



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Caracterización y determinación de sales de amonio
cuaternario por técnicas cromatográficas,
electroforéticas y espectrometría de masas**

Oscar Núñez Burcio



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

U	REGISTRE GENERAL
	Facultat de Química - Deganat
B	14 JUL. 2004
	Entrada: 2004 / 021 - 63

**CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE SALES DE AMONIO
CUATERNARIO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS, ELECTROFORÉTICAS
Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS**

Memoria presentada por el Sr. Oscar Núñez Burcio
para aspirar al grado de Doctor en Ciencias Químicas
por la Universitat de Barcelona



Directores: Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet y Dra. Encarnación Moyano Morcillo

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700856060

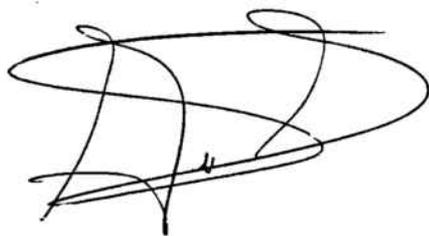
Barcelona, Julio de 2004

La Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet, Catedrática del Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, y la Dra. Encarnación Moyano Morcillo, Profesora Titular del mismo Departamento,

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación, titulado “CARACTERIZACIÓN Y DETERMINACIÓN DE SALES DE AMONIO CUATERNARIO POR TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS, ELECTROFORÉTICAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS”, ha sido realizado bajo nuestra dirección por el Sr. Oscar Núñez Burcio en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona, y que todos los resultados presentados son fruto de las experiencias realizadas por el citado doctorando.

Y para que así conste, firmamos el presente documento en Barcelona, a 9 de Julio de 2004.



Dra. Maria Teresa Galceran i Huguet



Dra. Encarnación Moyano Morcillo

"When you want something, all the universe conspires to help you achieve it", the old king had said.

But the old king hadn't said anything about being robbed, or about endless deserts, or about people who know what their dreams are but don't want to realize them. The old king hadn't told him that the Pyramids were just a pile of stones, or that anyone could build one in his backyard. And he had forgotten to mention that, when you have enough money to buy a flock larger than the one you had before, you should buy it.

Paulo Coelho, *"The Alchemist"*

A mis padres y a mi hermana
con cariño,

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Oscar", with a long horizontal flourish underneath.

AGRADECIMIENTOS

Durante estos últimos años han sido muchas las personas que han trabajado y compartido conmigo el desarrollo de esta tesis, por lo que quiero empezar dando las gracias a todos antes de que me olvide de alguien.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directoras de tesis, la Dra. Maria Teresa Galceran y la Dra. Encarnación Moyano, en especial por los esfuerzos realizados en la corrección de la presente memoria para poder ajustarnos a unos plazos muy ajustados. Maite, quiero agradecerte, en especial, que me propusieras la posibilidad de colaborar con el grupo del Profesor Shigeru Terabe. De aquí surgió una estancia de seis meses en Japón que se convirtió en uno de los mejores momentos de mi tesis.

I would like to thank Professor Terabe to accept me in his lab and the help he provided to me in all the aspects related to my stay in Japan. I think you are the best person I have ever met and I enjoyed working with you and your colleagues. Thank you very much to Jong-Bok Kim for his help with my experiments and to all the members of Professor Terabe's Lab, especially to Professor Otsuka, Michal, Weng, Philip, Li, Bifeng Liu and Zhen Liu, who did very easy my stay in a so much different, but exciting, country. Also I would like to thank all the other members of Terabe's lab which who I enjoyed a lot of activities such as some dinners in the Okonomiyaki restaurant and the Yumura-Onsen Spa & Tottori Dune trip, so thank you to Professor Matsubara, Yuji Tachibana, Yuhei Fujiki, Naoko Inoue, Wato Yamamoto, Chika Saeki, Motoaki Osaki, Yoichi Sera and the students Mieko Matsumura, Mieko Watanabe, Ai Sugitani, Yosuke Ishiguro and Miki Iba.

Really, I enjoyed a lot working with all of you and living in your country. I have been twice in Japan and I hope there will be more opportunities to visit you and your fascinating country.

Quiero dar también las gracias a todos los miembros del grupo de cromatografía, electroforesis capilar y espectrometría de masas. Realmente me lo he pasado muy bien trabajando con vosotros y, sinceramente, todo habría sido muy diferente si no hubiéseis estado. En especial a Vicky y a Sònia, ya que juntos fundamos el "Grupo Electroforético", y nos hemos ayudado mutuamente en la resolución de los frecuentes problemas del mundo de la electroforesis. Además, sois las personas con quien mejor me he llevado en el grupo. Sinceramente, gracias de todo corazón. A los que habéis estado en el grupo durante gran parte de mi tesis, Rocío, Nieves, Ramsés, Pablo, Elena, Eli, Rosa, Jordi y Jessica, y a aquellos que han estado menos tiempo, Olga, Javi (cubano), Javi Leonís, Magda, David, Alberto, Núria Donoso, Esther, Maite García, Erika, Soubhi, Betta, Andrea y Bianca (y aquellos de los que seguro me olvido), gracias por haberme aguantado y por los buenos momentos que hemos pasado juntos. También a los miembros de otros grupos del

departamento que han hecho más fácil la convivencia durante estos años, Xavi Saurina, Rosa Latorre, Boris, Alberto, Emma...

A mis compañeros de la carrera y que han continuado la andadura de una tesis doctoral, Jose, Pili, Irene y Marta, muchas gracias por todo. Jose, espero que todo te vaya bien en EEUU, aunque estoy convencido de que así será. Pili, hemos compartido muchísimos momentos y algunos difícilillos. Espero que las cosas te vayan bien y sigue luchando por sacar adelante la tesis. Irene, me alegro muchísimo que desde aquel primer momento en que oíste mi nombre y tu reacción fue: ¿Quién es ese Oscar y por qué le invitas? (recuerdas?), ahora seamos tan buenos amigos. Espero que no perdamos el contacto nunca y que te vaya bien en tu nuevo futuro docente. Marta, primero de todo, gracias por dar de comer a mis gatitos y no dejar que destrozasen el ático. Ya sabes que tendrás siempre las puertas abiertas. Eres, realmente, como mi segunda hermana y espero que nuestra relación siga siempre igual. En resumen, gracias de todo corazón y espero que continuemos quedando como hasta ahora.

Mónica, Jose, Ana y Javi, quiero daros las gracias por haber hecho todo lo posible por no perder el contacto conmigo y por invitarme a disfrutar con vosotros momentos muy felices. Creo que sois los mejores amigos que tengo en Hospitalet y espero que sigamos reuniéndonos de tanto en tanto. Muchas gracias por todo.

Finalmente quiero dar las gracias a mis padres porque, aunque no lo haya hecho patente con frecuencia, realmente es gracias a ellos que he podido estudiar una carrera y realizar la tesis doctoral y, sinceramente, les debo todo. A mi hermana, gracias también por ser como eres y por aguantar todos los royos de trabajo que te he contado. A vosotros, os dedico la presente memoria.

ÍNDICE

	<u>Página</u>
PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA	1
1. OBJETIVOS	3
2. ESTRUCTURA	4
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. SALES DE AMONIO CUATERNARIO CON CARÁCTER HERBICIDA: LOS CUATS	9
1.1.1. Propiedades y características	11
1.1.2. Toxicidad	15
1.1.3. Legislación	18
1.1.4. Metodologías analíticas	20
1.1.4.1. Métodos de extracción y preconcentración	21
1.1.4.2. Métodos de determinación	29
1.2. SALES DE AMONIO CUATERNARIO CON CARÁCTER BIOCIDA: EL CLORURO DE BENZALCÓNIO	55
1.2.1. Introducción	55
1.2.2. Toxicidad	58
1.2.3. Legislación	60
1.2.4. Metodologías analíticas	61
CAPÍTULO 2. ELECTROFORESIS CAPILAR	71
2.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO	73
2.2. MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN EN ELECTROFORESIS CAPILAR	76
2.2.1. Introducción	76
2.2.1.1. Métodos de preconcentración <i>on-line</i>	77
2.2.1.2. Comparación de los métodos de preconcentración <i>on-line</i>	87
2.2.2. Trabajo experimental	89
2.2.2.1. Estudio previo	89
2.2.2.2. <i>Stacking</i> con eliminación de matriz	93
2.2.2.3. Artículo I: <i>Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electrophoresis</i>	97

	<u>Página</u>
2.2.2.4. Artículo II: <i>Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water</i>	109
2.2.2.5. Cromatografía electrocinética micelar. Aplicación de los métodos de preconcentración <i>on-line</i> de <i>sweeping</i> -MEKC y CSEI- <i>sweeping</i> -MEKC	119
2.2.2.6. Artículo III: <i>Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection</i>	125
2.3. ELECTROFORESIS CAPILAR-ESPECTROMETRÍA DE MASAS	139
2.3.1. Introducción	139
2.3.2. Trabajo experimental	143
2.3.2.1. Experimental adicional	144
2.3.2.4. Artículo IV: <i>Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides</i>	151
2.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	167
2.4.1. Métodos de preconcentración <i>on-line</i>	167
2.4.2. Acoplamiento CE-ESI-MS	173
2.5. CONCLUSIONES	177
CAPÍTULO 3. ESTUDIOS DE FRAGMENTACIÓN	181
3.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO	183
3.2. INTRODUCCIÓN	184
3.3. TRABAJO EXPERIMENTAL	189
3.3.1. Artículo V: <i>High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides</i>	193
3.3.2. Resultados experimentales adicionales	205
3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	210
3.5. CONCLUSIONES	218

	<u>Página</u>
CAPÍTULO 4. CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS-ESPECTROMETRÍA DE MASAS	221
4.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO	223
4.2. DETERMINACIÓN DE CUATS POR LC-MS	225
4.2.1. Introducción	225
4.2.2. Trabajo experimental	228
4.2.2.1. Optimización de las condiciones de trabajo	228
4.2.2.2. Artículo VI: <i>Accurate mass measurement versus tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water</i>	235
4.2.3. Discusión de resultados	249
4.3. DETERMINACIÓN DE CLORURO DE BENZALCONIO Y DDMAC POR LC-MS	259
4.3.1. Introducción	259
4.3.2. Trabajo experimental	262
4.3.2.1. Optimización de las condiciones de trabajo	263
4.3.2.2. Artículo VII: <i>Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry</i>	265
4.3.3. Discusión de resultados	283
4.4. CONCLUSIONES	287
CONCLUSIONES DE LA MEMORIA	291
BIBLIOGRAFÍA	295
ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	317

PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA

1. OBJETIVOS

2. ESTRUCTURA

1. OBJETIVOS

Las características físico-químicas de las sales de amonio cuaternario las hace adecuadas para diversas aplicaciones. Así, estas sustancias se utilizan como tensioactivos catiónicos, plaguicidas o biocidas. En esta memoria se estudia la familia de compuestos que se utilizan como herbicidas y reguladores del crecimiento vegetal que se conocen con el nombre genérico de cuats, así como algunas sales de amonio cuaternario de cadena lineal (C₁₂-C₁₈) que se emplean como biocidas.

El objetivo global de la presente memoria es el establecimiento de metodología analítica lo suficientemente selectiva y sensible como para permitir la cuantificación y caracterización de estas sales de amonio cuaternario.

Este objetivo general se ha concretado en los siguientes puntos:

- Establecer métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar con detección a fin de alcanzar unos límites de detección adecuados para la determinación de cuats en aguas a bajos niveles de concentración.
- Acoplar la electroforesis capilar a la espectrometría de masas con el fin de obtener un método de análisis que permita la identificación, cuantificación y confirmación de estos compuestos en muestras ambientales.
- Evaluar la complementariedad de la información que proporcionan diferentes instrumentos de espectrometría de masas en estudios de fragmentación.
- Establecer un método automatizado de preconcentración *on-line* acoplado a un sistema de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas que sea robusto, selectivo y sensible, y que permita la determinación de cuats en aguas de bebida a los niveles requeridos por la Unión Europea.
- Desarrollar un método de análisis selectivo y sensible utilizando el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas que permita la identificación y determinación de los diferentes homólogos del cloruro de benzalconio y del cloruro de didecildimetilamonio en aguas y en preparados farmacéuticos.

2. ESTRUCTURA

La memoria que se presenta se ha estructurado en cuatro capítulos. En el primer capítulo se hace una introducción general sobre los compuestos estudiados, los plaguicidas de amonio cuaternario (cuats) y algunos biocidas, como el cloruro de benzalconio (BAC) abarcando aspectos tales como sus propiedades físico-químicas, su toxicidad o las metodologías analíticas utilizadas para su determinación. En los tres capítulos siguientes se expone el trabajo experimental realizado a lo largo de la tesis doctoral. Al final de la memoria se incluyen las conclusiones globales del trabajo realizado.

En el Capítulo 2 se describe el desarrollo de metodología analítica basada en la electroforesis capilar para el análisis de los plaguicidas de amonio cuaternario. En primer lugar se estudian métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar y se continúa con el estudio del acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas.

En el Capítulo 3 se realiza un estudio exhaustivo de la fragmentación de los plaguicidas de amonio cuaternario mediante la utilización de diversos analizadores de masas como la trampa de iones y el tiempo de vuelo. La combinación de la fragmentación MS^n en la trampa de iones y la elevada exactitud en la determinación de la masa que proporciona el analizador de tiempo de vuelo, permite establecer las rutas de fragmentación de los cuats de manera consistente.

En el Capítulo 4 se ponen a punto métodos basados en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas tanto para los cuats como para los biocidas. En la primera parte del capítulo se describe la automatización de un método de preconcentración *on-line* seguido del acoplamiento LC-MS para el análisis de los plaguicidas de amonio cuaternario utilizando tanto un analizador de triple cuadrupolo como uno de tiempo de vuelo. En la segunda parte del capítulo se describe el desarrollo de un método LC-MS utilizando un analizador de trampa de iones para el análisis de algunas sales de amonio cuaternario con actividad biocida.

La estructura interna de los capítulos se detalla al inicio de cada capítulo. En general, estos capítulos se inician con una introducción, a continuación se presenta el trabajo experimental realizado, bien en forma de publicaciones o bien como trabajo experimental adicional no publicado y se sigue con una discusión general de los resultados expuestos, finalizando con las conclusiones extraídas de los resultados obtenidos.

La distribución de las publicaciones a lo largo de los capítulos es la indicada a continuación:

Capítulo 2

- Artículo I: *Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electrophoresis.*
O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran.
Journal of Chromatography A, 912 (2001) 353-361.
- Artículo II: *Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water.*
O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran.
Journal of Chromatography A, 946 (2002) 275-282.
- Artículo III: *Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection.*
O. Núñez, J.B. Kim, E. Moyano, M.T. Galceran y S. Terabe.
Journal of Chromatography A, 961 (2002) 65-75.
- Artículo IV: *Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides.*
O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran.
Journal of Chromatography A, 974 (2002) 243-255.

Capítulo 3

- Artículo V: *High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides.*
O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran.
Journal of Mass Spectrometry, aceptado.

Capítulo 4

- Artículo VI: *Accurate mass measurement versus tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water.*
O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran.
Analytica Chimica Acta, enviado.
- Artículo VII: *Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry.*
O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran.
Journal of Chromatography A, enviado.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

1.1. SALES DE AMONIO CUATERNARIO CON CARÁCTER HERBICIDA: LOS CUATS

Los plaguicidas son sustancias que se usan principalmente para controlar animales y plantas indeseables aunque también se incluyen entre los plaguicidas los reguladores del crecimiento, los defoliantes y los desecantes. Entre los objetivos del uso de los plaguicidas cabe destacar el incremento y mejora de la producción agrícola, la protección de la población frente a molestias o enfermedades producidas por las plagas, la reducción de los daños causados por éstas y la mejora de la calidad estética de espacios exteriores e interiores. El mayor campo de aplicación de los compuestos químicos que actúan como ingredientes activos (IA) de los plaguicidas es la agricultura. Los plaguicidas agrícolas se utilizan, en general, para el control efectivo de malas hierbas, insectos, hongos, nematodos y otras amenazas para los cultivos, así como para garantizar la calidad y seguridad de los alimentos. Aunque los beneficios que se obtienen con el uso de estos compuestos son numerosos, la utilización, a escala mundial, de cantidades cada vez mayores y el creciente interés por la polución medioambiental y la contaminación de suelos, aguas y alimentos, ha llevado al establecimiento de rigurosas normativas por parte de los organismos públicos de diferentes países. En estas normativas se regula la utilización de los plaguicidas y se establecen límites máximos para los niveles de concentración de estas sustancias en diversas matrices. Por todo ello es imprescindible disponer de métodos de análisis que permitan el control de estos compuestos a los bajos niveles de concentración que se hallan legislados.

Entre los herbicidas que forman parte de la familia de sales de amonio cuaternario que se conocen con el nombre genérico de cuats, el paracuat (PQ) es el más conocido. Este compuesto se introdujo en la década de los 50 como herbicida no selectivo y hoy en día es uno de los más utilizados en todo el mundo, se vende en más de 130 países y se usa en granjas, plantaciones y en control no-agrícola de malas hierbas. En esta familia también se incluyen otros herbicidas como el dicuat (DQ) y el difenzocuat (DF) y algunos reguladores del crecimiento vegetal como el clormecuat (CQ) y el mepicuat (MQ). Existen otros compuestos con propiedades herbicidas que también se pueden incluir como son el cypercuat, el morfamcuat y el dietamcuat, aunque su uso es limitado y en la actualidad tienen poco interés comercial (The Pesticide Manual, 1994), por lo que, a efectos prácticos, la familia de los cuats se reduce a los cinco primeros compuestos mencionados y éstos son los que se estudian en esta memoria.

El PQ se sintetizó por primera vez en 1882 aunque sus propiedades herbicidas fueron descubiertas en 1955 por los laboratorios ICI (empresa conocida en la actualidad como Zeneca) quien empezó a comercializarlo en 1961 (Pesticides News, 1996). Aunque la patente del PQ ha caducado, Zeneca continúa siendo el mayor productor a escala mundial. Este herbicida se comercializa frecuentemente en mezclas con otros plaguicidas, entre ellos el dicuat que también es un producto de Zeneca. Esta empresa comercializa el paracuat como *Gramoxone* para usos agrícolas en formulaciones que contienen entre un 24 y un 26% de ingrediente activo y para uso particular y en jardinería con los nombres de *Weedol* y *Pathclear* en formulaciones que contienen aproximadamente un 2,5 % de PQ además de otros herbicidas. Ha sido durante muchos años uno de los principales productos de la empresa, generando el 24% de las ganancias, por ejemplo, la planta con sede en Reino Unido producía a mitad de los años 90 del orden de 8000 toneladas al año de las que el 95% se exportaban (Zeneca, 1995). El DQ se comercializa principalmente con el nombre de *Reglone*. Ambos se utilizan como herbicidas no selectivos de contacto para el control de malas hierbas en cultivos tanto acuáticos como terrestres, en plantaciones de plátano y cacao, en viñedos, etc. También se usan en la renovación de pastos, limpieza de rastrojos, como defoliantes en el cultivo de algodón y del lúpulo y para desecar diferentes cultivos como la caña de azúcar, el girasol y la soja entre otros. Además, se emplean para el control de malezas en canales, carreteras, acequias y zonas no cultivadas, así como para el control de plantas acuáticas y de algas (The Pesticide Manual, 1994).

El DF fue introducido en el mercado por American Cynamid con la denominación de *Avenge*, y se utiliza como herbicida selectivo en tratamientos de post-emergencia en campos de trigo, centeno, cebada y avena, y para el control de diferentes variedades de maíz en todo el mundo (The Pesticide Manual, 1994; de Liñán, 1997). Por lo que hace referencia al regulador del crecimiento CQ, éste se empezó a comercializar en 1966 a través de la Universidad del Estado de Michigan, American Cynamid y BASF AG con el nombre de *Cycoce*l y se utiliza a escala mundial para aumentar la resistencia a los parásitos e incrementar las cosechas de trigo, cebada y centeno. El MQ fue comercializado por BASF AG con el nombre de *Pix* y es un regulador del crecimiento que también se utiliza para la eliminación de parásitos en las plantaciones de centeno y cebada y para aumentar la producción de algodón (Feger *et al.*, 1991), así como para homogeneizar el tamaño y adelantar las cosechas de ajo, cebolla, melón y de la vid. También se utiliza en plantaciones de tabaco y de caña de azúcar. Ambos reguladores del crecimiento se utilizan en floricultura para facilitar la floración de azaleas, fucsias, begonias y otras plantas

ornamentales, así como para mejorar la maduración de frutas, almendras, aceitunas, tomates, etc.

En el mercado existe una gran variedad de formulaciones que contienen estos herbicidas como ingrediente activo principal o en combinación con otros pesticidas. En la Tabla 1.1 se resumen algunos de los nombres comerciales de las formulaciones más utilizadas tanto en España como a escala mundial.

Tabla 1.1. Formulaciones comerciales de los cuats

Cuat	Formulación	
	Individual	Mezcla con otro pesticida
PQ	Cekuquat, Crisquat, Dextrone, Esgram, Goldquat, Gramocil, Gramonol, Gramoxone, Agriparaquat 10 LS, Alcoquat, Cuatec, Dipiridil 10, Endecuat, Forquat, Herbimur P 10, Herpat LS, Katon, Probelcuat, Tenpar, Caldercol, Herbatex, Jirafa, Paratex, Pared	+ <u>Dicuat</u> : Gramoxone Plus, Actor, Preeglone, Preflone, Weedol, Cleansweep + <u>Diuron</u> : Sekol, Dexuron, Gramuron, Para-col, Tota-col + <u>Simazina</u> : Terraklene, Herpat Doble, Parazina + <u>Dicuat y Simazina</u> : Pathclear + <u>Monolinuron</u> : Gramonol
DQ	Aquacide, Dextrone, Ortho Diquat, Reglone	+ <u>Paracuat</u> : Gramoxone Plus, Actor, Preeglone, Preflone, Weedol, Cleansweep + <u>Paracuat y Simazina</u> : Pathclear
DF	Avenge, Finaven 15 LE, Supraven 33 PM	-
CQ	Agrococel, Argrichlormequat 40 LS, Aktibar-40, CCC 40, CCC, Ceku-CCC, Chlormequat SC, Cycocel Extra, Hidrofértil, Hormorregul, Luqsacel, Prococel, Quimurel, Recevel, Regufof	+ <u>Choline</u> : WR62, Cycocel 460, BAS 06200W, CCC Extra
MQ	Pix, Pix ULV	+ <u>ethephon</u> : Terpal

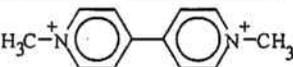
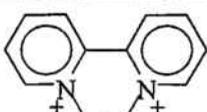
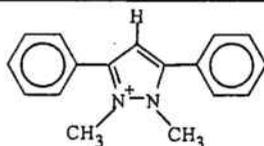
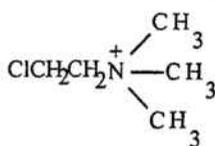
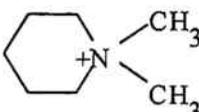
Fuentes: The Pesticide Manual, 1994; de Liñán, 1999; Reigart y Roberts, 1999

1.1.1. Propiedades y características

Las características principales de los herbicidas y los reguladores del crecimiento vegetal de la familia de los cuats son su carácter catiónico y su alta solubilidad en agua. En la Tabla 1.2 se incluyen las estructuras moleculares así como los nombres según la normativa de la IUPAC y del CAS de los cinco compuestos. El PQ y el DQ son sales de amonio cuaternario dipiridínicas (o bipiridínicas) que están constituidas por dos anillos de

piridina unidos por los átomos de carbono de las posiciones 4 y 2 respectivamente (Brienne *et al.*, 1995). Ambos forman parte de una familia de compuestos relativamente amplia, formada por diversos homólogos e isómeros de posición del nitrógeno cuaternario, de los que tan sólo algunos poseen actividad herbicida.

Tabla 1.2. Herbicidas de amonio cuaternario. Estructura molecular y nomenclatura

Nombre común	Estructura molecular	IUPAC	CAS
Paracuat		1,1'-dimethyl-4,4'- bipyridinium o 1,1'-dimethyl-4,4'- bipyridyldiylum	1,1'-dimethyl-4,4'- bipyridinium
Dicuat		9,10-dihydro-8a,10a- diazoniaphenanthrene o 1,1'-ethylene-2,2'- bipyridyldiylum	6,7-dihydrodipyrido[1,2- a:2',1'-c]pyrazinediium
Difenzocuat		1,2-dimethyl-3,5- diphenylpyrazolium	1,2-dimethyl-3,5-diphenyl- 1H-pyrazolium
Clormecuat		2-chloroethyltrimethyl ammonium	2-chloro- <i>N,N,N</i> - trimethylethanaminium
Mepiquat		1,1-dimethylpiperidinium	1,1-dimethylpiperidinium

Fuente: The pesticide Manual, 1994.

En el caso del PQ y del DQ su actividad herbicida es debida a la estructura planar de sus moléculas así como al número de posibles estructuras resonantes (unas 18 para ambos cationes) que estabilizan el radical formado en las reacciones de reducción en las que intervienen (Homer *et al.*, 1960). El carácter cuaternario es debido a la adición de un grupo metilo a cada uno de los nitrógenos piridínicos, en el caso del PQ, y de un grupo etileno puente entre los dos nitrógenos piridínicos en el caso del DQ, generando en ambos casos un dicatión. La molécula de DF, por su parte, está formada por dos anillos bencénicos unidos a un anillo de pirazolio, donde cada nitrógeno está unido a un grupo metilo. En este caso sólo existe una carga positiva compartida entre los dos nitrógenos de

los cuales sólo uno es cuaternario. Por lo que hace referencia al MQ y al CQ, éstos presentan estructuras moleculares mucho más sencillas. Así, el CQ tiene una estructura lineal con tres grupos metilo y un cloroetilo unidos al átomo de nitrógeno. El MQ, en cambio, consta de un anillo de piperidina con dos metilos enlazados al átomo de nitrógeno. La principal diferencia entre el CQ y el MQ y los otros tres compuestos es que ninguno de los dos tiene grupos cromóforos por lo que no absorben en la zona del UV.

En la Tabla 1.3 se resumen las principales propiedades físico-químicas de los herbicidas y los reguladores del crecimiento estudiados en esta memoria. Todos se presentan como sales donde mayoritariamente el anión suele ser el cloruro o el bromuro a excepción del DF que se presenta como sulfato. Son principalmente estructuras cristalinas higroscópicas que se descomponen a temperaturas relativamente elevadas y todas ellas muestran un cierto poder corrosivo frente a diversos metales. Son muy estables en agua y relativamente estables en medios ácidos, hidrolizándose alguno de ellos en medios básicos. La alta solubilidad en agua es la característica más relevante de estos herbicidas y un factor importante que determinará los métodos de tratamiento de muestra y los procedimientos de análisis. También hay que considerar la presencia de grupos cromóforos ya que determina la posibilidad de utilizar métodos de detección espectrofotométricos. Los máximos de absorción de los herbicidas PQ, DQ y DF también se indican en la Tabla 1.3. El desplazamiento de la absorbancia a longitudes de onda más elevadas para el DQ es debido al mayor número de estructuras resonantes entre sus tres anillos, que implica una disminución de la energía de excitación (Ekström y Akerblom, 1990).

Las propiedades físico-químicas del PQ y del DQ los hacen únicos entre los herbicidas. Ambos son rápidamente absorbidos por las plantas produciendo un efecto inmediato en éstas incluso a bajas concentraciones. Así, aproximadamente el 33 % de la cantidad de PQ y/o DQ aplicada sobre las hojas de las plantas es absorbida en 30 segundos lo que hace pensar que el proceso es debido más a fuerzas físicas (atracción iónica entre los herbicidas catiónicos y los centros de carga negativa que se encuentran en las hojas de la planta) que a reacciones químicas. El PQ es además fuertemente adsorbido de manera rápida por las partículas del suelo, especialmente en suelos arcillosos (Juo y Oginni, 1978), lo que conlleva que no esté disponible para las plantas, lombrices y microorganismos. Debido a esto y a su resistencia tanto a la degradación microbiana como a la descomposición por la luz solar (U.S. Environmental Protection Agency, 1987), su persistencia en el suelo es muy elevada. De hecho, algunos autores indican que puede persistir de manera indefinida y ser transportado junto con los sedimentos, aunque otros señalan que la vida media del PQ en los suelos puede variar desde 16 meses (en

condiciones de laboratorio aeróbicas) a 13 años (en estudios de campo) (Rao y Davidson, 1980).

Tabla 1.3. Propiedades físico-químicas de los cuats

Propiedades	PQ (Dicloruro)	DQ (Dibromuro)	DF (Metilsulfato)	CQ (Cloruro)	MQ (Cloruro)
Fórmula	C ₁₂ H ₁₄ N ₂ Cl ₂	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ Br ₂	C ₁₈ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	C ₅ H ₁₃ NCl	C ₇ H ₁₆ NCl
Peso molecular	186,3 (ion) 257,2 (sal)	184,2 (ion) 344,0 (sal)	249,3 (ion) 360,4 (sal)	122,6 (ion) 158,0 (sal)	114,2 (ion) 149,7 (sal)
Forma física	Cristal higroscópico incoloro	Cristal amarillento	Cristal higroscópico incoloro	Cristal higroscópico incoloro	Cristal higroscópico incoloro
Punto de fusión	Descompone a 300 °C	Descompone a 300 °C	150-160 °C	Descompone a 245 °C	Descompone a 285 °C
Presión de vapor	Despreciable a temperatura ambiente	Despreciable a 20 °C	Despreciable a temperatura ambiente	0,01 Pa a 20 °C	< 0,01 Pa a 20 °C
Estabilidad	Estable a pH neutro/ácido Se hidroliza a pH básico Descomposición fotoquímica (UV) en agua	Estable a pH neutro/ácido Se hidroliza a pH básico Descomposición fotoquímica (UV) en agua	Estable a pH débilmente ácido Descompone en ácidos fuertes y oxidantes	Estable en agua	Estable en medio ácido
Capacidad de corrosión	Corrosivo para los metales	Corrosivo para los metales	Corrosivo: Sn, Zn y Al	Corrosivo para los metales	Corrosivo: Al y Fe
Solubilidad en g/L (20 °C)	700 (agua), débilmente soluble en alcoholes inferiores Insoluble en hidrocarburos	700 (agua), débilmente soluble en alcoholes inferiores y en disolventes hidroxilados Prácticamente insoluble en disolventes orgánicos no polares K _{ow} : 2,5·10 ⁻⁵	765 (agua), 20 (acetona), 71 (1,2-dicloroetano), 23 (propan-2-ol), 1,1 (xileno) (a 25 °C) K _{ow} : 0,24	> 1000 g /kg (agua), < 1 g/kg (cloroformo), 320 g/kg (etanol) Insoluble en ciclohexano	> 1000 g /kg (agua), 20 g/kg (acetona), 10,5 g/kg (cloroformo), 162 g/kg (etanol)
Máximo de absorción en la zona UV	257 nm	310 nm	255 nm	No absorbe	No absorbe

Fuente: The Merk Index, 1996; The Pesticide Manual, 1994.

Por lo que hace referencia al DQ, éste también se adsorbe fuertemente sobre las partículas del suelo y de hecho se ha observado que algunos residuos de este herbicida han

persistido durante muchos años en los suelos sufriendo muy poca degradación (Tucker, 1980; WSSA Herbicide Handbook Committee, 1989; U.S. Department of Agriculture, 1990). La capacidad de adsorción del DQ sobre los suelos es tan alta en comparación con la velocidad a la que suele ser aplicado que existe poca posibilidad de que ocurran procesos de lixiviación y en consecuencia de contaminación de las aguas subterráneas. No obstante, hay evidencias de que el DQ tiene la capacidad de, eventualmente, saturar los puntos disponibles de adsorción de los suelos arcillosos y por lo tanto, la calidad de las aguas subterráneas puede verse afectada si todos los puntos de adsorción del suelo se saturan, arrastrando los residuos de herbicida no adsorbidos al producirse la filtración del agua en el suelo.

El DF también se adsorbe con fuerza en los suelos y no es degradado microbiológicamente. Su vida media en el suelo es de aproximadamente tres meses. Con respecto al clormecuat y al mepicuat no se dispone de suficiente información sobre su degradación en el medio ambiente, aunque hay evidencias de la persistencia del CQ en los suelos lo que ha suscitado un creciente interés sobre el control de este compuesto en vegetales como se comentará posteriormente en esta memoria.

1.1.2. Toxicidad

La toxicidad de estos herbicidas varía según los compuestos, siendo el PQ y el DQ los más tóxicos y los que más accidentes han provocado, en parte también por su mayor utilización. Aunque el uso de estos herbicidas se está restringiendo en muchos países, su amplio abanico de aplicaciones ha hecho aumentar su peligrosidad debido principalmente a un mal uso y a envenenamientos tanto accidentales como intencionados (Reigart y Roberts, 1999). Un parámetro que permite evaluar la toxicidad de un compuesto es el LD₅₀, que se define como la cantidad de compuesto que, suministrado en una sola dosis, causa la muerte del 50% de una población seleccionada como test. En la Tabla 1.4 se indican los valores de LD₅₀ orales determinados para estos herbicidas en diferentes animales. Como puede observarse, se dispone de mucha mayor información para el PQ y el DQ que para los otros herbicidas. De los datos mostrados en la Tabla 1.4 se puede resaltar que las vacas, en relación a su masa corporal, son animales especialmente sensibles a estos herbicidas, con unos valores de LD₅₀ relativamente bajos. Como puede observarse, el PQ y el DQ son considerablemente tóxicos para los animales estudiados, mientras que se necesitan dosis más elevadas para los otros tres herbicidas.

En relación con los efectos del PQ en los seres humanos se han descrito muchos casos de enfermedad y muerte por ingesta o contacto con este herbicida (Stevens and Darrell, 1991; Erickson *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1999; Bataller *et al.*, 2000; Hwang *et al.*, 2002). Su LD₅₀ en humanos es bajo, de aproximadamente 3-5 mg/Kg, lo que se traduce en tan solo 10-15 mL de una disolución al 20% (Pond, 1990; Giulivi *et al.*, 1995). La ingesta del PQ afecta al sistema gastrointestinal, a los riñones, al hígado, al corazón y a otros órganos, aunque los pulmones son los principales órganos diana para este herbicida y sus efectos en el mismo representan la manifestación más letal y menos tratable de su toxicidad. Sin embargo, hay que indicar que la inhalación, aunque puede producir hemorragias e irritación nasales, no acostumbra a producir daños serios debido a la baja presión de vapor del PQ.

Tabla 1.4. LD₅₀ oral de los cuats en algunos animales (mg/Kg)

Animal	PQ	DQ	DF	CQ	MQ
ratas	20-150 ^{a,b}	120 ^{c,d}	470 ^f	670 ^f	1490 ^f
ratones	196 ^b	233 ^{c,d}	-	1020 ^e	-
conejos	-	188 ^{c,d}	-	-	-
gallinas	262 ^e	200-400 ^e	-	920 ^e	-
monos	50 ^b	-	-	-	-
gatos	48 ^b	-	-	-	-
perros	25-50 ^e	187 ^{c,d}	-	-	-
cobayas	-	187 ^{c,d}	-	620 ^e	-
vacas	50-75 ^b	30-56 ^{c,d}	-	-	-

^a Wagner, 1983.

^b National Library of Medicine, 1992.

^c American Conference of Government Industrial Hygienists, 1986.

^d Occupational Health Services, 1991.

^e World Health Organization, 1996.

^f The Pesticide Manual, 1994

En cuanto al mecanismo de acción del PQ se ha establecido que tiene lugar a través de la formación de radicales libres los cuales producen daños por oxidación en los tejidos pulmonares (Pond, 1990; Giulivi *et al.*, 1995). Aunque suelen aparecer edemas pocas horas después de una ingesta severa del herbicida (Nordquist *et al.*, 1995), la fibrosis pulmonar, que es la causa más usual de muerte, suele ocurrir de 7 a 14 días después (Bismuth *et al.*,

1982). No obstante, algunos pacientes que han ingerido una gran cantidad de PQ han muerto rápidamente (en las primeras 48 horas) de fallo circulatorio (Bismuth *et al.*, 1982).

El envenenamiento por DQ es mucho menos común que el producido por PQ y, aunque existen casos descritos (Hantson, *et al.*, 2000), éstos son bastante menos numerosos. El DQ no se acumula selectivamente en el tejido pulmonar, a diferencia del PQ, por lo que el daño provocado es menos importante (Lam *et al.*, 1980; Vanholder *et al.*, 1981; Olson, 1994). Tras la ingesta tanto de PQ como de DQ, los primeros daños se producen en el tracto gastrointestinal, concretamente en la mucosa superficial, observándose hinchazones, edemas y ulceraciones. Además, también se pueden producir lesiones en los riñones y en el hígado, aunque el DQ suele producir un mayor trastorno renal que el PQ. Los daños producidos en el sistema renal son generalmente reversibles, aunque las lesiones provocadas pueden jugar un papel determinante en el resultado de un envenenamiento por PQ.

El DQ presenta efectos tóxicos severos sobre el sistema nervioso central (Vanholder *et al.*, 1981; Olson, 1994) y aunque algunos experimentos de laboratorio sugieren que el DQ no es directamente neurotóxico, sí que puede llegar a inducir cambios en el tejido cerebral (Vanholder *et al.*, 1981). Tanto el PQ como el DQ pueden también causar daños severos a través de la piel. Así, se ha estudiado el LD₅₀ cutáneo en algunos animales siendo de 236-325 mg/kg para el PQ y de 250-400 mg/kg para el DQ en conejos (Worthing, 1983). Aunque la adsorción a través de piel intacta es lenta, ésta se incrementa a través de alguna herida (Reigart y Roberts, 1999). Los daños generados por contacto en la piel de PQ y/o DQ incluyen la dermatitis y el contacto prolongado puede producir eritemas, abrasiones, ulceraciones y cambios en las uñas (Hayes, 1982; Tungsanga *et al.*, 1983; Vale *et al.*, 1987). En muchas ocasiones, cuando estos herbicidas son absorbidos por la piel a concentraciones elevadas, pueden causar síntomas similares a los ocurridos por ingestión, y algunos pueden manifestarse incluso hasta dos años más tarde (Bataller *et al.*, 2000).

La experiencia clínica descrita con los casos de envenenamiento por PQ ha permitido crear una escala preliminar dosis-efecto que permite establecer la prognosis para casos de ingestión de este herbicida (Vale *et al.*, 1987). Así, la ingesta de menos de 20 mg de ión paracuat por Kg de peso (menos de 7,5 mL de un concentrado al 20% (w/v) de paracuat) no da lugar a síntomas o sólo son gastrointestinales y la recuperación es posible. Una ingesta superior, de 20 a 40 mg de ión paracuat por Kg de peso (7,5-15,0 mL de un concentrado al 20% (w/v) de paracuat) genera fibroplasia pulmonar y la muerte se produce en la mayoría de los casos aunque puede retrasarse de 2 a 3 semanas. Si las cantidades son

superiores a los 40 mg de ión paracuat por Kg de peso (mas de 15,0 mL de un concentrado al 20% (w/v) de paracuat) se producen daños en un gran número de órganos de manera rápida y la mortalidad es del 100 % en 1-7 días.

Con relación a los otros tres compuestos, el DF, el CQ y el MQ, existen pocos datos de toxicidad disponibles en la literatura, y la mayoría de ellos corresponden a experimentos con animales. Así, se ha encontrado que el DF produce irritación ocular en conejos mientras que es moderadamente tóxico cuando se administra por vía oral, dérmica o por inhalación. También se ha puesto de manifiesto que el contacto con CQ puede producir irritación dérmica, ocular y pulmonar (en caso de inhalación), que a largo plazo, puede provocar daños hepáticos y que puede ser teratogénico aunque no se han obtenido evidencias que lo prueben (US Environmental Protection Agency, 1999). También existe algún caso descrito de muerte en humanos tras una ingestión accidental de CQ (Winek *et al.*, 1990). Con respecto al MQ, éste es moderadamente tóxico por vía oral.

Existen algunos estudios relacionados con los efectos carcinogénicos y mutagénicos de estos herbicidas. Así, el PQ parece ser mutagénico en humanos, en microorganismos y en ratones (U.S. Environmental Protection Agency, 1987). Algunos ensayos realizados con ratones muestran que el PQ puede producir tumores en los pulmones, en la piel y en la glándula tiroides. Aunque su potencial carcinogénico no ha sido evaluado de manera exhaustiva en humanos, la EPA clasifica este herbicida como posible carcinógeno (Walker y Lawrence, 1992). Con respecto al DQ, la información disponible sobre sus efectos mutagénicos es contradictoria por lo que se requieren más estudios. No obstante y dado que se desconoce su capacidad para producir cambios permanentes en el material genético es considerado no mutágeno (Hayes, 1982). Tampoco se considera al DQ como un posible causante de tumores. En cuanto a los otros compuestos, no hay referencias sobre su mutagenicidad o carcinogenicidad (U.S. Environmental Protection Agency, 1997).

1.1.3. Legislación

Debido al abundante uso de estos herbicidas y a su toxicidad, los organismos competentes de diversos países han establecido normas concretas en relación a los niveles permitidos de cuats en diferentes matrices. Así, la agencia de protección del medio ambiente de los EE.UU. (US EPA) ha establecido un nivel máximo de DQ (MCL, *maximum contaminant level*) en aguas de consumo de 20 µg/L (US Environmental Protection Agency, 2002). Para el resto de los herbicidas no existe un nivel máximo

legislado por la US EPA si bien este organismo propone restringir el uso del PQ (Routt Reigart y Roberts, 1999) estableciendo como objetivo un nivel máximo (MCLG, *maximum contaminant level goal*) de 3 $\mu\text{g/L}$ (US Environmental Protection Agency, 2001). En cuanto a los niveles tolerados, la US EPA establece una Dosis de Referencia (RfD, *Reference Dose*), que es una estimación de la exposición oral diaria que no produce un riesgo apreciable para la población humana durante toda la vida, de 0,005 mg/Kg/día para el DQ y de 0,0045 mg/Kg/día para el PQ. También definen un Nivel Equivalente para Aguas de Consumo (DWEL, *Drinking Water Equivalent Level*), que es la concentración máxima de un contaminante en aguas potables a la que puede estar expuesta una persona a lo largo de su vida sin que se produzcan efectos adversos. En este caso, los valores establecidos para el DQ y el PQ son de 0,07 y 0,2 mg/L respectivamente (US Environmental Protection Agency, 2002). Con respecto a la Unión Europea, no existen normas específicas para los cuats en aguas de consumo y esto obliga a aplicar la legislación general que regula los niveles máximos de plaguicidas, que son de 0,1 $\mu\text{g/L}$ para cada compuesto individualmente y de 0,5 $\mu\text{g/L}$ para el contenido total de pesticidas (European Union, 1980), valores muy inferiores a los de EEUU.

Con respecto al DQ cabe señalar que la Unión Europea tan solo autoriza su uso como herbicida terrestre y desecante y no lo autoriza para la lucha contra las malas hierbas acuáticas (European Union, 2001). Al mismo tiempo regula el nivel máximo de DQ en diversas matrices. Así, para cereales, establece un nivel de 10 mg/Kg en cebada, de 1 mg/Kg en maíz y mijo, de 2 mg/Kg en arroz y de 0,05 mg/Kg para el resto de cereales. Este último nivel es el que también se aplica en frutas frescas, desecadas o sin cocer, en frutos de cáscara, en raíces y tubérculos, en bulbos, en hortalizas del género Brassica, en hortalizas de hoja y hierbas aromáticas frescas, en leguminosas verdes (frescas) y en hongos y setas. Para algunas legumbres, como judías y lentejas, se establece un nivel máximo de 0,2 mg/Kg y de 0,5 mg/Kg para las habas de soja. El DQ también tiene legislado un nivel máximo de 0,5 mg/Kg en carnes, derivados cárnicos, despojos, grasas animales, leche y huevos frescos (European Union, 2003a).

El PQ ha sido recientemente incluido como sustancia activa en productos de protección agrícola por la Unión Europea (European Union, 2003b) y la directiva entrará en vigor a partir del 1 de noviembre de 2004. A partir de esta fecha sólo se autorizarán los usos de este compuesto como herbicida, quedando excluidas las aplicaciones con mochila y equipos de mano en jardinería doméstica. También se han fijado los niveles máximos en diversas matrices, por ejemplo en frutas, patatas, semillas y aceites de oleaginosas el nivel establecido es de 0,05 mg/Kg (European Union, 1996).

Respecto a los reguladores del crecimiento (CQ y MQ), en la Unión Europea existe una mayor preocupación por el uso del CQ. Se han fijado los niveles máximos permitidos en diferentes matrices, por ejemplo 2 mg/Kg para algunos cereales (cebada, centeno, trigo), 0,1 mg/Kg en frutos secos con o sin cáscara, semillas oleaginosas y lúpulo, y 0,05 mg/Kg en cítricos, frutos de pepita y de hueso, bayas y frutas pequeñas, hortalizas, legumbres y patatas. Además, se ha legislado el contenido de CQ en carnes y derivados, estableciéndose niveles máximos permitidos de 0,2 mg/Kg para riñones de vacuno, de 0,1 mg/Kg para hígado de vacuno, y de 0,05 mg/Kg para hígado de pollo y otras carnes, despojos o derivados cárnicos, así como en leche y huevos frescos (European Union, 2000a). Además, recientemente, se ha puesto de manifiesto un interés creciente en el control de este regulador del crecimiento en los cultivos frutales, especialmente en peras, lo que ha producido un incremento en el número de publicaciones respecto al análisis de este compuesto en dichas muestras como se verá en el siguiente apartado. Para este tipo de cultivo, la contaminación debido a CQ persiste en años posteriores tras el cese de su uso y con frecuencia los niveles encontrados son superiores al nivel máximo legislado (0,05 mg/Kg). Además, los datos de control realizados demuestran que la disminución de los residuos de este compuesto con el tiempo es muy lenta por lo que la Unión Europea ha decidido aplicar una moratoria de la entrada en vigor del nivel máximo permitiendo temporalmente un nivel de 0,3 mg/Kg, que estará vigente sólo hasta el 31 de julio de 2006 (European Union, 2003c).

El MQ y el DF son bastante menos tóxicos que el PQ y DQ y únicamente se han propuesto valores de 0,3 mg/Kg para el MQ en frutas y de 3 mg/Kg para el DF en cereales (European Union, 1996).

1.1.4. Metodologías analíticas

Tal como se comenta en los apartados anteriores los cuats presentan unas características muy distintas a la mayoría de los plaguicidas. Se trata de compuestos catiónicos, no volátiles y muy solubles en agua, lo que condiciona los procedimientos de extracción y análisis a utilizar. Por otra parte, el gran abanico de aplicaciones de estos compuestos en agricultura hace que el número de matrices donde se pueden encontrar sea muy elevado. Así, desde un punto de vista alimentario es importante su presencia en frutas y verduras así como en alimentos cárnicos. Desde un punto de vista medioambiental, se hallan en matrices de muy diversas características como suelos y sedimentos, aerosoles atmosféricos y aguas de diversa procedencia (ríos, lagos, aguas subterráneas). Al ser estas

aguas el origen de las aguas de consumo, es posible la presencia de los cuats en las mismas por lo que es necesario su control para cumplir con la legislación vigente. Además, el mal uso que se hace de esta familia de compuestos asociado a su toxicidad, hace que con relativa frecuencia se deban analizar junto con sus metabolitos, en fluidos biológicos humanos. El procedimiento de extracción de los cuats depende del tipo de matriz y viene condicionado por el método de análisis a utilizar. Además, los requerimientos legales establecidos por los organismos competentes para el control biosanitario de alimentos y de aguas de consumo, así como la utilización de métodos de análisis que no presentan una sensibilidad suficientemente elevada para cumplir con la legislación vigente conlleva la necesidad de una mejora del procedimiento de extracción y el uso indispensable de procedimientos de preconcentración. Por lo general se acostumbra a aplicar la preconcentración como una etapa posterior a la extracción, aunque la situación ideal es aquella en la que extracción y preconcentración se realizan en una sola etapa reduciendo la manipulación de la muestra y disminuyendo el tiempo de análisis. Con respecto a los métodos de análisis de los cuats éstos son numerosos, siendo las técnicas de separación como la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar los más utilizados. A continuación se comentan algunos de los procedimientos de extracción y preconcentración descritos en la literatura para los cuats y, posteriormente, se realiza una revisión bibliográfica de las metodologías analíticas más utilizadas para la determinación de esta familia de compuestos.

1.1.4.1. Métodos de extracción y preconcentración

Dada la alta solubilidad de los cuats en aguas, este disolvente es el que se elige con más frecuencia para la extracción de estos compuestos de matrices sólidas. En general, se suele utilizar agua ligeramente acidulada, pero también se emplean algunos disolventes orgánicos polares o mezclas de estos con agua, aunque la solubilidad de los cuats es menor en estos casos. Por ejemplo, para extraer el PQ y el DQ de matrices de origen vegetal los procedimientos que generalmente se proponen utilizan agua acidulada con ácido clorhídrico (Paschal *et al.*, 1979; Worobey, 1987; Nagayama *et al.*, 1987; Chichila y Walters, 1991; Worobey, 1993; Wigfield *et al.*, 1993; Chichila y Gilvydis, 1993; Pérez-Ruiz *et al.*, 1996), mezcla que también se ha empleado para la extracción de DF en muestras de harina (Lawrence *et al.*, 1981). En los últimos años se han publicado un número relativamente elevado de trabajos que hacen referencia al análisis de los reguladores del crecimiento CQ y MQ en frutas y verduras. En este caso, tras la

homogenización de la muestra mediante trituración, la extracción de CQ y en algunos casos también de MQ se lleva a cabo tanto con agua (Mol *et al.*, 2000), como con agua acidulada con ácido clorhídrico (Peeters *et al.*, 2001), así como con mezclas de agua y metanol (Hau *et al.*, 2000; Riediker *et al.*, 2002) o mezclas de metanol y agua acidulada con ácido acético (Vahl *et al.*, 1998; Juhler y Vahl, 1998) o con ácido fórmico (Castro *et al.*, 2001a). También se han propuesto procedimientos que emplean tan solo metanol para la extracción de CQ, por ejemplo en peras (Startin *et al.*, 1999; Lautié *et al.*, 2000) o en tomates (Careri *et al.*, 2002). En general, la extracción se realiza mediante agitación mecánica o en un baño de ultrasonidos, y en la mayoría de los casos se utiliza directamente la disolución extractante para la determinación, aunque a veces también se evapora el disolvente y se reconstituye en un medio más adecuado. En los casos en los que pueden presentarse interferencias de la matriz se utilizan procedimientos de *clean-up* previos al análisis empleando cartuchos de C₁₈ (Vahl *et al.*, 1998; Juhler y Vahl, 1998; Castro *et al.*, 2001a). Otros métodos realizan una pequeña etapa de preconcentración después de la extracción del CQ y para ello utilizan cartuchos de intercambio iónico SCX (Zhao *et al.*, 2000; Hau *et al.*, 2000). En general, la selección del procedimiento de extracción dependerá de la metodología analítica seleccionada para su análisis.

No existen muchos trabajos que describan el análisis de estos compuestos en matrices sólidas como suelos y sedimentos y esto es debido a que los cuats suelen quedar fuertemente retenidos en los mismos. En general, en estos casos se propone la utilización de ácidos para su extracción (Martínez *et al.*, 1988; Pérez-Ruiz *et al.*, 1996), aunque recientemente se ha publicado un trabajo que analiza el PQ soluble o extraíble de suelos realizando la extracción tan sólo con agua (Ouyang *et al.*, 2004). El PQ y el DQ también se han analizado en aerosoles atmosféricos llevando a cabo la extracción de los filtros en un Soxhlet con disolventes orgánicos (Baraud *et al.*, 2003).

En matrices de interés sanitario, como por ejemplo fluidos y tejidos biológicos, sólo se han analizado PQ y DQ ya que son los más tóxicos y los métodos de extracción suelen ser muy sencillos. Generalmente se realiza una desproteinización de la muestra con ácidos o cloroformo y seguidamente se evapora el disolvente y se inyecta directamente la muestra tras su reconstitución en el disolvente adecuado (Madhu *et al.*, 1995; Pérez-Ruiz *et al.*, 1996; Vinner *et al.*, 2001; Paixao *et al.*, 2002). En algunos casos, tras la extracción de los herbicidas de muestras biológicas como tejidos o de sangre, suero y orina, se utiliza una etapa de preconcentración con cartuchos de C₁₈ (Gill *et al.*, 1983; Corasaniti *et al.*, 1990; Ito *et al.*, 1990; Tomita *et al.*, 1992; Croes *et al.*, 1993; Wu y Tsai, 1998; Taylor *et al.*, 2001; Fuke *et al.*, 2002; Brunetto *et al.*, 2003) o de C₈ (Lee *et al.*, 1998). En todos estos

casos la extracción se lleva a cabo mediante formación de pares iónicos utilizando ácido trifluoroacético, heptanosulfonato de sodio y octanosulfonato de sodio como reactivos. Además, para la extracción de MQ de hígado, riñones y tejido muscular, entre otras matrices animales, también se ha propuesto el uso de acetona y agua acidulada con ácido clorhídrico (Fegert *et al.*, 1991).

El tratamiento de la muestra previo al análisis de los cuats en muestras de agua depende del nivel de contaminación de las mismas. Así, si se trata de muestras muy contaminadas, éstas pueden ser analizadas directamente sin ninguna etapa de extracción y/o preconcentración. No obstante, los bajos niveles de concentración de los cuats en aguas de consumo permitidos por los organismos competentes hacen necesarias etapas de enriquecimiento previas al análisis. Estas etapas proporcionan una extracción y preconcentración simultánea de los cuats, eliminando además posibles agentes interferentes en las matrices que podrían afectar negativamente en la metodología analítica utilizada a posteriori.

La técnica de extracción en fase sólida (SPE) es una de las más utilizadas en la actualidad para la extracción y preconcentración de muestras y ha sido ampliamente empleada en el caso de los cuats. Algunos ejemplos de utilización de estos métodos ya han sido comentados para matrices de origen vegetal y animal, así como para fluidos biológicos. Sin embargo, son las muestras de agua las que más ampliamente han sido tratadas mediante extracción en fase sólida habiéndose utilizado una gran variedad de adsorbentes. En el siguiente apartado se comentan algunos de los procedimientos descritos en la literatura para la preconcentración de cuats en dichas muestras.

Procedimientos de preconcentración con SPE en muestras de agua

Los procedimientos de preconcentración mediante SPE constan, básicamente, de tres etapas: acondicionamiento, preconcentración, limpieza y elución. El acondicionamiento de los cartuchos de extracción es una etapa importante, su función es la activación del adsorbente y, para ello, deben seleccionarse los disolventes en función del tipo de adsorbente y del tipo de analito a preconcentrar. De esta etapa depende, en gran medida, la recuperación obtenida, ya que si el cartucho no está convenientemente activado, la muestra no mojará adecuadamente el adsorbente o el analito no quedará suficientemente retenido produciendo una disminución en las recuperaciones.

Una vez acondicionados los cartuchos se procede a la etapa de preconcentración de la muestra haciendo pasar ésta a través de los mismos. En esta etapa hay que controlar

varios factores que afectan también a la recuperación final. El primer factor a considerar es la adecuación de la muestra al procedimiento de preconcentración a utilizar. Así, para la preconcentración de los cuats en muestras de agua, los métodos publicados recomiendan tratar las muestras directamente sin ningún ajuste previo del pH, manteniendo, por tanto, el pH ligeramente ácido característico de las aguas. Sin embargo, también se ha recomendado llevar la muestra a un pH ligeramente básico (alrededor de 9). En este último caso el ajuste se ha de realizar justo antes de la preconcentración pues algunos herbicidas como el PQ y el DQ se hidrolizan a pH básicos (Tabla 1.3). A veces se requiere la adición de algún reactivo a la muestra de agua para facilitar la extracción de los analitos. Por ejemplo, para la preconcentración de los cuats en cartuchos con fase invertida se añaden formadores de pares iónicos. Otro parámetro importante es el volumen de muestra a preconcentrar. En general, cuanto mayor es el volumen de muestra, mayor es la recuperación, siempre y cuando no se supere el volumen de ruptura del cartucho, es decir, aquel volumen a partir del cual los analitos no quedan adsorbidos al encontrarse ya saturado el adsorbente. Por lo tanto, la determinación del volumen de ruptura es importante pues determinará las recuperaciones así como la duración del procedimiento de extracción. El flujo al que la muestra percola por el adsorbente es también importante y debe controlarse, pues ha de permitir una buena interacción entre los analitos y el adsorbente.

Una vez adsorbidos los analitos en el cartucho se puede proceder a una etapa de limpieza con disolventes adecuados que no comporten la elución de éstos y, en función de si la preconcentración se realiza *on-line* u *off-line*, se suele realizar un secado del cartucho (*off-line*). La última etapa de un procedimiento de SPE es la elución de los analitos. En esta etapa hay que intentar eluir todos los compuestos con el menor volumen posible. Para ello se ha de seleccionar un eluyente con fuerza elutrópica adecuada, que dependerá, también, de si el método de preconcentración se realiza acoplado o no al sistema analítico. Así, si la preconcentración se realiza *off-line* se pueden seleccionar una mayor variedad de eluyentes y los principales requisitos que han de cumplir es que sean capaces de eluir adecuadamente al analito y sean fáciles de eliminar con posterioridad, ya que a veces es conveniente llevar el extracto a sequedad y reconstituirlo en un disolvente más adecuado al sistema analítico utilizado a posteriori. En cambio, si la preconcentración se realiza *on-line* es necesario que el eluyente sea compatible con el sistema analítico acoplado.

En la Tabla 1.5 se presentan en orden cronológico los procedimientos de preconcentración publicados en la literatura que utilizan SPE para la extracción de los cuats de muestras de agua. Al tratarse de compuestos catiónicos la preconcentración de los cuats se ha realizado principalmente en base a dos mecanismos, intercambio iónico y

Tabla 1.5. Procedimientos de preconcentración por SPE para cuats en muestras de agua

Cuat	Procedimiento				Ref.
	Modalidad SPE	Tratamiento	Adsorbente	Elución	
				Recuperaciones	
DF	Fase invertida con formación de pares iónicos	Adición de dihidrogenofosfato de potasio	Sep-Pak C ₁₈	Dihidrogenofosfato de potasio 1,4% en agua:acetonitrilo (1:1)	-- Ahmad, 1982
PQ	Fase invertida con formación de pares iónicos	Adición de tampón borax	Sep-Pak C ₁₈	Tampón ácido fosfórico:dihidrogenofosfato de amonio	>93% Ahmad, 1983
PQ	Resinas de intercambio iónico	Adición de EDTA, ajustar a pH 9	Dowex 50-X8 (Na ⁺)	Disolución saturada de cloruro de amonio	54-70% Chico <i>et al.</i> , 1987
PQ DQ	Cartuchos de sílice	--	Sep-Pak Sílice	Hidróxido de tetrabutilamonio 0,5%, sulfato de amonio 3%	118% (PQ) 117% (DQ) Simon y Taylor, 1989
PQ	Cartuchos de sílice	--	Silica gel	Disolución saturada de cloruro de amonio	97% Shivhare y Gupta, 1991
PQ	Resinas de intercambio iónico	--	Dowex 50-X8 (NH ₄ ⁺)	Disolución saturada de cloruro de amonio	-- Agudo <i>et al.</i> , 1993
DQ	Resinas de intercambio iónico	Adición de EDTA	Dowex 50-X8 (Na ⁺)	Disolución saturada de cloruro de amonio	-- Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 1994
PQ DQ	Resinas de intercambio iónico	Ajustar a pH 8,5	Dowex mixto	Acetato de amonio 200 mM : Acetonitrilo (90:10 v/v)	97% Khambampati <i>et al.</i> , 1994
PQ DQ DF	Cartuchos de sílice	--	Sep-Pak Sílice	Hidróxido de tetrabutilamonio 0,2%, sulfato de amonio 3%	86-95% Ibáñez <i>et al.</i> , 1996a, 1996b y 1998 Fernández <i>et al.</i> , 1998
PQ DQ	Fase invertida con formación de pares iónicos	Ajustar a pH 10,5 Adición de ácido hexanosulfónico	Cartuchos C ₈ Discos C ₈	Ácido fosfórico 0,1%, dietilamina 0,1%	85-90% Munch y Bashe, 1997 (Rev. Hodgeson <i>et al.</i> , 1992)
PQ DQ DF	Cartuchos de carbono grafitado	--	Cartuchos GCB	Hidróxido de tetrabutilamonio 0,2%, sulfato de amonio 3%, metanol	94-98% Ibáñez <i>et al.</i> , 1997

Tabla 1.5. Procedimientos de preconcentración por SPE para cuats en muestras de agua (continuación)

Cuat	Modalidad SPE		Procedimiento		Ref.
	Adecuación de la muestra	Adsorbente	Elución	Recuperaciones	
PQ DQ	Fase invertida con formación pares iónicos	Discos ENVI-8 DSK	Ácido trifluoroacético 5 M	--	Taguchi <i>et al.</i> , 1998
PQ DQ DF CQ MQ	Cartuchos de sílice	Sep-Pak Silice	Ácido clorhídrico 6 M, 8% de metanol	>85%	Castro <i>et al.</i> , 1999
PQ DQ DF CQ MQ	Fase invertida con formación de pares iónicos	Discos Envi-8	Ácido Heptafluorobutírico 15 mM en tampón fórmico-formiato de amonio 100 mM pH 3,3 : Acetonitrilo (88:12 v/v)	70-92%	Castro <i>et al.</i> , 2000 y 2001c
PQ DQ DF	Cartuchos de sílice (1) Cartuchos de carbono grafitado (2)	Sep Pak sílice (1) Cartuchos PGC (2)	Ácido clorhídrico 6 M, 8% metanol (1) Acetonitrilo : Ácido trifluoroacético (80:20 v/v) (2)	80-90% (1) 40-88% (2)	Carneiro <i>et al.</i> , 2000
PQ DQ	Cartuchos de sílice	Sílice 60	Ácido clorhídrico 6 M, 8% metanol	80-85%	Mallat <i>et al.</i> , 2001b
PQ DQ DF CQ MQ	Formación de pares iónicos	Hysphere-Resin GP (polidivinil-benceno)	Ácido Heptafluorobutírico 20 mM en tampón fórmico-formiato de amonio 100 mM pH 2,0 : Acetonitrilo (83:7 v/v)	78-100%	Castro <i>et al.</i> , 2001b
PQ DQ	Fase invertida con formación de pares iónicos (1) Mezcla fase invertida - intercambio iónico (2)	Cartuchos C ₁₈ (1) Resina MCX (2)	Ácido trifluoroacético 1,35% en agua (1) Cloruro de amonio 1M en metanol:agua (1:1) (2)	87-92% (1) >98% (2)	Grey <i>et al.</i> , 2002

formación de pares iónicos. Como se puede observar en la tabla, se han utilizado una gran variedad de adsorbentes: resinas de intercambio catiónico, sílice, fases enlazadas C₈ y C₁₈, carbono grafitado y adsorbentes poliméricos, siendo los tres primeros los más utilizados.

En la preconcentración de cuats mediante resinas de intercambio iónico se han utilizado tanto resinas intercambiadoras catiónicas fuertes (grupos sulfónicos) como débiles (grupos carboxílicos), siendo las primeras las más empleadas para muestras de agua. Como puede observarse en la Tabla 1.5, la resina Dowex 50-X8 con sodio o amonio como contraión es la más utilizada. Así, se han preconcentrado el PQ y el DQ en muestras de agua utilizando este tipo de resinas, donde la elución de los herbicidas se realiza mediante una disolución saturada de cloruro de amonio (Chico *et al.*, 1987; Agudo *et al.*, 1993; Pérez-Ruiz *et al.*, 1994). En algunos casos se adiciona previamente EDTA a la muestra para eliminar metales interferentes (Chico *et al.*, 1987; Pérez-Ruiz *et al.*, 1994). En este caso se consiguieron recuperaciones para ambos herbicidas del orden de 54-70% (Chico *et al.*, 1987). Cabe señalar, sin embargo, que la utilización de una resina Dowex mixta, con intercambiadores aniónicos y catiónicos, permitió aumentar las recuperaciones de los herbicidas PQ y DQ hasta un 97% (Kambhampati *et al.*, 1994). En este caso, la elución de los analitos se realizó con una mezcla acetato de amonio 200 mM:acetonitrilo (90:10 v/v). Recientemente se ha utilizado una resina mixta MCX donde los grupos sulfónicos se encuentran unidos a una base polimérica, de manera que se combinan características de dos mecanismos, adsorción sobre el polímero e intercambio iónico. Con estas resinas se han obtenido recuperaciones para el PQ y el DQ superiores al 98% (Grey *et al.*, 2002).

Otro tipo de adsorbentes muy utilizados para la preconcentración de los cuats en diversas matrices son los cartuchos de base sílice. Con este tipo de adsorbente la interacción de los cuats tiene lugar a través de un mecanismo de intercambio iónico con los grupos silanol. En este caso el pH juega un papel importante pues afecta a la capacidad intercambiadora de la sílice, aumentando con el pH al haber un mayor número de grupos silanol disociados. Por ello, tal como se observa en la Tabla 1.5, la mayor parte de los procedimientos que utilizan este tipo de adsorbente suelen ajustar el pH de las muestras de agua a valores ligeramente básicos. La elución de los cuats, en cambio, se realiza con diversos eluyentes. Así, se han utilizado disoluciones de ácido clorhídrico 6 M con un 8% de metanol (Castro *et al.*, 1999; Carneiro *et al.*, 2000; Mallat *et al.*, 2001b), disoluciones de hidróxido de tetrabutilamonio con sulfato de amonio (Simon y Taylor, 1989; Ibáñez *et al.*, 1996a, 1996b y 1998; Fernández *et al.*, 1998) o bien, como en el caso de las resinas de intercambio catiónico fuerte, disoluciones saturadas de cloruro de amonio (Shivhare y Gupta, 1991). En todos estos casos, las recuperaciones de los cuats en las muestras de agua, principalmente el PQ, DQ y

DF, han sido superiores al 80%. Tan solo en un trabajo se han preconcentrado los cinco herbicidas utilizando cartuchos de base sílice, obteniendo recuperaciones superiores al 85% (Castro *et al.*, 1999). Los adsorbentes comentados hasta ahora presentan un alto carácter polar. Sin embargo, para la extracción y preconcentración de los cuats también se han utilizado con frecuencia adsorbentes con un carácter más apolar, como pueden ser las fases enlazadas C₈ y C₁₈, los de carbono grafitado y los de base polimérica, siendo los primeros los más utilizados.

Con respecto a los adsorbentes con fases enlazadas C₈ y C₁₈ éstos presentan, en general, muy poca afinidad para los compuestos iónicos y, consecuentemente, para los cuats. Por ello, se han aplicado en el *clean-up* de la muestra y así eliminar las interferencias que quedan retenidas en el cartucho sin preconcentrar los cuats que percolan. Este tipo de aplicación se ha utilizado con frecuencia en la determinación de los cuats en matrices de tipo vegetal (Vahl *et al.*, 1998; Juhler y Vahl, 1998; Castro *et al.*, 2001a). Para las muestras de agua, sin embargo, estos adsorbentes se han utilizado siempre como sistema de preconcentración por lo que es necesario aumentar la interacción de los cuats con la fase invertida mediante la adición a la muestra de algún formador de pares iónicos. Tal como se indica en la Tabla 1.5, los formadores de pares iónicos más utilizados para la preconcentración de cuats en muestras de agua han sido el ácido heptafluorobutírico (Castro *et al.*, 2000 y 2001c) y el ácido trifluoroacético (Taguchi *et al.*, 1998; Grey *et al.*, 2002), aunque también se han utilizado dihidrogenofosfato de sodio o borax (Ahmad, 1982 y 1983). De hecho, la extracción mediante la formación de pares iónicos en fase invertida es el procedimiento recomendado por la EPA, método 549.2, para la determinación de PQ y DQ en muestras de agua de consumo (Munch y Bashe, 1997) utilizando en este caso como formador de pares iónicos el ácido hexanosulfónico, que también ha sido empleado por otros autores (Grey *et al.*, 2002). Para la elución de los cuats se han propuesto diferentes eluyentes que por lo general incluyen el formador de pares iónicos utilizado, como son disoluciones con dihidrogenofosfato de sodio (Ahmad 1982 y 1983), ácido trifluoroacético (Taguchi *et al.*, 1998; Grey *et al.*, 2002) o ácido heptafluorobutírico (Castro *et al.*, 2000 y 2001c). En este último caso la elución de los cuats se realiza acoplando *on-line* el cartucho a la columna de separación cromatográfica. El procedimiento recomendado por la EPA utiliza para la elución una disolución de ácido fosfórico y dietilamina (Munch y Bashe, 1997). Las recuperaciones con estos métodos también son bastante buenas (superiores al 70%) y, de nuevo, los trabajos de Castro *et al.*, han permitido la preconcentración simultánea los cinco herbicidas (Castro *et al.*, 2000 y 2001c). Para la preconcentración de los cinco herbicidas estos mismos autores también han utilizado un adsorbente de base polimérica (polidivinilbenceno), empleando para

ello también la formación de pares iónicos con ácido heptafluorobutírico. En este caso, la elución se realiza también *on-line* utilizando una fase móvil con ácido heptafluorobutírico y un 7% de acetonitrilo. Con este procedimiento se han obtenido recuperaciones superiores al 78% (Castro *et al.*, 2001b).

El uso del carbono grafitado como adsorbente en SPE se halla bastante extendido (Hennion, 2000) debido a que combina dos tipos de interacciones, la hidrofóbica y la electrónica. Los cartuchos de carbono grafitado se han utilizado para la extracción y preconcentración de cuats en muestras de agua y, aunque el tipo de interacción del adsorbente con estos compuestos no se conoce muy bien, parece que predomina una interacción electrónica de tipo π entre los anillos aromáticos de los cuats y los anillos del carbono grafitado. Hay que señalar que con estos adsorbentes la elución de los analitos se tiene que realizar con eluyentes de fuerza elutrópica elevada para obtener buenas recuperaciones. Así, para eluir los cuats de estos cartuchos se ha utilizado una disolución de hidróxido de tetrabutilamonio y sulfato de amonio obteniéndose recuperaciones para el PQ, DQ y DF superiores al 94% (Ibáñez *et al.*, 1997). Ahora bien, se ha puesto de manifiesto que estas recuperaciones disminuyen considerablemente si el volumen de muestra es superior a 50 mL. Por ejemplo, preconcentrado 250 mL de agua y eluyendo los cuats con ácido trifluoroacético:acetonitrilo (20:80 v/v) se han obtenido recuperaciones para el PQ, DQ y DF entre un 40-88% (Carneiro *et al.*, 2000).

1.1.4.2. Métodos de determinación

Son numerosas las metodologías analíticas que se han aplicado para la determinación de cuats en todo tipo de muestras, sin embargo, son las técnicas cromatográficas, y en especial la cromatografía de líquidos, y las técnicas electroforéticas las que con mayor frecuencia se utilizan para esta familia de compuestos. Dado que en la presente memoria nos hemos planteado el desarrollo de metodologías analíticas utilizando estas técnicas, en la revisión bibliográfica que se realiza en este apartado nos centraremos principalmente en ellas aunque se incluyen algunos comentarios de las otras técnicas analíticas utilizadas para esta familia de compuestos.

El primer método de análisis propuesto para la determinación de los cuats data de 1966 y se trata de un método espectrofotométrico en la zona del ultravioleta que fue aplicado para la determinación de DQ (Calderbank y Yuen, 1966). Desde entonces se han publicado numerosos trabajos con esta técnica. En general la mayoría de estos métodos se basan en la utilización de reactivos derivatizantes o de agentes reductores con el objetivo de obtener

derivados relativamente estables y se han aplicado a muestras muy diversas como aguas, muestras biológicas y alimentos (Yuen *et al.*, 1967; Yáñez-Sedeño y Díez, 1986; Chico Guijarro *et al.*, 1987; Shivhare y Gupta, 1991; Sakai, 1992; Jain *et al.*, 1993; Agudo *et al.*, 1993; Pérez-Ruiz *et al.*, 1994; Kesari *et al.*, 1997; Rai *et al.*, 1997; Minakata *et al.*, 2000). La espectroscopía de fluorescencia se ha utilizado como alternativa al UV con el objetivo de mejorar la selectividad y la sensibilidad en la determinación de los cuats. Así, se han desarrollado métodos, para la determinación de PQ, basados en la formación de un complejo de transferencia de carga entre el PQ y el benzaldehído (Pérez-Ruiz *et al.*, 1998) o mediante la reacción del PQ con el ácido ascórbico y el violeta de cresilo (Sendra *et al.*, 1999). Sin embargo, el DQ presenta un comportamiento similar al PQ de manera que interfieren mutuamente. Aunque los límites de detección de estos métodos suelen ser aceptables (2-50 $\mu\text{g/L}$), requieren un tiempo de análisis bastante largo y una gran manipulación de la muestra.

Las técnicas electroanalíticas también se han utilizado para el análisis del PQ y del DQ. No obstante, no pueden ser aplicadas para la determinación de CQ y MQ ya que no son especies electroactivas. Así, se encuentra descrita la valoración potenciométrica del PQ y del DQ con tetrafenilborato de sodio mediante la formación de pares iónicos (Vytras y Simickova-Stajerova, 1989) o la determinación potenciométrica de PQ en formulaciones y muestras biológicas (Saad *et al.*, 1998). También se han desarrollado diversos sensores electroquímicos para el análisis del PQ y del DQ basados en éteres corona o en formadores de pares iónicos (Moody *et al.*, 1987a y 1987b; Moody *et al.*, 1988), electrodos de membranas poliméricas (Saad *et al.*, 1997; Zen *et al.*, 1996), de oro modificado con una película polimerizada (Chang *et al.*, 1998), o electrodos de membrana de carbono (Bianco y Aghroud, 1997; Lu y Sun, 2000) o de pasta de carbono modificado (Pailleret *et al.*, 1997; Ayanthi y Nalaka, 2000). El PQ y el DQ también han sido analizados utilizando diversas técnicas amperométricas y voltamperométricas, como la polarografía, la voltamperometría de redisolución catódica, de onda cuadrada y de flujo continuo (Pinilla Macías *et al.*, 1993; Walcarius y Lamberts, 1996; Luque *et al.*, 1998; Ruhling, *et al.*, 1999; Galeano Díaz *et al.*, 2000). Con estos procedimientos se han conseguido límites de detección del orden de 1 $\mu\text{g/L}$ en diversas matrices.

También se han utilizado métodos fotocinéticos para la determinación de PQ y DQ, basados en la velocidad de fotoreducción de ambos analitos por el EDTA. La velocidad de fotoreducción, que es función lineal de la concentración de PQ o DQ, se monitoriza polarográficamente registrando la corriente de la p-benzoquinona que es reducida por los radicales $\text{PQ}^{\cdot-}$ o $\text{DQ}^{\cdot-}$ (Martínez *et al.*, 1988; Pérez-Ruiz *et al.*, 1990). En el caso del PQ, esta

metodología se ha aplicado al análisis en muestras biológicas y medioambientales, consiguiéndose límites de detección del orden de 20 $\mu\text{g/L}$.

Los herbicidas PQ, DQ y DF se han determinado también mediante métodos inmunológicos que proporcionan una gran especificidad, siendo el método ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) el más utilizado. El PQ es el herbicida para el que se han publicado un mayor número de trabajos utilizando ELISA usando tanto anticuerpos monoclonales como policlonales (Van Emmon *et al.*, 1986; Selisker *et al.*, 1995; Spinks *et al.*, 1999), mientras que tan solo se ha publicado un trabajo para la determinación de DF con anticuerpos policlonales (Yeung *et al.*, 1996). Recientemente se han desarrollado también inmunosensores para la determinación de PQ en muestras de agua (Mallat *et al.*, 2001a y 2001b) que permiten obtener límites de detección muy bajos, del orden de 0,06 $\mu\text{g/L}$, en aguas de río. Se ha desarrollado también un inmunosensor capilar de cuatro bandas lo que permite la determinación simultánea de cuatro pesticidas, entre ellos el PQ y el DQ. Para éstos, se han alcanzado límites de detección de 0,06 y 0,09 $\mu\text{g/L}$ respectivamente (Mastichiadis *et al.*, 2002).

Como se ha comentado previamente, la mayoría de las técnicas mencionadas se han aplicado a la determinación de uno o dos herbicidas en diversas muestras obteniéndose resultados bastante aceptables en determinados casos. Sin embargo, suelen ser técnicas de difícil aplicación para la determinación simultánea de los cinco compuestos incluidos en la familia de los cuats. Para ello son necesarias técnicas que permitan su separación, razón por la que la mayoría de las metodologías descritas en la literatura se basan en el uso de técnicas de separación cromatográficas y de electroforesis capilar.

Dentro de las técnicas cromatográficas, una de las que se ha utilizado para la determinación de los cuats ha sido la cromatografía de gases. Sin embargo, los cuats son sustancias poco volátiles e iónicas, inconveniente importante a la hora de analizarlos mediante esta técnica, lo que obliga a la transformación previa de estas especies a otras más volátiles. Éstas pueden obtenerse vía pirólisis, donde los cuats son convertidos en metano o acetileno (Cannard y Criddle, 1975; Greve y Hogendoorn, 1996). Otra posibilidad es utilizar la derivatización química, como puede ser la hidrogenación utilizando borohidruro de sodio (Hajšlová *et al.*, 1989), borohidruro de sodio con cloruro de níquel(II) (Kawase *et al.*, 1984) o la hidrogenación catalítica utilizando óxido de platino (Khan, 1974). También se han obtenido derivados mediante la reacción con reactivos como el benzotiolado de sodio (Tafari *et al.*, 1970) o el pentafluorotiofenol (Allender, 1992; Mortimer y Weber, 1994). Con respecto a los detectores se han utilizado el de ionización de llama, el de captura de electrones, el de nitrógeno-fósforo así como el acoplamiento a la espectrometría de masas. Aunque estas

metodologías pueden ser en algunos casos suficientemente sensibles, no se suelen utilizar con frecuencia para la determinación de estos herbicidas debido a los inconvenientes asociados a la manipulación de la muestra y a la necesidad de derivatizar los cuats.

Cromatografía de líquidos

La cromatografía de líquidos es la técnica de separación que más se ha utilizado para el análisis de los cuats pues es una técnica ideal para sustancias poco volátiles y no es necesaria la derivatización. En la Tabla 1.6 se incluyen las características más importantes de los procedimientos cromatográficos utilizados para la determinación de los cuats en diversas matrices utilizando diferentes tipos de cromatografía de líquidos. Como puede observarse, la mayoría de los métodos propuestos para el análisis de los cuats por cromatografía de líquidos utilizan detección espectrofotométrica en la zona del UV, por lo que tan sólo se han aplicado para el análisis de los herbicidas PQ, DQ y DF, ya que son los únicos que presentan grupos cromóforos. El CQ y el MQ, que carecen de grupos cromóforos, han sido también analizados por cromatografía de líquidos utilizando en este caso detección conductimétrica (Fegert *et al.*, 1991; Lautié *et al.*, 2000). Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se han analizado simultáneamente los cinco compuestos de la familia de los cuats. La utilización de la espectrometría de masas, como se verá más adelante, permite realizar el análisis simultáneo.

