

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LIMITACIONES DE MECC Y CZE CON RESPECTO A LA SENSIBILIDAD

Las primeras aplicaciones realizadas con CZE fueron en el campo de la bioquímica [1]. Sin embargo, a medida que se iba perfeccionando la técnica se fue ampliando su aplicación hasta abarcar todos los campos del análisis químico.

A pesar de ello, diversos autores han discutido sus limitaciones debido a la falta de sensibilidad de la técnica. Nielen et al. [2] llegaban a la conclusión de que CZE no era lo suficientemente sensible como para realizar análisis medioambientales, a no ser que se utilizaran técnicas especiales de inyección.

En 1991, Goodall et al. [3] explicaban que CZE podía proporcionar resultados analíticos tan buenos como los obtenidos mediante HPLC, pero con el problema de la falta de sensibilidad. Perrett y Ross [4] también fueron bastante críticos sobre la aplicación de CZE a análisis biomédicos debido a su limitada sensibilidad, mientras que Pluym et al [5] mostraban que la sensibilidad de CZE era adecuada para el control de calidad farmacéutico y químico.

Los detectores UV acoplados a un instrumento CZE son capaces de detectar cantidades tan pequeñas como 600 fg. [6], valores similares a los obtenidos con los mejores sistemas de Cromatografía de Gases. Sin embargo, los volúmenes de muestra que pueden ser inyectados sin que se produzcan pérdidas de resolución y eficacia son del orden de nanolitros, lo cual significa una pobre sensibilidad expresada en términos de concentración.

Los niveles de sensibilidad alcanzados (varios miles de ppb, o 10^6 M para una masa molecular baja] afortunadamente no se suelen encontrar en muestras medioambientales, y están lejos de los valores máximos requeridos por las directivas comunitarias.

1.2. OBJETIVOS

En anteriores capítulos se han desarrollado métodos de análisis de herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos . El problema existente para poder aplicarlo en muestras medioambientales es la mala sensibilidad de la técnica, no pudiéndose llegar a los límites de detección exigidos por las normativas oficiales. Con el fin de intentar solucionar este problema, en este capítulo se estudiarán posibles técnicas de pre-concentración compatibles con MECC.

Primero se realizará un resumen de las principales técnicas de concentración aplicables a la instrumentación CZE existentes en la bibliografía (apartado 1.3). En el apartado 2 se estudiarán técnicas de concentración on-line tanto teórica (apartado 2.1.) como experimentalmente (apartado 2.2.), mientras que en el apartado 3 se experimentará con cartuchos de extracción en fase sólida. Por último, en el apartado 4, se compararán los resultados obtenidos en ambos casos.

1.3. MODIFICACIONES DEL SISTEMA CZE CON EL FIN DE OPTIMIZAR LA SENSIBILIDAD

Con la finalidad de mejorar la sensibilidad de la Electroforesis Capilar diversos autores han estudiado posibles modificaciones del sistema, entre las cuales destacan las siguientes:

- Optimización del sistema de detección.
- Extracción en fase sólida en el interior del capilar.
- Acoplamiento on-line de Isatoforesis y Electroforesis Capilar.
- Stacking.

1.3.1. Optimización de los sistemas de detección.

Los sistemas CZE comerciales suelen estar equipados con detectores UV. Otros detectores utilizados, mayoritariamente de forma experimental, son los detectores amperométricos [7,8], de espectrometría de masas [9,10], de fluorescencia de láser inducido (LIF) [11,12] o detectores UV con el camino óptico extendido [13,14].

Utilizando este último tipo de detector con una columna capilar de 157m de diámetro interno, y una celda en forma de Z de 3 mm de camino óptico, Turnes M.L. et al. [14] consiguieron mejorar la sensibilidad en un factor de 15, pero disminuyendo también su capacidad de separación. Empleando un detector LIF se han conseguido detectar concentraciones menores a 10^{-12} [12], sin embargo su uso no puede ser aplicado en la mayoría de los análisis medioambientales debido a que la mayor parte de los contaminantes orgánicos no pueden ser derivatizados con los marcadores fluorescentes habituales. En la actualidad solamente existen dos compañías que comercializan sistemas CZE equipados con un detector LIF.

Con respecto al acoplamiento CE-MS, es un sistema que todavía no está considerado para la realización de análisis rutinarios [15]. La sensibilidad sigue siendo su mayor limitación además de la problemática de la interfase CE-MS. La utilización de MECC con MS también es difícil debido a la presencia de SDS que puede causar bajas eficiencias de ionización. Sin embargo, nuevas investigaciones están cambiando rápidamente esta situación, desarrollando nuevas interfaces CE-MS, instrumentaciones MS más sensibles y fases pseudoestacionarias más adecuadas para este tipo de análisis.

1.3.2. Extracción en fase sólida en el interior del capilar.

Para realizar una concentración de la muestra “on-line” mediante una extracción en fase sólida, es necesario fijar una pequeña cantidad de la sustancia que forma esta fase en el comienzo del capilar [16], o unir mediante enlaces covalentes la fase estacionaria hidrofóbica a la pared inerte del capilar [17].

Con este último caso, debido a la poca superficie de pared recubierta con la fase estacionaria, los factores de enriquecimiento son bastante pobres: entre 10 y 35 [17]. Los capilares con una cantidad de fase estacionaria al comienzo tienen una mayor superficie que intercambio y los factores de enriquecimiento pueden llegar a ser superiores a 250 [16].

Las desventajas de esta técnica de concentración es que, a diferencia de la extracción “off-line”, no se puede introducir la muestra directamente al capilar sino que se ha de realizar una limpieza y extracción parcial de los contaminantes. La muestra final tampoco debería tener un elevado porcentaje de disolvente orgánico. También es interesante destacar que este tipo de capilares los suministra un número limitado de distribuidores, y su precio es considerablemente superior al de una columna capilar normal.

