi iònic. L'altre inconvenient que presenta és el cost addicional que representa el pal·ladi encara que és poc significatiu i és redueix en part gràcies a la reutilització de la resina.

Però l'avantatge important de la tècnica IMAC és que permet l'extracció i concentració dels dos anàlits, glifosat i AMPA, gràcies a què es fa ús d'un mecanisme més selectiu que el bescanvi iònic, ja que es basa en la interacció dels anàlits amb el metall. L'extracció dels dos anàlits és del 100 % amb les tres resines assajades i només s'observen diferències pel que fa a l'elució de l'AMPA, obtenint-se els millors resultats amb la resina

Spheron Thiol 1000, on el pal·ladi està immobilitzat a través del grup tiol d'aquesta amb una interacció més forta que en el cas del grup funcional 8-hidroxiquinoleïna.

En el mètode IMAC, per aconseguir l'elució dels anàlits cal la seva protonació, a més de la presència d'ions clorur; l'eluent més efectiu és una solució formada per HCl 0,1 M i NaCl 1 M, ja que si l'eluent és simplement NaCl no es recuperen els anàlits. En canvi, en els mètodes de bescanvi iònic avaluats, membrana líquida suportada i resina de bescanvi, el mecanisme d'elució depèn del bescanvi dels anàlits per ions clorur i no cal la seva protonació; la solució d'elució més efectiva és NaCl 0,5 o 1 M, respectivament, com ja s'ha comentat.

El factor de concentració obtingut amb IMAC és limitat perquè a l'igual que amb la resina de bescanvi iònic, el volum d'elució és elevat (15 ml en aquest cas). Per disminuir-lo caldria reduir la quantitat de resina utilitzada, però probablement implicaria una menor retenció dels anàlits. En aquest cas, com que es treballa amb 50 ml de mostra, el factor de concentració és de 3,3.

Finalment, s'ha utilitzat una tècnica que implica una instrumentació més complexa, l'acoblament LC-LC. El fet de treballar amb dues columnes de cromatografia líquida acoblades implica l'ús de dues bombes d'HPLC i és necessària una interfase per connectar les dues columnes que en aquest cas és simplement una vàlvula de sis vies. Però, com a avantatge cal destacar que la purificació, preconcentració i determinació es produeixen en línia (*on-line*) en una mateixa etapa de 15-20 minuts de durada i per tant hi ha un pretractament mínim de la mostra. L'acoblament LC-LC ens ha permès detectar i quantificar els anàlits directament a concentracions de 0,1 ppb i 0,05 ppb per a glifosat i AMPA, respectivament. La sensibilitat d'aquesta tècnica és elevada gràcies a la injecció de volums grans (2 ml). Una característica important és que proporciona elevada selectivitat, ja que a la primera columna (C-1) es produeix una primera separació dels anàlits dels interferents i bàsicament es transfereix a la segona columna (C-2) la fracció que conté els anàlits. L'inconvenient d'aquesta tècnica és, com ja s'ha esmentat, que cal una major inversió en equipament instrumental i cal també una major formació i experiència per posar a punt el mètode ja que cal optimitzar més paràmetres que en un sistema LC convencional.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Els resultats obtinguts en els estudis que es recullen en aquesta memòria permeten extreure les conclusions següents:

Primera: s'ha aconseguit el transport de glifosat d'una fase de càrrega aquosa de pH > 11 (ajustat amb NaOH) fins a una fase receptora de pH àcid (HCl 0,1 M), a través d'una membrana líquida suportada que consisteix en una dissolució d'un bescanviador d'anions comercial, Aliquat 336, dissolt en dodecà modificat amb un 4 % de dodecanol. La major hidrofilitat de l'AMPA respecte al glifosat fa que el seu transport sigui menor i que estigui més afectat per la presència d'altres anions a la dissolució de càrrega que competeixen per les molècules del transportador.