Utilizando LC-UV se han determinado los herbicidas PQ, DQ y DF en muestras de muy diversa procedencia como, por ejemplo, de interés medioambiental (aguas de río, suelos y aerosoles), de control alimentario (aguas de consumo, harinas, semillas, frutas, vegetales, tubérculos y productos cárnicos), fluidos biológicos (orina, sangre, suero y jugo gástrico), tejidos biológicos (hígado y cerebro, entre otros) y formulaciones.

En cuanto a las columnas y fases estacionarias las que más se han utilizado para la separación de los cuats son las de sílice y las fases enlazadas C₁₈ y C₈, utilizando básicamente la formación de pares iónicos para estas últimas. Sin embargo, también se han publicado trabajos que utilizan otros tipos de relleno como pueden ser el carbono grafitado (Ibáñez *et al.*, 1997), copolímeros de estireno divinilbenceno (Fegert *et al.*, 1991; Worobey, 1993) y resinas de intercambio iónico (Kawano *et al.*, 1975; Lautié *et al.*, 2000).

En relación con las columnas de sílice, éstas se han utilizado con frecuencia para la separación y análisis de los cuats (Simon y Taylor, 1989; Chichila y Walters, 1991; Chichila y Gilvydis, 1993; Ibáñez *et al.*, 1996a, 1996b y 1998; Itagaki *et al.*, 1997; Fernández *et al.*, 1998; Ouyang *et al.*, 2004). En este caso, las interacciones que tienen lugar no están

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos

Cuat	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
PQ	Formulación	Intercambio iónico / Vydac, resina sulfónica (250 x 3,2 mm d.i., 30-44 µm)	Dietilamina 200 mM en metanol 4-6 mL/min	10 mg/L	Kawano <i>et al.</i> , 1975
PQ	Orina	Fase invertida /	Metanol/tampón fosfatos pH 2,45 (14:11 v/v)	< 100 µg/L	Pryde y Darby, 1975
DQ	Jugo Gástrico	γ-aminopropil-trietoxisilano en alúmina 20 µm (Spherisorb A20Y, 125x5 mm)	0,66 mL/min	UV 258 nm (PQ) 310 nm (DQ)	
PQ	Marihuana	Formación pares iónicos / µBondapak C18 (300x4 mm)	Octanosulfonato de sodio 10 mM en 27 % (v/v) ACN-agua (pH 3,0 con ác. sulfúrico), 1,5 mL/min	UV 254 nm, 280 nm	Needham <i>et al.</i> , 1979
PQ	Semillas de girasol	Formación pares iónicos / µBondapak C18	Octanosulfonato de sodio 10 mM en 27 % (v/v) ACN-agua (pH 3,0 con ác. sulfúrico), 1,5 mL/min	UV 254, 280 nm	Paschal <i>et al.</i> , 1979
DF	Formulación	Fase invertida / Whatman Partisil PXS 10/25 ODS (250 x 4,6 mm d.i.)	Fosfato de Sodio 20 mM (pH 2,85); Acetonitrilo (7:3 v/v) 2 mL/min	UV 280 nm	Barry y Pike, 1980
DF	Harina	Formación pares iónicos / LiChrosorb RP-8 (250 x 4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : Octanosulfonato de sodio 100 mM (70:30 v/v), pH 3,0 1 mL/min	UV 265 nm	Lawrence <i>et al.</i> , 1981
DF	Agua	Fase invertida / Whatman Partisil PXS 10/24 (250 x 4,6 mm d.i.)	50 % v/v 20 mM dihidrogenoortofosfato de potasio (pH 3,0) : Acetonitrilo 2 mL/min	UV 255 nm	Ahmad, 1982
PQ	Orina	Formación pares iónicos / ODS-Hypersil (160 x 5 mm d.i., 3 µm)	25% metanol (v/v) con ác. heptanosulfónico 10 mM, dietilamina 100 mM, ác. ortofosfórico 200 mM, pH 2,5 1 mL/min	UV 290 nm	Gill y Moffat, 1983

^a Valor estimado.^b Con preconcentración *off-line* de 100 mL muestra utilizando cartuchos C₁₈ SEP-PAK.^c Nivel adicionado.

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
PQ	Agua	Fase invertida / Whatman Partisil PXS 10/24 (250 x 4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : Dihidrogenofosfato de amonio/ác. fosfórico (pH 3,0) 400 mM (30:70 v/v) 2 mL/min	0,05 mg/L ^a	Ahmad, 1983
PQ	Hígado Sangre	Formación pares iónicos / μ Bondapak C18 (250 x 4,9 mm d.i., 10 μ m)	Metanol : ácido octanosulfónico 10 mM en tampón de fosfatos pH 3 con dietilamina (25:75 v/v) 1,3 mL/min	0,1 μ g/g (hígado) 0,05 μ g/mL (sangre)	Querée <i>et al.</i> , 1985
PQ	Patata	Fase invertida / Hibar	0,02 g/L NaCl : Metanol : Acetonitrilo (15:10:75 v/v), pH 3,0 con ác. fosfórico 1 mL/min	0,02 μ g/g	Nagayama <i>et al.</i> , 1987
DQ	Arroz	LiChrosorb NH ₂ (250 x 4,0 mm d.i., 5 μ m)		UV 257 nm (PQ) 310 nm (DQ)	
PQ	Patatas	Formación pares iónicos / Hamilton PRP-1, copolímero estireno-divinilbenceno (305 x 7 mm d.i.)	Ácido heptanosulfónico 15 mM en solución acuosa de ác. fosfórico y dietilamina 3 mL/min	0,05 mg/Kg	Worobey, 1987
DQ				UV 254 nm (PQ) 313 nm (DQ)	
PQ	Agua	Columna de sílice / 2 cartuchos sílice (33 x 2,6 mm d.i., 3 μ m)	Hidróxido de tetrametilamonio 100 mM pH 2,5 con ác. sulfúrico, sulfato de amonio 200 mM 0,4 mL/min	0,1 μ g/L ^b	Simon y Taylor, 1989
DQ				UV 255 nm (PQ) 310 nm (DQ)	
PQ	Suero Orina	Intercambio iónico / TSK gel SP-25 W (250 x 4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : Tampón fosfatos 200 mM pH 3 1 mL/min	0,1 mg/L ^c	Nakagari <i>et al.</i> , 1989
DQ				UV 290 nm	
PQ	cerebro rata	Formación pares iónicos / Altex Ultrasphere ODS C ₁₈ (250 x 4,6 mm d.i., 5 μ m)	Heptanosulfonato de sodio 7,5 mM, ác. ortofosfórico 100 mM, pH 3 con trietilamina, 10 % acetonitrilo 1 mL/min	15 ng/g	Corasaniti <i>et al.</i> , 1990
PQ	Vegetales	Columna de sílice / Du Pont Zorbax, sílice (250 x 4,6 mm d.i.)	NaCl 0,08 M (pH 2,2 con HCl) / Acetonitrilo (3:2) 1 mL/min	0,01-0,5 mg/Kg ^c	Chichila y Walters, 1991
DQ				UV 257 nm (PQ) 310 nm (DQ)	

^a Con preconcentración *off-line* de 200 mL muestra utilizando cartuchos C₁₈ SEP-PAK.

^b Con preconcentración *off-line* de 100 mL muestra utilizando cartuchos de sílice.

^c Niveles adicionados.

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
MQ	Vegetales Pollo	Formación pares iónicos / Ionpac MPIC-NS 1, copolímero poliestireno- divinilbenceno (250 x 4 mm d.i., 10 µm)	Ác. Hexanosulfónico 2 mM, 3% Acetonitrilo 1 mL/min	0,05 mg/Kg	Fegert <i>et al.</i> , 1991
PQ DQ	patatas	Formación pares iónicos / Hamilton PRP-1 Copolímero estireno-divinilbenceno 10 µm	Ácido heptanosulfónico 15 mM en solución acuosa de ác. fosfórico y dietilamina 3 mL/min	0,05 mg/Kg UV 254 nm (PQ) 313 nm (DQ)	Worobey, 1993
PQ DQ	Tejido humano	Fase invertida / µBondapak C18 (300 x 3,9 mm d.i., 10 µm)	0,5% KBr, 5% metanol, trietilamina (1 mL/L), pH 3-4 con ác. fosfórico 0,8 mL/min	0,05 µg/g 256 nm (PQ) 310 nm (DQ)	Ito <i>et al.</i> , 1993
PQ DQ	Cereales	Columna de sílice / Zorbax sílice (250 x 4,6 mm d.i.)	NaCl 8 g/L pH 2,2 con ác. clorhídrico : acetónitrilo (3:2 v/v) 1 mL/min	0,01-0,3 mg/Kg ^a UV 257 nm (PQ) 310 nm (DQ)	Chichila y Gilvydis, 1993
PQ	Suero	Formación pares iónicos / Micsospher C18 (100 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Metanol : Heptanosulfonato de sodio 2g/L en tampón de fosfatos con dietilamina (20:80 v/v) 0,5 mL/min	0,025 µg/L ^b UV 258 nm	Croes <i>et al.</i> , 1993
PQ DQ DF	Agua	Formación pares iónicos / LiChrospher 100 RP-18 (125 x 4 mm d.i., 5 µm)	Heptanosulfonato de sodio 10 mM, ác. fosfórico 100 mM, trietilamina 100 mM : Acetonitrilo (93:7 v/v). Gradiente con acetónitrilo 1,3 mL/min	3,6 µg/L (PQ) 3,2 µg/L (DQ) 5,5 µg/L (DF) UV 257 nm (PQ, DQ) 310 nm (DF)	Carneiro <i>et al.</i> , 1994
DQ	Suero Orina	Formación pares iónicos / Zorbax C8 (240 x 4,6 mm d.i.)	Ác. ortofosfórico 200 mM, dietilamina 100 mM, ác. octanosulfónico 7,5 mM, 5% acetónitrilo 1 mL/min	0,05 µg/mL UV 310 nm	Ameno <i>et al.</i> , 1995
DQ	Fluidos y tejidos biológicos	Formación pares iónicos / µ-Bondapak C18 (300 x 3,8 mm d.i.)	Ác. octanosulfónico 10 mM (dietilamina y tetrahydrofurano) : acetónitrilo (92,5:7,5 v/v) 1 mL/min	10 mmol/g UV 315 nm	Madhu <i>et al.</i> , 1995

^a Niveles adicionados.^b Límite de cuantificación.

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Detección		
PQ DQ DF	Agua	Columna de sílice / Spherisorb SW3 (30 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Hidróxido de tetrametilamonio 20 mM, sulfato de amonio 200 mM, pH 3,0 con ác. sulfúrico, gradiente con metanol 0,5 mL/min	UV 260 nm (PQ) 310 nm (DQ) 255 nm (DF)	< 0,1 µg/L ^a	Ibáñez <i>et al.</i> , 1996a
PQ DQ DF	Agua	Columna de sílice / Spherisorb SW3 (30 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Hidróxido de tetrametilamonio 20 mM, sulfato de amonio 200 mM, pH 3,0 con ác. sulfúrico, gradiente con metanol 0,5 mL/min	UV 260 nm (PQ) 310 nm (DQ) 255 nm (DF)	20 ng/L ^b	Ibáñez <i>et al.</i> , 1996b
PQ DQ	Fluidos biológicos	Formación pares iónicos / LiChrospher 100 RP-18 ^c y Nova-Pak C18 (150x3,9 mm d.i.) ^d	25% Metanol con ác. octanosulfónico 10 mM, 13,4 mL/L ác. ortofosfórico, pH 3 con dietilamina 1 mL/min	UV 254 nm (PQ) 310 nm (DQ)	0,1 µg/mL ^c 0,5 µg/mL ^d	Sánchez Sellero <i>et al.</i> , 1996
PQ DQ DF	Agua	Columna de carbono / Hypercarb PCB (50 x 4,6 mm I.D.), base carbono	Hidróxido de tetrametilamonio, sulfato de amonio pH 3,0, gradiente con metanol 0,7 mL/min	UV 260 (PQ) 310 (DQ) 255 (DF)	< 0'1 µg/L ^e	Ibáñez <i>et al.</i> , 1997.
PQ DQ	Orina Suero	Columna de sílice / Cartucho sílice (Bio-Rad, 150 x 4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo:Agua (25:75 v/v) con ácido heptanosulfónico 10 mM, fosfato de potasio 4 mM, KCl 10 mM, pH 3,0 1 mL/min	UV 257 nm (PQ) 310 nm (DQ)	125 ng/mL (PQ) 63 ng/mL (DQ)	Itagaki <i>et al.</i> , 1997
PQ DQ	Agua	Formación pares iónicos / Phenomenex Spherisorb (100 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Ácido Heptanosulfónico 0,3% 2 mL/min	UV 257 nm (PQ) 308 nm (DQ)	0,68 µg/L (PQ) ^f 0,72 µg/L (DQ) ^f	Munch y Bashe, 1997
PQ	Agua	Formación pares iónicos / Hypersil ODS 3 µm	Hexanosulfonato de sodio 0,1% con trietilamina, pH 2,5 0,3 mL/min	UV 257 nm	--	Selim <i>et al.</i> , 1997

^a Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua utilizando cartuchos de sílice Sep-Pak.
^b Con preconcentración *on-line* de 200 mL de agua utilizando cartuchos de sílice LiChrospher.
^c Para plasma y orina.
^d Para humor vítreo.
^e Límite de cuantificación y con preconcentración *off-line* de 50 mL de agua utilizando cartuchos de base carbono (GCB).
^f Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua utilizando discos de C8.

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
PQ DQ DF	Agua	Columna de sílice / Spherisorb SW3 (30 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Hidróxido de tetrametilammonio 20 mM, sulfato de amonio 200 mM, pH 3,0 con ácido sulfúrico, gradiente con metanol 0,5 mL/min	<0,1 µg/L ^a	Fernández <i>et al.</i> , 1998
PQ DD DF	Agua	Columna de sílice / Spherisorb SW3 (30 x 4,6 mm d.i., 3 µm)	Hidróxido de tetrametilammonio, gradiente con metanol 0,5 mL/min	<0,1 µg/L ^a	Ibáñez <i>et al.</i> , 1998
PQ	Suero	Formación pares iónicos / Inertsil ODS-2 (150 x 4,6 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : Tampón de fosfatos 50 mM (pH 2,0) (17:83 v/v) con octanosulfonato de sodio 10 mM 1 mL/min	0,1 mg/L	Lee <i>et al.</i> , 1998
PQ	Patrones	Formación pares iónicos / C-18 Symmetry	ác. 1-hexanosulfónico 5 mM : metanol (70:30 v/v) 1 mL/min	--	Moctezuma <i>et al.</i> , 1999
PQ DQ DF	Agua	Formación pares iónicos / LiChrospher 100 RP-18 (125x4 mm d.i., 5 µm)	Heptanosulfonato de sodio 40 mM, ácido fosfórico 100 mM, trietilamina 100 mM, 5 % Acetonitrilo. Gradiente con Acetonitrilo 1 mL/min	0,2-0,3 µg/L ^b 0,2-0,8 µg/L ^c	Carneiro <i>et al.</i> , 2000
CQ	Peras	Intercambio iónico / ZORBAX SCX (250x4,6 mm d.i., 5 µm)	Ácido oxálico 0,22 mg/mL, etilendiamina 0,75 mg/mL : acetona (90:10 v/v) 1 mL/min	0,1 mg/Kg ^d	Lautié <i>et al.</i> , 2000
PQ	Plasma Orina	Columna de sílice / Zorbax RX-silica (250x4,6 mm d.i.)	Cloruro de sodio (5 g/L):Acetonitrilo (96:4 v/v), pH 2,2 1 mL/min	0,1 mg/L ^d	Taylor <i>et al.</i> , 2001

^a Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua utilizando cartuchos de sílice Sep-Pak.^b Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua utilizando cartuchos de base carbono (PGC).^c Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua utilizando cartuchos de sílice Sep-Pak.^d Límite de cuantificación.

Tabla 1.6. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Detección		
PQ DQ	sangre hígado cerebro	Formación pares iónicos / Puresil C18	Tampón de fosfatos 500 mM (pH 3), octanosulfonato de sodio 10 mM, etilendiamina 10 mM 1 mL/min	UV 290 nm	0,05 mg/Kg	Fuke <i>et al.</i> , 2002
PQ	plasma suero	Formación pares iónicos / NovaPak C18 (150x4,6 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : Octanosulfonato de sodio 3 mM, ác. fosfórico 100 mM pH 3,0 con dietilamina (10:90 v/v) 0,8 mL/min	UV 258 nm	0,1 mg/L	Paixao <i>et al.</i> , 2002
PQ	Plasma	Formación pares iónicos / ODS C18 (Varian) (250x4,6 mm d.i., 5 µm)	40% metanol, octanosulfonato de sodio 10 mM en ácido ortofosfórico 50 mM, pH 2,8 1 mL/min	UV 258 nm	0,005 µg/mL	Brunetto <i>et al.</i> , 2003
PQ DQ	Aerosol	Fase invertida / Stability RP Pesticidas (CIL Cluzeau, 250x3 mm, 5 µm)	Acetonitrilo : Agua : ác. acético (39:59:2 v/v) 0,5 mL/min	UV 227 nm	1,7 ng/m ³ (PQ) ^a 2,2 ng/m ³ (DQ) ^a	Baraud <i>et al.</i> , 2003
PQ	Suelos	Columna de sílice / Alltech sílice (250x4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : 0,1 M NaCl (pH 3,0 con HCl) (40:60 v/v) 1 mL/min	UV 257 nm	0,5 mg/L ^b	Ouyang <i>et al.</i> , 2004

^a En 300 m³ de aerosol recogido sobre filtros de poliuretano. LODs instrumentales (S/N 3) de aproximadamente 1 µmol/L.

^b En la solución de extracción (20 mL para 10 g de suelo).

completamente establecidas, si bien se acepta que pueden tener lugar via dos mecanismos, el de intercambio iónico y el de formación de pares iónicos en función de la fase móvil utilizada. Por lo general, se suelen utilizar fases móviles con aditivos a concentraciones relativamente elevadas, como pueden ser hidróxido de tetrametilamonio (Simon y Taylor, 1989, Ibáñez *et al.*, 1996a, 1996b y 1998; Fernández *et al.*, 1998) o disoluciones concentradas de cloruro de sodio (Chichila y Walters, 1991; Chichila y Gilvydis, 1993; Ouyang *et al.*, 2004). En muchos de estos métodos la fase móvil contiene además un disolvente orgánico como acetonitrilo o metanol, aunque también se ha descrito un método que adiciona a la fase móvil un formador de par iónico como el ácido heptanosulfónico (Itagaki *et al.*, 1997). Los límites de detección obtenidos empleando columnas de sílice no son muy buenos, encontrándose valores alrededor de los 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en muestras vegetales (Chichila y Walters, 1991; Chichila y Gilvydis, 1993) y de 60 a 120 $\mu\text{g}/\text{L}$ en fluidos biológicos (Itagaki *et al.*, 1997). Cabe señalar, sin embargo, que en el caso de muestras de agua de consumo, estos métodos pueden proporcionar límites de detección inferiores al valor legislado por la Unión Europea (0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$) aunque todos ellos requieren una etapa de preconcentración previa de la muestra (Ibáñez *et al.* 1996a, 1996b y 1998; Fernández *et al.*, 1998).

La cromatografía de líquidos en fase invertida es la modalidad que más se ha utilizado para el análisis de los cuats trabajando con o sin la formación de pares iónicos. En estos casos, las columnas más utilizadas son las fases enlazadas C_{18} y C_8 tanto de base sílice como polimérica. Con respecto a la formación de pares iónicos, los reactivos que se han empleado con más frecuencia son básicamente ácidos sulfónicos o las correspondientes sales sódicas, por ejemplo el ácido heptanosulfónico (Gill y Moffat, 1983, Worobey, 1987; Corasaniti *et al.*, 1990; Fegert *et al.*, 1991; Worobey, 1993; Croes *et al.*, 1993; Carneiro *et al.*, 1994; Munch y Bashe, 1997; Carneiro *et al.*, 2000), el ácido octanosulfónico (Needhan *et al.*, 1979; Paschal *et al.*, 1979; Lawrence *et al.*, 1981; Querée *et al.*, 1985; Ameno *et al.*, 1995; Madhu *et al.*, 1995; Sánchez Sello *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1998; Fuke *et al.*, 2002; Paixao *et al.*, 2002; Brunetto *et al.*, 2003) y el ácido hexanosulfónico (Selim *et al.*, 1997; Moctezuma *et al.*, 1999). Sin embargo, aunque estos reactivos son adecuados para el análisis mediante detección UV, son compuestos poco volátiles por lo que no pueden ser utilizadas, como se verá más adelante, al trabajar con la espectrometría de masas. Las fases móviles contienen, además, algún modificador orgánico, en general acetonitrilo o metanol y, en muchos casos se suelen añadir dietilamina o trietilamina para reducir las colas. Con la formación de pares iónicos se obtienen límites de detección relativamente bajos pues los picos son más simétricos que con los métodos anteriores y, en general, se observan menores variaciones en los tiempos de retención. Sin embargo, para cumplir la normativa de la Unión Europea en cuanto a los

niveles permitidos en aguas de consumo sigue siendo necesaria la aplicación de procedimientos de preconcentración (Munch y Bashe, 1997; Carneiro *et al.*, 2000). Cabe señalar que la separación mediante la formación de pares iónicos con ácido heptanosulfónico y con preconcentración previa es el método recomendado por la EPA para el análisis de PQ y DQ en aguas de consumo (Munch y Bashe, 1997), y el Index Merck (The Merck Index, 1996) recomienda para la determinación de DF el método propuesto por Carneiro, que utiliza la formación de pares iónicos con heptanosulfonato (Carneiro *et al.* 1994).

Como se ha comentado anteriormente, en la literatura también se encuentran descritos métodos que utilizan rellenos de fase invertida de base sílice sin la adición de reactivos formadores de pares iónicos (Barry y Pike, 1980; Ahma, 1982 y 1983; Ito *et al.*, 1993; Baraud *et al.*, 2003). Aunque no está del todo claro, parece ser que el mecanismo de separación tiene lugar mediante intercambio catiónico con los grupos silanol libres del soporte. En estos casos el pH de la fase móvil es un parámetro importante pues afecta a la ionización de los grupos silanol y, por tanto, a la retención de los cuats. Las fases móviles que básicamente se han utilizado son disoluciones reguladoras de fosfatos o ácido acético con acetonitrilo o metanol como disolvente orgánico y, también en algún caso, se ha añadido trietilamina para reducir la formación de colas en los picos (Ito *et al.*, 1993).

Aunque en una proporción mucho menor, también se han empleado otras fases estacionarias para la determinación de los cuats por cromatografía de líquidos. Así, se ha descrito un método que utiliza columnas de carbono grafitado para el análisis de PQ, DQ y DF en muestras de agua (Ibáñez *et al.*, 1997). Este procedimiento propone realizar la separación utilizando una fase móvil con hidróxido de tetrametilamonio y sulfato de amonio, utilizando en gradiente de concentración metanol para eluir los compuestos. La interacción que tiene lugar entre los cuats y la fase estacionaria de la columna es equivalente a la comentada en el Apartado 1.2.4.1. donde se describen procedimientos de preconcentración mediante SPE utilizando cartuchos de carbono grafitado. Con este procedimiento se han conseguido límites de detección inferiores a 0,1 µg/L, después de realizar una preconcentración *off-line* de 50 mL de agua utilizando cartuchos de extracción del mismo tipo. Estos límites de detección son similares a los obtenidos por los mismos autores utilizando columnas de sílice tanto para la preconcentración como para la separación (Ibáñez *et al.*, 1996a y 1998). También se han utilizado rellenos de fase enlazada aminopropilo (Pryde y Darby, 1975; Nagayama *et al.*, 1987). Aunque el mecanismo de interacción que tiene lugar no está establecido, parece ser que en este tipo de fases el metanol forma una capa en la fase enlazada produciéndose la distribución del PQ y el DQ entre esta capa y la fase móvil, ya que se observa que la retención de ambos herbicidas aumenta con el contenido de metanol.

Finalmente, cabe comentar que también se han utilizado resinas de intercambio iónico (Kawano *et al.*, 1975; Lautié *et al.*, 2000), aunque los límites de detección conseguidos con estas resinas no suelen ser muy bajos encontrándose alrededor de los mg/L debido a que, generalmente, se obtienen picos cromatográficos anchos y con colas.

Aunque muchos de los métodos indicados en la Tabla 1.6 permiten alcanzar límites de detección del orden de los $\mu\text{g/L}$ son métodos, sin embargo, muy poco específicos, pues mayoritariamente la detección se realiza por espectrofotometría en la zona del UV, lo que puede comportar problemas cuando se analizan muestras complejas. Además, tan solo se pueden analizar los herbicidas que presentan absorción en esa región, lo que no permite el análisis simultáneo de todos los cuats. El acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas se presenta como una solución a estos problemas pues se trata de un sistema de detección universal, lo que permite analizar los cinco analitos que se engloban en la familia de los cuats y, además, las diferentes modalidades de adquisición que presenta hacen que sea una técnica altamente específica lo que permite resolver muestras complejas. En consecuencia, la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS) se plantea como una técnica ideal para el análisis de los cuats. En la Tabla 1.7 se resumen algunos de los métodos utilizados para el análisis de los cuats mediante cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas. Como puede observarse la mayoría de los trabajos son relativamente recientes, por lo general se han publicado a partir de 1998, aunque los primeros métodos LC-MS aparecieron en el año 1993 (Barceló *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1993). En cuanto a las aplicaciones, estos métodos se han utilizado para analizar cuats en diversas matrices, principalmente en aguas, suelos, cereales, frutas y verduras. Sin embargo, a diferencia de los métodos de cromatografía de líquidos comentados anteriormente (Tabla 1.6) no existe hasta el momento ninguna aplicación que haya utilizado LC-MS para el análisis de los cuats en fluidos o tejidos biológicos. También cabe señalar que el número de trabajos que analizan CQ o MQ en frutas y verduras es considerable, observándose, sobre todo, un interés creciente en el análisis de CQ en peras debido a la regulación por la Unión Europea de este compuesto en este tipo de matriz (European Union, 2003c).

Las fases estacionarias más utilizadas para el análisis de los cuats por LC-MS son las resinas de intercambio iónico y las fases enlazadas C_8 y C_{18} , utilizadas estas últimas, principalmente, con formación de pares iónicos. Sin embargo, al trabajar con un espectrómetro de masas como sistema de detección es imprescindible que los componentes de la fase móvil sean volátiles para evitar problemas de deposición de sales en la interfase del acoplamiento LC-MS. Por ello, la mayoría de las disoluciones reguladores que se utilizan en

Tabla 1.7. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.	
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Adición post-columna	Interfase	Analizador			Detección
PQ	Suelo	Fase invertida / Lichrospher 100 RP-18, 5 µm	Acetato de amonio 50 mM-metanol (1:1 v/v), 1 mL/min	--	Thermospray	Cuadrupolo	MS (SIM)	0,10-0,17 µg/g (PQ/DQ) ^a en suelos	Barceló <i>et al.</i> , 1993
DF	Agua								
CQ									
MQ									
PQ	Agua	Formación pares iónicos / Shim-pack CLC-ODS, 5µm	Acetato de amonio 100 mM (pH 5 con TFA) en metanol-agua (80:20 v/v), 1 mL/min	--	Thermospray	Cuadrupolo	MS (SIM)	0,2 mg/L	Yoshida <i>et al.</i> , 1993
DQ									
PQ	Agua	Mezcla fase invertida-intercambio iónico / C18-intercambio iónico (Alltech) (250x4,6 mm)	Acetato de amonio 50 mM - acetonitrilo 1 mL/min	--	Particle beam	Cuadrupolo	MS	25 µg/L	Kambhampati <i>et al.</i> , 1994
DQ									
PQ	Agua	Formación pares iónicos / Zorbax Rx-C8 (2,1x150 mm)	Acetonitrilo y HFBA 10 mM (gradiente), 200 µL/min	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	MS/MS (MRM)	5 µg/L (PQ) 1 µg/L (DQ)	Marr y King, 1997
DQ									
PQ	Agua	Formación pares iónicos / Ultremex C1, 3 µm	TFA 25 mM en metanol-agua (7:93 v/v), 40 µL/min	--	Electrospray	Sectores magnéticos	MS	0,2 µg/L (PQ) ^b 0,1 µg/L (DQ) ^b	Taguchi <i>et al.</i> , 1998
DQ									
CQ	Cereales	Fase invertida / Spherisorb S5 ODS1 (250x2 mm)	Acetato de amonio 50 mM en ACN-metanol-agua-ácido acético (53:21:25:1 v/v) 250 µL/min	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	MS/MS (MRM)	9 µg/Kg	Vahl <i>et al.</i> , 1998

^a Niveles analizados.

^b Con preconcentración off-line (500 mL de agua) utilizando discos Envi-8 DSK.

Tabla 1.7. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Adición post-columna	Interfase	Analizador		
CQ	Cereales	Fase invertida / Spherisorb S5 ODS1 (250x2 mm)	Acetato de amonio 50 mM en ACN-metanol-agua-ácido acético (53:21:25:1 v/v) 250 µL/min	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	MS/MS (MRM)	6 µg/Kg (CQ) 2 µg/Kg (MQ) Juhler y Vahl, 1999
PQ		Formación pares iónicos / Kromasil C8 (200x2,1 mm, 5 µm)	15 mM HFBA en tampón ác. fórmico-formiato de amonio 100 mM (pH 3,3), gradiente con ACN, 200 µL/min	Acetonitrilo (800 µL/min APCI; 200 µL/min ESI)	Electrospray APCI	Cuadrupolo	MS	0,05-4,7 µg/L (ESI) ^a 0,05-1,8 µg/L (APCI) ^a Castro et al., 1999
CQ	Pera	Intercambio iónico / Partisil 10 SCX (150x2,1 mm)	Formato de amonio 50 mM en agua-metanol (1:1 v/v), 200 µL/min	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	MS (SIM); MS/MS (SRM)	4-10 µg/Kg (MS/MS) Startin et al., 1999
CQ	Pera	Intercambio iónico / Partisil 10 SCX (150x2,1 mm)	Acetato de amonio 50 mM en metanol-agua (1:1 v/v), 200 µL/min	--	Electrospray	Trampa de iones (IT) / Triple cuadrupolo (TQ)	MS/MS	4 µg/Kg (IT) 5 µg/Kg (TQ) Evans et al., 2000a
CQ	Pera	Fase invertida / Sherisorb S5 ODS1 (250x4,6 mm)	Etanoato de amonio 50 mM en <i>methylcyanide</i> -metanol-agua-ácido etanoico (53:21:25:1 v/v), 1 mL/min	--	Electrospray	Trampa de iones	MS (SIM); MS/MS	0,2 µg/Kg (SIM) 0,3 µg/Kg (MS/MS) Evans et al., 2000b
PQ		Formación pares iónicos / Kromasil C8 (200x2,1 mm, 5 µm)	15 mM HFBA en tampón ác. fórmico-formiato de amonio 100 mM (pH 3,3), gradiente con ACN, 200 µL/min	Acetonitrilo (400 µL/min)	Electrospray	Cuadrupolo	MS	60 ng/L (PQ) ^b 50 ng/L (DQ) ^b 5 ng/L (DF) ^b 20 ng/L (CQ) ^b 10 ng/L (MQ) ^b Castro et al., 2000

^a Con preconcentración off-line (250 mL de agua) utilizando cartuchos de sílice (Sep-Pak).^b Con preconcentración on-line (50 mL de agua) utilizando discos de extracción C₈.

Tabla 1.7. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Adición post-columna	Interfase	Analizador		
PQ	Agua	Formación pares iónicos / Inertsil ODS 3 (250x2,1 mm, 5 µm)	ácido nonafluoropentanoico 5 mM en acetonitrilo-agua (5:95 v/v), 200 µL/min	2-propanol (50 µL/min)	<i>Electrospray</i>	Cuadrupolo	MS (SIM)	0,1 µg/L (PQ) 0,2 µg/L (DQ) Takino <i>et al.</i> , 2000
CQ	Pera y concentrados	Intercambio iónico / MacroSphere (150x4.6 mm, 7 µm)	Acetato de amonio 25 mM en agua-metanol (3:2 v/v), 1 mL/min	--	<i>Electrospray</i>	Cuadrupolo	MS (SIM)	3 µg/Kg Zhao <i>et al.</i> , 2000
CQ	Pera	Fase invertida / Spherisorb CN (100x3 mm)	metanol-acetato de amonio 10 mM (1:1), 300 µL/min	--	<i>Electrospray</i>	Triple cuadrupolo	MS/MS (SRM)	7 µg/Kg Mol <i>et al.</i> , 2000
CQ	Pera zumos cereales purés	Intercambio iónico / Spherisorb SCX (150x2 mm)	Acetato de amonio 50 mM en metanol-agua (1:1 v/v)	--	<i>Electrospray</i>	Triple cuadrupolo	MS/MS	0,5-1,5 µg/Kg Hau <i>et al.</i> , 2000
CQ	Frutas purés zumos	Formación pares iónicos / Kromasil C8 (200x2,1 mm, 5 µm)	15 mM HFBA en tampón ác. fórmico-formiato de amonio 100 mM (pH 3,3), gradiente con ACN, 150 µL/min	Metanol (150 µL/min)	<i>Electrospray</i>	Trampa de iones	MS/MS	0,03 mg/Kg Castro <i>et al.</i> , 2001a
PQ	Agua	Formación pares iónicos / XTerra MS C8 (100x2,1 mm, 3 µm)	20 mM HFBA en tampón ác. fórmico-formiato de amonio 100 mM (pH 2,0), gradiente con ACN, 150 µL/min	Metanol (300 µL/min)	<i>Electrospray</i>	Trampa de iones	MS/MS	5 µg/L (PQ) 1 µg/L (DQ) <0,1 µg/L (DF) (DF) 1 µg/L (CQ) 0,5 µg/L (MQ) (C)

^a LODs entre 0,01 y 0,04 µg/L con preconcentración on-line (30 mL de agua) utilizando cartuchos de polidivinilbenceno (Hysphere Resin GP, 5-15 µm).

Tabla 1.7. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Adición post-columna	Interfase	Analizador		
PQ			15 mM HFBA en					
DQ		Formación pares iónicos / Kromasil C8 (200x2 mm d.i., 5 µm)	tampón ác. fórmico-formiato de amonio 100 mM (pH 3,3), gradiente con ACN, 200 µL/min	Metanol (300 µL/min)	Electrospray	Trampa de iones (IT) / Cuadrupolo (Q)	5-50 ng/L (IT) ^a 5-60 ng/L (Q) ^a	Castro <i>et al.</i> , 2001c
DF	Agua							
CQ		Formación pares iónicos / Phenomenex C18 (250x3 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : agua (1:1) con ác. trifluoroacético y acetato de amonio	--	Electrospray	Cuadrupolo	0,05-1 µg/L ^b	Thurman <i>et al.</i> , 2001
MQ	Agua							
PQ		Formación pares iónicos / Zorbax 5B-C3 (150x4,6 mm d.i., 5 µm)	Ácido Trifluoroacético 25 mM en Metanol:Agua (5:95 v/v), 750 µL/min	--	Electrospray	Cuadrupolo	0,1-0,2 µg/L ^c 0,01-0,02 µg/g ^d	Grey <i>et al.</i> , 2002
DQ	Agua							
Lechuga								
CQ	Peras	Intercambio iónico / IonPac CS12A (250x4 mm d.i.)	Acetonitrilo : ác. sulfúrico 20 mM (4:96 v/v) 1 mL/min	--	Electrospray	Trampa de iones	0,5 mg/Kg ^e	Peeters <i>et al.</i> , 2001
CQ	Peras	Intercambio iónico / Partisil SCX (150x4 mm d.i., 5 µm)	Acetato de amonio 100 mM en agua:metanol (60:40 v/v) 0,7 mL/min	--	Electrospray	Trampa de iones	0,1 mg/Kg	Zrostliková <i>et al.</i> , 2002
CQ	Tomates	Intercambio iónico / Dionex IonPac C15S (250x4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : Acetato de amonio 200 mM (40:60 v/v) 1 mL/min (split 1:9)	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	0,88 mg/Kg	Careri <i>et al.</i> , 2002

^a Con preconcentración *on-line* de 50 mL de muestra utilizando discos de extracción C8.^b Estudio comparativo APCI y Electrospray, estimándose estos LODs para los cuats.^c En muestras de agua. Con preconcentración *off-line* de 200 mL de muestra utilizando cartuchos de C18.^d En lechuga tras extracción con diclorometano/HCl, reconstitución en 200 mL de agua y extracción con cartuchos de C18.^e Utiliza supresor iónico Dionex CSRS.

Tabla 1.7. Métodos para la determinación de cuats por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil	Adición post-columna	Interfase	Analizador		
CQ	Peras	Intercambio iónico / GromSil	Formiato de amonio 150 mM en metanol:agua (1:1 v/v)	--	Electrospray	Triple cuadrupolo	1-6 µg/Kg (CQ) ^a	Riediker <i>et al.</i> , 2002
MQ	Tomates Harina	SCX (50x2 mm d.i., 5 µm)	0,3 mL/min				2-3 µg/Kg (MQ) ^a	

^a Preconcentración *on-line* (Prospekt) de 30 µL extracto utilizando cartuchos de intercambio iónico LiChrolut SCX.

la fase móvil son tampones de ácido acético-acetato de amonio o de ácido fórmico-formiato de amonio. Con respecto a los formadores de pares iónicos éstos han de ser también volátiles, por lo que se sustituyen los mencionados en la Tabla 1.6 por compuestos más volátiles como el ácido trifluoroacético (Yoshida *et al.*, 1993; Taguchi *et al.*, 1998; Thurman *et al.*, 2001; Grey *et al.*, 2002) y el ácido heptafluorobutírico (Marr y King, 1997; Castro *et al.*, 1999, 2000, 2001a, 2001b y 2001c), aunque también se han utilizado otros formadores de pares iónicos volátiles como el ácido nonafluoropentanoico (Takino *et al.*, 2000).

La fuente de ionización utilizada por excelencia para el acoplamiento LC-MS ha sido la electropulverización o *electrospray*, y es, por tanto, también la más utilizada para el análisis de los cuats. Sin embargo, también se han utilizado otras fuentes de ionización como la termopulverización o *Thermospray* (Barceló *et al.*, 1993; Yoshida *et al.*, 1993), el haz de partículas o *Particle Beam* (Kambhampati *et al.*, 1994) o la ionización química a presión atmosférica o APCI (Castro *et al.*, 1999). Algunos de los métodos descritos en la Tabla 1.7 utilizan la adición post-columna de algún disolvente orgánico, principalmente metanol o acetonitrilo (Castro *et al.*, 1999, 2000, 2001a, 2001b y 2001c; Takino *et al.*, 2000). Dado que básicamente se trata de métodos que utilizan la formación de pares iónicos como mecanismo de separación la adición post-columna del disolvente orgánico permite aumentar la sensibilidad de la técnica debido a que reduce el efecto de supresión en la ionización causado por el formador de par iónico y favorece la formación del espray en las fuentes de *electrospray*.

En cuanto a los analizadores de masas son los de tipo cuadrupolar (cuadrupolo sencillo y triple cuadrupolo) y la trampa de iones los que más se han utilizado para el análisis de los cuats por LC-MS, aunque también existe algún trabajo con sectores magnéticos (Taguchi *et al.*, 1998) e incluso con analizadores de tiempo de vuelo, en este caso utilizando *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization* (MALDI) como sistema de ionización (Horak *et al.*, 2001; Cheng y Hercules, 2001). Los límites de detección conseguidos por cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas son los más bajos obtenidos para el análisis de los cuats, si bien existen pequeñas variaciones en función del modo de adquisición. Así, los límites obtenidos en tándem MS/MS son más bajos que los obtenidos por MS, y dentro de éstos, el modo de adquisición en SRM (*Selected Reaction Monitoring*) es el que presenta los valores menores, encontrándose descritos límites de detección en cereales y frutas de entre 0,3 y 9 µg/Kg para el CQ y el MQ (Vahl *et al.*, 1998; Juhler y Vahl, 1999; Mol *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001b; Riediker *et al.*, 2002), aunque los obtenidos para el CQ en frutas con la trampa de iones son sólo ligeramente superiores, entre 0,2 y 30 µg/Kg (Evans *et al.*, 2000a; Castro *et al.*, 2001a). La utilización de preconcentración mediante extracción en fase sólida ha

permitido obtener límites de detección para los cuats en muestras de agua bastante bajos, a niveles de ng/L (Castro *et al.*, 2000, 2001b y 2001c).

Electroforesis capilar

Una técnica de separación ideal para el análisis de compuestos iónicos es la electroforesis capilar, y por ello es una buena alternativa a la cromatografía de líquidos para la determinación de los cuats. En la Tabla 1.8 se incluyen los métodos que utilizan electroforesis capilar y que se han aplicado para el análisis de esta familia de compuestos. Los primeros trabajos aparecieron en 1992 cuando Cai y El Rassi analizaron PQ y DQ en muestras de agua utilizando capilares de sílice fundida sin ningún tipo de tratamiento previo, obteniendo unos límites de detección de 0,4 y 0,5 mg/L para el PQ y el DQ respectivamente. Tomita *et al.* (1992) el mismo año pusieron apunto un método para la determinación de estos compuestos en muestras de suero aunque en este caso se lleva a cabo una extracción con cartuchos ODS-sílice y se obtuvieron unas recuperaciones para los dos herbicidas superiores al 97% en un intervalo de concentraciones de 0,5 a 2 mg/L. Tal como puede observarse en la Tabla 1.8 en la mayoría de trabajos se utilizan electroforesis capilar de zona (CZE) con detección UV, lo que ha restringido estas metodologías al análisis de los tres herbicidas que presentan absorción en dicha región, el PQ, el DQ y el DF. Los dos primeros, PQ y DQ, son los más estudiados debido a su importancia y toxicidad, tal como ha sido comentado en los apartados anteriores. Con respecto a las matrices, ambos se han determinado en muestras de orina y suero (Pérez-Ruiz *et al.*, 1996; Wu y Tsai, 1998; Vinner *et al.*, 2001) y en suelos y algunos tubérculos como las patatas (Vinner *et al.*, 2001). De todos modos, las muestras de agua han sido las más estudiadas, así por ejemplo se han analizado los tres herbicidas con CE y detección UV en muestras de agua de regadío, de río y de consumo (Carneiro *et al.*, 1994; Galceran *et al.*, 1994; Carneiro *et al.*, 2000; Mallat *et al.*, 2001b; Santilio *et al.*, 2003) con LODs entre 0,3 y 30 µg/L. Para el análisis simultáneo de los tres herbicidas (PQ, DQ y DF) y de los dos reguladores del crecimiento (CQ y MQ) que carecen de grupos cromóforos, se ha propuesto la electroforesis capilar con detección UV-indirecta utilizando diversos cromóforos (Galceran *et al.*, 1997) aunque en este caso los límites de detección son superiores y se encuentran entre 2,5 y 6,9 mg/L en aguas de consumo utilizando inyección hidrodinámica.

Una variante de la electroforesis capilar que se conoce como isotacoforesis capilar (ITC) también ha sido utilizada para la determinación de los cuats. Así, el PQ, DQ y CQ han sido analizados en aguas y suelos, y el CQ en un preparado comercial conocido como Retacel

Tabla 1.8. Métodos para la determinación de cuats por electroforesis capilar

Cuat	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección		
PQ DQ CQ	Agua Suelos	Sílice fundida capilar de pre-separación: 22 cm x 0,75 mm d.i. Capilar analítico: 25 cm x 0,3 mm d.i.	Isotacoforesis: Electrolito de cabeza: Citrato de potasio pH 6,0 (PQ), Diidrotirosinato de potasio pH 7,4 (DQ) Electrolito terminal: Tris ⁺ -acetato 5 mM Aditivo: 0,05% PVA	Isotacoforesis: 25,9 µL	10 µg/Kg (suelos)	Stránský, 1985
PQ DQ	Agua	Sílice fundida 80 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	Fosfato de sodio 100 mM (pH 7,0), NaCl 0,2 M / 15 kV	Electrocínética 2-5 s, 15 kV	0,30 mg/L (PQ) 0,25 mg/L (DQ)	Cai y El Rassi, 1992
PQ DQ	Suero	Sílice fundida 75 cm x 50 µm d.i.	Glicina-HCl 10 mM (pH 3,0), NaCl 40 mM, 20% MeOH / 20 kV	Hidrodinámica 5 s	0,05 mg/L	Tomita <i>et al.</i> , 1992
CQ	Preparado comercial	Sílice fundida: capilar de pre-separación: 20 cm x 0,8 mm d.i. Capilar analítico: 20 cm x 0,3 mm d.i.	Isotacoforesis: Electrolito de cabeza: acetato de sodio 0,01 M, pH 4,5 Electrolito terminal: ácido 6- aminocaproico 0,01 M, pH 4,5	Isotacoforesis: 30 µL	--	Holeček <i>et al.</i> , 1993
PQ DQ	Patatas	Capilar modificado de sílice fundida (Bio-Rad) 50 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 45,4 cm	Tampón de fosfatos 0,1 M, pH 2,5 20 kV	Electrocínética 20 s, 4 kV	0,01 mg/Kg	Wigfield <i>et al.</i> , 1993
PQ DQ DF	Agua de riego	Sílice fundida 72 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	Acido acético-acetato de sodio pH 4,0, NaCl 100 mM / 15 kV	Electrocínética, 10 s, 5 kV	21 µg/L (PQ) 18 µg/L (DQ) 31 µg/L (DF)	Cameiro <i>et al.</i> , 1994
PQ DQ DF	Agua (patrones)	Sílice fundida 72 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	Acido acético-acetato de sodio pH 4,0, NaCl 100 mM / 15 kV	Electrocínética, 10 s, 5 kV	2,3 µg/L (PQ) 3,9 µg/L (DQ) 2,9 µg/L (DF)	Galceran <i>et al.</i> , 1994

Tabla 1.8. Métodos para la determinación de cuats por electroforesis capilar (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección		
PQ DQ	Agua	Capilar ITP: Sílice fundida, 8 cm x 0,85 mm d.i. Capilar CZE: Sílice fundida, 35 cm x 0,25 mm d.i. Long. efectiva: 25 cm	Isotacoforesis: ácido cítrico pH 6,08, K ⁺ 10 mM, MHEC 0,2 % CZE: Citrato pH 6,08, Tris ⁺ 10 mM, PEG 0,15%	Isotacoforesis: 25 µL	0,2 µg/L	Kaniansky <i>et al.</i> , 1994
PQ DQ	agua suelos suero orina patatas	Sílice fundida 57 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	Fosfato 100 mM, pH 4,0, 10 % acetónitrilo / 12 kV	Electrocínético 10 s, 5 kV Hidrodinámico 3 s	0,08 mg/Kg en suelos	Pérez-Ruiz <i>et al.</i> , 1996
CQ	Agua	Sílice fundida 80 cm x 50 µ0 d.i. Long. efectiva: 70 cm	Creatina 10 mM pH 3,6 con ác etanoico / 30 kV	Hidrodinámico 5 s	5 mg/L	Wycherley <i>et al.</i> , 1996
PQ DQ DF CQ MQ	Agua	Sílice fundida 72 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	clorhidrato de 1-(4- piridil)piridinio 10 mM (pH 2,5), 10 % metanol / 20 kV	Hidrodinámico 5 s	5,0 mg/L (PQ) 5,1 mg/L (DQ) 6,9 mg/L (DF) 2,8 mg/L (CQ) 2,5 mg/L (MQ)	Galceran <i>et al.</i> , 1997
PQ DQ	Agua	Sílice fundida recubiertos con 3 % de poliacrilamida lineal 45 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 30 cm	Isotacoforesis: Electrolito de cabeza: Sulfato de sodio, pH 6,5 (con HCl) Electrolito terminal: Tris, pH 6,5 (con HCl)	Electrocínético 30-120 s, 4-8 kV	335 µg/L (PQ) 360 µg/L (DQ)	Walker <i>et al.</i> , 1997
PQ DQ	Orina	Sílice fundida 47 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 40 cm	Glicina 10 mM pH 3,0, NaCl 50 mM, 20 % metanol	Hidrodinámico 2 s	8-15 µg/L ^a	Wu y Tsai, 1998

^a Con preconcentración *off-line* utilizando cartuchos de C₁₈.

Tabla 1.8. Métodos para la determinación de cuats por electroforesis capilar (continuación)

Cuat	Muestra	Procedimiento				LOD	Ref.
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección	Detección		
PQ DQ DF	Agua	Sílice fundida 72 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	ácido acético-acetato de sodio 60 mM, pH 4,0, NaCl 100 mM	Hidrodinámico 10 s	UV 205 nm	2-3 µg/L ^a 0,9-20 µg/L ^b	Carneiro <i>et al.</i> , 2000
PQ DQ	Agua	Sílice fundida 47 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 40 cm	Acetato de amonio 50 mM, NaCl 100 mM, pH 3,3 (con HCl) / 10 kV	Hidrodinámico 5 s	UV 214 nm	0,3 µg/L ^c	Mallat <i>et al.</i> , 2001b
PQ DQ DF	Patrones	Sílice fundida 83,5 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 75 cm	Tampón fosfato pH 4,0, 10 % metanol / 20 kV	Electrocinético 3 s, 10 kV	UV ^d 254 nm	0,06 mg/L (PQ) 0,17 mg/L (DQ) 0,18 mg/L (DF)	Santilio <i>et al.</i> , 2003

^a Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua de consumo o de río utilizando cartuchos de carbono grafitado.

^b Con preconcentración *off-line* de 250 mL de agua de consumo o de río utilizando cartuchos de sílice.

^c Con preconcentración *off-line* de 100 mL de agua de río utilizando cartuchos de sílice.

^d Acoplado a celda de alta sensibilidad

utilizando isotacoforesis capilar con detección conductimétrica (Stránský, 1985; Koleček *et al.*, 1993). Esta técnica también se ha empleado para la determinación de los herbicidas en muestras de agua con detección por espectroscopia Raman (Walker *et al.*, 1997) y se ha aplicado como pretratamiento para eliminar los efectos de matriz y preconcentrar los herbicidas para una posterior determinación por electroforesis capilar. De esta forma se pueden determinar PQ y DQ en muestras de agua utilizando preconcentración *on-line* con isotacoforesis y determinación con electroforesis capilar con detección UV (Kaniansky *et al.*, 1994). Con este método es posible introducir en el sistema un volumen de muestra de 90 μL y conseguir unos límites de detección de alrededor de 0,2 $\mu\text{g/L}$.

Por lo que hace referencia a los métodos que utilizan electroforesis capilar convencional podemos observar que se han empleado disoluciones reguladoras muy diversas, como por ejemplo tampones de fosfatos, de ácido acético-acetato de sodio, o de acetato de amonio. En la mayoría de los casos las concentraciones de los electrolitos son elevadas lo que permite aumentar la fuerza iónica y ayuda a mejorar la resolución entre los herbicidas. El cloruro de sodio es uno de los electrolitos más utilizados (Cai y El Rassi, 1992; Tomita *et al.*, 1992; Carneiro *et al.*, 1994; Galceran *et al.*, 1994; Wu y Tsai, 1998; Carneiro *et al.*, 2000; Mallat *et al.*, 2001b). En cuanto al modo de introducción de la muestra se utiliza tanto la inyección en modo hidrodinámico como en modo electrocinético. No obstante, aunque el modo electrocinético proporciona mejores límites de detección, comporta una disminución en la repetitividad y reproducibilidad y, además, discrimina entre los analitos.

Recientemente la electroforesis capilar en microchips está ganando importancia ya que permite realizar análisis con volúmenes de muestra muy pequeños y en tiempos de análisis muy cortos. Además, se presenta como un sistema ideal para la realización de análisis *in-situ*. Por lo que hace referencia a los cuats, se ha utilizado la isotacoforesis en microchip para determinar PQ y DQ en patrones utilizando para su detección espectroscopía Raman (Walker *et al.*, 1998). Utilizando un canal de 21 μm de ancho y 75 μm de profundidad, y introduciendo la muestra electrocinéticamente a un potencial de 4 kV durante 1-2 min, se han conseguido límites de detección de 60 $\mu\text{g/L}$ y 40 $\mu\text{g/L}$ para el PQ y el DQ respectivamente.

En relación a otras modalidades de electroforesis capilar, no existe en la literatura ningún trabajo que las utilice para la determinación de esta familia de compuestos.

Al igual que con la cromatografía de líquidos, el acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas permite disponer de una técnica más selectiva y capaz de analizar simultáneamente los cinco compuestos de la familia de los cuats. Sin embargo, tan sólo existen, hasta el momento, cuatro publicaciones que utilizan esta técnica y en todas ellas se ha estudiado la presencia de cuats en muestras de agua. En la Tabla 1.9 se resumen algunos

aspectos de estos métodos. La mayoría de los trabajos utilizan espectrómetros de masas cuadrupolares (Moyano *et al.*, 1996; Song y Budde, 1996; Wycherley *et al.*, 1996) a excepción del estudio de Lazar y Lee que utiliza un analizador de tiempo de vuelo (Lazar y Lee, 1999). Todos los trabajos utilizan *electrospray* como técnica de ionización y tan sólo en uno de ellos (Moyano *et al.*, 1996) se determinan simultáneamente los cinco herbicidas, consiguiendo límites de detección en agua de bebida entre 10 y 70 $\mu\text{g/L}$ con inyección electrocinética. No existe ningún trabajo que haya acoplado la electroforesis capilar a un analizador de trampa de iones a excepción del que es objeto de esta tesis doctoral y que se incluye en el capítulo 2 de esta memoria.

Las disoluciones reguladoras utilizadas están constituidas por tampones volátiles, principalmente de ácido acético-acetato de amonio y suelen contener algún modificador orgánico como metanol o acetonitrilo, que ayuda a mejorar la resolución entre los cuats. Con respecto a los capilares utilizados, estos son los mismos que para electroforesis capilar, sin embargo su longitud total ha de ser mayor dado que el extremo de salida del capilar ha de llegar hasta la entrada del espectrómetro. Esto implica que parte del capilar quede al aire libre, entre la electroforesis capilar y el espectrómetro de masas, no controlándose su temperatura. No obstante, hoy en día existen instrumentos que permiten introducir el capilar a través de una conducción por la que circula líquido refrigerante, solventando este problema.

Todos los métodos descritos para el análisis de los cuats utilizan además un líquido envolvente que se mezcla en la fuente de ionización con el flujo que proviene de la electroforesis. Básicamente estas disoluciones permiten cerrar el circuito eléctrico y ayudan a la evaporación y formación del *espray* por lo que suelen tener un alto contenido orgánico (principalmente metanol) y algún electrolito para que sean conductoras. Algunos de los aspectos más relevantes del acoplamiento CE-MS serán comentados más extensamente en el capítulo 2 de esta memoria.

Tabla 1.9. Métodos para la determinación de cuats por electroforesis capilar-espectrometría de masas

Cuat	Muestra	Procedimiento			MS		LOD	Ref.	
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección	Interfase	Líquido Envolvente			Analizador y detección
PQ			ácido acético/acetato de amonio 50 mM, pH 4,0, 10 % metanol / 20 kV	Electrocínético 10 s, 10 kV	<i>Electrospray</i>	metanol-ácido acético (10 mM) (9:1)	Triple cuadropolo Detección: MS	45 µg/L (PQ) 70 µg/L (DQ) 20 µg/L (DF) 20 µg/L (CQ) 10 µg/L (MQ)	Moyano <i>et al.</i> , 1996
DQ	Agua	Sílice fundida 65 cm x 50 µm d.i.				3 µL/min			
PQ			0,5-1,5 % ácido acético en 50 % (v/v) agua-						
DQ	Agua	Sílice fundida 90 cm x 75 µm d.i.	metanol, citrato de amonio 5 mM, pH 3,9 ajustado con acético / 25 kV	Hidrodinámico 50 nL	<i>Electrospray</i>	0,1 % ácido acético en metanol 2 µL/min	cuadropolo Detección: MS	200 µg/L	Song y Budde, 1996
CQ	Agua	Sílice fundida 80 cm x 50 µm d.i.	Creatinina 10 mM, pH 3,6 con ácido etanoico / 30 kV	Hidrodinámico 5 s (5 nL)	<i>Electrospray</i>	Metanol : agua acidificada con 1 % ácido acético (1:1), 20 µL/min	cuadropolo Detección: MS	--	Wycherley <i>et al.</i> , 1996
PQ			Acido acético-acetato de amonio 100 mM pH 7,2 : acetonitrilo 1:1 / 30 kV	Electrocínética 3 s, 5 kV	<i>Electrospray</i>	metanol :agua:ácido fórmico (80:20:0,1 v/v) 1 µL/min	TOF-MS	--	Lazar y Lee, 1999
DQ	Agua	Sílice fundida 100 cm x 50 µm d.i.							

1.2. SALES DE AMONIO CUATERNARIO CON CARÁCTER BIOCIDA: EL CLORURO DE BENZALCÓNIO

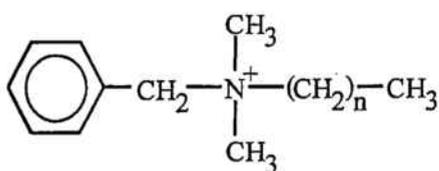
1.2.1. Introducción

Las sales de amonio cuaternario con carácter biocida forman parte de la familia de los tensioactivos. En general estos compuestos tienen como característica la capacidad de concentrarse o acumularse en la interfase entre dos medios, alterando así la tensión superficial. Hoy en día y desde un punto de vista ambiental y toxicológico se ha generado un gran interés en esta familia de compuestos. Su estudio pretende por un lado, mantener en valores mínimos el nivel de contaminación de ríos, lagos y costas, y por otro, asegurar el funcionamiento correcto de instalaciones de depuración de aguas residuales. Básicamente, estos compuestos presentan una estructura molecular lineal y asimétrica, con un grupo hidrofílico y uno hidrofóbico en sus extremos. La parte hidrofóbica suele ser una cadena alifática, ya sea lineal o ramificada, que contiene de 10 a 18 átomos de carbono. Por otro lado, el grupo hidrofílico, que determina la solubilidad de los tensioactivos en las aguas, es un grupo polar que puede presentar tanto carácter ácido como básico. En función de este grupo hidrofílico los tensioactivos se clasifican en tres grandes grupos: tensioactivos aniónicos, catiónicos y no iónicos. En esta introducción nos centraremos tan solo en los tensioactivos catiónicos, pues algunos de ellos son objeto de estudio en esta memoria.

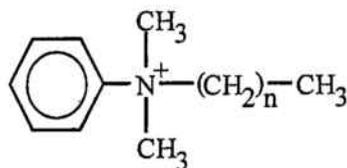
Los tensioactivos catiónicos se caracterizan por presentar un grupo hidrofílico cargado positivamente y entre los compuestos de esta familia los que presentan un mayor interés a nivel industrial son compuestos grasos nitrogenados y, especialmente, compuestos con nitrógeno cuaternario. La estructura y nomenclatura de algunos tensioactivos de nitrógeno cuaternario se muestran en la Figura 1.1. Estos compuestos tienen poca utilidad en procesos de limpieza, porque la mayoría de superficies tienen cargas negativas y los cationes se retienen sobre ellas en lugar de solubilizar la suciedad adherida. Sin embargo, algunos de estos compuestos presentan actividad biocida y suelen ser utilizados frecuentemente como agentes antisépticos eliminando o inhibiendo el crecimiento de bacterias u otros microorganismos patógenos. Los agentes antisépticos más comunes suelen ser el cloruro de benzalconio, la cetrimida, la clorhexidina, el hexaclorofeno y algunos compuestos iodados.

Otras sustancias que también han sido utilizadas para aplicaciones antisépticas son el ácido bórico y algunos aceites volátiles como el metilsalicilato. Estos compuestos son, con frecuencia, vertidos a las aguas superficiales desde las plantas de tratamiento de aguas residuales por lo que pueden presentar problemas ya que son tóxicos para algunos organismos

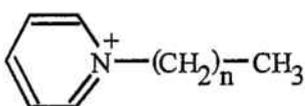
acuáticos (Richards y Xing, 1993). Su presencia en el medioambiente es preocupante ya que se carece de datos sobre su degradación y algunos de ellos son tóxicos a bajas concentraciones (Sánchez-Leal *et al.*, 1994).



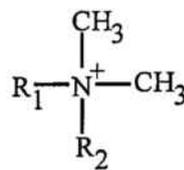
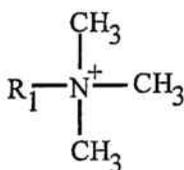
Sales de alquibencildimetil amonio



Sales de alquildimetilfenil amonio



Sales de alquilpiridinio

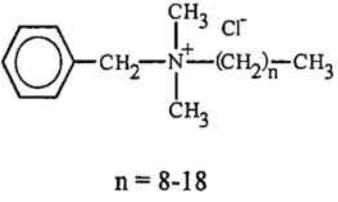


Sales de alquiltrimetil- y dialquildimetil amonio

Figura 1.1. Estructura y nomenclatura de los principales tipos de tensioactivos catiónicos

Las sales de amonio cuaternario con actividad biocida suelen contener en su estructura al menos una cadena hidrocarbonada larga y entre las más utilizadas se encuentra el cloruro de benzalconio. El cloruro de benzalconio comercial es una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio donde los grupos alquilo son cadenas hidrocarbonadas con una longitud de entre 8 y 18 átomos de carbono (Merck, 2001). En la Tabla 1.10 se indica la estructura molecular de este compuesto así como su nombre según la nomenclatura del CAS, los acrónimos más utilizados y el nombre de algunas formulaciones comerciales. Aunque no existe un nombre común ISO para esta mezcla, la Organización Mundial de la Salud acepta el nombre de cloruro de benzalconio (Compendium of Pesticide Common Names, 2003) y las abreviaturas BAC o BZK se utilizan con frecuencia. Esta mezcla se usa como sustancia activa en productos antibactericidas y/o antifúngicas, como conservante en alimentos enlatados, como algacida en piscinas, en formulaciones cosméticas, como desinfectante hospitalario y en preparaciones para el tratamiento de infecciones menores oculares, bucales y de garganta (Ambrus *et al.*, 1987; Gómez-Gomar *et al.*, 1990; Cross y Singer, 1994). También se utiliza en el último enjuague en servicios de lavandería de hospitales y otras instituciones. Como se ha mencionado anteriormente, también es un agente antiséptico y se usa con frecuencia para limpiar heridas y quemaduras en la piel (Reynolds, 1996).

Tabla 1.10. Cloruro de benzalconio. Nomenclatura, estructura y productos comerciales.

Estructura molecular	Nombre CAS	Acrónimos utilizados	Formulaciones comerciales
 <p style="text-align: center;">n = 8-18</p>	Alkylbenzyl-dimethyl-ammonium chloride	BAC BZK	Ammonyx, Benirol, Bradophen, BTC, Capitol, Cequaryl, Drapolene, Drapolex, Enuclen, Germinol, Germitol, Morpan BC, Osvan, Paralkan, Quadrilan+so BC, Rewoquat B 50, Roccal, Rodalon, Variquat+so 50MC, Zephiran chloride, Zephirol, Zilkonium chloride, Zoharquat 50

Fuente: Compendium of Pesticide Common Names (2003), www.chemservice.com y www.chemicaland21.com

Se suele presentar en forma de un polvo higroscópico amorfo de color blanco o amarillento, jabonoso al tacto y con un moderado olor aromático. Es bastante soluble en acetona, etanol, metanol, propanol y agua, y prácticamente insoluble en éter. Las disoluciones acuosas de este preparado presentan una tensión superficial baja y poseen propiedades detergentes y emulsionantes (Wade y Weller, 1994).

Los homólogos más habituales suelen ser los que presentan una cadena hidrocarbonada de 12, 14 o 16 átomos de carbono (C₁₂-BAC, C₁₄-BAC y C₁₆-BAC respectivamente). Cada uno de ellos posee propiedades físicas y químicas diferentes y, además, una acción biocida también diferente. Así, en términos generales, el homólogo C₁₂-BAC es más efectivo contra las levaduras y los hongos, el C₁₄-BAC contra las bacterias gram-positivo y el C₁₆-BAC contra las bacterias gram-negativo (Merianos, 1991). La proporción de cada homólogo en la mezcla final determinará, por lo tanto, su eficacia como conservante y desinfectante.

Otras sales de amonio cuaternario del tipo dialquildimetilamonio presentan también actividad biocida y algunos fabricantes de productos desinfectantes para hospitales han sustituido el BAC por alguna de ellas, especialmente el cloruro de didecildimetilamonio (DDMAC), la estructura del cual se muestra en la Figura 1.2. Este compuesto, a diferencia de los homólogos del BAC, no presenta grupos cromóforos y, por lo tanto, no absorbe en la zona del ultravioleta, lo que limita el número de técnicas a utilizar para su análisis.

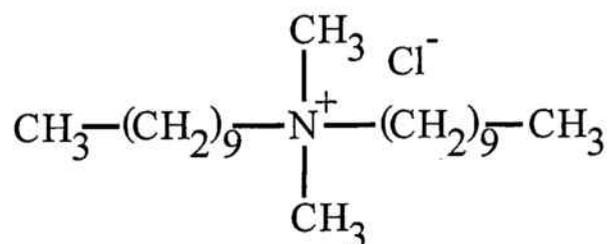


Figura 1.2. Estructura molecular del cloruro de didecildimetilamonio (DDMAC).

1.2.2. Toxicidad

La toxicidad del cloruro de benzalconio puede considerarse relativamente alta. En la Tabla 1.11 se incluyen los valores de LD₅₀, en algunos animales, obtenidos utilizando diferentes vías de administración. Como puede observarse los LD₅₀ varían en función del tipo de animal y del tipo de exposición (Wade y Weller, 1994). Como es de esperar, una exposición a través de la piel requiere de un nivel de concentración mayor que mediante exposición oral. La toxicidad de esta sustancia no ha sido tan estudiada como la de los cuats pero para los animales incluidos en la Tabla 1.11 los valores de LD₅₀ observados son bastante similares a los descritos para los herbicidas PQ y DQ, que son los más tóxicos de la familia (Tabla 1.4). También se han realizado bioensayos de toxicidad acuática para estos compuestos que consisten en poner en contacto una fracción diluida del efluente a examinar con un número dado de individuos de una especie determinada, a una temperatura fijada. Después de un tiempo determinado se examina la proporción de individuos que han quedado afectados por el contacto con el efluente. De esta forma, se puede llegar a evaluar la toxicidad de un medio contaminante sobre un organismo y deducir del efecto la causa, una vez conocida, por los test de toxicidad, la relación entre la concentración de contaminante y la tasa de mortalidad de los individuos en un tiempo determinado (LC_x). Con respecto a la toxicidad del BAC para los peces, ésta es elevada encontrándose valores de LC₀ de entre 0.5 y 4 mg/L o de LC₁₀₀ entre 2 y 5 mg/L (TIS, 1995).

Otros ensayos utilizados para evaluar la toxicidad de compuestos son los test de genotoxicidad que usan bacterias luminiscentes. Estos test se basan en la medida de la cantidad de luz emitida por las bacterias antes y después de su contacto con la muestra acuosa contaminada. Los resultados se suelen expresar en función de la concentración efectiva que produce un 50% de disminución de la emisión de la luz y que se designa por EC₅₀. Cuanto más baja es la concentración que corresponde a la EC₅₀, más tóxica es la sustancia o la

muestra ensayada. Así, para el caso del BAC se ha obtenido un valor de EC_{50} de 10 mg/L (TIS, 1995) y un EC_0 de 4 mg/L para la *Pseudomonas putida* (Kümmerer *et al.*, 1997).

Tabla 1.11. LD_{50} oral del cloruro de benzalconio en algunos animales (mg/Kg).

Animal	Exposición	LD_{50}
cobaya	oral	200
ratón	oral	175
rata	oral	240
rata	piel	1560

Fuente: Wade y Weller, 1994.

Con respecto a los seres humanos, la intoxicación se suele producir por vía oral (Vale y Meredith, 1985), pero un grado de intoxicación grave con BAC suele ser raro debido a las bajas concentraciones a las que se encuentra en la mayoría de los preparados (Vale y Meredith, 1985) y a su fácil eliminación a través de las heces (Craig y Stitzel, 1994). No obstante, al igual que con otras sales de amonio cuaternario, la ingestión de elevadas concentraciones puede producir quemaduras en los labios, lengua, boca, garganta, esófago y estómago (Chataigner *et al.*, 1991) debido al carácter cáustico de estas sustancias. Además, suele producir hipersalivación, vómitos, diarrea y confusión (van Berkel y de Wolff, 1988). Una intoxicación severa puede producir hipotensión, parálisis respiratoria, convulsiones, coma y parada cardiorrespiratoria (Mathieu-Nolf *et al.*, 1985). También se han descrito algunos casos de muerte, donde se indica que ésta puede ocurrir entre 1 y 3 horas después de la ingestión (Chataigner *et al.*, 1991; Hitosugi *et al.*, 1998). Además, existen estudios que confirman que la presencia de alcohol puede potenciar el efecto letal de este tipo de sustancias (Adelson y Sunshine, 1952). Se ha estimado que a partir de una dosis oral de entre 100 y 400 mg/Kg (en términos generales y para sales de amonio cuaternario de esta familia) se puede producir la muerte (Ellenhorn *et al.*, 1997).

Algunos estudios muestran que el cloruro de benzalconio presente en algunos preparados nasales puede producir rigidez e hinchazón de la mucosa nasal (Reynolds, 1996). La inhalación puede causar, además, la constricción de los bronquios (Graf *et al.*, 1995; Hallen y Graf, 1995) y asma (Bernstein *et al.*, 1974).

Los vertidos accidentales de este tipo de sustancias sobre la ropa y sobre la piel son comunes debido a que estos compuestos se encuentran en diversas preparaciones de uso habitual, como desinfectantes, agentes de limpieza, formulaciones nasales y orales, etc. Sin embargo, la absorción a través de la piel es lenta a excepción de los casos en que ésta se

encuentra dañada (Fisher y Stillman, 1972; Nicola *et al.*, 1997). Además, el carácter cáustico del cloruro de benzalconio puede producir quemaduras en la piel incluso en preparaciones diluidas de hasta 1:20000 veces (Wilson y Burr, 1975) y suelen ser muy típicos los casos de dermatitis en el personal expuesto a esta sustancia (Ortiz-Frutos *et al.*, 1996; Placucci *et al.*, 1996; Krogsrud y Larsen, 1997). También se han descrito casos de sensibilización en usuarios de material esterilizado con cloruro de benzalconio.

Los ojos también pueden ser una ruta de entrada de este tipo de sustancia provocando desde un ligero malestar a daños serios en la córnea en función de la concentración. Elevadas concentraciones de cloruro de benzalconio pueden provocar una importante inflamación ocular (Reynolds, 1996). El uso de soluciones oftálmicas con cloruro de benzalconio ha provocado también el desarrollo de conjuntivitis alérgicas en algunas personas (Fisher y Stillman, 1972).

Con respecto al DDMAC no existen datos concretos sobre su toxicidad. Sin embargo, muchos de los datos mencionados en este apartado pueden hacerse extensivos a otras sales de amonio cuaternario con propiedades antisépticas y biocidas.

1.2.3. Legislación

Como se ha indicado en el apartado anterior, el cloruro de benzalconio, así como otros tensioactivos catiónicos, tiene un impacto importante en el medio ambiente. Además, la exposición a esta sustancia es relativamente fácil debido a que su uso como desinfectante hace que se encuentre en una gran variedad de productos de uso habitual. Es por ello que la Unión Europea está estudiando el establecimiento de una Directiva de Productos Biocidas (BDP, *Biocidal Products Directive*) cuyo objetivo es establecer un mercado europeo único para los biocidas y garantizar la protección de los usuarios, el público y el medio ambiente (European Union, 1998b). El cloruro de benzalconio ha sido incluido entre las sustancias activas a regular (European Union, 2002) y aunque para matrices de carácter medioambiental no existe ninguna regulación concreta, sí que se han establecido los niveles máximos permitidos en algunos ámbitos. Por ejemplo, se ha autorizado el uso del BAC como conservante en preparados cosméticos en función de la longitud de la cadena hidrocarbonada y respetando las concentraciones máximas permitidas. Así, se permite un nivel máximo de un 3% en contenido total de cloruro de benzalconio en productos relacionados con la limpieza del cabello, siempre que el contenido total de homólogos con cadenas inferiores a 14 átomos de carbono no supere el 0,1%. Sin embargo, para el resto de productos el contenido total de cloruro de benzalconio se limita a un 0,1% (European Union, 2000b). La Unión Europea también autoriza el uso del

cloruro de benzalconio como excipiente en preparados veterinarios para cualquier especie animal destinada a la alimentación siempre que su concentración no supere el 0,05% (European Union, 1998a).

1.2.4. Metodologías analíticas

El gran abanico de aplicaciones del BAC, así como el impacto que puede tener tanto en el medioambiente como en otros ámbitos debido a su toxicidad, hace que sea necesario el desarrollo de metodologías analíticas sensibles, selectivas y robustas para su determinación en matrices diversas.

La determinación de los homólogos presentes en los preparados de BAC se ha venido llevando a cabo mediante técnicas espectrofotométricas con formación de derivados para elevar la absorción de estos compuestos en la zona del ultravioleta. Por ejemplo, se ha utilizado la formación de complejos de asociación entre el cloruro de benzalconio y compuestos como el verde de bromocresol o la quinina (Sakai, 1983), la formación de complejos estables a través de la transferencia de electrones entre el cloruro de benzalconio y el 7,7,8,8,-tetracianoquinodimetano o el 2,3-dicloro-5,6-diciano-p-benzoquinona (Belal *et al.*, 1997) o la formación de pares iónicos entre el cloruro de benzalconio y la 2',4',5',7'-tetrabromofluoresceína (Kovács-Hadady y Fábíán, 1998) o con el tetrabromofenolftaleína-etil éster (Sakai, 1992). En general, estos métodos, que suelen ser largos y complejos, se han aplicado para la determinación del contenido total de BAC en formulaciones oftálmicas, no siendo posible determinar la cantidad correspondiente a cada uno de los homólogos. Estos contenidos totales también han sido determinados mediante métodos potenciométricos utilizando electrodos de plata (Pinzauti y La Porta, 1977).

Sin embargo, son las técnicas de separación cromatográficas las que con más frecuencia se han utilizado para el análisis de estos compuestos ya que permiten la separación de sus diferentes homólogos. Ahora bien, para su análisis mediante cromatografía de gases es necesaria la generación de compuestos volátiles y, por ejemplo, se ha determinado la composición de los diferentes homólogos en diversos preparados comerciales mediante la generación de alquildimetilaminas por hidrogenación (Warrington *et al.*, 1961), por pirólisis (Cybulski, 1984; Lay-Keow *et al.*, 1986), o mediante la degradación de Hofmann utilizando *tert*-butóxido de potasio en condiciones suaves (Suzuki *et al.*, 1989). La cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) se ha utilizado también en algunos casos previa derivatización para obtener los tricloroetil carbamatos (Abidi, 1980). La GC-MS se ha utilizado en el análisis de estos compuestos en muestras medioambientales como aguas

de río y aguas residuales, pero ha sido necesaria una preconcentración previa mediante extracción en fase sólida (Ding y Liao, 2001) llegándose a detectar niveles por debajo de 0,1 µg/L tras haber preconcentrado 500 mL de una muestra de agua.

La cromatografía de líquidos ha sido la técnica que más se ha utilizado para la determinación de los homólogos del BAC en diferentes tipos de matrices. En la Tabla 1.12 se resumen los trabajos más importantes publicados hasta el momento en cromatografía de líquidos exceptuando aquellos que utilizan el acoplamiento a la espectrometría de masas que serán comentados en el apartado 4.3.1 de esta memoria. Como puede deducirse de esta tabla, la separación por cromatografía de líquidos de los homólogos del BAC se ha llevado a cabo, principalmente, utilizando cromatografía en fase invertida con columnas ciano, aunque también se han utilizado columnas de C₈ (Santoni *et al.*, 1994; Heinig *et al.*, 1997), de fenilo (Miller *et al.*, 1993; Parhizkari *et al.*, 1995b) o poliméricas (Shibukawa *et al.*, 1999).

La mayor parte de estas separaciones cromatográficas implican un mecanismo de formación de pares iónicos, bien sea por la adición a la fase móvil de algún agente formador de pares iónicos como puede ser el hexanosulfonato de sodio (Miller *et al.*, 1993; Parhizkari *et al.*, 1995b) o bien porque las fases móviles que se utilizan contienen tampones de acetato de sodio (Meyer, 1980; Prieto-Blanco *et al.*, 1999; Prince *et al.*, 1999; Xue *et al.*, 2002) o de propionato de sodio (Marsh y Takahashi, 1983; Bleau y Desaulniers, 1989; Parkizkari *et al.*, 1995a), y en estos casos el anión acetato o propionato forma el par iónico con los iones alquilbenzildimetilamonio que constituyen el BAC.

La espectrofotometría en la región ultravioleta es el sistema de detección que con mayor frecuencia se ha empleado para el análisis de estos compuestos por cromatografía de líquidos. Se suele seleccionar longitudes de onda entre 214 y 254 nm, debido a la presencia del grupo bencilo. No obstante, también se ha utilizado en algunos casos la detección fluorimétrica (Kümmerer *et al.*, 1997) que proporciona una mayor selectividad y sensibilidad. Además, el carácter iónico de estas sustancias hace que la detección conductimétrica sea también posible y en la literatura pueden encontrarse algunos trabajos que utilizan esta técnica para la detección de estos compuestos (Wee y Kennedy, 1982; Shibukawa *et al.*, 1999).