1.3.3. Acoplamiento on-line de Isotacoforesis y Electroforesis Capilar.

La isotacoforesis (ITP) [18] es una técnica electroforética que tiene lugar en un sistema discontinuo de tampones. Los analitos son inyectados entre el denominado “electrolito principal” (de alta movilidad) y el “electrolito terminal” (de baja movilidad).

En el momento en que se establece un campo eléctrico, se crea una configuración migratoria en la cual los analitos migran como zonas consecutivas. Las zonas de analitos de baja concentración se adaptarán (zona de compresión) al nivel de concentración del “ión principal” siguiendo la función de regulación de Kohlrausch [18], y originando su concentración.

Estas características de la Isotacoforesis pueden ser aprovechadas en CZE realizando el acoplamiento ITP-CZE. Varios autores [19-21] han demostrado que los resultados pueden ser muy atractivos. D.S. Stegehius et al. [21] utilizando un volumen de inyección de 10⁷ l en la parte ITP, consiguieron un factor de enriquecimiento de 1.000 (comparado con los resultados de CZE) con una precisión del 3,7 % de R.S.D. Reinhoud et al. [22,23] realizaron el acoplamiento ITP-CZE en un capilar y en un instrumento comercial, alcanzando factores de enriquecimiento del orden de 100 pero sin la complejidad experimental existente en los trabajos citados en las referencias 19-21.

1.3.4. Stacking.

El Stacking es una de las más prometedoras técnicas de optimización de la sensibilidad en CZE, tanto desde el punto de vista práctico como económico. Es una técnica menos complicada que la ITP-CZE, utilizándose la instrumentación CZE disponible comercialmente y con las columnas capilares normales.

En el apartado 2.1. se explicará con detalle sus fundamentos, y se expondrán los resultados experimentales derivados de su aplicación en el análisis de los herbicidas utilizados en los anteriores capítulos de este trabajo.

1.4. CONDICIONES EXPERIMENTALES

- Fuerza iónica: 0,02 M.
- Concentración de surfactante: 0,05 M.
- Co-disolvente: 3.5% de n-Butanol.
- Cartuchos de extracción de 250 mg de Carbopack B procedentes de Shandon, y de 500 mg de C-18 procedentes de J. and W Scientific.

El resto de las condiciones experimentales son las descritas en el apartado 1.3. del capítulo 2.

2. MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN ON-LINE

2.1. DESCRIPCIÓN TEÓRICA

2.1.1. Stacking

Esta técnica está basada en el hecho de que la velocidad electroforética de un ión (V_{ep}) depende linealmente del campo eléctrico aplicado (E) según la ecuación:

$$V_{ep} = \mu_{ep} \cdot E \quad (1)$$

siendo μ_{ep} la movilidad electroforética del ión. μ_{ep} puede ser expresado como:

$$\mu_{ep} = q / 6\pi a \eta \quad (2)$$

donde:

- q es la carga del ión.
- a es el radio del ión.
- η es la viscosidad.

Los analitos son disueltos en un disolvente con una conductividad menor que el del tampón utilizado para realizar el análisis. Al inyectar la disolución con los analitos y al aplicar el voltaje de separación, se cumple que el campo eléctrico en la zona de la muestra (E_m) es mayor que en la zona del tampón (E_t) debido a que la diferencia de potencial en las zonas es inversamente proporcional a su conductividad (ley de Ohm). Por lo tanto se cumple que:

$$E_m / E_t = \eta_R \quad (3)$$

siendo η_R la relación de conductividad entre el tampón y la muestra.

Como consecuencia de este efecto, la velocidad de los analitos en la zona de la muestra aumentará respecto a la velocidad dentro del tampón (ecuación 1). Cuando el analito alcanza la interfase entre las dos zonas disminuye su campo eléctrico y por lo tanto su velocidad, provocando la concentración de los compuestos catiónicos en el frente de la zona de la muestra y los aniónicos en la parte final. Este fenómeno se muestra en la figura (1).

El mecanismo de concentración basado en el efecto “stacking” es complejo dado a que la relación de campos de la expresión (3) va disminuyendo a lo largo de la separación, ya que en los alrededores de la muestra se van concentrando hasta llegar a conductividades similares a las del tampón. Así pues, la anterior expresión marca el factor de concentración máximo que se puede conseguir.

Cuanto mayor sea el tiempo de contacto entre la muestra y la zona de baja conductibilidad más cerca a φ_R será el factor de concentración que se consiga. Entre los factores que favorecen un tiempo grande de contacto y una conductibilidad baja de la zona se puede citar la similitud en los movimientos del analito y de los aniones del tampón [24] y la anchura de la muestra inyectada en el capilar.

Sin embargo tiempos excesivos de inyección pueden disminuir la eficacia de los picos al influir en su anchura y en su movilidad (dado que bajan la corriente eléctrica que circula por el capilar), y pueden afectar la linealidad de la calibración [25] e introducir picos indeseables del sistema debido a contracciones de las zonas [26].

A pesar de que es beneficioso operar con un valor de φ_R elevado, un aumento excesivo de este parámetro puede provocar dispersiones de picos debido a perfiles de velocidad laminares creados por presiones de campos eléctricos no uniformes [27].

Po lo tanto, el efecto “stacking” hace disminuir la zona inicial de inyección W_{inj} en un factor φ_R pero introduce dispersiones por efectos laminares. El valor de dispersión creado por ambos efectos viene dado por:

$$\varphi_{onj}^2 + \varphi_{stack}^2 = (W_{onj}^2/12\varphi_R^2) + (R_i\varphi_v)^2 t_d/24D \quad (4)$$

donde φ_v es la diferencia entre la velocidad electroosmótica local y la velocidad electroosmótica del eje del capilar. Este valor aumenta con W_{onj} i φ_R , y por tanto hay un valor óptimo de φ_R que, bajo condiciones típicas, se encuentra alrededor de 10.

