

METODOLOGÍA EN LÍNEA PARA LA DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE LOS HERBICIDAS 2,4-D Y 2,4-DB EN AGUA

Luz Elena VERA-ÁVILA, José Luis MERAZ-LIRA y Patricia PADILLA-CORTÉS

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510 D.F., México

(Recibido agosto 1997, aceptado diciembre 1997)

Palabras clave: 2,4-D, 2,4-DB, preconcentración en línea, análisis de agua.

RESUMEN

Se desarrolló un método analítico, basado en la Extracción en Fase Sólida acoplada en línea con la Cromatografía de Líquidos, para la determinación de trazas de los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB en agua. Los solutos fueron extraídos de la matriz acuosa mediante una fase reversa polimérica empacada en una pequeña precolumna, posteriormente el extracto se purificó por transferencia de los solutos ionizados a una segunda precolumna empacada con un intercambiador de aniones. Finalmente, esta última fue eluida en línea con la columna analítica para la separación y la detección en UV de los analitos. La precisión (<3%), exactitud (recuperación ~100%) y los límites de detección ($\leq 1 \mu\text{g/l}$) del método, aunados a sus posibilidades de automatización, lo hacen idóneo para el monitoreo regular de estos dos herbicidas en aguas naturales y tratadas.

ABSTRACT

An analytical method based on Solid Phase Extraction on-line coupled to Liquid Chromatography was developed for the trace determination of the herbicides 2,4-D and 2,4-DB in water. A small precolumn packed with a polymeric reversed phase was used for the extraction of the solutes from the aqueous matrix. Further cleanup of the extract was performed by the transfer of the ionized solutes to a second precolumn packed with an anion exchanger. Finally, the latter was coupled to the analytical column for the on-line elution, separation and UV detection of the analytes. The precision (< 3%), recovery (~100%) and detection limits ($\leq 1 \mu\text{g/l}$) of the method, joined to the possibility of its automation, render it as an ideal mean for the regular monitoring of these two herbicides in natural and treated waters.

INTRODUCCIÓN

Los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4-(2,4-diclorofenoxi) butanoico (2,4-DB) se encuentran entre los herbicidas más utilizados en México para el control de maleza en los campos de cereales y en las presas. En la agricultura el 2,4-D se emplea, principalmente, en cultivos de arroz, avena, caña de azúcar, centeno, espárrago, maíz, trigo y sorgo; mientras que el 2,4-DB se usa en los de alfalfa, cacahuete y soya. Estos herbicidas, por ser moderadamente hidrosolubles, se introducen en las aguas superficiales y subterráneas por el drenado natural de los suelos debido a las lluvias o por infiltración (Schmidt *et al.* 1983). Adicionalmente, en México el 2,4-D se utiliza sistemáticamente para el control de hierbas acuáticas en lagunas y presas que sirven como suministro de agua para las plantas potabilizadoras (DOF 1991).

Aunque uno de estos compuestos está clasificado como mo-

deradamente tóxico (2,4-D) y el otro como ligeramente tóxico (2,4-DB) (Van der Leeden *et al.* 1990), el estudio de su ciclo en el agua muestra una gran persistencia debida a la baja actividad de biodegradación para este tipo de contaminantes (Hamann y Kettrup 1987). Por ello, es necesario monitorear regularmente sus niveles de concentración en este medio natural. El método oficial más empleado para determinar los ácidos clorofenoxi en agua es el método 8150 de la USEPA (Agencia de Protección Ambiental de EUA, Keith 1990), que se basa en una doble extracción líquido-líquido seguida por evaporación del disolvente orgánico, derivación de los solutos y análisis por cromatografía de gases. Este método es largo y tedioso, implica una continua manipulación de la muestra y requiere del uso y posterior evaporación de volúmenes relativamente grandes de disolventes orgánicos de alta pureza.

En años recientes, el empleo de la Extracción en Fase Sólida (EFS) para la preparación de muestras acuosas ha tenido gran

éxito, tanto en la modalidad en diferido (cartuchos y discos) como en línea (precolumnas). En el caso particular de los ácidos clorofenoxi se han utilizado diversos materiales para su aislamiento y preconcentración por EFS como las resinas intercambiadoras de aniones (Ohno y Aoyama 1992), las fases apolares C-18 (Hoké *et al.* 1986, Wells y Michael 1987) y las resinas estireno-divinilbenceno no iónicas (Geerdink *et al.* 1989 y 1991, Betti *et al.* 1990, Chiron *et al.* 1994). Sin embargo, muchos de los métodos reportados presentan aún algunas desventajas. En los métodos en diferido persisten los riesgos de pérdida o contaminación de la muestra durante su manipulación y, además, no son automatizables. Los métodos en línea presentan el problema de la falta de selectividad de los adsorbentes (principalmente de las fases reversas), ya que éstos extraen y concentran no sólo a los compuestos de interés sino a toda la materia orgánica de polaridad media o baja presente en la muestra acuosa. Por lo tanto, en el cromatograma obtenido al eluir en línea la precolumna con la columna analítica se observa una matriz de fondo muy grande que dificulta o imposibilita la determinación de los herbicidas a bajos niveles de concentración.

Para resolver el problema de la baja selectividad en la EFS en línea se han propuesto dos tipos de sistemas: la elución fraccionada de la precolumna, enviando solamente la fracción que contiene los solutos de interés a la columna analítica (Geerdink *et al.* 1991) y el uso de arreglos de varias precolumnas con diferentes empaques (Nielen *et al.* 1985, Hennion *et al.* 1991). Esta última opción, ya utilizada anteriormente con ácidos clorofenoxi (Vera-Ávila *et al.* 1996), es la que se propone en este trabajo para determinar los herbicidas 2,4-D y 2,4-DB hasta niveles de concentración del orden de partes por billón ($\mu\text{g/l}$) o inferiores, según el tipo de agua que se va a analizar.