Segona: la preconcentració dels anàlits és possible amb les dues configuracions avaluades: el sistema de membrana laminar on recircula la dissolució receptora i el mòdul de fibra buida. Els millors resultats s'han obtingut amb aquesta darrera configuració quan la fase de càrrega conté glifosat i AMPA a pH > 11 i la dissolució receptora és una dissolució de NaCl 0,5 M. Els factors de concentració emprant aigua natural fortificada amb 1 µg/l dels anàlits han estat de 25 i 3 per al glifosat i AMPA, respectivament, després de 24 hores d'operació del mòdul recirculant 100 ml de la solució de càrrega i 4 ml de la solució de retroextracció.

Tercera: els diferents complexos de pal·ladi sintetitzats no han estat efectius com a transportadors de glifosat en el sistema de membrana líquida suportada, a causa principalment de la seva limitada solubilitat en els dissolvents orgànics emprats per la membrana líquida. En canvi, en un sistema d'extracció líquid-líquid on l'extractant emprat era el complex de pal·ladi amb 7-(4-etil-1-metiloctil)-8-hidroxiquinoleïna (Kelex 100), s'ha obtingut entre un 30-50 % d'extracció de glifosat. La retroextracció amb diferents àcids ha donat recuperacions inferiors al 5 %.

Quarta: la immobilització de pal·ladi (II) en la resina quelant Spheron Oxine 1000, que conté el grup funcional 8-hidroxiquinoleïna, ha permès desenvolupar un mètode basat en la tècnica de cromatografia d'afinitat amb ió metàl·lic immobilitzat (IMAC) per preconcentrar glifosat i AMPA. La resina amb Pd adsorbeix quantitativament glifosat i AMPA en un rang de pH entre 5,5-9. El millor eluent ha estat una barreja de HCl 0,1 M i NaCl 1 M amb recuperacions del 80-90 % per a glifosat i 60-80 % per a AMPA, la qual cosa demostra que el mecanisme d'elució implica la protonació dels anàlits i el seu bescanvi per ions clorur.

Cinquena: s'ha constatat que la interacció entre el glifosat i AMPA amb la resina Spheron Oxine 1000 es produeix a través del pal·ladi(II) immobilitzat en aquesta, ja que en experiments sense carregar la resina amb pal·ladi, la retenció dels anàlits ha estat inferior al 10 %. A més, s'ha determinat que és possible reutilitzar la resina si prèviament es renta amb una solució de clorhídric.

Sisena: el mètode desenvolupat amb la Spheron Oxine 1000 carregada amb pal·ladi(II) ha permès preconcentrar glifosat i AMPA en presència d'interferents com àcids húmics. S'han fortificat mostres naturals amb 10 µg/l dels anàlits i 4 mg/l d'àcid húmich i les recuperacions obtingudes han estat del 90 % i el 65 % per al glifosat i AMPA, respectivament.

Setena: per avaluar la influència de la matriu i del grup funcional s'han comparat tres resines: Spheron Oxine 1000, Spheron Thiol 1000 i Iontosorb Oxin 100. Amb totes tres és possible adsorbir quantitativament glifosat i AMPA de mostres naturals fortificades amb 1 µg/l dels anàlits. Les recuperacions obtingudes en eluir amb HCl 0,1 M + NaCl 1 M han estat del mateix ordre per al glifosat (80-100 %). En canvi per a l'AMPA només amb la resina Spheron Thiol s'han obtingut recuperacions superiors al 90 %.

Vuitena: s'ha desenvolupat un mètode per determinar glifosat i AMPA en aigües naturals (potables, superficials i subterrànies) amb un límit de quantificació de 0,1 µg/l que consisteix en la derivatització dels anàlits amb el reactiu fluorescent FMOC, la injecció d'un volum gran de mostra (2 ml) i l'acoblament LC-LC-FD. El mètode s'ha aplicat, a més,

a una mostra real on s'ha detectat la presència de 7,5 i 1 µg/l de glifosat i AMPA, respectivament.