2.1.2. Stacking con inversión de polaridad.

En el caso anterior se ha comentado que inyectar un gran volumen de muestra puede provocar pérdidas de eficacia. Existe un volumen máximo a partir del cual no es aconsejable trabajar, y el cual marca el enriquecimiento máximo que puede ser alcanzado. El factor de concentración máximo propuesto por diversos autores [27,28,29] es del orden de 10, proporcionando un límite de detección, en “condiciones favorables”, de alrededor de 20 ppb.

Una forma de incrementar la cantidad de muestra inyectada por encima de las condiciones óptimas y mantener prácticamente inalterada la eficacia, consiste en eliminar parte del tampón procedente de la muestra después de que el proceso del Stacking haya finalizado [24].

Para realizar este proceso, una vez inyectada la muestra, se cambia la polaridad del sistema y se aplica el potencial. El tampón procedente de la muestra es bombeado fuera del capilar por el efecto del flujo electroosmótico, mientras que los analitos, cargados negativamente, son concentrados en la interfase muestra-tampón. Remarcar que, contrariamente a lo que sucede en la disolución tampón, la velocidad electroforética de los analitos en la zona de la muestra es mucho más alta que el flujo electroosmótico bajo estas condiciones. Este hecho nos asegura que no habrá pérdidas de analito al bombear hacia fuera del capilar el tampón procedente de la muestra [27]. En la figura (2) se muestra el proceso descrito.

La eliminación del tampón procedente de la muestra se ha de efectuar hasta que la zona que contiene los analitos haya alcanzado el principio del capilar. Desde un punto de vista práctico, esto ocurre cuando el valor de la corriente eléctrica ha alcanzado aproximadamente el 95% de su valor normal con el voltaje aplicado [24]. Un estricto control de la corriente durante la etapa de polaridad reversa es esencial para evitar pérdidas de los analitos.

El volumen máximo de muestra que puede ser pre-concentrado de esta manera, sin pérdidas de muestra causada por el flujo inverso hacia el vial, depende tanto de la movilidad electroforética del analito como del valor del flujo electroosmótico [28]. Dependiendo de estas variables, la zona inyectada puede ser tan grande como un tercio de la longitud total del capilar, y en algunos casos puede ser incluso superior [24]. Algunos autores [30,31] han llegado a factores de enriquecimiento superiores a 500 utilizando esta técnica, lo cual permite análisis de trazas a niveles inferiores a ppb.

Desde el punto de vista medioambiental se ha de tener en cuenta que esta técnica requiere muestras que posean una conductividad relativamente baja y reproducible. Es obvio que las

matrices de este tipo de muestras pueden ser muy diversas; en la práctica se tendrían que filtrar para evitar obturaciones del capilar, y cambiar la matriz original por otra con los requisitos mencionados.

2.1.3. Stacking en compuestos neutros.

Hasta ahora se han explicado los fundamentos del stacking aplicado a compuestos iónicos y en un sistema CZE. Si en vez de utilizar este sistema, utilizamos un sistema MECC, es decir, si adicionamos un tensioactivo a la disolución tampón, las repercusiones sobre el efecto stacking en los analitos iónicos es despreciable ya que estos compuestos permanecen mayoritariamente en la fase acuosa.

La posibilidad de pre-concentrar moléculas neutras en un sistema MECC y utilizando los principios del Stacking ha sido estudiada por algunos autores [32,33,34]. La base de estas investigaciones es que, aunque las moléculas neutras no tienen una movilidad inherente, sus interacciones con las micelas cargadas les proporcionan una movilidad efectiva y consecuentemente la posibilidad de ser pre-concentradas mediante el efecto Stacking.

El proceso de pre-concentración es similar al explicado en los apartados anteriores: al aplicar un campo eléctrico las micelas migran rápidamente hacia la interfase muestra-tampón, para después disminuir su velocidad como consecuencia de la reducción del campo eléctrico en la zona del tampón (mayor conductividad). Las moléculas neutras que estén distribuidas principalmente en la fase micelar serán sometidas a efectos de concentración similares a los de las micelas. En moléculas neutras con un carácter más hidrófilo el efecto stacking será menor al permanecer mayoritariamente en la fase acuosa.

La velocidad neta (V_{sol}) de un soluto neutro debida a su interacción con las micelas viene descrita por :

$$V_{sol} = V_{ef} + V_{eo} = E \cdot \mu_{ef} + E \cdot \mu_{eo} \quad (5)$$

donde:

- V_{ef} es la velocidad electroforética efectiva.
- V_{eo} es la velocidad electroosmótica.
- E es la fuerza del campo eléctrico.
- μ_{ef} es la movilidad electroforética efectiva.
- μ_{eo} es la movilidad electroosmótica.

μ_{ef} se define como (apartado 2.1.2., capítulo 1):

$$v_{ef} = \frac{I}{I + k'} v_{ep} + \frac{k'}{I + k'} v_{mc} \quad (6)$$

siendo:

- v_{ep} la movilidad electroforética absoluta del soluto.
- v_{mc} la movilidad electroforética absoluta de la micela.
- K' es el coeficiente de distribución.

Teniendo en cuenta que para un soluto neutro $v_{ep} = 0$ la ecuación (5) queda como:

$$V_{sol} = \frac{k'}{I + k'} v_{mc} \cdot E + v_{eo} \cdot E \quad (7)$$

Contra más hidrófobo sea el soluto mayor será k' (apartado 2.1.2., cap. 1), mayor será el término $k'/(1 + k')$ de la ecuación (7), mayor será la velocidad neta del soluto neutro, y mayor será la pre-concentración obtenida al aplicar el campo eléctrico en el proceso de Stacking [34]. Por este mismo razonamiento, cuando se realiza el Stacking con polaridad inversa los solutos neutros con valores pequeños de k' podrían ser bombeados hacia fuera del capilar en la etapa en la cual se elimina el tampón de la muestra.

Esta técnica de concentración de compuestos neutros ha sido utilizada por varios investigadores resultando incrementos de sensibilidad inferiores a los obtenidos normalmente con analitos aniónicos. Por ejemplo, Liu et al. [32] consiguieron incrementar la sensibilidad en 75-85 al utilizar Stacking con inversión de polaridad en el análisis de 1,2,4,7 y 1,2,4,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina. El factor de concentración obtenido por Surre y Muller [34] en otro tipo de compuestos fue de 30, mientras que Nielsen y Foley [33] muestran factores entre 10 y 20.