La cromatografía de líquidos resulta especialmente ventajosa en el análisis de estos compuestos en matrices complejas como pueden ser las medioambientales, por ejemplo aguas de río (Wee y Kennedy, 1982) o residuos hospitalarios (Kümmerer *et al.*, 1999), y las de fluidos biológicos tales como sangre y plasma, así como algunos tejidos (Bleau y Desaulniers, 1989; Xue *et al.*, 2002). No obstante, estas técnicas también se han empleado para la determinación de cada uno de los homólogos contenidos en el BAC en matrices acuosas de preparados oftálmicos y nasales, matrices algo más simples que las anteriormente citadas. Los

Tabla 1.12. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por cromatografía de líquidos

Homólogos	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
			Detección		
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos	Formación pares iónicos / μ Bondapak CN (300x4 mm d.i., 10 μ m)	Acetonitrilo : Acetato de sodio 0,1 M pH 5 (con ác. acético) (60:40 v/v) 2 mL/min	40 mg/L ^a	Meyer, 1980
C ₁₈	Agua de río	Fase invertida / Whatman CN Partisil PAC 10	Cloroformo : metanol (92:8 v/v) 1 mL/min	2 μ g/L ^a	Wee y Kennedy, 1982
C ₁₀ C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Productos oftálmicos	Fase invertida / μ Bondapak CN (300x4 mm d.i., 10 μ m)	Acetonitrilo: propionato de sodio 0,161 M pH 5,35 (58:42 v/v) 2 mL/min	--	Marsh y Takahashi, 1983
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos	Fase invertida / μ Bondapak CN (150x4 mm d.i., 4 μ m)	Agua (pH 2,2 con ác. perclórico) : Acetonitrilo : 2-propanol (58:33:9 v/v/v) 1 mL/min	0,5 mg/L	Ambrus <i>et al.</i> , 1987
C ₁₂ C ₁₄	Plasma	Fase invertida / Spherisorb-CN	Acetonitrilo : tampón propionato 0,161 M pH 5,4 (90:10 v/v) 2 mL/min	2,5 mg/Kg ^a	Bleau y Desaulniers, 1989
C ₁₀ C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos	Fase invertida / Spherisorb-CN (125x4,6 mm d.i., 5 μ m)	Acetonitrilo : trietilamina 0,1 % pH 2,5 con fosfórico (40:60 v/v) 2 mL/min	4 mg/L	Gomez-Gomar <i>et al.</i> , 1990
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos	Fase invertida / Zorbax Stablebond CN (150x4,6 mm d.i., 5 μ m)	Agua:Tetrahidrofurano:trietilamina pH 3,0 (2500:1500:20) 2 mL/min	< 50 μ g/mL ^b	Elrod <i>et al.</i> , 1992
C ₁₀ C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Productos oftálmicos	Fase invertida / Ultrasphere CN (150x4,6 mm, d.i., 5 μ m)	Acetonitrilo : tampón de fosfatos pH 5,0 (60:40 v/v) 2 mL/min	0,01 mg/mL	Fan y Wall, 1993

^a Niveles analizados^b Nivel analizados. Preconcentración *off-line* de 20 mL de muestra con cartuchos Sep-Pak C18 o *on-line* de 0,2 mL muestra con cartuchos LiChrosorb RP-8 de 5 μ m.

Tabla 1.12. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por cromatografía de líquidos (continuación)

Homólogos	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos	Formación pares iónicos / μ Bondapak phenyl (300x3,9 mm d.i., 10 μ m)	Acetonitrilo : Tampón fosfatos 50 mM, hexanosulfonato de sodio 57 mM pH 6,3 1,8 mL/min	<12 μ g/mL ^a	Miller <i>et al.</i> , 1993
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos oftálmicos y nasales	Fase invertida / Technosphere RP C8 (100x4,6 mm d.i., 5 μ m)	Acetonitrilo : Bromuro de tetrametilamonio 0,04 M : ác. acético 1 M pH 4,5 (80:15:5 v/v/v) 1,5 mL/min	3-20 μ g/mL ^a	Santoni <i>et al.</i> , 1994
C ₁₂ C ₁₄	Productos oftálmicos	Formación pares iónicos / CPS Hypersil-1 CN (150x4,6 mm d.i., 3 μ m)	Propionato de sodio 50 mM, pH 5,3 con ác. sulfúrico : Acetonitrilo (35:65 v/v) 1,3 mL/min	0,05 mg/mL ^a	Parhizkari <i>et al.</i> , 1995a
C ₁₂ C ₁₄	Productos oftálmicos	Formación pares iónicos / μ Bondapak phenyl (300x3,9 mm d.i., 10 μ m)	Acetonitrilo : Tampón fosfatos 50 mM, hexanosulfonato de sodio 57 mM, pH 6,3 (65:35 v/v) 1,8 mL/min	0,05 mg/mL ^a	Parhizkari <i>et al.</i> , 1995b
BAC	Residuo hospitalario	Fase invertida / Partisil PAC CN-NH ₂ (250x4 mm d.i., 5 μ m)	Cloroformo:metanol (80:20 v/v) 1 mL/min	0,05 mg/L ^b	Kümmerer <i>et al.</i> , 1997
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos nasales	Fase invertida / Beckman C8 (250x4 mm)	Acetonitrilo : HCl 0,02 M (60:40 v/v), gradiente con ACN 1 mL/min	0,17 mg/L	Heinig <i>et al.</i> , 1997
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Preparado comercial	Formación pares iónicos / Lichrosorp CN (250x4,0 mm d.i., 5 μ m)	Acetonitrilo : Tampón acetato pH 5 (55:45 v/v) 1,5 mL/min	(^c)	Prieto-Blanco <i>et al.</i> , 1999

^a Niveles analizados

^b Niveles analizados. Preconcentración *off-line* de 8 mL de residuo con cartuchos RP-18 end-capped.

^c Sintetizan BAC y buscan impurezas.

Tabla 1.12. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por cromatografía de líquidos (continuación)

Homólogos	Muestra	Procedimiento		LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil		
C ₁₂ C ₁₄	Patrones	Polímero de alcohol polivinílico Shodex Asahipak GF-310 HQ (100x4,6 mm d.i.)	Acetonitrilo : Agua con 4,4'-bipiridil 0,4 mM, tetrametilamonio 4 mM, HCl 0,8 mM (27:93 v/v)	0,008 mg/L	Shibukawa <i>et al.</i> , 1999
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Preparado comercial	Formación pares iónicos / Bakerbond CN (250x4,6 mm, 5 µm)	Acetonitrilo : Acetato de sodio 0,1 M pH 5 (60:40 v/v) 1 mL/min	2 mg/L	Prince <i>et al.</i> , 1999
C ₁₂ C ₁₄	Sangre Tejidos	Fase invertida / YMC-Pack CN(250x4,6 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : tampón acetato 0,1 M pH 5,0 (48:52 v/v) 1 mL/min	0,2 mg/L	Xue <i>et al.</i> , 2002

límites de detección alcanzados con la detección espectrofotométrica para preparados farmacéuticos están por lo general alrededor de 0,2-40 mg/L, mientras que con detección conductimétrica se han alcanzado valores muchos más bajos, del orden de 2 a 8 $\mu\text{g/L}$ (Wee y Kennedy, 1982; Shibukawa *et al.*, 1999).

No obstante, con todas estas técnicas no es posible una identificación inequívoca y una confirmación de la presencia de estos compuestos en matrices complejas. Hoy en día, el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas hace posible disponer de información estructural evitando este problema. Además, la mayor selectividad y sensibilidad de este tipo de metodología hace que mayoritariamente se haya aplicado al análisis de muestras medioambientales como aguas, sedimentos y fangos residuales. Por otra parte, el acoplamiento a la espectrometría de masas hace posible la detección de compuestos que no presentan grupos cromóforos como el DDMAC y que con esta técnica se han empezado a analizar conjuntamente con los homólogos del BAC. En apartado 4.3.1 del capítulo 4 se comentan los trabajos que han utilizado la espectrometría de masas para el análisis de esta familia de biocidas haciendo especial referencia a las fuentes de ionización y a los analizadores utilizados.

Dado el carácter catiónico de estos compuestos, otra técnica de separación que se ha utilizado ampliamente en este campo ha sido la electroforesis capilar, técnica rápida y sencilla y que se presenta como una buena alternativa a la cromatografía de líquidos. En la Tabla 1.13 se resumen los trabajos que han utilizado la electroforesis capilar para el análisis de los homólogos del BAC.

En general, la electroforesis capilar se ha utilizado en estudios con patrones con la finalidad de estudiar la capacidad de separación de esta técnica (Weiss *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1996a y 1996b) o bien para determinar los homólogos del BAC en formulaciones comerciales y preparados farmacéuticos. En estas muestras los niveles de concentración de estos compuestos son relativamente elevados y adecuados para el análisis con esta técnica, si se tiene en cuenta que la electroforesis capilar, sin etapa de preconcentración previa, proporciona límites de detección relativamente elevados.

Los capilares de sílice fundida, normalmente de 50 o 75 μm de diámetro interno, que se suelen utilizar son relativamente cortos, aunque excepcionalmente en algún caso se han empleado capilares algo más largos, del orden de unos 60 cm de longitud efectiva (Hou *et al.*, 2002). En cuanto al sistema de inyección lo normal es utilizar el modo de inyección hidrodinámico y la detección se lleva a cabo con un espectrofotómetro a longitudes de onda entre los 200 y 215 nm.

Tabla 1.13. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por electroforesis capilar

Homólogos	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección		
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Patrones	Sílice fundida 24 cm x 50 µm d.i.	Tetrahydrofurano : Tampón fosfato 44 mM (57,5:42,5 v/v) / 25 kV	--	UV	Weiss <i>et al.</i> , 1992
BAC	Formula- ciones	Sílice fundida 37 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 30 cm	Tampón fosfatos 25 mM pH 2,5 / 15 kV	Hidrodinámico 5 s	UV 200 nm	Altria <i>et al.</i> , 1996
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Patrones	Sílice fundida 44 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 37 cm	Acetonitrilo : Tampón fosfato 20 mM pH 5 (30:70 v/v) / 15 kV	Hidrodinámico 2 s	UV 210 nm	Lin <i>et al.</i> , 1996a 1996b
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Productos nasales	Sílice fundida 37 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 30 cm	Tetrahydrofurano : tampón fosfato 50 mM pH 6,8 (58:32 v/v) / 20 kV	Hidrodinámico 5 s	UV 200 nm	Heinig <i>et al.</i> , 1997
C ₁₂ C ₁₄	Productos nasales	Sílice fundida 35 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 28,5 cm	Ác. fosfórico 75 mM, triethylamina 42,7 mM (pH 2,3) / 15 kV	Hidrodinámico 10 s, 35 mbar	UV 215 nm	Jimidar <i>et al.</i> , 1998
BAC	Productos nasales	Sílice fundida 37 cm x 75 µm d.i. Long. efectiva: 30 cm	ác. 2-(N-ciclohexilamino)etano- sulfónico 100 mM pH 10 : Acetonitrilo : metanol (50:30:20 v/v/v) con SDS 30 mM / 12 kV	Hidrodinámico 1,6 s, 3,5 kPa	UV 214 nm	Bernal <i>et al.</i> , 1998
C ₁₂ C ₁₄	pastillas	Sílice fundida 27,5 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 20,5 cm	Acetonitrilo : dihidrogenofosfato de sodio 50 mM pH 3,0 (1:1) / 15 kV	Hidrodinámico 10 s, 50 mbar	UV 210 nm	Taylor <i>et al.</i> , 1998
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆	Preparado comercial	Sílice fundida 26 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 20 cm	Acetonitrilo : Fosfato de sodio 500 mM pH 3,06 (30:70 v/v) / 7,5 kV	Hidrodinámico 5 s, 3,5 kPa	UV 214 nm	Prince <i>et al.</i> , 1999

^a Niveles analizados.^b Límite de cuantificación.

Tabla 1.13. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por electroforesis capilar (continuación)

Homólogos	Muestra	Procedimiento			LOD	Ref.
		Capilar	Electrolito / Voltaje separación	Modo de inyección		
C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Productos desinfectantes y espermicidas	Sílice fundida 33,5 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 25 cm	Borato 80 mM pH 8,5, deoxicolato de sodio 50 mM, 30% etanol / 15 kV	Hidrodinámico 2 s, 50 mbar	UV 214 nm 3-25 mg/L	Herrero- Martínez <i>et al.</i> , 2000
C ₁₀ C ₁₂ C ₁₄ C ₁₆ C ₁₈	Productos oftálmicos	Sílice fundida 60 cm x 50 µm d.i. Long. efectiva: 50 cm	Acetonitrilo : Tampón fosfato 40 mM pH 4,0 (40:60 v/v) / 15 kV	Hidrodinámico 10 s, 2 psi	UV 200 nm 0,5 mg/L ^a	Hou, <i>et al.</i> , 2002

^a Límite de cuantificación

Los electrolitos que se han empleado para la separación son, por lo general, son mezclas de disoluciones acuosas de tampones de fosfato con algún disolvente orgánico como el tetrahidrofurano (Weiss *et al.*, 1992; Heinig *et al.*, 1997) o el acetonitrilo (Lin *et al.*, 1996a y 1996b; Taylor *et al.*, 1998; Prince *et al.*, 1999; Hou *et al.*, 2002). No obstante, en algún caso también se han utilizado disoluciones acuosas de estos tampones sin adición del disolvente orgánico (Altria *et al.*, 1996) o bien con la adición de trietilamina (Jimidar *et al.*, 1998). El pH del electrolito usado para la separación electroforética no afecta a la ionización de los homólogos del BAC, ya que son sales de amonio cuaternario que presentan carga positiva a cualquier valor de pH, sin embargo en general se prefiere trabajar a valores de pH ácido. En cambio cuando se utiliza la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) el pH suele ser básico, empleando para ello tampones de borato y deoxicolato de sodio a pH 8,5 (Herrero-Martínez *et al.*, 2000) o 2-(N-ciclohesilamino)etanosulfonato y SDS a pH 10 (Bernal *et al.*, 1998).

Como ya se ha mencionado, los límites de detección en electroforesis capilar suelen ser por lo general más altos que con otras técnicas, como por ejemplo la cromatografía de líquidos. En esta línea, los límites de detección conseguidos con detección espectrofotométrica para los homólogos del BAC son algo inferiores a los mg/L, concretamente para los homólogos C₁₂-BAC y C₁₄-BAC el valor más bajo analizado ha sido de 0,1 mg/L (Jimidar *et al.*, 1998), aunque en el caso de no separar los homólogos y analizar el contenido total se ha llegado a alcanzar un LOD de 0,05 mg/L (Altria *et al.*, 1996).

Por lo que hace referencia al acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas se tiene que indicar que hasta el momento de redactar este capítulo no se ha encontrado ningún trabajo en la literatura que haya utilizado esta técnica para el análisis de los homólogos del cloruro de benzalconio.

Capítulo 2

ELECTROFORESIS CAPILAR

2.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO

Una de las familias objeto de estudio en esta memoria es la de las sales de amonio cuaternario que presentan actividad herbicida y que son conocidas con el nombre genérico de cuats. Tal como se ha comentado en la introducción, las características de estos compuestos hacen que la electroforesis capilar de zona (CZE) sea una de las técnicas ideales para su análisis y, en este sentido, existen diversas publicaciones en las que se propone la determinación de los cuats utilizando esta técnica con diferentes sistemas de detección. Sin embargo, la mayoría de estos trabajos no consiguen llegar a unos límites de detección que satisfagan los niveles legislados en diferentes matrices, especialmente en agua de bebida. Por ello, uno de los objetivos de esta tesis, y al que se dedica este capítulo, es el desarrollo de metodologías analíticas basadas en la electroforesis capilar que permitan disminuir los límites de detección de esta técnica y así poder analizar los herbicidas de amonio cuaternario en muestras de agua de bebida, a niveles por debajo o bien próximos a los legislados.

Este capítulo se ha estructurado en dos apartados. El primero de ellos, apartado 2.2, se centra en la utilización de métodos de preconcentración, principalmente *on-line*, en electroforesis capilar con detección ultravioleta (UV), para aumentar la sensibilidad de la técnica y, en consecuencia, analizar los cuats en muestras de agua de bebida a bajos niveles de concentración. El apartado se inicia con una introducción (Apartado 2.2.1) sobre los métodos de preconcentración más utilizados en la literatura, en el que se comenta el fundamento de dichos métodos y se resaltan las mejoras, en términos de sensibilidad, que se según los datos publicados en la literatura se han obtenido para diversas familias de compuestos. Tal como se comenta en esta introducción, de entre los métodos de preconcentración *on-line* que se utilizan en electroforesis capilar, los métodos de preconcentración electroforéticos no requieren ninguna modificación especial de la instrumentación, y por ello, se seleccionaron para este estudio. En estos métodos la preconcentración tiene lugar dentro del capilar electroforético por lo que también son denominados por algunos autores como métodos *in-line*. Sin embargo, nosotros utilizaremos la nomenclatura *on-line* para referirnos a todos los métodos de preconcentración directamente acoplados al sistema de separación. De entre ellos, los basados en los fenómenos de *stacking* y *sweeping* son los que han permitido unos factores de preconcentración mayores en el análisis de diferentes compuestos aunque no habían sido empleados hasta el momento para el análisis de los cuats. Por ello se decidió utilizar alguno de estos métodos de preconcentración para la determinación de cuats a bajos

niveles de concentración en muestras de agua. Se tiene que indicar que debido a que el estudio de estos métodos de preconcentración se realizó utilizando electroforesis capilar con detección UV, la metodología desarrollada en el Apartado 2.2 sólo se aplicó al análisis de los herbicidas de amonio cuaternario que contienen grupos cromóforos, el paracuat, el dicuat y el difezocuat.

Así, la parte experimental de este apartado se inicia con la optimización de un método de preconcentración *on-line* conocido como “*stacking* con eliminación de matriz” utilizando una electroforesis capilar Beckman P/ACE system 5500 modificada para permitir una inversión manual de la polaridad. El desarrollo y la aplicación del procedimiento para el análisis de los cuats se encuentra descrito en el Artículo I, titulado “*Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electroforesis*” y que se incluye en el Apartado 2.2.2.3 de este capítulo.

Con el objetivo de disminuir aún más los límites de detección obtenidos con el método de preconcentración anterior se decidió añadir una etapa previa *off-line* de extracción en fase sólida (SPE). En un estudio previo realizado en nuestro grupo se había desarrollado un método de extracción en fase sólida con cartuchos de carbono grafitado (Carneiro *et al.*, 2000), y por ello se decidió comparar la preconcentración de los cuats con diferentes cartuchos de diferentes casas comerciales. Tras la etapa de extracción en fase sólida, los extractos resultantes se analizaron con el método de *stacking* con eliminación de matriz desarrollado anteriormente. Este estudio forma parte del segundo artículo incluido en esta memoria, titulado “*Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water*” que se incluye en el Apartado 2.2.2.4 de este capítulo.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se realizó una estancia en el Instituto de Tecnología Himeji (Kamigori, Japón), en el grupo del Profesor Shigeru Terabe, donde se trabajó aplicando unos nuevos métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar basados en un fenómeno denominado *sweeping*. Así, la parte experimental del Apartado 2.2 finaliza con la aplicación de dos métodos de preconcentración en MEKC basados en el fenómeno de *sweeping*. Los métodos utilizados fueron el *sweeping*-MEKC y el *cation-selective exhaustive injection (CSEI)*-*sweeping*-MEKC. Estos métodos de preconcentración tampoco se habían utilizado con anterioridad para el análisis de los cuats. El desarrollo de estas metodologías y su aplicación al análisis de los cuats en muestras de agua de bebida se incluye en el Artículo III, titulado “*Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using*

sweeping and cation selective exhaustive injection” que se incluye en el apartado 2.2.2.6 de este capítulo.

El siguiente apartado de la memoria, el 2.3, se centra en el acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas (CE-MS). Tal como se comenta en el Capítulo 1, no todos los compuestos englobados en la familia de los cuats tienen grupos cromóforos como es el caso de los dos reguladores del crecimiento, clormecuat y mepicuat. Para poder analizar los cinco herbicidas simultáneamente, la espectrometría de masas se presenta como una de las técnicas ideales debido a su universalidad. Así, uno de los objetivos de esta memoria es el desarrollo de metodologías analíticas para el análisis de los cuats basadas en el acoplamiento CE-MS. Como se comenta en el Capítulo 1, no hay muchos trabajos publicados que utilicen este tipo de técnica para el análisis de los cuats, y tan sólo en uno de ellos se analizan los cinco compuestos simultáneamente utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Moyano *et al.*, 1996). Así, el Apartado 2.3 se inicia con una introducción (Apartado 2.3.1) sobre el acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas, resaltando los inconvenientes que hay que resolver para el correcto acoplamiento de ambas técnicas y las interfases más utilizadas en la literatura para dicho acoplamiento. La parte experimental del apartado se centra en el desarrollo de un método para el análisis de cuats en muestras de agua de bebida utilizando el acoplamiento CE-MS. Para ello se acopló una electroforesis capilar Beckman P/ACE system 5500, modificada para llevar a cabo el acoplamiento, con un espectrómetro de masas (Thermo-Finnigan) equipado con una trampa de iones como analizador y una fuente de *electrospray* tricoaxial (ESI) como fuente de ionización e interfase para el acoplamiento. El desarrollo de esta metodología se encuentra descrito en el Artículo IV, titulado “*Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides*” que se incluye en el Apartado 2.3.2.4 de este capítulo.

El capítulo finaliza con una discusión de los resultados obtenidos (Apartado 2.4) y las conclusiones obtenidas del trabajo experimental realizado.

2.2. MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN EN ELECTROFORESIS CAPILAR

2.2.1. Introducción

La electroforesis capilar es una técnica de separación que está adquiriendo gran popularidad como muestra el creciente número de trabajos publicados en los últimos años. Está considerada como una técnica alternativa a la cromatografía de líquidos y entre sus ventajas se pueden citar su gran eficacia, el corto tiempo de análisis y el relativo bajo coste asociado tanto a la técnica y a los reactivos que se requieren. No obstante, una de las mayores limitaciones que presenta es su baja sensibilidad debido tanto al pequeño volumen de muestra introducido en el capilar, normalmente del orden de pocos nL, como al pequeño camino óptico en el caso de detección espectroscópica, ya que la medida se realiza en el propio capilar y éste tiene tan solo un diámetro de 50-75 μm . En consecuencia, si se quiere hacer de la electroforesis capilar una técnica competitiva en términos de sensibilidad, es necesario solventar uno o ambos problemas. Para ello se han desarrollado capilares con celdas burbuja (*bubble-cells*) (Olgemöller *et al.*, 1999) y con celdas en forma de Z (*Z-shaped cells*) (Moring *et al.*, 1993) que permiten aumentar el camino óptico pero, en contraposición, la resolución se ve afectada. Alternativamente, se utilizan detectores más sensibles como la detección fluorimétrica (LIF) (Horstkotter *et al.*, 2002) o la espectrometría de masas (MS) (Cherkaoui and Veuthey, 2002). Otra manera de incrementar la sensibilidad de la técnica es aumentar la cantidad de analito introducida en el capilar mediante la aplicación de métodos de preconcentración (Veraart *et al.*, 1999). En función del modo de utilización de estos métodos podemos hablar de preconcentración *off-line* (cuando la preconcentración y manipulación de la muestra se realiza en una etapa externa previa a la inyección y separación electroforética de la muestra en la electroforesis capilar) y de preconcentración *on-line* (cuando la muestra es inyectada y la preconcentración y separación electroforética se producen de manera consecutiva en la misma etapa).

Los métodos de preconcentración *off-line* más utilizados para el análisis de los cuats se basan en la extracción en fase sólida (SPE). En el Capítulo 1 se han discutido los diferentes adsorbentes utilizados para la preconcentración de las sales de amonio cuaternario por lo que en este apartado pasaremos a presentar directamente algunos de los métodos de preconcentración *on-line* utilizados en electroforesis capilar.

2.2.1.1. Métodos de preconcentración *on-line*

Obviamente, las propuestas más interesantes, a la hora de preconcentrar, son aquellas que evitan una manipulación de la muestra, es decir, los métodos en línea. En el campo de la electroforesis capilar estos métodos pueden clasificarse en electroforéticos o cromatográficos dependiendo del mecanismo de preconcentración. En los cromatográficos se lleva a cabo una extracción en fase sólida en línea con la separación electroforética, pero son los menos utilizados debido a que se necesitan dispositivos especiales que en ocasiones son difíciles de acoplar al sistema estándar de electroforesis capilar. En general se trata de capilares de pequeñas dimensiones o bien membranas que contienen una fase estacionaria (desde C18 hasta inmunoabsorbentes) que retienen, más o menos selectivamente, los analitos. Posteriormente se eluyen los analitos con el disolvente adecuado al mismo tiempo que se introducen en el capilar de separación. Aunque se han desarrollado diferentes diseños que intentan superar algunas de las dificultades que se presentan, el principio sigue siendo el mismo (Tomlinson *et al.*, 1996; Heegaard, *et al.*, 1998; Schweitz *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2000; Guzman y Stubbs, 2001).

Los métodos de preconcentración basados en fenómenos electroforéticos focalizan y preconcentran los analitos aprovechando las diferentes propiedades fisicoquímicas (viscosidad, fuerza iónica, conductividad, pH, etc.) que presentan la matriz de la muestra y el tampón electroforético (Britz-McKibbin y Chen, 2000a). Los compuestos que presentan diferentes velocidades en cada una de las regiones, se focalizan en la interfase de separación en una banda estrecha, lo que produce un aumento de concentración de analito en dicha banda. Entre los métodos de preconcentración electroforéticos más utilizados se encuentran la isotacoforesis, el *pH-focusing*, los métodos basados en inyecciones electrocinéticas amplificadas (*field-amplified sample injection, FASI*) y los basados en los fenómenos de *stacking* y *sweeping*. A continuación se comentan los fundamentos de estos métodos y la manera de aplicarlos, haciendo especial énfasis en los dos últimos ya, que son los que hemos utilizado en esta memoria para el análisis de los herbicidas catiónicos.

(i) Isotacoforesis

La isotacoforesis (ITP) es una técnica electroforética en la que el mecanismo de preconcentración se basa en la diferente movilidad de los iones de un tampón electroforético discontinuo (tampón o electrolito de cabeza, LE, y tampón o electrolito terminal, TE) y la de los analitos (Figura 2.1-a). El electrolito de cabeza contiene iones de

mayor movilidad que la de los analitos mientras que los iones del electrolito terminal tienen menor movilidad. De esta forma, al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar se genera un gradiente de potencial a lo largo de éste, distribuyéndose los analitos en diferentes zonas en función de sus movilidades (Figura 2.1-b).

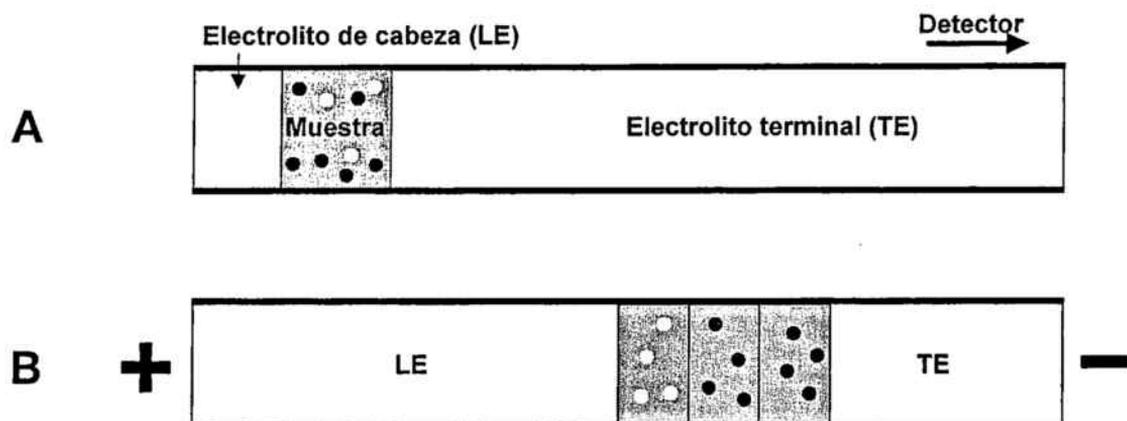


Figura 2.1. Esquema de separación en isotacoforesis.

La zona que contiene iones de mayor movilidad presenta una mayor conductividad y el campo eléctrico creado al aplicar una determinada diferencia de potencial es menor en esta zona. En consecuencia, cuando un analito penetra en una zona adyacente a la suya se ve afectado por un campo eléctrico de diferente magnitud lo que hace que disminuya o aumente su velocidad volviéndose de nuevo a agrupar en su zona. De esta manera se produce la separación electroforética de los analitos y la preconcentración de éstos en el mismo capilar, lo que se conoce como *transient ITP* (tITP). Como ejemplo de esta técnica se puede citar el trabajo presentado por Waterval y cols. en el que la utilización de la tITP-CE ofrece una mayor eficacia y una sensibilidad similar a la obtenida con cromatografía de líquidos para el análisis de gonadorelin y angiotensin II en plasma (Waterval *et al.*, 1999). La preconcentración y la separación se llevan a cabo en dos capilares acoplados en línea, y la técnica recibe el nombre de *on-line coupled multiple capillary ITP* (cITP). Esta técnica ha sido empleada, por ejemplo, en el análisis de trazas de ácido ascórbico en fluidos biológicos (Prochazkova *et al.*, 1998).

(ii) *pH-focusing*

Las técnicas de preconcentración conocidas como *pH-focusing* se basan en la focalización de los analitos en la interfase creada entre dos zonas que tienen diferente pH, la de la muestra y la del tampón electroforético. En este caso, la conductividad de la

muestra no es importante, pero es necesario que alguna propiedad inherente al analito cambie al pasar de la zona de la muestra a la del tampón. La Figura 2.2 muestra un esquema de este procedimiento para la preconcentración de analitos neutros, como por ejemplo el fenol, susceptibles de adquirir carga negativa cuando se produce un cambio de pH.

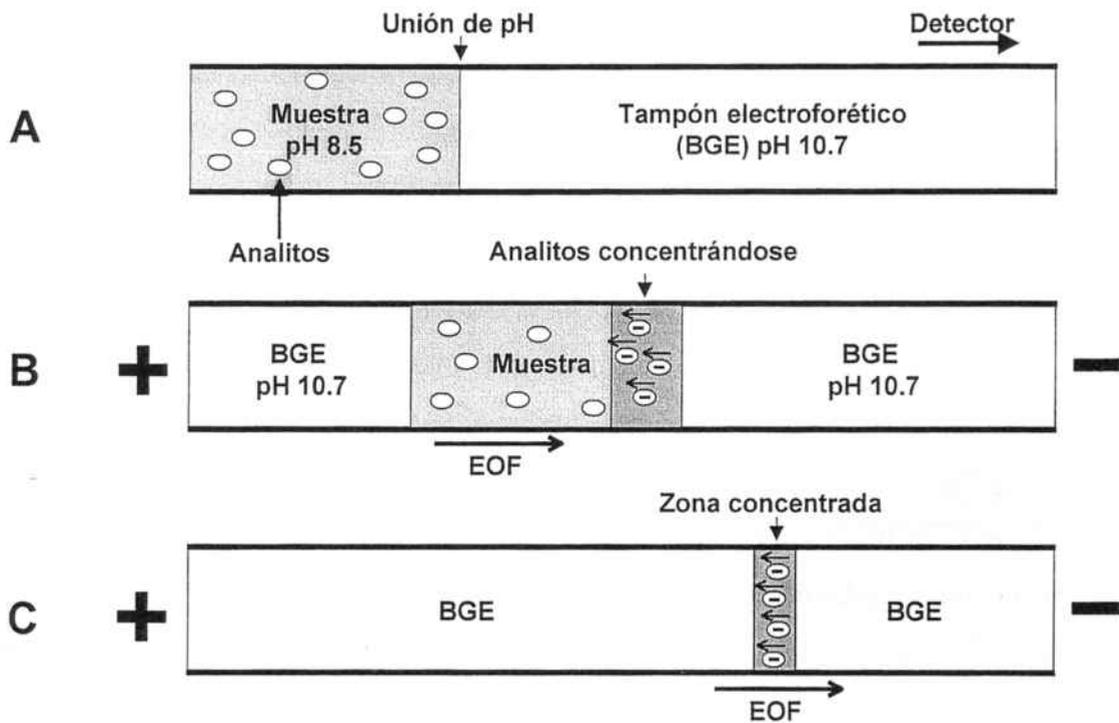


Figura 2.2. Esquema de separación utilizando *pH-focusing*.

El capilar se acondiciona primero con un tampón electroforético a un pH determinado. Un volumen relativamente elevado de muestra a un pH inferior al del tampón electroforético (pH 8.5 en la figura), se introduce hidrodinámicamente en el capilar (Figura 2.2-a). Al aplicar una diferencia de potencial catódica, los iones hidroxilo de la zona del tampón electroforético, que presenta un pH mayor, van penetrando en la zona de muestra y al interactuar con los analitos neutros de la parte frontal de la zona de muestra, desplazan el equilibrio ácido-base de manera que se obtiene la base conjugada que presenta carga negativa y, por tanto, tiene una movilidad anódica. En cambio, los analitos en la parte trasera de la zona de muestra permanecen neutros y migran con el flujo electroosmótico. Este proceso tiene lugar hasta que los iones hidroxilo alcanzan el final de la zona de muestra, produciendo la focalización de los aniones en la interfase entre la zona de muestra

y el tampón electroforético (Figura 2.2-b). El pH de todo el capilar es ahora el mismo y los analitos cargados negativamente son arrastrados hacia el detector por el flujo electroosmótico en una banda más estrecha (Figura 2.2-c).

Con este método se ha llegado a conseguir un factor de preconcentración de hasta unas 50 veces en el análisis de nucleótidos (Britz-McKibbin *et al.*, 2000b) y recientemente, se han combinado dos métodos de preconcentración, la unión dinámica de pH y el *sweeping*, para el análisis de algunos flavin-nucleótidos obteniendo mejoras en las respuestas superiores a 1200 veces (Britz-McKibbin *et al.*, 2002).

(iii) Métodos basados en el fenómeno de *stacking*

El fenómeno de *stacking* se produce cuando la conductividad de la muestra es menor que la del electrolito de la separación. A menor conductividad, el campo creado al aplicar una determinada diferencia de potencial es mayor y, por lo tanto, la velocidad electroforética es también mayor, lo que conlleva que los analitos se muevan más rápidamente en la zona de la muestra que en la zona del electrolito de separación y, consecuentemente, se produzca su acumulación en la frontera entre ambas zonas. Debido a esta compactación o apilamiento de los analitos en la interfase de separación muestra-tampón electroforético se denominó a este fenómeno con la terminología inglesa de *stacking*.

En función del volumen de muestra que se introduce en el capilar cuando se utiliza este método de preconcentración, hablamos de (i) *normal stacking*, o *stacking* sin eliminación de matriz, cuando el volumen de muestra introducido en el capilar es pequeño y se realiza una separación electroforética convencional, o (ii) *stacking* con eliminación de matriz, cuando se realiza una inversión de polaridad para eliminar la matriz de la muestra lo que permite introducir grandes volúmenes de muestra sin pérdidas de eficacia. Este último procedimiento permite obtener mayores factores de preconcentración.

(i) *normal stacking*

El término *normal stacking* hace referencia al efecto de preconcentración que se produce al aplicar un voltaje después de inyectar hidrodinámicamente la muestra disuelta en un tampón de baja conductividad. En el modo más sencillo se utiliza como disolvente de la muestra agua o un tampón de concentración menor que la del tampón electroforético, aunque hay que señalar que el uso de disolventes orgánicos puede mejorar el factor de

preconcentración. Es bastante frecuente utilizar acetonitrilo puesto que su resistividad favorece el efecto de *stacking* (fenómeno conocido como *acetonitrile stacking*) y, por ejemplo, se ha descrito que la utilización de acetonitrilo como disolvente de la muestra permite mejorar del orden de 10 veces la respuesta en la determinación de procainamida y su metabolito N-acetilprocainamida en suero (Shihabi, 1998). La Figura 2.3 muestra un esquema del procedimiento de *normal stacking*. Tras la inyección hidrodinámica de la muestra y al aplicar una diferencia de potencial en el capilar los iones presentes en dicha muestra migran hacia los electrodos correspondientes siendo frenados al llegar a la zona del tampón (donde tienen una movilidad menor), lo que produce la compactación y, por tanto, preconcentración de los mismos en la interfase de separación muestra-tampón.

Con este método de preconcentración es posible aumentar el volumen de muestra introducido en el sistema electroforético, de manera que se llegue a llenar hasta un 10 o un 20 % del volumen total del capilar sin producirse pérdida de eficacia (Chien and Burgi, 1992a y 1992b).

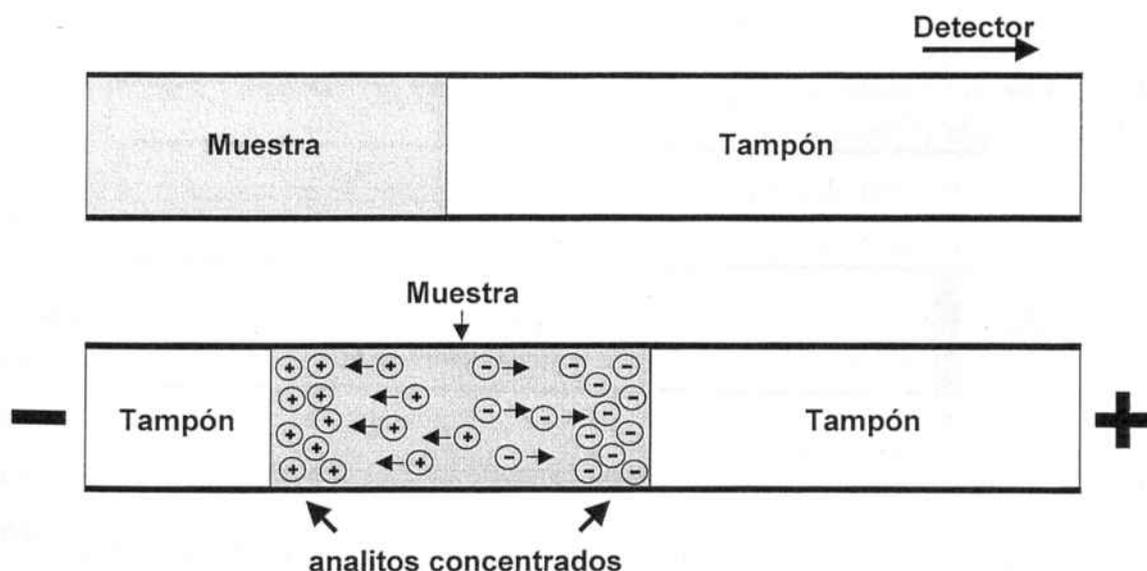


Figura 2.3. *Normal stacking* o *stacking* sin eliminación de matriz.

(ii) *Stacking* con eliminación de matriz

Una variante de la preconcentración mediante *stacking* es el *stacking* con eliminación de matriz que consiste en la utilización del flujo electroosmótico para eliminar la matriz de la muestra durante el proceso de preconcentración, lo que permite introducir grandes volúmenes de muestra sin pérdida significativa de eficacia. Cabe mencionar que, si bien el método de *normal stacking* permite preconcentrar simultáneamente aniones y

caciones, en la modalidad de *stacking* con eliminación de matriz sólo es posible la preconcentración de aquellos analitos que presentan una movilidad electroforética en sentido opuesto al flujo electroosmótico. Los analitos cuya movilidad sea en el mismo sentido que la del flujo electroosmótico serán eliminados conjuntamente con la matriz de la muestra. Por lo tanto, en un capilar de sílice fundida cuyo flujo electroosmótico es catódico, sólo podrán preconcentrarse aniones, mientras que la mayor parte de los cationes serán eliminados del capilar.

En la Figura 2.4 se muestra un esquema de los procesos que tienen lugar en esta modalidad de *stacking*.

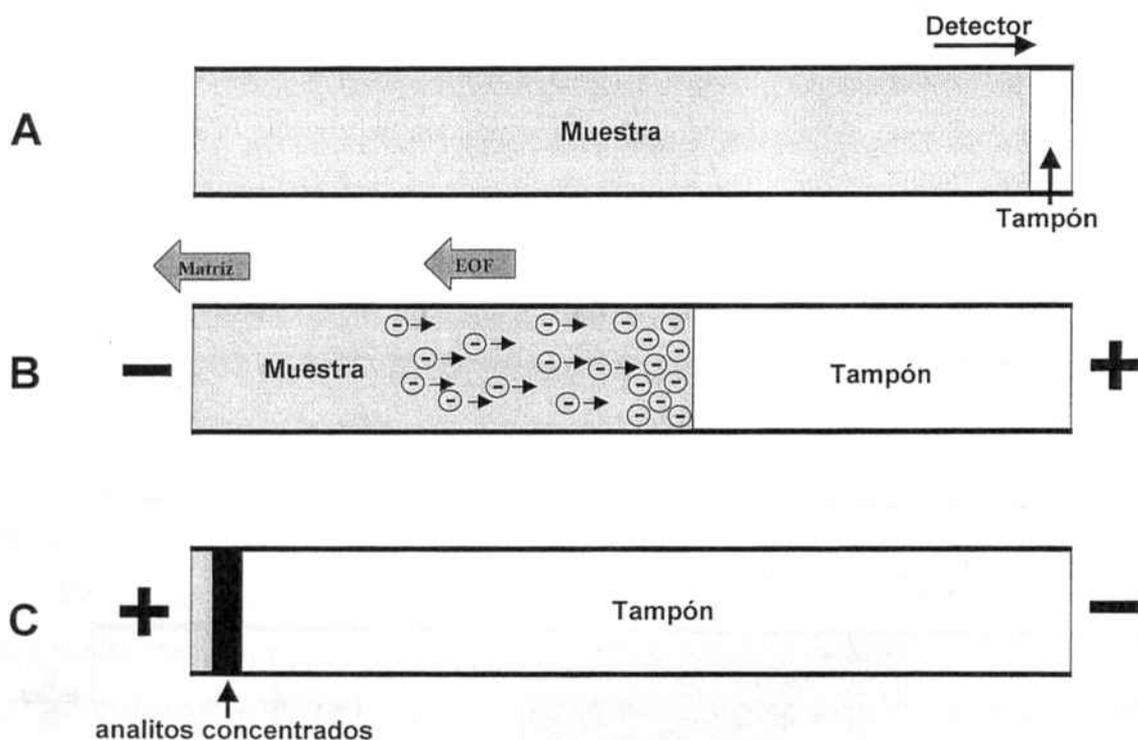


Figura 2.4. *Stacking* con eliminación de matriz. Preconcentración de aniones en un capilar de sílice fundida.

En primer lugar el capilar se llena prácticamente con la muestra disuelta en un tampón de la misma naturaleza que el tampón electroforético pero de menor concentración (Figura 2.4-a). Seguidamente, se aplica una diferencia de potencial negativa (polaridad inversa) lo que provoca que los aniones se muevan hacia el ánodo concentrándose en la frontera entre el electrolito y la muestra, mientras que el flujo electroosmótico (en sentido catódico) empuja la matriz de la muestra eliminándola por el extremo de introducción (Figura 2.4-b). Cuando la matriz ha sido eliminada prácticamente en su totalidad, se invierte la polaridad y se inicia la separación electroforética (Figura 2.4-c).

(iv) Inyección electrocinética (*Field-amplified sample injection, FASI*)

En la inyección electrocinética la introducción de los analitos en el capilar depende tanto del flujo electroosmótico como de la carga y movilidad de los analitos. Por ello, mientras la cantidad de analitos iónicos introducida en el capilar aumenta, la de aquellos que son eléctricamente neutros disminuye. Además, en función de la polaridad utilizada, este tipo de inyección discrimina, en gran medida, entre aniones y cationes.

El fenómeno de *stacking*, comentado en el apartado anterior, cuando se produce durante la inyección electrocinética da lugar a la técnica que se conoce como *field-amplified sample injection* (FASI), *field-amplified sample stacking* (FASS) o *field-enhancement sample injection* (FESI). En este procedimiento la muestra se disuelve en un tampón de baja conductividad y se introduce en el sistema mediante inyección electrocinética. Al aplicar una diferencia de potencial, que puede ser de la misma magnitud que el potencial de separación, y debido a la baja conductividad de la muestra, el campo eléctrico que se genera en la muestra es mayor que el del electrolito de separación. En consecuencia, la velocidad que los analitos iónicos tienen en la muestra es mayor. Todo ello se traduce en un aumento de la cantidad de muestra introducida, y por tanto, de la concentración de los analitos en la zona de separación entre muestra y electrolito (efecto *stacking*). Esta técnica se ha aplicado, por ejemplo, al análisis de pesticidas (Aturki *et al.*, 2001; Tegeler y El Rassi, 1999) y al de compuestos orgánicos en soluciones acuosas (Zhu *et al.*, 2001). Con frecuencia, antes de la inyección de la muestra se introduce en el capilar una determinada cantidad de un disolvente de alta resistividad (normalmente agua), lo que permite asegurar una adecuada amplificación del campo eléctrico, y así aumentar aun más la respuesta. En este caso la mejora obtenida depende en gran medida de la conductividad de la muestra, es decir, de su matriz. Esta técnica, por ejemplo, ha permitido mejorar 1000 veces la señal obtenida en la determinación de dihidrocodeína y sus metabolitos en plasma (Zhang y Thormann, 1998).

Esta técnica no parece adecuada para el análisis de compuestos neutros puesto que la introducción de la muestra se lleva a cabo en modo electrocinético. Sin embargo, Quirino y Terabe han propuesto la combinación del FASI (con introducción de un bolo de agua) con la cromatografía electrocinética micelar (MEKC), lo que ha permitido el análisis de compuestos neutros (Quirino y Terabe, 1998b y 1998c). En la Figura 2.5 se presenta un esquema de la combinación de estos dos métodos. En este caso, el capilar se llena primero con un electrolito que contiene un tensioactivo a una concentración superior a la concentración micelar crítica. A continuación, se introduce una cierta cantidad de agua

(Figura 2.5-a) y, posteriormente, se inyecta electrocinéticamente (diferencia de potencial negativa) la muestra preparada en un medio micelar (Figura 2.5-b). De este modo, los analitos neutros combinados con micelas negativas se introducen en el capilar mientras que el flujo electroosmótico elimina el agua empujándola hacia el extremo de inyección. En este caso, la cantidad de analito inyectada dependerá de la constante de asociación soluto-micela (k). Cuando prácticamente se ha eliminado toda el agua del capilar se inicia la separación aplicando una diferencia de potencial positiva entre dos viales que contienen el tampón micelar (Figura 2.5-c).

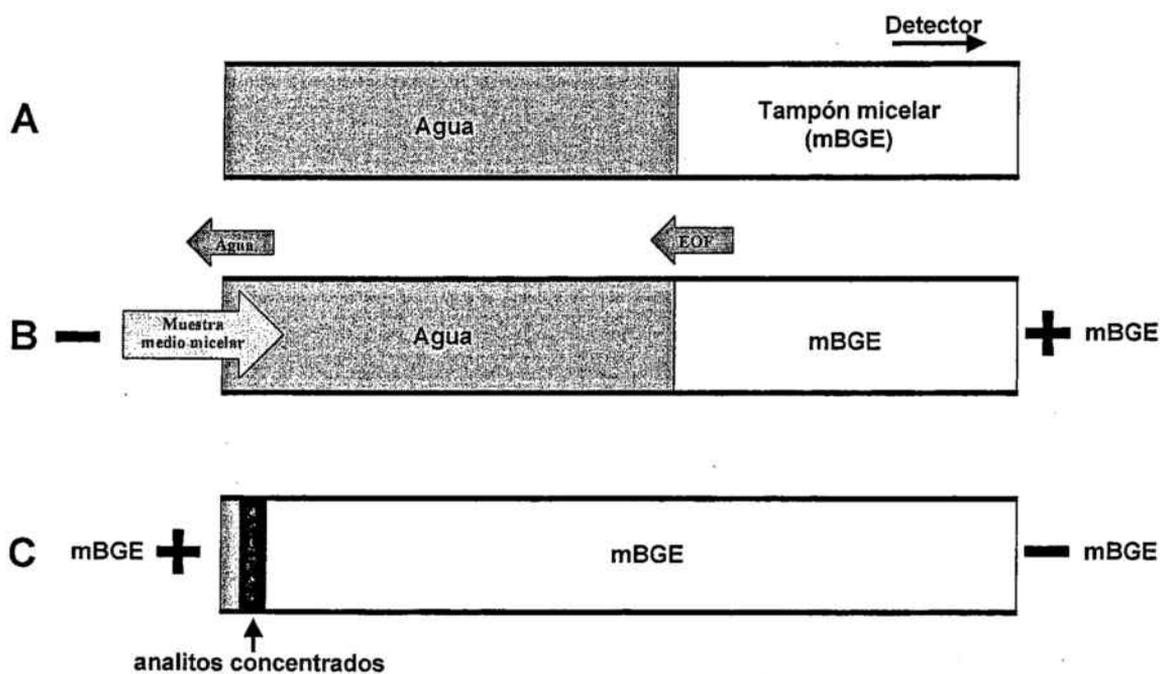


Figura 2.5. Combinación de FASI con cromatografía electrocinética micelar para el análisis de compuestos neutros.

(v) Métodos basados en el fenómeno de *sweeping*

En los últimos años, se ha introducido una nueva técnica de preconcentración en cromatografía electrocinética micelar conocida como *sweeping* que, en principio, produce un incremento excepcional en la respuesta de aquellas especies que presentan una elevada constante de asociación soluto-micela (Quirino y Terabe, 1998a y 1999). En la Figura 2.6 se muestra un esquema de las etapas del procedimiento estándar de aplicación de este método de preconcentración, descrito por Quirino y Terabe y que han denominado *sweeping*-MEKC (Quirino y Terabe, 1998a).

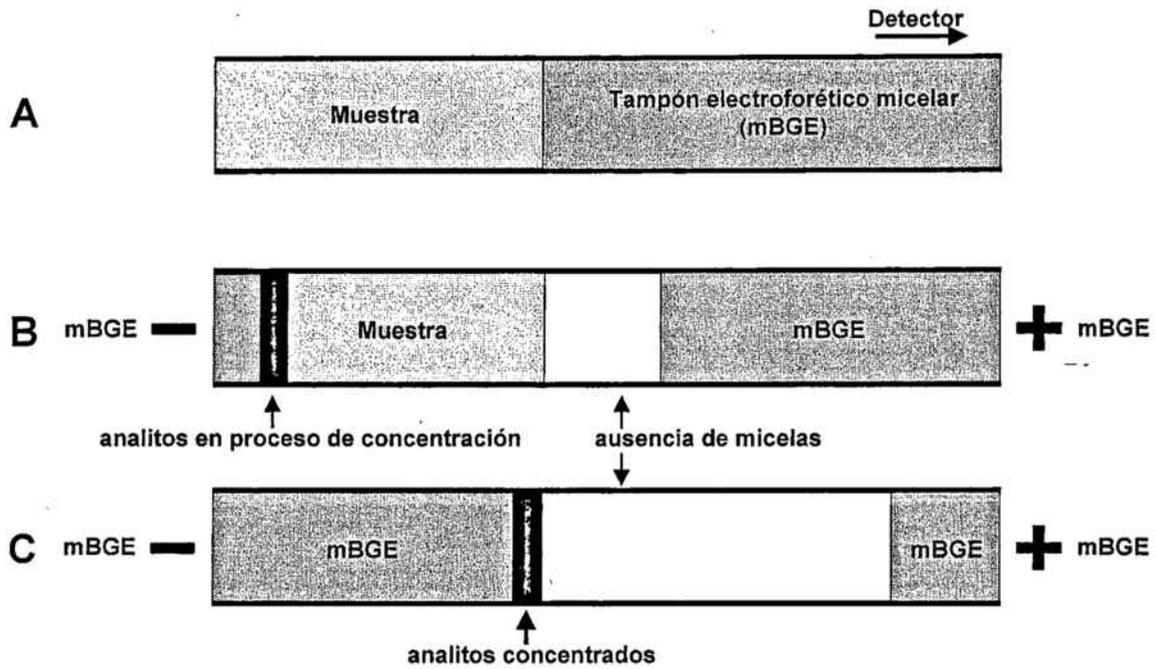


Figura 2.6. *Sweeping*-MEKC utilizando micelas con carga negativa.

En primer lugar, el capilar se acondiciona con un tampón electroforético micelar (*micellar background electrolyte*, mBGE). Por ejemplo un tampón con un tensioactivo como el dodecilsulfato de sodio (SDS) que da lugar a micelas cargadas negativamente. Seguidamente, se introduce hidrodinámicamente en el capilar (Figura 2.6-a) un volumen grande de muestra preparada en una matriz con una conductividad similar a la del mBGE pero libre de micelas. Finalmente, ambos extremos del capilar se introducen en viales que contienen el tampón micelar y se aplica una diferencia de potencial de polaridad negativa (Figura 2.6-b). De este modo, las micelas entran en el capilar y, en su avance a través de él, penetran en la zona de muestra interaccionando con los analitos (por ejemplo los cationes moviéndose en sentido contrario) y los van acumulando en una banda más estrecha. El proceso de separación de los diferentes analitos tiene lugar entonces mediante MEKC (Figura 2.6-c). Se tiene que indicar que a diferencia de los procedimientos de *stacking*, en los de *sweeping* se recomienda que las conductividades de la muestra y del electrolito sean lo más parecidas posible. No obstante, una mayor conductividad de la muestra no parece afectar de modo importante la preconcentración mediante el método de *sweeping* (Quirino *et al.*, 2000b; Lin *et al.*, 2001). La utilización del *sweeping*-MEKC usando tensioactivos catiónicos como formadores de micelas ha conducido a aumentos en la respuesta de entre 10 y 1000 veces para algunos ácidos sulfónicos (Kim *et al.*, 2001b).

Más recientemente se ha descrito una nueva variante de este método de preconcentración que combina el FASI y el *sweeping* y con la que se puede conseguir una mejora en la respuesta de analitos cargados de entre 100 y casi un millón de veces. Este método fue denominado *cation-selective exhaustive injection-sweeping* (CSEI-*sweeping*) por Quirino y Terabe (Quirino y Terabe, 2000). No obstante, como la cromatografía electrocinética micelar se utiliza para la separación de los analitos, el procedimiento general se conoce como CSEI-*sweeping*-MEKC. En la Figura 2.7 se muestra un esquema de las etapas del procedimiento estándar de este método de preconcentración para cationes, utilizando SDS como formador de micelas.

El capilar se acondiciona primero con un tampón electroforético de bajo pH y sin micelas (*non-micellar background electrolyte*, nmBGE). A continuación se introduce hidrodinámicamente en el capilar una cantidad relativamente elevada de un tampón de alta conductividad y sin disolventes orgánicos (*high conductivity solution*, HCS), seguida de una pequeña cantidad de agua (Figura 2.7-a). La muestra, que contiene los analitos (cationes) en una disolución de baja conductividad (o simplemente agua), se introduce en el capilar electrocinéticamente aplicando una diferencia de potencial de polaridad positiva que puede ser de la misma magnitud que la de separación (Figura 2.7-b), durante un período mucho más largo de lo usual (por ejemplo 10 minutos). Durante la inyección electrocinética de la muestra, los analitos (cationes) entran en el capilar y sufren una preconcentración por el fenómeno de *stacking* en la zona de tampón de elevada conductividad. No obstante, debido al elevado tiempo de inyección, los cationes no se concentran tan sólo en la zona de separación entre el agua y el HCS sino que se distribuyen a través de toda la zona del HCS.

A continuación se procede a la preconcentración mediante *sweeping*. Se introducen los extremos del capilar en viales con tampón electroforético micelar (mBGE) y se aplica un voltaje de polaridad negativa (Figura 2.7-c). Las micelas de SDS entran en el capilar y al penetrar en la sección del HCS interaccionan con los cationes y los preconcentran en una banda más estrecha. La separación de los analitos tiene lugar posteriormente mediante MEKC.

En términos generales, este método de preconcentración se denomina ISEI (*ion-selective exhaustive injection*) pero puede especificarse si se trata de la preconcentración de aniones o de cationes pasando a llamar *anion-selective or cation-selective exhaustive injection* (ASEI o CSEI, respectivamente). Las polaridades de trabajo dependerán en cada caso del tipo de ión a preconcentrar así como del tipo de micela usada en la preconcentración mediante *sweeping*.

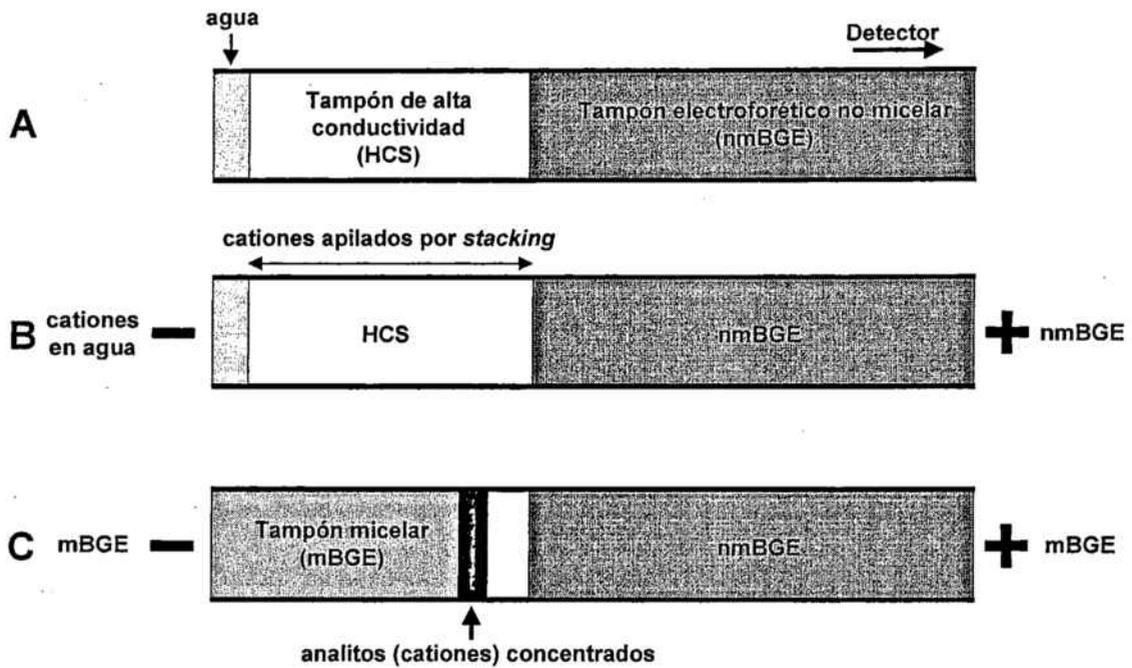


Figura 2.7. CSEI-sweeping-MEKC utilizando SDS como formador de micelas.

Una limitación de este procedimiento proviene de la primera etapa que es una preconcentración mediante FASI. Para obtener una preconcentración eficaz en esta etapa la muestra debe estar preparada en una matriz de baja conductividad y en algunos casos es difícil que tras la preparación de las muestras los analitos se encuentren en una disolución de estas características.

Como ejemplo de la aplicación de esta variante del método se puede citar el uso de ASEI-sweeping-MEKC en el análisis de algunos ácidos carboxílicos consiguiendo aumentos en la respuesta de entre 1000 y 6000 veces (Kim *et al.*, 2001a), y la utilización de CSEI-sweeping-MEKC en el análisis de algunas aminas aromáticas que ha permitido mejoras de entre 10^4 y 10^6 veces (Quirino *et al.*, 2000a).

2.2.1.2. Comparación de los métodos de preconcentración *on-line*

Tal como se describe en el apartado anterior, hoy en día existen diversos métodos de preconcentración *on-line* para mejorar uno de los principales problemas de la electroforesis capilar, es decir, los elevados límites de detección obtenidos en condiciones normales. En la Tabla 2.1 se resumen los métodos de preconcentración *on-line* comentados anteriormente, los analitos que pueden ser analizados aplicando estos métodos y se

comparan las mejoras obtenidas, en términos de sensibilidad, que se han descrito en la bibliografía para el análisis de diversos tipos de analitos.

Tabla 2.1. Métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar

Método	Tipo de analito	Aumento de sensibilidad	Características de la muestra
<i>normal-stacking</i>	cargados neutros ⁽¹⁾	10	menor conductividad que el tampón
<i>stacking</i> con eliminación de matriz	cargados neutros ⁽²⁾	100	menor conductividad que el tampón
FASI	cargados neutros ⁽²⁾	1000	menor conductividad que el tampón
<i>sweeping</i> -MEKC	compuestos con afinidad por la micela	1000	misma conductividad que el tampón
ISEI- <i>sweeping</i> -MEKC	cargados con afinidad por la micela	10 ⁴ -10 ⁶	menor conductividad que el tampón
Isotacoforesis	cargados	100	movilidad intermedia a la de los tampones
<i>pH-focusing</i>	compuestos ionizables	50 1000 ⁽³⁾	pH diferente al del tampón

⁽¹⁾en cromatografía electrocinética micelar

⁽²⁾unidos a micelas

⁽³⁾combinando *pH-focusing* con *sweeping*

Tanto la aplicabilidad como la mejora obtenida con los diversos métodos dependerán de las características instrumentales del equipo y de la naturaleza de los analitos y la matriz en la que éstos se encuentran. En este aspecto hay que mencionar que muchos de estos métodos de preconcentración requieren unas condiciones y características ideales en cuanto a las propiedades físico-químicas (conductividad, viscosidad, pH, etc.) de la matriz de la muestra y de los tampones electroforéticos utilizados. Esto implica que, por lo general, no sea posible extrapolar a muestras reales las mejoras obtenidas con patrones. Por ello, es necesario estudiar en cada caso la estrategia a seguir y el tratamiento de muestra necesario para modificar la matriz y hacerla más adecuada al método de preconcentración aplicado.

Como se puede observar en la Tabla 2.1 el método de *sweeping* y el de FASI proporcionan una mejora considerable en la respuesta que puede llegar a ser de hasta unas 1000 veces. La combinación de dos métodos de preconcentración, como puede ser el *pH-focusing* y el *sweeping*, puede conducir a mejoras equivalentes a las comentadas anteriormente. Sin embargo, es la combinación de *sweeping* con FASI, método conocido

como ISEI-*sweeping*-MEKC, el que puede producir el mayor incremento en la respuesta de los analitos, encontrándose descritas mejoras de hasta un millón de veces.

2.2.2. Trabajo experimental

2.2.2.1. Estudio previo

La mayor parte de los trabajos en los que se analizan los cuats con electroforesis capilar utilizan tampones electroforéticos no volátiles y que, en principio, no son compatibles con la espectrometría de masas (Pérez-Ruiz *et al.*, 1996; Galceran *et al.*, 1997; Carneiro *et al.*, 2000; Vinner *et al.*, 2001; Mallat *et al.*, 2001; Santilio *et al.*, 2003). Dado que uno de los objetivos de esta tesis es el desarrollo de metodología analítica basada en el acoplamiento de la electroforesis capilar con la espectrometría de masas para el análisis de estos compuestos y la posible adecuación de los métodos de preconcentración *on-line* a este acoplamiento, antes de pasar a estudiar los métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar se estudió la separación mediante CZE de los cuats empleando detección UV utilizando tampones volátiles adecuados para el posterior acoplamiento a la espectrometría de masas.

En un trabajo previo realizado en nuestro grupo se había utilizado un tampón electroforético de ácido acético/acetato de amonio para el análisis de los cuats mediante CE-MS (Moyano *et al.*, 1996) y por ello se decidió utilizar este sistema como tampón de partida. Para estos estudios se utilizó una electroforesis capilar Beckman P/ACE system 5500 con un detector UV de serie de diodos. Como ni el CQ ni el MQ presentan grupos cromóforos, los analitos objeto de estudio fueron tan solo el paracuat, el dicuat y el difenzocuat, herbicidas que presentan absorción en la zona del ultravioleta. A estos compuestos se añadieron dos sustancias de la familia del paracuat, el etilviológeno (EV) y el heptilviológeno (HV), con el fin de ser utilizados como patrones internos. Estos dos compuestos se diferencian del PQ en que los grupos alquilo en los nitrógenos cuaternarios son el etilo, en el EV, y el heptilo, en el HV.

Con la intención de poder comparar los resultados obtenidos con los métodos de preconcentración *on-line* con una separación utilizando electroforesis capilar de zona convencional, se decidió obtener esta separación y calcular los parámetros de calidad. Para ello se evaluó el efecto de diferentes parámetros, como la concentración del tampón electroforético, la presencia de disolvente orgánico, el voltage de separación aplicado, la temperatura de trabajo, y el tiempo de inyección tanto en modo electrocinético como

hidrodinámico. En cuanto a la detección, el PQ y el DF se analizaron a 255 nm y el DQ a 220 nm, longitudes de onda a las cuales estos compuestos presentan una buena absorción con una relación señal/ruido de fondo favorable. Las condiciones óptimas encontradas se resumen a continuación.

Condiciones óptimas de separación:

Tampón electroforético: ácido acético/acetato de amonio 160 mM pH 4,0

Modificador orgánico: 30 % metanol

Potencial aplicado: 20 kV

Temperatura: 25 °C

Inyección: hidrodinámica 10 s; electrocinética (5 kV) 5 s

Capilar de sílice fundida de 57 cm (50 cm longitud efectiva) x 50 µm d.i.

En una primera fase la separación de los cinco compuestos se llevó a cabo utilizando un tampón electroforético de ácido acético/acetato de amonio 160 mM a pH 4,0 y con un 30 % de metanol, obteniéndose una separación aceptable para los tres herbicidas y los dos patrones internos. Se prepararon disoluciones patrón de los analitos utilizando como disolvente tanto el tampón de la separación electroforética como agua Milli-Q. Ambas disoluciones patrón, de idéntica concentración, se introdujeron en el sistema mediante inyección hidrodinámica y en la Figura 2.8 se muestran los electroferogramas obtenidos, observándose un incremento en la respuesta cuando los analitos se encuentran disueltos en agua Milli-Q, debido al efecto de preconcentración producido por *normal stacking*. Por esta razón, de aquí en adelante las disoluciones de los cuats se prepararon siempre en agua Milli-Q.

En la Figura 2.9 se muestran los electroferogramas obtenidos en las condiciones óptimas a las dos longitudes de onda utilizadas para la cuantificación de DQ (220 nm) y de PQ y DF (255 nm). Puesto que la CZE va a servir de base para la comparación de los diferentes métodos de preconcentración se calcularon los parámetros de calidad con este método y en la Tabla 2.2 se resumen los valores obtenidos. Los límites de detección (LODs) se determinaron como la concentración inyectada de analito que da una señal igual a tres veces el ruido de fondo del electroferograma. Los LODs obtenidos con inyección electrocinética estuvieron alrededor de 1 mg l^{-1} para los tres herbicidas, obteniéndose valores considerablemente inferiores con la inyección electrocinética (entre 8 y 50 µg l^{-1}).

A continuación, se estudió la linealidad de la respuesta de los herbicidas en el intervalo de trabajo utilizando cinco disoluciones con concentraciones comprendidas entre 1 y

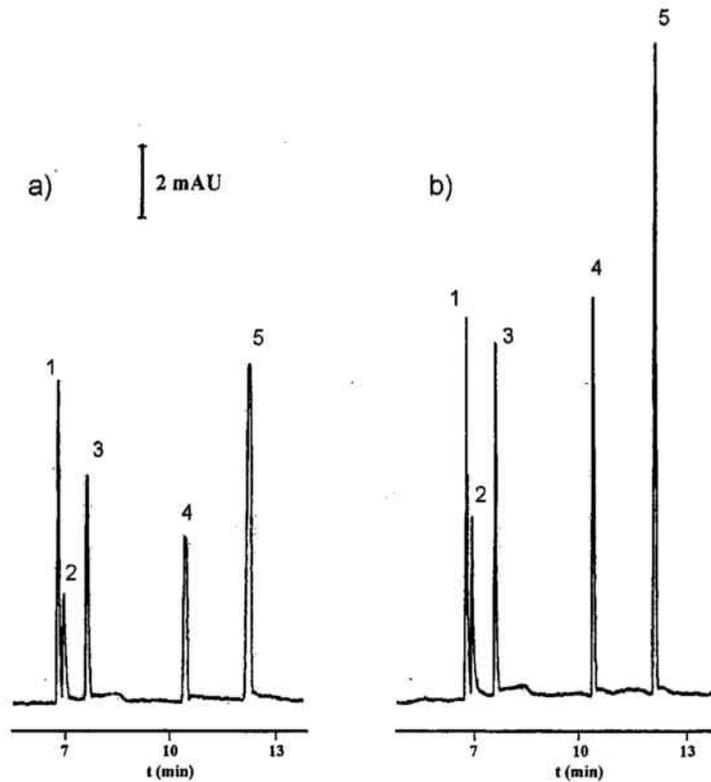


Figura 2.8. Electroferogramas de una disolución patrón de cuats y patrones internos (30 mg l^{-1}), obtenido en las condiciones óptimas, y preparada en (a) tampón de separación electroforética y (b) agua Milli-Q. Identificación de los picos: 1, PQ; 2, DQ; 3, EV; 4, HV; 5, DF. Marcador EOF a 30,6 min. Electroforesis capilar: Applied Biosystems Model 270 A. Capilar de 75 cm (55 cm longitud efectiva) y $50 \mu\text{m}$ d.i. Detección a 200 nm.

80 mg l^{-1} y el EV y el HV como patrones internos. En todos los casos se utilizó inyección hidrodinámica (10 s). Todas las funciones de las curvas de calibrado se pudieron ajustar a rectas con coeficientes de regresión superiores a 0,990.

La precisión del método se calculó tanto a corto como a medio plazo. La repetitividad o precisión *run-to-run*, definida como la desviación estándar relativa de un determinado número de medidas realizadas en las mismas condiciones y en un mismo día, se determinó a partir de 5 inyecciones (inyección hidrodinámica, 10 s) de una disolución patrón que contenía todos los analitos y los patrones internos a una concentración aproximada de 45 mg l^{-1} . Se calculó la repetitividad de los tiempos de migración y también se evaluó la repetitividad en base a la concentración utilizando para ello el método de calibración con patrón interno. Las desviaciones estándar obtenidas, indicadas en la Tabla

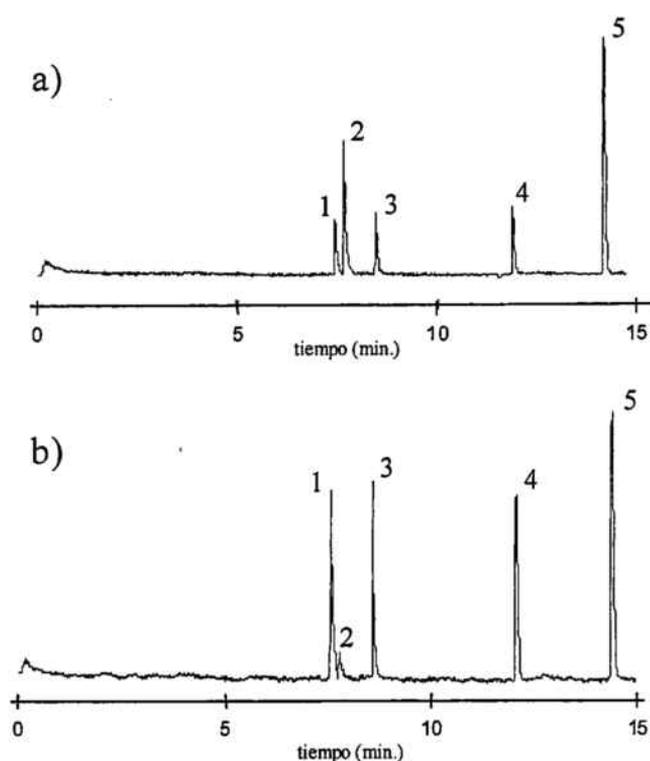


Figura 2.9. Electroferograma de una mezcla de cuats y de patrones interno (30 mg l^{-1}) obtenido con electroforesis capilar de zona convencional. Inyección hidrodinámica (10 s). El resto de condiciones son las óptimas para la separación. (a) 220 nm, (b) 255 nm. Identificación de los picos: 1, PQ; 2, DQ; 3, EV; 4, HV; 5, DF. Electroforesis capilar: Beckman P/ACE system 5500. Capilar de 57 cm (50 cm longitud efectiva) y $50 \mu\text{m}$ d.i.

Tabla 2.2. Parámetros de calidad de la separación de cuats mediante electroforesis capilar de zona convencional con detección UV

	PQ		DQ		DF	
	patrón EV	patrón HV	patrón EV	patrón HV	patrón EV	patrón HV
Límite de detección						
Inyección hidrodinámica (mg l^{-1})	1,1		1,0		0,8	
Inyección electrocinética ($\mu\text{g l}^{-1}$)	8,5		10,3		50,5	
<i>C</i> (mg/L)	47,9	48,9	43,9	47,9	46,5	47,2
Error relativo (%) ^a	4,1	6,1	3,0	7,3	6,0	7,6
Repetitividad %RSD (n=5)	3,2	4,9	4,0	4,5	5,1	4,9
Reproducibilidad %RSD (n=15)	4,4	9,6	7,1	8,5	6,5	5,6
<i>t_M</i> (min.)	7,66		7,90		14,76	
Repetitividad %RSD (n=5)	0,1		0,1		0,3	
Reproducibilidad %RSD (n=15)	1,3		1,5		2,6	

^a Comparando las concentraciones calculadas con los valores adicionados.

2.2, no superaron en ningún caso el 0,3 % para el tiempo de retención y el 5,1 % para las concentraciones. Los errores relativos obtenidos al comparar las concentraciones calculadas con los valores reales adicionados no superaron en ningún caso el 7,6 %.

De manera similar, la precisión a medio plazo o *day-to-day*, definida como la desviación estándar relativa de una serie de medidas realizadas bajo las mismas condiciones en diferentes días, se determinó a partir de 5 inyecciones (cada día) de una disolución patrón que contenía los herbicidas a un nivel aproximado de 45 mg l⁻¹ en tres días diferentes (n=15). Se calculó la variabilidad de los tiempos de retención y de la determinación de la concentración mediante la utilización de una recta de calibrado. Los resultados de las desviaciones estándar relativas, incluidos en la Tabla 2.2, fueron en todos los casos inferiores a 2,6 % para los tiempos de migración y a 9,6 % para las concentraciones. En términos generales el EV resultó ser mejor patrón interno para los herbicidas PQ y DQ y el HV para el DF, en ambos casos debido a la proximidad de patrón interno en cuestión con los respectivos herbicidas, tal como puede observarse en la Figura 2.9, debido a que permiten una mejor corrección de las posibles fluctuaciones de la respuesta en los electroferogramas.

2.2.2.2. *Stacking* con eliminación de matriz

El primer método de preconcentración *on-line* que desarrollamos para el análisis de los cuats mediante electroforesis capilar con detección UV fue el de *stacking* con eliminación de matriz. Como se comentó en el Apartado 2.2.1., la utilización de capilares de sílice fundida solo permite aplicar este método de preconcentración a aniones, ya que es necesario que el EOF vaya en sentido contrario a la movilidad electroforética de los iones que se quieren preconcentrar. Este hecho hace imprescindible invertir el sentido del EOF si se quieren preconcentrar cationes. La utilización de tensioactivos catiónicos que provocan la inversión de potencial Z del capilar permite invertir el sentido del EOF.

La pared de un capilar de sílice fundida tiene carga negativa debido a la ionización de los grupos silanol. El flujo electroosmótico tiene su origen en el movimiento en bloque de la disolución del electrolito provocado por el movimiento de los cationes hacia el cátodo, lo que da lugar a un EOF catódico. Si se añade al tampón electroforético un tensioactivo catiónico, en una primera etapa el capilar quedará recubierto por una capa de tensioactivo, lo que anula la carga negativa del capilar y, en consecuencia, el flujo electroosmótico. Si la concentración de tensioactivo en el tampón es suficientemente elevada, se puede generar una doble capa de tensioactivo haciendo que el capilar quede

totalmente recubierto de éste y con carga positiva. Ahora, el bloque de la disolución del electrolito se moverá debido al movimiento de los aniones hacia el ánodo, generándose entonces un EOF anódico.

Con esta inversión del flujo electroosmótico es posible aplicar el método de preconcentración de *stacking* con eliminación de matriz al análisis de cationes. No obstante, la modificación del capilar debe mantenerse constante en el tiempo y para ello, tanto el tampón electroforético como las muestras deben contener la misma concentración de tensioactivo catiónico.

Un parámetro crítico en este procedimiento de preconcentración es el momento en que se tiene que producir la inversión de la polaridad (tiempo de inversión). Para optimizar este parámetro se monitoriza la corriente eléctrica a través del capilar. Con el capilar lleno del tampón electroforético de trabajo se mide la intensidad de corriente en el capilar y que en nuestro caso era cercana a 10 μA . Este es el límite máximo que se podrá alcanzar cuando el capilar se haya llenado completamente de tampón. Seguidamente se procede a la inyección de la muestra preparada en un tampón de baja conductividad, o en su caso en agua Milli-Q. Simultáneamente al proceso de *stacking* con eliminación de matriz se lleva a cabo un registro de la evolución de la intensidad de corriente eléctrica. A medida que se va produciendo la eliminación de la matriz la intensidad de corriente va aumentando. Cuando toda la muestra ha sido eliminada del capilar se alcanza la corriente eléctrica propia del tampón electroforético que nuevamente llena el capilar. Puede considerarse que la matriz se ha eliminado prácticamente cuando se alcanza el 99% de la corriente correspondiente al tampón. En nuestro caso, el valor seleccionado fue del 95% que garantiza la eliminación de gran parte de la matriz sin una pérdida considerable de los analitos en estudio. En las condiciones de trabajo utilizadas, el tiempo de inversión estimado fue alrededor de 2,3 min. Sin embargo se tiene que mencionar que es necesario controlar este parámetro diariamente, e incluso a lo largo de una misma sesión, ya que pequeñas modificaciones en la pared del capilar a lo largo del día pueden hacer variar el valor óptimo.

En la comunicación científica que se incluye en el siguiente apartado (Artículo I) se describe con detalle el desarrollo del método de preconcentración *on-line* mediante *stacking* con eliminación de matriz para el análisis de los herbicidas PQ, DQ y DF en muestras de agua de bebida. En este trabajo, además de la optimización de parámetros importantes para la aplicación del método a estos compuestos catiónicos se obtienen los parámetros de calidad para su aplicación cuantitativa. Posteriormente y con la finalidad de disminuir los límites de detección se añadió una etapa previa de preconcentración *off-line* basada en una extracción en fase sólida (SPE) con cartuchos de carbono grafitado poroso

(PGC), y para la cual se siguió una metodología previamente desarrollada en nuestro grupo (Carneiro *et al.*, 2000). La combinación de ambos métodos de preconcentración y la aplicación del método resultante al análisis de los herbicidas PQ, DQ y DF en muestras de agua de bebida se incluye en la comunicación científica del apartado 2.2.2.4 (Artículo II).

2.2.2.3. Artículo I

Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electrophoresis

O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou y M.T. Galceran

Journal of Chromatography A, 912 (2001) 353-361.



Sample stacking with matrix removal for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat in water by capillary electrophoresis[☆]

O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

Received 27 November 2000; received in revised form 4 January 2001; accepted 16 January 2001

Abstract

Conditions for the simultaneous determination of paraquat, diquat and difenzoquat by capillary zone electrophoresis using a stacking technique in a chemically modified capillary have been established. To apply the stacking method with sample matrix removal for the analysis of cations, an anodic electroosmotic flow is mandatory. For quats, 50 mM acetic acid–ammonium acetate (pH 4.0) with 5% (v/v) methanol as electrophoretic buffer and the addition of 0.8 mM cetyltrimethylammonium bromide as wall capillary organic modifier was proposed. Field polarity reversal time was optimised for several sample matrices. Detection was carried out at 220 and 255 nm. Detection limits, based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were lower than 15 $\mu\text{g l}^{-1}$ for standards in Milli-Q water and two to ten times higher for drinking water samples. Run-to-run and day-to-day reproducibility have been established. The method was successfully applied to the determination of the three herbicides in spiked drinking water. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Sample stacking; Sample handling; Quaternary ammonium herbicides; Pesticides

1. Introduction

Some quaternary ammonium herbicides, named “quats”, have been widely used in agricultural applications. Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion, PQ) and diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridylium ion, DQ) are used mainly as non-selective herbicides, and difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-

diphenylpyrazolium ion, DF) as a selective herbicide [1]. The herbicide structures are shown in Fig. 1. Quats are toxic to man and have been classified as

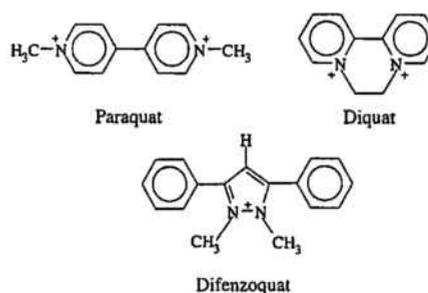


Fig. 1. Quaternary ammonium herbicide structures.