MATERIALES Y MÉTODOS

Equipo

La figura 1 muestra el diagrama del arreglo experimental utilizado, el cual está constituido por dos sistemas unidos mediante válvulas de conmutación. El sistema de análisis consta de un cromatógrafo de líquidos Gilson (P1 en la Fig. 1), equipado con dos bombas modelos 305 y 306, un mezclador dinámico modelo 811B y un medidor de presión modelo 805; una válvula de inyección Rheodyne 7125 (válvula C) con rizo de $22 \mu\text{l}$ calibrado *in situ* (Vera-Ávila *et al.* 1994); una columna analítica (RP-HPLC); un detector UV con arreglo de diodos Spectromonitor 5000 (UV) y un integrador-graficador Hewlett-Packard modelo 3396A (I). El sistema de preparación de muestra, intercalado entre el inyector y la columna analítica, consta de una bomba isocrática Beckman 210A (P2) y dos válvulas de conmutación Rheodyne 7000 (válvulas A y B), con la precolumna de concentración (RP) y la precolumna de limpieza del extracto (AX) colocadas respectivamente entre las puertas 1 y 4 de cada válvula.

Columnas y fases móviles

Las dos precolumnas utilizadas, de acero inoxidable 20 X 2

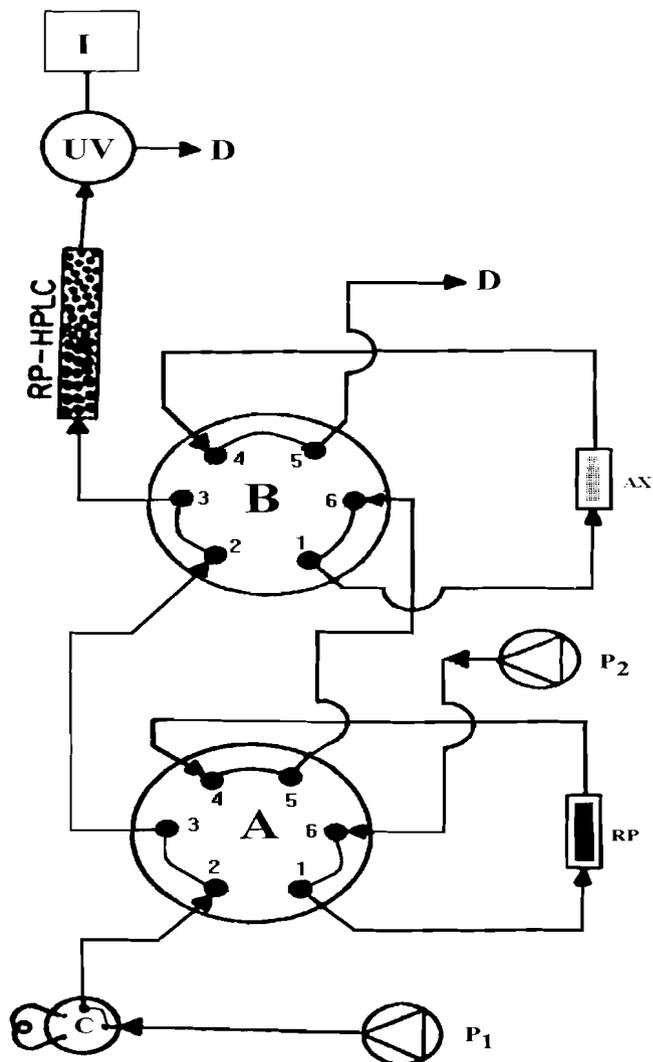


Fig. 1. Diagrama del montaje experimental utilizado para la extracción, concentración, limpieza y análisis cromatográfico de 2,4-D y 2,4-DB en agua

P₁: cromatógrafo para gradiente binario, P₂: bomba isocrática. A y B: válvulas de conmutación de alta presión, C: inyector, UV: detector, I: integrador, D: desechos, RP: precolumna de concentración (20x2 mm D.I.) empacada con fase CHP-3C de 10 μm , AX: precolumna de limpieza (20x2 mm D.I.) empacada con fase PRP-X100 de 10 μm , RP-HPLC: columna analítica (150x4.6 mm D.I.) empacada con fase Spherisorb ODS-2 de 5 μm .

mm D.I. de Upchurch Scientific, fueron empacadas en el laboratorio con una bomba Haskel modelo 29426. La precolumna de concentración (RP) se empacó a 210 bar con la fase reversa polimérica CHP-3C, 10 μm , de Mitsubishi en suspensión metanólica ligeramente acidificada. La precolumna de limpieza del extracto (AX) se empacó a 150 bar con la resina intercambiadora de aniones PRP-X100, 10 μm , de Hamilton en una suspensión metanol-NaOH (pH 13) 60:40 v/v. La columna analítica (RP-HPLC), de acero inoxidable 150 X 4.6 mm D.I., se empacó en el laboratorio a 500 bar con la fase reversa Spherisorb ODS-2, 5 μm , de Phase Separations en una suspensión etanol-acetona 50:50 v/v.

La elución y separación de los compuestos se efectuó con un gradiente binario de fase móvil a flujo de 1 ml/min y temperatura ambiente. Las fases móviles débil (fase A) y fuerte (fase B) fueron mezclas acetonitrilo-agua (pH 3.8) 20:80 v/v y 80:20 v/v, respectivamente; la parte acuosa en ambas fases contenía HClO₄ 0.01 M, HCOOH 0.01 M y NaOH para ajustar el pH al valor indicado. El programa de gradiente empleado fue: fase móvil B, 0 min = 0%, 5 min = 5%, 20 min = 35%, 21 min = 40% y 40 min = 45%.

Reactivos y disoluciones

El acetonitrilo y el metanol fueron grado cromatográfico de Prolabo. El agua utilizada para la preparación de fases móviles y muestras fortificadas para el estudio de certificación del método fue grado reactivo tipo I, obtenida de un desionizador Nanopure de Barnstead Thermolyne. Otros compuestos grado reactivo analítico fueron: hidróxido de sodio y ácido fórmico de Merck y ácido perclórico de Aldrich, todos empleados sin purificación ulterior. Los ácidos 2,4-D (pKa = 2.64) y 2,4-DB (pKa = 4.8) se adquirieron de Chem Service con un grado de pureza certificada del 99%.

Se preparó una mezcla patrón de los herbicidas a una concentración de 990 mg/l cada uno en metanol. A partir de esta disolución se prepararon las disoluciones estándar de trabajo a diferentes concentraciones de los analitos, igualmente en metanol.

Tratamiento previo de la muestra

Para la aplicación del método propuesto en este trabajo, el muestreo se realizó con un frasco ámbar de ~125 ml el cual fue llenado hasta cerca del borde con el agua problema. Antes de comenzar el análisis, se marcó el menisco del agua en el frasco para determinar posteriormente el volumen exacto de muestra y poder realizar los cálculos cuantitativos. Este método puede ser

aplicado para volúmenes de muestra entre 120 y 130 ml sin ninguna modificación.