2.2. RESULTADOS EXPERIMENTALES

2.2.1. Stacking

El estudio experimental del efecto Stacking se realizó utilizando los mismos analitos iónicos que en capítulos anteriores (2,4-DP, 2,4-D, 2,4,5-T y 2,4-DB) y según el método de análisis descrito en el apartado 1.4. Los cuatro compuestos aniónicos fueron diluidos en agua desionizada hasta una concentración final de 500 ppb, y esta disolución fue inyectada a diferentes volúmenes (diferentes tiempos de inyección).

Los tiempos de inyección ensayados fueron entre 10 segundos, que corresponde un tiempo de inyección normal, y 60 segundos. Los resultados experimentales correspondientes a estos volúmenes de inyección confirman el incremento de la sensibilidad debido al efecto Stacking, tal y como se contempla en la figura (3).

Con tiempos de inyección entre 20 y 30 segundos, se observa un claro aumento de las alturas de los picos, mientras que la eficacia y la resolución no se ven afectados. Sin embargo, cuando se incrementa hasta 40 segundos, las alturas prácticamente no se alteran pero la resolución entre los picos del 2,4-D y 2,4,5-T disminuye. Con un volumen de inyección de 60 segundos la pérdida de resolución es tan importante que impide la correcta cuantificación de los analitos.

Por lo tanto, el límite del Stacking viene determinado por la disminución de la resolución que conlleva el incremento del volumen de inyección. En el caso estudiado el valor óptimo está entre 30 y 40 segundos, consiguiéndose un factor de concentración de 10 aproximadamente. El límite de detección de los cuatro herbicidas está alrededor de 100 ppb, valor demasiado alto como para utilizarlo en análisis de trazas.

Figura (3). Electroferogramas correspondientes a una disolución de 500 ppb de 2,4-DP (1), 2,4-D (2), 2,4,5-T (3) y 2,4-DB (4) utilizando una concentración de surfactante de 0'05M, una fuerza iónica de 0'02M, una concentración de Butanol de 0382M (3.5%) y diferentes tiempos de inyección. (A) 8 seg., (B) 20 seg., (C) 30 seg., (D) 40 seg., (E) 60 seg.

2.2.2. Stacking con polaridad inversa.

Tal y como se explicó en el apartado 2.1.2 el Stacking con Polaridad Inversa tiene la ventaja sobre el Stacking de que se puede aumentar el volumen de inyección y conseguir un incremento de las alturas de los picos, sin ocasionar pérdidas importantes en la resolución y en la eficacia.

Experimentalmente se estudiaron las posibilidades de esta técnica en unas condiciones de trabajo similares a las utilizadas en el apartado anterior, con la diferencia de que la concentración de la muestra inyectada fue de 50 o 100 ppb.

Se utilizaron tiempos de inyección entre 35 y 480 segundos. Su efecto sobre la eficacia y la altura de los picos se representa en las gráficas (1) y (2), observándose un fenómeno similar al detectado en el estudio del Stacking: el incremento de los tiempos de inyección aumenta la altura de los picos pero disminuye sus eficacias. Por lo tanto, el volumen óptimo de inyección será aquel que equilibre el aumento de la sensibilidad con la correspondiente pérdida de resolución y eficacia. En nuestro caso este volumen óptimo lo situamos a un tiempo de inyección de 120 segundos. Por encima de este valor tanto la eficacia como la resolución entre los compuestos 2,4-D y 2,4,5-T son demasiado bajas.

Con referencia a los límites de detección, se han obtenido valores de 5 ppb aproximadamente, lo cual equivale a un factor de enriquecimiento del orden de 200, valores superiores a los hallados mediante Stacking (Tabla 1).

	L.D. (ppb)	F.E.	t. inj. (seg.)
Inyección normal	800	1	10
Stacking	100	8	30
Stacking con P.I.	5	160	120

Tabla (1). Límites de detección (L.D.) y factores de enriquecimiento (F.E.) obtenidos con el compuesto 2,4,5-T al utilizar diferentes técnicas y tiempos de inyección (t. inj.).

Otro factor de gran importancia al realizar el Stacking con polaridad inversa es el tiempo y el voltaje utilizado en la fase reversa. Con respecto al voltaje algunos autores [34] han afirmado la conveniencia de trabajar con voltajes bajos con el fin de obtener mejores resultados de eficacia. En nuestro caso, después de realizar diferentes pruebas, se eligió V=5KV por ser un valor lo suficientemente pequeño como para controlar con exactitud las variaciones de la intensidad de la corriente. Con respecto al tiempo, se optó por mantener el sistema con polaridad inversa hasta que la intensidad de la corriente volviera al 95 % de su valor inicial, independientemente del