[☆]Presented at the 29th Scientific Meeting of the Spanish Group of Chromatography and Related Techniques, Alcalá de Henares (Madrid), 12–14 July, 2000.

*Corresponding author. Fax: +34-93-402-1233.

E-mail address: galceran@apolo.qui.ub.es (M.T. Galceran).

moderately hazardous by the World Health Organisation [2] and some have been included on “priority” lists and are regulated in drinking water in Mediterranean countries [3]. For drinking water, the US Environmental Protection Agency has established a maximum contamination level (MCL) of $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for DQ and a goal of $3 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ [4,5].

The determination of these compounds is difficult due to their cationic character. Nevertheless, their analysis in several matrices has been reported using spectrophotometry [6,7], spectrofluorimetry [8], ion-selective electrodes [9,10], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [11,12], gas chromatography [13,14] and gas chromatography–mass spectrometry [15]. Ion-pair high-performance liquid chromatography with direct UV detection has also been used for the simultaneous determination of paraquat, diquat and difenzoquat [16,17]. In order to improve selectivity and sensitivity, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) has been used [18–20]. Capillary electrophoresis (CE) has been applied to the determination of quaternary ammonium herbicides in water [16,21–23] and other matrices such as serum [24,25], soil and urine [24]. Moreover, CE–MS has also been used for the determination of these compounds in water samples [26–28].

Capillary electrophoresis using on-column UV detection is hindered by the short optical path defined by the column diameter. Although the mass limit in CE can be very low because of the small volume, the detection limit is usually $\sim 10^{-6} M$, which is several orders of magnitude higher than the detection limits for LC, and so preconcentration techniques are needed. Off-line preconcentration procedures contribute to reaching low detection limits but involve long analysis times and laborious sample handling. Several techniques for on-column preconcentration have been reported. Isotachopheresis (ITP) [29,30] has been used as on-line water sample pre-treatment for the determination of PQ and DQ by CE [31]. The major disadvantage of ITP is the need to use several types of support buffers in a single capillary column, a process known as discontinuous electrophoresis. Other on-column preconcentration techniques involve several sample stacking procedures [32–34], the simplest of which consists of the injection of large volumes of sample

dissolved in a lower conductivity buffer matrix than those used for CE separation. In these conditions, the charged species are focused in a sharp sample band, and the detection limit is decreased ten-fold. However, the amount of sample which can be loaded into the capillary in conventional sample stacking is rather limited because of disturbances caused by the low-concentration sample buffer [33,35]. To stack an extremely long sample plug while retaining high resolution, the sample buffer must be removed after stacking is completed in order to eliminate the non-uniform distribution of both the field strength and electroosmotic velocity.

One method of pumping out the sample matrix is to use the electroosmotic flow (EOF) while the sample stacking is in progress. The most usual procedure to do this involves field polarity reversal when the capillary has been filled with a large volume of sample of lower conductivity than those used for CE separation. To apply this method to a cationic analyte, which has a positive electrophoretic mobility with respect to the electroosmotic flow, the direction must be reversed, for instance by adding a cationic surfactant.

In this work, we used the stacking concentration method with sample matrix removal in a single, continuous support buffer, to enhance quaternary ammonium herbicide detection. Cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) was used as wall capillary modifier to make the charge on the silica wall positive and thus reverse the electroosmotic flow. Quality parameters were obtained and the method was applied to the analysis of tap water and mineral water samples.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Beckman P/ACE 5500 capillary electrophoresis system (Fullerton, CA, USA) equipped with diode array detection was used. This system was modified to control the reversal of the electrode polarity. Electrophoretic separations were carried out using uncoated fused-silica capillaries (Supelco, Bellefonte, PA, USA) with a total length of 57 cm, separation length of 50 cm, and internal diameter of

50 μm . New capillaries were pre-treated using 0.1 M hydrochloric acid for 15 min, ultrapure water for 15 min, 1 M sodium hydroxide for 30 min, and finally rinsed with ultrapure water for 30 min. The capillary was conditioned daily using 1 M sodium hydroxide for 15 min, then rinsed with ultrapure water for 15 min and finally with the running buffer for 60 min before the first run. Conditioning was carried out between runs using a running buffer for 2 min. Acetic acid–ammonium acetate 50 mM buffer solution at pH 4.0 containing 5% methanol and 0.8 mM CTAB as wall capillary modifier was used as running buffer. Carrier electrolyte was filtered through a 0.45- μm membrane filter, and degassed before use. The temperature was held at 25°C and direct UV detection was performed at 255 and 220 nm. Samples were loaded by pressure injection at 140 kPa and an injection time of 0.25 min. For sample matrix removal, +20 kV were applied and the separation was performed by reversing the polarity at the same potential. Electrophoretic data were processed with Beckman P/ACE Station software version 1.0.

2.2. Chemicals

The reagents, all of analytical grade, were obtained from the following sources: DQ (97%) and DF (98%) were purchased from Chemservice (West Chester, PA, USA), and PQ from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethyl viologen (EV) (Aldrich, Milwaukee, WI, USA) and heptyl viologen (HV) (TCI, Tokyo, Japan) were used as internal standards. HPLC-gradient grade methanol, acetic acid (100%), sodium hydroxide, hydrochloric acid (25%) and CTAB were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), ammonium acetate from Fluka (Buchs, Switzerland) and phenol from Carlo Erba (Milan, Italy). Water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock standard solutions of individual quats and internal standards (1 mg ml^{-1}) were prepared in Milli-Q water and stored in plastic vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by dilution with 0.8 mM CTAB aqueous solution, and were filtered through a 0.45- μm nylon filter. Buffers were prepared from an aqueous solution of acetic acid 400 mM and the pH was adjusted with am-

monium acetate or sodium acetate (400 mM). This buffer was diluted with Milli-Q water to 50 mM after the addition of CTAB and methanol to obtain the final carrier electrolyte.

2.3. Stacking procedure

To reverse the electroosmotic flow a cationic surfactant, CTAB, at a concentration of 0.8 mM was added to the carrier electrolyte and the samples. CTAB concentration was always under its critical micelle concentration (0.92 mM under aqueous conditions) to avoid micelle formation. Phenol was used as EOF marker. The determination of quats in tap water (883 $\mu\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$) and mineral water (474 $\mu\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$) required dilution 1:4 with Milli-Q water (1.6 $\mu\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$) prior to analysis.

The stacking procedure involved several steps. The capillary was first filled with the carrier electrolyte and then a long plug of sample was introduced hydrodynamically by pressure (140 kPa) during 0.25 min. A high voltage (+20 kV) was then applied and the electric current was monitored to indicate when the sample matrix was almost removed from the capillary. After injection, the current decreased due to the high resistivity caused by the presence of the sample. As the sample matrix was pushed out of the capillary, the current increased. When the current was 95% of the original carrier electrolyte value the voltage was turned off and the electrodes were switched to the separation configuration.

3. Results and discussion

3.1. Stacking and CE separation conditions

To apply the stacking technique with sample matrix removal to the determination of quats, CTAB was used as surfactant to reverse the EOF towards the anode. At low pH (below pH 4.0) there was a marked number of dissociated silanol groups (Si-O^-) in the internal capillary wall. Due to association of CTAB long hydrocarbon chains, a reversal in the zeta potential of the double layer at the capillary internal surface occurred at a certain critical concentration of surfactant. To evaluate the effect of the

counter ion, two buffers were studied, acetic acid–ammonium acetate and acetic acid–sodium acetate, both at pH 4.0. The CTAB concentration and carrier electrolyte concentration were optimised for each buffer to obtain an electrophoretic flow high enough to elute the quaternary ammonium herbicides, which have electrophoretic mobilities in opposite directions. For this purpose, a buffer concentration in the range 50–240 mM and CTAB concentration from 0.3 to 0.8 mM were studied.

Fig. 2 shows the variation of EOF versus buffer concentration at several CTAB concentrations. When using 0.8 mM CTAB, a decrease in buffer concentration produced an increase in the EOF, due to the effect of ionic strength. When ammonium buffer was used at low CTAB concentrations (0.5 and 0.3 mM), a decrease in the EOF was observed as buffer concentration decreased. This behavior was specially marked at concentration levels below 100 mM. In contrast, an increase was always observed for sodium buffer. This may be due to the distinct adsorption of the buffer counter ion on the capillary

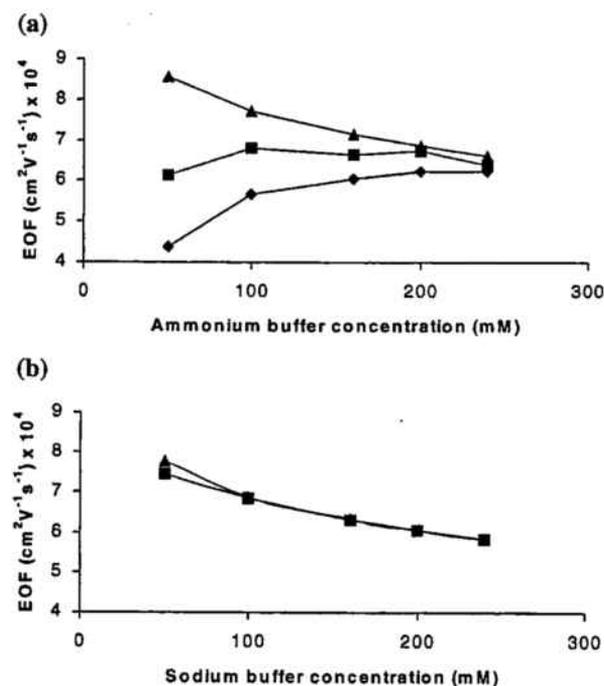


Fig. 2. Effect of buffer and surfactant concentration on the electroosmotic flow. (a) Acetic acid–ammonium acetate (pH 4.0). (b) Acetic acid–sodium acetate (pH 4.0). ♦ 0.3 mM CTAB, ■ 0.5 mM CTAB, ▲ 0.8 mM CTAB.

wall. The adsorption of the ammonium ion was stronger than that of the sodium, thus competition with the cetyltrimethylammonium ion for the capillary surface occurred and, as a result, the capillary wall was not totally coated with the surfactant. The negative charge density within the diffused layer decreased and lower EOF values for the ammonium ion were observed. Therefore, to obtain a high EOF, a low ammonium buffer (50 mM) and high CTAB concentration (0.8 mM) were used for the remainder of this study.

Fig. 3 shows the electropherograms obtained in the above mentioned conditions, at two wavelengths (220 and 255 nm). The three cationic herbicides and the two internal standards appeared after the electroosmotic flow marker and the bromide counteranion of some quaternary ammonium herbicide standards migrated before the EOF marker.

To achieve an efficient stacking effect the field polarity reversal time must be established. This time was affected by electrolyte composition, capillary conditioning and sample matrix. Therefore the reversal time must be controlled for each buffer and sample. To study the influence of this parameter on the separation, standard solutions of the three her-

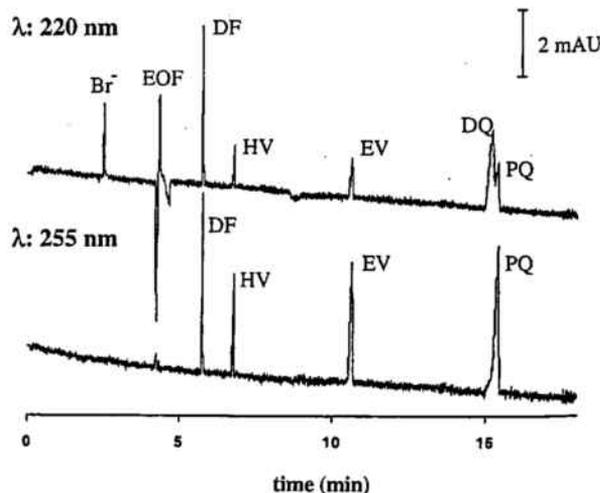


Fig. 3. Electropherograms, at two wavelengths, of a standard solution of PQ (21.4 mg l⁻¹), DQ (20.7 mg l⁻¹) and DF (20.4 mg l⁻¹) and the internal standards EV (21.1 mg l⁻¹) and HV (20.4 mg l⁻¹) in Milli-Q water. Carrier electrolyte: acetic acid–ammonium acetate 50 mM (pH 4.0), 0.8 mM CTAB. Hydrodynamic injection, 10 s. Applied potential, +20 kV. Phenol (20.8 mg l⁻¹) was used as an EOF marker.

bicides and the two internal standards in Milli-Q water were used. The capillary current was monitored to determine the reversal time. Before injection, the current of a capillary completely filled with electrophoretic buffer was measured applying +20 kV. Then, the standard solution containing 0.8 mM CTAB was hydrodynamically injected into the capillary (0.25 min, 140 kPa) and a voltage of +20 kV was applied. After the injection, the current level decreased due to the increase in resistivity caused by the ionic concentration of the sample. As the sample matrix was pushed out of the capillary, the current increased until the initial value. The polarity was reversed when the electric current was 95% of the initial value, and 2.3 min were needed.

When the reversal time was too high, DF was not detected because it was completely pushed out of the capillary with the sample matrix due to its low electrophoretic mobility. In contrast, when it was too low, a poor resolution between PQ and DQ was observed due to the long plug of sample in the capillary. The reversal time was critical due to the distinct electrophoretic behavior of the double-charged herbicides, PQ and DQ, which have high electrophoretic mobilities, and the monocharged herbicide DF, with low electrophoretic mobility. The difference in the migration time for these herbicides was above 10 min (Fig. 3).

Fig. 4a shows that the herbicides can be detected by applying the stacking method in a short analysis time. Although a system peak appeared (9.7 min), the electrophoretic separation was not affected. Nevertheless the EV peak, which migrated near to the system peak, showed a disturbance that prevented the use of this compound as internal standard. To improve the resolution between PQ and DQ, small amounts of methanol (0.5–8%) were added to the electrophoretic buffer. This addition increased the resolution between PQ and DQ but the analysis time was also augmented. As a compromise, 5% methanol was used (Fig. 4b) because a baseline resolution between both herbicides in a relatively short analysis time was obtained. Consequently, 50 mM acetic acid–ammonium acetate at pH 4.0 with 5% methanol and 0.8 mM CTAB was proposed as the optimal electrophoretic carrier electrolyte for the analysis of these compounds.

3.2. Quality parameters

Quality parameters using stacking with sample matrix removal under optimal conditions are given in Table 1. The detection limits, expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$ of quaternary ammonium ion, are based on a signal-to-noise ratio of 3:1 and were lower than $15 \mu\text{g l}^{-1}$. These detection limits are 30–80 times lower than

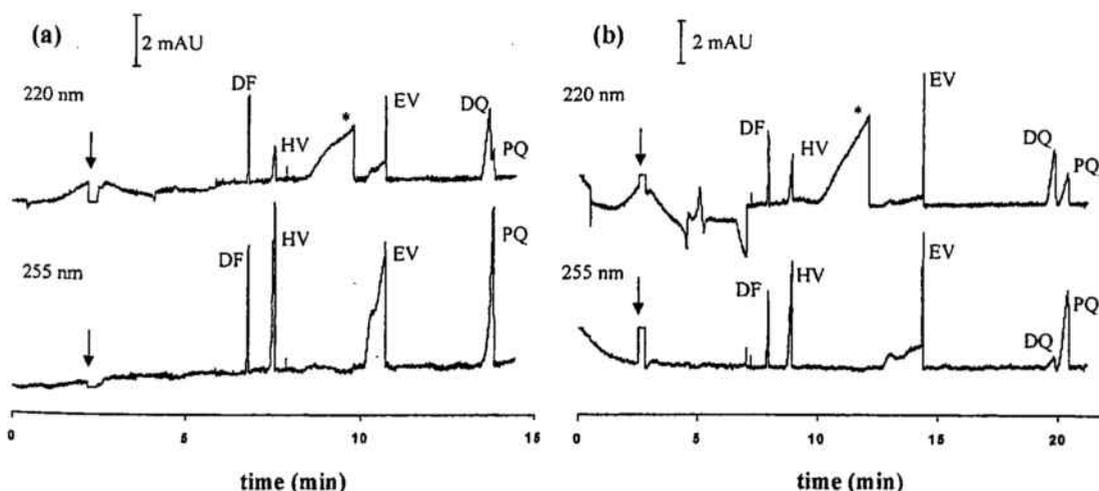


Fig. 4. Electropherogram of a standard solution of PQ (0.2 mg l^{-1}), DQ (0.2 mg l^{-1}) and DF (0.2 mg l^{-1}) and the internal standards EV (0.8 mg l^{-1}) and HV (0.8 mg l^{-1}) in Milli-Q water. Hydrodynamic injection, 0.25 min (137.9 kPa). Applied potential, +20 kV (sample matrix removal), -20 kV (electrophoretic separation). Carrier electrolyte: (a) acetic acid–ammonium acetate (pH 4.0), 0.8 mM CTAB. (b) as (a) with 5% MeOH. *, system peak. The arrow shows the reversal time.

Table 1
Quality parameters

Parameter	PQ ^a			DQ ^b			DF ^a		
	Milli-Q ^c water	Tap water	Mineral water	Milli-Q ^c water	Tap water	Mineral water	Milli-Q ^c water	Tap water	Mineral water
LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	10	48	18	11	64	25	15	154	62
LOD hydrodynamic injection ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^d	829	820	–	960	950	–	435	425	–
LOD electrokinetic injection ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^e	2.9	21	–	2.3	18	–	3.9	31	–
<i>Migration time</i>									
Run-to-run reproducibility, RSD (%) ($n=5$)	1.3	0.8	0.2	1.2	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1
Day-to-day reproducibility, RSD (%) ($n=15$)	8.8	–	–	8.4	–	–	1.6	–	–
<i>Concentration (spiked sample)</i>									
Run-to-run reproducibility, RSD (%) ($n=5$) ^f	(1) 3.7 (2) –	2.5 4.6	3.3 2.8	6.8 –	3.6 3.5	2.4 3.2	2.3 –	5.4 3.7	4.6 1.8
Day-to-day reproducibility, RSD (%) ($n=15$)	13.1	–	–	15.4	–	–	2.4	–	–
<i>Linearity (30–850 $\mu\text{g l}^{-1}$)</i>									
Correlation coefficients ^f	(1) 0.992 (2) –	0.999 0.999	0.999 0.999	0.994 –	0.999 0.999	0.999 0.996	0.999 –	0.999 0.994	0.999 0.997

^a λ : 255 nm.

^b λ : 220 nm.

^c Using HV as internal standard.

^d Ref. [36].

^e Ref. [16].

^f (1) External calibration; (2) standard addition.

those obtained in a previous study using hydrodynamic injection but are slightly worse than those obtained using electrokinetic injection [36] although the reproducibility is improved.

A total of five replicate determinations of a standard solution of PQ, DQ and DF (0.4 mg l^{-1}) were carried out under optimum conditions to determine run-to-run reproducibility. Relative standard deviations (RSD) of migration time (0.3–1.3%) and concentration determined by external calibration (2.3–6.8%) were obtained. To determine day-to-day reproducibility, five replicate analyses of the same standard solution were made on 3 days ($n=15$). RSDs in the range 1.6–8.8% for migration time and 2.4–15.4% for concentration were obtained. DF showed the best results probably due to the lower analysis time and the internal standard used (HV), that migrated close to it. Calibration curves based on the peak area ratio (compound/internal standard) for

paraquat, diquat and difenzoquat at concentrations between 30 and $850 \mu\text{g l}^{-1}$ were obtained and good linearity was observed.

3.3. Application

To show the applicability of the method for the routine analysis of real samples, spiked tap water from Barcelona and mineral water were used. When applying the stacking method with sample matrix removal to the analysis of these samples, the signal obtained was lower and the resolution between PQ and DQ was worse than those obtained for standards, probably due to the relatively high conductivity of the samples, tap water ($883 \mu\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$) mineral water ($474 \mu\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Since the stacking method requires a considerable difference between the sample region and the carrier electrolyte conductivity,

the salinity of the sample must be taken into account. Therefore, a dilution of the sample with Milli-Q water was necessary to increase the efficiency of the preconcentration step.

In the electropherograms of the spiked sample without dilution and diluted 1:1 (Fig. 5a2 and a3) a poor resolution between PQ and DQ was obtained, and DF did not appear. When the dilution factor increased, the resolution improved and DF was detected (Fig. 5a4 and a5). These electropherograms have been acquired at 200 nm, because at this wavelength the three herbicides can be detected simultaneously. The increase in resolution between PQ and DQ can be explained by the stacking effect, which is very pronounced with samples of low conductivity (Fig. 5b). Nevertheless, dilution produced a decrease in the peak areas. In contrast, DF was detected when the sample was sufficiently

diluted, because the matrix effect was prevented as the high efficiency of the stacking with sample matrix removal increased. As a compromise between response and PQ/DQ resolution, a dilution of 1:4 was proposed.

Quality parameters using stacking with sample matrix removal under optimal conditions for water samples are given in Table 1. The detection limits, expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$ of quaternary ammonium ion, are based on a signal-to-noise ratio of 3:1 and were slightly higher than those obtained for water samples using electrokinetic injection [16]. The values for mineral water were three times lower than for tap water due to its lower salinity. These detection limits were higher than those obtained for Milli-Q water spiked samples, thus showing the contributory effect of sample matrix. Nevertheless these values are higher than those established by the US Environmen-

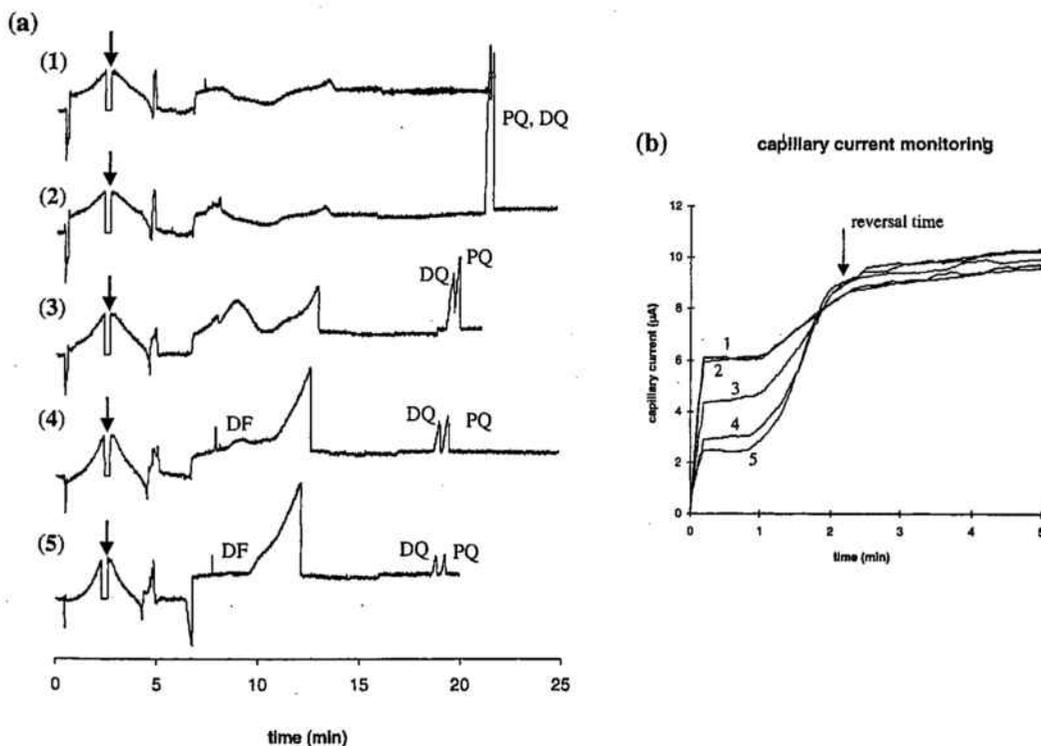


Fig. 5. (a) Electropherogram of tap water and (b) capillary current monitoring. (1) Non-spiked water; (2) spiked water at $1000 \mu\text{g l}^{-1}$; (3) spiked water diluted 1:1; (4) spiked water diluted 1:4; (5) spiked water diluted 1:9. Running buffer: acetic acid–ammonium acetate (pH 4.0), 0.8 mM CTAB, 5% MeOH. λ : 200 nm.

tal Protection Agency [4,5] for drinking water, so the method can only be applied for relatively highly contaminated waters.

A total of five replicate determinations of spiked tap water and mineral water at a level of 1 mg l^{-1} were carried out under optimum conditions to determine run-to-run reproducibility. In these samples neither EV nor HV could be used as internal standards due to disturbances produced by the system peak. Therefore quantification was carried out using both external calibration with standard solutions of PQ, DQ and DF in Milli-Q water in the range from 30 to $850 \mu\text{g l}^{-1}$, and standard addition. RSDs based on concentration were from 2.5 to 5.4%. Both quantitation methods can be applied to the analysis of drinking water samples.

4. Conclusions

In this paper the suitability of stacking using a cationic surfactant to reverse EOF for the separation of cations with a wide range of mobilities has been verified. CTAB in a buffer solution with methanol was needed to reverse the flow and obtain a convenient separation of PQ and DQ. Reversal time is critical and must be established for each sample. Sample matrix contributes to the performance of the procedure and a sample dilution is mandatory to improve both resolution and sensitivity. Sample stacking with EOF reversal has proven to be a convenient method for the analysis of paraquat, diquat and difenzoquat in highly contaminated water samples. Actually additional studies are being carried out to improve the limits of detections by combining stacking procedure with other preconcentration methods.

Acknowledgements

This work has been supported by CICYT project AMB97-0405. O. Núñez thanks the Generalitat de Catalunya for a grant (Beca predoctoral per a la formació de personal investigador, FI/FIAP).

References

- [1] The Pesticide Manual: A World Compendium Incorporating the Agrochemical Handbook, 10th ed, The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, Bath, UK, 1994.
- [2] The WHO Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 1996–1997, WHO, Geneva, 1996.
- [3] D. Barceló, *J. Chromatogr.* 643 (1993) 117.
- [4] Drinking Water Health Advisory: Pesticides, US Environmental Protection Agency, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [5] Code of Federal Regulations. Title 40, Part 141, US Government Printing Office, Washington, DC, July 1, 1997, Revised.
- [6] P. Yáñez-Sedeño, L.M. Pozo Díez, *Talanta* 33 (1986) 745.
- [7] P. Shihhare, V.K. Gupta, *Analyst* 116 (1991) 391.
- [8] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Fenoll, *Analyst* 123 (1998) 1577.
- [9] P. Bianco, N. Aghroud, *Electroanalysis* 9 (1997) 602.
- [10] M. Pecorari, P. Bianco, *Electroanalysis* 10 (1998) 181.
- [11] M.Y. Selisker, D.P. Herzog, R.D. Erber, J.R. Fleeker, J.A. Itak, *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 544.
- [12] C.A. Spinks, B. Wang, E.N.C. Mills, M.R.A. Morgan, *Analyst* 124 (1999) 847.
- [13] A.J. Cannard, W.J. Criddle, *Analyst* 100 (1975) 848.
- [14] S. Kawase, S. Kanno, *J. Chromatogr.* 283 (1984) 231.
- [15] Y. Tondeur, G.W. Sovocool, R.K. Mitcum, W.J. Niederhut, J.R. Donnelly, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* 14 (1987) 733.
- [16] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 217.
- [17] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 325.
- [18] V.Y. Taguchi, S.W.D. Jenkins, P.W. Crozier, D.T. Wang, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 830.
- [19] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 145.
- [20] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 441.
- [21] J.Y. Cai, Z. Elrassi, *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 1193.
- [22] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Díez, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 289.
- [23] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, L. Puignou, *Chromatographia* 39 (1994) 581.
- [24] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, V. Tomás, *Chromatographia* 43 (1996) 468.
- [25] M. Tomita, T. Okuyama, Y. Nigo, *Biomed. Chromatogr.* 6 (1992) 91.
- [26] E. Moyano, D.E. Games, M.T. Galceran, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1379.
- [27] D. Wycherley, M.E. Rose, K. Giles, T.M. Hutton, D.A. Rimmer, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 339.
- [28] I.M. Lazar, M.L. Lee, *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 117.
- [29] F.M. Everaerts, T.P.E.M. Verheggen, F.E.P. Mikkers, *J. Chromatogr.* 169 (1979) 21.

- [30] P. Jandik, W.R. Jones, *J. Chromatogr.* 546 (1991) 431.
- [31] D. Kaniansky, F. Ivanyi, F.I. Onuska, *Anal. Chem.* 66 (1994) 1817.
- [32] M. Albin, P.D. Grossman, S.E. Moring, *Anal. Chem.* 65 (1993) A489.
- [33] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) A489.
- [34] C. Schwer, *LC–GC Int.* 6 (1993) 630.
- [35] R.L. Chien, D.S. Burgi, *Anal. Chem.* 64 (1992) 1046.
- [36] M.C. Carneiro, Doctoral thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, 1996.

2.2.2.4. Artículo II

Solid-phase extraction and sample stacking-capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water

O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran

Journal of Chromatography A, 946 (2002) 275-282.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 946 (2002) 275–282

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Solid-phase extraction and sample stacking–capillary electrophoresis for the determination of quaternary ammonium herbicides in drinking water[☆]

O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, E-08028 Barcelona, Spain

Received 12 June 2001; received in revised form 26 November 2001; accepted 26 November 2001

Abstract

Conditions for the simultaneous determination of paraquat, diquat and difenzoquat by capillary zone electrophoresis were established by combining two preconcentration procedures. Off-line solid-phase extraction was used for the isolation and preconcentration of quats in drinking water. Quats were then analysed by capillary electrophoresis using sample stacking with matrix removal as on-column preconcentration procedure. Two different porous graphitic carbon cartridges were compared. The breakthrough volumes of the three herbicides were calculated and the loading capacity of the sorbents was compared. Recoveries higher than 80% for difenzoquat and around 40% for paraquat and diquat were obtained when a sample volume of 250 ml was percolated. For the stacking–capillary electrophoresis analysis of quats, 50 mM acetic acid–ammonium acetate (pH 4.0), 0.8 mM cetyltrimethylammonium bromide with 5% (v/v) methanol as carrier electrolyte was used. Detection limits, based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were lower than $0.3 \mu\text{g l}^{-1}$ for standards in Milli-Q water, and lower than $2.2 \mu\text{g l}^{-1}$ for drinking water samples. Run-to-run and day-to-day precision of the method were established. The two preconcentration procedures used together was successfully applied to the analysis of the three herbicides in spiked drinking water at concentrations below the maximum admissible US Environmental Protection Agency levels. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Sample stacking; Water analysis; Quaternary ammonium compounds; Pesticides

1. Introduction

Quaternary ammonium compounds form a group of herbicides commonly known as “quats”, which

are widely used in agriculture to boost productivity. Paraquat (PQ) and diquat (DQ) are used as non-selective contact herbicides for crop desiccation, pasture renovation, crop production with limited or no tillage and selective weed control. Difenzoquat (DF) is a selective herbicide used for post-emergence control of wild oats in cereal crops [1]. Quats are included in a European Union priority list of potentially dangerous herbicides in the Mediterranean countries, given their widespread use in this area [2]. The US Environmental Protection Agency (EPA) has included paraquat and diquat in a priority

[☆]Presented at the 30th Scientific Meeting of the Spanish Group of Chromatography and Related Techniques/1st Meeting of the Spanish Society of Chromatography and Related Techniques, Valencia, 18–20 April, 2001.

*Corresponding author. Tel.: +34-93-402-1100; fax: +34-93-402-1233.

E-mail address: galceran@apolo.qui.ub.es (M.T. Galceran).

list of hazardous chemicals [3] and has established a maximum contamination level of $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for DQ and a goal of $3 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ [4,5] in drinking water.

These herbicides are polar, easily soluble in water and have low volatility. Because of these properties, they are usually determined by ion-pair high-performance liquid chromatography (HPLC) with direct UV detection [6–8]. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) has also been used to analyse these compounds [9,10] in order to improve both selectivity and sensitivity. Due to the cationic character of the herbicides, capillary electrophoresis (CE) has also proved to be a promising alternative for their separation and/or analysis. Quats have been determined by CE in water [7,11–13] and other matrices such as serum, soil and urine [14,15] when using UV detection. For greater selectivity, CE together with mass spectrometry (CE–MS) has also been used to analyse quats in water samples [16–18]. However, CE has a less-than-desirable sensitivity based on concentration, as compared to HPLC. The concentration sensitivity problem comes from two sources, namely the low sample injection volume and the short optical path-length for on-capillary detection. So, to comply with the maximum legally permitted levels of quats in drinking water [5], enrichment procedures prior to determination have to be used.

Different techniques for on-column preconcentration of quaternary ammonium herbicides have been reported. Isotachophoresis (ITP), a discontinuous electrophoresis process, has been used as an on-line sample pre-treatment together with CE for the analysis of PQ and DQ in water [19]. Several techniques for on-column preconcentration in CE, known as sample stacking procedures, in which the concentration effect is based on the sudden change in analyte electrophoretic velocity brought about by the difference in the magnitude of the electric field, have been reported [20–23]. In a previous study [24] we used one of these stacking procedures to analyse quats in drinking water. This procedure involves field polarity reversal after the capillary has been filled with a large volume of sample of lower conductivity than is used for CE separation. Nevertheless, this method is only appropriate for the analysis of these compounds in highly contaminated

water samples. Limits of detection (LODs) are between 18 and $154 \mu\text{g l}^{-1}$ [24], so other preconcentration methods are needed.

Solid-phase extraction (SPE) has often been recommended for the isolation and concentration of quaternary ammonium herbicides [25]. Cation-exchange resins have been proposed to concentrate paraquat and diquat in drinking waters [26–28] and silica has also been extensively used for the isolation and preconcentration of quats in different matrices such as water [8,10,29–31], urine [32,33] and foods [32,33]. Non-polar phases such as C_8 and C_{18} [34,35] after addition of an ion pair reagent for the concentration of these compounds in water have also been reported.

Recently, the use of graphitic carbons for the SPE of organic compounds from liquid natural matrices or extracts has been proposed [36]. The surface characteristics of porous graphitic carbons are responsible for various types of interactions (hydrophobic, electronic and ion-exchange) with analytes. These sorbents have also been used for the isolation and concentration of quats in water [31,37].

In this study, conditions for the extraction and preconcentration of PQ, DQ and DF from water using different porous graphitic carbons (PGCs) as adsorbent materials, previous to CE analysis using sample stacking with matrix removal, are established. Quality parameters were obtained and the combination of SPE and sample stacking was applied to the analysis of tap and mineral water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Methanol and acetonitrile (both HPLC-gradient grade), acetic acid (100%), sodium hydroxide, hydrochloric acid (25%) and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) were obtained from Merck (Darmstadt, Germany); trifluoroacetic acid (TFA) from Sigma (St. Louis, MO, USA); and ammonium acetate from Fluka (Buchs, Switzerland). Water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

The herbicides studied, which are shown in Fig. 1, were paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium ion)

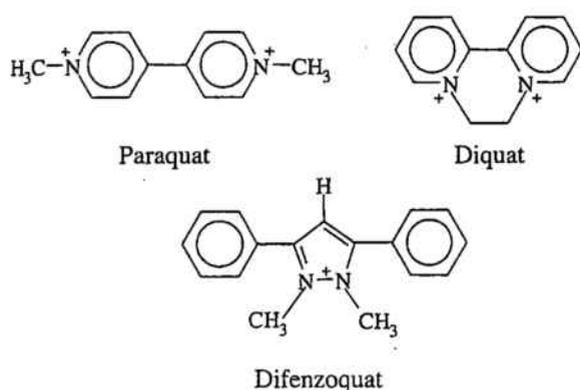


Fig. 1. Quaternary ammonium herbicide structures.

purchased from Sigma, and diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridylium ion) and difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium ion) obtained from Chemservice (West Chester, PA, USA).

Stock standard solutions of individual quats (1 mg ml^{-1}) were prepared in Milli-Q water and stored in plastic vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by dilution with 0.8 mM CTAB aqueous solution, and were filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ nylon filter. Buffers were prepared from an aqueous solution of 400 mM acetic acid and pH 4.0 was obtained by adding ammonium acetate (400 mM). This buffer was diluted with Milli-Q water to 50 mM after the addition of CTAB and methanol to obtain the final carrier electrolyte.

Two PGC cartridges were used. Hypersep Hypercarb SPE cartridges (200 mg , 3 ml) were purchased from ThermoQuest (ThermoHypersil, Cheshire, UK) and Supelclean Envi-Carb SPE cartridges (250 mg , 3 ml) from Supelco (Bellefonte, PA, USA).

2.2. Capillary electrophoresis conditions

A Beckman (Fullerton, CA, USA) P/ACE System 5500 CE instrument with diode array detection was used. This system was modified to control the removal of electrode polarity. Electrophoretic data were processed using the P/ACE Station software version 1.0. An uncoated fused-silica capillary (Supelco) of 57 cm (50 cm effective length) $\times 50 \text{ }\mu\text{m}$ I.D. was used. The temperature was held at $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Samples were loaded by pressure injection at 140

kPa and for 0.25 min . For sample matrix removal, $+20 \text{ kV}$ were applied and then the separation was performed by reversing the polarity at the same potential. Direct detection was performed at two wavelengths, 220 nm for DQ and 255 nm for PQ and DF. Electrophoretic separation was carried out using an acetic acid–ammonium acetate 50 mM buffer solution at pH 4.0 containing 5% methanol and 0.8 mM CTAB. Methanol was added in order to improve resolution between PQ and DQ while CTAB was added as wall capillary modifier to reverse the electroosmotic flow (EOF) allowing the application of the sample stacking with matrix removal procedure to the analysis of cationic compounds [24]. Carrier electrolyte was filtered through a $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ membrane filter and degassed before use.

2.3. Capillary conditioning

New capillaries were pre-treated with 0.1 M hydrochloric acid for 15 min , ultrapure water for 15 min , 1 M sodium hydroxide for 30 min , and finally rinsed with ultrapure water for 30 min . At the beginning of each session, the capillary was treated with 1 M sodium hydroxide for 15 min , then rinsed with ultrapure water for 15 min and, finally, with the carrier electrolyte for 60 min . The capillary was rinsed with the carrier electrolyte for 2 min before each run.

2.4. Sample treatment

Tap water and mineral water samples spiked with PQ, DQ and DF were treated using PGC cartridges (HyperSep Hypercarb and Supelclean Envi-Carb), following the procedure described by Carneiro et al. [31]. The cartridges were washed with 2 ml of MeOH, 2 ml of MeOH–water (1:1), 2 ml of water and finally with 2 ml of water at pH 9.0. Samples of 250 ml at concentration levels between 1.0 and $20 \text{ }\mu\text{g l}^{-1}$ and adjusted to pH 9.0 with 1 M sodium hydroxide immediately before use were passed through the cartridges at a flow-rate of $2\text{--}3 \text{ ml min}^{-1}$ using a Visiprep System (Supelco). The cartridge was dried with air and quats were eluted with 2 ml of acetonitrile–TFA (80:20, v/v) and the eluate was evaporated to dryness with N_2 . Subsequent evapora-

tion steps after the addition of 0.5 ml of acetonitrile were performed to remove the TFA completely. Finally, the extract was re-dissolved in the appropriate amount (1–5 ml) of 0.8 mM CTAB solution.

2.5. Stacking procedure

The stacking procedure was developed in a previous study [24]. Briefly, the silica capillary was filled with the carrier electrolyte and then a long plug of sample was introduced under hydrodynamic pressure (140 kPa) for 0.25 min. A high voltage (+20 kV) was then applied and the sample matrix was removed from the capillary. After sample injection, the current decreased due to the high resistivity caused by the lower conductivity, but rose again when the sample matrix was removed from the capillary. The voltage was turned off and the polarity was switched to the separation configuration when the current was 95% of the original carrier electrolyte value.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary study

A preliminary study was carried out using 250 ml of Milli-Q water spiked with PQ, DQ and DF at $0.8 \mu\text{g l}^{-1}$, and using the Hypersep Hypercarb PGC cartridges. After the SPE preconcentration the sample was eluted with 2 ml of acetonitrile–TFA (80:20, v/v), evaporated to dryness with N_2 , reconstituted with 1 ml of 0.8 mM CTAB aqueous solution, and directly injected into the capillary electrophoresis system using the stacking procedure. Fig. 2a shows the electropherogram obtained at two wavelengths, 220 and 255 nm. The presence of TFA in the reconstituted sample affected the electrophoretic separation when the stacking procedure was applied. When the TFA was not totally removed DF showed a double peak, probably due to the coexistence of both DF and the TFA–DF ion-pair under non-equilibrium conditions. Splitting of the peaks was

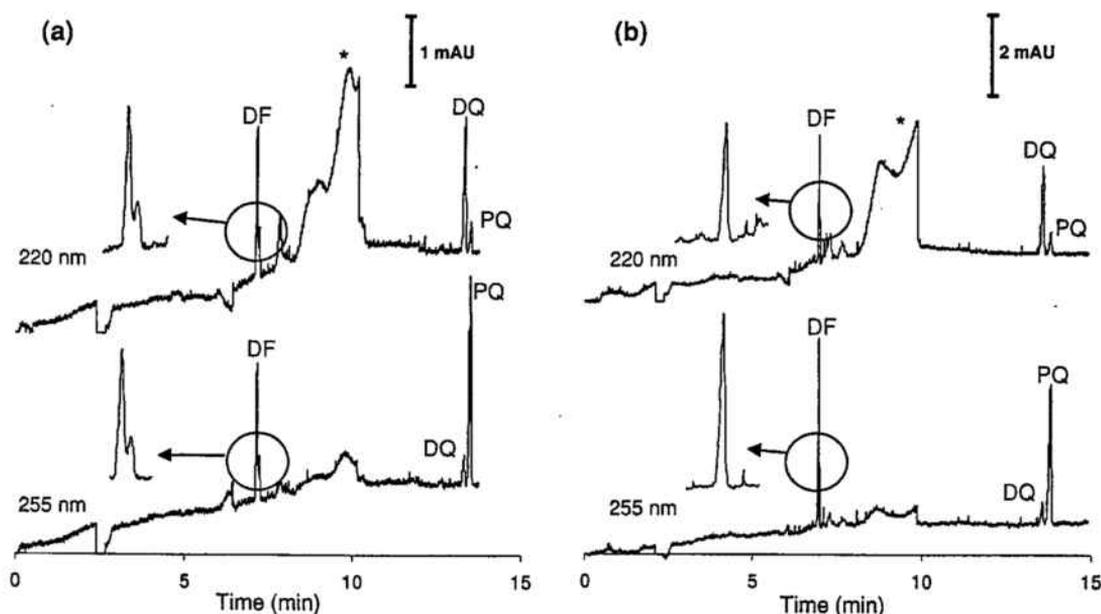


Fig. 2. Effect of TFA on the electrophoretic separation of quats. Electropherograms of 250 ml Milli-Q water spiked with quats at a concentration of $0.8 \mu\text{g l}^{-1}$. (a) After the SPE preconcentration step. (b) Same as (a) after the complete removal of TFA. *, system peak. Electrophoretic conditions: carrier electrolyte, acetic acid–ammonium acetate 50 mM (pH 4.0), 0.8 mM CTAB/5% methanol; injection time, 0.25 min at 140 kPa; voltage during sample matrix removal, +20 kV; separation voltage, –20 kV.

not observed for PQ and DQ, because their migration times were too high for their equilibrium to be reached. In order to remove the TFA completely, small volumes of acetonitrile (0.5 ml, five times) were added to the extract, which was consecutively evaporated to dryness. When the TFA was totally removed, the double peak for DF disappeared (Fig. 2b).

3.2. Breakthrough volume

For off-line SPE preconcentration two different porous graphitic sorbents (PGC), Hypersep Hypercarb and Supelclean Envi-Carb, were tested. In SPE the breakthrough volume is an important feature to take into account since it determines the detection limit that can be reached. For determining the breakthrough and the recoveries, the method described by Hennion et al. [38] was applied. Only Milli-Q water was used to study breakthrough, since several authors have reported [39,40] that breakthrough volumes using different types of water do not show significant variations. Milli-Q water was spiked with quats at various concentration levels with the sample amount kept constant (200 ng). Therefore, the sample volume was increased (2–500 ml) and the concentration of quats was decreased ($100\text{--}0.4\ \mu\text{g l}^{-1}$). Sample volumes higher than 500 ml were not studied because the total analysis time would have been too long. After preconcentration, samples were injected into the CE system using the stacking procedure and peak areas were measured and the recoveries were calculated by comparing the peak areas with those of a control sample ($200\ \mu\text{g l}^{-1}$) representing 100% recovery.

Fig. 3 shows the breakthrough curves obtained for the quats using both PGC sorbents. While both cartridges gave high and practically constant recoveries (up to 400 ml) for DF, PQ and DQ behaved differently. A considerable decrease in the recovery values of these two compounds was observed at small volumes, although, for the HyperSep Hypercarb cartridge, higher recoveries were obtained from 50 to 250 ml (e.g. for DQ, 37% against 15% for 50 ml). For this reason a volume of 250 ml and HyperSep HyperCarb as sorbent were chosen for the off-line SPE preconcentration. The recoveries were 80, 40 and 30% for DF, PQ and DQ, respectively.

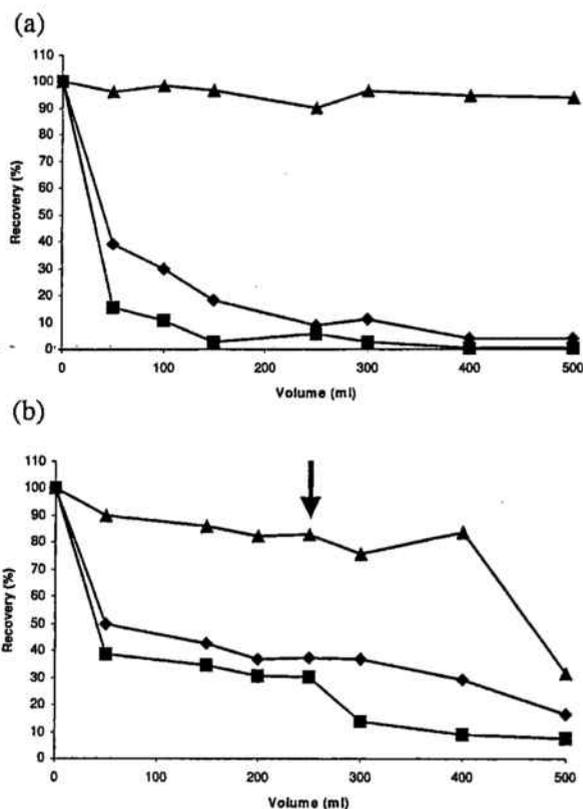


Fig. 3. Effect of sample volume on the recoveries of PQ, DQ and DF for both PGC sorbents. (a) Supelclean Envi-Carb cartridges; (b) HyperSep Hypercarb cartridges. ♦, PQ; ■, DQ; ▲, DF. Electrophoretic conditions as in Fig. 2.

3.3. Quality parameters with Milli-Q water

The limits of detection, linearity, run-to-run and day-to-day precision were obtained for quats using the method proposed. The results are summarised in Table 1. The LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 and expressed as micrograms per liter of quaternary ammonium ion, were determined after preconcentration of 250 ml Milli-Q water spiked at low concentrations of quats. DF showed the lower LOD, $0.08\ \mu\text{g l}^{-1}$, while the figures for PQ and DQ were higher, 0.3 and $0.1\ \mu\text{g l}^{-1}$, respectively. These LODs are 35–185 times lower than those found in the earlier study using only sample stacking with matrix removal [24] and 10 times lower than those

Table 1
Quality parameters of the method (Milli-Q water)

Parameter	PQ ^a	DQ ^b	DF ^a
LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.1	0.3	0.08
LOD Sample stacking ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^c	10	11	15
<i>Concentration (spiked level 5 $\mu\text{g l}^{-1}$)</i>			
Run-to-run reproducibility, RSD (%) ($n=6$)	7.6	7.3	6.3
Day-to-day reproducibility, RSD (%) ($n=2 \times 3$)	12.3	11.7	11.6
<i>Linearity (0.7–24.5 $\mu\text{g l}^{-1}$)</i>			
Correlation coefficients	0.990	0.996	0.991

^a λ : 255 nm.

^b λ : 220 nm.

^c Ref. [24].

published by Carneiro et al. [31] using off-line SPE and CE–UV. The LODs achieved are 8–200 times better than those obtained by electrokinetic injection and CE–MS using a quadrupole as analyser [16] and much lower than those with a time-of-flight [18].

Linearity was studied by preconcentrating through a HyperSep Hypercarb cartridge 250 ml of Milli-Q water spiked with quats at concentrations ranging from 0.7 to 24.5 $\mu\text{g l}^{-1}$. Calibration graphs were drawn and the calibration gave satisfactory correlation coefficients ($r^2 > 0.99$) for all the compounds.

For run-to-run precision, six replicas of 250 ml of Milli-Q water spiked at 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ were determined. The relative standard deviations (RSDs) based on concentration ranged from 6.3 to 7.6%. For day-to-day precision, a total of six replicas of 250 ml of Milli-Q water spiked at 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ were determined on 3 different days (two replicates each day). The RSDs based on concentration were lower than 12.3%. These values are good and similar to those obtained when only sample stacking with matrix removal was used: thus, off-line SPE did not introduce any great variation into the analysis.

3.4. Application

To show how the method can be applied to the analysis of real samples, tap water from Barcelona and mineral water were analysed with the proposed method. The water samples were spiked at 5 $\mu\text{g l}^{-1}$ with quats; 250 ml were preconcentrated using

HyperSep Hypercarb cartridges; and the extracts were reconstituted in 1 ml of 0.8 mM CTAB solution. When these water samples underwent the stacking procedure, the capillary current was higher than for Milli-Q water due to these samples' higher salinity. As the stacking method requires a considerable difference between the sample and the carrier electrolyte conductivity, higher volumes of 0.8 mM CTAB solution had to be used to re-dissolve the extract. Fig. 4 shows the electropherograms obtained at 220 and 255 nm after the preconcentration of 250 ml of tap water spiked with PQ, DQ and DF (5 $\mu\text{g l}^{-1}$), when the sample was reconstituted with different volumes of 0.8 mM CTAB solution. When the sample was reconstituted using 1 ml of the CTAB solution (Fig. 4a), poor resolution between PQ and DQ was obtained and DF did not appear in the electropherogram. PQ/DQ resolution improved and DF was detected when a higher volume (5 ml) of CTAB was used (Fig. 4c). The dilution depends on the sample: for instance, a mineral water with lower salinity than Barcelona tap water only needed 2 ml of CTAB for the reconstitution of the SPE extract.

The limits of detection for real samples after a preconcentration step are always higher than those for standard solutions in Milli-Q water. Moreover, in the stacking technique the salinity of the sample must be taken into account because higher detection limits are obtained for samples with high salinity content. By using the combination of both preconcentration methods, off-line SPE and sample stacking, the limits of detection for quats in Barcelona tap water and mineral water samples were estimated. The LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 are listed in Table 2. These were two to four times higher than the figures for Milli-Q water due to the salinity of the samples. Nevertheless, the figures are below the maximum admissible levels established by the EPA for PQ and DQ.

The method proposed was used to quantify tap water and mineral water samples spiked with quats at two concentration levels, the EPA level and a concentration below this figure (see Table 2). The recoveries for drinking water samples were similar to those for spiked Milli-Q water. Quantification was performed by external calibration using Milli-Q water spiked samples, with three replicas determined for each sample and spiked level. The results in

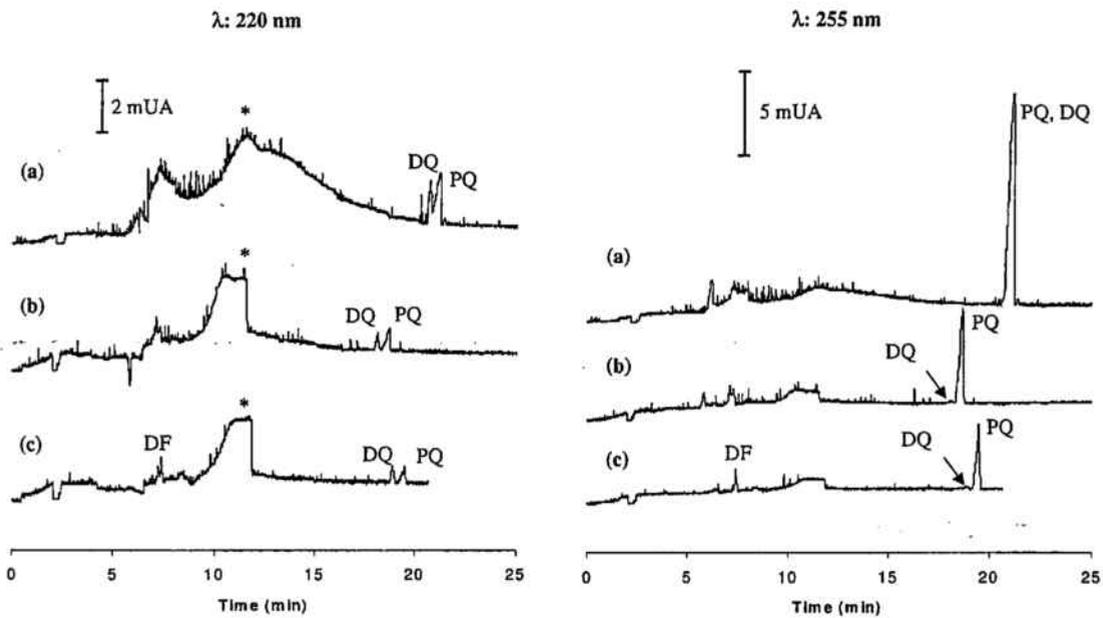


Fig. 4. Electropherograms of 250 ml tap water spiked at $5 \mu\text{g l}^{-1}$ with PQ, DQ and DF. After the off-line SPE preconcentration step, the sample was reconstituted with (a) 1 ml CTAB 0.8 mM, (b) 3 ml CTAB 0.8 mM and (c) 5 ml CTAB 0.8 mM. *, system peak. Electrophoretic conditions as in Fig. 2.

terms of concentration and standard deviations are given in Table 2. As we can see, good accuracy and precision were obtained.

4. Conclusions

The results of this study showed that the combination of solid-phase extraction with PGC cartridges and on-column sample stacking–capillary electro-

phoresis can be used to determine paraquat, diquat and difenzoquat in water samples. The highest recoveries were obtained using HyperSep HyperCarb cartridges but residues of TFA must be thoroughly eliminated to prevent peak splitting in the electropherogram. Detection limits, between 0.2 and $2.2 \mu\text{g l}^{-1}$, were obtained, allowing the analysis of these compounds in drinking water samples at the levels established by the US Environmental Protection Agency.

Table 2
Water sample analysis

Quat	LOD ($\mu\text{g l}^{-1}$)		Analysis at two spiked levels ($n=3$)					
	Tap water	Mineral water	Spiked level ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Tap water	Mineral water	Spiked level ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Tap water	Mineral water
PQ ^a	0.4	0.2	3.5^c	3.2 ± 0.3	3.5 ± 0.2	1.2^d	1.2 ± 0.2	1.3 ± 0.3
DQ ^b	2.2	1.8	20.3^c	20.5 ± 0.9	20.1 ± 0.4	5.8^d	5.3 ± 0.6	5.6 ± 0.2
DF ^a	1.1	0.4	5.7	5.2 ± 0.6	5.3 ± 0.4	2.7	2.8 ± 0.2	2.5 ± 0.2

^a λ : 255 nm.

^b λ : 220 nm.

^c EPA level.

^d Below EPA level.

Acknowledgements

This study was supported by the Comissionat per Universitats i Recerca of the Generalitat de Catalunya (1999SGR-00049). O. Núñez thanks the Generalitat de Catalunya for a grant (FI/FIAP).

References

- [1] The Pesticide Manual: A World Compendium Incorporating The Agrochemical Handbook, British Crop Protection Council and Royal Society of Chemistry, Bath, 10th ed., 1994.
- [2] D. Barceló, Environmental Analysis—Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [3] Title III List of Lists: Consolidated List of Chemicals Subject to the Emergency Planning and Community Right-to-Know Act (EPCRA) and Section 112(r) of the Clean Air Act, EPA 550-B-98-017, US Environmental Protection Agency, 1998.
- [4] Drinking Water Health Advisory: Pesticides, US Environmental Protection Agency, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [5] Code of Federal Regulations. Title 40, Part 141, US Government Printing Office, Rev. July 1, 1997.
- [6] B.L. Worobey, J. AOAC Int. 76 (1993) 881.
- [7] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 669 (1994) 217.
- [8] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatogr. A 728 (1996) 325.
- [9] V.Y. Taguchi, S.W.D. Jenkins, P.W. Crozier, D.T. Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 830.
- [10] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 830 (1999) 145.
- [11] J.Y. Cai, Z. Elrassi, J. Liq. Chromatogr. 15 (1992) 1193.
- [12] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, L. Puignou, Chromatographia 39 (1994) 581.
- [13] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Diez, L. Puignou, J. Chromatogr. A 782 (1997) 289.
- [14] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, V. Tomás, Chromatographia 43 (1996) 468.
- [15] M. Tomita, T. Okuyama, Y. Nigo, Biomed. Chromatogr. 6 (1992) 91.
- [16] E. Moyano, D.E. Games, M.T. Galceran, Rapid Commun. Mass Spectrom. 10 (1996) 1379.
- [17] D. Wycherley, M.E. Rose, K. Giles, T.M. Hutton, D.A. Rimmer, J. Chromatogr. A 734 (1996) 339.
- [18] I.M. Lazar, M.L. Lee, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 117.
- [19] D. Kaniansky, F. Ivanyi, F.I. Onuska, Anal. Chem. 66 (1994) 1817.
- [20] J.P. Quirino, S. Terabe, J. Chromatogr. A 902 (2000) 119.
- [21] Z.K. Shihabi, J. Chromatogr. A 902 (2000) 107.
- [22] R.L. Chien, D.S. Burgi, Anal. Chem. 64 (1992) 1046.
- [23] C. Schwer, LC–GC Int. 6 (1993) 630.
- [24] O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 912 (2001) 353.
- [25] Y. Picó, G. Font, J.C. Molto, J. Mañes, J. Chromatogr. A 885 (2000) 251.
- [26] M. Agudo, A. Rios, M. Valcarcel, Anal. Chim. Acta 281 (1993) 103.
- [27] I. Kambhampati, K.S. Roinestad, T.G. Hartman, J.D. Rosen, E.K. Fukuda, R.L. Lippincott, R.T. Rosen, J. Chromatogr. A 688 (1994) 67.
- [28] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, R. Casajus, Analyst 119 (1994) 1557.
- [29] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatogr. A 823 (1998) 137.
- [30] M. Fernández, M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, Arch. Environ. Contam. Toxicol. 35 (1998) 377.
- [31] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, Anal. Chim. Acta 408 (2000) 263.
- [32] M.K. Rai, J.V. Das, V.K. Gupta, Talanta 45 (1997) 343.
- [33] R. Kesari, M. Rai, V.K. Gupta, J. AOAC Int. 80 (1997) 388.
- [34] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 869 (2000) 441.
- [35] I. Ahmad, Anal. Lett. 15 (1982) 27.
- [36] M.C. Hennion, J. Chromatogr. A 885 (2000) 73.
- [37] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, Chromatographia 45 (1997) 402.
- [38] M.C. Hennion, P. Subra, R. Rosset, J. Lamacq, P. Scribe, A. Saliot, Int. J. Environ. Anal. Chem. 42 (1990) 15.
- [39] E.R. Brouwer, I. Liska, R.B. Geerdink, P.C.M. Frintrop, W.H. Mulder, H. Lingeman, U.A.Th. Brinkman, Chromatographia 32 (1991) 445.
- [40] V. Pichon, M.C. Hennion, J. Chromatogr. A 665 (1994) 269.

2.2.2.5. Cromatografía electrocinética micelar. Aplicación de los métodos de preconcentración *on-line* de sweeping-MEKC y CSEI-sweeping-MEKC

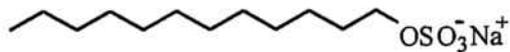
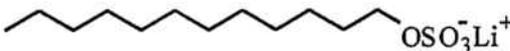
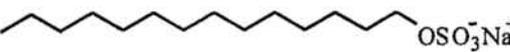
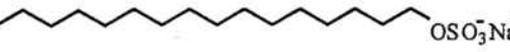
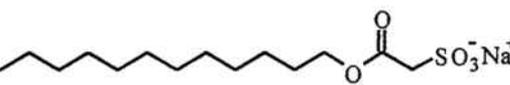
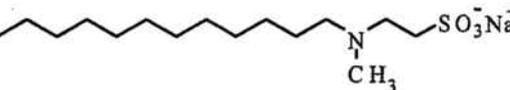
La cromatografía electrocinética micelar (MEKC) es una modalidad de electroforesis capilar introducida por S. Terabe (Terabe *et al.*, 1984) que puede considerarse una variante de la electrocromatografía. En esta variante, la fase estacionaria fija en el interior del capilar se sustituye por una disolución micelar y la separación tiene lugar como consecuencia de las diferentes interacciones que se establecen entre los analitos y las micelas. Tal como se ha indicado en la introducción de este capítulo, los métodos de preconcentración *on-line* basados en el fenómeno de *sweeping* son adecuados para su utilización cuando se lleva a cabo un análisis por MEKC. La evaluación de las posibilidades reales de la aplicación de estas técnicas al análisis de compuestos catiónicos nos llevó a estudiar y desarrollar un método basado en la combinación del *sweeping* con la separación por MEKC para la determinación de los cuats en muestras de agua.

En el momento de iniciar estos estudios no existía ninguna publicación que hiciera referencia al análisis de herbicidas catiónicos utilizando MEKC, por lo que en una primera fase fue necesario optimizar la separación de los herbicidas. El estudio se realizó utilizando electroforesis capilar con detección UV-visible y, por lo tanto, se utilizaron tan solo los herbicidas PQ, DQ y DF, así como los dos patrones internos EV y HV. Además, se comparó el uso de diferentes tensioactivos aniónicos como formadores de micelas. Los tensioactivos aniónicos estudiados, así como su estructura y el acrónimo utilizado, se indican en la Tabla 2.3. Como podemos observar, todos ellos presentan una cadena hidrocarbonada larga unida a un grupo funcional con carga negativa. Los dos primeros, SDS y LDS, se diferencian tan solo en el contraión (sodio y litio, respectivamente), lo que nos permitirá evaluar si éste tiene algún efecto en la separación. También nos propusimos comparar el posible efecto de la longitud de la cadena hidrocarbonada (SDS, SMS y SCS con 12, 14 y 16 átomos de carbono, respectivamente) así como la presencia de diversos grupos funcionales próximos a la carga negativa (LSA, LMT y LBS, con grupos acetato, N-metilaurato y benzeno, respectivamente). Estos tensioactivos presentan concentraciones micelares críticas del orden de 3,8 mM (LSA), 8,6 mM (SDS) y 8,7 mM (LMT) en agua destilada a una temperatura de 40 °C (Takeda *et al.*, 1998).

Un parámetro importante en la MEKC es el factor de retención (k) que se define como la relación del número de moles de soluto entre la fase pseudoestacionaria y la fase acuosa (Terabe *et al.*, 1984). Este factor está directamente relacionado con la afinidad del soluto por la fase pseudoestacionaria. En teoría, los analitos que presentan un factor de

retención elevado experimentaran un excepcional incremento de la respuesta al aplicar los métodos de preconcentración basados en el fenómeno de *sweeping*.

Tabla 2.3. Estructura de los tensioactivos aniónicos utilizados en MEKC

Nombre	Acrónimo	Estructura
Sodium dodecyl sulfate	SDS	
Litium dodecyl sulfate	LDS	
Sodium myristyl sulfate	SMS	
Sodium cetyl sulfate	SCS	
Sodium laurylsulfoacetate	LSA	
Sodium N-lauryl-N-methyltaurate	LMT	
Sodium laurylbenzenesulfonate	LBS	

El factor de retención (k) en MEKC para sustancias iónicas se puede definir como:

$$k = \frac{\mu(a) - \mu_{ep}(a)}{\mu_{ep}(mc) - \mu(a)} \quad (2.1)$$

donde $\mu(a)$ es la movilidad electroforética de la especie "a" en el sistema MEKC, $\mu_{ep}(a)$ es la movilidad electroforética de la especie "a" en un sistema de separación de electroforesis capilar de zona (CZE) convencional y $\mu_{ep}(mc)$ es la movilidad electroforética de las micelas en el sistema MEKC. Por lo tanto, para poder evaluar los factores de capacidad o retención de los cuats con los diferentes tensioactivos, se realizaron dos separaciones electroforéticas, una en el sistema MEKC y otra en un sistema de CZE donde se utiliza el mismo tampón electroforético pero sin la presencia de micelas. Como marcador de la

micela se utilizó el bromuro de timentidio (*3-di(2-thienyl)methylene-5-methoxy-1,1-dimethylpiperidinium bromide*).

Los factores de retención obtenidos permitían comparar la adecuación de los diferentes tensioactivos aniónicos para el análisis de los cuats mediante MEKC. También se tuvo en cuenta la estabilidad de la línea de base en la separación electroforética.

En la Figura 2.10 se presenta un diagrama de barras donde se comparan los factores de capacidad obtenidos para cada herbicida con los diferentes tensioactivos aniónicos utilizados y en la Figura 2.11 se muestran los electroferogramas obtenidos, a 220 y 255 nm, para la separación de los cuats en MEKC utilizando los diferentes tensioactivos aniónicos. En todos los casos el tampón electroforético fue una disolución 80 mM de tensioactivo preparada en un tampón de fosfato de sodio/dihidrogenofosfato de sodio 50 mM (pH 2,5) con un 20 % de acetonitrilo.

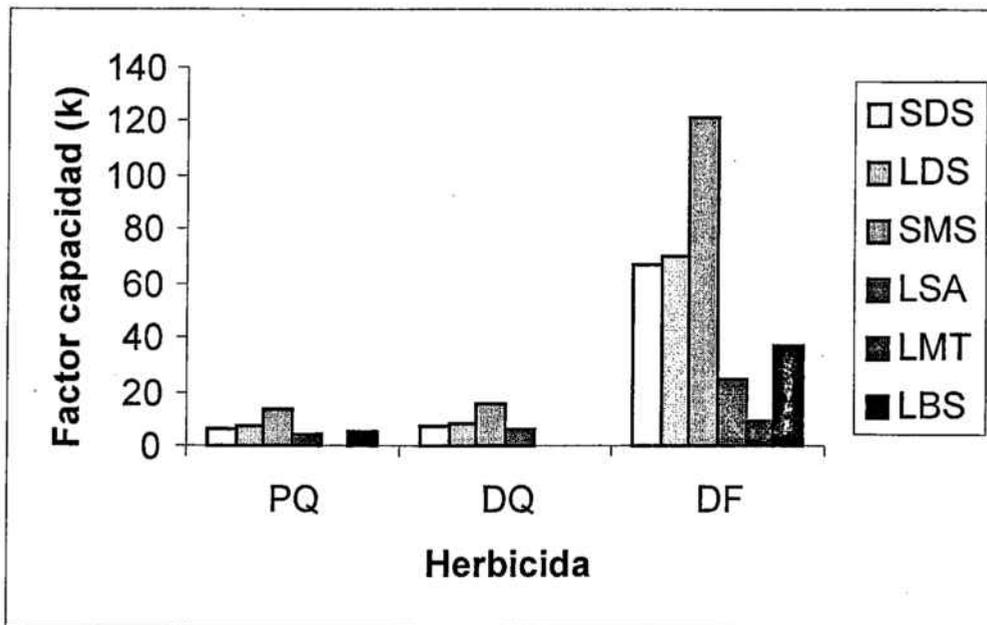


Figura 2.10. Factores de capacidad o retención (k) para los herbicidas PQ, DQ y DF con los diferentes tensioactivos aniónicos.

Como puede observarse en diagrama de barras, el DF es el herbicida que presenta en todos los casos los mayores valores de k , lo que indica que este compuesto debería dar los mayores incrementos en la respuesta al aplicar los métodos de preconcentración basados en el fenómeno de *sweeping*. Los factores de capacidad obtenidos con el SDS y el LDS son del mismo orden y la línea de base obtenida en los electroferogramas es también similar (Figuras 2.11 a y b). La única diferencia entre estos dos tensioactivos es el

contraión (sodio en el caso del SDS y litio para el LDS) y su comportamiento nos puede indicar el efecto de los cationes en la separación. Para poder evaluar de manera correcta el efecto del contraión en la separación, cuando se estudió el tensioactivo LDS el tampón electroforético se preparó a partir de dihidrogenofosfato de litio en lugar de dihidrogenofosfato de sodio. Como puede observarse en la Figura 2.11 a y b, los picos obtenidos con SDS presentan menos cola que los obtenidos con LDS. Este hecho podría ser debido a que el sodio se adsorbe sobre la pared del capilar en mayor proporción que el litio, disminuyendo la interacción de los cuats con la pared y obteniéndose picos con menos colas (Galceran *et al.*, 1994). En consecuencia, se recomienda el uso de tampones y tensioactivos con sodio como contraión.

El efecto que el incremento de la cadena hidrocarbonada del tensioactivo puede tener en la separación se evaluó mediante la comparación del SDS (cadena de 12 átomos de carbono), el SMS (cadena de 14 átomos de carbono). También se intentó utilizar el SCS (*sodium cetyl sulfate*, cadena de 16 átomos de carbono) aunque no se pudo obtener ningún resultado dado que este último tensioactivo no era soluble en las condiciones de trabajo. De la comparación de los otros dos tensioactivos, SDS y SMS, se desprende que el segundo permite obtener mayores k para los herbicidas (Figura 2.10). Sin embargo, la resolución entre los picos en la separación electroforética empeora con el SMS cuando se trabaja utilizando el mismo tampón electroforético (Figura 2.11 c). Para mejorar la separación con SMS sería necesario incrementar el contenido en disolvente orgánico del tampón micelar, lo que daría lugar a tiempos de migración mayores. Además, elevados contenidos de disolvente orgánico llevarían a condiciones de inestabilidad en la formación de las micelas. De estos ensayos se deduce que el SDS puede considerarse la mejor opción ya que, con una cadena hidrocarbonada más corta, proporciona buenos resultados sin necesidad de añadir elevados contenidos de disolvente orgánico.

Para estudiar el efecto que el grupo aniónico del tensioactivo puede tener en la separación se compararon tensioactivos con la misma cadena hidrocarbonada (de 12 átomos de carbono) y diferente grupo aniónico (el SDS, LSA, LMT y LBS). Tanto el LMT como el LBS (Figuras 2.11 e y f) dieron lugar a una mala separación, presentando electroferogramas con líneas de base muy irregulares a 220 nm y con un nivel elevado de ruido de fondo. Además no fue posible detectar ni el PQ ni el DQ. Las mejores separaciones se obtuvieron con el SDS y el LSA (Figuras 2.11 a y d). No obstante, se obtuvo una mayor respuesta para el DQ, a ambas longitudes de onda, utilizando el SDS. Además, los factores de retención de los herbicidas fueron mayores con SDS que con LSA (Figura 2.10).

Como conclusión de este estudio preliminar se puede indicar que de entre los seis tensioactivos aniónicos comparados, el tensioactivo SDS es el que proporciona los mejores

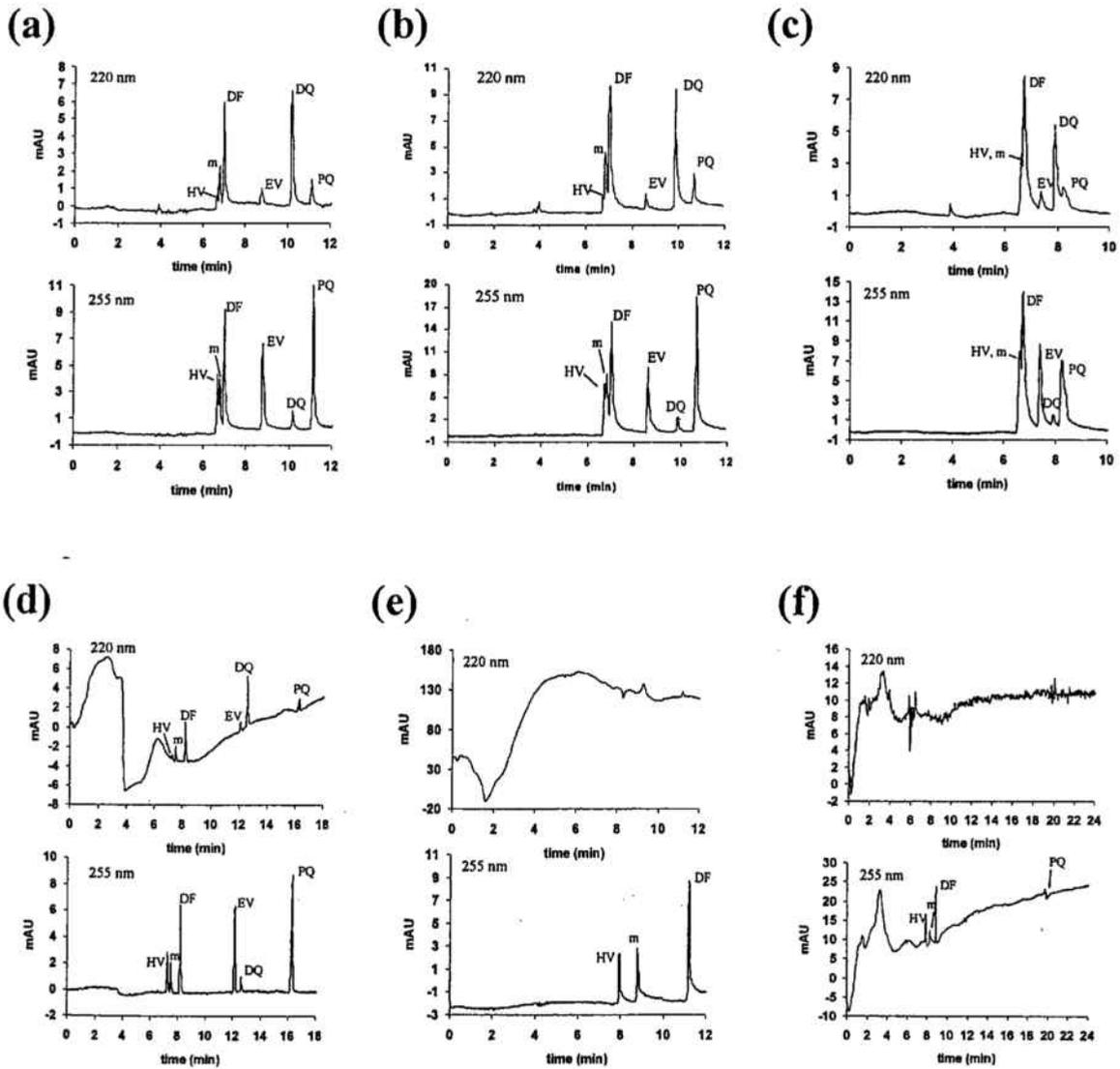


Figura 2.11. Separación de los cuats con MEKC utilizando diferentes tensioactivos aniónicos. Muestra: 100 mg l^{-1} de cada compuesto preparada en el correspondiente tampón micelar. Inyección hidrodinámica de 1 s, separación a -22 kV . Tensioactivos: (a) SDS, (b) LDS, (c) SMS, (d) LSA, (e) LMT y (f) LBS. m: marcador de micela (Bromuro de timepidio). Tampón electroforético: ácido fosfórico/dihidrogenofosfato de sodio 50 mM (pH 2,5), salvo en (b) donde se usó didihidrogenofosfato de litio, con un 20 % de acetonitrilo. Concentración de los tensioactivos, 80 mM .

resultados, proporcionando tanto una buena separación entre los diferentes compuestos como unos factores de retención (k) adecuados que permitirán obtener buenos factores de preconcentración al aplicar el método de preconcentración *on-line* de *sweeping*.

Una vez seleccionado el tensioactivo aniónico que se utilizará en este trabajo, se procedió a estudiar la separación de los cuats por MEKC adicionando diferentes disolventes orgánicos al tampón electroforético micelar para mejorar la separación y se calcularon los parámetros de calidad del método propuesto. A continuación se procedió al desarrollo de los métodos de preconcentración *on-line* de *sweeping*-MEKC y CSEI-*sweeping*-MEKC para la determinación de los herbicidas catiónicos en aguas de bebida. Este estudio, que engloba la optimización de algunos parámetros críticos, la determinación de los parámetros de calidad de ambos métodos de preconcentración y, finalmente, su aplicación al análisis de los tres herbicidas en muestras de agua de bebida se incluye en el siguiente apartado (Artículo III).

2.2.2.6. Artículo III

Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection

O. Núñez, J.B. Kim, E. Moyano, M.T. Galceran y S. Terabe

Journal of Chromatography A, 961 (2002) 65-75.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 961 (2002) 65–75

 JOURNAL OF
 CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Analysis of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat in drinking water by micellar electrokinetic chromatography using sweeping and cation selective exhaustive injection

Oscar Núñez^{a,b,*}, Jong-Bok Kim^a, Encarnación Moyano^b, Maria Teresa Galceran^b, Shigeru Terabe^a

^aFaculty of Science, Himeji Institute of Technology, Kamigori, Hyogo 678-1297, Japan

^bDepartament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain

Abstract

Optimum conditions for the determination of the herbicides paraquat, diquat and difenzoquat by micellar electrokinetic chromatography (MEKC) using sweeping and cation-selective exhaustive injection (CSEI) as on-line concentration methods were developed. Sodium dodecyl sulfate (80 mM) in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) with 20% acetonitrile was used as a background electrolyte for the methods studied. The limits of detection, based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were about 2.6–5.1 mg l⁻¹ in purified water when MEKC was applied for the standards. By using an on-line preconcentration method known as sweeping–MEKC, up to a 500-fold increase in detection sensitivity was obtained whereas up to a 50 000-fold increase for CSEI–sweeping–MEKC was achieved. The limits of detection using optimum CSEI–sweeping–MEKC were lower than 1 µg l⁻¹ and the method was validated obtaining good reproducibility (relative standard deviation lower than 22%) and linearity. CSEI–sweeping–MEKC was successfully applied to the determination of the three herbicides in spiked tap water below the levels established by the US Environmental Protection Agency. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Sweeping; Injection methods; Cation-selective exhaustive injection; Sample stacking; Paraquat; Diquat; Difenzoquat; Pesticides; Quaternary ammonium compounds

1. Introduction

The widespread use of pesticides and herbicides is an essential component of modern agriculture to boost productivity. However, the increasing concern about environmental pollution and drinking water and food contamination has led to the establishment of strict regulations that have driven efforts to develop highly sensitive analytical methods [1].