En la **figura 2** aparece el diagrama de bloques del procedimiento para el tratamiento previo de la muestra. La filtración se realizó con una membrana de Nylon 66, de poro 0.4 μm, colocada en un sistema de filtración Millipore modelo OM027; el filtrado

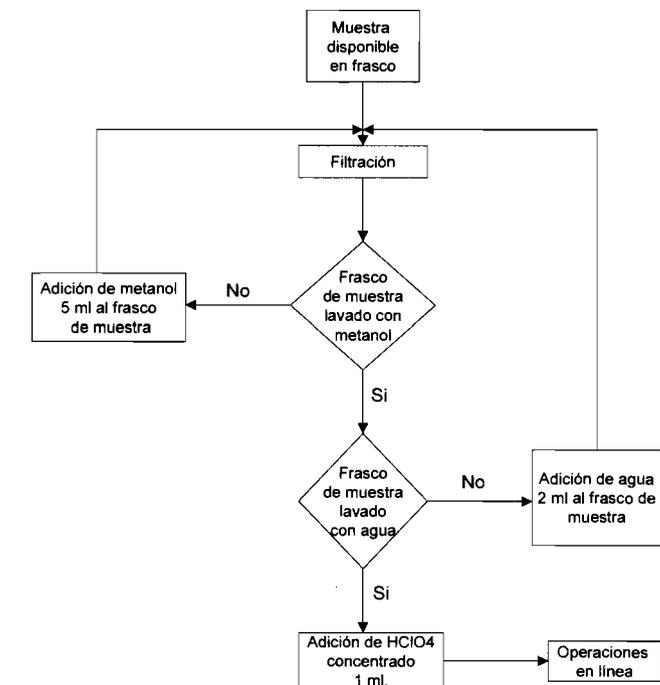


Fig. 2. Tratamiento previo de la muestra (operaciones fuera de línea)

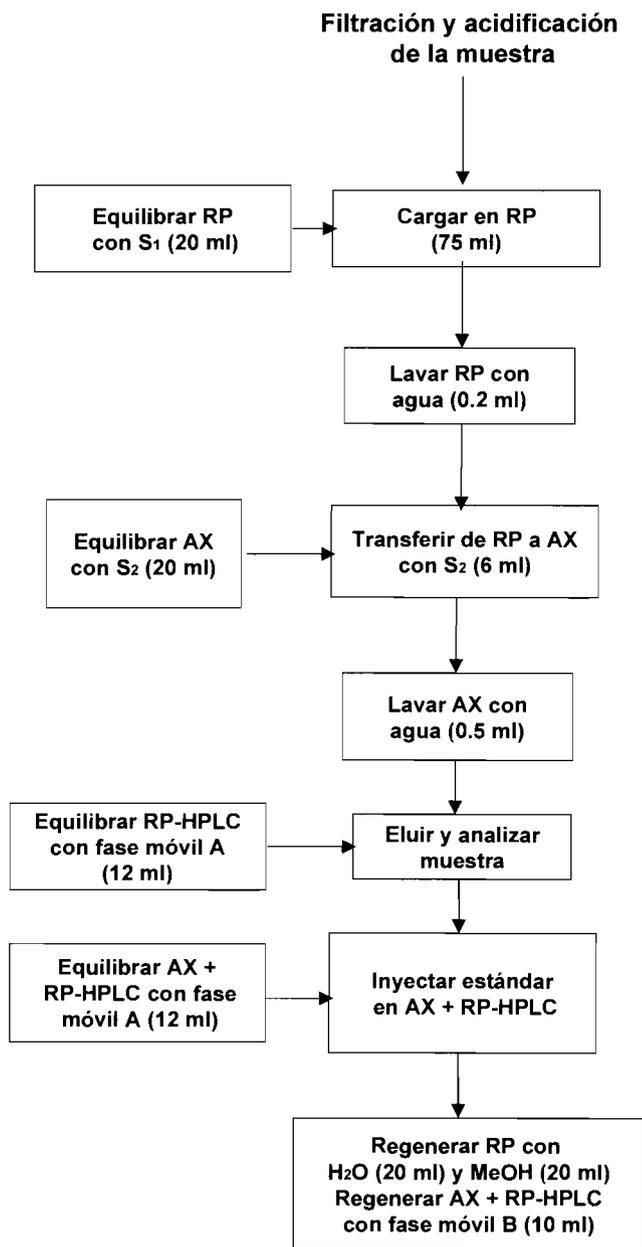


Fig. 3. Operaciones en línea para la determinación de trazas de 2,4-D y 2,4-DB en agua

RP: precolumna de concentración, AX: precolumna de limpieza, RP-HPLC: columna analítica, S₁: metanol-HClO₄ (pH 1) 5:95 v/v, S₂: acetonitrilo-NaOH (pH 10) 10:90 v/v, MeOH: metanol, fase móvil A: acetonitrilo-agua (pH 3.8) 20:80 v/v con HClO₄ 0.01 M, HCOOH 0.01 M y NaOH para ajustar el pH, Fase móvil B: acetonitrilo-agua (pH 3.8) 80:20 v/v con HClO₄ 0.01 M, HCOOH 0.01 M y NaOH para ajustar el pH

se recibió en un matraz kitazato de vidrio de 150 ml, que fue después utilizado directamente como reservorio de la bomba P2 durante las operaciones en línea. Antes de usarse, la membrana se sumergió por 1 a 2 horas en metanol, luego se colocó en el sistema de filtración y se lavó con 10 ml de metanol fresco y 20 ml de agua. Después de filtrar la muestra, el frasco se enjuagó con metanol y agua como se indica en el diagrama y ambos disolventes se pasaron a través de la misma membrana y se colectaron en el mismo matraz kitazato que el agua problema. Al terminar el tratamiento indicado en la **figura 2** se tienen, aproximadamente, 133 ml de una disolución con 3.75% de metanol y pH cercano a 1.

Concentración y análisis

El diagrama de la **figura 3** muestra las operaciones en línea efectuadas para la extracción y la concentración de los herbicidas, la limpieza del extracto y el análisis cromatográfico, empleando el arreglo experimental presentado en la **figura 1**. La posición de las válvulas A y B (carga o inyección) y el estado de las bombas P1 y P2 (en operación o detenida) durante los diferentes pasos de esta parte del método se indican en la **tabla I**.