Novena: és possible determinar glifosat en aigües potables i subterrànies fins a concentracions de 0,02 µg/l amb el mètode de LC-LC-FD, amb enriquiment previ amb la resina de bescanvi iònic Amberlite®IRA-900. L'elució és efectiva amb NaCl 1 M, amb recuperacions superiors al 90 % per a glifosat. L'AMPA no és adsorbit quantitativament per la resina, ja que queda afectat per la competència d'altres anions, però el mètode de LC-LC-FD permet detectar-lo directament en concentracions inferiors a 0,1 µg/l.

ANNEX

Publicació I

**FACILITATED TRANSPORT AND PRECONCENTRATION OF THE
HERBICIDE GLYPHOSATE AND ITS METABOLITE AMPA THROUGH
A SOLID SUPPORTED LIQUID-MEMBRANE**

C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo. "Facilitated transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA through a solid supported liquid-membrane". *Journal of membrane science*. Vol. 203, issue 1-2 (30 June 2002) : p. 201-208.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388\(02\)00007-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0376-7388(02)00007-8)

Department de Química, Universitat de Girona, 17071, Girona, Spain

Received 31 May 2001; revised 18 December 2001; accepted 19 December 2001. Available online 18 January 2002.

Abstract

A solid supported liquid-membrane (SLM) system for the transport and preconcentration of the herbicide glyphosate and its main metabolite aminomethylphosphonic acid (AMPA) has been designed and characterised. The influence of the chemical composition of the system as well as membrane configuration on the transport properties were investigated. The best extraction conditions were achieved by adjusting the pH of the aqueous feed phase to 12 (0.1 M NaOH). Among the different options tested, a 0.1 M HCl solution was found to be the most effective to strip glyphosate and AMPA from the loaded organic phase. The effect of carrier concentration and the nature of the organic solvent were also tested and the best results were obtained when working with 0.2 M Aliquat 336 in dodecane modified with 4% dodecanol.

Under these chemical conditions some preconcentration experiments were run using two different geometries of the membrane: a hollow fiber liquid-membrane (HFSLM) and a laminar membrane system (LSLM) where the stripping solution can be recirculated. The best results were obtained for the liquid-membrane system in HF configuration, with concentration factors of 19 and 2.5 for glyphosate and AMPA, respectively.

Author Keywords: Glyphosate; Liquid-membrane; Preconcentration; Aminomethylphosphonic acid (AMPA); Hollow fiber

Publicació II

**PRECONCENTRATION OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE AND ITS
METABOLITE AMPA BY IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY
CHROMATOGRAPHY (IMAC)**

(J. Sep. Sci., en revisió)

C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo. "Preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA by immobilized metal ion affinity chromatography (IMAC)". *Journal of Separation Science*
En revisió.

DOI:10.1002/jssc.200301657

<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/107642201/PDFSTART>

Abstract

A method based on Immobilised Metal Ion Affinity Chromatography (IMAC) consisting of a chelating resin (Spheron Oxine 1000) loaded with Pd(II) is evaluated for the extraction and preconcentration of glyphosate and AMPA from natural water samples. The efficiency of the metal loaded resin in retaining glyphosate and AMPA and the ability of different reagents to recover them is investigated. The most effective elution solution for the recovery of both analytes from the resin is found to be a mixture of 0.1M HCl and 1M NaCl. The effect of flow-rate, analyte concentration and sample volume is evaluated. The optimised experimental conditions are then used in the extraction of the analytes from spiked natural waters. The use of the Pd loaded resin led to recoveries ranging from 80-90% for glyphosate and 60-80% for AMPA.