Quaternary ammonium herbicides constitute a particularly difficult group of herbicides to analyze, commonly known as “quats”. Paraquat (PQ) and diquat (DQ) are used as non-selective contact herbicides for the control of weeds and grasses in plantation crops, for pasture renovation and as defoliant for cotton and hops. Difenzoquat (DF) is a selective herbicide used for post-emergence control of wild oats in cereal crops [2]. On the basis of their toxicity, the World Health Organization (WHO) has classified these three compounds as moderately hazardous [3]. Given the threat they pose to the

*Corresponding author. Fax: +34-93-402-1233.

E-mail address: oscarribu@eresmas.com (O. Núñez).

environment, some of these compounds have been included on "priority" lists and are currently regulated in a number of countries [4,5]. For drinking waters, the Office of Water of the US Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum contaminant level of $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for DQ and a goal of $3 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ [6,7]. The European Union has not regulated the levels of these compounds in water and the values $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for individual pesticides and $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for total pesticides are applied [8]. To help enforce the legislated values, sensitive analytical methods for quats still need to be developed.

The analysis of these compounds is difficult due to their cationic character. Nevertheless, a great number of ion-selective [9–11], spectrophotometric [12,13], spectrofluorimetric [14] and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [15,16] methods have been developed. Moreover, these compounds are polar, easily soluble in water and have low volatility. Because of these properties, they are usually determined by ion-pair high-performance liquid chromatography with direct UV detection [17,18]. In order to improve sensitivity and selectivity, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has also been used [19–23].

Capillary electrophoresis (CE) has also been demonstrated to be a promising alternative for the separation and/or analysis of quaternary ammonium herbicides. Quats have been determined by CE in water [17,24–27] and in other matrices such as serum, soil and urine [28,29]. CE coupled to mass spectrometry (CE-MS) has also been applied to analyze quats in water samples [30–32]. Nevertheless, CE has lower concentration sensitivity than high-performance liquid chromatography due to both the low sample injection volume and the short optical path-length for on-capillary detection. To detect the maximum legally permitted levels of quats in drinking water [6–8], enrichment procedures prior to determination have to be used in order to enhance sensitivity. Off-line preconcentration procedures have been used to attain low detection limits and have been applied to the analysis of quats in drinking water [27,33] but usually involve long analysis times and laborious sample handling. Several techniques for on-line preconcentration have been reported for the analysis of these compounds. Isotachopheresis (ITP) has been used as an on-line water sample

pre-treatment for the determination of PQ and DQ by CE [34]. A sample stacking procedure has been reported for the analysis of quats in drinking water [35]. This method involves field polarity reversal after the capillary has been filled with a large volume of sample of lower conductivity than the buffer used for CE separation. However, it was only appropriate for the analysis of highly contaminated water samples due to limited sensitivity, so other on-column preconcentration methods are needed.

Micellar electrokinetic chromatography (MEKC) has become widely popular as a powerful separation technique for both neutral and ionic compounds, as first introduced by Terabe et al. [36]. The separation mechanism involves differential partitioning of analytes between the pseudostationary phase (micelles) and the surrounding aqueous phase and their electrokinetic transport. In order to improve concentration sensitivity in MEKC, different on-line concentration methods have recently been reported. One of these methods was first introduced by Quirino and Terabe [37] and is referred to as sweeping. It consists in the introduction of a large sample zone prepared in a matrix devoid of pseudostationary phase, wherein the analytes are picked-up and accumulated by the pseudostationary phase that penetrates the sample zone. Anionic surfactants have been used in most of the papers that deal with on-line sample concentration for MEKC [38,39]. Different studies using sweeping-MEKC with cationic micelles under strong electroosmotic flow (EOF) conditions and suppressed EOF conditions have also been reported [40,41] with sensitivity enhancements of over a 1000-fold [40] for some analytes. Recently, a combination of sample stacking and sweeping, referred to as cation-selective exhaustive injection and sweeping (CSEI-sweep) has achieved almost a million-fold enhancement in detector response for cationic hydrophobic analytes [39]. On-line concentration of positively charged analytes with anionic sodium dodecyl sulfate (SDS) micelles provided high sensitivity enhancements because of the strong interaction between oppositely charged analytes and the SDS micelle [42].

In this paper, the conditions for the simultaneous determination of paraquat, diquat and difenzoquat by MEKC using both sweeping and CSEI-sweeping as on-line concentration are developed. Ethylviologen

(EV) and heptylviologen (HV) are used as internal standards. Quality parameters such as limit of detection, repeatability, inter-day reproducibility and linearity were assessed. Optimum CSEI–sweeping–MEKC was successfully applied to the analysis of quats in spiked tap water at the levels established by the US EPA.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Hewlett-Packard ^{3D}CE System (Waldbronn, Germany) with a UV absorbance detector was used. Electrophoretic data were processed using a HP ^{3D}CE ChemStation software. An uncoated fused-silica capillary (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) of 60 cm (51.5 cm effective length) × 50 μm I.D. × 360 μm O.D. was used. The capillary was thermostated at 25 °C. Samples were introduced by pressure (5 kPa) or electrokinetic injection. Direct detection was performed at two wavelengths, 220 nm for DQ and 255 nm for PQ and DF. Electrophoretic separation was carried out using 80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) with 20% acetonitrile as the background electrolyte (BGE). The BGE was filtered through a 0.45-μm membrane filter and sonicated before use. Conductivity of sample and separation solutions was measured using a Horiba ES-12 conductivity meter (Kyoto, Japan).

2.2. Chemicals

Diquat (1,1'-ethylene-2,2'-bipyridinium ion) and difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium ion) were purchased from Chemservice (West Chester, PA, USA) and paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion) from Sigma (St. Louis, MO, USA). Ethylviologen (1,1'-diethyl-4,4'-bipyridinium ion, EV) obtained from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and heptylviologen (1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium ion, HV) from TCI (Tokyo, Japan) were used as internal standards. Structures of the quaternary ammonium herbicides and internal standards are shown in Fig. 1. Methanol, acetonitrile, hydrochloric acid and SDS were purchased from Nacalai Tesque (Kyoto, Japan), phosphoric acid

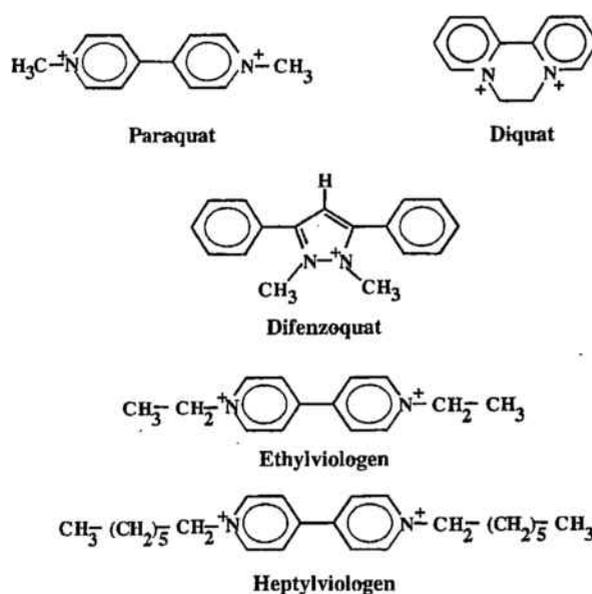


Fig. 1. Molecular structures of quaternary ammonium herbicides and internal standards.

solution (0.5 M) and sodium dihydrogenphosphate dihydrate from Kanto Chemical (Tokyo, Japan) and sodium hydroxide solution (1 M) from Wako (Osaka, Japan). Water used for the matrix and sample preparations was purified by using a Milli-Q water purification system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock standard solutions of individual herbicides and internal standards (1 mg ml⁻¹) were prepared in purified water and stored in plastic vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by dilution with BGE, sample matrix or purified water, and were filtered through a 0.45-μm membrane filter before use. Buffers were prepared daily by dilution of stock solutions of phosphoric acid and sodium dihydrogenphosphate. Stock solutions of 0.5 M SDS were prepared every week in purified water. Micellar BGE were prepared (each day) by dilution of the SDS stock solution in appropriate phosphate buffers. Acetonitrile was added to the BGE to improve the separation. All buffers and working solutions were sonicated and filtered through a 0.45-μm membrane filter before use.

2.3. Capillary conditioning

New capillaries were pretreated by rinsing at

pressure (ca. 100 kPa) with 0.1 M hydrochloric acid for 15 min, water for 15 min, 1 M sodium hydroxide for 30 min and finally rinsed with water for 30 min. At the beginning of each day, the capillary was rinsed with 1 M sodium hydroxide for 10 min, followed by methanol for 10 min and then with water for 10 min. To ensure reproducibility, at the end of each run the capillary was treated with 1 M sodium hydroxide for 3 min, methanol for 3 min, water for 3 min and then with the BGE for 6 min. When the CSEI–sweeping–MEKC method was applied, the capillary was also treated at the end of each run and after the BGE with a non-micellar BGE for 4 min.

2.4. MEKC procedure

In the MEKC procedure, the sample was prepared directly in the BGE (80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer at pH 2.5 with 20% acetonitrile). The capillary was first conditioned with the BGE and then, a conventional hydrodynamic injection of the sample (1 s, 5 kPa) was performed.

2.5. Sweeping–MEKC procedure

Sweeping–MEKC was performed according to the procedure reported by Quirino and Terabe [37] and Isoo et al. [43]. The capillary was first conditioned with a micellar BGE (80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer at pH 2.5 with 20% acetonitrile). The sample prepared in a matrix (phosphate buffer at pH 2.5) having a conductivity similar to that of the BGE ($\sim 6.3 \text{ mS cm}^{-1}$) but devoid of micelles was injected hydrodynamically for 500 s (5 kPa). The injected analyte zone was assumed completely swept and the herbicides were separated by MEKC.

2.6. CSEI–sweeping–MEKC procedure

CSEI–sweeping–MEKC was performed following the procedure described by Quirino et al. [42]. The capillary was first conditioned with a nonmicellar BGE (100 mM phosphate buffer at pH 2.5, with 20% acetonitrile). A zone of a high-conductivity buffer (HCB) devoid of micelles (HCB, 200 mM phosphate buffer at pH 2.5) was hydrodynamically injected for 200 s at 5 kPa, followed by a 6-s injection (5 kPa) of

a water plug. Then, the cationic herbicides prepared in a low-conductivity solution (purified water or tap water) were electrokinetically injected (400 s, +22 kV). The sample cations enter the capillary through the water plug with high velocities. Once the sample cations reached the interface between the water and HCB zones their velocities decreased due to the increase in the ionic strength and focus or stack at this interface. It should be noted that the EOF was suppressed by working in acidic conditions, so only the cations enter into the capillary when the positive voltage was applied. Then, the electrokinetic injection was stopped and micellar BGE solutions (80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer at pH 2.5 with 20% acetonitrile) were placed at both ends of the capillary and the separation voltage (–22 kV) was applied. In this step, the anionic micelles will enter the capillary and sweep the previously stacked cationic herbicides and introduced the analytes as narrower bands. Finally, the herbicides were separated by MEKC.

3. Results and discussion

3.1. Micellar electrokinetic chromatography

As there is no previous work dealing with the determination of quaternary ammonium herbicides by micellar electrokinetic chromatography, a preliminary study was carried out using 50 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5). A 100 mg l^{-1} mixture of the three herbicides and the two internal standards in the BGE was used. It should be noted that at pH 2.5, EOF was practically suppressed. When a negative polarity (–22 kV) was applied, the direction of the SDS micelles was toward the anode (detection window) interacting with the cationic quats and permitting their analysis. Under these conditions, the electropherogram obtained showed only two peaks due to partial comigration of these compounds. In order to improve the separation, the addition of an organic modifier to the BGE was necessary. For this purpose, different amounts of methanol or acetonitrile, from 5 to 20%, were added to the BGE. Fig. 2 shows the electropherograms obtained at 255 nm for two mixtures of herbicides, each one with one internal standard, using BGE

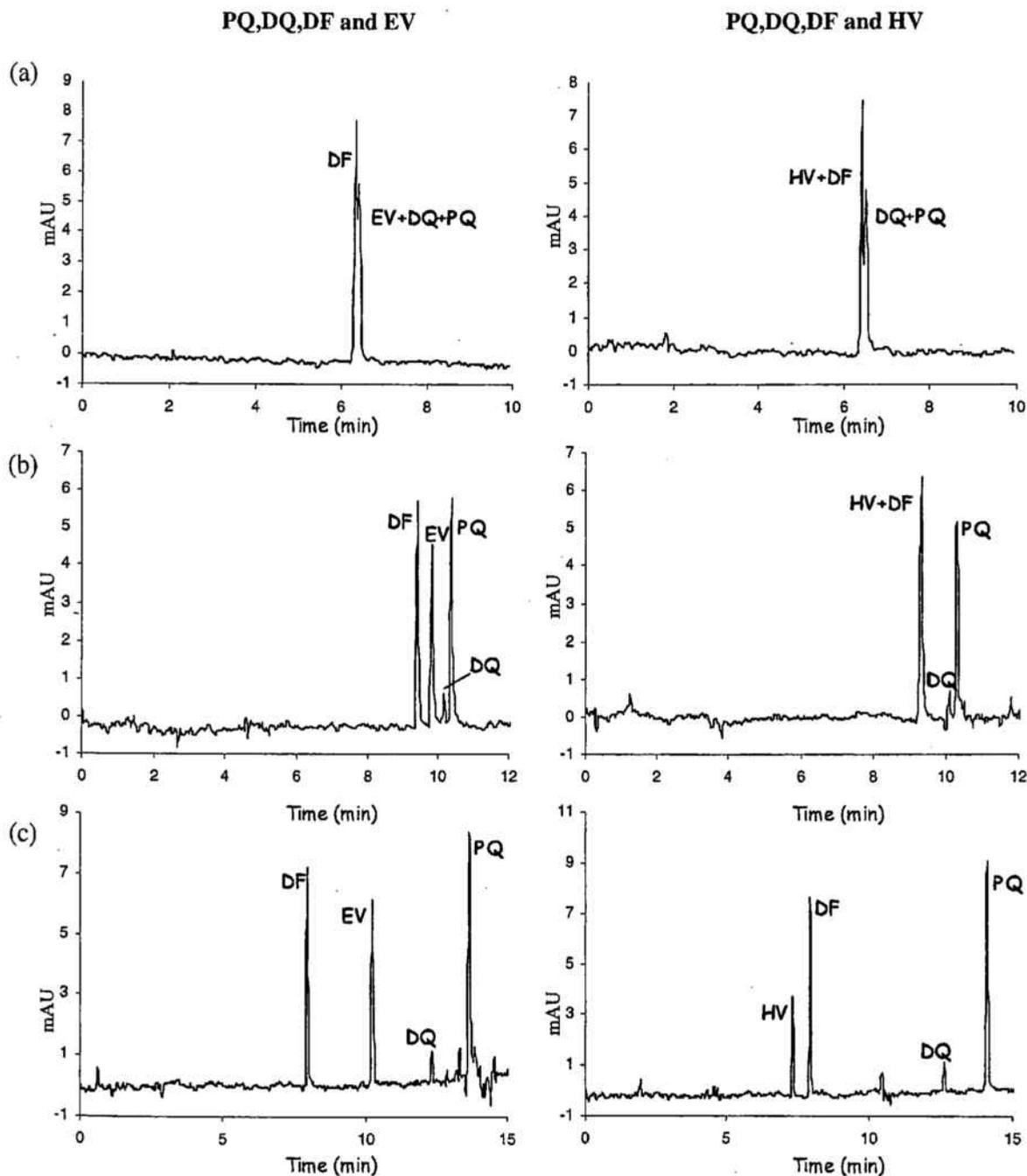


Fig. 2. Electropherograms obtained at 255 nm by MEKC for two mixtures of quats with each one of the internal standards (EV and HV). BGE: 50 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) (a) without organic solvent, (b) with 20% methanol, (c) with 20% acetonitrile.

without organic solvent (Fig. 2a), with 20% of methanol (Fig. 2b) and with 20% of acetonitrile (Fig. 2c). Both methanol and acetonitrile provided good electrophoretic separations of the three herbicides but only acetonitrile provided a good separation between

the herbicides and both internal standards. Moreover, the resolution between PQ and DQ using 20% of acetonitrile in the BGE was higher than obtained with other electrophoretic methods [27,33,35].

Different SDS concentrations (50–100 mM) were

studied in order to improve the detection of the three herbicides. The BGE was 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) with 20% acetonitrile. When high concentrations of SDS were employed, the resolution between HV and DF decreased and the baseline noise increased. The best separation and sensitivity were obtained when 80 mM SDS was added to the BGE and Fig. 3a shows the electropherograms at two wavelengths (220 and 255 nm) when a mixture of the five compounds studied were hydrodynamically injected (1 s, 5 kPa). Under these conditions, the complete separation of all five compounds was achieved showing that MEKC can be used for quat analysis.

The limits of detection (LODs) of quats using MEKC under optimal were 2.6, 3.2, and 5.1 mg l⁻¹ for PQ, DF and DQ, respectively, based on a signal-

to-noise ratio of 3:1. These LODs were similar to those obtained with other conventional electrophoretic separation techniques without using preconcentration methods [44].

3.2. Sweeping-MEKC

In order to increase the detection sensitivity, two different on-line preconcentration methods were investigated. The first was sweeping-MEKC. This procedure consists of a large hydrodynamic introduction of the sample solution into the capillary. The analytes must be prepared in a sample matrix with the same conductivity as that of the BGE but devoid of micelles. Different sample injection times (from 400 to 700 s, 5 kPa) were tested in order to obtain higher detector response. The best results were

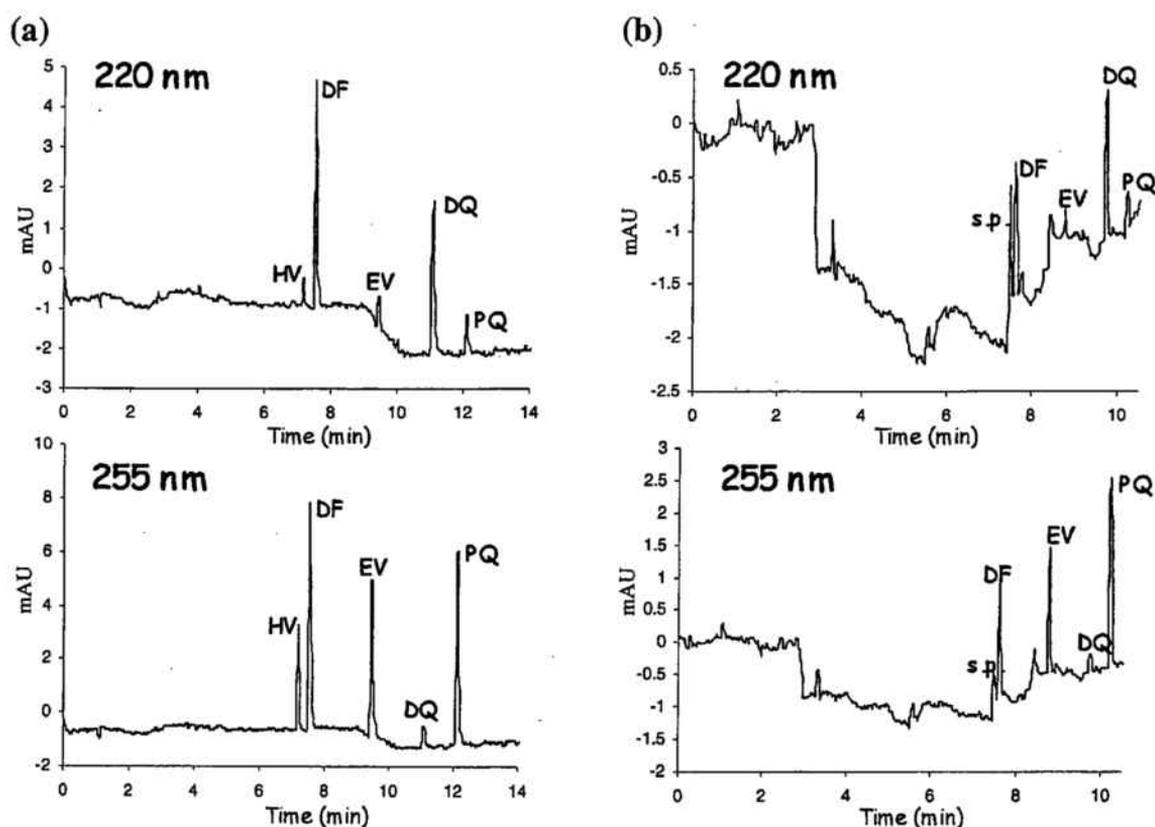
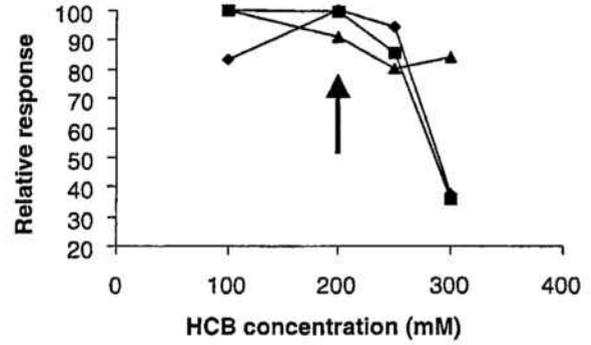


Fig. 3. Conventional MEKC and sweeping-MEKC of quaternary ammonium herbicides. BGE: 80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing 20% acetonitrile. (a) MEKC: Sample prepared in BGE; sample concentration, 100 mg l⁻¹; injection time, 1 s at 5 kPa. (b) Sweeping-MEKC: sample prepared in a phosphate buffer (pH 2.5) with the same conductivity of BGE (~6.3 mS cm⁻¹); sample concentration, 100 µg l⁻¹; injection time, 500 s at 5 kPa. Separation conditions (a and b): separation voltage, -22 kV with the micellar BGE at both ends of the capillary. s.p., system peak.

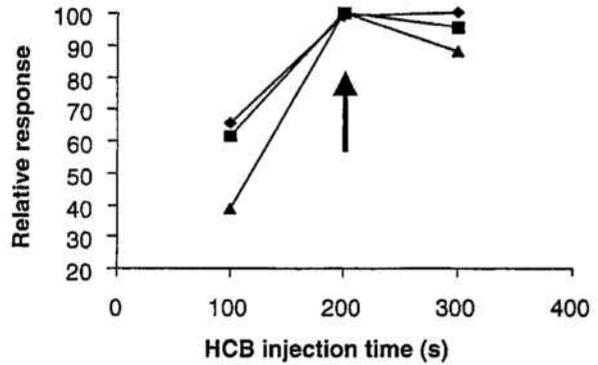
obtained for 500 s injection time. Fig. 3b shows the electropherograms obtained at two different wavelengths for a $100 \mu\text{g l}^{-1}$ mixture of PQ, DQ, DF, EV and HV by sweeping-MEKC. HV comigrated with a system peak that appeared close to DF preventing the use of this compound as internal standard. Higher sample injection times caused deterioration of the resolution between DF and the system peak and increased the baseline noise. Spikes in these electropherograms were caused by the change in composition of the liquid during sweeping [37]. Enhancement factors were calculated as the ratio of the peak heights obtained from sweeping-MEKC (Fig. 3b) and normal injection of 1 s by MEKC (Fig. 3a) and correction by the dilution factor (in this case 1000). The enhancement factors obtained were 230 for DF, 380 for DQ and 400 for PQ in terms of peak height.

3.3. CSEI-sweeping-MEKC

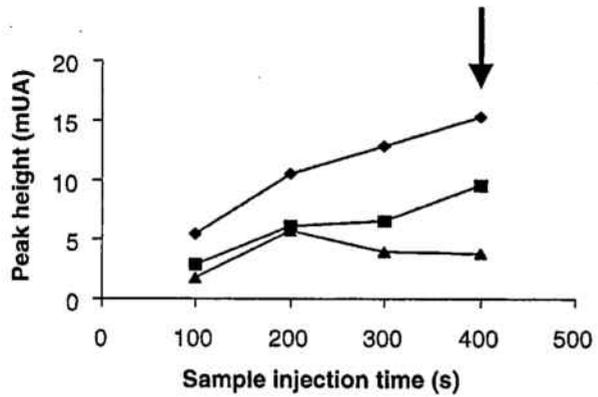
The enhancement obtained by sweeping-MEKC was insufficient to analyze quats in drinking waters at the legislated levels [6–8]. For this reason, other on-line concentration methods were studied. A new method that combine sample stacking and sweeping, CSEI-sweeping, achieved almost million-fold enhancements in detector response for some cationic hydrophobic analytes [39]. Thus, CSEI-sweeping was considered to be a promising method for the analysis of quaternary ammonium herbicides. In this case, the capillary was first filled with a nonmicellar BGE, because micelles interfered with the entry of the quats into the capillary when electrokinetic injection was used. Furthermore, sweeping can not occur in the resulting zone of electrokinetically injected quats. The concentration of phosphate buffer in this nonmicellar BGE was increased two-fold to compensate for the change in conductivity. Hence, 100 mM phosphate buffer pH (2.5) with 20% acetonitrile was used as nonmicellar BGE. After introduction of the nonmicellar BGE in the capillary, a high concentration phosphate buffer solution (HCB) devoid of organic solvent followed by a small water plug was hydrodynamically introduced into the capillary, before the electrokinetic injection of the sample. Fig. 4a shows the variation of the relative response of the three herbicides versus the



(a)



(b)



(c)

Fig. 4. (a) Effect of HCB concentration on the quaternary ammonium herbicide responses. (b) Effect of HCB injection time on the quaternary ammonium herbicide responses. (c) Variation of the herbicide peak heights versus the sample injection time.

HCB concentration. PQ and DQ gave the highest response when 200 mM phosphate buffer (pH 2.5) was used. A decrease in the response was observed at higher concentrations and this value has been chosen as optimal concentration. Fig. 4b shows the variation of the relative response of quats versus the hydrodynamic injection time of the HCB. For all three quats, higher response was obtained when 200 s was used. After the hydrodynamic injection of the HCB, a small water plug must be introduced into the capillary. Several groups have studied the effect of a water plug on sample stacking by electrokinetic injection [45,46] and Chien [45] has reported that a water plug provides a higher electric field at the tip of the capillary, which will eventually improve the

sample stacking. If there is no water plug, the sample ions will stack at the injection point and cause degradation in the field enhancement. Thus, a 6-s hydrodynamic injection (5 kPa) of water followed by a large electrokinetic injection of sample at positive polarity was performed. Fig. 4c shows the peak height variation of quats with the sample electrokinetic injection time. For PQ and DQ the peak height increased with the injection time. Nevertheless, for DF a slight decrease at injections time higher than 200 s occurred. In order to obtain the highest signal for PQ and DQ (the only two quats legislated by the EPA [6,7]), 400 s electrokinetic injection was chosen as optimum injection time.

Fig. 5b shows the electropherograms obtained at

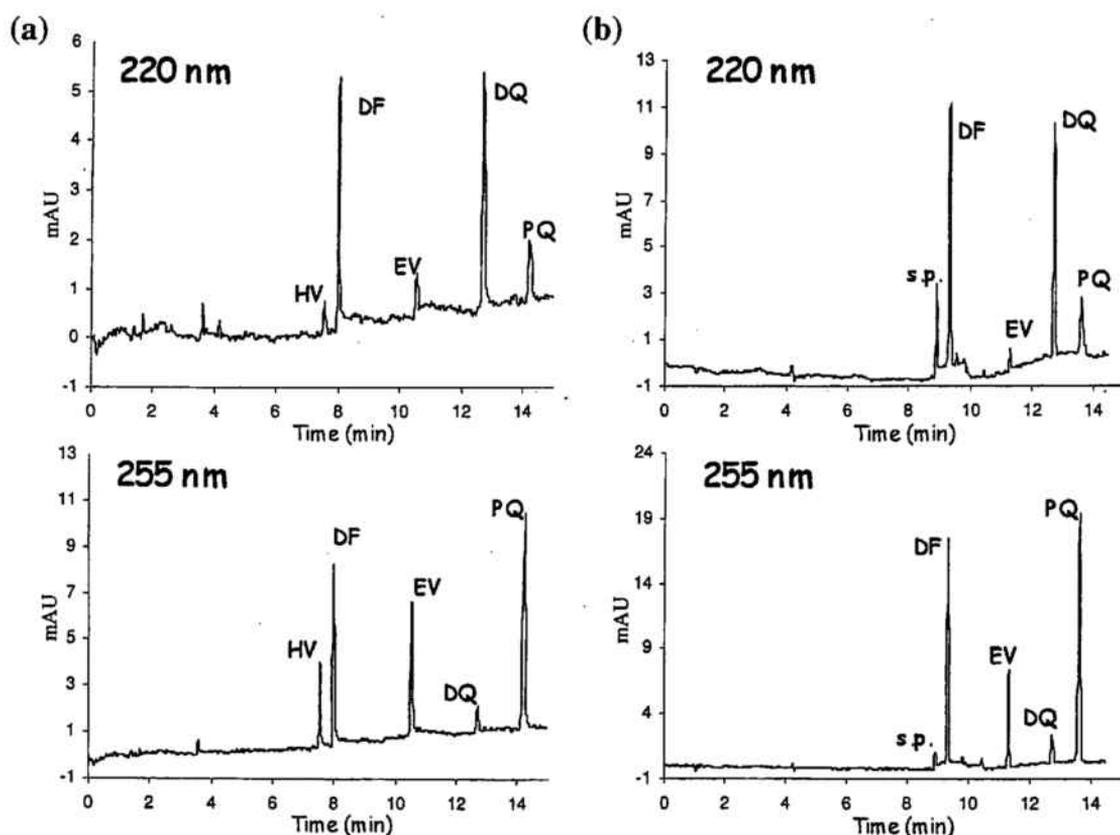


Fig. 5. Conventional MEKC and CSEI-sweeping-MEKC of quaternary ammonium herbicides. Nonmicellar BGE: 100 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing 20% acetonitrile; micellar BGE: 80 mM SDS in 50 mM phosphate buffer (pH 2.5) containing 20% acetonitrile; HCB: 200 mM phosphate buffer (pH 2.5); conditioning solution before injection, (a) micellar BGE, (b) nonmicellar BGE; (a) MEKC: sample prepared in BGE; sample concentration, 100 mg l⁻¹; injection time, 1 s at 5 kPa. (b) CSEI-sweeping-MEKC: sample prepared in water; sample concentration, 10 µg l⁻¹ PQ, DQ and EV, 50 µg l⁻¹ DF. Injection scheme: hydrodynamic injection of HCB for 200 s (5 kPa), hydrodynamic injection of water for 6 s (5 kPa), electrokinetic injection of sample for 400 s (+22 kV); Separation conditions (a and b): separation voltage, -22 kV with the micellar BGE at both ends of the capillary. s.p., system peak.

two wavelengths for a $10 \mu\text{g l}^{-1}$ mixture of PQ, DQ, EV and HV and $50 \mu\text{g l}^{-1}$ of DF in purified water using CSEI-sweeping-MEKC under optimal conditions. HV comigrated with a system peak that appeared close to DF preventing the use of this compound as internal standard. Enhancement factors were calculated by the ratio of the peak heights obtained from CSEI-sweeping-MEKC (Fig. 5b) and normal injection of 1 s by MEKC (Fig. 5a) and correction by the dilution factor (in this case 10 000 for PQ and DQ and 2000 for DF). The enhancement factors obtained were 5000 for DF and 21 000 for PQ and DQ in terms of peak height.

3.4. Quality parameters

Figures of merit using both sweeping-MEKC and CSEI-sweeping-MEKC methods under optimal conditions were calculated and the results are given in Table 1. The LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 and expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$ of quaternary ammonium ion were about 10 when sweeping-MEKC was used. These LODs are similar to those obtained in a previous work using stacking with sample matrix removal as an on-line concentration procedure [35] and are 30–80 times lower than those obtained in a previous work using conventional capillary zone electrophoresis with hydrodynamic injection [44]. When CSEI-sweeping-MEKC was

used, LODs lower than $1 \mu\text{g l}^{-1}$ were obtained. In this case, the LODs are similar, and slightly lower for PQ and DQ, than those obtained in a previous work using the combination of two preconcentration procedures, solid-phase extraction (SPE) and stacking with sample matrix removal [33]. However, the latter technique suffers from longer analysis time and laborious sample handling. For PQ and DQ, these LODs are below the maximum permitted levels established by both the EPA [6,7] and the European Union [8]. It should be noted that the relative sensitivity enhancement achieved with both sweeping methods, obtained by comparing the limits of detection with those of conventional MEKC, were between 250- and 500-fold enhancement for sweeping-MEKC and between 3000 and 50 000 for CSEI-sweeping-MEKC.

To obtain run-to-run repeatability information, a total of six replicates ($\sim 100 \mu\text{g l}^{-1}$ for sweeping-MEKC, and $\sim 10 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ, DQ and EV and $\sim 50 \mu\text{g l}^{-1}$ for DF for CSEI-sweeping-MEKC) determinations were performed under optimal conditions in the same day. The day-to-day reproducibility was calculated by performing six replicate determinations of the same standard solution in 3 days (two replicates each day). The relative standard deviations (RSDs) obtained by sweeping-MEKC were lower than 4.7% for migration time and lower than 7.9% for concentration. CSEI-sweeping-MEKC shows

Table 1
Quality parameters

Parameter	PQ ^a		DQ ^b		DF ^a	
	Sweeping	CSEI-sweeping	Sweeping	CSEI-sweeping	Sweeping	CSEI-sweeping
Limit of detection ($\mu\text{g l}^{-1}$)	10.2	0.075	10.1	0.1	13.0	1.0
Sensitivity enhancement (SEc) ^c	250	35 000	500	51 000	250	3000
Run-to-run repeatability, RSD (%) ($n=6$)						
Migration time	4.7	6.6	4.3	6.1	2.7	4.2
Concentration ^d	5.1	5.9	5.6	5.4	5.7	7.5
Day-to-day reproducibility, RSD (%) ($n=2 \times 3$)						
Migration time	4.3	14.2	4.1	12.4	3.7	7.2
Concentration ^d	7.1	8.9	5.7	20.8	7.9	22.6
Working range ($\mu\text{g l}^{-1}$)	20.4–306.1	0.5–25.5	20.3–304.9	0.5–25.4	26.1–391.4	6.5–130.5
Linearity (r^2)	0.9997	0.9994	0.9997	0.9995	0.9985	0.9995

^a λ : 255 nm.

^b λ : 220 nm.

^c SEc = LOD(MEKC)/LOD (sweeping-MEKC or CSEI-sweeping-MEKC).

^d Obtained by external calibration using EV as internal standard.

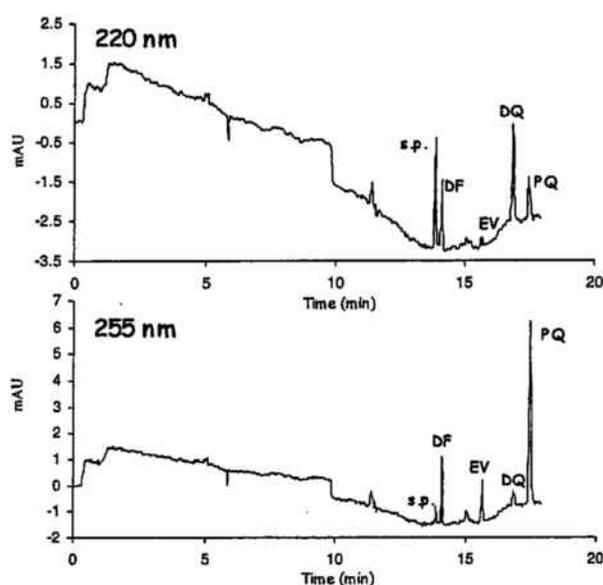


Fig. 6. Electropherogram of tap water analysed by CSEI-sweeping-MEKC. Sample concentration: $10 \mu\text{g l}^{-1}$ PQ, DQ and EV, $50 \mu\text{g l}^{-1}$ DF. Other conditions as in Fig. 5b.

higher RSDs due to the poor reproducibility of the electrokinetic injection [47]. Calibration curves based on the peak height ratio (compound/internal standard) for PQ, DQ and DF at the working ranges indicated in Table 1 were obtained and good linearity, with correlation coefficients (r^2) higher than 0.998, was observed.

3.5. Application

To demonstrate how the CSEI-sweeping-MEKC method can be applied for routine analysis of real samples, quat-spiked tap water samples were ana-

lysed. Fig. 6 shows the electropherograms obtained when Japanese tap water (Harima Science Garden) spiked at $10 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ, DQ and EV and at $50 \mu\text{g l}^{-1}$ for DF was injected using the optimized method. The limits of detection, expressed as $\mu\text{g l}^{-1}$ of quaternary ammonium herbicides and based on a signal-to-noise ratio of 3:1, are given in Table 2 and were 0.5 for PQ, 1.0 for DQ and 3.3 for DF. These limits of detection are higher than those obtained when standards in purified water were used, due to the relatively high salinity of tap water (conductivity: $152.4 \mu\text{S cm}^{-1}$) that produced a low field enhancement when the electrokinetic injection was used. The values are similar to those obtained in a previous work using SPE-stacking [33] for tap water. Moreover, for PQ and DQ the LODs obtained are sufficient for the analysis of these compounds in drinking water at the levels established by the EPA. The method was used to quantify a Japanese tap water spiked at 1.0 and $5.0 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ and DQ, respectively (values below the EPA levels) and at $6.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for DF. Quantitation was performed by standard addition ($n=3$) and the results in terms of concentration and standard deviations are given in Table 2 showing that good accuracy and precision were obtained using this method.

4. Conclusions

Sensitive methodologies based on sweeping-MEKC and CSEI-sweeping-MEKC for the analysis of quats have been developed. Enhancement of lower than 240- and 50 000-fold was obtained when sweeping-MEKC and CSEI-sweeping-MEKC were

Table 2
Application: analysis of spiked tap water

	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$)	LODs SPE-stacking ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^c	Spiked value ($\mu\text{g l}^{-1}$)	Found value ($\mu\text{g l}^{-1}$) ^d
PQ ^a	0.5	0.4	1.0	1.0 ± 0.2
DQ ^b	1.0	2.2	5.0	4.9 ± 0.5
DF ^a	3.3	1.1	6.5	6.3 ± 0.2

^a λ : 255 nm.

^b λ : 220 nm.

^c Ref. [33].

^d Obtained by standard addition ($n=3$) using EV as internal standard.

applied, respectively, providing LODs down to 0.075–1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ for standards in purified water when CSEI–sweeping–MEKC was used. Acceptable run-to-run and day-to-day reproducibilities were obtained for both on-line concentration methods. The results of this study demonstrated that CSEI–sweeping–MEKC may be used for the determination of trace amounts of the quaternary ammonium herbicides in drinking water. LODs between 0.5 and 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ were obtained for paraquat and diquat in drinking water allowing the analysis of these compounds at the levels established by the EPA.

Acknowledgements

O. Núñez is grateful to the Generalitat de Catalunya (Spain) for a grant (Beca predoctoral per a la formació de personal investigador, FI) and for the financial support of a stay in Japan.

References

- [1] J. Sherma, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 80 (1997) 283.
- [2] British Crop Protection Council, The Pesticide Manual: A World Compendium Incorporating the Agrochemical Handbook, 10th ed, Royal Society of Chemistry, Bath, 1994.
- [3] World Health Organization, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1996–1997, WHO, Geneva, 1996.
- [4] D. Barceló, Environmental Analysis: Techniques, Applications and Quality Assurance, Elsevier, Amsterdam, 1991.
- [5] US Environmental Protection Agency, Title III List of Lists: Consolidated List of Chemicals Subject to the Emergency Planning and Community Right-to-Know Act (EPCRA) and Section 112(r) of the Clean Air Act, EPA 550-B-98-017, EPA, Washington, DC, 1998.
- [6] US Environmental Protection Agency, Drinking Water Health Advisory: Pesticides, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [7] Code of Federal Regulations, Title 40, Part 141, US Government Printing Office, Rev. 1 July, 2001.
- [8] European Union, EEC Drinking Water Guidelines 80/779/EEC, EEC No. L229/11-29, EU, Brussels, 1980.
- [9] K. Watabe, K. Okada, T. Katsu, J. Toxicol. Environ. Health 38 (1992) 142.
- [10] P. Bianco, N. Aghroud, Electroanalysis 9 (1997) 602.
- [11] M. Pecorari, P. Bianco, Electroanalysis 10 (1998) 181.
- [12] P. Yáñez-Sedeño, L.M. Pozo Díez, Talanta 33 (1986) 745.
- [13] P. Shivhare, V.K. Gupta, Analyst 116 (1991) 391.
- [14] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Fenoll, Analyst 123 (1998) 1577.
- [15] M.Y. Selisker, D.P. Herzog, R.D. Erber, J.R. Fleeker, J.A. Itak, J. Agric. Food Chem. 43 (1995) 544.
- [16] C.A. Spinks, B. Wang, E.N.C. Mills, M.R.A. Morgan, Analyst 124 (1999) 847.
- [17] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 669 (1994) 217.
- [18] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatogr. A 728 (1996) 325.
- [19] V.Y. Taguchi, S.W.D. Jenkins, P.W. Croxier, D.T. Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 830.
- [20] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 830 (1999) 145.
- [21] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 869 (2000) 441.
- [22] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, Chromatographia 53 (2001) 273.
- [23] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 914 (2001) 111.
- [24] J.Y. Cai, Z. El Rassi, J. Liq. Chromatogr. 15 (1992) 1193.
- [25] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, L. Puignou, Chromatographia 39 (1994) 581.
- [26] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Díez, L. Puignou, J. Chromatogr. A 782 (1997) 289.
- [27] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, Anal. Chim. Acta 408 (2000) 263.
- [28] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, V. Tomás, Chromatographia 43 (1996) 468.
- [29] M. Tomita, T. Okuyama, Y. Nigo, Biomed. Chromatogr. 6 (1992) 91.
- [30] E. Moyano, D.E. Games, M.T. Galceran, Rapid Commun. Mass Spectrom. 10 (1996) 1379.
- [31] D. Wycherley, M.E. Rose, K. Giles, T.M. Hutton, D.A. Rimmer, J. Chromatogr. A 734 (1996) 339.
- [32] I.M. Lazar, M.L. Lee, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 117.
- [33] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A (in press).
- [34] D. Kaniansky, F. Ivanyi, F.I. Onuska, Anal. Chem. 66 (1994) 1817.
- [35] O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 912 (2001) 353.
- [36] S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.
- [37] J.P. Quirino, S. Terabe, Science 282 (1998) 465.
- [38] J.P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 71 (1999) 1638.
- [39] J.P. Quirino, S. Terabe, Anal. Chem. 72 (2000) 1023.
- [40] J.B. Kim, J.P. Quirino, K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 916 (2001) 123.
- [41] J.B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 912 (2001) 343.
- [42] J.P. Quirino, Y. Iwai, K. Otsuka, S. Terabe, Electrophoresis 21 (2000) 2899.
- [43] K. Isoo, K. Otsuka, S. Terabe, Electrophoresis 22 (2001) 3426.
- [44] M.C. Carneiro, Doctoral thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain, 1996.
- [45] R.L. Chien, Anal. Chem. 63 (1991) 2866.
- [46] C.X. Zhang, W. Thormann, Anal. Chem. 68 (1996) 2523.
- [47] J.B. Kim, K. Otsuka, S. Terabe, J. Chromatogr. A 932 (2001) 129.

2.3. ELECTROFORESIS CAPILAR-ESPECTROMETRÍA DE MASAS

2.3.1. Introducción

Como ya se ha comentado al inicio de este capítulo, la electroforesis capilar es una técnica de separación que puede llegar a ser una buena alternativa a la cromatografía de líquidos cuando se trata de separar especies cargadas aunque el pequeño volumen de muestra utilizado se traduce en una baja capacidad de carga que, junto con las pequeñas dimensiones de la celda de detección (habitualmente constituida por el propio capilar), demanda una muy elevada capacidad de respuesta por parte de los sistemas de detección para conseguir límites de detección aceptables. Como ya se ha visto en los apartados anteriores, los métodos de preconcentración pueden llegar a mejorar considerablemente la sensibilidad alcanzada con esta técnica. Los sistemas de detección que se utilizan son similares a los empleados en la cromatografía de líquidos, aunque su diseño está especialmente optimizado para mejorar la respuesta en condiciones tan poco ventajosas como las que se han comentado. El sistema de detección más comúnmente utilizado en electroforesis capilar es el espectrofotométrico debido, en parte, a la mayor universalidad que presenta. No obstante, actualmente también se utilizan detectores más selectivos y sensibles como el de fluorescencia inducida por láser o el electroquímico. Sin embargo, a pesar de la selectividad alcanzada con estos últimos sistemas de detección, la identificación inequívoca no es posible y únicamente se puede llegar a alcanzar mediante el acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas (CE-MS). Desde la publicación de los primeros resultados realmente satisfactorios del acoplamiento CE-MS a finales de los años 80, este acoplamiento ha sufrido una evolución importante y, hoy en día, empieza a ser una técnica analítica multidimensional complementaria a otras técnicas de separación acopladas a la espectrometría de masas (Schmitt-Kopplin y Frommberger, 2003).

En el acoplamiento CE-MS el objetivo es transferir los iones desde la fase líquida del electrolito de la electroforesis capilar a la fase gas con la máxima eficacia para su posterior análisis por espectrometría de masas. A lo largo de la evolución de este acoplamiento se han diseñado diferentes interfaces, todas ellas basadas en fuentes de ionización que normalmente se utilizan en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas y de entre ellas, el *electrospray* es la que ha proporcionado mejores resultados. Sin embargo se han tenido que practicar pequeñas modificaciones con el fin de hacerlas compatibles con los pequeños caudales de líquido que provienen de la electroforesis capilar (normalmente de menos de 1 a 100 nL/min) y, a la vez, poder cerrar

el circuito eléctrico entre los dos extremos del capilar. Las interfaces de *electrospray* que se han desarrollado para el acoplamiento CE-MS las podemos agrupar en tres grandes grupos: las coaxiales, las *sheathless* y las de unión líquida. En la Figura 2.12 se muestran, de manera esquemática, los tres tipos de interface utilizados en CE-MS.

La interfaz coaxial con líquido envolvente (Figura 2.12 a) fue introducida por Smith en 1988 (Smith *et al.*, 1988) y consiste en una fuente de *electrospray* triple coaxial en la que el capilar de sílice de la electroforesis capilar se introduce en el tubo metálico que conforma la aguja del *electrospray*. Por el espacio que queda entre las paredes de los dos tubos circula concéntricamente un líquido conductor denominado líquido envolvente que se mezcla con el tampón electroforético al llegar al extremo del capilar. El contacto entre el líquido envolvente y el tampón electroforético permite cerrar los circuitos eléctricos tanto de la electroforesis capilar como del *electrospray*. Finalmente, por un tercer tubo dispuesto concéntricamente sobre la aguja del *electrospray* se hace circular nitrógeno con el objetivo de facilitar la formación del spray de microgotas. El caudal de líquido envolvente suele ser del orden de los $\mu\text{L}/\text{min}$, lo que permite pasar de los nL/min del flujo electroosmótico hasta el caudal óptimo del *electrospray*.

La composición del líquido envolvente es un factor importante para el óptimo funcionamiento del acoplamiento CE-MS. En general, el uso de concentraciones elevadas de electrolito en disolventes que contienen altos porcentajes de agua, que son los que normalmente se emplean en electroforesis capilar, afecta de manera negativa a la eficacia del *electrospray*, elevando la tensión superficial y dificultando la evaporación iónica. La dilución de estas disoluciones de tampón electroforético con un líquido envolvente conductor que contenga un elevado porcentaje de disolvente orgánico volátil ayuda a obtener un spray de microgotas más estable y una evaporación iónica más eficaz. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que el líquido envolvente actúa como “vial electroforético de salida” y, por lo tanto, ha de contener un electrolito para que sea posible mantener una separación electroforética eficaz. La concentración óptima se establece como compromiso entre la que proporciona una buena separación electroforética (concentraciones elevadas de sal) y la que permite obtener un spray estable y eficaz (concentraciones bajas de sal) (van Brocke *et al.*, 2001).

Otro de los parámetros críticos en el funcionamiento de esta interfaz es la posición del extremo de salida del capilar electroforético con respecto al extremo del tubo de acero inoxidable por donde fluye concéntricamente el líquido envolvente. La posición relativa de estos extremos afecta de manera muy importante a la respuesta (Banks, 1995; Banks *et al.*, 1996) ya que el volumen de la zona donde se mezclan ambos líquidos debe mantenerse

lo más pequeño posible para evitar un ensanchamiento del pico electroforético por difusión (van Brocke *et al.*, 2001) y a la vez tiene que ser suficiente para que se produzca el contacto entre ambas disoluciones de manera eficaz y cerrar así el circuito eléctrico.

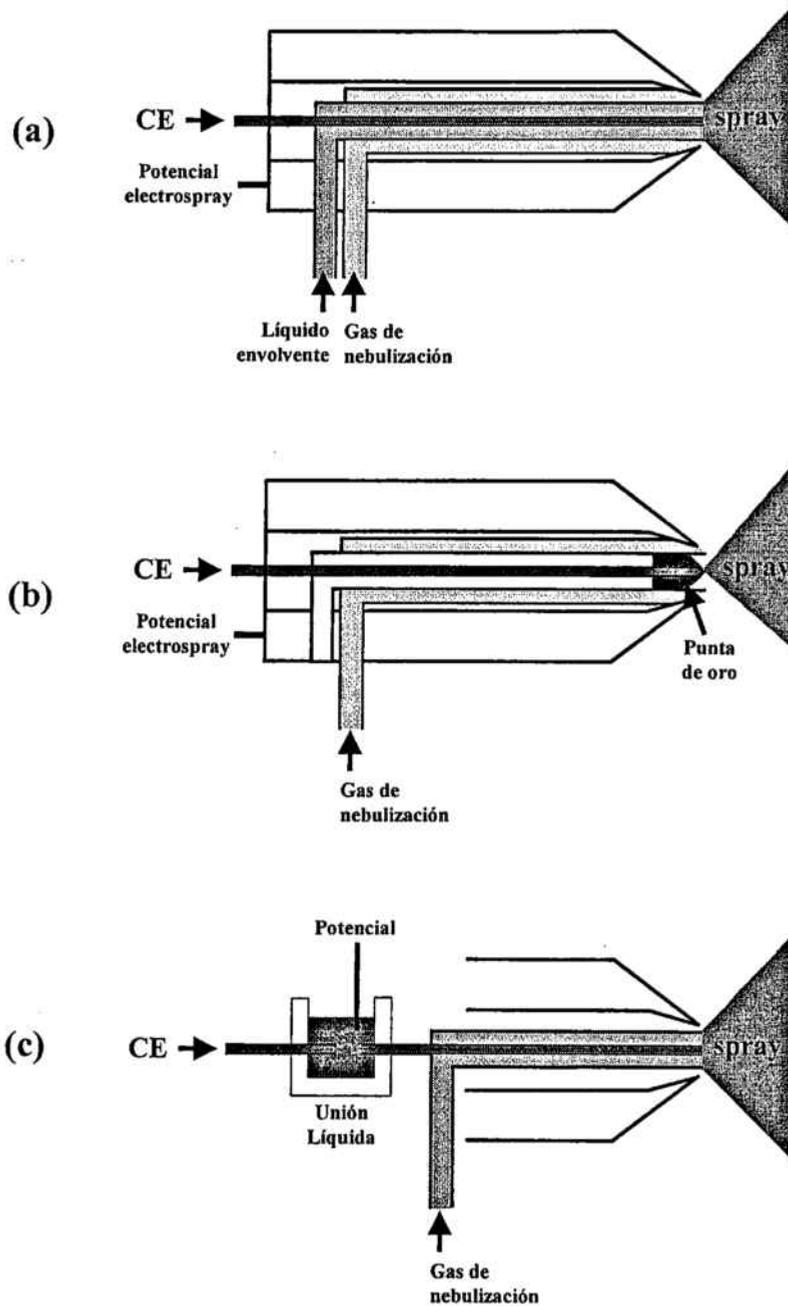


Figura 2.12. Interfaces para el acoplamiento CE-ESI/MS. (a) interfaz con líquido envolvente coaxial, (b) interfaz sin líquido envolvente o *sheathless* y (c) interfaz de unión líquida.

La interfaz sin líquido envolvente o *sheathless* (Figura 2.12 b) fue introducida en 1987 por Olivares y colaboradores (Olivares *et al.*, 1987). En este tipo de interfaz no se diluye el analito con un líquido envolvente, sino que la superficie exterior del extremo de

salida del capilar electroforético se recubre con una fina capa de metal, normalmente oro, que permite establecer el contacto eléctrico que cierra tanto el circuito de la electroforesis capilar como del *electrospray*, o bien, se introduce el extremo del capilar electroforético en una pequeña pieza de oro para establecer este contacto eléctrico. Por otra parte, como el caudal de líquido que llega al *electrospray* solo es el correspondiente al flujo electroosmótico, es necesario estrechar el diámetro interno del extremo de salida del capilar electroforético para que acabe con un orificio muy pequeño y, de esta manera, obtener un espray estable a caudales bajos. Un inconveniente importante que presenta esta interfaz es la baja estabilidad mecánica de los recubrimientos metálicos que, con el tiempo, se van desprendiendo y termina por perderse el contacto eléctrico.

La interfaz de unión líquida (Figura 2.12 c) fue desarrollada por Henion y colaboradores (Lee *et al.*, 1988). En este tipo de interfaz se produce una discontinuidad entre el capilar electroforético y la aguja del *electrospray*. El extremo de salida del capilar electroforético y el extremo de entrada del tubo metálico de la aguja del *electrospray* están sumergidos en un pequeño depósito lleno de un tampón electroforético y entre ellos hay un pequeño espacio muerto de unos 10-12 μm . Por este punto y mediante un electrodo que se encuentra alojado en el pequeño depósito de tampón se establece el contacto que permite cerrar los circuitos eléctricos. Este tipo de interfaz es difícil de construir y, con frecuencia, suele producir un ensanchamiento de los picos electroforéticos como consecuencia de una pérdida de eficacia producida por la difusión de los analitos en el espacio muerto que hay entre el capilar electroforético y la aguja del *electrospray*.

Recientemente se han empezado a utilizar también las fuentes de ionización química a presión atmosférica (APCI) para el acoplamiento CE-MS (Takeda *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2003), aunque se trata de primeras aproximaciones y los resultados obtenidos no son muy buenos. Por otra parte, las últimas tendencias en el acoplamiento CE-MS es la utilización de interfaces miniaturizadas en combinación con sistemas de fuentes de *nanoelectrospray*.

Aunque es posible llevar a cabo el acoplamiento CE-MS con cualquier tipo de espectrómetro de masas, los sistemas de analizadores con un único cuadrupolo son los que más se han venido utilizando (Riu *et al.*, 2001; Somsen *et al.*, 2003). No obstante, buscando una mayor selectividad y sensibilidad, también se han empleado analizadores de triple cuadrupolo (Moyano *et al.*, 1996; Stahl *et al.*, 2002), de tiempo de vuelo (Peterson *et al.*, 2003), de trampa de iones (Bendahl *et al.*, 2002; Wey *et al.*, 2002) y de resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (Que *et al.*, 2003).

La electroforesis capilar de zona (CZE) es la modalidad que más se ha utilizado en las aplicaciones descritas con el acoplamiento CE-MS. Sin embargo, también se han empleado en algunas ocasiones otros modos de CE como el isoelectroenfoque capilar (CIEF) (Lamoree *et al.*, 1997; Clarke *et al.*, 2002), la cromatografía electrocinética micelar (MEKC) (Shamsi, 2001; Petersson *et al.*, 2003; Somsen *et al.*, 2003), la isotacoforesis capilar (CITP) (Peterson *et al.*, 2003), la electroforesis capilar en gel (GCE) (Freudemann *et al.*, 2001; von Brocke *et al.*, 2003) y la electrocromatografía capilar (CEC) (Taylor y Teale, 1997; Que y Novotny, 2002; Que *et al.*, 2003).

2.3.2. Trabajo experimental

Tal como se ha comentado en el Capítulo 1, los reguladores del crecimiento CQ y MQ no muestran ninguna absorción en la zona UV debido a la ausencia de grupos cromóforos en su estructura. La electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas se presenta, entonces, como una buena opción para el análisis simultáneo de los cinco herbicidas catiónicos incluidos en la familia de los cuats. Además, el acoplamiento CE-MS ofrece la posibilidad de mejorar la sensibilidad y selectividad obtenida para los cuats con respecto al método con detección UV así como el poder disponer de una identificación inequívoca. Para este estudio se acopló una electroforesis capilar Beckman P/ACE system 5500 a un espectrómetro de masas LCQ de Thermo-Finnigan equipado con una trampa de iones como analizador. Se utilizó una fuente de ionización de electrospray triple coaxial asistida neumáticamente con nitrógeno. La electroforesis capilar se tuvo que modificar para poder llevar a cabo el acoplamiento CE-MS. La principal modificación consistió en el cambio de la fuente de alimentación de manera que el electrodo de salida perdiese su funcionalidad a cambio de cerrar el circuito eléctrico en la interfase del acoplamiento.

Como en los métodos descritos anteriormente en este capítulo, se utilizaron el EV y el HV como patrones internos y, además, se incluyeron los compuestos deuterados de los cuats que se encuentran disponibles comercialmente: PQ-d₈, DQ-d₄ y CQ-d₄, para su evaluación también como patrones internos.

El estudio del acoplamiento CE-MS para el análisis de los cuats en muestras de agua de bebida se incluye en el Apartado 2.3.2.4 (Artículo IV) de este capítulo. Sin embargo, algunos aspectos son comentados con más detalle a continuación.

2.3.2.1. Experimental adicional

Con el objetivo de obtener la máxima respuesta en el acoplamiento CE-MS se optimizaron varios parámetros de la interfase de *electrospray* que permiten mejorar la eficacia de la ionización, como son los caudales del líquido envolvente y del gas de nebulización, la composición del líquido envolvente, el voltaje del *electrospray* y la posición del capilar electroforético. La optimización de la composición y el caudal del líquido envolvente, así como el caudal del gas de nebulización se encuentra descrita en la comunicación científica que se incluye en el apartado 2.3.2.4 (Artículo IV). Los caudales necesarios no son muy elevados y, como se ha comentado anteriormente, el líquido envolvente está compuesto mayoritariamente por metanol para facilitar la evaporación iónica si bien es necesario la presencia de un electrolito, en este caso ácido acético. En cuanto a la distancia que el capilar electroforético sobresale del tubo concéntrico por donde fluye el líquido envolvente, los resultados que se obtuvieron están de acuerdo con lo descrito en la literatura. Esta distancia ha de ser la menor posible (en nuestro caso el óptimo resultó estar a 0,1 mm) para no producir ensanchamientos de la banda de los picos por difusión (von Brocke *et al.*, 2001) y, además, es crítica para obtener un *espray* estable y no se produzcan cortes en el contacto eléctrico. A valores por encima de 0,3 mm la señal obtenida para los cuats era muy pequeña y, además, en ocasiones se perdía el contacto eléctrico.

La distancia entre el capilar electroforético y el capilar a alta temperatura (*heated capillary*) del espectrómetro de masas por donde se produce la entrada de iones al analizador es un parámetro que también influye considerablemente en la sensibilidad. En la Figura 2.13 se comparan los electroferogramas obtenidos cuando la fuente de ionización se posiciona a 2,5 cm y a 1,5 cm de distancia. Como se puede observar, cuanto menor es la distancia mayor señal se obtiene para los cinco analitos. Para alguno de ellos, como el PQ, DQ, CQ o MQ, el incremento de señal es de hasta un 90 %. Este incremento es lógico ya que con el acoplamiento CE-ESI/MS, el líquido envolvente fluye a pocos $\mu\text{L}/\text{min}$ y la pluma del *espray* resultante es muy pequeña y cuanto más cerca se este *espray* del orificio de entrada al espectrómetro de masas mayor es la transmisión de iones y, en consecuencia, la señal obtenida. Por esta razón, la fuente de ionización se colocó lo más cerca posible del espectrómetro de masas, es decir, a 1,5 cm.

Otro parámetro importante en el acoplamiento CE-ESI/MS es el voltaje de *electrospray* que se aplica en la fuente. Es importante remarcar que los altos voltajes que se aplican en las separaciones electroforéticas convencionales (de 10 a 30 kV) no pueden

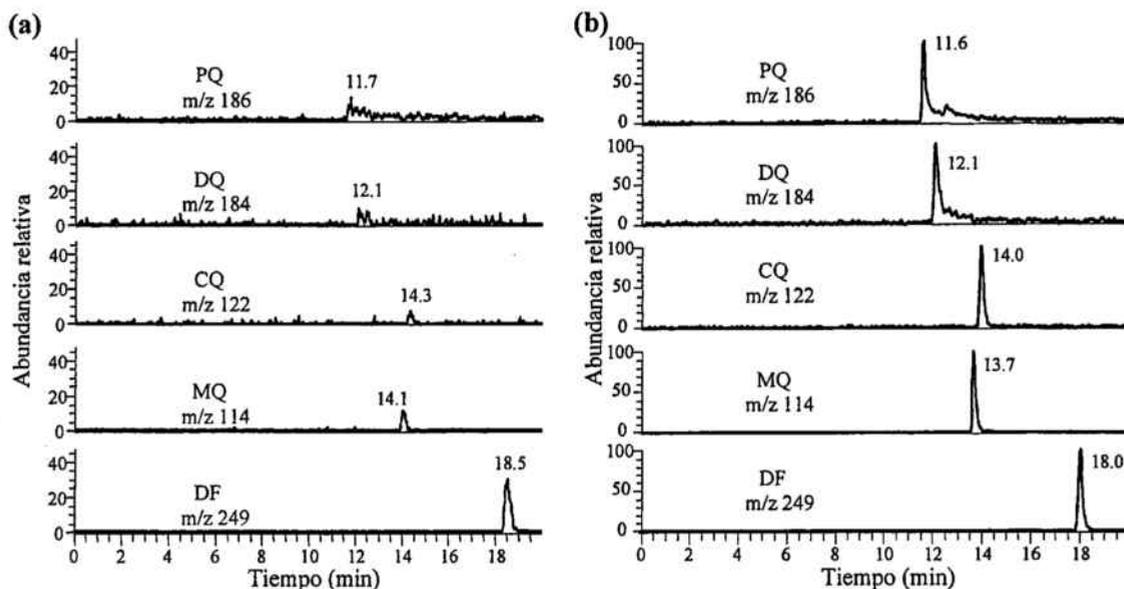


Figura 2.13. Efecto de la distancia entre el extremo del capilar electroforético y la entrada al espectrómetro de masas. (a) 2,5 cm (b) 1,5 cm.

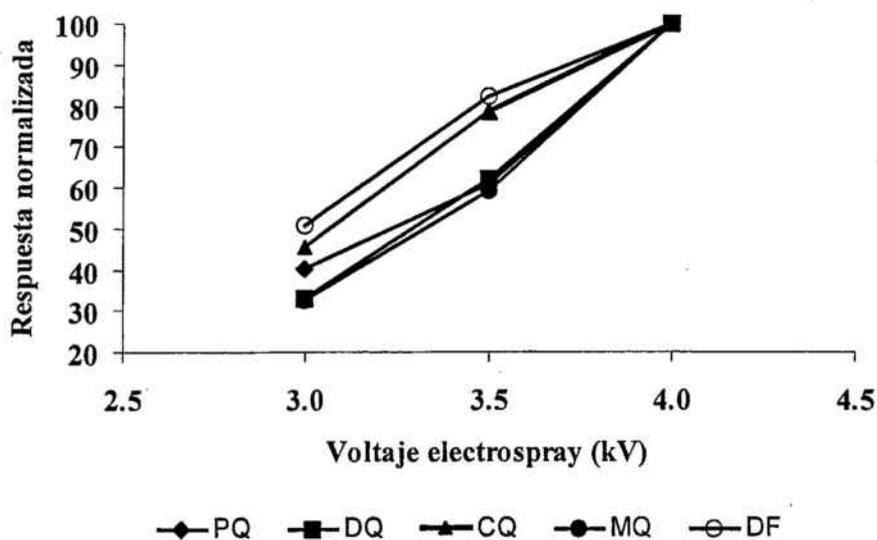


Figura 2.14. Variación de la respuesta de los cuats con respecto al voltaje de electropray.

mantenerse en el extremo del capilar electroforético que se acopla al espectrómetro de masas ya que produciría descargas eléctricas durante la formación del spray. Para la formación de éste, los voltajes adecuados se encuentran alrededor de 3-5 kV, de manera que las interfases para el acoplamiento deben estar configuradas para permitir la aplicación, en el extremo final del capilar electroforético, de un voltaje menor. En la Figura 2.14 se muestra la respuesta normalizada obtenida para los cuats con la variación del voltaje de electrospray. La señal de todos los analitos aumenta con el incremento del voltaje de electrospray aplicado. No obstante, voltajes elevados producen descargas eléctricas en la fuente que desestabilizan el spray y producen cortes en la señal adquirida. Por ello, se escogió 4 kV como valor óptimo.

Una vez optimizados los parámetros de fuente para obtener la máxima respuesta de los cuats, se inyectó una disolución patrón junto con los patrones internos EV y HV y los compuestos deuterados PQ-d₈, DQ-d₄ y CQ-d₄ registrándose el electroferograma CE-MS, que se muestra en la Figura 2.15. Como puede observarse, la separación electroforética obtenida es buena para todos los compuestos, incluso las parejas PQ/DQ y CQ/MQ, que al migrar en la misma zona son susceptibles de sufrir supresión iónica con la fuente ESI utilizada (Castro *et al.*, 1999), están perfectamente separadas evitando este fenómeno.

En la traza del PQ (*m/z* 186) aparece un segundo pico después del correspondiente al analito y que presenta una abundancia considerable (alrededor del 20 %). Este pico coincide con la aparición de los picos electroforéticos correspondientes al DQ-d₄ (*m/z* 188) y se debe a que este compuesto presenta un fragmento a una *m/z* 186 debido a la pérdida de un deuterio, [M-D]⁺.

Dado que la espectrometría de masas en tandem ofrece una mayor selectividad y, en general, también una mayor sensibilidad con respecto al modo de barrido completo de iones (*full scan*) se decidió estudiar y desarrollar un método CE-ESI/MS/MS para la determinación de los cuats, utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones. La fragmentación en la trampa de iones depende de las características del ion precursor independientemente del origen de éste. En un estudio anterior realizado en nuestro grupo de trabajo se habían establecido las condiciones óptimas de trabajo para la fragmentación de los cuats utilizando el acoplamiento LC-MS (Castro *et al.*, 2001b) y, por ello, no se creyó necesario volver a optimizar de manera exhaustiva estos parámetros para el acoplamiento CE-MS. No obstante, se estudiaron algunos parámetros para alguno de los compuestos con el fin de comprobar la validez de los parámetros previamente establecidos. A modo de ejemplo, en la Figura 2.16 se muestran las curvas de la respuesta obtenida para los iones del CQ y del MQ en función de la variación de uno de los parámetros más

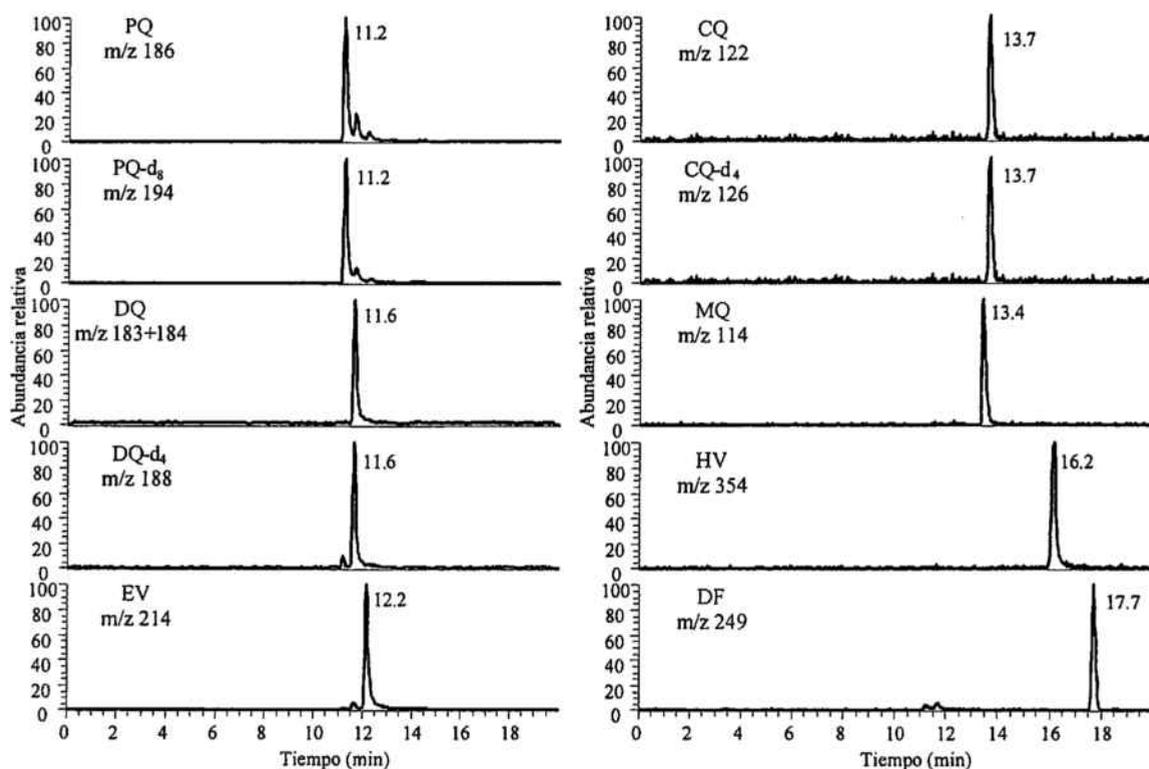


Figura 2.15. Electroforegrama de una mezcla de cuats, patrones internos (EV, HV) y compuestos deuterados (PQ-d₈, DQ-d₄, CQ-d₄) obtenido con el acoplamiento CE-ESI/MS bajo las condiciones óptimas de separación. Patrón preparado en agua Milli-Q (~0,3 mg l⁻¹). Inyección electrocinética (10s, 10 kV).

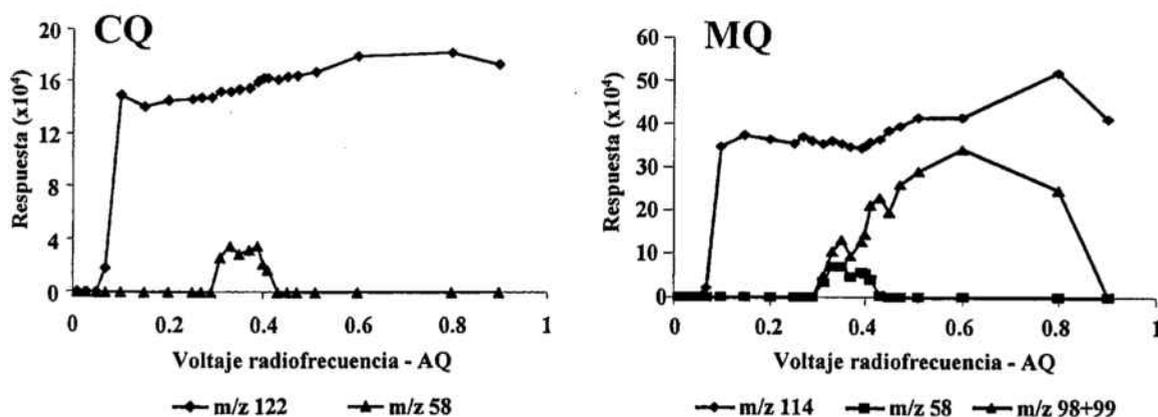


Figura 2.16. Variación de la señal del ion precursor y del ion producto de interés en función del voltaje de radiofrecuencia o *activation Q* (AQ) para los reguladores del crecimiento CQ y MQ.

importantes, como es el voltaje de radiofrecuencia (AQ). Estas curvas coinciden con las obtenidas previamente para este parámetro con el acoplamiento LC-MS/MS (Castro *et al.*, 2001b).

En la Tabla 2.4 se presentan los parámetros de adquisición seleccionados para el análisis de los cuats por CE-ESI/MS/MS. El electroferograma CE-ESI/MS/MS se adquirió en modo de barrido de iones producto (*product ion scan*) (los intervalos de masas utilizados están indicados en la Tabla 2.4) y el electroferograma se dividió en tres segmentos. En el primer segmento se adquirieron el PQ, el DQ, sus deuterados y el patrón interno EV, en el segundo segmento los reguladores del crecimiento CQ y MQ y el

Tabla 2.4. Parámetros de adquisición CE-ESI/MS/MS para el análisis de los cuats, patrones internos y compuestos deuterados. Límites de detección de los cuats en agua Milli-Q por CE-ESI/MS/MS.

Parámetro	PQ	DQ	CQ	MQ	DF	EV	HV	PQ (d ₈)	DQ (d ₄)	CQ (d ₄)
Barrido de iones producto (m/z)	65- 200	60- 200	50- 200	50- 200	105- 280	70- 250	115- 400	65- 200	65- 200	50- 200
Ion precursor (m/z)	186	184	122	114	249	214	354	194	188	126
Ion producto diagnóstico (m/z)	171	168	58	99	208	185	255	179	169	58
Ventana de aislamiento (m/z)	1,5	1,5	1,5	1,5	1,2	1,5	1,5	1,5	1,5	1,5
Activation Q	0,32	0,32	0,35	0,37	0,40	0,30	0,30	0,32	0,32	0,35
Energía Normalizada de colisión (%)	28	40	32	35	40	30	30	28	40	32
Tiempo de Activación (ms)	35	35	32	32	35	35	35	35	35	32
LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$), inyección hidrodinámica, 10s	1000	2500	1000	1000	1000					
LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$), inyección electrocinética, 20s a 10 kV	1,0	10	1,0	1,0	1,0					

deuterado del CQ y en el último segmento el DF y el patrón interno HV. En la Figura 2.17 se muestran, a modo de ejemplo, los electroferogramas obtenidos para los cuats con CE-ESI/MS/MS utilizando tanto inyección hidrodinámica como electrocinética.

Los límites de detección con CE-ESI/MS/MS se calcularon en base a la concentración de analito que produce una señal igual a tres veces el ruido de fondo del electroferograma. Los valores obtenidos, con patrones preparados en agua Milli-Q y utilizando ambos modos de inyección (hidrodinámica y electrocinética), se muestran en la Tabla 2.4. El uso de CE-ESI/MS/MS no produce una mejora considerable en la respuesta con respecto a la obtenida con CE-ESI/MS, ya que las muestras de agua analizadas

presentan una matriz bastante limpia por lo que la mejora en el ruido de fondo obtenida al trabajar en MS/MS queda compensada por la disminución de señal que se produce simultáneamente en este modo.

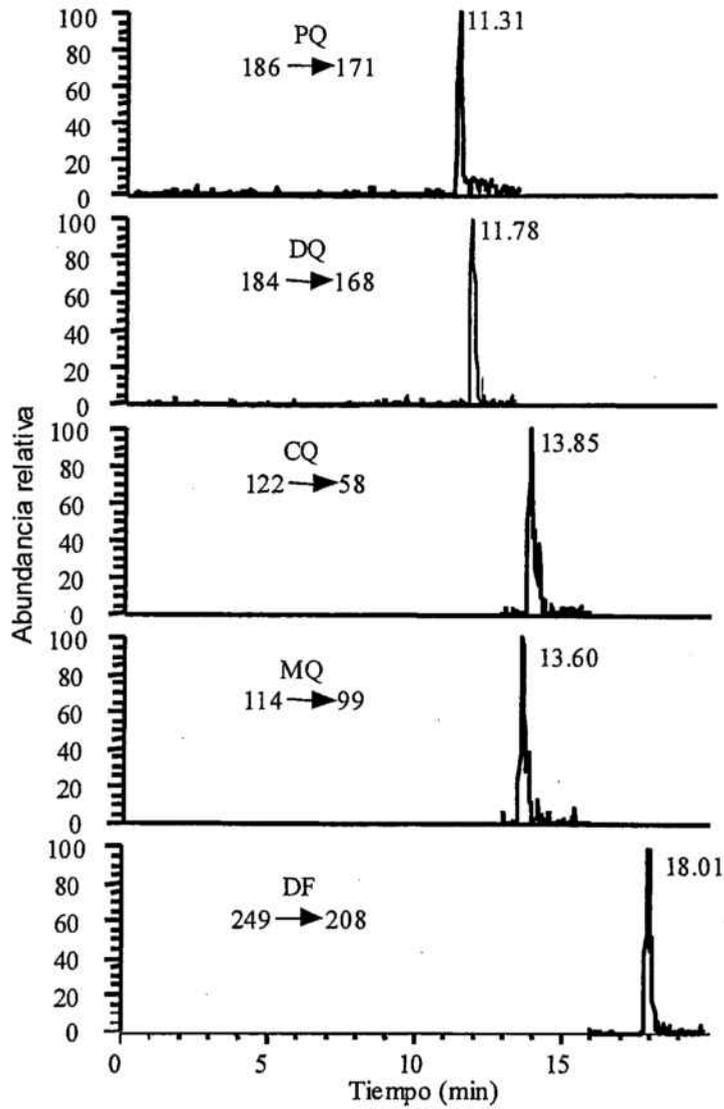


Figura 2.17. Electroferograma obtenidos por CE-ESI/MS/MS para un patrón de cuats preparado en agua Milli-Q. Concentración: $0,1 \text{ mg l}^{-1}$, inyección electrocinética, 10 s a 10 kV ($NL 9,5 \cdot 10^3 - 7,6 \cdot 10^4$).

2.3.2.4. Artículo IV

Capillary electrophoresis-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides

O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran

Journal of Chromatography A, 974 (2002) 243-255.