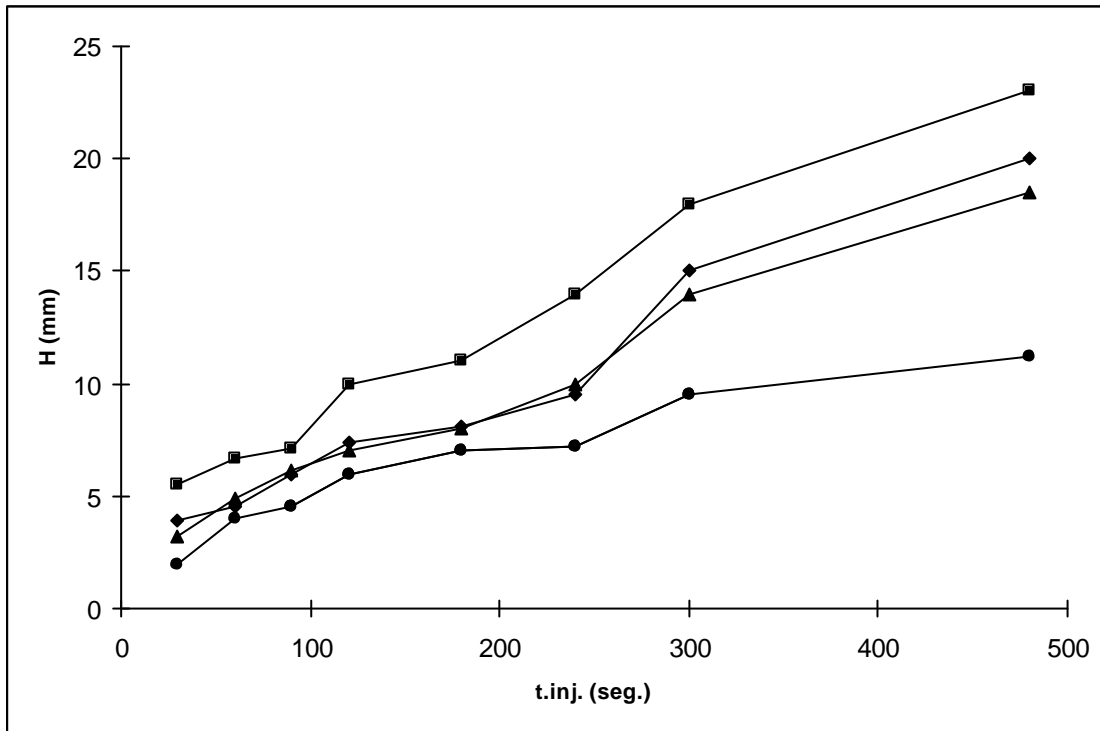
tiempo necesario para ello. Esta etapa del análisis es muy delicada y de extrema importancia, ya que un tiempo excesivo puede provocar la salida de los analitos fuera del capilar, mientras que un tiempo demasiado corto significará una insuficiente eliminación de la matriz de la muestra inyectada y una pérdida de resolución debido a la distribución no uniforme del campo eléctrico.

Finalmente se comprobó la precisión de la técnica y se comparó con los resultados obtenidos con un modo de inyección normal (capítulo I). Los resultados se describen en la siguiente tabla y confirman una disminución importante de la precisión del método de análisis.

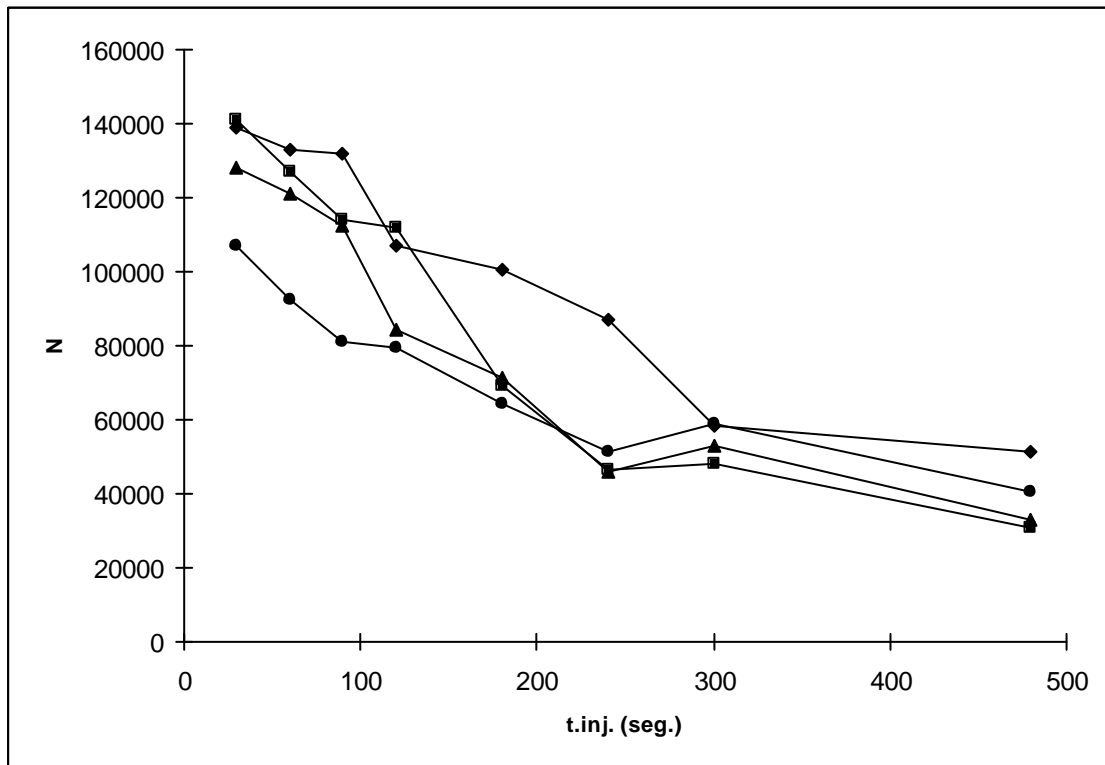
	INJ. NORMAL		STACKING CON P.I.	
	A	t_r	A	t_r
2,4-DP	1,0	0,9	5,1	1,5
2,4-D	0,9	0,8	4,3	1,6
2,4,5-T	0,9	0,8	4,2	1,6
2,4-DB	1,1	0,9	4,9	2,0

Tabla (2). Precisión de las áreas (A) y de los tiempos de retención (t_r) obtenidos mediante inyección normal ($t. inj. = 10 \text{ seg.}$) y mediante Stacking con polaridad inversa ($t. inj. = 120 \text{ seg.}$). La precisión viene expresada como la desviación estándar relativa resultante de 10 inyecciones consecutivas.

En la figura (4) se muestra un electroferograma obtenido mediante esta técnica de inyección.