TABLA I. POSICIÓN DE LAS VÁLVULAS «A» Y «B» Y ESTADO DE LAS BOMBAS P₁ Y P₂ DURANTE LOS DIFERENTES PASOS DEL MÉTODO

| Paso | Operación | Válvula | Válvula | Bomba | Bomba |
|------|---|---------|---------|-------|-------|
| 1 | Equilibrar RP Regenerar AX+RP-HPLC | L | I | ON | ON |
| 2 | Cargar RP Equilibrar AX+RP-HPLC y analizar estándar | L | I | ON | ON |
| 3 | Enjuagar RP con agua | L | I | OFF | ON |
| 4 | Equilibrar AX | I | L | OFF | ON |
| 5 | Transferir de RP a AX Equilibrar RP-HPLC | L | L | ON | ON |
| 6 | Enjuagar AX con agua | I | L | OFF | ON |
| 7 | Analizar muestra Regenerar RP | L | I | ON | ON |
| 8 | Regresar a 1 para la siguiente muestra | | | | |

RP: precolumna de concentración, AX: precolumna de limpieza, RP-HPLC: columna analítica, L: posición «carga», I: posición «inyección», ON: en operación, OFF: «detenida»

La bomba P1 sólo se usa para enviar las fases móviles hacia el sistema de análisis. La bomba P2 se utiliza para enviar 5 disoluciones diferentes: agua, metanol, mezcla metanol-HClO₄ (pH 1) 5:95 v/v (S1), mezcla acetonitrilo-NaOH (pH 10) 10:90 v/v (S2) y la muestra, hacia el sistema de preparación de muestra. El equilibrio de las precolumnas RP y AX (pasos 1 y 4) se realiza a flujo de 2 ml/min, el enjuague de las mismas con agua (pasos 3 y 7) se efectúa a 0.2 ml/min, las demás operaciones se llevan a cabo a 1 ml/min. En la **tabla I** se observa que algunas operaciones se realizan simultáneamente (en los pasos 1, 2, 5 y 7) para disminuir el tiempo de análisis; en estos casos, al terminar una de las operaciones, la bomba correspondiente se detiene y se espera a que la otra operación termine antes de proceder con el siguiente paso. Al terminar cada paso, la cabeza de la bomba P2 y las tuberías del sistema de preparación de la muestra deben enjuagarse y llenar-

se con la siguiente disolución a utilizar, lo cual se lleva a cabo bombeando con P2 la nueva disolución durante 3 minutos a un flujo de 5 ml/min y manteniendo las válvulas A y B en posición «inyección» y la bomba P1 detenida.

El conjunto de operaciones en línea se puede trabajar en series de ciclos continuos para el análisis rutinario de muestras. En cada ciclo están incluidas operaciones de regeneración de las precolumnas y la columna analítica para eliminar compuestos presentes en las muestras que hayan podido quedar atrapados en ellas y así evitar problemas de contaminación cruzada. Para mayor protección de las columnas AX y RP-HPLC se recomienda, al finalizar el día de trabajo, lavarlas con 20 ml de agua y 20 ml de una mezcla acetonitrilo-agua 80:20 v/v, sin sales. Asimismo, para mantener la capacidad de retención de la precolumna AX es necesario reactivarla, después de cada 10 muestras analizadas, con 20 ml de una disolución acuosa de NaOH a pH 12 seguidos por un abundante lavado con agua. Esta operación debe realizarse conectando la precolumna directamente a la bomba isocrática, ya que la disolución de NaOH a pH 12 daña las válvulas de conmutación.

Las operaciones en línea pueden ser completamente automatizadas adaptando una válvula selectora de baja presión con 5 canales a la entrada de la bomba isocrática. Todas las válvulas, incluyendo el inyector, deberán ser neumáticas y deberán estar controladas por un microprocesador al igual que el detector y las bombas P1 y P2.

La duración total del análisis, incluyendo el llenado y enjuague de tuberías con cada nueva disolución (no indicado en la **Tabla 1**), es de aproximadamente 3 horas. Durante este tiempo el analista puede realizar el tratamiento previo de las muestras (filtración y acidificación) si las operaciones en línea están automatizadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Operaciones fuera de línea

Los ácidos 2,4-D y 2,4-DB en su forma molecular son bastante hidrofóbicos y tienden a adsorberse sobre la superficie de cualquier material que se encuentre en contacto con sus disoluciones acuosas (Walsh *et al.* 1988). De hecho, en un trabajo previo (Vera-Ávila *et al.* 1996) se comprobó que el 2,4-DB puede adsorberse sobre los filtros o las paredes internas de los recipientes que contienen la muestra, aún estando en su forma ionizada. Por ello, es necesario tener algunas precauciones durante la preparación de la muestra para evitar pérdidas de los analitos. Después de filtrar la muestra deben enjuagarse cuidadosamente con metanol, el frasco y la membrana de filtración, para recuperar solutos adsorbidos y un poco de agua para arrastrar los últimos residuos del disolvente orgánico; ambos disolventes deben añadirse a la muestra. Se debe utilizar un volumen pequeño de los disolventes de enjuague para no diluir demasiado la muestra y no limitar, en operaciones posteriores, el volumen de ésta que puede ser cargado en la precolumna RP. Por otra parte, se ha observado que en presencia de disolventes

orgánicos, la membrana de filtración de Nylon 66 libera algunos compuestos que pueden interferir posteriormente en el análisis de los solutos de interés. Si la membrana se trata previamente como se indicó en la parte de «materiales y métodos» se evitan estos problemas de contaminación. La adición del ácido se realiza en el matraz kitazato que contiene la muestra y los disolventes de enjuague; el pequeño contenido de metanol en esta mezcla permite reducir drásticamente la tendencia de los solutos moleculares a adsorberse en las paredes del recipiente.

Los resultados de recuperación de los solutos, reportados posteriormente, demuestran que con las precauciones mencionadas se puede evitar totalmente la pérdida de analitos durante el tratamiento inicial de la muestra.