ELSEVIER

Journal of Chromatography A, 974 (2002) 243–255

JOURNAL OF
CHROMATOGRAPHY A

www.elsevier.com/locate/chroma

Capillary electrophoresis–mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides

Oscar Núñez, Encarnación Moyano, Maria Teresa Galceran*

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1–11, E-08028 Barcelona, Spain

Abstract

Conditions for the simultaneous determination of the three herbicides paraquat, diquat and difenzoquat and the two plant growth regulators chlormequat and mepiquat by pressure-assisted capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry (ion-trap) using electrospray as ionisation source have been established. A 200 mM formic acid–ammonium formate buffer solution at pH 3.0 with 50% of methanol was used as carrier electrolyte. Some capillary electrophoresis–mass spectrometry parameters such as sheath liquid and sheath gas flow-rates, sheath liquid composition, electrospray voltage and the CE capillary position were optimised. The MS and MS–MS spectra of positive ions were studied in order to obtain structural information for the confirmation of the identity. The use of labelled standards allowed to confirm fragment ions assignment. The detection limits, based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were between 0.5 and 2.5 mg l⁻¹ with hydrodynamic injection (10 s) and between 1 and 10 µg l⁻¹ with electrokinetic injection (20 s, 10 kV) using standards in ultrapure water. Quality parameters such as linearity and run-to-run precision (*n*=6) were established. Quantitation was carried out using labelled standards. The method has been applied to the analysis of contaminated irrigation water and spiked mineral water samples. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Water analysis; Quaternary ammonium herbicides; Pesticides

1. Introduction

The increased dependency of modern agricultural practice upon herbicides to control weeds and increase crop yield has led to concerns about their residues in different environmental samples. Among pesticides, the group of quaternary ammonium herbicides (quats) is of major economic importance. This group includes two non-selective contact herbicides, paraquat (PQ), which has been marketed in over 130 countries as highly effective herbicide, and diquat (DQ), the selective herbicide difenzoquat

(DF), and two plant growth regulators, chlormequat (CQ) and mepiquat (MQ) [1]. These compounds are widely used to control many types of weeds, insects and other pests in a wide variety of agricultural and non-agricultural settings. Because of their moderate toxicity [2], there is a great concern about the presence of these compounds in fruits, soils and waters. For drinking waters, the Office of Water of the US Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum contaminant level of 20 µg l⁻¹ for DQ and a maximum contaminant level goal of 3 µg l⁻¹ for PQ [3,4]. Thus, analytical techniques of enough sensitivity and selectivity are needed to monitor the quality of drinking water.

Although a great number of techniques have been used for the analysis of these compounds, ion-pair

*Corresponding author. Tel.: +34-93-402-1275; fax: +34-93-402-1233.

E-mail address: galceran@apolo.qui.ub.es (M.T. Galceran).

high-performance liquid chromatography (HPLC) [5–7] and capillary electrophoresis (CE) [5,8–12] using UV detection were the most frequently applied. However, the analysis of the plant growth regulators, which do not have chromophore groups, requires the use of indirect UV detection [13]. The major disadvantage of these methods is the lack of analytical specificity, which results in identification and quantification difficulties. The use of mass spectrometry (MS) as a detection technique allows to overcome these problems and permits the simultaneous analysis of the three herbicides and the two plant growth regulators. Recently, there is a great interest about the presence of residues of chlormequat in fruits and different studies applying liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC–MS) have been published [14–17]. LC–MS has also been widely applied for the analysis of quats in drinking water [18–22].

Since quats are ionic species the use of CE for their analysis without the requirement of using ion-pair reagents seems ideal. Recently, the development in coupling CE to mass spectrometry (CE–MS) has been remarkable. This coupling combines the advantages of both techniques such as the high resolution power of CE and the detection and identification potential of MS, which provides a powerful tool for the separation and identification of quats. Among the different ionisation sources developed for LC–MS, the electrospray (ES) is the most widely used for on-line CE–MS [23–25]. Nevertheless, when coupling the CE to the mass spectrometer an interface is necessary to close the electrical circuit and to achieve the flow needed (about $\mu\text{l min}^{-1}$) for electrospray optimal conditions. The most frequently used interface is a coaxial sheath flow system [26], although now, with developments in nanoelectrospray techniques, new interfaces based in sheathless systems are also used [27]. Few papers using CE–MS for the analysis of quats [28–30] have been published and only one proposes a method for the simultaneous analysis of the five compounds [28].

In this work the potential of CE–MS using electrospray as an ionisation source for the analysis of quats in the environment was studied. Different coupling parameters such as sheath liquid and sheath gas flow-rates, sheath liquid composition, electrospray voltage, and capillary position into the electro-

spray source were optimised. The MS–MS spectra of positive ions were studied in order to identify the compounds and the fragments obtained were discussed. Quality parameters such as limits of detection (LODs), run-to-run precision and linearity were obtained using both hydrodynamic and electrokinetic injection. Quantitation using conventional internal standards and labelled compounds was compared. Finally the method was applied to the analysis of a highly contaminated irrigation water and spiked mineral water samples.

2. Experimental

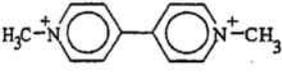
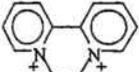
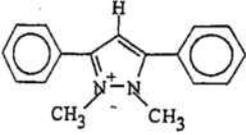
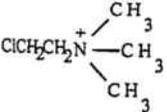
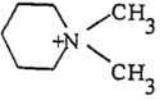
2.1. Chemicals

The quaternary ammonium herbicides were obtained from the following sources: diquat (1,1'-diethylene-2,2'-bipyridinium ion, DQ), difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium ion, DF) and chlormequat (2-chloroethyltrimethylammonium ion, CQ) were purchased from Chemservice (West Chester, PA, USA), paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion, PQ) from Sigma (St. Louis, MO, USA), and mepiquat (1,1'-dimethylpyperidinium ion, MQ) from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Ethylviologen (1,1'-diethyl-4,4'-bipyridinium ion, EV) purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and heptylviologen (1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium ion, HV) from TCI (Tokyo, Japan) were used as internal standards. The deuterated analytes paraquat- d_8 (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium-rings- d_8 ion, PQ- d_8), diquat- d_4 (1,1'-ethylene- d_4 -2,2'-dipyridinium ion, DQ- d_4) and chlormequat- d_4 (2-chloroethyl- d_4 -trimethylammonium ion, CQ- d_4 , 100 mg l^{-1}) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). The structures of all these compounds are shown in Tables 1 and 2.

All the reagents were of analytical grade. Methanol, acetic acid (100%), formic acid (98–100%), ammonium acetate, sodium hydroxide and hydrochloric acid (25%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany), and ammonium formate from Fluka (Buchs, Switzerland). Water was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock standard solutions of individual quats, PQ-

Table 1
Mass spectra of quaternary ammonium herbicides in CE-MS and CE-MS-MS

Structure	Name	Retention time (min)	MS spectra		MS-MS spectra		
			<i>m/z</i> (% relative abundance)	Assignment	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i> (% relative abundance)	Assignment
	Paraquat (PQ)	10.4	186 (100) 185 (22) 171 (28) 93 (24)	[Cat] ⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat-CH ₃] ⁺ [Cat] ²⁺	186	185 (<5) 171 (100)	[Cat-H] ⁺ [Cat-CH ₃] ⁺
	Diquat (DQ)	10.8	184 (100) 183 (57) 92 (12)	[Cat] ⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat] ²⁺	184	183 (96) 168 (100) 158 (71) 157 (92)	[Cat-H] ⁺ [Cat-NH ₂] ⁺ or [Cat-CH ₄] ⁺ [Cat-C ₂ H ₂] ⁺ [Cat-C ₂ H ₃] ⁺ or [Cat-CN] ⁺
	Difenzoquat (DF)	16.9	249 (100)	[Cat] ⁺	249	234 (25) 208 (100) 193 (83) 146 (27) 131 (33) 118 (6)	[Cat-CH ₃] ⁺ [Cat-(NCH ₃) ₂ +2H+CH ₃] ⁺ [Cat-(NCH ₃) ₂ +2H] ⁺ [Cat-C ₆ H ₅ -CNCH ₃ +CH ₃] ⁺ [Cat-C ₆ H ₅ -CNCH ₃] ⁺ [Cat-C ₆ H ₅ -C ₂ HNCH ₃] ⁺
	Chlormequat (CQ)	12.5	122 (100) 124 (34)	[Cat] ⁺ [Cat+2] ⁺	122	94 (36) 86 (7) 63 (28) 59 (65) 58 (100)	[Cat-C ₂ H ₄] ⁺ [Cat-HCl] ⁺ [Cat-N(CH ₃) ₃] ⁺ [Cat-ClC ₂ H ₄] ⁺ [Cat-ClC ₂ H ₅] ⁺
	Mepiquat (MQ)	12.4	114 (100)	[Cat] ⁺	114	99 (82) 98 (100) 58 (96)	[Cat-CH ₃] ⁺ [Cat-CH ₃ -H] ⁺ [Cat-C ₄ H ₈] ⁺

d₈, DQ-d₄ and internal standards (1 mg ml⁻¹) were prepared in ultrapure water and stored in plastic vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by dilution with ultrapure water, and were filtered through a 0.45 μm nylon filter. Buffers were prepared from an aqueous solution of formic acid 400 mM and the pH 3.0 was adjusted with ammonium formate (400 mM). The final carrier elec-

trolyte was obtained by mixing the previous buffer with methanol 1:1.

2.2. Capillary electrophoresis instrumentation

The experiments were performed on a Beckman P/ACE 5500 capillary electrophoresis system (Fullerton, CA, USA) equipped with a diode array

Table 2
Mass spectra of internal standard and labelled compounds in CE–MS and CE–MS–MS

Structure	Name	Retention time (min)	MS spectra		MS–MS spectra		
			<i>m/z</i> (% relative abundance)	Assignment	Precursor ion <i>m/z</i>	Product ion <i>m/z</i> (% relative abundance)	Assignment
	Ethylviologen (EV)	11.5	214 (100) 213 (11) 185 (45) 107 (26)	[Cat] ²⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat-C ₂ H ₅] ⁺ [Cat] ²⁺	214	213 (22) 185 (100)	[Cat-H] ⁺ [Cat-C ₂ H ₅] ⁺
	Heptylviologen (HV)	14.2	354 (100) 353 (12) 255 (61) 177 (85)	[Cat] ²⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat-C ₇ H ₁₅] ⁺ [Cat] ²⁺	354	353 (<5) 255 (100)	[Cat-H] ⁺ [Cat-C ₇ H ₁₅] ⁺
	Paraquat-d ₈ (PQ-d ₈)	10.4	194 (100) 193 (9) 179 (15) 97 (13)	[Cat] ²⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat-CH ₃] ⁺ [Cat] ²⁺	194	193 (45) 179 (100)	[Cat-H] ⁺ [Cat-CH ₃] ⁺
	Diquat-d ₄ (DQ-d ₄)	10.8	188 (100) 187 (34) 186 (67) 94 (13)	[Cat] ²⁺ [Cat-H] ⁺ [Cat-D] ⁺ [Cat] ²⁺	188	187 (35) 186 (10) 171 (26) 170 (33) 169 (100) 160 (15) 159 (26)	[Cat-H] ⁺ [Cat-D] ⁺ [Cat-NHD] ⁺ [Cat-ND ₂] ⁺ [Cat-CD ₂ H] ⁺ [Cat-C ₂ D ₂ H] ⁺ or [Cat-CND] ⁺ [Cat-C ₂ D ₂ H] ⁺
	Chlomequat-d ₄ (CQ-d ₄)	12.5	126 (100) 128 (34)	[Cat] ²⁺ [Cat+2] ⁺	126	94 (68) 89 (5) 67 (21) 59 (71) 58 (100)	[Cat-C ₂ D ₄] ⁺ [Cat-DCl] ⁺ [Cat-N(CH ₃) ₃] ⁺ [Cat-ClC ₂ D ₄] ⁺ [Cat-ClC ₂ D ₄ H] ⁺

detection system and modified to permit the coupling with a mass spectrometer. The electrophoretic separations were carried out using uncoated fused-silica capillaries (Beckman) with a total length of 80 cm × 50 μm I.D. and a 200 mM formic acid–ammonium formate buffer solution, pH 3.0, containing 50% of methanol as carrier electrolyte. The temperature was

held at 25 °C. The buffer was filtered through a 0.45 μm membrane filter, and degassed by sonication before use. Samples were loaded by using two injection modes: hydrodynamic injection pressure assisted (35 kPa, 10 s) and electrokinetic injection (+10 kV, 10–20 s). When the injection was performed, the electrospray voltage was turned off in

order to prevent the electrokinetic introduction of the analytes. Pressure-assisted electrophoretic separations were performed by applying simultaneously a voltage of +25 kV and an overimposed pressure of 35 kPa on the inlet vial during the whole run. The CE instrument was controlled using a Beckman P/ACE station software version 1.0.

2.3. Mass spectrometry instrumentation

An LCQ mass spectrometer (Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with a tricoaxial pneumatically assisted ES ionisation source designed for the CE-MS coupling and with an ion trap as analyser was used. A solution of methanol–10 mM acetic acid (9:1) at a flow-rate of 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ was used as sheath liquid after degassed by sonication in order to avoid bubble formation. The ES was pneumatically assisted by nitrogen as sheath gas at a flow-rate of 13.5 l h^{-1} (15 arbitrary units). The electrospray needle was set at +4.0 kV and the heated capillary temperature was held at 250 °C. The CE capillary protrudes from the electrospray needle 0.1 mm, and the distance to the heated capillary was 1.5 cm. Moreover 0.5–1 cm of the polyamide coating was eliminated from the end of the fused-silica capillary in order to improve the wettability by the sheath liquid.

CE-MS data acquisition was carried out in full scan mode from m/z 50 to 400 in centroid mode using a maximum injection time of 100 ms and performing 6 μscans . The CE-MS-MS data acquisition was performed in the full scan mode using a maximum injection time of 200 ms with 1 μscans . Isolation width (m/z) between 1.2 and 1.5 was used, the activation Q (AQ) was set between 0.3 and 0.4, the activation amplitude (AA, %) from 28 to 40 and the activation time (AT) between 32 and 35 ms. Mass spectrometry data were processed with a Xcalibur 1.2 software.

2.4. Capillary conditioning

New capillaries were pre-treated using 0.1 M hydrochloric acid for 15 min, ultrapure water for 15 min, 1 M sodium hydroxide for 30 min, and finally rinsed with ultrapure water for 30 min. At the beginning of each session, the capillary was rinsed with 400 mM formic acid–ammonium formate buf-

fer at pH 3.0 during 30 min and finally with the carrier electrolyte for 60 min. The conditioning method was carried out daily in order to prevent adsorption of the quaternary ammonium herbicides on the capillary wall. Finally, the capillary was rinsed with carrier electrolyte for 1 min between runs and stored after rinsed with 50 mM formic acid–ammonium formate buffer at pH 3.0.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary study and electrophoretic separation

In this work a volatile buffer, 50 mM acetic acid–ammonium acetate at pH 4.0 with 10% methanol, was used as carrier electrolyte. At these conditions, poor resolution for PQ/DQ and CQ/MQ was obtained. Moreover, an important problem in the analysis of quats by MS is the decrease in the responses of these compounds when coelution between them occurred due to ionic suppression in the electrospray source [33]. For this reason the electrophoretic separation of quats must be improved.

In capillary electrophoresis the poor resolution for the quats is mainly due to the important adsorption on the wall silica capillary that produced tailing peaks. To improve the separation different parameters such as buffer concentration, amount of methanol and pH of carrier electrolyte were studied. An increase in the ionic strength of the carrier electrolyte by increasing the buffer concentration reduced the adsorption of these compounds and improved the peak shapes. Different buffer concentrations from 50 to 260 mM were tested and 200 mM was chosen as a compromise between separation and the capillary current suitable for the CE-MS coupling. Moreover, the addition of different amounts of methanol to the carrier electrolyte was also studied in order to achieve better separations. It was observed that the increase of methanol improved the resolution between PQ and DQ but decreased the resolution between CQ and MQ. For instance, using a 200 mM acetic acid–ammonium acetate at pH 4.0 with 30% methanol, a baseline resolution for PQ/DQ was obtained but, in contrast, CQ/MQ comigrated. With higher amounts of methanol, the migration order of

MQ and CQ changed due to the higher mobility of MQ and using 50% of methanol a base line resolution for these compounds was obtained. So, to get a good electrophoretic separation of quats, high concentration buffers with high amounts of methanol were required although the analysis time increased because of the lower electroosmotic flow. Moreover, buffers at lower pH (3.5 and 3.0) were tested in order to reduce the ionisation of silanol groups of the capillary wall and consequently to decrease the electrostatic interaction between quats and the negatively charged surface. A 200 mM formic acid–ammonium formate buffer at pH 3.0 with 50% of methanol used as carrier electrolyte gave the best electrophoretic separation. Nevertheless, in these conditions the electroosmotic flow was too low to guaranty the introduction of the ions into the mass spectrometer and keep the electric contact. For this reason, an overimposed pressure of 35 kPa on the inlet vial was applied during the whole run. Migration times of quats, internal standards and labelled compounds under optimal electrophoretic conditions are given in Tables 1 and 2. Good electrophoretic separation of all the compounds was obtained.

3.2. Optimisation of the coupling parameters

The ES-MS instrumental parameters such as sheath liquid flow-rate, sheath gas flow-rate, sheath liquid composition, electrospray voltage, size of the CE capillary protruding from the sheath liquid tube and distance between the electrospray needle and the MS heated capillary were optimised in order to obtain the higher response. To optimise these parameters a standard solution of 15 mg l⁻¹ of quats prepared in ultrapure water was used. The introduction of the standard solution was performed by hydrodynamic injection (10 s, 35 kPa).

Fig. 1 shows the normalised response of the five herbicides with the variation of the sheath liquid flow-rate from 3 to 12 $\mu\text{l min}^{-1}$ (Fig. 1a), the sheath gas flow-rate from 4.5 to 18 l h⁻¹ (Fig. 1b) and the amount of methanol (from 50 to 90%) as organic solvent into the sheath liquid (Fig. 1c). When the sheath liquid flow-rate increased (Fig. 1a) the response of the herbicides decreased until 5 $\mu\text{l min}^{-1}$ due to the dilution. Moreover, a maximum response of the herbicides was obtained when 13.5 l h⁻¹

sheath gas flow-rate was used (Fig. 1b). At flow-rates too low or too high the response decreased due to the electrospray instability. In order to obtain the maximal response sheath liquid and sheath gas flow-rates of 3 $\mu\text{l min}^{-1}$ and 13.5 l h⁻¹, respectively, were used.

The composition of the sheath liquid is critical to the performance of the CE-MS system. Methanol was added to increase the ionisation efficiency and acetic acid was chosen as electrolyte to have a conductive solution that permits closing the electrical circuit between the CE and the electrospray source. The normalised response of the herbicides with the amount of methanol in the sheath liquid is given in Fig. 1c. The maximal response was obtained using a mixture of methanol–10 mM acetic acid (9:1) as sheath liquid.

The electrospray voltage was optimised from 3.0 to 4.5 kV. The response increased when the electrospray voltage raised but when values higher than 4.0 kV were used discharges occurred in the electrospray source. So 4.0 kV was chosen as the optimum value. The distance that the CE capillary protrudes from the electrospray needle was also optimised because it may seriously affect the performance of the system [23]. The variation of the normalised response of the herbicides when this distance was varied between 0.05 to 0.3 mm is shown in Fig. 1d. Maximum response was achieved when the CE capillary only protruded 0.1 mm from the sheath liquid tube. At lower and higher values the response decreased probably due to the instability in the formation of the charged droplets in the electrospray.

The distance between the electrospray needle and the MS heated capillary must be optimised in order to achieve a high efficiency in the transmission of the ions. This parameter was studied by positioning the interface in the minor and in the major values permitted by the instrument, 1.5 and 2.5 cm, respectively. An important increase in the response (60–90%) was observed when 1.5 cm was used, due to the proximity between the spray and the MS heated capillary which permits the introduction of a major number of ions into the mass spectrometer.

3.3. Mass spectrometry

Full scan MS and MS-MS spectra were obtained for the cationic herbicides in order to identify and

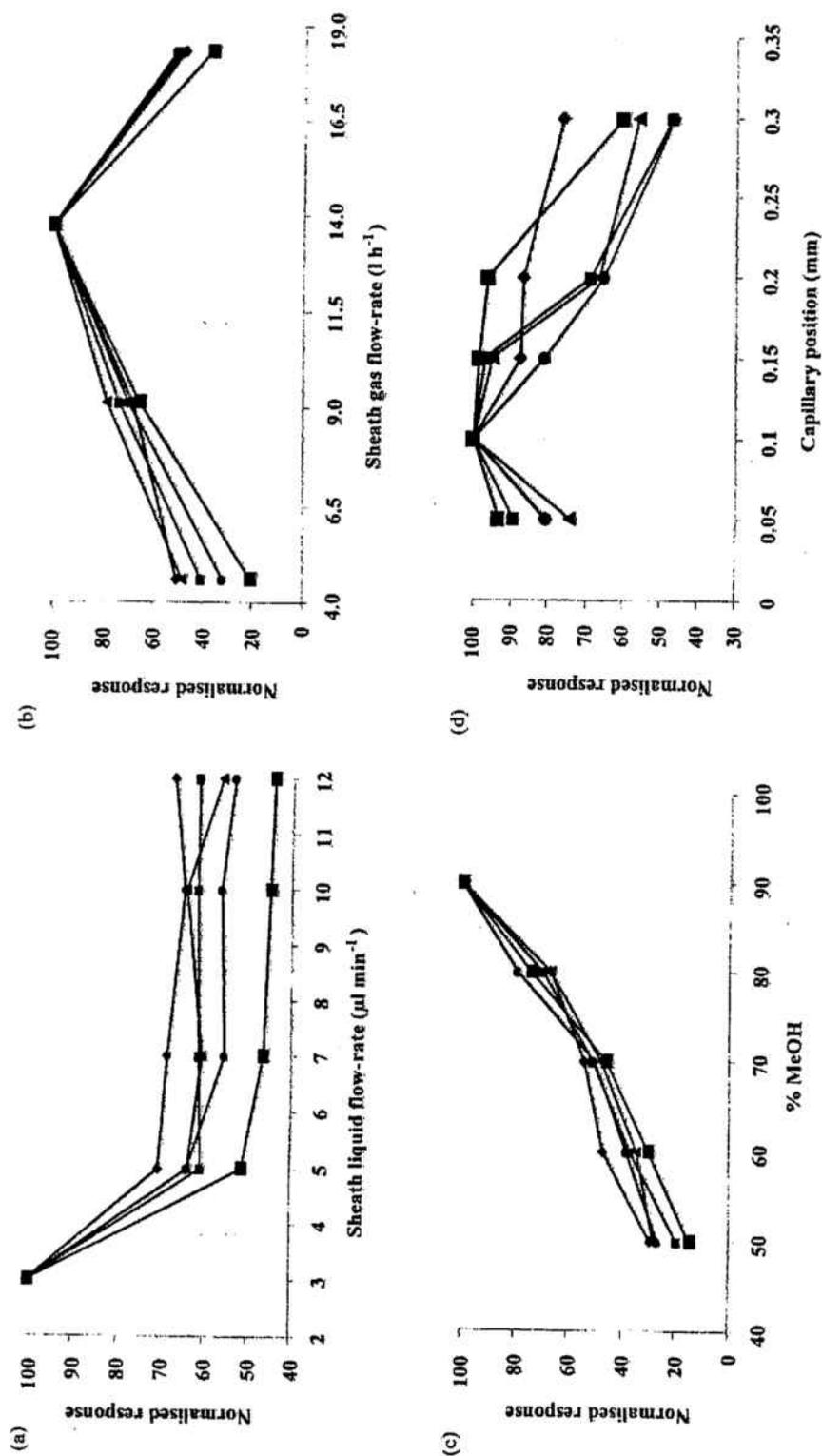


Fig. 1. Normalised response of quaternary ammonium herbicides. Effect of: (a) sheath liquid flow-rate, (sheath gas flow-rate, 13.5 l h^{-1} ; sheath liquid, methanol–10 mM acetic acid, 8:2); (b) sheath gas flow-rate, (sheath liquid flow-rate, $3 \mu\text{l min}^{-1}$; sheath liquid, methanol–10 mM acetic acid, 8:2); (c) amount of methanol in the sheath liquid (sheath gas flow-rate, 13.5 l h^{-1} ; sheath liquid flow-rate, $3 \mu\text{l min}^{-1}$) and (d) CE capillary distance that protrudes from the electrospray needle. Electrophoretic conditions: Standard solution (15 mg l^{-1}); hydrodynamic injection, 10 s (35 kPa); applied potential, $+25 \text{ kV}$ with an overimposed pressure of 35 kPa on the inlet vial during the whole run; carrier electrolyte 200 mM formic acid–ammonium formate containing (pH 3.0) 50% methanol. \diamond , PQ; \blacktriangle , DQ; \blacksquare , MQ; \bullet , DF.

characterise these compounds. The CE–MS spectra data for quats, labelled compounds and internal standards are given in Tables 1 and 2. DF, CQ and MQ gave the molecular ion $[\text{Cat}]^+$ at m/z 249, 122 and 114, respectively, as the most abundant peak. CQ also gave the ion at m/z 124 corresponding to the ^{37}Cl isotopic contribution and CQ- d_4 (Table 2) showed the equivalent spectrum to CQ shifted in mass according to the deuterium atoms (m/z 126 and 128). These spectral data agree with those obtained in a previous work [28] using a quadrupole as analyser, except for CQ. For this compound the fragment ion at m/z 73 assigned to $[\text{Cat-Cl-CH}_2]^+$ was not observed when we used an ion-trap. PQ and DQ showed a more fragmented CE–MS spectra. PQ gave the molecular radical ion $[\text{Cat}]^{\cdot+}$ at m/z 186 as the most abundant peak and the ions at m/z 185 and 171 assigned to $[\text{Cat-H}]^+$ and $[\text{Cat-CH}_3]^+$, respectively. PQ- d_8 gave a similar spectrum to PQ shifted in mass according to the deuterium atoms in the aromatic rings. Moreover, the spectral data of this deuterated compound showed that the loss of H came from the methyl group. For both, DQ and DQ- d_4 the most abundant peak was the molecular radical ion $[\text{Cat}]^{\cdot+}$ (m/z 184 and 188, respectively). Moreover, the peak in the spectrum of DQ at m/z 183 assigned to $[\text{Cat-H}]^+$ correspond to two peaks in the DQ- d_4 spectrum (m/z 187 and 186). While the ion at m/z 186 could be assigned to the loss of a deuterium atom from the ethylene group, the ion at m/z 187 could only be explained if an hydrogen–deuterium exchange occurred in the molecule [34], making possible the loss of H of the d_4 -ethylene group. Other interesting peaks in the PQ, PQ- d_8 , DQ and DQ- d_4 spectra are the doubly charged molecular ions $[\text{Cat}]^{2+}$, m/z 93, 97, 92 and 94, respectively. These doubly charged ions were also observed by other authors when using CE–MS [28–30] and LC–MS [33,35] in combination with methanol/water mobile phases or carrier electrolytes, but they are inhibited by the presence of acetonitrile or ion-pair reagents in the mobile phase [18].

The two internal standards, EV and HV, have equivalent structures to PQ and the spectra were quite similar showing the molecular radical ion $[\text{Cat}]^{\cdot+}$, the doubled charged ion $[\text{Cat}]^{2+}$, the loss of an hydrogen from the alkyl group $[\text{Cat-H}]^+$ and the

loss of the alkyl group ($[\text{Cat-C}_2\text{H}_5]^+$ for EV and $[\text{Cat-C}_7\text{H}_{15}]^+$ for HV).

During the collision-induced dissociation (CID) step in an ion trap, a resonance excitation voltage has to be applied to the endcap electrodes to fragment parent ions into product ions in order to perform the MS–MS experiments. This CID energy is controlled by the magnitude (AA, activation amplitude) and the duration (AT, activation time) of the resonant excitation voltage and the magnitude of the trapping radio frequency (RF) voltage (AQ, activation Q) [31,32]. We have used the values previously optimised for quats [18] and we have obtained the corresponding values for labelled compounds and internal standards.

PQ and PQ- d_8 gave a similar MS–MS spectrum shifted in mass according to the deuterated atoms and providing as the most abundant peak the fragment corresponding to the loss of the methyl group. The lost of an hydrogen from the methyl group was also observed. DQ, CQ, MQ and DF showed a more complicated MS–MS spectra. The lost of an hydrogen was one of the more abundant peaks (m/z 183, $[\text{Cat-H}]^+$) for DQ that in the spectrum of DQ- d_4 corresponded to the peaks at m/z 187 ($[\text{Cat-H}]^+$) and 186 ($[\text{Cat-D}]^+$). The base peak for DQ was the ion at m/z 168, assigned in previous works [18,28] to $[\text{Cat-NH}_2]^+$ which can be related with peaks at m/z 171 ($[\text{Cat-NHD}]^+$) and 170 ($[\text{Cat-ND}_2]^+$) in the DQ- d_4 spectrum, taking into account the hydrogen–deuterium exchange previously commented. Moreover, the ion at m/z 168 can also be assigned to $[\text{Cat-CH}_4]^{\cdot+}$ in agreement with the ion at m/z 169 $[\text{Cat-CD}_3\text{H}]^{\cdot+}$ that is the base peak for DQ- d_4 . DQ also gave two fragments at m/z 158 and 157 that can be correlated with losses on the ethylene group, $[\text{Cat-C}_2\text{H}_2]^{\cdot+}$ and $[\text{Cat-C}_2\text{H}_3]^+$ or $[\text{Cat-CN}]^{\cdot+}$, respectively, which has been confirmed in the DQ- d_4 spectrum by the presence of fragment ions at m/z 159 and 160 assigned to $[\text{Cat-C}_2\text{D}_2\text{H}]^+$ (with an hydrogen–deuterium exchange) and $[\text{Cat-C}_2\text{D}_2]^{\cdot+}$ or $[\text{Cat-CND}]^{\cdot+}$. The lost of C_2D_3 was also observed although the relative abundance of this ion was lower than 5%.

CQ gave the ions at m/z 94, 86, 63, 59 and 58, corresponding to $[\text{Cat-C}_2\text{H}_4]^+$, $[\text{Cat-HCl}]^+$, $[\text{Cat-N}(\text{CH}_3)_3]^+$, $[\text{Cat-ClC}_2\text{H}_4]^{\cdot+}$ and $[\text{Cat-ClC}_2\text{H}_5]^+$, respectively. The fragment ions at m/z 86 and 94,

explained as the neutral loss of HCl and as an ion/molecule reaction between the ion at m/z 59 and the HCl present in the ion trap [18], respectively, were not observed with quadrupol mass spectrometers [14,15,28]. The labelled CQ-d₄ gave fragment ions that agree with those proposed for the non-labelled compound. MQ gave the fragment ions at m/z 99, 98 and 58, assigned as [Cat-CH₃]⁺, [Cat-CH₃-H]⁺ and [Cat-C₄H₈]⁺ respectively. The fragment ion at m/z 99 was not observed when a quadrupol was used as analyser [28]. DF gave the ions at m/z 234, 208, 193, 146, 131 and 118 (Table 1). The ion at m/z 234 produced a radical $\cdot\text{CH}_3$ which can react by an ion-molecule reaction in the ion-trap with the ions at m/z 193 and 131 to produce the ions at m/z 208 and 146, respectively. All the ions obtained for MQ, CQ and DF with the CE-MS-MS experiments agree with those obtained with LC-MS-MS using the same analyser [18]. The MS-MS spectra of the two internal standards EV and HV were very simple and they only gave the loss of the alkyl group as the most abundant peak and also the loss of hydrogen from the alkyl group.

3.4. Quality parameters in ultrapure water

Quality parameters using the proposed CE-MS method with both hydrodynamic injection and electrokinetic injection were obtained and the figures are given in Table 3. The LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 were lower than 3 mg l⁻¹ when hydrodynamic injection (10 s) was used. Using electrokinetic injection (10 kV) the LODs decreased to 5–30 µg l⁻¹ when the samples were injected

during 10 s and to 1–10 µg l⁻¹ if 20 s were used. These LODs are similar than those obtained using a quadrupol as analyser [28]. The molecular ions (for CQ, MQ and DF) and the radical molecular ion (for PQ) have been used for CE-MS quantitation purposes. Nevertheless, for DQ the relative abundance of the ions at m/z 184 ([Cat]⁺) and 183 ([Cat-H]⁺) was not constant so the signal of both ions (m/z 183+184) was monitored. Calibration curves based on the peak area ratio ($A_{\text{compound}}/A_{\text{internal standard}}$ or $A_{\text{compound}}/A_{\text{labelled compound}}$) for the five herbicides at concentrations between 2.5 and 40 mg l⁻¹ (hydrodynamic injection, 10 s) and between 0.01 and 0.8 mg l⁻¹ (electrokinetic injection, 10 s) and using EV and HV as internal standards were obtained showing acceptable linearities ($r > 0.924$). Better results ($r > 0.993$) were achieved by using labelled compounds as internal standards. Six replicate determinations of a standard solution of the five herbicides at ~15 mg l⁻¹ (hydrodynamic injection) and ~0.3 mg l⁻¹ (electrokinetic injection) were carried out under optimum conditions to determine run-to-run reproducibility and the relative standard deviations (RSDs) based on concentration ranged between 7 and 12% for hydrodynamic injection and between 11 and 17% for electrokinetic injection. Nevertheless, when labelled compounds were used as internal standard the run-to-run reproducibility improved obtaining RSDs between 2 and 5% and between 8 and 13% for hydrodynamic and electrokinetic injection, respectively. Moreover good accuracy was achieved and the best results were obtained when labelled compounds were used (bias lower than 8.5%).

Table 3
CE-MS quality parameters (ultrapure water)

Compound	LOD		Run-to-run (n=6)				
	Hydrodynamic injection, 10 s (µg l ⁻¹)	Electrokinetic injection		Hydrodynamic injection (10 s)		Electrokinetic injection (10 s)	
		10 s (µg l ⁻¹)	10 s (µg l ⁻¹)	20 s (µg l ⁻¹)	I.S. (EN, HV) ^a (% RSD)	Labelled I.S. ^b (% RSD)	I.S. (EN, HV) ^a (% RSD)
PQ	2000	30	1	7	4	17	10
DQ	3000	30	10	8	5	11	8
CQ	1000	8	1	12	2	17	8
MQ	1000	8	1	12	3	14	9
DF	500	8	1	10	2	16	13

^a EV for PQ and DQ; HV for CQ, MQ and DF.

^b PQ-d₄ for PQ; DQ-d₄ for DQ; CQ-d₄ for CQ, MQ and DF.

For the CE-MS-MS study, the LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 were obtained. With hydrodynamic injection, the LODs were in the range 1–3 mg l⁻¹ and with electrokinetic injection (20 s, 10 kV) were in the range 1–10 µg l⁻¹. When CE-MS-MS was used, the noise decreased three times with respect the CE-MS noise, and the signal of the product ion also decreased in the same proportion. For this reason, the detection did not increase and the LODs obtained using CE-MS-MS were similar than those obtained with CE-MS. Then, CE-MS is proposed for quantitation and CE-MS-MS is only proposed for confirmation purposes.

3.5. Application

A highly contaminated irrigation water was ana-

lysed using the CE-MS method with hydrodynamic injection. Fig. 2 shows the electropherogram obtained for this sample. Two quaternary ammonium herbicides, PQ and DQ, were identified and quantified using CE-MS, and CE-MS-MS was used for confirmation.

The analysis of the sample was performed by standard addition ($n=3$) and using the labelled compounds PQ-d₈ and DQ-d₄ as internal standards. The results of the analysis were 12.5±0.5 mg l⁻¹ for PQ and 6.2±1.2 mg l⁻¹ for DQ. Moreover, this sample was also analysed by LC-MS using a chromatographic method previously developed [19] and the results obtained were in agreement (PQ: 11.3±0.8 mg l⁻¹, DQ: 7.6±0.3 mg l⁻¹) with those of CE-MS. Lower analysis times and similar precision were obtained for both techniques although

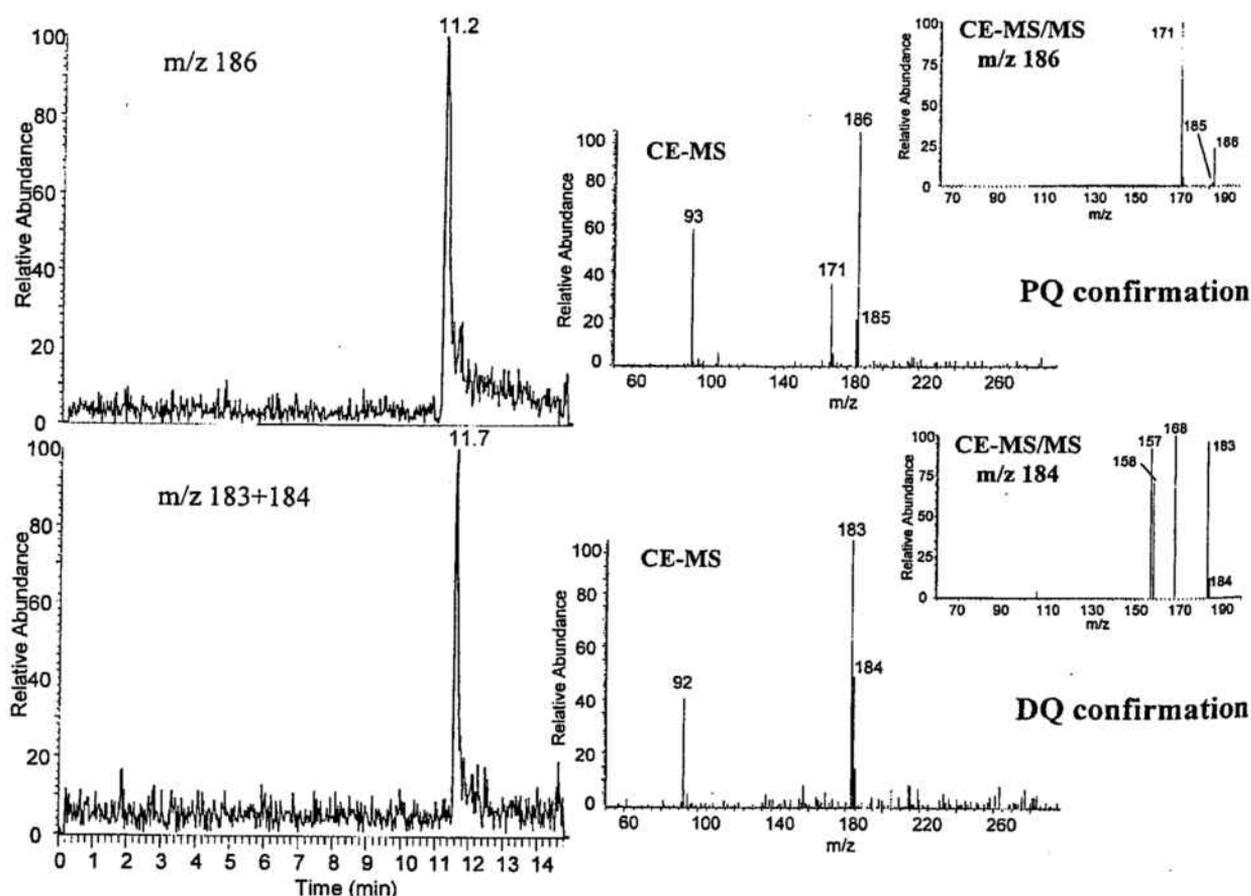


Fig. 2. Electropherogram of a contaminated irrigation water sample and CE-MS and CE-MS-MS spectra of the identified compounds. Electrophoretic conditions as in Fig. 1.

LC-MS provided lower detection limits ($0.1\text{--}7\ \mu\text{g l}^{-1}$) [33].

In order to study the applicability of the method for the analysis of these compounds in drinking water at low levels, an spiked mineral water was also analysed by CE-MS using electrokinetic injection (20 s, 10 kV). The water sample was spiked with quats at $\sim 20\ \mu\text{g l}^{-1}$ (EPA level for DQ) and the

electropherogram obtained is given in Fig. 3. LODs in mineral water in both CE-MS and CE-MS-MS were calculated obtaining values slightly higher than the figures for ultrapure water ($10\ \mu\text{g l}^{-1}$ for DQ and around $5\ \mu\text{g l}^{-1}$ for the other quats). Both MS methods gave similar LODs probably due to the decrease of the signal and the noise in MS-MS as happened with standards and to the fact that drinking

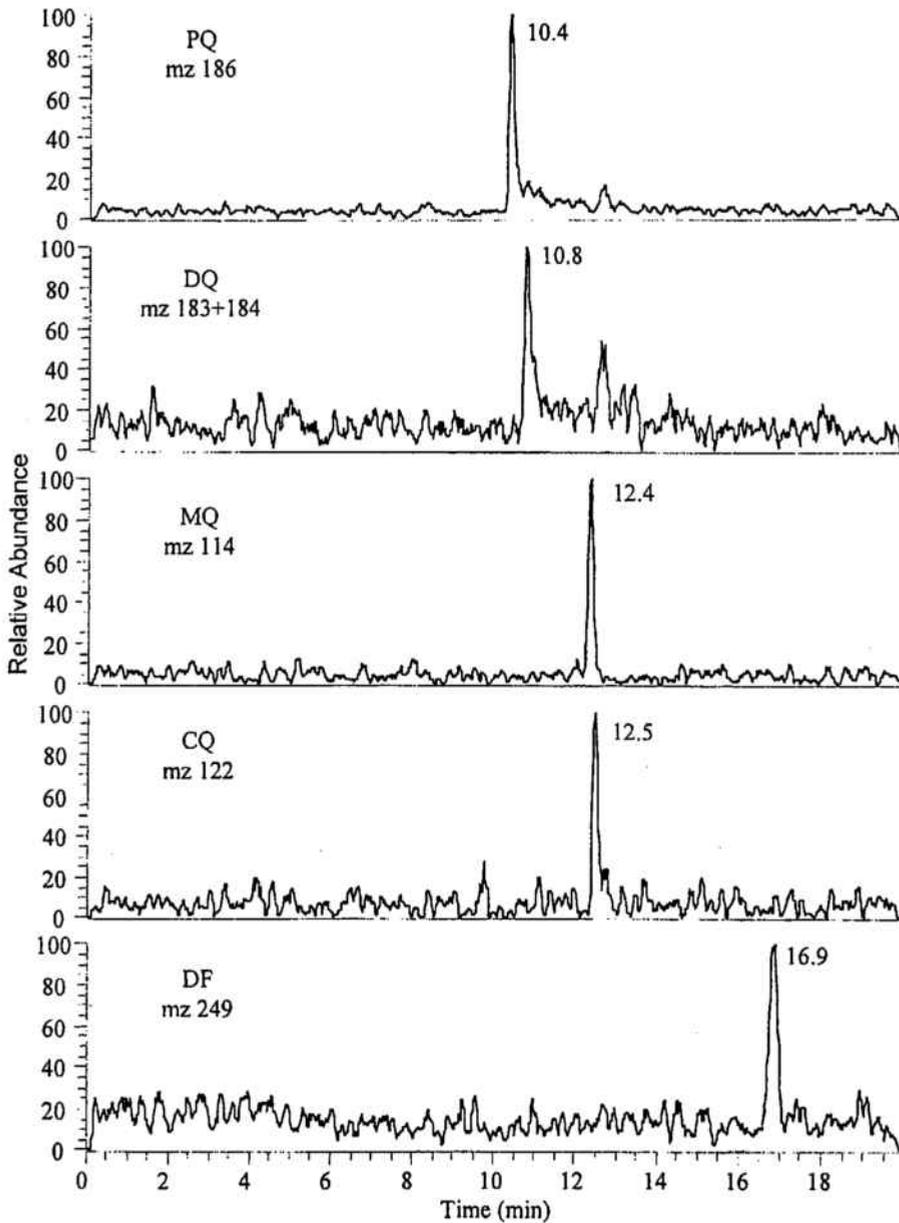


Fig. 3. Electropherogram of an spiked mineral water ($\sim 20\ \mu\text{g l}^{-1}$). Electrokinetic injection (20 s, 10 kV). Other conditions as in Fig. 1.

water is a relatively clean sample with a low chemical noise. LODs are below the maximum admissible level established by the US EPA for DQ showing that the method can be used for the analysis of quats in drinking water. Three analyses were performed by standard addition ($n=3$) of a mineral water spiked at $20 \mu\text{g l}^{-1}$ obtaining good accuracy and precision (from 2 to 10%).

4. Conclusions

A CE-MS (ion-trap) method using electrospray as ionisation source and a coaxial coupling device has been developed. Good reproducibilities and good electrophoretic separation were achieved avoiding the ionic suppression of the pairs PQ/DQ and CQ/MQ. CE-MS is proposed for quantitation and CE-MS-MS only for confirmation purposes because detection limits using this last technique did not improve in respect to CE-MS. For mineral water, LODs between 5 and $10 \mu\text{g l}^{-1}$ were achieved allowing the analysis of DQ in drinking water samples at the level established by the US Environmental Protection Agency. The results obtained showed that the method is a promising one for the identification and determination of these compounds when electrokinetic injection and labelled standards are used.

Acknowledgements

This work was supported by the Ministerio de Ciencia y Tecnología (REN2000-0885). O. Núñez thanks the Generalitat de Catalunya for a grant (Beca predoctoral per a la formació de personal investigador, FI).

References

- [1] The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, The Pesticide Manual, Incorporating the Agrochemical Handbook, 10th ed., Tomlin, Bath, 1995.
- [2] World Health Organization, The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1996-1997, WHO, 1996.
- [3] US Environmental Protection Agency, Drinking Water Health Advisory: Pesticides, US Environmental Protection Agency, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [4] Code of Federal Regulations, Title 40, Part 141, US Government Printing Office, 1 July 2001.
- [5] M.C. Carneiro, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 669 (1994) 217.
- [6] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatogr. A 728 (1996) 325.
- [7] T. Itagaki, S.J. Lai, S.R. Binder, J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol. 20 (1997) 3339.
- [8] J.Y. Cai, Z. Elrassi, J. Liq. Chromatogr. 15 (1992) 1193.
- [9] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, L. Puignou, Chromatographia 39 (1994) 581.
- [10] O. Núñez, E. Moyano, L. Puignou, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 912 (2001) 353.
- [11] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 946 (2002) 275.
- [12] O. Núñez, J.B. Kim, E. Moyano, M.T. Galceran, S. Terabe, J. Chromatogr. A 961 (2002) 65.
- [13] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Diez, L. Puignou, J. Chromatogr. A 782 (1997) 289.
- [14] J.R. Startin, S.J. Hird, M.D. Sykes, J.C. Taylor, A.R.C. Hill, Analyst 124 (1999) 1011.
- [15] J. Hau, S. Riediker, N. Varga, R.H. Stadler, J. Chromatogr. A 878 (2000) 77.
- [16] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. AOAC Int. 84 (2001) 1.
- [17] C.S. Evans, J.R. Startin, D.M. Goodall, B.J. Keely, J. Chromatogr. A 897 (2000) 399.
- [18] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 914 (2001) 111.
- [19] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, J. Chromatogr. A 869 (2000) 441.
- [20] M. Vahl, A. Graven, R.K. Juhler, Fresenius J. Anal. Chem. 361 (1998) 817.
- [21] V.M. Morris, C. Hargreaves, K. Overall, P.J. Marriott, J.G. Hughes, J. Chromatogr. A 766 (1997) 245.
- [22] V.Y. Taguchi, S.W.D. Jenkins, P.W. Crozier, D.T. Wang, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 9 (1998) 830.
- [23] A.P. Snyder, in: A.P. Snyder (Ed.), Biochemical and Biotechnical Applications of Electrospray Ionization Mass Spectrometry, American Chemical Society, Washington, DC, 1996, p. 1, Chapter 1.
- [24] J.F. Banks, Electrophoresis 18 (1997) 2255.
- [25] M. Jussila, K. Sinervo, S.P. Porras, M.L. Riekkola, Electrophoresis 21 (2000) 3311.
- [26] R.D. Smith, C.J. Barinaga, H.R. Udseth, Anal. Chem. 60 (1988) 1948.
- [27] Y.Z. Chang, G.R. Her, Anal. Chem. 72 (2000) 626.
- [28] E. Moyano, D.E. Games, M.T. Galceran, Rapid. Commun. Mass Spectrom. 10 (1996) 1379.
- [29] X.B. Song, W.L. Budde, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 7 (1996) 981.
- [30] I.M. Lazar, M.L. Lee, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 117.
- [31] R.G. Cooks, G. Chen, C. Weil, G. Sindona, R.M. Caprioli (Eds.), Selected Topics in Mass Spectrometry in the Bio-

- molecular Sciences, NATO ASI Series, Series C, 504, Kluwer, Dordrecht, 1997, p. 213.
- [32] J.V. Johnson, R.A. Yost, P.E. Kelley, D.C. Bradford, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2162.
- [33] R. Castro, Doctoral Thesis, University of Barcelona, Barcelona, 2001.
- [34] D.R. Reed, S.R. Kass, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 1163.
- [35] I. Kambhampati, K.S. Roinestad, T.G. Hartman, J.D. Rosen, E.K. Fukuda, R.L. Lippincott, R.T. Rosen, *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 67.

2.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

2.4.1. Métodos de preconcentración *on-line*

En el apartado de experimental de este capítulo se ha descrito la optimización de varios métodos de preconcentración basados en los fenómenos de *stacking* y *sweeping*. Todas las optimizaciones, así como las validaciones de los métodos, se llevaron a cabo utilizando patrones de los cuats preparados en agua Milli-Q. Para poder evaluar las mejoras obtenidas con los diferentes métodos de preconcentración estudiados, los resultados se compararon con los obtenidos trabajando en condiciones de no preconcentración. En la Tabla 2.5 se dan los resultados obtenidos con CZE y MEKC así como con los métodos de preconcentración estudiados: *stacking* con eliminación de matriz, *sweeping*-MEKC y CSEI-*sweeping*-MEKC. En la columna donde se dan los resultados con *stacking* se indican además, entre paréntesis, los valores obtenidos empleando la combinación de la extracción en fase sólida con cartuchos de carbono grafitado con la preconcentración mediante *stacking* con eliminación de matriz. Los parámetros que se indican en la Tabla son los límites de detección así como la repetitividad y la reproducibilidad en términos de tiempos de migración y de concentración. Además se indica también la mejora efectiva obtenida con cada método, siempre tomando como referencia la determinación mediante CZE.

La determinación de los cuats mediante CZE y MEKC proporciona límites de detección a niveles de mg/L, siendo de dos a seis veces mejores los obtenidos con CZE. Sin embargo, se ha de tener en cuenta que los tiempos de inyección utilizados en ambos métodos son diferentes (10 s en CZE y 1 s en MEKC), por lo que en condiciones equivalentes de inyección se obtendrían LODs similares. Los métodos de preconcentración *on-line* de *stacking* con eliminación de matriz y de *sweeping*-MEKC permiten alcanzar límites de detección que se encuentran en ambos casos entre 10 y 15 µg/L, lo que implica una mejora con respecto a CZE de 50 a 100 veces aproximadamente y que es acorde con la descrita en la literatura para este tipo de preconcentración (Osbourn *et al.*, 2000; Núñez y Sentellas, 2002). Además, estos LODs son del orden de los obtenidos con la inyección electrocinética en CZE para el PQ y el DQ, mientras que para el caso del DF son ligeramente inferiores. Tanto en *stacking* con eliminación de matriz como en *sweeping*-MEKC la muestra se introduce en el capilar hidrodinámicamente, evitando los problemas de discriminación de los analitos que pueden tener lugar en la inyección electrocinética, lo que hace que los LODs obtenidos sean del orden para los tres analitos. En CZE con inyección electrocinética, en cambio, el LOD del DF es bastante superior ya que al presentar

Tabla 2.5. Comparación de distintos procedimientos electroforéticos para la determinación de los herbicidas PQ, DQ y DF. CZE, MEKC y los métodos de preconcentración *on-line* basados en los fenómenos de *stacking* y *sweeping*

	PQ					DQ					DF				
	CZE	stacking (+SPE)	MEKC	sweeping	CSEI	CZE	stacking (+SPE)	MEKC	sweeping	CSEI	CZE	stacking (+SPE)	MEKC	sweeping	CSEI
Límites de detección ($\mu\text{g/L}$)															
Inyección hidrodinámica	1100	10 (0,1)	2600	10,2	-	1000	11 (0,3)	3200	10,1	-	800	15 (0,08)	5100	13,0	-
Inyección electrocinética	8,5	-	-	-	0,075	10,3	-	-	-	0,1	50,5	-	-	-	1,0
Tiempo de migración															
Repetitividad (%RSD)	0,1	1,3	2,4	4,7	6,6	0,1	1,2	1,8	4,3	6,1	0,3	0,3	0,7	2,7	4,2
Reproducibilidad (%RSD)	1,3	8,8	2,4	4,3	14,2	1,5	8,4	1,7	4,1	12,4	2,6	1,6	0,8	3,7	7,2
Concentración															
Repetitividad (%RSD)	4,9	3,7 (7,6)	4,3	5,1	5,9	4,5	6,8 (7,3)	2,5	5,6	5,4	4,9	2,3 (6,3)	4,5	5,7	7,5
Reproducibilidad (%RSD)	9,6	13,1 (12,3)	4,7	7,1	8,9	8,5	15,4 (11,7)	6,1	5,7	20,8	5,6	2,4 (11,6)	5,8	7,9	22,6
Mejora efectiva obtenida^a	-	110 (11000)	0,4	108	14667	-	91 (3300)	0,3	99	10000	-	53 (10000)	0,15	62	800

^aCalculada a partir de la relación de límites de detección tomando como referencia los valores en CZE: LOD(CZE)/LOD(método)

una sola carga se introduce en menor proporción que el PQ y el DQ que presentan doble carga. Los LODs obtenidos tanto con *stacking* con eliminación de matriz como con *sweeping*-MEKC (por debajo de 15 µg/L con patrones en agua Milli-Q) son inferiores a los valores legislados en aguas de consumo por la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los EEUU (US EPA), al menos para el DQ cuyo valor legislado es de 20 µg/L (US EPA, 2004). No obstante, tal como se describe en el Artículo I (Apartado 2.2.2.3) para el *stacking* con eliminación de matriz, y en el Artículo III (Apartado 2.2.2.6) para el *sweeping*-MEKC, en la aplicación de estos métodos a muestras de agua la salinidad de la matriz juega un papel muy importante.

Tal como se describe en el Artículo II (Apartado 2.2.2.4), con el fin de disminuir los límites de detección obtenidos con el método de preconcentración de *stacking* con eliminación de matriz se añadió una etapa previa de extracción en fase sólida, en la que se utilizaron cartuchos de carbono grafitado para la preconcentración *off-line* de los cuats. Se compararon cartuchos de carbono grafitado de diferentes casas comerciales y se obtuvieron los mejores resultados con los cartuchos HyperSep HyperCarb (Thermo Electron Corporation), pudiendo llegar a procesar un volumen de muestra de 250 mL con recuperaciones de alrededor del 40% para el PQ y el DQ y del 90% para el DF. Los LODs alcanzados con este método para patrones en agua Milli-Q fueron de 0,08 µg/L para el DF a 0,3 µg/L para el DQ (Tabla 2.5). La aplicación, por lo tanto, de una etapa previa de extracción en fase sólida proporciona una mejora de la sensibilidad de 36, 100 y 188 veces para el DQ, PQ y DF, respectivamente, con respecto al método de preconcentración de *stacking* con eliminación de matriz aplicado individualmente. Estas mejoras se encuentran dentro de lo esperado para una preconcentración *off-line* mediante extracción en fase sólida para esta familia de compuestos. Lógicamente, la mejora es mayor para el DF, herbicida que presenta las mayores recuperaciones en la etapa de SPE. Si comparamos los resultados obtenidos con SPE+*stacking* con los de CZE vemos que se obtienen mejoras muy buenas para el PQ y el DQ (superiores a 10000 veces) y de alrededor de 3300 veces para el DQ.

Los LODs obtenidos con el método de preconcentración *on-line* CSEI-*sweeping*-MEKC utilizando patrones en agua Milli-Q (Tabla 2.5) fueron de 0,075, 0,1 y 1,0 µg/L para el PQ, DQ y DF respectivamente, lo que implica una mejora de la sensibilidad con respecto a MEKC convencional de 3000 a 51000 veces (Tabla 1, Artículo III). Si comparamos las mejoras obtenidas con respecto a CZE, estas son de 15000, 10000 y 800 veces para el PQ, DQ y DF respectivamente. En términos generales, los límites de detección obtenidos tanto con la combinación de SPE+*stacking* como con CSEI-*sweeping*-MEKC son similares, siendo ligeramente superiores para el DF con CSEI-*sweeping*-

MEKC. En este último caso, tiene lugar una inyección electrocinética que, como ya se ha comentado antes, produce una entrada menor de DF en el capilar si se compara con los otros dos herbicidas. Los LODs conseguidos con ambos métodos están, además, por debajo de los valores legislados por la US EPA y también son ligeramente inferiores o del orden de los valores legislados por la Unión Europea (0,1 µg/L) en muestras de agua de consumo, por lo que, en principio, es posible la aplicación de estos métodos a muestras de agua cumpliendo la legislación vigente (European Union, 1980; US EPA, 2004). Esta aplicación será discutida más adelante. Además, los límites de detección conseguidos con ambos métodos de preconcentración son similares, o ligeramente mejores, que los descritos por otros autores para la determinación de cuats en muestras de agua con electroforesis capilar (Tabla 1.8, capítulo 1).

Con respecto a la repetitividad en los tiempos de migración, los resultados obtenidos en todos los métodos (Tabla 2.5) son buenos, siendo los valores más desfavorables los obtenidos para CSEI-*sweeping*-MEKC (RSDs entre 4,2 y 6,6%). En cuanto a la reproducibilidad de los tiempos de migración, los resultados obtenidos son también aceptables y, de nuevo, los valores más altos se obtienen con CSEI-*sweeping*-MEKC. La pérdida de repetitividad y reproducibilidad en los tiempos de migración sigue, además, una tendencia lógica. Así, vemos que ambos parámetros empeoran al pasar de MEKC a *sweeping*-MEKC y de aquí a CSEI-*sweeping*-MEKC, pues cada método supone la adición de nuevas etapas con respecto al anterior, lo que explica los ligeros incrementos en las RSDs obtenidas y, por tanto, las pérdidas en repetitividad y reproducibilidad de los tiempos de migración.

En términos de cuantificación el procedimiento de *stacking* con eliminación de matriz no produce un empeoramiento significativo de la repetitividad obteniéndose valores de RSDs que van de 2,3 a 6,8% frente a los valores obtenidos con CZE que están entre 4,5 y 4,9%. Estas diferencias son aceptables si se tiene en cuenta la mayor complejidad del método de preconcentración y los niveles de concentración usados, que en el caso del *stacking* son bastante inferiores con respecto a los empleados en CZE. En cuanto a la reproducibilidad, se observa también un ligero empeoramiento con respecto a CZE. Para ambos parámetros, el DF da mejores resultados en la aplicación del *stacking* con eliminación de matriz que con respecto a CZE. Esto puede ser debido a que el DF aparece el primero al aplicar los métodos de *stacking* obteniéndose picos más estrechos que con el PQ y el DQ, lo que hace que las pequeñas fluctuaciones en el tiempo de inversión producidas a lo largo del día lo afecten en menor medida, consiguiéndose mejores repetitividades y reproducibilidades para este herbicida.

La adición de una etapa previa de SPE al método de *stacking* con eliminación de matriz no implica, en términos de cuantificación, un empeoramiento sustancial por lo que respecta a la repetitividad y reproducibilidad del método, sobre todo para los herbicidas PQ y DQ, observándose un incremento mayor para el caso del DF. Los valores de RSDs conseguidos en la cuantificación con SPE+*stacking* son aceptables para electroforesis capilar para el nivel de concentraciones estudiadas ($\mu\text{g/L}$), siendo siempre inferiores a un 12%.

La aplicación del método de preconcentración *sweeping*-MEKC no implica tampoco, en términos generales, una pérdida importante de repetitividad ni de reproducibilidad con respecto a la cuantificación. Los valores de RSDs obtenidos tanto para la repetitividad como para la reproducibilidad son muy similares entre sí, y además son también del orden de los obtenidos mediante MEKC o incluso CZE. De manera equivalente, la aplicación de CSEI-*sweeping*-MEKC también da lugar a unas repetitividades en la cuantificación buenas y del orden de las comentadas anteriormente. Sin embargo, sí que se observa un empeoramiento sustancial en la reproducibilidad de la cuantificación con CSEI-*sweeping*-MEKC con respecto a los otros métodos descritos, obteniéndose valores de RSDs entre 9 y 22%. Esto es debido a que en CSEI-*sweeping*-MEKC la muestra se introduce en modo electrocinético durante un tiempo de inyección elevado (400 s). Como es bien sabido, este modo de inyección introduce una mayor variabilidad en la respuesta traduciéndose un incremento de los valores de RSDs. No obstante, los valores obtenidos son aceptables para el nivel de concentración de trabajo y para este tipo de metodología, donde la reproducibilidad puede llegar a ser muy baja, encontrándose valores descritos de repetitividad de hasta el 30% de RSD para algún analito (Quirino y Terabe, 2000). El hecho de utilizar un patrón interno en la cuantificación disminuye en parte la dispersión de los resultados, mejorando significativamente los valores de reproducibilidad con respecto a otros descritos en la literatura.

Aplicación a muestras de agua de consumo.

Tal como se ha comentado anteriormente, los LODs obtenidos con los diferentes métodos de preconcentración empleando patrones disueltos en agua Milli-Q están por debajo de los valores legislados por la US EPA y, en el caso del SPE+*stacking* y del CSEI-*sweeping*-MEKC también por debajo de los valores legislados por la Unión Europea por lo que, en principio, estos métodos son buenos candidatos para el análisis de los cuats en muestras de aguas de consumo. Sin embargo, y tal como se ha descrito en las

correspondientes comunicaciones científicas, en la aplicación de estos métodos a muestras de aguas de consumo se ha de tener en cuenta que la salinidad de la matriz juega un papel muy importante.

En los métodos de *stacking* con eliminación de matriz y de la combinación de SPE+*stacking* (Artículo I y Artículo II, respectivamente) fue necesario la dilución de las muestras para rebajar la salinidad que era muy elevada e impedía la aplicación correcta del procedimiento de *stacking* con eliminación de matriz donde es imprescindible una diferencia importante de conductividad entre la muestra y el tampón electroforético. En el método de *sweeping*-MEKC (Artículo III), en cambio, es necesario que la conductividad de la muestra sea la misma que la del tampón electroforético, por lo que la muestra se tiene que diluir o bien se le tiene que adicionar algún electrolito para ajustar conductividad. Dado que el método CSEI- *sweeping*-MEKC proporcionó mejores límites de detección que el de *sweeping*-MEKC se decidió aplicar tan solo este método de preconcentración al análisis de muestras de agua de consumo.

En la Tabla 2.6 se dan los límites de detección obtenidos con estos métodos para muestras de agua de consumo. Como puede observarse, los LODs obtenidos con los métodos basados en el fenómeno de *stacking* en muestras de agua de bebida fueron superiores a los obtenidos con agua Milli-Q. La razón es la ya expuesta anteriormente, pues es necesario una dilución de la muestra para una eficaz aplicación del método de *stacking* con eliminación de matriz. Este aumento se ve incrementado en la muestra de agua del grifo debido a su mayor salinidad con respecto a la mineral.

Tabla 2.6. LODs en muestras de agua de consumo ($\mu\text{g/L}$)

Cuat	stacking		SPE+stacking		CSEI- <i>sweeping</i> -MEKC
	Agua del grifo	Agua mineral	Agua del grifo	Agua mineral	Agua del grifo
PQ	48	18	0,4	0,2	0,5
DQ	64	25	2,2	1,8	1,0
DF	154	62	1,1	0,4	3,3

Los LODs obtenidos con la combinación SPE+*stacking* y con CSEI-*sweeping*-MEKC son, de nuevo, bastante similares entre ellos y, además, inferiores a los valores legislados por la US EPA. Además, son tan solo ligeramente superiores a los valores

legislados por la Unión Europea (0,1 $\mu\text{g/L}$), lo que permitiría analizar sin ningún problema muestras de bebida ligeramente contaminadas. El método de CSEI-*sweeping*-MEKC presenta además, como ventaja, que es un método mucho más rápido que la combinación SPE+*stacking* y precisa una menor manipulación de la muestra, por lo que se puede considerar como la mejor opción, entre los métodos estudiados en este capítulo, para la determinación de cuats en muestras de agua de consumo.

2.4.2. Acoplamiento CE-ESI-MS

Tal como se ha comentado al inicio de este capítulo uno de los objetivos de esta memoria es el desarrollo de una metodología basada en el acoplamiento de la electroforesis capilar con la espectrometría de masas, que permita el análisis simultáneo de los cinco herbicidas. La optimización de los parámetros de fuente de este método y de la separación electroforética se encuentran descritas en el Artículo IV (Apartado 2.3.2.4). Algunos aspectos se han comentado también en el trabajo experimental incluido en el apartado 2.3.2.-

El estudio de los cuats se llevó a cabo tanto en CE-ESI/MS como en tandem CE-ESI/MS/MS, y se compararon los límites de detección con patrones preparados en agua Milli-Q. Los LODs en CE/MS se obtuvieron utilizando inyección hidrodinámica (10s, 3,5 kPa) alcanzándose valores entre 0,5 y 2 mg/L (Tabla 3, Artículo IV). Estos valores son del orden de los encontrados en CZE convencional para el PQ, DQ y DF y ligeramente inferiores a los encontrados en MEKC convencional (Tabla 2.5). Estos resultados están de acuerdo con los publicados en la bibliografía, donde por lo general los límites de detección en CE/MS suelen ser del orden de los de CZE o ligeramente inferiores. Si se utiliza el modo de inyección electrocinético (10 s, 10 kV), los LODs disminuyen considerablemente a valores entre 8 y 30 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 3, Artículo IV). Si se fuerzan las condiciones de inyección, llegándose a un compromiso entre el tiempo de inyección y la resolución entre los picos electroforéticos, los LODs pueden disminuir de 3 a 8 veces (20 s, 10 kV), alcanzándose valores de entre 1 y 10 $\mu\text{g/L}$ (Tabla 3, Artículo IV). En este caso, estos LODs son ligeramente mejores a los encontrados aplicando algunos de los métodos de preconcentración *on-line* discutidos anterioremente, *stacking* con eliminación de matriz y *sweeping*-MEKC, con un tiempo total de análisis inferior pues se pueden analizar las muestras directamente sin necesidad de adecuar las matrices de éstas.

Si comparamos los LODs obtenidos por CE-ESI/MS utilizando una trampa de iones como analizador con los descritos en la literatura utilizando la misma técnica para la

misma familia de compuestos (Tabla 1.9, Capítulo 1) éstos son mejores que algunos de los descritos utilizando analizadores cuadrupolares (Song y Budde, 1996; Wycherley *et al.*, 1996) y similares a los encontrados utilizando un analizador de triple-cuadrupolo (Moyano *et al.*, 1996).

Los límites de detección también se determinaron para el sistema CE-ESI/MS/MS utilizando ambos modos de introducción de la muestra, modo hidrodinámico (10 s, 3,5 kPa) y modo electrocinético (20 s, 10 kV), y los resultados se encuentran incluidos en la Tabla 2.4. Los valores obtenidos resultaron ser equivalentes a los determinados para CE-ESI/MS. Esto puede ser debido al hecho de que el descenso en el ruido de fondo, aproximadamente 3 veces, producido al trabajar con CE-ESI/MS/MS quedaba compensado por la propia disminución de la señal típica en MS/MS, con lo que los límites de detección no se veían prácticamente afectados. Si bien este estudio se realizó con patrones preparados en agua Milli-Q, se comprobó también que el mismo efecto se observaba al aplicarlo a muestras de agua de consumo. Por lo tanto, se propone el acoplamiento CE-ESI/MS como método de cuantificación mientras que CE-ESI/MS/MS se recomienda como método de confirmación.

Se evaluó la repetitividad en la cuantificación con el método CE-ESI/MS utilizando ambos modos de inyección. En este caso la cuantificación se realizó utilizando EV y HV como patrones internos así como los compuestos deuterados. Como era de esperar, la repetitividad fue algo peor cuando se utilizó el modo de inyección electrocinético (Tabla 3, Artículo IV), debido a la mayor influencia que tiene la metriz en este tipo de inyección. Por otra parte, se mejoró considerablemente la repetitividad en la cuantificación al utilizar patrones deuterados como patrones internos. Esta mejora es lógica para el analito nativo correspondiente al patrón deuterado, ya que ambos migran simultáneamente y la respuesta de ambos compuestos se ve afectada del mismo modo. No obstante, para los herbicidas de los que no se disponía del compuesto deuterado, DF y MQ, también se encontró mejora al utilizar como patrón interno alguno de los deuterados que migraban más próximos a ellos, resultando ser mejores patrones internos que el EV o el HV por lo que se propone su utilización.

Los LODs obtenidos fueron inferiores a los valores legislados por la US EPA, por lo que se procedió a aplicar el método CE-ESI/MS al análisis de muestras de agua. Tal como se describe en el Artículo IV, se analizó una muestra de agua de riego procedente de Almería susceptible de una contaminación intencionada. La muestra se analizó por CE-ESI/MS y se confirmó la presencia de PQ y DQ por CE-ESI/MS/MS. Los resultados de concentración se compararon con los obtenidos mediante el análisis de la misma muestra

por LC-ESI/MS siguiendo un método de análisis previamente desarrollado en nuestro grupo (Castro *et al.*, 2000), obteniendo resultados equivalentes. También se determinaron los límites de detección en una muestra de agua mineral, obteniendo valores del orden de 5-10 $\mu\text{g/L}$. La muestra se adicionó a niveles por debajo de los legislados por la US EPA, y se analizó por adición estándar obteniendo también buenos resultados.

Si bien los resultados obtenidos con el acoplamiento CE/MS para el análisis de los cuats son bastante buenos teniendo en cuenta la particular dificultad de este tipo de acoplamiento, los resultados no permiten analizar muestras a los niveles legislados por la Unión Europea (0,1 $\mu\text{g/L}$). Una manera de disminuir estos límites de detección es la utilización de métodos de preconcentración.

La utilización de métodos de preconcentración *on-line* es la opción ideal para disminuir los LODs sin alargar excesivamente los tiempos de análisis. Ahora bien, los tres procedimientos *on-line* descritos anteriormente resultan no ser aplicables al acoplamiento CE/MS. En el caso del *stacking* con eliminación de matriz es necesaria la inversión de la polaridad para eliminar la matriz, momento en que el flujo electrosmótico obliga a la entrada de tampón por el extremo de salida del capilar. Al trasladar esta metodología al acoplamiento CE/MS resultó ser incompatible pues es necesario substituir el líquido envolvente (metanol:agua 9:1) por el tampón electroforético para que al invertir la polaridad éste pueda entrar por el extremo de salida del capilar. Sin embargo, la intensidad de corriente en el ESI aumenta considerablemente debido a la conductividad del tampón. Además, se producían cortes de corriente en el circuito eléctrico, lo que indicaba que la entrada no era del todo efectiva y se producían burbujas en el interior del capilar. Además, en las condiciones óptimas de trabajo para CE/MS es necesaria la superposición de presión sobre el vial de entrada para aumentar el flujo a través del capilar, debido al bajo flujo electrosmótico que se generaba, resultando incompatible con la inversión de la polaridad. En el caso de los procedimientos basados en el fenómeno de *sweeping*, más que una incompatibilidad de metodología, resultó existir una incompatibilidad instrumental. El acoplamiento CE/MS se realizó con el instrumento LCQ Classic que utiliza una fuente de ESI en configuración *on-axis* con respecto a la entrada al espectrómetro de masas. Este tipo de interfaz requiere la utilización de disolventes volátiles para evitar contaminaciones excesivas, por lo que el uso de tensioactivos aniónicos como el SDS no es recomendable. Además, las concentraciones de SDS utilizadas en *sweeping* son muy elevadas lo que produce intensidades de corriente en el ESI elevadas. En parte, algunos de estos problemas pueden solventarse acoplando la electroforesis capilar a un espectrómetro de masas con una fuente de ionización más robusta, por ejemplo con una configuración ortogonal, pero

dicho acoplamiento, en el momento de la realización de este trabajo, no era disponible, por lo que se decidió plantear la aplicación de procedimientos de preconcentración *on-line* basados en el fenómeno de *sweeping* como una futura línea de investigación dentro de nuestro grupo.

En el apartado 3.3 del Artículo IV se realiza una discusión de los espectros MS y MS/MS obtenidos para los cuats y se establecen las asignaciones de cada uno de los fragmentos observados. No obstante, en este capítulo no se lleva a cabo ningún comentario al respecto ya que en el Capítulo 3 de esta memoria se hace una discusión exhaustiva de la fragmentación de los cuats utilizando diferentes analizadores con el fin de establecer las rutas de fragmentación de estos compuestos.

2.5. CONCLUSIONES

El trabajo experimental incluido en el Capítulo 2 de esta memoria nos ha permitido establecer metodologías analíticas basadas en electroforesis capilar: combinación de *off-line* y *stacking* con eliminación de matriz, CSEI-*sweeping*-MEKC y CE-ESI/MS, que han permitido la determinación de los cuats en muestras de agua de consumo a los niveles requeridos por la Agencia de Protección del Medio Ambiente y por la Unión Europea.

- Combinación de *off-line* SPE y *stacking* con eliminación de matriz:
 - La separación de los herbicidas estudiados (PQ, DQ y DF) ha sido posible mediante *stacking* con eliminación de matriz empleando un capilar de sílice fundida y utilizando un tampón de ácido acético-acetato de amonio con un 5% de metanol y conteniendo 0,8 mM de CTAB como modificador orgánico de la pared del capilar para la inversión del sentido del flujo electroosmótico, obteniéndose 2,3 min. como tiempo de inversión óptimo.
 - La elevada salinidad de las muestras de agua de consumo utilizadas obliga a su dilución en un factor 1:4 para una óptima aplicación del *stacking* con eliminación de matriz, obteniéndose límites de detección entre 18 y 150 $\mu\text{g/L}$ en muestra.
 - La combinación de una etapa previa de extracción en fase sólida utilizando cartuchos de carbono grafitado seguida del procedimiento de *stacking* con eliminación de matriz permite disminuir los límites de detección en muestras de agua de consumo a niveles similares a los legislados por la Unión Europea (0,1 $\mu\text{g/L}$), aunque los extractos han de ser reconstituidos con 2-5 mL de una disolución 0,8 mM de CTAB para una óptima aplicación del procedimiento de *stacking*.
 - El método de análisis establecido ha mostrado una buena linealidad en el intervalo de concentraciones de trabajo, siendo el coeficiente de regresión superior a 0,99 en todos los casos. La precisión del método ha sido satisfactoria, ya que tanto la repetitividad como la reproducibilidad en la cuantificación en términos de %RSD han oscilado entre 6 y 12%.

- CSEI-*sweeping*-MEKC:

- Para la separación de los herbicidas estudiados (PQ, DQ y DF) mediante *sweeping*-MEKC se propone emplear un capilar de sílice fundida y un tampón de fosfatos (pH 2,5) con un 20% de acetonitrilo que contiene 80 mM de SDS. Este tensioactivo aniónico es el que proporcionó los mejores resultados en términos de separación electroforética y factores de capacidad, obteniéndose límites de detección en patrones de alrededor de 10 µg/L.
- La combinación de CSEI-*sweeping*-MEKC ha permitido obtener mejoras en la respuesta de hasta 51000 veces con respecto a MEKC convencional, permitiendo también la disminución de los límites de detección a niveles del orden de los legislados por la Unión Europea, sin la necesidad de un tratamiento previo de la matriz de la muestra.
- Los límites de detección obtenidos en muestras de agua de consumo mediante CSEI-*sweeping*-MEKC son similares de los obtenidos mediante la combinación de *off-line* SPE y *stacking* con eliminación de matriz, con la ventaja de que se reduce considerablemente el tiempo de análisis y de que requiere muy poca manipulación de la muestra.
- El método de análisis establecido ha mostrado una muy buena linealidad en el intervalo de trabajo (coeficiente de regresión superior a 0,999 en todos los casos). La precisión del método es satisfactoria para los niveles de concentración estudiados, si bien se han obtenido valores de %RSD para la repetitividad y reproducibilidad superiores a los obtenidos con *sweeping*-MEKC, oscilando entre un 7 y un 22%. La utilización de patrón interno ha permitido obtener que estos valores sean inferiores a los descritos en la literatura.

- Acoplamiento CE-ESI/MS:

- La separación de los cinco herbicidas estudiados ha sido posible mediante la utilización de un capilar de sílice fundida y un tampón de ácido fórmico-formiato de amonio (pH 3,0) con un 50% de metanol. Para aumentar el flujo electroosmótico se aplicó una sobrepresión de 3,5 kPa sobre el vial de entrada.

- Las condiciones óptimas de acoplamiento han requerido la utilización de una disolución ácido acético (10 mM):metanol (1:9) como líquido envolvente. La señal óptima se alcanza cuando el capilar electroforético sobresale tan solo 0,1 mm con respecto a la aguja del *electrospray* y ésta se posiciona a tan solo 1,5 cm de la entrada al espectrómetro de masas.
- La utilización de la espectrometría de masas en tandem con la electroforesis capilar (CE-ESI/MS/MS) no ha mostrado una mejora significativa en los límites de detección si se comparan con los conseguidos con CE-ESI/MS, por lo que se propone esta última técnica para la cuantificación y CE-ESI/MS/MS para la confirmación.
- El método de análisis establecido muestra una buena linealidad en el intervalo de trabajo, obteniéndose coeficientes de regresión superiores a 0,993 cuando se utilizan compuestos deuterados como patrones internos para la cuantificación. La precisión del método es también satisfactoria obteniéndose valores de repetitividad inferiores al 13%.
- Si bien la metodología propuesta no permite el análisis de esta familia de compuestos a los niveles requeridos por la Unión Europea, se plantea como una futura línea de investigación la utilización del procedimiento de preconcentración *on-line* CSEI-*sweeping*-MEKC, mediante el acoplamiento de la electroforesis capilar con espectrómetros de masas que dispongan de fuentes de ionización más robustas y eficaces, como son las configuraciones ortogonales.

Capítulo 3

ESTUDIOS DE FRAGMENTACIÓN

3.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO

En este capítulo se realiza un estudio exhaustivo de la fragmentación de los cuats utilizando dos espectrómetros de masas de características muy diferentes: un analizador de trampa de iones y un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo. Mediante la combinación de la información obtenida con ambos instrumentos se pretende establecer, de manera consistente, las rutas de fragmentación de los cuats.

Así, este capítulo se inicia con una introducción (Apartado 3.2) en la que se describen los diferentes analizadores de masas y se comentan las ventajas e inconvenientes que presenta cada uno de ellos en la realización de estudios de fragmentación. La introducción finaliza con una revisión de los estudios de fragmentación de los cuats descritos en la literatura.

En la parte experimental de este capítulo (Apartado 3.3) se incluye un estudio exhaustivo de la fragmentación de los cuats y de algunos de sus compuestos deuterados utilizando un espectrómetro de masas de trampa de iones, que permite obtener fragmentaciones sucesivas en el tiempo (MS^n), y un espectrómetro de masas híbrido Q-TOF, que proporciona una buena exactitud en la determinación de la masa y una fragmentación sucesiva en el espacio. En primer lugar se discuten los modos de trabajo con ambos instrumentos que nos permiten obtener los diferentes tipos de espectros y, a continuación, se presentan los resultados experimentales. La mayor parte del desarrollo experimental de este trabajo, así como la propuesta de las rutas de fragmentación de los cuats se encuentra descrito en el Artículo V, titulado "*High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multistep mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides*" que se incluye en el apartado 3.3.1 de este capítulo.