Gráfica (1). Influencia de los tiempos de inyección ($t. inj$) en la altura de los picos (H) al inyectar 100 ppb de muestra mediante Stacking con polaridad inversa.
 ? 2,4-DB ? 2,4-DP ? 2,4-D | 2,4,5-T



Gráfica (2). Influencia de los tiempos de inyección ($t. inj$) en la eficacia de los picos (N) al inyectar 100 ppb de muestra mediante Stacking con polaridad inversa.
 ? 2,4-DB ? 2,4-DP ? 2,4-D | 2,4,5-T.

Figura (4). Electroferograma obtenido mediante Stacking con polaridad inversa y con un tiempo de inyección de 120 seg. Concentración de la muestra inyectada: 50 ppb. Otras condiciones similares a la figura (3).

2.2.3. Stacking en compuestos neutros.

Finalmente se intentó aplicar el Stacking con inversión de polaridad en compuestos neutros según los principios de concentración expuestos en el apartado 2.1.3. Para ello, los analitos utilizados (Fenurón, Monurón, Monolinurón, Diurón y Linurón) fueron disueltos en una disolución de SDS de concentración 0'002M hasta obtener una concentración final de 500 ppb. Las demás condiciones analíticas fueron similares a las utilizadas en los apartados anteriores.

Los resultados experimentales obtenidos configuran claramente dos grupos de analitos; el primero lo forma el Fenurón, Monurón y Monolinurón. Son compuestos con coeficientes de partición pequeños y que permanecen principalmente en la fase acuosa. Por esta causa, al aplicar la polaridad inversa son sacados parcial o totalmente del capilar junto con la matriz de la muestra, provocando una pérdida parcial (en el caso del Monurón y Monolinurón) o total (en el caso del Fenurón) de los analitos.

El segundo grupo de analitos esta formado por el Diurón y Linurón. Son compuestos con un carácter acentuado de hidrofobicidad, con coeficientes de partición altos, que permanecen principalmente en la fase micelar, y por lo tanto reúnen las características químicas adecuadas para ser concentrados mediante Stacking con polaridad inversa. Con ellos se consiguieron factores de concentración entre 15 y 20 con un tiempo de inyección de 60 seg., y unos valores de repetibilidad del orden del 10% de desviación estándar. Tiempos de inyección superiores disminuían considerablemente las eficacias de los picos.

Estos resultados son peores que los obtenidos utilizando compuestos aniónicos, y ponen serias dudas sobre la conveniencia de utilizar el efecto Stacking en compuestos neutros.

3. MÉTODOS DE CONCENTRACIÓN OFF-LINE

3.1. DESCRIPCIÓN TEÓRICA

La forma tradicional de concentrar trazas de pesticidas en muestras ambientales ha sido la extracción líquido-líquido. Esta técnica tiene algunas desventajas como son la utilización de grandes cantidades de disolventes tóxicos, caros e inflamables, que hacen que su manipulación sea incómoda y peligrosa. Además, algunas familias de pesticidas tienen altas solubilidades en agua y difícilmente pueden ser extraídas con los típicos disolventes orgánicos.

Es por ello por lo que en los últimos años ha habido un gran desarrollo de la técnica de concentración denominada extracción en fase sólida (SPE).

En SPE los analitos son absorbidos en una fase estacionaria para ser después desorbidos mediante un pequeño volumen de disolvente. Es una técnica rápida, barata y con la cual se pueden obtener factores elevados de concentración. La concentración puede ser realizada con discos o columnas, y las fases estacionarias más comunes son las fases no polares (C-18, C-8, grupos fenil, etc.) polares (silice, grupos -CN, etc.) o de intercambio iónico (SAX, SCS, etc.).

En este trabajo se estudio la capacidad de concentración de dos tipos de columnas: columnas compuestas por cadenas C-18 y columnas compuestas por carbón grafitizado (Carbopack B).

Carbopack B es un tipo de carbón grafitizado bien conocido con un área superficial de alrededor de 100 m²/g. Debido a la homogeneidad de su superficie y su alta área superficial ha sido utilizado con éxito en columnas de cromatografía de gases, tanto en columnas empaquetadas como en capilares. En columnas de extracción en fase sólida se ha utilizado en la extracción de diversos analitos en fluidos biológicos [35,36] o en el análisis de insecticidas organoclorados [37,38], organofosforados [39,40] ó triazinas [41] en muestras de aguas.

Otra característica interesante de su superficie es que está contaminada por unos particulares complejos carbono-oxígeno que, en presencia de agua acidificada, son capaces de reorganizarse para formar moléculas cargadas positivamente de estructura similar a las sales de benzopyrylium [42]. Estas cargas positivas proporcionan a las columnas de Carbopack la capacidad de actuar tanto como columnas de intercambio iónico como de absorbente no específico. La unión con analitos aniónicos es tan fuerte que mezclas de disolventes convencionales son incapaces de desorberlos de la columna, siendo necesario la basificación de los eluyentes. Esta característica ha sido utilizada por Di Corcia et al. [39,43] para aislar y separar

analitos ácidos de neutros o básicos, pasando a través de la columna primero una mezcla de disolventes que eluyan los compuestos no aniónicos, y después adicionar esta mezcla de disolventes basificada para extraer los analitos aniónicos. De esta forma se consigue, utilizando una única columna, además de la extracción y la concentración de los analitos, su fraccionamiento.

Con respecto a las columnas C-18, son el tipo más ampliamente utilizadas, obteniéndose buenos resultados en compuestos neutros hidrófobos. Compuestos aniónicos y neutros hidrófilos son difícilmente retenidos en este tipo de columnas al tener una alta afinidad por la fase acuosa y polar. En el caso de los compuestos aniónicos, una posibilidad para extraerlos es disminuir el pH de la muestra hasta que los analitos son neutros, aumentando de esta forma su afinidad por la fase estacionaria y apolar de la columna.