Análisis cromatográfico

Los ácidos 2,4-D y 2,4-DB difieren mucho en hidrofobicidad y por lo tanto en retención sobre una columna de fase reversa. Adicionalmente, el soluto más hidrofóbico (2,4-DB) es también el ácido más débil, por lo que no es posible lograr disminuir la diferencia en retención de los dos analitos mediante ajustes del pH de la fase móvil. Por otra parte, es bien sabido que en el análisis de aguas naturales siempre se obtiene al inicio del cromatograma un gran «pico de matriz» que desciende lentamente a la línea base y puede interferir en la determinación de los solutos si estos eluyen a tiempos de retención muy cortos. Considerando lo anterior, para obtener picos estrechos y simétricos

y controlar adecuadamente los tiempos de elución de los solutos, fue necesario realizar la separación cromatográfica con un gradiente de elución. El programa de gradiente propuesto en la parte experimental inicia con un eluyente relativamente débil y una pendiente de gradiente pequeña para eluir al «pico de matriz» y retardar al 2,4-D; a los 20 minutos la pendiente aumenta rápidamente por un minuto y luego se mantiene una composición casi constante lo que permite eluir al 2,4-DB y evitar la interferencia de los «picos fantasma» o «picos de gradiente», que se observan comúnmente al final de los cromatogramas cuando hay cambios bruscos en la composición del eluyente. En la **figura 4** se muestra la forma del gradiente usado y la separación obtenida al inyectar un estándar de los ácidos clorofenoxi.

La inyección de los estándares siempre se debe hacer con la precolumna AX acoplada a la columna analítica, para tener condiciones idénticas a las del análisis de las muestras. Sin embargo, el acoplamiento de dos fases estacionarias diferentes con mecanismos de retención también distintos, puede provocar la deformación y el ensanchamiento de los picos. En este trabajo lo anterior se evitó con el gradiente de elución diseñado y añadiendo percloratos a las fases móviles. El efecto del perclorato se atribuye a la fuerte afinidad de este ion por los intercambiadores de aniones, lo que permite desplazar más fácilmente a los solutos de este soporte disminuyendo el coleo y evitando el desdoblamiento de los picos.

Los ácidos clorofenoxi presentan máximos de absorción en el

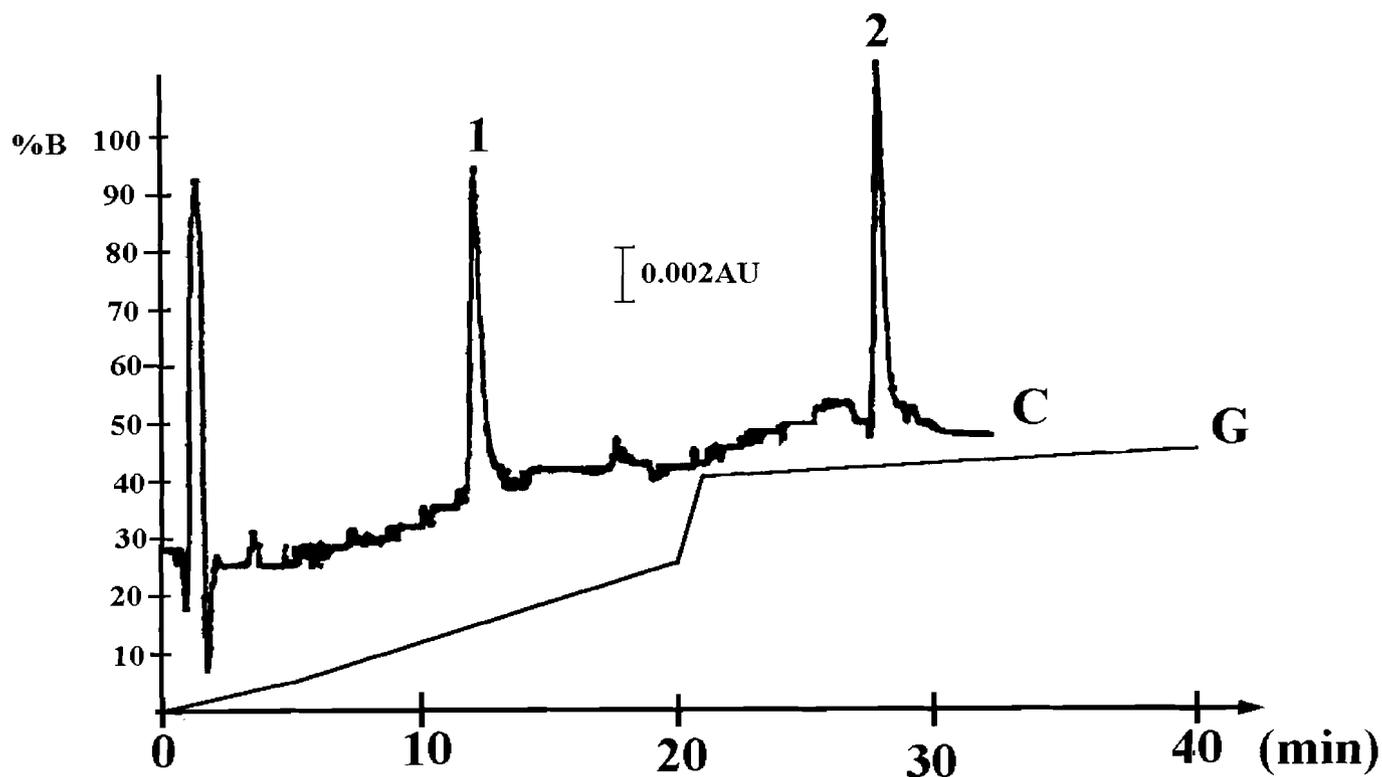


Fig. 4. Separación cromatográfica (S) y gradiente de elución (G)

Solutos: (1) 2,4-D, (2) 2,4-DB; gradiente empleado: fase móvil B, 0 min = 0%, 5 min = 5%, 20 min = 35%, 21 min = 40% y 40 min = 45%; velocidad de flujo 1 ml/min; columna analítica y precolumna de intercambio de aniones acopladas; detección a 280 nm; estándar conteniendo 3.36 mg/l de cada herbicida; volumen inyectado 22 μ l

UV a 230 y 280 nm con una relación 9:1 en el coeficiente de extinción molecular entre estas dos longitudes de onda (Betti *et al.* 1990). En este trabajo se optó por seleccionar la longitud de onda de 280 nm por dos razones: para tener una detección más selectiva y para que la deriva de la línea base debida al gradiente fuera menor y con ello tener mayor precisión en la integración de los picos.