Keywords: Glyphosate • Aminomethylphosphonic acid (AMPA) • Preconcentration • Resins • Palladium • IMAC

Publicació III

**COMPARISON OF THREE CHELATING RESINS FOR THE
PRECONCENTRATION OF THE HERBICIDE GLYPHOSATE AND
ITS METABOLITE AMPA BY IMMOBILISED METAL ION AFFINITY
CHROMATOGRAPHY (IMAC)**

(en preparació)

C. Rios, V. Salvadó, M. Hidalgo, "Comparison of three chelating resins for the preconcentration of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA by immobilised metal ion affinity chromatography (IMAC)",

En preparació.

Abstract

The extraction and preconcentration of glyphosate and AMPA with Pd(II) loaded onto two glycolmethacrylate supports functionalised with either 8-hydroxyquinoline (Spheron Oxine 1000) or a thiol group (Spheron Thiol 1000) and a cellulose support functionalised with 8-hydroxyquinoline (Iontosorb Oxin 100) has been investigated. The resins are compared to determine the influence of the matrix and their functional group in the loading of palladium and the preconcentration of the analytes. Glyphosate and AMPA are quantitatively adsorbed by the three resins studied and they can be eluted with a mixture of 0.1 M HCl and 1 M NaCl. The recoveries obtained for glyphosate were very similar (80-100 %) for all the resins tested, with slightly different recoveries for AMPA. With Spheron Oxine 1000 and Iontosorb Oxin 100 recoveries between 60-80 % were obtained and with Spheron Thiol more than 90 % of AMPA was eluted from the resin. Spheron Thiol 1000 gave the best results for both analytes indicating that their preconcentration is more favourable when palladium is immobilised through the thiol functional group. Cu(II) loaded onto Iontosorb Oxin was also tested for the preconcentration of glyphosate and AMPA, but poorer results were achieved.

Keywords: glyphosate; aminomethylphosphonic acid (AMPA); preconcentration; resins; palladium; IMAC

*Corresponding author. Tel.: +34-972418190; Fax: +34-972418150

E-mail: manuela.hidalgo@udg.es

Publicació IV

**IMPROVED LC-LC METHOD FOR THE DETERMINATION OF
GLYPHOSATE AND AMINOMETHYLPHOSPHONIC ACID (AMPA)
RESIDUES IN ENVIRONMENTAL WATERS**

(J. Chromatogr. A, acceptat)

C. Hidalgo, C. Rios, M. Hidalgo, V. Salvadó, J. V. Sancho, F. Hernández. "Improved LC-LC method for the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) residues in environmental waters". *Journal of Chromatography A*

Acceptat.

[doi:10.1016/j.chroma.2004.02.044](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.02.044)

ABSTRACT

A previous analytical method developed in our laboratory for the determination of glyphosate and its main metabolite AMPA in water samples has been revised and improved. The method is based on pre-column derivatization with the fluorescent reagent FMOC followed by large volume injection in a coupled-column LC system using fluorescence detection (LC-LC-FD). The derivatization step has been slightly modified simply changing parameters as volume and/or concentration of sample and reagents with the aim of decreasing the limits of quantification (LOQ) of glyphosate and AMPA down to 0.1 µg/l.

Additionally, the potential of an anion-exchange resin (Amberlite® IRA-900) for preconcentration of glyphosate, previously to the derivatization step, has been investigated. In this way, the LOQ of the parent compound has been lowered to 0.02 µg/l.

Different water samples (drinking, surface and groundwater) spiked with glyphosate and AMPA at three concentration levels (0.1-10 µg/l) were analysed by the improved LC-LC-FD method yielding recoveries between 87 and 106 % with relative standard deviations lower than 8 %. Moreover, drinking and ground water samples spiked with glyphosate at 0.02 and 0.1 µg/l were also analysed after preconcentration on an anion exchange resin with satisfactory recoveries (94-105 %) and precision (better than 8%). The LC-LC method proposed can be applied for the determination of glyphosate at sub-ppb concentration levels with or without preconcentration step depending on the sensitivity required.

Keywords: glyphosate, water analysis, coupled column Liquid Chromatography