En la discusión de resultados (Apartado 3.4) se presenta y comenta la estrategia de trabajo utilizada para combinar la información obtenida con ambos instrumentos con el fin de establecer las rutas de fragmentación. Para ello, se ha tomado como ejemplo uno de los cuats de manera que se puedan seguir todos los pasos de la estrategia que se ha propuesto en esta memoria. El capítulo finaliza con las conclusiones que se pueden extraer de los resultados experimentales obtenidos.

3.2. INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas es una técnica muy versátil utilizada en numerosos campos científicos, acoplada a técnicas de separación como las cromatográficas y electroforéticas, donde se utiliza como sistema de detección, como para elucidación estructural y determinación de rutas de fragmentación. Las rutas de fragmentación son una herramienta útil para la caracterización estructural de los analitos, sirven para la selección de transiciones específicas útiles en el análisis cuantitativo y ayudan en la identificación inequívoca de analitos cuando se trabaja con matrices muy complejas y en la identificación de compuestos desconocidos. Para establecer las rutas de fragmentación es necesario disponer de un espectrómetro de masas que permita fragmentar los analitos en múltiples etapas. Muchos de los analizadores disponibles en la actualidad permiten estudiar fragmentaciones, ya sea utilizándolos individualmente o como instrumentos híbridos que engloban dos o más analizadores. La baja resolución de algunos analizadores (cuadрупolos, trampa de iones) hace que algunas veces no pueda asignarse la composición elemental de un fragmento de manera correcta. Por ejemplo, discernir entre una pérdida de un grupo CH_4 o de un grupo NH_2 requiere una resolución y una exactitud en la masa capaz de precisar una diferencia de 0,0126 Da, y esto no es posible con un analizador de trampa de iones o de cuadrupolo, por lo que se requieren analizadores con mayor resolución y exactitud en la determinación de la masa.

En el mercado existe una gran diversidad de espectrómetros de masas con diferentes tipos de analizadores como los cuadrupolares (Q), las trampas de iones (IT), los sectores, los de tiempo de vuelo (TOF) y los de resonancia ciclotrónica de iones con Transformada de Fourier (FT-ICR). En la Tabla 3.1 se resumen las características más importantes de estos analizadores. Si bien las razones para la construcción y la aplicación de los diferentes analizadores ha ido cambiando con el paso de los años, la necesidad de una mayor sensibilidad, una elevada resolución, una buena exactitud en la determinación de la masa así como disponer de información estructural son las que imperan hoy en día. En cuanto a la posibilidad de llevar a cabo estudios de fragmentación, los analizadores de un único cuadrupolo no ofrecen esta posibilidad, siendo necesario recurrir a instrumentos híbridos como el triple cuadrupolo donde se pueden llevar a cabo experimentos de espectrometría de masas en tándem en el espacio. En cambio, con los analizadores de trampa de iones y los FT-ICR es posible realizar fragmentaciones sucesivas en el tiempo o MS^n (tándem en el tiempo), lo que hace de estos analizadores una excelente herramienta para los estudios de elucidación estructural, aunque hay que tener en cuenta que la señal

disminuye con las etapas de fragmentación realizadas. Para evitar este problema, recientemente se han desarrollado analizadores con trampas de iones lineales que presentan una elevada eficacia en el almacenamiento de los iones y proporcionan un aumento importante en la respuesta de los analitos (Hager, 2002). En algunos casos, estas trampas de iones lineales se están utilizando en instrumentos híbridos que combinan una configuración típica de un triple cuadrupolo donde se sustituye el último cuadrupolo por la trampa lineal.

Tabla 3.1. Especificaciones generales de los analizadores de masas cuadrupolares, trampa de iones, sector magnético, TOF y FT-ICR.

Criterio	Cuadrupolo	Traps de iones	Sector magnético	TOF	FT-ICR
Intervalo de masas	2-1000 Da	10-1000 Da	2-4000 Da	5-1500 Da	10-3000 Da
Exactitud en la masa	100 ppm	100 ppm	1-5 ppm	5-10 ppm	1-2 ppm
Velocidad	Baja	Media	Baja	Muy alta	Alta
Modo de adquisición	Full scan, SIM	Full scan, SIM, product ion scan	Full scan, SIM	Espectro en todo el intervalo	Full scan, SIM, product ion scan
Sensibilidad	Media	Media	Alta	Alta	Alta
Resolución	Unidad de masa	Unidad de masa	> 10000	1000-10000	> 10000
MS/MS	No (excepto configuración de triple cuadrupolo)	MS ⁿ	No (excepto configuración híbrida)	No	MS ⁿ
Coste relativo	Bajo	Bajo	Muy alto	Alto	Alto

Fuente: McLuckey y Wells, 2001; Barceló-Barrachina *et al.*, 2004b

Los analizadores de trampa de iones, así como los cuadrupolares, son de los instrumentos más utilizados hoy en día debido a su facilidad de acoplamiento a múltiples técnicas de separación y a su bajo coste en relación a los otros analizadores. Sin embargo, para el estudio de las rutas de fragmentación presentan el inconveniente de que son analizadores con poca resolución y poca exactitud en la determinación de la masa, generalmente por encima de 100 ppm. Los analizadores basados en sectores magnéticos y los FT-ICR son los que presentan las mejores prestaciones en cuanto a la determinación exacta de la masa ya que proporcionan la mayor resolución (superior a 10.000) y la mejor exactitud (errores relativos entre 1 y 5 ppm). A diferencia de los FT-ICR que permiten fragmentaciones sucesivas en el tiempo, como ya se ha comentado anteriormente, con los instrumentos basados en sectores magnéticos es necesario recurrir a configuraciones híbridas para llevar a cabo estudios en tándem. El mayor inconveniente de estos instrumentos, sectores magnéticos y FT-ICR, es su elevado coste y tamaño, que junto con

los grandes avances en el desarrollo de los otros analizadores, ha hecho que se utilicen menos que los demás. Es por esta razón que si se compara el uso de los analizadores de trampa de iones y los FT-ICR, los primeros son los más utilizados hoy en día para el estudio de rutas de fragmentación, a pesar de su menor resolución y exactitud en la determinación de la masa, problemas que se pueden solventar combinando la información obtenida con la de otro analizador que presente buenas prestaciones y un precio relativamente asequible, como por ejemplo el de tiempo de vuelo.

Durante las últimas dos décadas, los espectrómetros de masa de tiempo de vuelo se han empezado a utilizar con profusión y sus aplicaciones continúan en crecimiento. La mayor ventaja de este analizador es su velocidad (Tabla 3.1), la mayor de todos los analizadores, además de proporcionar una resolución relativamente elevada (~10.000) sin pérdidas importantes de sensibilidad y una elevada exactitud en la determinación de la masa (5-10 ppm) (Guilhaus, 2001). Es un analizador que no realiza barridos y el ciclo total de adquisición está controlado por el tiempo total de vuelo. Si bien su coste es bastante mayor que el de los analizadores cuadrupolares o de trampa de iones, la facilidad para su acoplamiento con algunas técnicas de separación hace que también sea uno de los instrumentos más utilizados. Estos analizadores presentan una elevada sensibilidad en todo el intervalo de masas. Además, algunos de ellos tienen la posibilidad de poder trabajar en configuraciones de V o W (incrementando el tiempo de vuelo) pudiendo elegir entre trabajar en condiciones de elevada sensibilidad manteniendo una resolución aceptable (configuración en V) o trabajar en condiciones de elevada resolución si la sensibilidad no es un problema para nuestro objetivo (configuración en W). Si bien los analizadores de tiempo de vuelo sencillos no permiten estudios de fragmentación, la posibilidad de combinaciones híbridas como el cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) (Chernushevich *et al.*, 2001; Wolff *et al.*, 2001) o la trampa de iones-tiempo de vuelo (QIT-TOF) (Martin *et al.*, 2003) hacen posible llevar a cabo experimentos en tándem convirtiendo este instrumento en una herramienta ideal para la elucidación estructural.

Cabe mencionar que ninguno de los analizadores comentados anteriormente es claramente superior a los otros en todos los aspectos. Por esta razón, la selección de uno u otro dependerá, en gran medida, de la importancia de las características particulares de cada instrumento que se requieren para una aplicación concreta.

En este capítulo se pretende poner de manifiesto que la combinación de la información obtenida con dos instrumentos de un coste económico relativamente accesible, un analizador de trampa de iones y un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo, puede ayudar al establecimiento de rutas de fragmentación de compuestos orgánicos de

peso molecular relativamente bajo, tomando como ejemplo los cuats. Para ello es necesario obtener y combinar la información de manera adecuada, por lo que se ha establecido una estrategia de trabajo que se comenta en la discusión de resultados de este capítulo.

En la introducción de esta memoria se han comentado diversos estudios en los que se utilizan técnicas de separación acopladas a la espectrometría de masas para el análisis de los cuats. La mayor parte de estos trabajos tienen como objetivo el análisis cuantitativo de estos compuestos en diferentes muestras mientras que tan solo unos pocos han llevado a cabo algún estudio sobre su fragmentación. En la mayoría de los casos se ha utilizado la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas con analizadores de trampa de iones (Evans *et al.*, 2000a; Castro *et al.*, 2001a y 2001b) o de triple cuadrupolo (Marr y King, 1997; Hau *et al.*, 2000; Mol *et al.*, 2000;; Riediker *et al.*, 2002; Careri *et al.*, 2002). En consecuencia, son los espectros MS/MS los más estudiados ya que la utilización de la espectrometría de masas en tándem ofrece una mayor selectividad y sensibilidad que revierte en unos mejores resultados. Sin embargo, debido a la baja resolución y poca exactitud en el cálculo de la masa que presentan estos analizadores, a algunos fragmentos se les pueden asignar varias composiciones elementales. En esta memoria se han calculado las relaciones m/z de cada uno de los iones de los espectros de los cuats con una exactitud que proporciona errores relativos inferiores a 10 ppm. Ello ha permitido comprobar que algunas de las asignaciones publicadas en la literatura proporcionan errores muy superiores a este valor. En otros trabajos se han obtenido otro tipo de espectros como pueden ser los generados mediante fragmentación en la fuente o in-source CID MS (Khambhampati *et al.*, 1994; Castro *et al.*, 1999), si bien estos espectros como tal no suelen aportar mucha información.

En el momento de la realización del trabajo experimental de esta memoria tan solo se habían publicado dos trabajos en los que se proponían rutas de fragmentación para los cuats. En el primero (Evans *et al.*, 2001) se realiza un estudio de fragmentación utilizando un analizador de trampa de iones. En este trabajo se estudian los espectros MS, MS² y MS³ de los cuats, se proponen asignaciones para explicar cada uno de los fragmentos observados y se indican algunos iones no descritos previamente. Aunque muchas de las asignaciones propuestas son correctas, otras pueden explicarse mediante asignaciones alternativas. De hecho, algunas de estas asignaciones han sido modificadas a partir de los resultados obtenidos en esta memoria. El segundo trabajo que propone rutas de fragmentación para los cuats lo hace tan solo para los herbicidas PQ, DQ y DF (Cheng y Hercules, 2001). En este trabajo se utiliza un analizador de tiempo de vuelo, sin embargo, el principal objetivo es demostrar la aplicabilidad de la técnica de ionización MALDI para

el análisis de moléculas orgánicas pequeñas y no utiliza todo el potencial del TOF (determinación de la masa exacta) para la correcta asignación de los iones observados, por lo que nuevamente algunas de las asignaciones pueden explicarse de una manera diferente.

3.3. TRABAJO EXPERIMENTAL

El estudio de las rutas de fragmentación de los cuats se llevó a cabo mediante la obtención de los espectros de fragmentación en etapas sucesivas MS^n ($n=1-4$) utilizando un analizador de trampa de iones (LCQ Classic de Thermo-Finnigan). Este estudio se realizó para los tres herbicidas PQ, DQ y DF y los dos reguladores del crecimiento CQ y MQ, así como para los compuestos deuterados disponibles (PQ- d_8 , DQ- d_4 y CQ- d_4). La baja resolución de la trampa de iones hace que a algunos de los iones obtenidos en los espectros se les pueda asignar varias composiciones elementales, por lo que también se estudió la fragmentación de los cuats utilizando un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF-2 de Micromass) obteniendo los correspondientes espectros TOF-MS, TOF-MS/MS, in-source CID TOF-MS e in-source CID TOF-MS/MS.

En el analizador de trampa de iones las fragmentaciones sucesivas tienen lugar en el tiempo en diferentes etapas que permiten establecer una relación genealógica entre los diferentes iones producto generados en cada una de las etapas. El ión precursor procedente de la fuente de ionización (ión de primera generación) se aísla en la trampa de iones para proceder a su fragmentación mediante la aplicación de una energía de radiofrecuencias. Posteriormente, se analizan los iones producto generados (iones de segunda generación) lo que da lugar a los espectros MS^2 . El aislamiento de uno de estos iones producto de segunda generación y su posterior fragmentación y análisis de los nuevos iones producto generados (iones de tercera generación) da lugar al espectro MS^3 . De esta manera se obtienen los diferentes espectros MS^n de todos los iones necesarios para trazar las rutas de fragmentación estableciendo un orden genealógico.

La obtención de los diferentes espectros comentados anteriormente en un instrumento híbrido Q-TOF es, en cambio, algo más complicada. En la Figura 3.1 se muestra un esquema con los componentes típicos de un instrumento Q-TOF. En este sistema existen dos zonas donde es posible fragmentar los iones para obtener fragmentos de generaciones superiores. La primera zona es la propia fuente de ionización, donde aumentando el voltaje del cono de extracción a la entrada al espectrómetro de masas se consigue acelerar los iones generados en la fuente de ionización y se obliga a que se fragmenten por colisión con el resto de moléculas presentes en la fase gas. El grado de fragmentación dependerá del potencial aplicado, siendo mayor cuanto mayor es este voltaje. Esta fragmentación no es selectiva y todo ión o molécula presente en la fuente puede experimentar un efecto similar, lo que lleva a obtener espectros complejos, resultado de la mezcla de los iones producto de nuestros analitos con los del resto de componentes

que eluyen conjuntamente. La otra zona útil para los estudios de fragmentación es la celda de colisión que se encuentra ubicada entre el analizador de cuadrupolo y el de tiempo de vuelo y que permite llevar a cabo los experimentos de tándem en el espacio. Los iones generados en la fuente de ionización son seleccionados en el cuadrupolo (iones precursores) para ser conducidos a la celda de colisión (hexapolo) donde mediante la acción combinada de un gas inerte y de la aplicación de un voltaje de radiofrecuencias se fuerza su fragmentación. Los iones producto generados en este último proceso son analizados en el tiempo de vuelo.

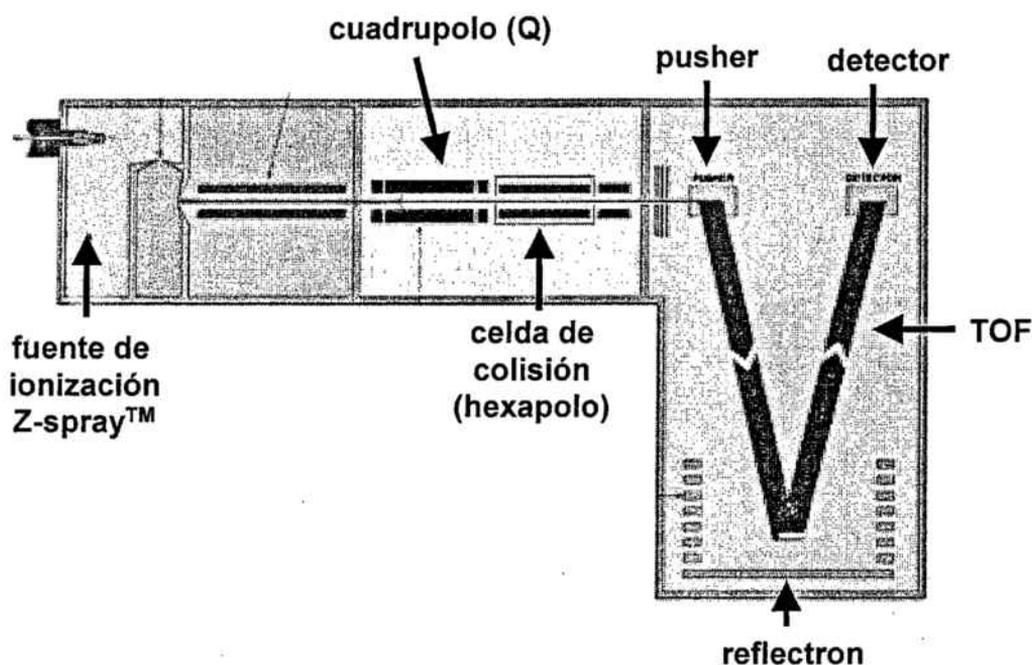


Figura 3.1. Esquema de un espectrómetro de masas híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo.

Las distintas posibilidades de combinación de fragmentación de iones en las dos zonas dan lugar a diferentes modos de operación. El análisis de la información proporcionada por los espectros de masas de los distintos modos de operación permite establecer un orden genealógico de los iones producto comparable, en parte, al de la trampa de iones. En la Figura 3.2 se esquematizan los principales modos de operación. En el primer caso, los iones presentes en la fuente de ionización, en condiciones que favorecen la formación de iones moleculares (iones de primera generación), son analizados directamente en el TOF (Figura 3.2 a). El cuadrupolo y la celda de colisión actúan como

lentes que permiten solo focalizar y transferir los iones desde la fuente de ionización hasta el analizador de tiempo de vuelo. El espectro que se obtiene proporciona información de la masa exacta de los iones moleculares que posteriormente serán utilizados como iones precursores.

Los espectros TOF-MS/MS (Figura 3.2 b) se obtienen cuando el cuadrupolo actúa de filtro de masas seleccionando un único ión. Este ión precursor se transfiere a la celda de colisión (hexapolo) donde se fuerza su fragmentación. Los iones producto generados en este proceso (iones de segunda generación) son analizados posteriormente en el TOF. Los iones que se observan en estos dos modos de operación (TOF-MS y TOF-MS/MS) son generalmente equivalentes a los que se pueden observar en una trampa de iones en las etapas de MS y MS².

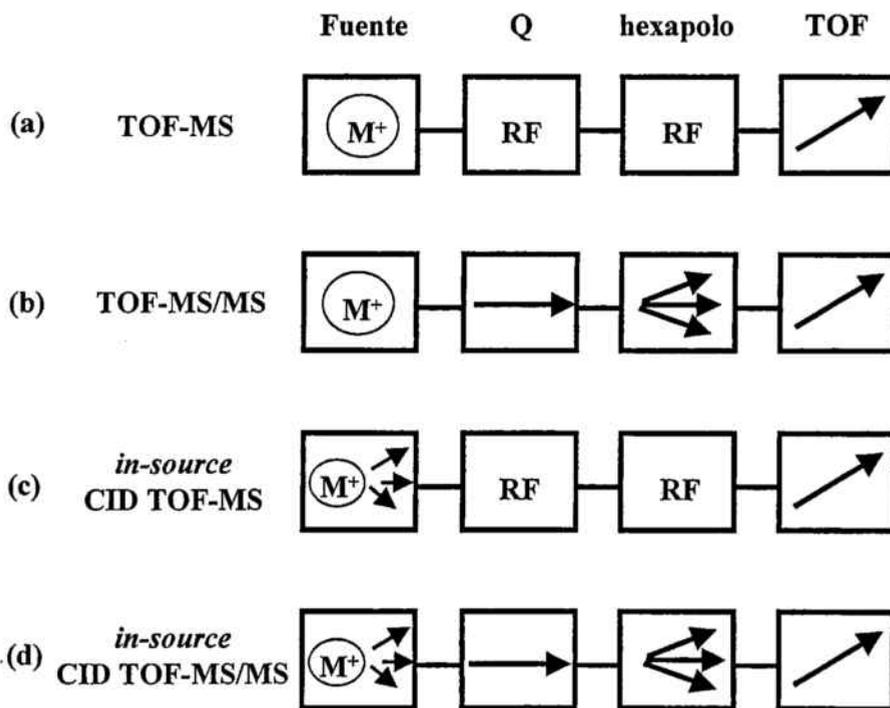


Figura 3.2. Modos de operación con un instrumento híbrido Q-TOF.

Como se ha comentado anteriormente, es posible fragmentar los iones en la fuente de ionización. El análisis directo de estos iones fragmento con el TOF da lugar a los espectros *in-source* CID-TOF-MS (Figura 3.2 c). Valores elevados del voltaje del cono no solo producen la fragmentación del ión molecular, sino que pueden forzar la fragmentación de los iones producto que se hayan formado, dando lugar a fragmentos de distintas generaciones. La comparación de estos espectros con los de TOF-MS/MS y IT-MS² permite identificar los iones de segunda generación formados en la fuente de ionización y que són útiles para obtener los espectros *in-source* CID-TOF-MS/MS.

El último modo de operación aprovecha la información obtenida en los modos anteriores para proporcionar los espectros *in-source* CID-TOF-MS/MS. Los iones de segunda generación obtenidos en la fuente de ionización se seleccionan en el cuadrupolo para ser utilizados como iones precursores. En la celda de colisión se fuerza su fragmentación generando los iones de tercera generación y que, posteriormente, son analizados en el TOF. Los iones presentes en estos espectros son, generalmente, equivalentes a los que se observan en IT-MS³.

Finalmente, se tiene que tener en cuenta que en la celda de colisión pueden tener lugar procesos de fragmentación por colisiones múltiples de los iones en el tiempo que éstos se encuentran en la celda antes de ser enviados al TOF y siempre que la energía que se aplica sea suficientemente elevada. Estos procesos dan lugar a fragmentos de generaciones superiores y que en una trampa de iones solo se observan en etapas múltiples de fragmentación (MS³, MS⁴, etc.), ya que una vez generados los iones producto, éstos quedan aislados en órbitas estables y con energía insuficiente para proseguir con fragmentaciones sucesivas.

Por otra parte, en la trampa de iones es posible que tengan lugar reacciones ión-molécula que dan lugar a iones producto diferentes a los que se generan por fragmentaciones directas a partir del ión precursor. Este tipo de iones no se observan en sistemas de tándem en el espacio, por ejemplo Q-TOF.

En consecuencia, para plantear un estudio de caracterización estructural y de rutas de fragmentación de manera consistente parece necesario combinar la información procedente de un sistema de trampa de iones, que nos proporciona una cierta seguridad sobre el orden genealógico de los iones, y de un sistema de cuadrupolo-tiempo de vuelo, que suministra la masa exacta y, por tanto, la composición elemental precisa de los fragmentos de diferentes generaciones.

El estudio de los espectros MS y MS² para los cuats y los tres herbicidas deuterados utilizando la trampa de iones se ha descrito con detalle en el Artículo IV (sección 3.3) que se incluye en el Capítulo 2 (apartado 2.3.2.4) de esta memoria. El estudio de los espectros MS³ y MS⁴ así como el trabajo llevado a cabo con el Q-TOF se incluye en la comunicación científica del siguiente apartado (Artículo V). En el apartado 3.2.2 se incluyen algunos resultados experimentales adicionales concernientes a los compuestos deuterados que no se incluyeron en la comunicación científica pero que ayudan en el establecimiento de las rutas de fragmentación de los cuats.

3.3.1. Artículo V

High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides

O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran

Journal of Mass Spectrometry (2004) *in press*.

High mass accuracy in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry and multi-step mass spectrometry as complementary tools for fragmentation studies of quaternary ammonium herbicides

Oscar Núñez, Encarnación Moyano and Maria Teresa Galceran*

Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1–11, 08028 Barcelona, Spain

Received 5 January 2004; Accepted 30 March 2004

Fragmentation studies using both an ion-trap mass analyzer and a hybrid quadrupole time-of-flight (Q-TOF) mass spectrometer were performed in order to establish the fragmentation pathways of organic molecules. A general strategy combining MS^n data ($n = 1–4$) in an ion-trap analyzer with tandem mass spectrometry and in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (CID MS/MS) in a Q-TOF instrument was applied. The MS^n data were used to propose a tentative fragmentation pathway following genealogical relationships. When several assignments were possible, MS/MS and in-source CID MS/MS (Q-TOF) allowed the elemental compositions of the fragments to be confirmed. Quaternary ammonium herbicides (quats) were used as test compounds and their fragmentation pathways were established. The elemental composition of the fragments was confirmed using the TOF analyzer with relative errors <0.0023 Da. Some fragments previously reported in the literature were reassigned taking advantage of the high mass resolution and accuracy of the Q-TOF instrument, which made it possible to solve losses where nitrogen was involved. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: quaternary ammonium herbicides; quats; multistep mass spectrometry; ion trap; quadrupole time-of-flight

INTRODUCTION

Mass spectrometry (MS) techniques have been widely used in many scientific fields as detection systems or for structure elucidation.^{1,2} The study of fragmentation pathways is particularly useful in the characterization of analytes and the identification of specific transitions, since it permits their unequivocal assignment. Triple-quadrupole instruments and ion-trap instruments are normally used to obtain this information.^{3–5} However, the low resolution achieved with these instruments sometimes fails to permit the exact assignment of the ion fragments observed in the spectra. It is true that a slightly higher resolution in an ion-trap instrument can be obtained via slow and short scans, but the mass accuracy is poor.⁶ In recent years, time-of-flight mass spectrometry (TOFMS) has gained considerable momentum for mass analysis. High selectivity, with resolutions of ~ 10000 , now attainable without loss of sensitivity, and high mass accuracy, due to very stable calibration,⁷ make these instruments particularly useful for the assignment of

elemental compositions. These analyzers transmit ions in a large m/z interval, and hybrid devices such as quadrupole time-of-flight (Q-TOF) and ion-trap-time of-flight (QIT-TOF)^{8,9} mass spectrometers offer excellent tandem MS performance in the product ion scan mode,⁷ providing an effective tool for the study of fragmentation pathways.

In this study, ion-trap MS^n and in-source collision-induced dissociation tandem mass spectrometry (CID MS/MS) in a Q-TOF instrument were used as complementary techniques for structure characterization and for the study of the fragmentation pathways of small organic molecules. A family of quaternary ammonium herbicides named quats was chosen as test analytes. This family includes three herbicides, paraquat (PQ), diquat (DQ) and difenzoquat (DF), and the two plant-growth regulators, chlormequat (CQ) and mepiquat (MQ). These compounds are extensively used to control many types of weeds and pests in a wide variety of agricultural and non-agricultural settings. They have been classified as moderately hazardous by the World Health Organization,¹⁰ and some of them have been included on priority lists and are regulated in drinking water^{11,12} and in other matrices such as fruit.^{13,14}

Liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) and capillary electrophoresis/mass spectrometry (CE/MS)

*Correspondence to: Maria Teresa Galceran, Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Martí i Franquès 1–11, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: galceran@apolo.ubi.ub.es
Contract/grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología; Contract/grant number: REN2000-0885 TECNO.

are the techniques that have most often been applied for the determination of quats using a range of analyzers such as sector,^{15,16} single-quadrupole,^{17–23} triple-quadrupole^{24,25} and ion-trap instruments.^{20,26–29} Nevertheless, only a few studies have used MS/MS to study fragmentation pathways, giving tentative assignments of the fragment ions.^{24–26,29} One detailed MSⁿ study on an ion-trap instrument²⁶ revealed a number of previously unreported ions. However, the analyzer used in that study offered only low resolution and some of the fragment ion assignments can be explained by means of several elemental compositions.

To our knowledge, only three papers have reported the study of quats using TOFMS. Two of these papers used MS for selective detection for quantitative purposes without emphasizing structural elucidation.^{30,31} Some quats have been used as test analytes to demonstrate the applicability of matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) TOFMS for the analysis of small organic molecules.³² Although a considerable number of metastable peaks were described in that study, the fragmentation patterns proposed were unclear and the exact mass was not used for fragment ion assignment.

In this work, we used multi-step ion-trap mass spectrometry (MSⁿ) in combination with in-source MS/MS coupled with a Q-TOF instrument for the study of the fragmentation pathway of quaternary ammonium herbicides in order to assess the viability of the method as a general strategy for elucidating fragment ions. The use of labeled compounds for paraquat (D₈), diquat (D₄) and chlormequat (D₄) helped in the assignment of fragment ions and the high mass accuracy provided by the TOF mass spectrometer allowed the reassignment of some fragment ions previously reported in the literature.

EXPERIMENTAL

Chemicals

Quaternary ammonium herbicides were obtained from the following sources: paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion, PQ) was purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA), diquat (1,1'-diethylene-2,2'-bipyridinium ion, DQ), difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium ion, DF) and chlormequat (2-chloroethyltrimethylammonium ion, CQ) from Chemservice (West Chester, PA, USA), and mepiquat (1,1'-dimethylpiperidinium ion, MQ) from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). The labeled analytes paraquat-d₈ (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium-rings-d₈ ion, PQ-d₈), diquat-d₄ (1,1'-ethylene-d₄-2,2'-dipyridinium ion, DQ-d₄) and chlormequat-d₄ (2-chloroethyl-d₄-trimethylammonium ion, CQ-d₄, 100 mg l⁻¹) were obtained from Dr Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

All reagents were of analytical grade. Methanol and formic acid (98–100%) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany) and ammonium formate from Fluka (Buchs, Switzerland). Diethylamine from Sigma (St. Louis, MO, USA), ethylviologen (1,1'-diethyl-4,4'-bipyridinium ion) (EV) from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and heptylviologen (1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium ion) (HV) from TCI (Tokyo, Japan) were used as lock mass and to expand the mass calibration range when using the Q-TOF instrument. Water

was purified using an Elix 3 coupled to a Milli-Q system (Millipore, Bedford, MA, USA).

Stock standard solutions of individual quats, PQ-d₈ and DQ-d₄ (1 mg l⁻¹) were prepared in purified water and stored in plastic (polyethylene) vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by dilution in 400 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.0)–methanol 10:90 (v/v) solution, and were degassed by sonication before use.

Instrumentation and MS conditions

A Classic LCQ instrument (Thermo-Finnigan, San Jose, CA, USA) equipped with an ion-trap mass analyzer and a coaxial pneumatically assisted electrospray ionization source was used for the study of the MSⁿ fragmentation pathways of quaternary ammonium herbicides. The working conditions were as follows: sheath gas flow-rate, 90 a.u. (arbitrary units); auxiliary gas flow-rate, 40 a.u.; capillary temperature, 275 °C; capillary voltage, 13.0 V; and electrospray needle voltage, 3.0 kV. The mobile phase pumping system was an Alliance Waters (Milford, MA, USA) 2690 Separations Module. A 10 mg l⁻¹ standard solution of each compound prepared in 400 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.0)–methanol (1:1, v/v) was infused at a flow-rate of 3 μl min⁻¹ using the syringe pump included in the LCQ instrument, and was mixed with the same solvent (300 μl min⁻¹) by means a Valco zero dead volume tee-piece (Supelco, Alcobendas, Spain). MSⁿ ion-trap data acquisition was carried out in full scan (*m/z* 50–300) in profile mode. An isolation width (*m/z*) between 1.2 and 1.5 was used in order to avoid interferences from isotopic species, 1 μscans were carried out with a maximum injection time of 200 ms and the activation time (AT, duration of the voltage applied to the endcap electrodes) ranged from 32 to 35 ms. The activation Q (AQ, magnitude of the voltage applied to the ring electrode) was set between 0.3 to 0.4 and the normalized collision energy (NCE %, amplitude of the voltage applied to the endcap electrodes) from 28 to 40. Ion-trap MS data were processed using Xcalibur software version 1.2.

A Q-TOF-2 mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) working in the W-Optics mode was used to confirm the assignment of the fragment ions on the basis of highly accurate measurements of mass provided by this instrument. This mass spectrometer was also equipped with a Z-spray ionization source. A cone gas flow-rate of 50 a.u. and a desolvation gas flow-rate of 300 a.u. were used. Standard solutions of concentration between 1 and 10 mg l⁻¹ for each compound prepared in 400 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.0)–methanol (10:90, v/v) were infused at a flow-rate of 9 μl min⁻¹ using a syringe pump (Harvard Apparatus, Natick, MA, USA). The source temperature and desolvation temperature were set at 80 and 130 °C, respectively, and the capillary voltage was maintained at 3.0 kV. Argon was used as the collision gas for MS/MS experiments at a pressure ranging from 5 to 15 a.u. When working with in-source CID MS/MS, the cone voltage was set between 10 to 100 V and the collision cell offset voltage between 10 to 35 V, the optimum value being chosen for each compound. Full-scan from *m/z* 10 to 300 in profile mode was

used for both MS and product ion scans. The quadrupole worked at unit mass resolution and a window width of 1.0 was used to select the precursor ions in order to avoid interferences from isotopic species. A scan time of 1.0 s was used with an interscan time of 0.1 s. Q-TOFMS data were processed using MassLynx software version 3.5.

For high mass accuracy, the Q-TOF was calibrated using quats, prepared in 400 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.0)–methanol (10:90, v/v) at a level of 1–10 mg l⁻¹, as calibrating standards. Moreover, to extend the mass range, diethylammonium ion (*M*, 74.0970 Da), EV (*M*, 214.1470 Da) and HV (*M*, 354.3035 Da) were added to the calibration standard mixture. Temperature variations in the environment and in the instrument power supplies can cause drifts in measurements of a few hundred parts per million over the course of a day. The instrument drift can be compensated by applying a lock mass correction, which recalculates the spectral data by using the calibration curve obtained previously. EV was used as lock mass for MS experiments and the precursor ions for MS/MS experiments.

RESULTS AND DISCUSSION

In this study, the strategy used for elucidating fragment ions in order to establish the fragmentation pathways of quats was a combination of spectral information from the multi-step mass spectral data obtained with an ion-trap analyzer and the mass accuracy measurements of fragment ions obtained with a Q-TOF instrument. The spectral data provided by the ion trap analyzer were used to link compositions via genealogical relationships. Nevertheless, owing to the low resolution of the ion trap, fragment ions may be assigned to more than one elemental composition, giving as a result several fragmentation pathways. In these cases, the accurate mass measurement of the uncertain fragment ions by MS/MS and in-source CID MS/MS with the Q-TOF instrument allowed accurate elemental composition assignment. Moreover, when necessary the data concerning the labeled compounds were also considered.

The starting point of the general strategy for fragmentation studies of quats was the ion-trap single mass spectra obtained under working conditions that maximize the abundance of molecular ions and prevent fragmentation. To obtain ions of second generation, MS/MS experiments were performed with the ion trap.²⁹ Product ions coming from a direct loss were stabilized in the ion trap after fragmentation of precursor ions and avoiding subsequent fragmentations, making it possible to link each precursor ion with their corresponding product ions. However, due to the low mass resolution of the ion trap, different assignments could be proposed for some fragments, especially when nitrogen was involved. In these cases, MS/MS fragmentation with a Q-TOF instrument solved the problem. For instance, when studying the spectra obtained by MS/MS with the ion trap for DQ, two tentative assignments were proposed, [M – NH₂]⁺ and [M – CH₄]⁺⁺ for the ion at *m/z* 168 and [M – CNH]⁺⁺ and [M – C₂H₃]⁺ for the ion at *m/z* 157.²⁹ Cheng and Hercules³² also proposed the loss of the HCN group to explain the ion at *m/z* 157 obtained using a MALDI-TOF instrument.

The MS/MS data obtained with the Q-TOF instrument (Table 1) confirmed that the fragmentation begins in the ethylene group, as can be demonstrated by the good mass agreement obtained for the ions [M – C₂H₃]⁺ (–0.0010 Da) and [M – CH₄]⁺⁺ (–0.0006 Da). Following the same criterion, the ions obtained at *m/z* 169.0760 and 156.0694 can be assigned as losses related to the ethylene group, [M – CH₃]⁺⁺ (–0.0006 Da) and [M – C₂H₄]⁺ (–0.0007 Da).

Comparing the MS/MS data from tandem-in-time (ion trap)²⁹ with data obtained by tandem-in-space (Q-TOF), several differences can be observed. For instance, the base peak for DQ in the Q-TOF instrument was the ion at *m/z* 183.0924 (Table 1), whereas in the ion trap it was the ion at *m/z* 168. The abundance of ions at *m/z* 168, 158 and 157 obtained using the ion trap decreased in the Q-TOF owing to the lower fragmentation achieved with this instrument under these working conditions and to multiple collisions in the r.f. quadrupole. The labeled compound DQ-*d*₄ gave a similar MS/MS pattern (for the ion at *m/z* 188.1247) shifted in mass according to the deuterium atoms. However, fragment ions that involve the ethylene-*d*₄ group showed hydrogen–deuterium exchange; for instance, in addition to the fragment at *m/z* 158.0825 (0.0002 Da) for DQ-*d*₄ assigned as [M – C₂D₃]⁺, losses of C₂D₂H and C₂DH₂ that generated ions at *m/z* 159.0874 and 160.0916 were also observed (0.0015 and 0.0005 Da, respectively). These ions were less abundant than [M – C₂D₃]⁺.

For PQ and DQ, doubly charged ions were observed in the single mass spectra²⁹ and were selected as precursor ions in MS/MS studies (Table 1). The spectrum of the doubly charged ion of DQ (*m/z* 92) obtained by MS/MS with both instruments partially agreed with that described by Evans *et al.*²⁶ Nevertheless, those authors did not observe the ion at *m/z* 168 and they attributed the ion at *m/z* 157 to the loss of a CNH group. The comparison of the exact mass of this fragment (157.0891 Da) with that obtained by the Q-TOF instrument (*m/z* 157.0753) gave a high mass error (–0.0138 Da), indicating that the loss of a C₂H₃ group is a better assignment (Table 1). Moyano *et al.*²⁵ also studied this compound using a triple-quadrupole instrument and assigned the ions at *m/z* 168 and 157 to the losses of NH₂ and CNH, respectively. With the information provided by the Q-TOF, we have demonstrated that these ions are due to the losses of CH₄ and C₂H₃, respectively. Moreover, the doubly charged ion at *m/z* 84.5382 reported as the loss of a CH₄ group^{25,26} is actually due to the loss of a methyl group ([M – CH₃]²⁺), as demonstrated by the results obtained using the Q-TOF instrument (Table 1).

For DF, the ion at *m/z* 193.0889 has been explained in the literature by the loss of the group CH₂NNCH₂.^{27,29,32} However, the data obtained using the Q-TOF instrument did not agree with the exact mass of this even-electron ion (mass error of –0.0128 Da). This ion can be better explained by the loss of a C₂H₆CN group, giving an odd-electron ion that retains only one nitrogen in its structure and differs from the theoretical mass by only –0.0002 Da (Table 1). For the ion at *m/z* 208, a different behavior was observed using both the ion trap and the Q-TOF instruments (Fig. 1). In the ion trap this

Table 1. MS/MS data for quaternary ammonium herbicides in a Q-TOF instrument

Compound	Formula	Precursor ion (m/z)	MS			Calculated m/z	Error (Da) ^a
			Product ion m/z (% relative abundance)	Assignment			
Paraquat (PQ)		186	186.1157 (10)	[M] ⁺⁺	186.1157	L.M.	
			185.1092 (<5)	[M - H] ⁺	185.1079	0.0013	
			171.0920 (100)	[M - CH ₃] ⁺	171.0922	-0.0002	
		93	171.0922 (100)	[M ²⁺ - CH ₃] ⁺	171.0922	0	
			169.0780 (10)	[M ²⁺ - CH ₃ - 2H] ⁺	169.0766	0.0014	
			144.0816 (20)	[M ²⁺ - CH ₃ - HCN] ⁺	144.0813	0.0003	
			94.0660 (15)	[M ²⁺ - C ₆ H ₆ N] ⁺	94.0657	0.0003	
			93.0578 (45)	[M] ²⁺	93.0578	L.M.	
			85.0424 (50)	[M ²⁺ - CH ₄] ²⁺	85.0422	0.0002	
			78.5452 (10)	[M ²⁺ - CH ₃ N] ²⁺	78.5446	0.0006	
Diquat (DQ)		184	184.1000 (22)	[M] ⁺⁺	184.1000	L.M.	
			183.0924 (100)	[M - H] ⁺	183.0922	0.0002	
			169.0760 (25)	[M - CH ₃] ⁺	169.0766	-0.0006	
			168.0681 (<5)	[M - CH ₄] ⁺⁺	168.0687	-0.0006	
			158.0849 (20)	[M - C ₂ H ₂] ⁺⁺	158.0844	0.0005	
		92	157.0756 (10)	[M - C ₂ H ₃] ⁺	157.0766	-0.0010	
			156.0694 (40)	[M - C ₂ H ₄] ⁺⁺	156.0687	0.0007	
			106.0651 (23)	[M - C ₅ H ₄ N] ⁺	106.0657	-0.0006	
			168.0681 (9)	[M ²⁺ - CH ₄] ⁺⁺	168.0687	-0.0006	
			157.0753 (10)	[M ²⁺ - C ₂ H ₃] ⁺	157.0766	-0.0013	
			130.0658 (9)	[M ²⁺ - C ₂ H ₃ - HCN] ⁺	130.0657	0.0001	
Difenzoquat (DF)		249	249.1392 (60)	[M] ⁺	249.1392	L.M.	
			234.1158 (15)	[M - CH ₃] ⁺⁺	234.1157	0.0001	
			233.1089 (20)	[M - CH ₄] ⁺	233.1079	0.0010	
		208.1143 (5)	[M - CH ₃ CN] ⁺	208.1126	0.0017		
			193.0889 (100)	[M - C ₂ H ₆ CN] ⁺⁺	193.0891	-0.0002	
			146.0977 (7)	[M - C ₆ H ₅ CN] ⁺	146.0970	0.0007	
			131.0737 (75)	[M - C ₆ H ₅ - CH ₃ CN] ⁺⁺	131.0735	0.0002	
			130.0657 (40)	[M - C ₆ H ₅ - CH ₃ CN - H] ⁺	130.0657	0	
			118.0653 (60)	[M - C ₆ H ₅ - CHCNCH ₃] ⁺	118.0657	-0.0004	
Chlormequat (CQ)		122	122.0737 (100)	[M] ⁺	122.0737	L.M.	
			106.0430 (10)	[M - CH ₄] ⁺	106.0424	0.0006	
			94.0431 (10)	[M - C ₂ H ₄] ⁺	94.0424	0.0007	
			86.0975 (8)	[M - HCl] ⁺	86.0970	0.0005	
			63.0001 (30)	[M - N(CH ₃) ₃] ⁺	63.0002	-0.0001	
			60.0818 (5)	[M - ClC ₂ H ₄ + H] ⁺	60.0813	0.0005	
			59.0737 (40)	[M - ClC ₂ H ₄] ⁺⁺	59.0735	0.0002	
			58.0654 (22)	[M - ClC ₂ H ₅] ⁺	58.0657	-0.0003	
Mepiquat (MQ)		114	114.1283 (30)	[M] ⁺	114.1283	L.M.	
			99.1046 (10)	[M - CH ₃] ⁺⁺	99.1048	-0.0002	
			98.0962 (100)	[M - CH ₄] ⁺	98.0970	-0.0008	
			69.0706 (5)	[M - HN(CH ₃) ₂] ⁺	69.0704	0.0002	
			58.0655 (5)	[M - C ₄ H ₈] ⁺	58.0657	-0.0002	

^a L.M., ion used as lock mass correction.

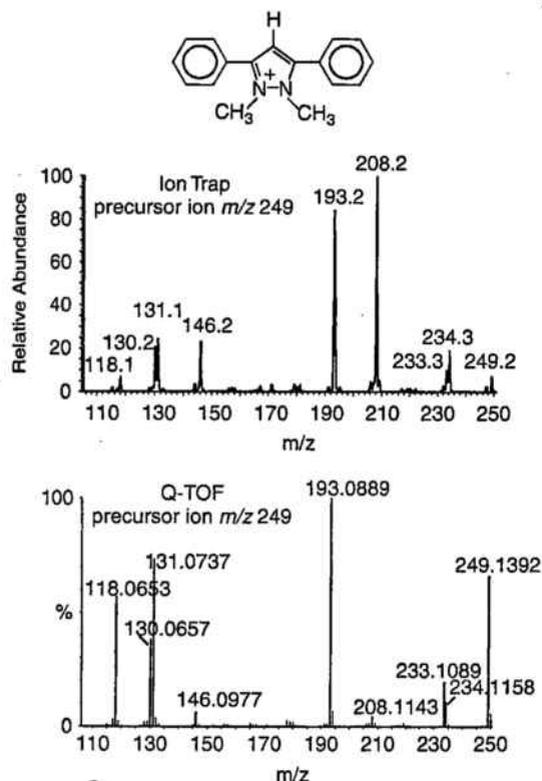


Figure 1. MS/MS in an ion trap and in a Q-TOF for DF (precursor ion: m/z 249).

fragment is the base peak, whereas in the Q-TOF the relative abundance is only 5%. The m/z obtained in the Q-TOF for this ion is 208.1143, which can be explained by the direct loss of CH_3CN with an error of only 0.0017 Da. The higher abundance of this ion in the ion trap can be explained if two fragmentation patterns occurred: (i) the direct fragmentation mentioned above and (ii) an ion-molecule reaction in the trap between the ion at m/z 193 and the methyl radical produced in the formation of the ion m/z 234. Taking into account the assignment of the ion m/z 193.0889, which is $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_6\text{CN}]^+$, the ion at m/z 208 corresponds to

$[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_6\text{CN} + \text{CH}_3]^+$. The difference in the abundance of the ion at m/z 208 in the two instruments suggested that in the ion trap the most important fragmentation pattern is the ion-molecule reaction rather than the direct fragmentation proposed by Evans *et al.*²⁶ As in the case of the ion at m/z 208.1143 mentioned above, the ion at m/z 146.0977 was obtained with a low relative abundance (7%) when using the Q-TOF instrument (Fig. 1). Hence we also propose that two mechanisms are possible: an ion-molecule reaction between the ion at m/z 131.0737 and a methyl radical, $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5 - \text{CH}_3\text{CN} + \text{CH}_3]^+$,²⁹ and direct formation, $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{CN}]^+$,²⁶ the ion-molecule reaction being more likely when working with the ion trap instrument.

Ions of third generation were obtained by MS^3 in an ion trap in order to link them with the corresponding second-generation ions used as precursor ions. However, some fragments were difficult to assign and in these cases in-source CID MS/MS with the Q-TOF instrument were able to solve the problem. To study the in-source CID MS ions the cone voltage was varied from 10 to 100 V. Since the in-source fragmentation produced a large number of fragments, only the most abundant ones are shown in the in-source CID MS curves in Fig. 2. As can be seen, a range of patterns was obtained; whereas PQ and DQ gave fragments throughout the range studied, MQ and DF were fragmented only at voltages higher than 50 V and for CQ no fragmentation was observed.

For PQ, at low cone voltage only the ions at m/z 186.1152, 185.1091 and 93.0577 were observed. On increasing the cone voltage, the doubly charged ion at m/z 93.0577 disappeared and fragmentation of the other ions occurred, giving as the most abundant fragment the ion at m/z 171.0920. DQ showed the ions at m/z 184.1006, 183.0925 and 92.0507 at low cone voltage. As in the case of PQ, with increase in the cone voltage the doubly charged ion at m/z 92.0507 disappeared. In contrast, a larger number of fragments appeared, the ions at m/z 168.0684, 157.0763 and 156.0694 being the most abundant. In relation to DF, this compound only gave fragments at voltages above 50 V and the relative abundances were <20%. In order to simplify the in-source

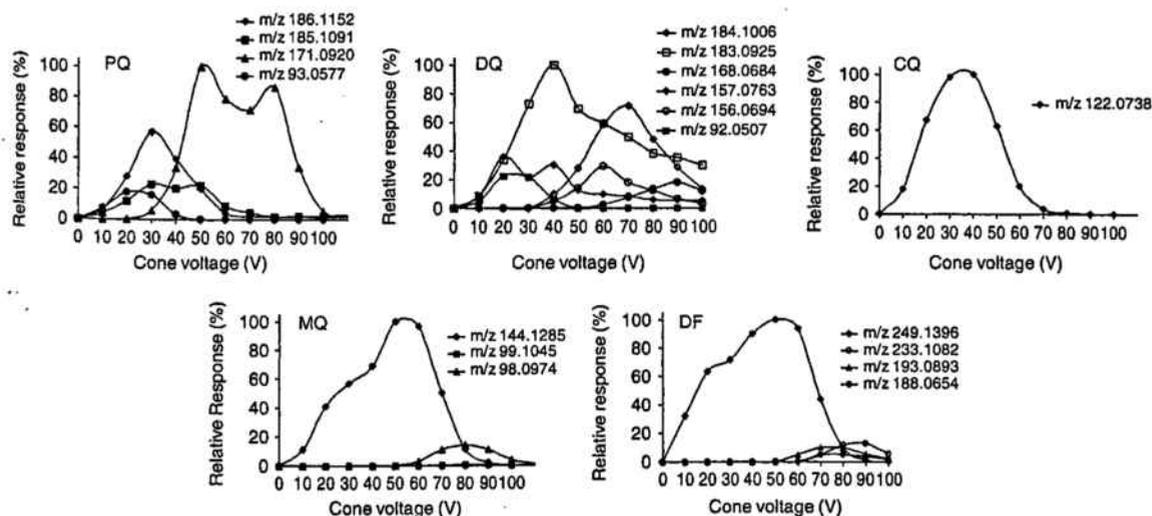


Figure 2. In-source MS fragmentation curves of quats.

1 fragmentation curve of DF in Fig. 2, only the ions at m/z
2 233.1082, 193.0893 and 118.0654 have been included.

3 The spectra obtained by in-source CID MS were com-
4 pared with those obtained by MS/MS in order to identify
5 the second-generation ions that can be used to elucidate
6 fragmentation pathways. It should be noted that the ions
7 obtained in the source at low cone voltage were the same
8 as those obtained by MS/MS using the Q-TOF instru-
9 ment. The isolation of these fragments in the quadrupole
10 and their fragmentation in the r.f. quadrupole provided
11 spectra by in-source CID MS/MS comparable to those
12 obtained by MS³ with an ion-trap instrument. More-
13 over, the appropriate selection of a cone voltage high
14 enough to produce third-generation ions in combination
15 with MS/MS in the r.f. quadrupole provided fragment
16 patterns equivalent to those obtained with MS⁴ using
17 an ion-trap instrument. It should also be pointed out
18 that the in-source fragmentation occurred at atmospheric
19 pressure, indicating that ions may be fragmented via a
20 mechanism other than r.f. quadrupole fragmentation under
21 high vacuum.

22 Tables 2 and 3 show the MS³ spectral data (ion trap) and
23 the in-source CID MS/MS spectral data (Q-TOF) for some
24 ions of DF, PQ and DQ. The elemental composition assigned

to each fragment and the mass error obtained with the
Q-TOF were established following the same procedure as
used previously for MS/MS. For instance, when studying
the fragmentation pathway of PQ, in MS³ of the ion
at m/z 171 a fragment at m/z 103 was obtained using
the ion trap (Fig. 3). For this fragment, two elemental
compositions involving nitrogen can be proposed: the
odd-electron ion $[M - CH_3 - CH_3CNC_2H_2]^{+\bullet}$ and the even-
electron ion $[M - CH_3 - HCN - CH_2CN]^+$. The m/z value
obtained by in-source CID MS/MS for this fragment was
103.0551 (Fig. 3). The ion $[M - CH_3 - CH_3CNC_2H_2]^{+\bullet}$ (M_r
103.0422 Da) gave a mass error of 0.0129 Da whereas the ion
 $[M - CH_3 - HCN - CH_2CN]^+$ (M_r 103.0548 Da) gave a mass
error of 0.0003 Da. Hence this even-electron ion is a more
accurate assignment for this fragment (Table 3).

To our knowledge, there are only two studies that gave
fragmentation pathways for these compounds, by Evans
*et al.*²⁶ using MSⁿ with an ion trap and by Cheng and
Hercules³² using post-source decay with a MALDI-TOF
instrument. Our study with Q-TOF proposes a more pre-
cise assignment of fragments (error <0.0023 Da). Moreover,
previously unreported MS³ data were obtained which helped
to establish more consistent fragmentation pathways for this
family of compounds.

Table 2. MS³ data (ion trap) and in-source CID MS/MS data (Q-TOF) for difenzoquat (m/z 249)

Precursor ion ^a (m/z)	Ion trap		Q-TOF ^a		
	Product ion m/z (% relative abundance)	Product ion m/z (% relative abundance)	Assignment	Calculated m/z	Error (Da) ^b
234.3	234.3 (36)	234.1157 (50)	$[M - CH_3]^{+\bullet}$	234.1157	L.M.
	233.3 (100)	233.1100 (100)	$[M - CH_3 - H]^+$	233.1079	0.0021
	219.2 (19)	219.0945 (20)	$[M - CH_3 - CH_3]^+$	219.0922	0.0023
	131.0 (7)	131.0730 (10)	$[M - CH_3 - C_6H_5CN]^{+\bullet}$	131.0735	-0.0005
	130.1 (3)	130.0647 (30)	$[M - CH_3 - C_6H_5CN - H]^+$	130.0657	-0.0010
208.2	208.2 (13)		$[M - CH_3CN]^+$		
	193.3 (100)		$[M - CH_3CN - CH_3]^{+\bullet}$		
	181.2 (7)		$[M - CH_3CN - HCN]^+$		
	130.2 (9)		$[M - CH_3CN - C_6H_5 - H]^+$		
193.2	193.2 (15)	193.0891 (50)	$[M - C_2H_6CN]^{+\bullet}$	193.0891	L.M.
	192.3 (44)	192.0827 (40)	$[M - C_2H_6CN - H]^+$	192.0813	0.0014
	191.3 (32)	191.0749 (10)	$[M - C_2H_6CN - 2H]^{+\bullet}$	191.0735	0.0014
	165.2 (100)	165.0710 (100)	$[M - C_2H_6CN - H_2CN]^+$	165.0704	0.0006
146.1	146.1 (20)		$[M - C_6H_5CN]^+$		
	131.1 (100)		$[M - C_6H_5CN - CH_3]^{+\bullet}$		
	118.1 (5)		$[M - C_6H_5CN - C_2H_4]^+$		
131.2	131.2 (13)	131.0735 (40)	$[M - C_6H_5CH_3CN]^{+\bullet}$	131.0735	L.M.
	130.2 (100)	130.0649 (100)	$[M - C_6H_5CH_3CN - H]^+$	130.0657	-0.0008
130.2	130.2 (21)	130.0657 (70)	$[M - C_6H_5CH_3CN - H]^+$	130.0657	L.M.
	128.1 (42)	128.0508 (20)	$[M - C_6H_5CH_3CN - H - 2H]^+$	128.0500	0.0008
	103.1 (100)	103.0549 (100)	$[M - C_6H_5CH_3CN - H - HCN]^+$	103.0548	0.0001
	77.1 (5)	77.0397 (70)	$[M - C_6H_5CH_3CN - H - CHCNCH_2]^+$	77.0391	0.0006
118.2	118.2 (33)	118.0657 (30)	$[M - C_6H_5 - CHCNCH_3]^+$	118.0657	L.M.
	91.2 (44)	91.0549 (35)	$[M - C_6H_5 - CHCNCH_3 - HCN]^+$	91.0548	0.0001
	77.1 (100)	77.0394 (100)	$[M - C_6H_5 - CHCNCH_3 - CH_3CN]^+$	77.0391	0.0003

^a Ion trap, precursor ion in MS³; Q-TOF, precursor ion for in-source MS/MS.

^b M., ion used as lock mass correction.

Table 3. MS³ and MS⁴ data (ion trap) and in-source CID MS/MS data (Q-TOF) for paraquat (*m/z* 186) and diquat (*m/z* 184)

Compound/ ion trap spectrum	Transition in MS ⁿ	Ion trap		Q-TOF		
		Product ion <i>m/z</i> (% relative abundance)	Product ion <i>m/z</i> (% relative abundance)	Assignment	Calculated <i>m/z</i>	Error (Da) ^a
PQ/MS ³	186.1 > 185.2 ^b	185.2 (10)	185.1079 (30)	[M - H] ⁺	185.1079	L.M.
		183.2 (20)	183.0929 (5)	[M - H - 2H] ⁺	183.0922	0.0007
		170.2 (100)	170.0844 (100)	[M - H - CH ₃] ⁺ *	170.0844	0
		158.3 (20)	158.0978 (5)	[M - H - HCN] ⁺	158.0970	0.0008
		144.2 (25)	144.0821 (10)	[M - H - CH ₃ CN] ⁺	144.0813	0.0008
		118.2 (5)	118.0662 (5)	[M - H - CH ₃ CN - C ₂ H ₂] ⁺	118.0657	0.0005
PQ/MS ³	186.1 > 171.2 ^b	171.2 (60)	171.0922 (100)	[M - CH ₃] ⁺	171.0922	L.M.
		169.2 (33)	169.0767 (20)	[M - CH ₃ - 2H] ⁺	169.0766	0.0001
		157.3 (<5)	157.0752 (10)	[M - CH ₃ - CH ₂] ⁺	157.0766	-0.0014
		156.1 (70)	156.0681 (40)	[M - CH ₃ - CH ₃] ⁺ *	156.0687	-0.0006
		155.2 (80)	155.0607 (80)	[M - CH ₃ - CH ₄] ⁺	155.0609	-0.0002
		144.2 (100)	144.0813 (28)	[M - CH ₃ - HCN] ⁺	144.0813	0
		143.3 (25)	143.0735 (38)	[M - CH ₃ - H ₂ CN] ⁺ *	143.0735	-0.0006
		130.1 (25)	130.0657 (20)	[M - CH ₃ - CH ₃ CN] ⁺	130.0657	0.0002
		115.1 (5)	115.0559 (20)	[M - CH ₃ - 2H ₂ CN] ⁺	115.0548	0.0011
		103.2 (15)	103.0551 (55)	[M - CH ₃ - 2HCN - CH ₂] ⁺	103.0548	0.0003
		91.1 (10)	91.0553 (12)	[M - CH ₃ - 2HCN - C ₂ H ₂] ⁺	91.0548	0.0005
		77.1 (5)	77.0396 (65)	[M - CH ₃ - 2HCN - C ₃ H ₄] ⁺	77.0391	0.0005
DQ/MS ³	184.1 > 183.2 ^b	183.2 (25)	183.0922 (35)	[M - H] ⁺	183.0922	L.M.
		181.3 (15)	181.0782 (10)	[M - H - 2H] ⁺	181.0766	0.0016
		168.2 (100)	168.0690 (95)	[M - H - CH ₃] ⁺ *	168.0687	0.0003
		157.2 (10)	157.0765 (100)	[M - H - C ₂ H ₂] ⁺	157.0766	-0.0001
		130.2 (<5)	130.0660 (30)	[M - H - C ₂ H ₂ - HCN] ⁺	130.0657	0.0003
		106.2 (<5)	106.0666 (10)	[M - H - C ₅ H ₃ N] ⁺	106.0657	0.0009
DQ/MS ³	184.1 > 157.2 ^b	157.2 (100)	157.0766 (50)	[M - C ₂ H ₃] ⁺	157.0766	L.M.
		156.1 (25)	156.0696 (10)	[M - C ₂ H ₃ - H] ⁺ *	156.0687	0.0009
		131.1 (10)	131.0722 (10)	[M - C ₂ H ₃ - CN] ⁺ *	131.0735	-0.0013
		130.1 (50)	130.0648 (100)	[M - C ₂ H ₃ - HCN] ⁺	130.0657	-0.0009
		103.2 (<5)	103.0554 (15)	[M - C ₂ H ₃ - 2HCN] ⁺	103.0548	0.0006
		78.1 (10)	78.0350 (50)	[M - C ₂ H ₃ - C ₅ H ₅ N] ⁺	78.0344	0.0006
DQ/MS ⁴	184.1 > 183.2 > 168.2 ^b	168.2 (25)	168.0687 (70)	[M - H - CH ₃] ⁺ *	168.0687	L.M.
		167.1 (15)	167.0620 (50)	[M - H - CH ₃ - H] ⁺	167.0609	0.0011
		166.2 (10)	166.0536 (10)	[M - H - CH ₃ - 2H] ⁺ *	166.0531	0.0005
		142.2 (25)	142.0647 (40)	[M - H - CH ₃ - CN] ⁺	142.0657	-0.0010
		141.2 (100)	141.0581 (100)	[M - H - CH ₃ - HCN] ⁺ *	141.0578	0.0003
		140.1 (15)	140.0499 (45)	[M - H - CH ₃ - H ₂ CN] ⁺	140.0500	-0.0001
		117.2 (70)	117.0586 (60)	[M - H - CH ₃ - C ₃ HN] ⁺ *	117.0578	0.0008
		114.0 (20)	114.0473 (50)	[M - H - CH ₃ - C ₂ H ₂ N ₂] ⁺ *	114.0470	0.0003

^aL.M., ion used as lock mass correction.^bQ-TOF, precursor ion for in-source MS/MS.

For DF (Table 2), in-source CID MS/MS of the ions at *m/z* 208 and 146 could not be achieved owing to their low abundance in the Q-TOF instrument. For this reason, the assignment given in Table 3 was established for these ions taking into account the genealogical relationship with the precursor ions at *m/z* 208.1143 and 146.0977 (Table 1). When the single MS and MSⁿ fragmentation of DF had been studied with an ion trap instrument and the elemental composition of each fragment confirmed via the MS, MS/MS and in-source CID MS/MS with a Q-TOF instrument, the fragmentation pathway for this compound was proposed (Fig. 4(a)).

For PQ and DQ, only the MSⁿ data that could be confirmed using the Q-TOF instrument are indicated in Table 3. For PQ, the fragmentation of *m/z* 185 agrees with that proposed by other workers.^{24,26} The fragmentation of *m/z* 171 shown in Fig. 3 has not been reported previously. In Fig. 4(b), the fragmentation pathway proposed for this compound is given. In the case of DQ, the fragmentation of *m/z* 183 partially agrees with that proposed by Evans *et al.*,²⁶ although the ions at *m/z* 130 and 106 were obtained. For the spectrum of the ion at *m/z* 157, several fragments with a relative abundance >10% were observed. Of these

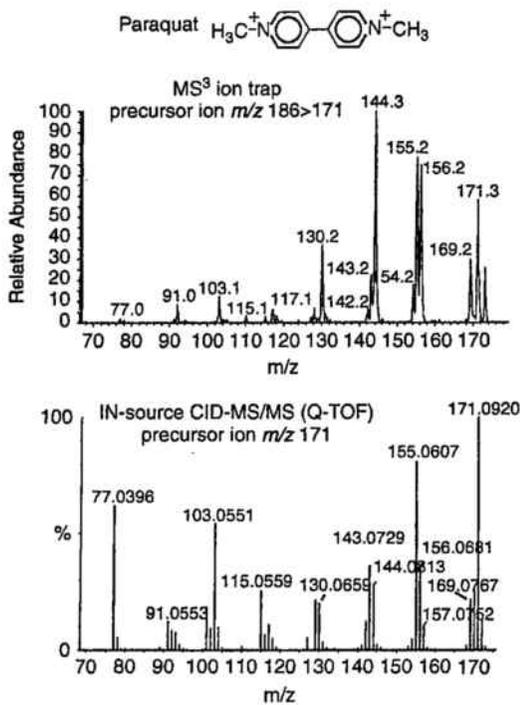


Figure 3. MS³ (ion trap) and in-source CID MS/MS (Q-TOF) for the ion *m/z* 171 of paraquat.

fragments, only the *m/z* 130 was reported by Evans *et al.*²⁶ DQ gave MS³ fragments of relatively high abundance and also sufficiently high fragmentation using in-source CID MS

at high cone voltages (Fig. 2). Therefore, MS⁴ of the ion at *m/z* 168 (Table 3) was performed and the elemental composition of the fragments confirmed by in-source CID MS/MS. Figure 5 shows the fragmentation pathway proposed for this compound.

MS³ of some ions of the two plant growth regulators was also carried out using the ion-trap instrument. For CQ, the fragmentation of the ion at *m/z* 94 ([M - C₂H₄)⁺) on MS³ gave ions at *m/z* 59 and 58, corresponding to losses of Cl and HCl, respectively. MS³ of the ion at *m/z* 86 ([M - HCl]⁺) only showed a radical ion at *m/z* 71, which was assigned as [M - HCl - CH₃)^{•+}. The labeled compound CQ-*d*₄ gave MS³ fragment ions similar to those proposed for CQ. As mentioned previously, no direct confirmation of these structures was possible using the Q-TOF instrument because no in-source fragmentation was obtained for CQ (Fig. 2). However, most of these fragments were also obtained by MS/MS and the same elemental composition could be expected. Both MS³ spectra are consistent with those obtained by Evans *et al.*²⁶ In the case of MQ, MS³ of the ions at *m/z* 99 ([M - CH₃)^{•+}) and 98 ([M - CH₄)⁺) was studied. The former gave the loss of hydrogen at *m/z* 98 ([M - CH₃ - H]⁺). Three ions were observed in MS³ of *m/z* 98 (*m/z* 96, 83 and 70), assigned as [M - CH₄ - 2H]⁺, [M - CH₄ - CH₃)^{•+} and [M - CH₄ - C₂H₄)⁺ respectively, although the odd-electron ion was obtained with a low relative abundance. In-source CID MS/MS of *m/z* 98 using the Q-TOF instrument gave fragments at *m/z* 96.0818, 83.0731 and 70.0662, which allowed confirmation of the proposed structures with the ion trap, with errors in the mass accuracy of 0.0005, -0.0004

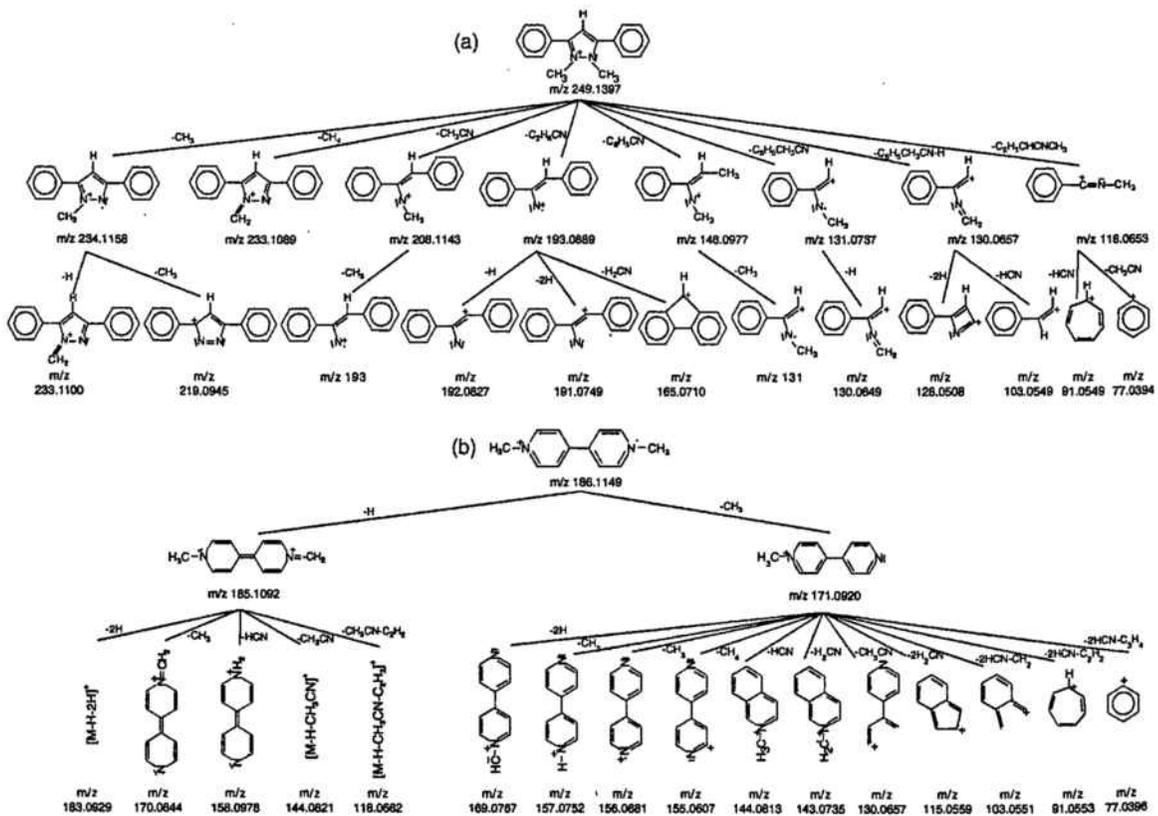


Figure 4. Fragmentation pathways of the herbicides (a) difenzoquat and (b) paraquat.

1 and 0.0005 Da, respectively. The ion at m/z 70 was consistent
 2 with the fragmentation of m/z 98 reported by Evans *et al.*,²⁶
 3 although they also obtained this ion in the MS³ of m/z 99.
 4 The fragments at m/z 96 and 83 have not been published
 5 previously. Figure 6 shows the fragmentation pathways for
 6 both plant growth regulators.

7
 8 **CONCLUSIONS**
 9

10 This study led to a general strategy for establishing
 11 fragmentation pathways, based on obtaining multi-step mass
 12 spectra in an ion-trap analyzer and on making tentative
 13 assignments of the fragments via genealogical relationships.
 14 For fragment ions in which several elemental compositions
 15 are possible, MS/MS and in-source CID MS/MS in a Q-TOF
 16 instrument can be performed. The high-resolution MS/MS
 17 fragmentation allows the confirmation of the elemental
 18 compositions assigned to the ions obtained by ion-trap
 19 MS/MS. Moreover, in-source CID MS/MS was used for
 20 a precise assignment of fragments observed in MS³ and
 21 MS⁴ with the ion trap. This strategy was applied to
 22 quaternary ammonium herbicides and the mass accuracy
 23 achieved with the Q-TOF instrument was acceptable, with
 24 errors always <0.0023 Da. This was adequate to establish
 25 the elemental composition of the fragments and to rectify
 26 some incorrect assignments previously reported in the
 27 literature. The results obtained in this study allowed us to
 28 propose consistent fragmentation pathways for this family
 29 of compounds.

30
 31 **Acknowledgements**

32 This work was partially supported by the Ministerio de Ciencia
 33 y Tecnología (REN2000-0885 TECNO). The authors acknowledge
 34 the assistance with Q-TOF of the Serveis Científic-Tècnics de la
 35 Universitat de Barcelona. Oscar Núñez thanks the Generalitat de
 36 Catalunya for a pre-doctoral grant.

37
 38 **REFERENCES**
 39

40 1. Caprioli RM, Malorni A, Sindona G (eds). *Selected Topics in*
 41 *Mass Spectrometry in the Biomolecular Sciences*. NATO ASI Series,
 42 Series C: Mathematical and Physical Sciences, vol. 504. Kluwer:
 43 Dordrecht, 1996.
 44 2. Gelpi E (ed). *Advances in Mass Spectrometry*, vol. 15. Wiley: New
 45 York, 2001.
 46 3. Rizzi E, Ferrario F, Sala A, Catinella S, Traldi P. *Rapid Commun.*
 47 *Mass Spectrom.* 1994; 8: 639.
 48 4. Adamus G, Kowalczyk M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000;
 49 14: 195.
 50 5. Toribio F, Moyano E, Puignou L, Galceran MT. *J. Mass Spectrom.*
 51 2002; 37: 812.

62 6. Cooks RG, Chen G, Weil C. Quadrupole mass filters and
 63 quadrupole ion traps. In *Selected Topics in Mass Spectrometry*
 64 *in the Biomolecular Science*, Caprioli RM, Malorni A, Sindona G
 65 (eds). NATO ASI Series, Series C: Mathematical and Physical
 66 Sciences, vol. 504. Kluwer: Dordrecht, 1996; 213.
 67 7. Guilhaus M. Time-of-flight mass spectrometry for the new
 68 millenium. In *Advances in Mass Spectrometry*, vol. 15, Gelpi E
 69 (ed.). J Wiley; New York, 2001; 19.
 70 8. Martin RL, Brancia FL. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17:
 71 1358.
 72 9. He L, Llang L, Lubman DM. *Anal. Chem.* 1995; 67: 4127.
 73 10. *The WHO Recommended Classification of Pesticides By Hazard and*
 74 *Guidelines to Classification 1996-1997*. WHO: Geneva, 1996.
 75 11. *EEC Drinking Water Guidelines 80/779/EEC*. EEC No. L229/11-29.
 76 European Commission: Brussels, 1980.
 77 12. *Code of Federal Regulations, Title 40, Part 141*. US Government
 78 Printing Office: Washington, DC, 2002.
 79 13. *Commission Directive 2000/42/CE of 22 June 2000 Amending*
 80 *the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and*
 81 *92/642/EEC on the Fixing of Maximum Levels for Pesticide Residues*
 82 *in and on Cereals, Foodstuffs of Animal Origin and Certain Products of*
 83 *Plant Origin, Including Fruit and Vegetables Respectively*. European
 84 Commission: Brussels, 2000.
 85 14. *Commission Directive 2001/35/EC of 11 May 2001 Amending the*
 86 *Annexes to Council Directive 90/642/EEC on the Fixing of Maximum*
 87 *Levels for Pesticide Residues in and on Certain Products of Plant*
 88 *Origin, Including Fruit and Vegetables*. European Commission:
 89 Brussels, 2001.
 90 15. Taguchi VY, Jenkins SWD, Crozier PW, Wang DT. *J. Am. Soc.*
 91 *Mass Spectrom.* 1998; 9: 830.
 92 16. Barceló D, Durand G, Vreeken RJ. *J. Chromatogr.* 1993; 647: 271.
 93 17. Yoshida M, Watabiki T, Tokiyasu T, Ishida N. *J. Chromatogr.* 1993;
 94 628: 235.
 95 18. Takino M, Daishima S, Yamaguchi K. *Anal. Sci.* 2000; 16: 707.
 96 19. Castro R, Moyano E, Galceran MT. *J. Chromatogr. A* 1999; 830:
 97 145.
 98 20. Castro R, Moyano E, Galceran MT. *Chromatographia* 2001; 53: 273.
 99 21. Castro R, Moyano E, Galceran MT. *J. Chromatogr. A* 2000; 869:
 100 441.
 101 22. Wycherley D, Rose ME, Giles K, Hutton TM, Rimmer DA.
 102 *J. Chromatogr. A* 1996; 734: 339.
 103 23. Song XB, Budde WL. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1996; 7: 981.
 104 24. Marr JC, King JB. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1997; 11: 479.
 105 25. Moyano E, Games DE, Galceran MT. *Rapid Commun. Mass*
 106 *Spectrom.* 1996; 10: 1379.
 107 26. Evans CS, Startin JR, Goodall DM, Keely BJ. *Rapid Commun. Mass*
 108 *Spectrom.* 2001; 15: 699.
 109 27. Evans CS, Startin JR, Goodall DM, Keely BJ. *Rapid Commun. Mass*
 110 *Spectrom.* 2001; 15: 1341.
 111 28. Castro R, Moyano E, Galceran MT. *J. Chromatogr. A* 2001; 914:
 112 111.
 113 29. Núñez O, Moyano E, Galceran MT. *J. Chromatogr. A* 2002; 974:
 114 243.
 115 30. Lazar IM, Lee ML. *J. Microcol. Sep.* 1999; 11: 117.
 116 31. Horak J, Werther W, Schmid ER. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*
 117 2001; 15: 241.
 118 32. Cheng Y, Hercules DM. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001; 12: 590.

3.3.2. Resultados experimentales adicionales

Junto a los resultados experimentales que dieron lugar a la comunicación científica que se ha presentado en el apartado anterior, se obtuvieron otros resultados que se detallan a continuación. En este trabajo experimental adicional se incluye la fragmentación de los compuestos deuterados PQ-d₈, DQ-d₄ y CQ-d₄ que nos ayudó a confirmar las rutas de fragmentación de los cuats.