Operaciones en línea y certificación del método

La sensibilidad del método depende en gran medida del volumen de muestra cargado en la precolumna de extracción y concentración (precolumna RP). Este volumen depende a su vez de la solvofobicidad de los analitos en la muestra preparada; entre más grande es la solvofobicidad, mayor es la retención en la fase reversa polimérica y también es mayor el volumen de muestra que puede cargarse sin que se fuguen los compuestos de interés de la precolumna. Los estudios preliminares realizados con una disolución de 2,4-D en agua grado reactivo acidificada a pH 1 mostraron que es posible cargar hasta 200 ml sin que haya pérdida del soluto. Sin embargo, al añadir un poco de metanol a la muestra y agregar otros compuestos se observó una disminución notable del volumen de fuga del 2,4-D. Dado que las muestras de aguas superficiales y subterráneas contienen generalmente altas concentraciones de compuestos orgánicos diversos y, además, durante su tratamiento previo es necesario añadir metanol, se optó por limitar el volumen de carga a 75 ml. Con esta condición no se tuvo evidencia de fuga de los solutos en ninguna de las muestras analizadas posteriormente.

El paso de transferencia de los analitos de la precolumna RP a la precolumna AX es el más delicado y difícil de optimizar. El volumen y la fuerza del disolvente utilizado para la transferencia deben ser adecuados para desorber los solutos de la primera precolumna sin provocar su fuga de la segunda. Al mismo tiempo, estos parámetros deben de ser suficientemente pequeños para no comprometer la selectividad del método al transferir otros compuestos interferentes que hayan quedado atrapados en la primera precolumna. Considerando que la retención en la precolumna AX es debida a interacciones eléctricas de los solutos ionizados y a efectos hidrofóbicos, mientras que la retención en la precolumna RP es debida sólo a estos últimos, se ensayaron diversos volúmenes de mezclas acetonitrilo-NaOH (pH 10) en diferentes proporciones para la transferencia. De las condiciones probadas se seleccionó aquella que permitió obtener los resultados deseados con el mínimo volumen de mezcla (6 ml) y la menor proporción (10%) de acetonitrilo.

La optimización de condiciones en cada paso del método se realizó utilizando el montaje completo (Fig. 1) y monitoreando en cada ensayo el porcentaje de recuperación de los solutos. Éste se determinó por comparación de las áreas de los picos obtenidos al analizar una muestra con las condiciones del ensayo y los logrados por inyección directa de una cantidad conocida de los solutos. La cantidad inyectada se calculó multiplicando el volumen de inyección por la concentración de los solutos en el estándar, por lo que se requirió calibrar previamente el inyector. El porcentaje de recupera-

ción (% R) para cada soluto se calcula mediante la relación siguiente:

$$\% R = (A_m \times Q_s \times 100) / (A_s \times Q_m) \quad (1)$$

donde, A_m es el área del pico del soluto en la muestra analizada, A_s es el área del pico del soluto obtenido al inyectar el estándar, Q_m es la cantidad de soluto teóricamente presente en el volumen de muestra analizado (volumen cargado en la precolumna RP) y Q_s es la cantidad de soluto inyectado. Para una mayor precisión en la determinación de % R, la cantidad inyectada debe ser similar a la cantidad teóricamente analizada, por lo que para cada ensayo se debe inyectar un estándar de concentración apropiada con respecto a la concentración y el volumen de carga de la muestra a analizar.

Los resultados de la evaluación del método finalmente establecido se reportan en las tablas II y III. La tabla II muestra la exactitud y la precisión del método, medidas como recuperación de los solutos y desviación estándar relativa de recuperación, obtenidas por el análisis de siete réplicas de agua grado reactivo fortificada a 4.67 µg/l de cada herbicida. A un nivel de incertidumbre del 5%, la recuperación de los dos solutos es estadísticamente igual al 100%. La precisión obtenida, inferior al 3%, es excelente para el nivel de concentración estudiado.

TABLA II. EXACTITUD Y PRECISIÓN UNINIVEL DEL MÉTODO. LÍMITE DE DETECCIÓN

| Compuesto | R (%) | DER (%) | LDM (µg/l) |
|-----------|-------|---------|------------|
| 2,4-D | 100.5 | 2.2 | 0.3 |
| 2,4-DB | 101.6 | 2.5 | 0.4 |

Número de réplicas: 7 Concentración de solutos: 4.67 µg/l
R: recuperación, DER: desviación estándar relativa de la recuperación
LDM: límite de detección del método

La linealidad y la exactitud multinivel del método se evaluaron por el análisis de 9 muestras de agua grado reactivo fortificadas a diferentes concentraciones de los analitos, en el intervalo de 0.5 a 80 µg/l. Para los dos solutos, la relación Respuesta vs. Concentración presentó una tendencia lineal con un coeficiente de correlación de 0.998 y una ordenada al origen estadísticamente igual a cero. La tabla III presenta los resultados de estos experimentos como relaciones de Cantidad Recuperada vs. Cantidad Teóricamente Analizada. A un nivel de incertidumbre del 5%, la ordenada al origen de las rectas que representan esta relación es igual a cero y la pendiente igual a uno. Esto significa que, con las muestras de agua grado reactivo fortificadas, el método no presenta evidencias de errores sistemáticos y las recuperaciones del 2,4-D y 2,4-DB son del 100% en el intervalo de concentraciones estudiado.

TABLA III. EXACTITUD MULTINIVEL DEL MÉTODO (CANTIDAD RECUPERADA VS CANTIDAD TEÓRICAMENTE ANALIZADA)

| Compuesto | OO (µg) | Pendiente | r | Intervalo (µg) |
|-----------|---------|-----------|--------|----------------|
| 2,4-D | 0.037 | 1.013 | 0.9994 | 0.037-7.466 |
| 2,4-DB | 0.006 | 1.012 | 0.9998 | 0.037-7.466 |

Número de muestras analizadas: 9
OO: ordenada al origen, r: coeficiente de correlación

Para evaluar el límite de detección del método (LDM) se utilizó el procedimiento recomendado por la USEPA (Keith 1991). Dicho procedimiento se basa en el análisis de al menos 7 muestras idénticas, fortificadas a una concentración de analito cercana al límite de detección esperado. El límite de detección del método se estima a partir de la ecuación:

$$\text{LDM} = t_{(n-1, \alpha=0.99)} \times S \quad (2)$$

donde, S es la desviación estándar de los valores de concentración obtenidos ($\mu\text{g/l}$) y $t_{(n-1, \alpha=0.99)}$ es el valor de la t de Student para un nivel de confianza del 99% y n-1 grados de libertad, siendo n el número de réplicas. La **tabla II** muestra los límites de detección del método obtenidos utilizando los datos del análisis de las 7 réplicas fortificadas a $4.67 \mu\text{g/l}$. Estos resultados muestran la gran sensibilidad del método que permite determinar con certeza concentraciones inferiores a una parte por billón ($1 \mu\text{g/l}$)