3.2. PROCEDIMIENTOS DE TRABAJO

3.2.1. Columnas Carbopack.

El procedimiento experimental utilizado para la concentración de las muestras utilizando las columnas de Carbopack es el siguiente:

- Acondicionamiento de la columna mediante 5 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-H}_2\text{O}$ 80:20 + 2 ml de CH_3OH + 5 ml de HCl pH=2.
- Concentración de la muestra. El volumen de muestra es forzado a pasar a través de la columna con un flujo de 33 ml/min. por medio de una bomba de vacío.
- Limpieza de la columna añadiendo 7 ml de agua desionizada.
- Secado de la columna centrifugándola durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. y pasando nitrógeno a través de ella durante 2 minutos.
- Elución de los analitos mediante 2 ml de $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ 60:40 + 0.016M de KOH . El eluyente pasa a través de la columna por su propia fuerza gravitatoria, sin utilizar la bomba de vacío.
- Evaporación a sequedad del eluyente a través de una corriente de nitrógeno a 35°C.
- Redisolución del residuo adicionando 100 μl de una disolución 0.05M de SDS . La mezcla resultante se mantiene durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos para asegurar su total redisolución.

3.2.2. Columnas C-18.

Utilizando columnas C-18 las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Acondicionamiento de la columna mediante 10 ml de CH_3OH + 10 ml de H_2O .
- Concentración de la muestra. El volumen de muestra es forzado a pasar a través de la columna con un flujo de 20 ml/min. por medio de una bomba de vacío.
- Limpieza de la columna adicionando 7 ml de agua desionizada.
- Secado de la columna centrifugándola durante 5 minutos a 2.000 r.p.m. y pasando nitrógeno a través de ella durante 2 minutos.
- Elución de los analitos mediante 5 ml de CH_3OH . El eluyente pasa a través de la columna por su propia fuerza gravitatoria, sin utilizar la bomba de vacío.
- Evaporación a sequedad del eluyente a través de una corriente de nitrógeno a 35°C.

- g) Redisolución del residuo adicionando 100 μ l de una disolución 0.05M de SDS. La mezcla resultante se mantiene durante 5 minutos en un baño de ultrasonidos para asegurar su total redisolución.

3.3. RESULTADOS EXPERIMENTALES

Los ensayos realizados con las columnas de extracción en fase sólida se describen la siguiente tabla. Cada una de estas pruebas se realizó por triplicado y utilizando como muestra una disolución de los herbicidas fenoxiácidos y fenilureicos en agua destilada.

	Columna	V. muestra	Conc. muestra	Factor conc.
Prueba nº1	Carbopack	250 ml	1,6 ppb	2.500
Prueba nº2	Carbopack	1.000 ml	0,4 ppb	10.000
Prueba nº3	C-18	250 ml	1,6 ppb	2.500
Prueba nº4	C-18	1.000 ml	0,4 ppb	10.000
Prueba nº5	C-18 pH=2	250 ml	1,6 ppb	2.500
Prueba nº6	C-18 pH=2	1.000 ml	0,4 ppb	10.000

Tabla (3). *Ensayos realizados con las columnas de extracción en fase sólida.*

Las recuperaciones obtenidas según el procedimiento de trabajo descrito en el apartado anterior son las siguientes:

	p.1	p.2	p.3	p.4	p.5	p.6
2,4-DP	96%	92%	4%	<2%	90%	75%
2,4-D	97%	93%	2%	<2%	91%	77%
2,4,5-T	97%	92%	4%	2%	91%	81%
2,4-DB	98%	94%	6%	3%	94%	84%
Fenurón	97%	94%	92%	91%	87%	88%
Monurón	97%	94%	95%	90%	90%	91%
Monolinurón	98%	93%	95%	94%	91%	91%
Diurón	98%	95%	95%	92%	93%	93%
Linurón	98%	95%	95%	95%	94%	93%

Tabla (4). *Recuperaciones obtenidas en las pruebas descritas en la tabla 3.*

Se observa que utilizando columnas C-18 sin acidificar la muestra las recuperaciones de los compuestos fenoxiácidos son muy bajas. Esto es debido a que con un pH > 2 estos compuestos permanecen en forma aniónica, y por lo tanto tienen más tendencia a quedarse en la fase acuosa y polar que en la fase estacionaria y apolar formada por las cadenas C-18. Al acidificar la muestra hasta pH = 2 neutralizamos sus cargas negativas consiguiendo una mayor afinidad por la fase estacionaria y un aumento importante de los porcentajes de recuperación. Estos porcentajes son mayores contra menor es el volumen de muestra utilizado.

El problema de la acidificación hasta $\text{pH} = 2$ es que en muestras medioambientales se pueden producir precipitaciones, lo cual puede ser causa de pérdidas de analitos al ser absorbidos en el precipitado. También pueden obturar las columnas de extracción si no se realiza un filtrado previo.

Con respecto a las fenilureas se lograron buenos resultados utilizando las columnas C-18 tanto a $\text{pH} = 2$ como con el pH normal de la muestra. El incremento del volumen de muestra no repercutió apreciablemente en los rendimientos.

Utilizando las columnas Carbo-pack, los resultados alcanzados fueron superiores a los obtenidos con las columnas C-18 tanto con los compuesto fenoxiácidos, donde las recuperaciones no bajaron del 90% para un volumen de 1.000 ml de muestra, como con las fenilureas. El incremento del volumen de muestra tampoco repercutió apreciablemente en los rendimientos.

Con las columnas Carbo-pack se estudió la precisión del método utilizando un volumen de muestra de 1.000 ml y realizando 5 extracciones consecutivas. Los resultados están entre un 4% y un 8% de desviación estándar. A continuación se muestra un electroferograma obtenido utilizando este tipo de columnas y con un volumen inicial de 250 ml (prueba nº1 de la tabla 3).

Figura (5). Electroferograma obtenido después de realizar una extracción de 250 ml de muestra mediante una columna Carbo-pack. Fenurón (1), 2,4-DP (2), 2,4-D (3), 2,4,5-T, (4), Monurón (5), 2,4-DB (6), Monolinurón (7), Diurón (8) y Linurón (9). Otras condiciones similares a la figura (3).