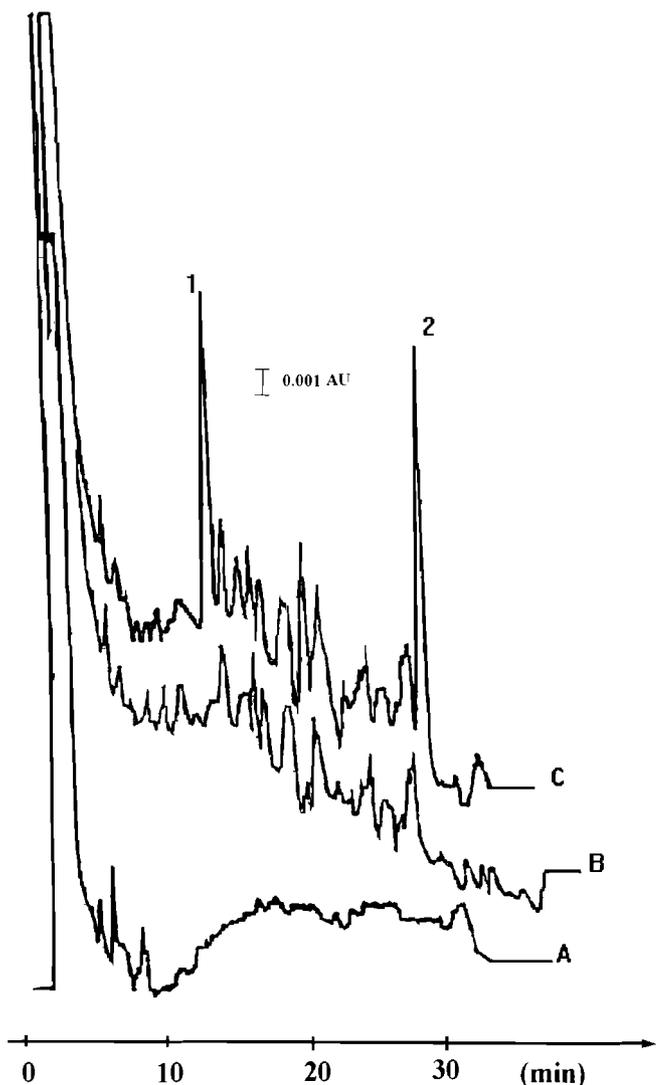


Fig. 5. Cromatogramas del análisis de agua de pozo. A: blanco de agua grado reactivo, B: blanco de agua de pozo, C: agua de pozo fortificada a $2 \mu\text{g/l}$ de cada herbicida. Solutos: (1) 2,4-D, (2) 2,4-DB.

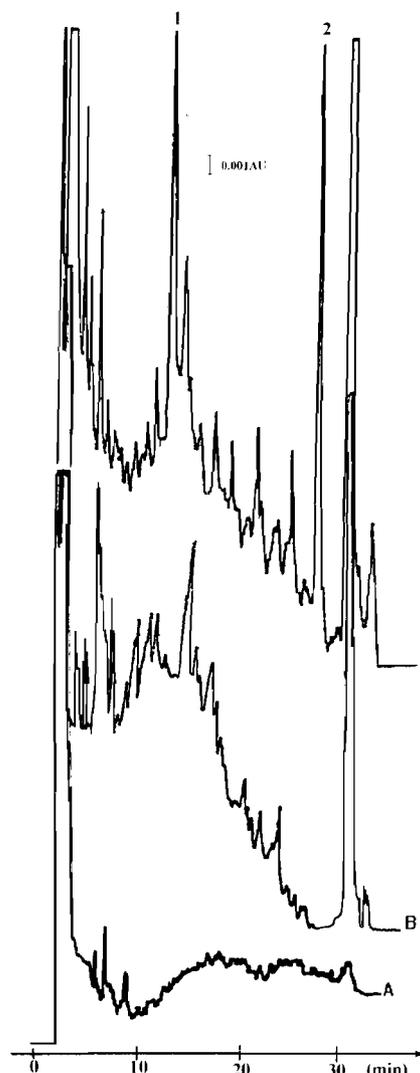


Fig. 6. Cromatogramas del análisis de agua de río. A: blanco de agua grado reactivo, B: blanco de agua de río, C: agua de río fortificada a $4 \mu\text{g/l}$ de cada herbicida. Solutos: (1) 2,4-D, (2) 2,4-DB.

en aguas relativamente limpias, como el agua de beber o la de grifo.

Análisis de aguas superficiales y subterráneas

La aplicabilidad del método para el análisis de matrices acuosas más complejas se probó con una muestra de agua de pozo, colectada en una zona agrícola cercana a la localidad de Texcoco, Estado de México y con una muestra de agua de río de la misma zona. Ambas aguas son utilizadas para riego.

Las **figuras 5 y 6** presentan los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras blanco, las mismas muestras dopadas a $2 \mu\text{g/l}$ (agua de pozo) y $4 \mu\text{g/l}$ (agua de río) y, por comparación, un blanco de agua grado reactivo analizada bajo las mismas condiciones. Aunque los cromatogramas de las muestras blanco presentan varias señales, ninguna de ellas corresponde a los herbicidas estudiados, lo que se corrobora al comparar con los cromatogramas de las muestras fortificadas. Por tanto, se deduce que el 2,4-D y el 2,4-DB no están presentes, en cantidades

detectables, en el agua de pozo ni en la de río. No obstante, los resultados del análisis de las muestras fortificadas (**Tabla IV**) permiten concluir que en este tipo de matrices acuosas sería posible determinar con exactitud bajas concentraciones de los herbicidas. De hecho, el límite de detección del método en estas aguas, estimado con base en el ruido de fondo, es de alrededor de 1 µg/l para ambos herbicidas.

TABLA IV. ANÁLISIS DE AGUA DE POZO Y AGUA DE RÍO

| Compuesto | Agua de pozo R (%) | Agua de río R (%) |
|-----------|-----------------------|----------------------|
| 2,4-D | 99.1 | 102.3 |
| 2,4-DB | 99.8 | 99.5 |

Agua de pozo fortificada a 2 µg/l de cada herbicida

Agua de río fortificada a 4 µg/l de cada herbicida

R: recuperación

En la **tabla V** se comparan las recuperaciones y los límites de detección del método desarrollado con algunos resultados, descritos en la literatura, que fueron obtenidos utilizando otros métodos.