4. CONCLUSIONES

Al estudiar la técnica de concentración Stacking se han detectado varios problemas importantes:

- Los analitos han de ser aniónicos para conseguir un factor mínimo de concentración.
- Al ser una técnica “on line” también se concentran los productos secundarios de la muestra.
- El factor de concentración que se obtiene no es lo suficientemente alto como para poder utilizarlo en el análisis de muestras medioambientales.
- Como la técnica depende básicamente de la conductividad de la muestra, se debe de realizar un tratamiento previo para conseguir la conductividad adecuada para el análisis.

Las ventajas principales del Stacking son la simplicidad y economía del proceso.

Utilizando columnas de extracción en fase sólida del tipo Carbo-pack, la mayoría de los inconvenientes enumerados al hablar del Stacking son solucionados :

- Factores de concentración del orden de 10.000, lo cual permite al análisis medioambiental.
- Concentración de compuestos tanto aniónicos como neutros en una misma columna de extracción.
- Eliminación de interferencias, al realizar una elección selectiva de los analitos absorbidos en la columna.
- No se ha de realizar ningún tratamiento previo de la muestra.

Como desventajas podemos citar el coste económico del proceso (columnas de extracción, disolventes), el tiempo necesario para realizarlo y su complejidad.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Jorgenson J.W., Lukacs K.D., *Anal. Chem.* 53 (1981), 1298.
2. Nielen M.W.F., *20th Int. Symp. on Environm. Anal. Chem., Strasbourg*, 1990.
3. Goodall D.M., Williams S.J., Lloyd D.K., *Trends Anal. Chem.* 10 (1991), 272.
4. Perrett D., Ross G., *Trends Anal. Chem.* 11 (1992), 156.
5. Pluym A., Ael W., De Smet M., *Trends Anal. Chem.*, 11 (1992), 27.
6. Grossman P., Colburn J.C., *Capillary Electrophoresis Theory and Practice*, Academic Press, San Diego, 1992.
7. Hu S., Wang Z., Li P., Cheng J., *Anal. Chem.* 69 (1997), 264.
8. Gaitonde C.D., Pathak P.V., *J. Chromatogr.*, 514 (1990), 389.
9. Kostiaien R., Bruins A.P., *J. Chromatogr.*, 634 (1993), 113.
10. Garcia F., Henion J., *J. Chromatogr.*, 606 (1992), 237.
11. Imasaka T., Nishitani K., Ishibashi N., *Analist* 116 (1991), 264.
12. Cooper C.L., Staller T.D., Sepaniak M.J., *Polycyclic Arom. Comp.*, 3 (1993), 121.
13. K. Otsuka, S. Terabe and T. Ando, *J. Chromatogr.*, 396 (1987) 350.
14. Turnes M.L., Mejuto M.C., Cela R., *J. Chromatogr.*, 733 (1996), 395.
15. Song L., Xu Z., Kang J., Cheng J., *J. Chromatogr.*, 780 (1997), 297.
16. Waters AccuSep C/PRP Concentrator Capillaries; Waters, Milford, MA.
17. Cai J., El Rassi Z., *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992), 1179.
18. Everaerts F.M., Beckers J.L., Verheggen Th.P.E.M., *Isotachophoresis - Theory, Instrumentation and Applications*, Elsevier, Amsterdam, 1976.
19. Foret F., Sustacek V., Bocek P., *J. Microcol. Sep.*, 2 (1990), 229.
20. Kaniansky D., Marak J., *J. Chromatogr.*, 498 (1990), 191.
21. Stegehuis D.S., Tjaden U.R., Van der Greef J., *J. Chromatogr.*, 591 (1992), 341.
22. Reinhoud N.J., Tjaden U.R., Van der Greet J., *J. Chromatogr.*, 641 (1993), 155.
23. Reinhoud N.J., Tjaden U.R., Van der Greet J., *J. Chromatogr.*, in press.
24. Albin M., Grossman P.D., Moring S.E., *Anal. Chem.* 65 (1993), 489.
25. Beckers J.L., Ackermans M.T., *J. Chromatogr.*, 629 (1993), 371.
26. Gebauer P., Thormann W., Bocek P., *J. Chromatogr.*, 608 (1992), 47.
27. Burgi D.S., Chien R.L., *Anal. Chem.* 63 (1991), 2042.
28. Chien R.L., Burgi D.S., *Anal. Chem.*, 64 (1992) 489A.
29. Szucs R., Vindevogel J., Sandra P., Verhagen L.C., *Chromatographia*, 36 (1993), 323.
30. M.W.F. Nielen, *Trends of Anal. Chem.*, 12 (1993), 345.
31. R.L. Chien and D.S. Burgi, *Anal. Chem.*, 64 (1992) 1046.
32. Liu Z., Sam P., Sirimanne S.R., McClure P.C., *J. Chromatogr.*, 673 (1994), 125.

33. Nielsen K.R., Foley J.P., *J. Chromatogr.*, 686 (1994), 283.
34. Süsse H., Müller H., *J. Chromatogr.*, 730 (1996), 337.
35. Di Corcia A., Ripani L., Samperi R., *J. Chromatogr.* 229 (1982), 365.
36. Andreolini F., Borra C., Caccamo F., Di Corcia A., Samperi R., *Anal. Chem.* 59 (1987), 1720.
37. Bacaloni A., Goretti G., Lagaña A., Petronio B.M., Rotatori M., *Anal. Chem.* 52 (1980), 2033.
38. Mangani F., Crescentini G., Bruner F., *Anal. Chem.* 53 (1981), 1627.
39. Di Corcia A., Marchetti M., *Anal Chem* 63, (1991), 580.
40. Bruner F., Ciccio P., Crescentini G., Pistolesi M.T., *Anal. Chem.* 45 (1993), 1.851.
41. Battista M., Di Corcia A., Marchetti M. *Anal Chem* 61 (1989), 935.
42. Di Corcia A., Samperi R., Sebastiani E., Serverini C. *Anal Chem* 52 (1980), 1.345.
43. Di Corcia A., Marchetti M, Samperi R., *Anal Chem.* 61 (1989), 1.363.