TABLA V. DETERMINACIÓN DE 2,4-D Y 2,4-DB EN MUESTRAS DE AGUA. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

| Compuesto | Muestra (método) | R (%) | LDM (µg/l) | Referencia |
|-----------|-------------------------------|----------|---------------|--------------------------------|
| 2,4-D | Agua de río (EFS diferido) | 80 | 1 | Ohno y Aoyama 1992 |
| 2,4-D | Agua de río (EFS diferido) | 92 | - | Wells y Michael 1987 |
| 2,4-D | Agua pura (EFS diferido) | 80 | 10 | Hoké <i>et al.</i> 1986 |
| 2,4-D | Agua de río (EFS en línea) | 74-82 | 0.05 | Chiron <i>et al.</i> 1994 |
| 2,4-D | Agua de río | 103 | - | Hamann y Kettrup 1987 |
| 2,4-DB | (ELL) | 100 | - | |
| 2,4-D | Agua de río | >85 | 0.05-0.1 | Geerdink <i>et al.</i> 1991 |
| 2,4-DB | (EFS en línea) | | | |
| 2,4-D | Agua pura | 101 | 10 | Betti <i>et al.</i> 1990 |
| 2,4-DB | (EFS diferido) | 99 | 50 | |
| 2,4-D | Agua pura | 93 | 0.91 | Keith 1991 |
| 2,4-DB | (ELL) | 75 | 1.2 | (Método 8150 USEPA) |
| 2,4-D | Agua pura | 100 | 0.3 | Este |
| 2,4-DB | (EFS en línea) | 101 | 0.4 | trabajo |
| 2,4-D | Agua de pozo | 99-102 | 1 | Este |
| 2,4-DB | y río | 99-100 | 1 | trabajo |
| | (EFS en línea) | | | |

ELL: extracción líquido-líquido. EFS: extracción en fase sólida.

R: recuperación. LDM: límite de detección del método

CONCLUSIONES

Se desarrolló un método en línea, simple, relativamente rápido y casi totalmente automatizable, para la determinación de trazas de 2,4-D y 2,4-DB en diferentes matrices acuosas. En este méto-

do la manipulación de la muestra es mínima, lo que reduce los riesgos para el analista y las posibilidades de contaminación de la muestra o pérdida de los analitos durante el proceso. Adicionalmente, el método resulta bastante económico para los análisis de rutina ya que no requiere del consumo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos de alta pureza y las precolumnas utilizadas en la preparación de la muestra son regenerables, muy durables y, eventualmente, pueden reempacarse con alrededor de 30 miligramos de los adsorbentes. La calidad de los resultados obtenidos por este método, en lo que se refiere a exactitud, precisión y límites de detección, se compara favorablemente con la mayoría de los métodos reportados para la determinación de 2,4-D y 2,4-DB en agua.

AGRADECIMIENTOS

Para el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo financiero de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, Universidad Nacional Autónoma de México y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México.

REFERENCIAS

- Betti A., Lodi G. y Coppi S. (1990). Separation and determination of acidic herbicides on a PRP-1 polymeric column. *J. Chromatogr.* 513, 219-225.
- Chiron S., Martínez E. y Barceló D. (1994). On-line and off-line sample preparation of acidic herbicides and bentazone transformation products in estuarine waters. *J. Chromatogr.* 665, 283-293.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) (1991). Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Catálogo oficial de plaguicidas.
- Geerdink R.B., Van Balkom C.A.A. y Brouwer H.J. (1989). Determination of phenoxyacid herbicides in water. Polymeric pre-column preconcentration and tetrabutylammonium ion-pair separation on a PRP-1 column. *J. Chromatogr.* 481, 275-285.
- Geerdink R.B., Graumans A.M.B.C. y Viveen J. (1991). Determination of phenoxyacid herbicides in water. *J. Chromatogr.* 547, 478-483.
- Hamann R. y Kettrup A. (1987). Determination of phenoxy acid herbicides in water samples. *Chemosphere* 16, 527-536.
- Hennion M.-C., Subra P., Coquart V. y Rosset R. (1991). Determination of polar aniline derivatives in aqueous environmental samples using on-line liquid chromatographic preconcentration techniques. *Fresenius J. Anal. Chem.* 339, 488-493.
- Hoké S.H., Brueggeman E.E., Baxter L.J. y Trybus T. (1986). Determination of phenoxy acid herbicides using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 357, 429-432.

- Keith L.H. (Ed.) (1991). *Compilation of EPA's sampling and analysis methods*. Lewis Pub., Boca Raton, pp 513-518.
- Nielen M.W.F., Brinkman U.A.Th. y Frei R.W. (1985). Industrial wastewater analysis by liquid chromatography with precolumn technology and diode-array detection. *Anal. Chem.* *57*, 806-810.
- Ohno H. y Aoyama T. (1992). Simultaneous determination of asulam and 4 kinds of phenoxy acid herbicides in water by high performance liquid chromatography. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health* *38*, 202-208.
- Schmidt M., Hillawsky A., Maasfeld W. y Kettrup A. (1983). Chromatographic investigation of the behavior of dichlobenil and 2,4,5-T in water during slow sand filtration. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* *13*, 289-297.
- Van der Leeden F., Troise F.L. y Todd D.K. (Eds.) (1990). *The water encyclopedia*. Lewis Pub., Michigan, 2a. ed., Capítulo VI, pp 441-444.
- Vera-Avila L.E. y Covarrubias R. (1994). On-line trace enrichment and HPLC determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* *56*, 33-47.
- Vera-Avila L.E., Padilla C.P., Hernández M.G. y Meraz J.L.L. (1996). On-line preconcentration, cleanup and high-performance liquid chromatographic determination of chlorophenoxy acid herbicides in water. *J. Chromatogr. A* *731*, 115-122.
- Walsh M.E., Knapp L.K. y Jenkins T.F. (1988). Evaluation of disposable membrane filter units for sorptive losses and sample contamination. *Environ. Technol. Lett.* *9*, 45-52.
- Wells M.J.M. y Michael J.L. (1987). Recovery of picloram and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid from aqueous samples by reversed-phase solid-phase extraction. *Anal. Chem.* *59*, 1739-1742.