En una primera fase de estos estudios adicionales se obtuvieron los espectros TOF-MS por infusión de disoluciones individuales de cada uno de los cuats mezcladas con EV y utilizando como disolvente una disolución de ácido fórmico/formiato de amonio 400 mM (pH 3,0):metanol (10:90 v/v). La masa del EV se utilizó como referencia para la corrección de los espectros (*lock mass*) en el cálculo de las masas exactas. Los iones observados, su asignación y el error en la determinación de su masa se indican en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Datos de los espectros de masas obtenidos con el instrumento Q-TOF para los cuats y los compuestos deuterados

Compuesto	Espectros MS			
	<i>m/z</i> (Abundancia relativa, %)	Asignación	<i>m/z</i> calculada	Error (Da)
Paracuat (PQ)	186.1149 (100)	[M] ⁺⁺	186.1157	-0.0008
	185.1092 (40)	[M-H] ⁺	185.1079	0.0013
	171.0920 (12)	[M-CH ₃] ⁺	171.0922	-0.0002
	93.0581 (28)	[M] ²⁺	93.0579	0.0002
Dicuat (DQ)	184.1013 (100)	[M] ⁺⁺	184.1000	0.0013
	183.0924 (90)	[M-H] ⁺	183.0922	0.0002
	92.0506 (60)	[M] ²⁺	92.0500	0.0006
Difenzocuat (DF)	249.1397 (100)	[M] ⁺	249.1392	0.0005
Chlormecuat (CQ)	122.0746 (100)	[M] ⁺	122.0737	0.0009
	124.0705 (22)	[M+2] ⁺	124.0707	-0.0002
Mepicuat (MQ)	114.1289 (100)	[M] ⁺	114.1283	0.0006
Paracuat-d ₈ (PQ-d ₈)	194.1647 (100)	[M] ⁺⁺	194.1651	-0.0004
	193.1584 (21)	[M-H] ⁺	193.1573	0.0011
	192.1525 (19)	[M-D] ⁺	192.1511	0.0014
	179.1419 (14)	[M-CH ₃] ⁺	179.1416	0.0003
	97.0833 (32)	[M] ²⁺	97.0826	0.0007
Dicuat-d ₄ (DQ-d ₄)	188.1237 (10)	[M] ⁺⁺	188.1247	-0.0010
	187.1158 (8)	[M-H] ⁺	187.1169	-0.0011
	186.1116 (100)	[M-D] ⁺	186.1107	0.0009
	94.0615 (75)	[M] ²⁺	94.0624	-0.0009
Chlormecuat-d ₄ (CQ-d ₄)	126.0978 (100)	[M] ⁺	126.0984	-0.0006
	128.0952 (22)	[M+2] ⁺	128.0954	-0.0002

Tabla 3.4. Datos de los espectros de tándem obtenidos con el Q-TOF para los compuestos deuterados PQ-d₈, DQ-d₄ y CQ-d₄

Compuesto	Ión precursor (<i>m/z</i>) (Voltaje de colisión)	Espectros MS/MS				
		Iones producto <i>m/z</i> (Abundancia relativa, %)	Asignación	<i>m/z</i> calculada	Error (Da)	
PQ-d ₄	194 (25 V)	194.1651 (25)	[M] ⁺⁺	194.1651	L.M.	
		193.1585 (<5)	[M-H] ⁺	193.1573	0.0012	
		179.1418 (100)	[M-CH ₃] ⁺	179.1416	0.0002	
	97 (20 V)	179.1416 (100)	[M ²⁺ -CH ₃] ⁺	179.1416	0	
		178.1377 (<5)	[M ²⁺ -CH ₂ D] ⁺	178.1354	0.0023	
		151.1244 (20)	[M ²⁺ -CH ₃ -DCN] ⁺	151.1245	-0.0001	
		98.0909 (12)	[M ²⁺ -C ₆ D ₄ H ₂ N] ⁺	98.0904	0.0005	
		97.0826 (30)	[M] ²⁺	97.0826	L.M.	
		85.5639 (35)	[M ²⁺ -CH ₃ -D] ²⁺	88.5638	0.0001	
		82.5689 (8)	[M ²⁺ -CH ₃ N] ²⁺	82.5693	-0.0005	
	DQ-d ₄	188 (25 V)	188.1247 (20)	[M] ⁺⁺	188.1247	L.M.
			187.1168 (100)	[M-H] ⁺	187.1169	-0.0001
			186.1117 (45)	[M-D] ⁺	187.1107	0.0010
			171.0870 (10)	[M-CD ₂ H] ⁺	171.0889	-0.0019
170.0837 (18)			[M-CD ₃] ⁺	170.0827	0.0010	
169.0756 (<5)			[M-CD ₃ H] ⁺⁺	169.0749	0.0007	
168.0679 (9)			[M-CD ₄] ⁺⁺	168.0687	-0.0008	
160.0956 (5)			[M-C ₂ DH ₂] ⁺	160.0951	0.0005	
159.0874 (8)			[M-C ₂ D ₂ H] ⁺	159.0889	-0.0015	
158.0825 (10)			[M-C ₂ D ₃] ⁺	158.0827	-0.0002	
157.0764 (10)			[M-C ₂ D ₃ H] ⁺⁺	157.0749	0.0015	
156.0674 (40)			[M-C ₂ D ₄] ⁺⁺	156.0687	-0.0013	
110.0916 (25)			[M-C ₅ H ₄ N] ⁺	110.0904	0.0012	
94 (20 V)		169.0762 (<5)	[M ²⁺ -CD ₃ H] ⁺⁺	169.0749	0.0013	
		168.0678 (10)	[M ²⁺ -CD ₄] ⁺⁺	168.0687	-0.0009	
		159.0895 (10)	[M ²⁺ -C ₂ D ₂ H] ⁺	159.0889	0.0006	
		158.0828 (15)	[M ²⁺ -C ₂ D ₃] ⁺	158.0827	0.0001	
		131.0712 (10)	[M ²⁺ -C ₂ D ₃ -HCN] ⁺	131.0718	-0.0006	
		130.0664 (7)	[M ²⁺ -C ₂ D ₃ -DCN] ⁺	130.0657	0.0007	
		94.0624 (25)	[M] ²⁺	94.0624	L.M.	
85.5441 (20)	[M ²⁺ -CD ₂ H] ²⁺	85.5446	-0.0005			
85.0411 (100)	[M ²⁺ -CD ₃] ²⁺	85.0413	-0.0002			
80.0478 (8)	[M ²⁺ -C ₂ D ₂] ²⁺	80.0484	-0.0006			
CQ-d ₄	126 (28 V)	126.0984 (100)	[M] ⁺	126.0984	L.M.	
		110.0679 (12)	[M-CH ₄] ⁺	110.0671	0.0008	
		94.0414 (10)	[M-C ₂ D ₄] ⁺	94.0424	-0.0010	
		89.1147 (10)	[M-DCI] ⁺	89.1155	-0.0008	
		67.0250 (40)	[M-N(CH ₃) ₃] ⁺	67.0249	0.0001	
		61.0879 (5)	[M-ClC ₂ D ₄ +D] ⁺	61.0875	0.0004	
		60.0824 (10)	[M-ClC ₂ D ₄ +H] ⁺	60.0813	0.0011	
		59.0738 (50)	[M-ClC ₂ D ₄] ⁺⁺	59.0735	0.0003	
		58.0662 (25)	[M-ClC ₂ D ₄ H] ⁺	58.0657	0.0005	

L.M. - Ión usado para la corrección *lock mass*.

Como se observa en la Tabla 3.3, para el PQ-d₈ y el DQ-d₄ además de los iones, que lógicamente, se corresponden con los de los compuestos nativos, aparecen otros iones

que pueden asignarse a pérdidas debidas a intercambios hidrógeno-deuterio y que se comentarán con más detalle en la discusión de resultados.

Posteriormente, se optimizaron las condiciones de trabajo para la fragmentación de los compuestos deuterados en la celda de colisión y así obtener los espectros TOF-MS/MS. En la Tabla 3.4 se indican los fragmentos observados, así como las asignaciones de sus composiciones elementales y el error en la determinación de su masa, donde la masa exacta del ión precursor se utilizó como *lock mass*. Estos datos complementan los de la Tabla 1 (página xx) del Artículo V incluido en este capítulo.

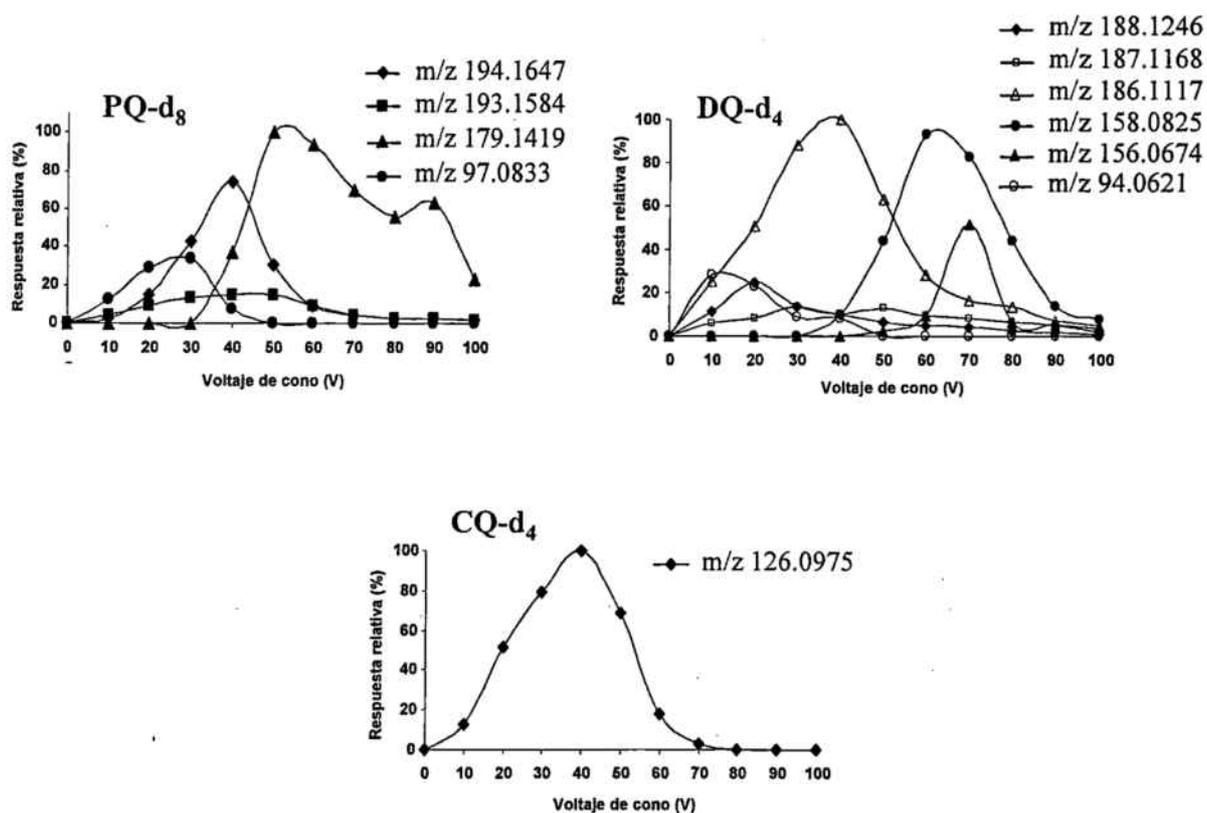


Figura 3.3. Curvas de fragmentación en la fuente para los cuats deuterados.

Tal como se ha comentado anteriormente en este capítulo, es necesario estudiar la fragmentación en la fuente para seleccionar el voltaje del cono de extracción apropiado para la obtención de los espectros *in-source* CID TOF-MS/MS. Para ello deben representarse las curvas de variación de la respuesta de los iones fragmento más abundantes obtenidos en la fuente al variar el voltaje del cono de extracción (Figura 3.3). Como se puede observar, las curvas son similares a las obtenidas para los compuestos nativos (Figura 2 el Artículo V, página 199). Para el CQ-d₄ no se observó fragmentación alguna en la fuente, mientras que tanto para el PQ-d₈ como para el DQ-d₄ se observaron diferentes iones a lo largo de todo el intervalo de voltajes estudiado. Estas curvas dan una

cierta información sobre el origen de los fragmentos ya que en primer lugar se fragmenta el ión molecular para originar los fragmentos de segunda generación y, posteriormente, a valores más altos de voltaje se obtienen los iones de tercera generación.

Tabla 3.5. Datos de los espectros MS³ (trampa de iones) y de los espectros in-source CID-MS/MS (Q-TOF) de algunos iones del PQ-d₈ (m/z 194) y del DQ-d₄ (m/z 188).

Cuat	Transición en MS ³	Trampa de iones		Q-TOF		
		Iones producto m/z (Abundancia relativa %)	Iones producto m/z (Abundancia relativa %)	Asignación	m/z calculada	Error (Da)
PQ-d ₈	194.1>193.1	193.1 (20)	193.1473 (25)	[M-H] ⁺	193.1473	L.M.
		191.2 (35)	191.1424 (40)	[M-H-2H] ⁺	191.1416	0.0008
		178.2 (100)	178.1327 (100)	[M-H-CH ₃] ⁺⁺	178.1338	-0.0011
		177.1 (20)	177.1271 (25)	[M-H-CH ₂ D] ⁺⁺	177.1276	-0.0005
		165.1 (8)	165.1412 (10)	[M-H-DCN] ⁺	165.1402	0.0010
		152.1 (5)	152.1312 (10)	[M-H-CH ₃ CN] ⁺	152.1307	0.0005
	194.1>179.2	179.2 (65)	179.1416 (100)	[M-CH ₃] ⁺	179.1416	L.M.
		177.2 (20)	177.1263 (18)	[M-CH ₃ -2H] ⁺	177.1260	0.0003
		176.2 (18)	176.1204 (12)	[M-CH ₃ -H-D] ⁺	176.1198	0.0006
		165.1 (10)	165.1266 (10)	[M-CH ₃ -CH ₂] ⁺	165.1260	0.0006
		164.1 (45)	164.1191 (30)	[M-CH ₃ -CH ₃] ⁺⁺	164.1181	0.0010
		162.2 (90)	162.1049 (50)	[M-CH ₃ -CH ₃ D] ⁺	162.1041	0.0008
		161.2 (30)	161.0994 (15)	[M-CH ₃ -CH ₂ D ₂] ⁺	161.0980	0.0014
		152.1 (15)	152.1289 (8)	[M-CH ₃ -HCN] ⁺	152.1307	-0.0018
		151.2 (100)	151.1254 (25)	[M-CH ₃ -DCN] ⁺	151.1245	0.0009
		150.2 (15)	150.1162 (20)	[M-CH ₃ -HDCN] ⁺⁺	150.1167	-0.0005
		149.1 (10)	149.1109 (15)	[M-CH ₃ -D ₂ CN] ⁺⁺	149.1105	0.0004
		138.2 (35)	138.1165 (20)	[M-CH ₃ -CH ₃ CN] ⁺	138.1151	0.0014
		110.2 (10)	110.0991 (12)	[M-CH ₃ -HCN-DCN-CH ₂] ⁺	110.0980	0.0011
		109.1 (15)	109.0909 (8)	[M-CH ₃ -2DCN-CH ₂] ⁺	109.0918	-0.0009
DQ-d ₄	188.1>186.2	186.2 (20)	186.1107 (30)	[M-D] ⁺	186.1107	L.M.
		182.1 (10)	182.0819 (15)	[M-D-2D] ⁺	182.0827	-0.0008
		169.2 (20)	169.0759 (25)	[M-D-CD ₂ H] ⁺⁺	169.0749	0.0010
		168.2 (100)	168.0699 (100)	[M-D-CD ₃] ⁺⁺	168.0687	0.0012
		158.1 (12)	158.0818 (15)	[M-D-C ₂ D ₂] ⁺	158.0827	-0.0009
	188.1>158.1	158.1 (100)	158.0827 (55)	[M-C ₂ D ₃] ⁺	158.0827	L.M.
		156.2 (30)	156.0681 (15)	[M-C ₂ D ₃ -D] ⁺⁺	156.0687	-0.0006
		132.2 (10)	132.0789 (10)	[M-C ₂ D ₃ -CN] ⁺⁺	132.0797	-0.0008
		131.1 (35)	131.0724 (60)	[M-C ₂ D ₃ -HCN] ⁺	131.0718	0.0006
		130.2 (45)	130.0651 (100)	[M-C ₂ D ₃ -DCN] ⁺	130.0657	-0.0006

L.M. - Ión usado para la corrección *lock mass*.

Voltajes de colisión en el Q-TOF: 25-30 V

Los iones fragmento obtenidos en la fuente se usaron como iones precursores, de manera que se seleccionaron en el cuadrupolo y se forzó su fragmentación en la celda de colisión, obteniéndose finalmente el espectro de los iones producto en el TOF (*in-source* CID TOF-MS/MS). Los iones producto observados en estos espectros, sus asignaciones y el error en la determinación de la masa se incluyen en la Tabla 3.5. En esta misma tabla se incluyen también los iones observados en los espectros MS³ obtenidos con el analizador de la trampa de iones y son datos complementarios a los incluidos en la Tabla 3 (página 201) del Artículo V.

3.4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo de este capítulo es la caracterización estructural de los cuats mediante la obtención de sus rutas de fragmentación y los resultados del estudio se incluyen en el artículo del apartado 3.3.1. En este apartado de discusión de resultados pretendemos presentar y discutir la estrategia utilizada para la caracterización estructural combinando la información proporcionada con los dos espectrómetros de masas utilizados en este trabajo, la trampa de iones y el Q-TOF. Para ello, utilizamos como ejemplo el estudio de la ruta de fragmentación del dicuat (DQ).

Así, el primer paso de la estrategia propuesta consiste en la obtención de los espectros MS utilizando el analizador de trampa de iones. Estos espectros nos permiten identificar la relación m/z de los iones de primera generación que serán utilizados como iones precursores en la obtención de los espectros en tándem. De la comparación de los espectros en la zona del pico molecular del DQ y del DQ-d₄ obtenidos con ambos instrumentos (Figura 3.4) se deduce la posibilidad de un intercambio hidrógeno-deuterio en el compuesto DQ-d₄, ya que aparece un ión adicional con respecto al compuesto nativo, hecho que también fue observado para el PQ al comparar los espectros del compuesto nativo y del PQ-d₃. Si bien la asignación de los iones obtenidos en estos espectros se puede realizar directamente a partir de la información facilitada por el analizador de trampa de iones, la obtención de los correspondientes espectros TOF-MS con el Q-TOF permite confirmar la hipótesis del intercambio hidrógeno deuterio.

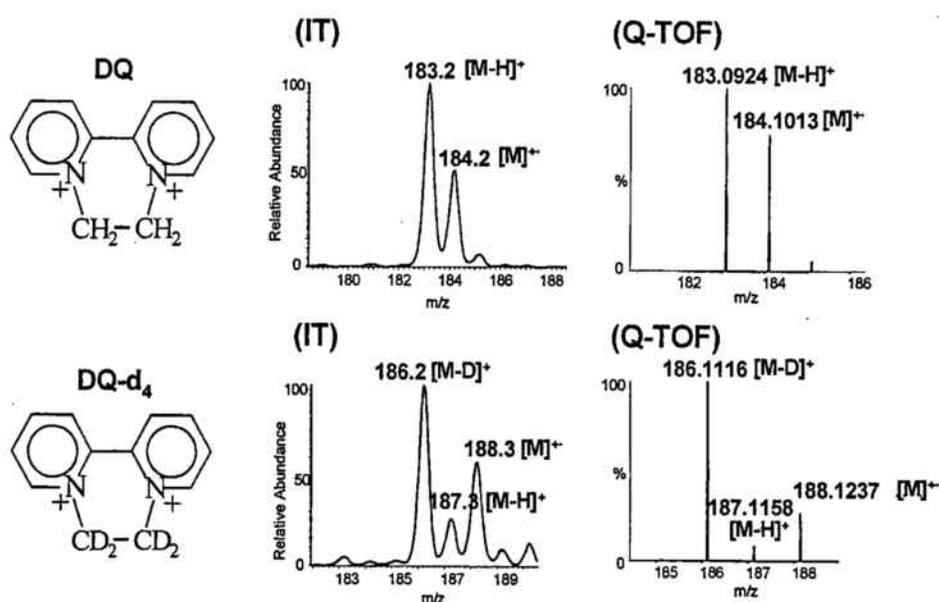


Figura 3.4. Espectros de masas del DQ y DQ-d₄ obtenidos con los espectrómetros de masas de trampa de iones y Q-TOF. Espectros adquiridos en modo continuo. Indicada sólo la zona del ión molecular.

Así, el DQ presenta la pérdida característica de un hidrógeno del grupo etileno a m/z 183.0924. Esta pérdida debería corresponder en el caso del DQ- d_4 a una pérdida de un deuterio del grupo etileno- d_4 , la cual se observa a m/z 186.1116, pero además aparece un fragmento a m/z 187.1158 que se puede explicar como la pérdida de un hidrógeno. Tanto para el DQ como para el PQ debería ser más favorable la pérdida de un hidrógeno de los grupos alquilo unidos al nitrógeno que no un hidrógeno de los anillos aromáticos, ya que la estructura del ion resultante es mucho más estable. Este hecho ha sido descrito por Song *et al.*, quien propone un mecanismo mediante el cual el amoníaco puede arrancar un protón ácido del grupo etileno del dicuat (o del grupo metilo del paracuat) durante el proceso de desolvatación de las gotas cargadas en el electrospray para generar el correspondiente ion desprotonado con una sola carga, $[M-H]^+$ (Song y Budde, 1996). Así, la correspondiente pérdida de un hidrógeno en el DQ- d_4 a m/z 187.1158 solo puede explicarse si existe un intercambio hidrógeno-deuterio en la molécula, como ha sido descrito para otros compuestos deuterados (Reed y Kass, 2001; Toribio *et al.*, 2002). Sin embargo, podría existir la duda de que estas asignaciones pudieran ser debidas a la presencia de impurezas de grado de deuteración inferior en los patrones utilizados (DQ- d_3 , por ejemplo). La presencia de una impureza debida al compuesto DQ- d_3 (187.1186 Da) daría lugar a la presencia de un ión molecular a una m/z de 187 y junto a él deberían aparecer los iones $[M-H]$ (m/z 186.1107) y $[M-D]^+$ (m/z 185.1042) debido a las pérdidas de H y D a partir del grupo etilo unido a los nitrógenos. Los iones a m/z 187 y 186 provenientes del DQ- d_3 aparecerían solapados con los correspondientes iones del DQ- d_4 , pero como puede apreciarse en la Figura 3.4, no se observa ninguna señal a m/z 185, lo que pone de manifiesto la ausencia de impurezas parcialmente deuteradas.

Como se ha comentado anteriormente, para el PQ ocurre el mismo fenómeno. En el espectro TOF-MS del PQ (Tabla 3.3) aparece la correspondiente pérdida de un hidrógeno del grupo etilo a m/z 185.1092 que, en el caso del PQ- d_8 (con los ocho deuterios en los anillos aromáticos) correspondería también a una pérdida de hidrógeno del mismo grupo, la cual que se observa a m/z 193.1584. Sin embargo aparece además un ión adicional a m/z 192.1525 correspondiente a una pérdida de deuterio debida, de nuevo, a un intercambio hidrógeno-deuterio.

Una vez obtenidos los espectros MS (trampa de iones) del DQ y DQ- d_4 y confirmadas las asignaciones con la información obtenida mediante los espectros TOF-MS (Tabla 3.3), se puede utilizar cualquiera de estos iones como iones precursores para la segunda etapa de los estudios de fragmentación consistente en la obtención de los espectros en tándem.

Así, en el segundo paso se obtienen los espectros MS^2 utilizando el analizador de trampa de iones. En el caso del DQ que hemos tomado como ejemplo, se utilizaron como iones precursores el ion molecular $[M]^{+•}$ y el ión de doble carga $[M]^{2+}$. A modo de ejemplo, en la Figura 3.5 se muestran los espectros MS^2 obtenidos con la trampa de iones para el DQ (m/z 184) y el DQ- d_4 (m/z 188).

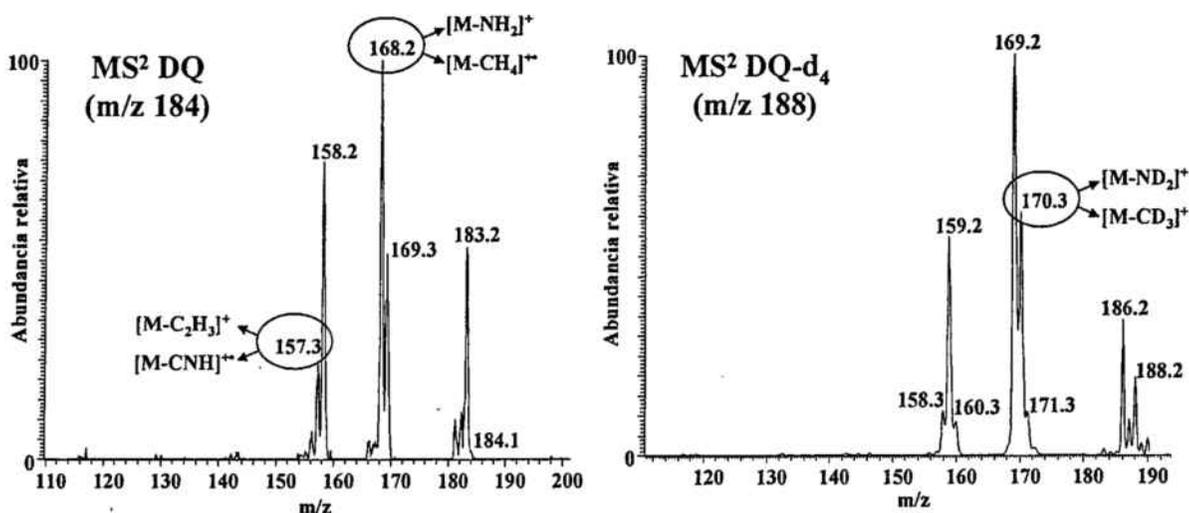


Figura 3.5. Espectros MS^2 del DQ (ión precursor m/z 184) y del DQ- d_4 (ión precursor m/z 188) en la trampa de iones.

A partir de la información proporcionada por la trampa de iones y combinando los datos obtenidos con el compuesto deuterado se puede realizar una primera asignación de cada uno de los fragmentos obtenidos en el espectro MS^2 del DQ (Tabla 1 del Artículo IV, página 155). Sin embargo, la baja resolución y la baja exactitud en la determinación de la masa de la trampa de iones hizo difícil la asignación de algunos de estos fragmentos, llegándose a proponer más de una asignación para alguno de ellos. Así, si nos fijamos por ejemplo en el fragmento obtenido a m/z 168 éste podría explicarse como la pérdida tanto de un grupo NH_2 como de un grupo CH_4 , o incluso el fragmento a m/z 157 podría explicarse como la pérdida tanto de un grupo C_2H_3 como de un grupo CNH . Además, en estos casos la información obtenida con el espectro MS^2 (trampa de iones) del DQ- d_4 (Figura 3.5) no ayuda a resolver el problema pues, de nuevo, algunos iones se pueden explicar mediante diferentes asignaciones. Por ejemplo, el fragmento a m/z 170 se puede explicar como una pérdida de un grupo ND_2 o de un grupo CD_3 . En este caso, además, el uso del compuesto deuterado complica aún más el problema debido a la posibilidad de intercambios hidrógeno-deuterio.

En este caso la obtención del espectro TOF-MS/MS del DQ ayuda a resolver la asignación de la composición elemental de todos los fragmentos obtenidos. En la Figura 3.6 se presenta a modo de ejemplo el espectro TOF-MS/MS del DQ (ión precursor 184).

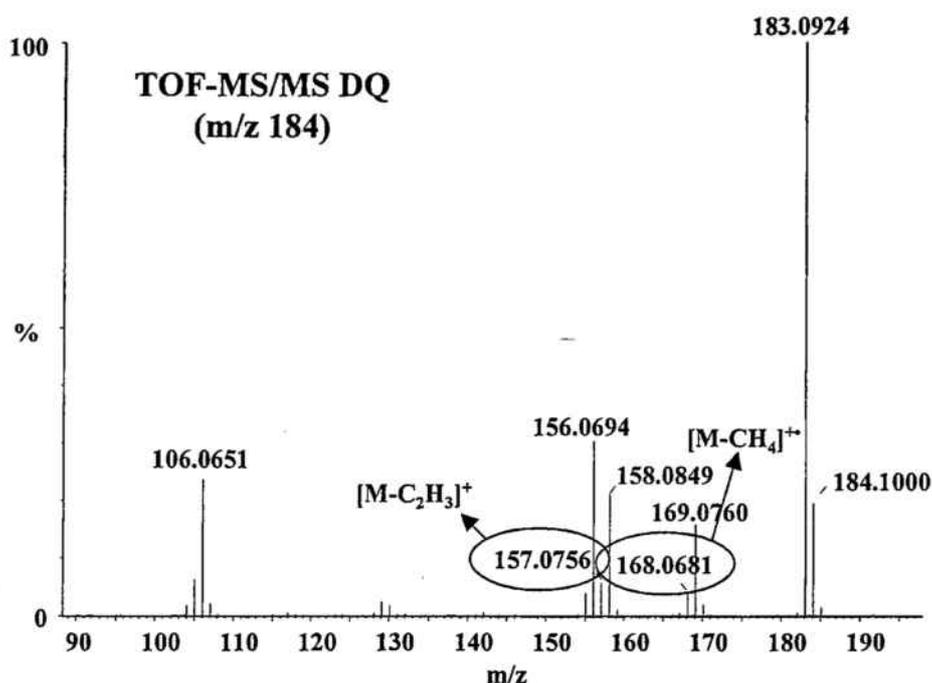


Figura 3.6. Espectros TOF-MS/MS del DQ (ión precursor m/z 184) obtenido con el instrumento Q-TOF. Modo de adquisición en continuo.

En la Tabla 1 del Artículo V incluido en este capítulo (página 198) se incluyen las asignaciones realizadas para el espectro indicado en la Figura 3.6. Si nos centramos ahora, por ejemplo, en el fragmento obtenido a m/z 168.0681 podemos ver que la asignación que mejor explica este ión es [M-CH₄]⁺* (masa exacta de 168.0687 Da) ya que se obtiene un error relativo en la determinación de su masa de tan solo -0.0006 Da, mientras que la otra posible asignación comentada anteriormente, [M-NH₂]⁺ (masa exacta de 168.0813 Da), implicaría un error mayor, de -0.0132 Da. De manera equivalente se resuelven el resto de asignaciones.

Así, los espectros TOF-MS/MS permiten confirmar las asignaciones realizadas con los espectros MS² y resolver las composiciones elementales de aquellos fragmentos donde es posible más de una asignación si sólo se tiene en cuenta la información proporcionada por la trampa de iones.

La siguiente etapa del estudio de las rutas de fragmentación es la obtención de espectros de grado superior, es decir, la obtención de los espectros MS³ que nos permiten obtener fragmentos de tercera generación y de los espectros MS⁴ que nos permiten obtener

fragmentos de cuarta generación. En el caso del DQ, se obtuvieron con el analizador de trampa de iones los espectros MS³ de los iones a m/z 183, [M-H]⁺ (transición 184-183) y a m/z 157, [M-C₂H₃]⁺ (transición 184-157). También se obtuvo el espectro MS⁴ del ión a m/z 168 (transición 184-183-168). En la Tabla 3 del Artículo V incluido en este capítulo (página 201) se indican los iones obtenidos en estos espectros así como sus abundancias relativas. En la Figura 3.7 se presentan, a modo de ejemplo, los espectro MS³ del fragmento a m/z 157 y MS⁴ del fragmento a m/z 168.

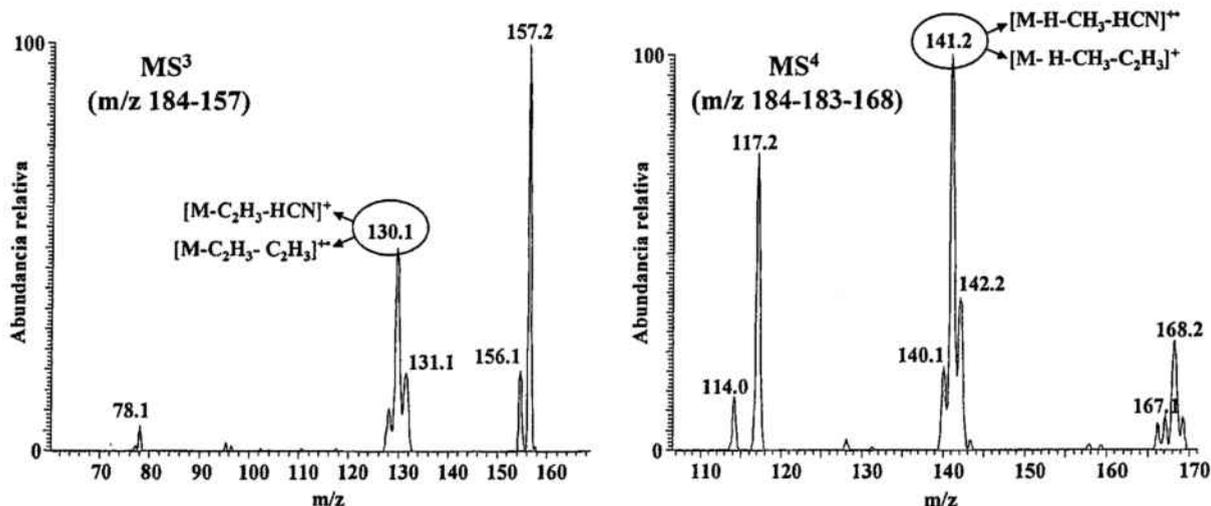


Figura 3.7. Espectro MS³ (transición 184-157) y MS⁴ (transición 184-183-168) del DQ obtenidos con el analizador de trampa de iones.

Una vez obtenidos los espectros y conocida la composición elemental correcta de los iones precursores a partir de los espectros MS², se puede realizar una primera asignación para cada uno de los fragmentos obtenidos en los espectros MS³ y MS⁴ utilizando relaciones genealógicas entre las sucesivas fragmentaciones en la trampa de iones. Por ejemplo, en el espectro MS³ del ión m/z 183, aparece un fragmento a m/z 168 que, teniendo en cuenta la asignación realizada en el espectro MS² debería explicarse ahora como [M-H-CH₃]^{+•}. También se puede utilizar la información obtenida a partir de la fragmentación de DQ-d₄. Para el compuesto DQ-d₄ se obtuvieron con la trampa de iones los espectros MS³ de los iones equivalentes a los de su nativo, es decir, del ión a m/z 186, [M-D]⁺ (transición 188-186) y del ión a m/z 158, [M-C₂D₃]⁺ (transición 188-158) (Tabla 3.5). Debido, de nuevo, a la baja resolución proporcionada por la trampa de iones, a algunos de los fragmentos obtenidos en estos espectros se les podría asignar más de una composición elemental llevando a diferentes interpretaciones. Por ejemplo, si nos fijamos en el fragmento obtenido a m/z 130.1 en el espectro MS³ del ión 157 (Figura 3.7), este

podría ser debido a una pérdida de un grupo HCN ($[M-C_2H_3-HCN]^+$), que en principio sería lo más lógico, pero también se puede explicar como la pérdida, de nuevo, de un grupo C_2H_3 ($[M-C_2H_3-C_2H_3]^{+*}$) que también implicaría la rotura de uno de los anillos aromáticos del DQ. Lo mismo puede ocurrir con el espectro MS^4 (transición m/z 184-183-168) donde aparece un fragmento a m/z 141 que podría ser explicado mediante las asignaciones $[M-H-CH_3-HCN]^+$ o $[M-H-CH_3-C_2H_3]^{+*}$. De nuevo, es la información obtenida con el Q-TOF quien puede resolver y confirmar las asignaciones propuestas. Para ello es necesario la obtención de los espectros *in-source* CID TOF-MS/MS para lo que previamente se ha de estudiar la fragmentación en la fuente de estos compuestos, es decir, los espectros *in-source* CID TOF-MS. Centrándonos en el ejemplo del DQ, en la Figura 3.8 se reproduce la curva de fragmentación en la fuente de este herbicida así como algunos de los espectros *in-source* CID TOF-MS/MS.

Como puede observarse en la curva de fragmentación en la fuente del DQ, a medida que aumenta el voltaje del cono de extracción aumenta la fragmentación. A voltajes bajos aparecen los iones correspondientes a los espectros MS . A medida que se incrementa el voltaje empiezan a aparecer los iones de segunda generación, es decir, los correspondientes a los espectros MS^2 en la trampa de iones. A voltajes del cono de extracción más elevados, por encima de 50-60 V empiezan a aparecer ya los iones de tercera generación, es decir, aquellos que podrían corresponder a iones de los espectros MS^3 en la trampa de iones. Así, seleccionando un voltaje de extracción de cono de 70 V tenemos la formación en la fuente del fragmento a m/z 157 y seleccionando este ión en el cuadrupolo del Q-TOF y fragmentándolo en la celda de colisión, podemos obtener el correspondiente espectro *in-source* CID TOF-MS/MS de este ión (Figura 3.8), el cual puede relacionarse directamente con el espectro MS^3 (transición 184-157) obtenido con la trampa de iones (Figura 3.8). Si seleccionamos un voltaje de extracción de cono de 90 V tenemos la formación en la fuente del fragmento a m/z 168 y tras su selección en el cuadrupolo del Q-TOF y su fragmentación en la celda de colisión, se obtiene su espectro *in-source* CID TOF-MS/MS (Figura 3.8) que puede relacionarse ahora con el espectro MS^4 (transición 184-183-168) obtenido con la trampa de iones (Figura 3.8).

Si nos fijamos ahora en el fragmento a m/z 130.0648 obtenido en el espectro *in-source* CID TOF-MS/MS podemos ver que la composición elemental que mejor explica este ión es $[M-C_2H_3-HCN]^+$ (masa exacta 130.0657 Da) con un error relativo en la determinación de su masa de tan solo -0.0009 Da. La otra posible asignación, $[M-C_2H_3-C_2H_3]^{+*}$ (masa exacta 130.0531 Da), que ya de entrada se suponía la menos probable, implicaría un error de 0.0117 Da, con lo que se concluye que la primera asignación explica

mejor la composición elemental de este fragmento. Con el ejemplo mostrado para el espectro MS⁴ de la trampa de iones ocurre lo mismo (Figura 3.7). El fragmento que se obtiene en el espectro *in-source* CID TOF-MS/MS es m/z 141.0581. Comparando esta valor con las masas exactas de las dos posibles asignaciones ([M-H-CH₃-HCN]⁺ de 141.0578 Da o [M-H-CH₃-C₂H₃]⁺ de 141.0453) se puede ver que la asignación que mejor explica el fragmento es la primera (error relativo de 0.0003 Da frente a 0.0128 Da de la segunda). De manera equivalente se asignan el resto de iones observados en estos espectros.

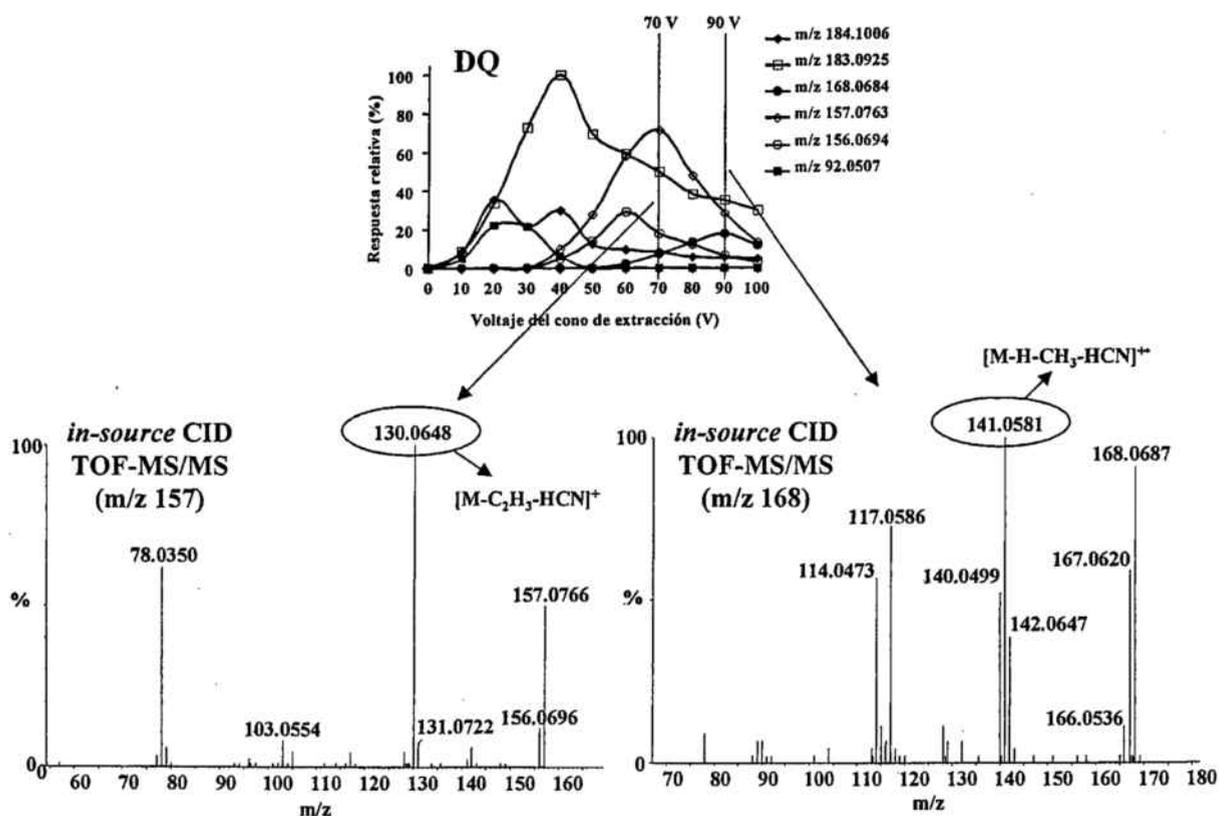


Figura 3.8. Curva de fragmentación en la fuente del DQ y espectros *in-source* CID TOF-MS/MS de los fragmentos a m/z 157 y 168.

Así, los espectros *in-source* CID TOF-MS/MS permiten confirmar las asignaciones realizadas con los espectros MS³ y MS⁴, y resolver las composiciones elementales de aquellos fragmentos donde es posible más de una asignación si se tiene en cuenta sólo la información proporcionada por la trampa de iones.

Finalmente, el último paso consiste en establecer la ruta de fragmentación de los compuestos. En las Figuras 4, 5 y 6 de la comunicación científica incluida en este capítulo (páginas 202 y 203) se proponen las rutas de fragmentación para los tres herbicidas PQ, DQ y DF y los dos reguladores del crecimiento CQ y MQ. En estas rutas de

fragmentación se han incluido, para la mayoría de los fragmentos, la estructura que creemos más probable para explicar los iones observados. Sin embargo, para algunos de ellos tan solo se ha indicado la composición elemental del fragmento. A partir de la información obtenida con el TOF se ha podido confirmar la composición elemental de todos los fragmentos observados con errores relativos en la determinación de su masa inferiores a 0.0023 Da.

3.5. CONCLUSIONES.

El trabajo experimental incluido en el Capítulo 3 de la memoria nos ha permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- Se ha establecido una estrategia de trabajo para la caracterización estructural de compuestos orgánicos de peso molecular relativamente bajo combinando la información obtenida mediante la utilización de dos espectrómetros de trabajo diferentes, una trampa de iones que permite fragmentaciones sucesivas en el tiempo y un instrumento híbrido Q-TOF que proporciona una buena exactitud en la determinación de la masa de los fragmentos obtenidos.
- Los estudios de fragmentación realizados utilizando un espectrómetro de masas con un analizador de trampa de iones nos han permitido obtener los sucesivos espectros MS^n que se han utilizado para hacer una propuesta inicial de rutas de fragmentación.
 - Las primeras asignaciones de los iones obtenidos con la trampa de iones han hecho posible el establecimiento de unas relaciones genealógicas entre los sucesivos fragmentos obtenidos en los espectros MS^n .
 - El estudio de la fragmentación MS^n de compuestos deuterados ha ayudado a una mejor asignación de los iones en los espectros MS^n obtenidos con la trampa de iones.
 - Los estudios de fragmentación realizados con los compuestos deuterados PQ-d₈ y DQ-d₄ ha permitido observar la existencia de intercambios hidrógeno-deuterio en estos compuestos, pudiéndose concluir que los hidrógenos de los anillos aromáticos del PQ y DQ se intercambian con relativa facilidad con los hidrógenos de los grupos alquilo unidos a los nitrógenos.
 - Sin embargo, algunas asignaciones no pueden ser resueltas con la trampa de iones debido a su baja resolución.
- La mayor resolución y exactitud en la determinación de la masa que proporciona un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (Q-TOF) ha permitido confirmar

las asignaciones realizadas a partir de la información proporcionada por la trampa de iones, así como explicar algunas asignaciones dudosas.

- Los espectros MS y MS/MS obtenidos con el Q-TOF han permitido confirmar las asignaciones realizadas en los espectros MS y MS² obtenidos con la trampa de iones así como reasignar algunos fragmentos. Por ejemplo, la fragmentación del DQ se inicia por la rotura del grupo etileno en lugar de la rotura de los anillos aromáticos propuesta por otros autores. Además, se ha puesto de manifiesto que en la trampa de iones tienen lugar reacciones ión-molécula.
 - Los espectros in-source CID-MS/MS obtenidos con el Q-TOF han permitido confirmar las asignaciones realizadas en los espectros MSⁿ obtenidos con la trampa de iones y, de nuevo, reasignar algunos fragmentos cuya asignación era dudosa a partir de la información proporcionada por la trampa de iones.
 - La masa de todos los fragmentos obtenidos con el Q-TOF se ha obtenido con una exactitud elevada, dando lugar a errores en la determinación de la masa inferiores a 0.0023 Da.
- La combinación del poder de fragmentación de la trampa de iones con la mayor resolución y exactitud del instrumento híbrido Q-TOF nos ha permitido proponer unas rutas de fragmentación consistente para los tres herbicidas PQ, DQ y DF y los dos reguladores del crecimiento CQ y MQ. Este trabajo ha permitido, además, resolver algunas asignaciones dudosas descritas en la literatura.

Capítulo 4

CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS- ESPECTROMETRÍA DE MASAS

4.1. ESTRUCTURA DEL CAPÍTULO

El principal objetivo de este capítulo es dar continuidad a estudios previos realizados en nuestro grupo en la línea del acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas (LC-MS). En concreto nos hemos propuesto automatizar, utilizando un sistema Prospekt, un método LC-MS/MS de determinación de cuats en aguas previamente establecido en nuestro grupo de trabajo (Castro *et al.*, 2001b). Este método incluye una etapa de preconcentración *on-line* que en su día sólo pudo implementarse de manera manual. Además, se utilizó un analizador de trampa de iones mientras que en esta memoria el sistema automatizado se ha acoplado a dos instrumentos distintos que a su vez disponen de dos analizadores a su vez diferentes, un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo y uno de tiempo de vuelo (TOF) que además presentan diferencias en el diseño de la fuente de *electrospray*. Esto nos va a permitir comparar los resultados obtenidos con los tres instrumentos y poner de manifiesto las diferencias debidas tanto a los analizadores como a los diferentes diseños de las fuentes de *electrospray*.

Por otro lado, se pretende utilizar la experiencia adquirida en el estudio de los cuats para establecer metodología analítica para la determinación de otras familias de sales de amonio cuaternario especialmente aquellas que presentan carácter biocida. Esta nueva línea de investigación se ha iniciado estudiando la separación de estos compuestos mediante cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas.

Este capítulo se ha estructurado, por lo tanto, en dos apartados. El primero de ellos, el Apartado 4.2, se centra en el desarrollo de metodologías analíticas basadas en la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas para el análisis de los cuats. El capítulo se inicia con una introducción (apartado 4.2.1) donde se enmarca el trabajo realizado siguiendo los estudios previos realizados en nuestro grupo de investigación y se incluyen comentarios relacionados con la automatización de los métodos de preconcentración *on-line* y algunos aspectos de los espectrómetros de masas utilizados.

La parte experimental de este apartado se centra en la automatización de un método de preconcentración *on-line*. Este método se utiliza acoplado a la cromatografía de líquidos-espectrometría de masas utilizando tanto un analizador de triple cuadrupolo como con uno de tiempo de vuelo, lo que nos ha permitido comparar la sensibilidad obtenida en *tándem* MS/MS (triple cuadrupolo) con la del método de masa exacta (TOF). El desarrollo y aplicación de estos métodos para el análisis de los cuats en muestras de agua de bebida se encuentra descrito en el apartado 4.2.2.1 en el Artículo VI, titulado: "*Accurate mass measurement versus tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium*

herbicides in drinking water” y que se incluye en el apartado 4.2.2.2 de este capítulo. El apartado 4.2 finaliza con una discusión de los resultados obtenidos en el trabajo experimental realizado.

El Apartado 4.3 se centra en el desarrollo de un método basado en el acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas para el análisis de algunas sales de amonio cuaternario con carácter biocida. Las sales de amonio cuaternario estudiadas corresponden a la familia del cloruro de benzalconio (BAC) y el cloruro de didecildimetilamonio (DDMAC) que, con frecuencia, se utiliza en sustitución del primero. En este caso se ha utilizado un espectrómetro de masas con un analizador de trampa de iones. Este apartado se ha organizado de modo idéntico al anterior, es decir, se inicia con el establecimiento de las condiciones de trabajo en espectrometría de masas (apartado 4.3.2.1) y, posteriormente, en el Artículo VII, titulado: “*Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry*” del apartado 4.3.2.2 de este capítulo se describe el desarrollo de este método de análisis y su aplicación a muestras ambientales, productos oftálmicos y formulaciones. A continuación se incluye una discusión de los resultados obtenidos en la parte experimental.

El capítulo finaliza con las conclusiones que se pueden extraer de los resultados experimentales obtenidos.

4.2. DETERMINACIÓN DE CUATS POR LC-MS

4.2.1. Introducción

El desarrollo de metodologías analíticas basadas en la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas para la determinación de cuats en muestras de agua es una de las líneas de investigación en la que nuestro grupo ha estado trabajando los últimos años. En este sentido, en una tesis doctoral previa (Castro, 2001) se desarrolló un método de determinación de los cuats por LC-MS en la que la separación cromatográfica tenía lugar por formación de pares iónicos empleando una columna de fase invertida y la detección se llevaba a cabo con un analizador de trampa de iones previa ionización en una fuente de *electrospray*. Sin embargo, para alcanzar los niveles legislados por la Unión Europea para los cuats en aguas de consumo (0,1 $\mu\text{g/L}$ para cada pesticida) fue necesario aplicar métodos de preconcentración. Para ello se utilizó un método de preconcentración *on-line* empleando cartuchos poliméricos y formando pares iónicos mediante la adición previa de ácido heptafluorobutírico (HFBA) a las muestras de agua (Castro *et al.*, 2001b). Los límites de detección obtenidos con este método en muestras de agua de consumo fueron inferiores a 0,1 $\mu\text{g/L}$, lo que permitió analizar los cuats en este tipo de muestras a los niveles legislados. Sin embargo, el método de preconcentración aplicado, a pesar de ser *on-line* no estaba automatizado y era necesario desviar manualmente la fase móvil a través del cartucho de preconcentración para eluir los analitos mediante la manipulación de una válvula Rheodine de 6 vías.

En esta tesis doctoral se ha continuado con el desarrollo de metodologías analíticas basadas en LC-MS para la determinación de compuestos catiónicos y, como primer objetivo en esta línea, nos planteamos la automatización del método de preconcentración comentado anteriormente. Para ello se utilizó un sistema de preconcentración Prospekt (*Programmable Solid-Phase Extraction Technique*) de Spark Holland de dos módulos, el dispensador de disolventes y el módulo principal. El primero consta de un sistema de bombeo y una válvula de 16 puertos que permite alternar el uso de diferentes disolventes. En el módulo principal se encuentra la unidad de control electrónico de todo el sistema, así como un dispensador que suministra los cartuchos al *holder*, o dispositivo para alojarlos, durante el proceso de preconcentración en cada análisis. Este *holder* se conecta en línea tanto con el módulo dispensador de disolventes como con la columna analítica mediante un sistema de válvulas de alta presión. Este sistema permite la preconcentración automática de volúmenes grandes de muestra utilizando para el bombeo de la misma uno de los canales

del dispensador de disolventes. La muestra pasa a través del cartucho en el módulo principal y, posteriormente, se eluye en contracorriente con la fase móvil hacia la columna analítica. Los 16 puertos del módulo dispensador de disolventes permiten manejar, de manera automática, un número elevado de muestras.

Con respecto a los analizadores utilizados en este trabajo, sus principales características se han comentado en el capítulo 3 de esta memoria. Sin embargo, la configuración de las fuentes de *electrospray* de ambos analizadores son distintas y a su vez diferentes a la utilizada en el desarrollo inicial del método con el analizador de trampa de iones (Castro *et al.*, 2001b). Por ello a continuación se comentan las características de las fuentes utilizadas.

Configuraciones de las fuentes de electrospray utilizadas

La fuente de ionización de *electrospray* es una de las más empleadas en el acoplamiento LC-MS y, en la actualidad, existen varios diseños comerciales que pretenden aumentar la eficacia de la ionización, la transmisión de los iones al espectrómetro de masas y la robustez de la fuente. En nuestro caso, el instrumento LCQ Classic (Thermo Electron) con un analizador de trampa de iones utiliza una fuente de *electrospray* típica de configuración *on-axis*. En cambio, los otros dos espectrómetros de masas presentan configuraciones más complejas como son la fuente TurboIonspray en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo API 3000 (Perkin Elmer Sciex) y la fuente Z-spray en el instrumento de tiempo de vuelo Q-TOF Ultima (Micromass). En la Figura 4.1 se muestran los esquemas de estas tres fuentes de *electrospray*.

La configuración *on-axis* es la más simple (Figura 4.1 a) y en ella el *espray* se genera en la dirección de la entrada de los iones al espectrómetro de masas y, además, de modo concéntrico al orificio de entrada, de manera que los iones siguen una trayectoria más o menos lineal desde el *espray* hasta el orificio de entrada al espectrómetro de masas. Esta configuración es más susceptible de presentar problemas de contaminación y de ruido. En la fuente Z-spray (Figura 4.1 b), el *espray* no está dirigido hacia el orificio de entrada del espectrómetro de masas sino en dirección perpendicular a éste con lo que se reduce la entrada de componentes no ionizables y poco volátiles de la matriz. Posteriormente los iones circulan por una región intermedia de presión reducida y se dirigen a otro orificio perpendicular al primero que conduce a la zona de alto vacío del analizador. De esta manera, los iones siguen una trayectoria en forma de Z desde el *electrospray* al cuadrupolo.

Esta configuración permite aumentar la apertura del primer orificio con lo que el número de iones muestreados se incrementa lo que conlleva un aumento de señal.

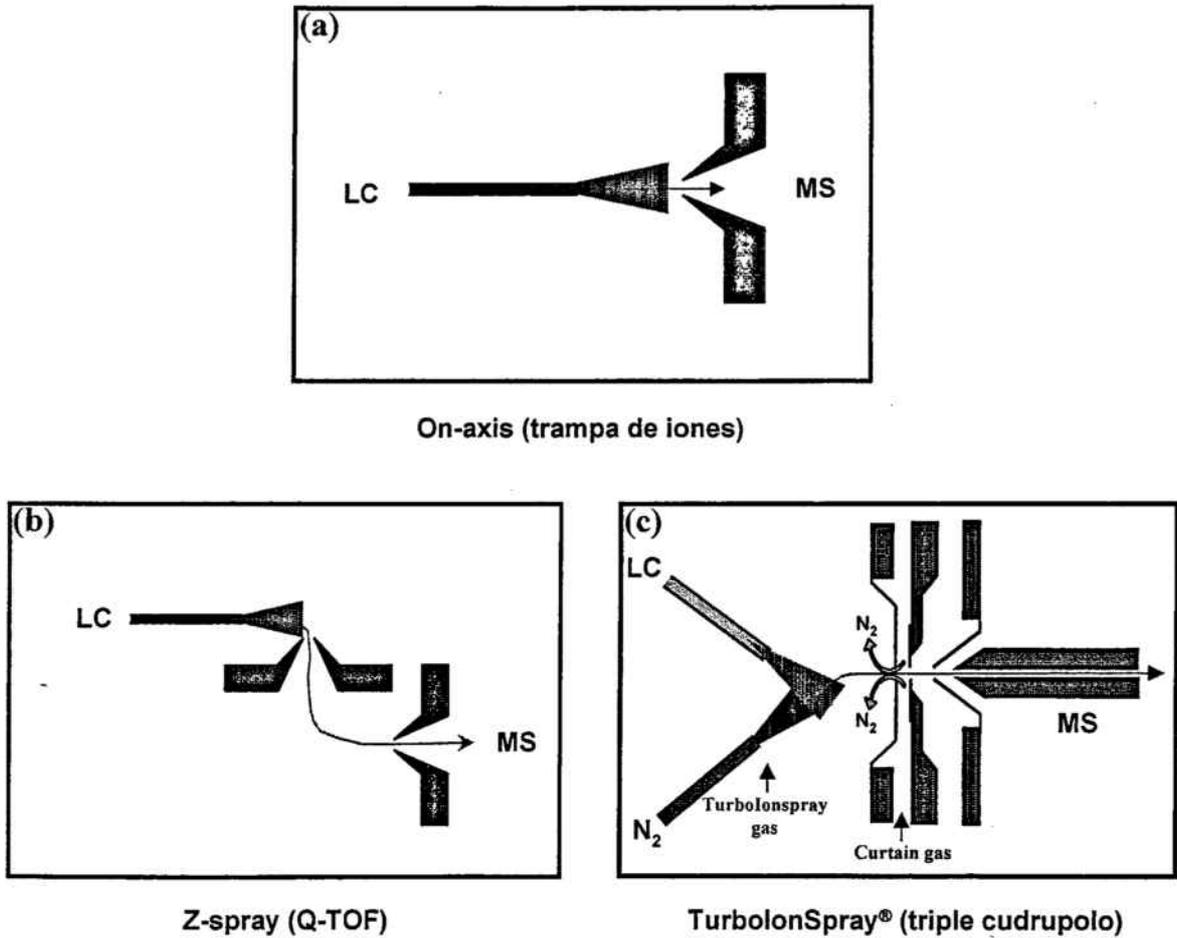


Figura 4.1. Fuentes de ionización de *electrospray* para el acoplamiento LC-MS con diferentes espectrómetros de masas.

En la fuente TurboIonSpray (Figura 4.1 c) el spray se genera en ángulo con respecto al orificio de entrada al espectrómetro de masas y se encuentra ligeramente desplazado hacia un lado de manera que no impacta directamente sobre el orificio de entrada. Además, se hace incidir un chorro de gas a elevada temperatura (turboionspray gas) perpendicularmente a la dirección del spray lo que ayuda a la desolvatación de los iones y crea un flujo turbulento frente al orificio de entrada al espectrómetro de masas. De la nube generada, tan solo los iones de un determinado signo, positivos o negativos, son atraídos por el gradiente de potencial hacia el analizador. Esta fuente dispone además de una cortina de gas que circula en dirección contraria a la trayectoria de los iones por delante del orificio de entrada al analizador y que se conoce como *curtain gas*. Este gas evita que moléculas neutras u otros componentes de la matriz no ionizables y poco

volátiles penetren en la región del analizador. Ambas fuentes, Z-spray y TurboIonspray, presentan una eficacia de vaporización superior a la de la configuración *on-axis* y a lo largo de los experimentos descritos en este capítulo se verá que ambas fuentes permiten disminuir los problemas de supresión de la ionización.

4.2.2. Trabajo experimental

El desarrollo y la optimización de la metodología basada en LC-MS y LC-MS/MS utilizando los analizadores de triple cuadrupolo y de trampa de iones para la determinación de cuats en muestras de agua de bebida se encuentran descritos con detalle en la comunicación científica Artículo VI que se incluye en el apartado 4.2.2.2 de esta memoria. Sin embargo, algunos aspectos del desarrollo de este trabajo, como son la optimización de los parámetros de fuente o la fragmentación de los cuats en el triple cuadrupolo, son solo comentados de manera superficial, por lo que se explican con más detalle en el siguiente apartado. Finalmente se incluye un apartado de discusión de los resultados obtenidos.

4.2.2.1. Optimización de las condiciones de trabajo

En el trabajo desarrollado en la comunicación científica incluida en el siguiente apartado se han utilizado dos fuentes de ionización de *electrospray* para el acoplamiento LC-MS. Cada una de estas fuentes presenta unos parámetros instrumentales característicos que fueron optimizados con el fin de obtener la máxima respuesta para los cuats. Así, en la fuente TurboIonspray utilizada con el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Figura 4.1 c), los parámetros de fuente característicos que se han optimizado son los caudales del gas de nebulización, del *curtain gas* y del *TurboIonspray gas*, así como la temperatura de este último, y el voltaje del *electrospray*. La optimización de los caudales del gas de nebulización (Figura 4.2 a), del *curtain gas* (Figura 4.2 b) y del *TurboIonspray gas* (Figura 4.2 c) se ha llevado a cabo mediante inyecciones de una disolución del regulador de crecimiento CQ mientras que para la temperatura del gas TurboIonspray y para el voltaje de *electrospray* (Figuras 4.2 d y e, respectivamente) se monitoriza la señal correspondiente para todos los herbicidas. Para este estudio se ha utilizado como fase móvil una disolución 20 mM de HFBA en tampón ácido fórmico/formiato de amonio (pH 3,3) 100 mM, con un 40% de acetonitrilo, a un flujo de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Como puede observarse, para todos los gases el incremento de su caudal produce un incremento de la señal del CQ (Figuras 4.2 a, b y c) hasta llegar a un valor máximo a partir del cual se produce una ligera disminución en

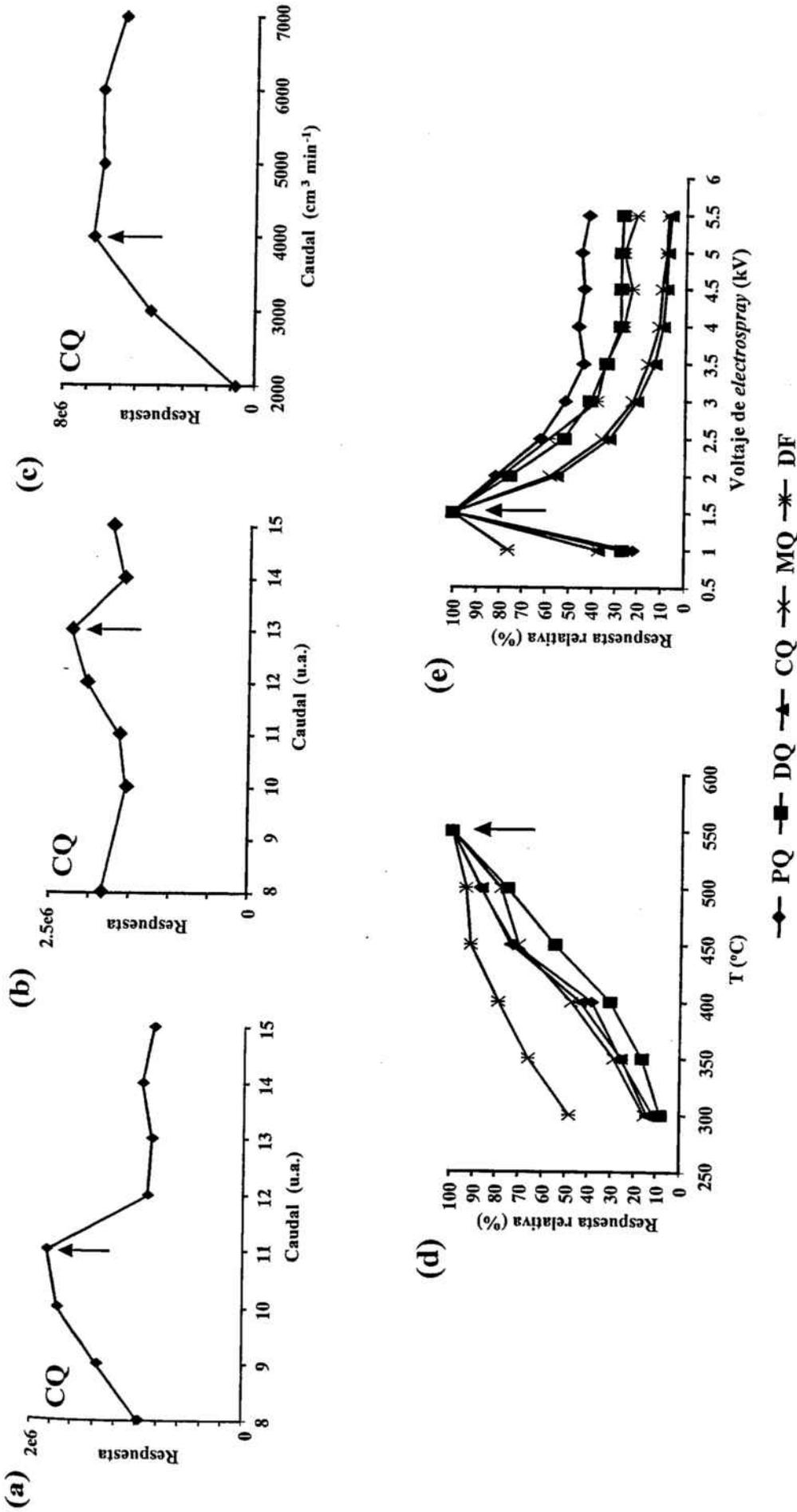


Figura 4.2. Optimización de los parámetros de la fuente Turbolonspray en el triple cuadrupolo. (a) Gas de nebulización, (b) Curtain gas, (c) Turbolonspray gas, (d) Temperatura del Turbolonspray gas y (e) Voltaje del electro-spray.

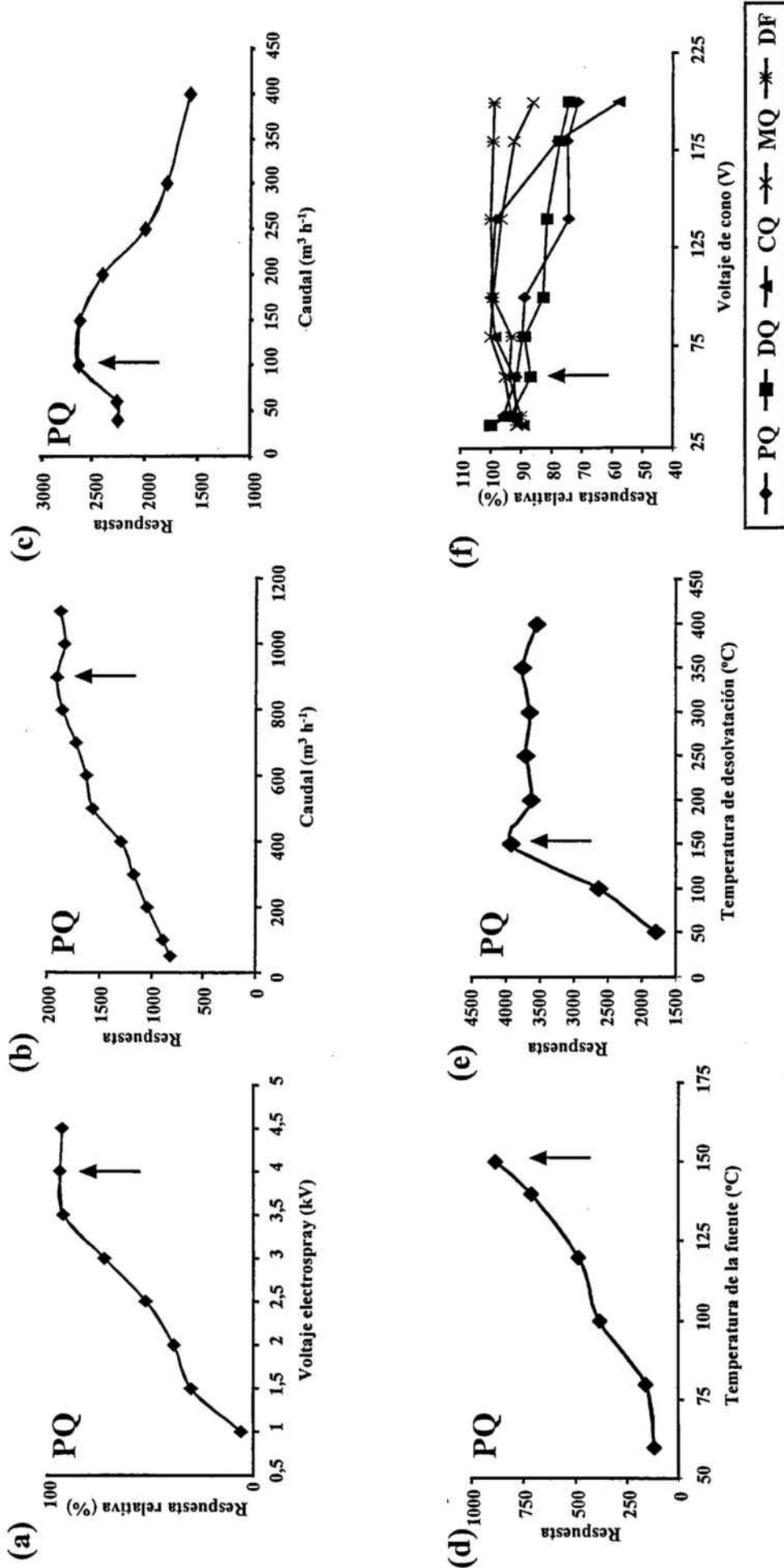


Figura 4.3. Optimización de los parámetros de la fuente Z-spray en el Q-TOF. (a) Voltaje de electro-spray, (b) Gas de desolvación, (c) Gas del cono, (d) Temperatura de la fuente, (e) Temperatura de desolvación y (f) Voltaje del cono.

la respuesta aunque en el caso del gas de nebulización el descenso de la señal es más brusco (Figura 4.2 a). La disminución de la señal a caudales muy elevados es debida a la desestabilización del espray. De este estudio se deduce que se necesitan caudales relativamente elevados para todos los gases y se han seleccionado 11 u.a., 13 u.a. y 4000 cm^3/min como los caudales óptimos para el gas de nebulización, el *curtain gas* y el gas turboionspray respectivamente. En relación con la temperatura, para todos los cuats se obtiene la mejor señal cuando la temperatura del gas Turboionspray es máxima (Figura 4.2 d) debido a que la temperatura favorece tanto la desolvatación de los compuestos como la rotura del par iónico con el HFBA, por lo que se escogió un valor de 550 °C como óptimo. En el caso del voltaje de electrospray, en cambio, la máxima respuesta para todos los cuats se obtuvo al trabajar a 1.0 kV, produciéndose a partir de este valor un descenso importante en la señal de los cuats.

Con respecto a la fuente Z-spray que es la utilizada con el espectrómetro de masas de tiempo de vuelo (Figura 4.1 b), los parámetros de fuente característicos que se han optimizado son el voltaje de electrospray, los caudales del gas de desolvatación y del gas de cono, la temperatura de la fuente y la temperatura de desolvatación, así como el voltaje de cono. En la Figura 4.3 se muestra como varía la respuesta de los cuats en función de estos parámetros. La optimización de todos los parámetros se ha llevado a cabo mediante inyecciones del herbicida PQ a excepción del voltaje de cono para el cual se han monitorizado todos los compuestos. En este caso se ha utilizado PQ en vez de CQ, que es el compuesto empleado en el triple cuadrupolo, porque en las primeras pruebas realizadas con el instrumento de tiempo de vuelo el CQ daba una señal poco estable. La fase móvil ha sido la misma que en el caso anterior y contiene un 40% de acetonitrilo. Como puede observarse, la señal del PQ aumenta considerablemente con el incremento del caudal del gas de desolvatación (Figura 4.3 b), hasta llegar a un valor que se mantiene más o menos constante a partir de 900 m^3/h . Con respecto al caudal del gas del cono (Figura 4.3 c), se produce un ligero aumento de la señal hasta un caudal de 100 m^3/h y a partir de aquí la señal disminuye considerablemente debido a que a estos caudales tan elevados el espray se desestabiliza y, en consecuencia, disminuye la respuesta. Así, se seleccionaron los caudales de 900 y 100 m^3/h como los óptimos para los gases de desolvatación y de cono, respectivamente. La señal también aumenta con la temperatura de la fuente (Figura 4.3 d) por lo que se ha escogido el valor más elevado posible (150 °C), mientras que para la temperatura de desolvatación (Figura 4.3 e), la señal aumenta hasta un valor de 150 °C a partir del cual no se observan cambios importantes. El aumento de la respuesta con la temperatura se atribuye, de nuevo, a una mejora en la desolvatación de los compuestos y a

la rotura del par iónico formado. Con respecto al voltaje del electrospray (Figura 4.3 a) la señal aumenta considerablemente con el incremento de voltaje, manteniéndose constante a partir de 3,5 kV, por lo que se seleccionó el valor de 4,0 kV como óptimo. En cuanto al voltaje del cono de extracción (Figura 4.3 f) se seleccionó como valor óptimo para todos los cuats aquel que permite la máxima transmisión de iones hacia el espectrómetro de masas sin producir la fragmentación de estos en la fuente, es decir, un valor de alrededor de 60 V.

Espectros MS y MS/MS con el triple cuadrupolo

Los parámetros de fuente se ahn optimizado para maximizar la respuesta de los iones moleculares en el caso del CQ, MQ y DF, y de los iones $[M-H]^+$ para el PQ y el DQ. En la Tabla 4.1 se indican los iones detectados en un barrido de m/z en el primer cuadrupolo así como sus asignaciones. Estos resultados coinciden con los que previamente se habían obtenido en el instrumento de trampa de iones y en el de tiempo de vuelo (Capítulo 3). Los espectros en *full scan* para el PQ y el DQ presentan una diferencia importante con respecto a los obtenidos con la trampa de iones (Tabla 1 del Artículo IV, página 198). En dicho instrumento (trampa de iones), el ión más abundante en estos espectros es el ión molecular a m/z 186 y m/z 184, para el PQ y el DQ respectivamente. Sin embargo, en el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo se encuentra favorecida la pérdida de hidrógeno, siendo el ión más abundante el catión $[M-H]^+$ a m/z 185 y m/z 183, para el PQ y DQ respectivamente. Por esta razón, y tal como se describe en el artículo, estos son los dos iones que se seleccionan como iones precursores para los experimentos de tándem. Así, en la Tabla 4.1 sólo se dan los iones producto que generan estos dos iones y no los correspondientes a los iones moleculares.

Para optimizar las condiciones de los experimentos en tándem en el triple cuadrupolo se estudió el efecto de la presión del gas de colisión en la cámara de colisión ubicada entre los dos cuadrupolos y el de la energía de colisión. En la Figura 4.4 se muestran, a modo de ejemplo, las curvas de fragmentación para el PQ y el DF al variar el voltaje de colisión desde 0 a 130 V en la celda de colisión del triple cuadrupolo. Estas curvas se obtuvieron por infusión de disoluciones de los herbicidas preparadas en fase móvil con un 40% de acetonitrilo.

Como puede observarse, a medida que aumenta el voltaje de colisión, aumenta la fragmentación de los herbicidas. Los iones que aparecen a energías de colisión más elevadas están relacionados con iones de segunda o tercera generación tal como se discutió

en el capítulo 3 donde se comentó la fragmentación obtenida en el instrumento híbrido Q-TOF.

Tabla 4.1. Espectros MS y MS/MS de los cuats con el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo

Cuat	Espectros MS		Espectros MS/MS		
	Iones, m/z (Abundancia relativa, %)	Asignación	Ion precursor (Voltaje de colisión)	Ion producto (Abundancia relativa, %)	Asignación
PQ	186.1 (20)	[M] ²⁺	185.1 (35 V)	185.1 (25)	[M-H] ⁺
	185.1 (100)	[M-H] ⁺		183.1 (10)	[M-H-2H] ⁺
	170.1 (15)	[M-CH ₄] ²⁺		170.1 (100)	[M-H-CH ₃] ²⁺
	93.4 (15)	[M] ²⁺		158.2 (60)	[M-H-HCN] ⁺
				144.2 (25)	[M-H-CH ₃ CN] ⁺
				118.1 (35)	[M-H-CH ₃ CN-CH ₂] ⁺
DQ	184.1 (25)	[M] ²⁺	183.1 (33 V)	183.1 (25)	[M-H] ⁺
	183.1 (100)	[M-H] ⁺		181.1 (10)	[M-H-2H] ⁺
	92.4 (20)	[M] ²⁺		168.1 (25)	[M-H-CH ₃] ²⁺
				157.1 (100)	[M-H-C ₂ H ₂] ⁺
				130.1 (15)	[M-H-C ₂ H ₂ -HCN] ⁺
				106.1 (10)	[M-H-C ₅ H ₃ N] ⁺
DF	249.2 (100)	[M] ⁺	249.2 (45 V)	249.2 (20)	[M] ⁺
				234.1 (15)	[M-CH ₃] ²⁺
				233.0 (40)	[M-CH ₄] ⁺
				208.1 (<5)	[M-CH ₃ CN] ⁺
				193.1 (100)	[M-C ₂ H ₆ CN] ²⁺
				146.1 (<5)	[M-C ₆ H ₅ CN] ⁺
				131.2 (70)	[M-C ₆ H ₅ -CH ₃ CN] ²⁺
				130.1 (80)	[M-C ₆ H ₅ -CH ₃ CN-H] ⁺
				118.1 (80)	[M-C ₆ H ₅ -CHCNCH ₃] ⁺
	CQ	122.1 (100)		[M] ⁺	122.1 (38 V)
124.2 (30)		[M+2] ⁺	106.1 (15)	[M-CH ₄] ⁺	
			94.1 (30)	[M-C ₂ H ₄] ⁺	
			86.1 (10)	[M-HCl] ⁺	
			63.2 (40)	[M-N(CH ₃) ₃] ⁺	
			60.1 (10)	[M-ClC ₂ H ₄ +H] ⁺	
			59.1 (45)	[M-ClC ₂ H ₄] ²⁺	
			58.1 (100)	[M-ClC ₂ H ₅] ⁺	
MQ	114.1 (100)	[M] ⁺	114.1 (38 V)	114.1 (50)	[M] ⁺
				99.2 (15)	[M-CH ₃] ²⁺
				98.1 (100)	[M-CH ₄] ⁺
				69.2 (8)	[M-HN(CH ₃) ₂] ⁺
				58.1 (20)	[M-C ₄ H ₈] ⁺

La energía de colisión óptima se seleccionó como compromiso entre la máxima intensidad de los iones producto que vamos a utilizar posteriormente como iones diagnóstico y la presencia en el espectro del ión precursor en una abundancia relativa de por lo menos un 10%. En la Tabla 1 del artículo VI (página 241) se indican las transiciones

seleccionadas para la adquisición en modo MRM. La fragmentación observada en el instrumento de triple cuadrupolo (Tabla 4.1) coincide con la descrita para el instrumento híbrido Q-TOF y, además, coincide también con los iones descritos para los espectros MS² (*product ion scan* de las transiciones 186→185 y 184→183 para el PQ y el DQ, respectivamente) en la trampa de iones.

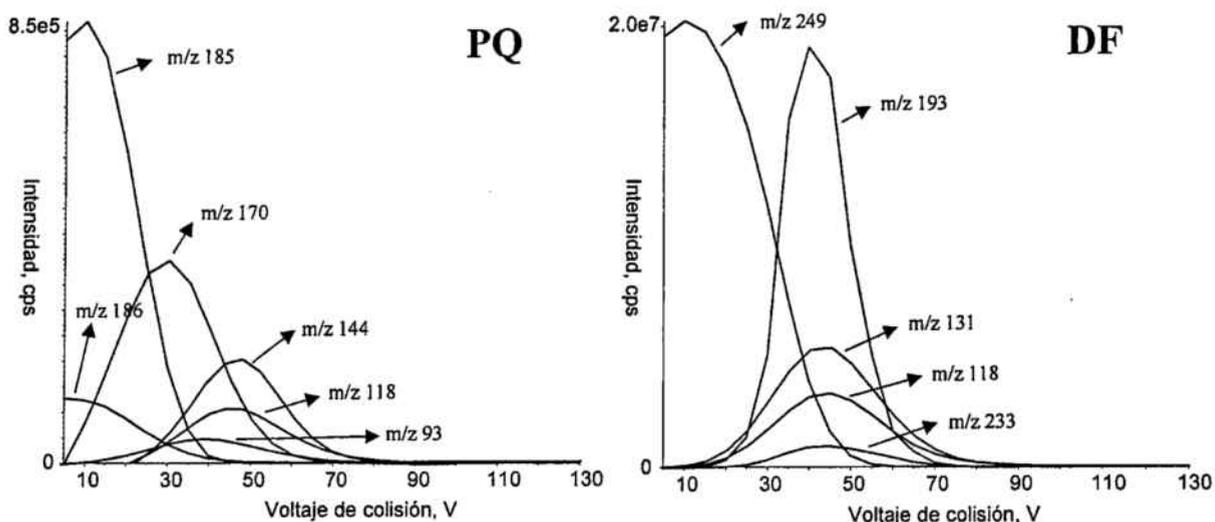


Figura 4.4. Curvas de fragmentación en la celda de colisión del triple cuadrupolo para los herbicidas PQ y DF.

En el espectro MS/MS del DF, la abundancia relativa de los fragmentos a m/z 146 y 208 al igual que pasaba en el Q-TOF es muy pequeña, inferior al 5%, lo que viene a confirmar las conclusiones del Capítulo 3 respecto a la formación de estos fragmentos en la trampa de iones, donde se establece que su formación tiene lugar via dos mecanismos, (i) pérdida directa y (ii) reacción ión-molécula. En cambio, en los espectrómetros de masas de triple cuadrupolo y en los Q-TOF las reacciones ión-molécula no tienen lugar, lo que explica la poca abundancia de estos dos fragmentos en ambos instrumentos.

4.2.2.2. Artículo VI

Accurate mass measurement versus tandem mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water

O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran

Analytica Chimica Acta (2004) submitted.

Manuscrito enviado a la revista *ANALYTICA CHIMICA ACTA* para su publicación

**Accurate Mass Measurement versus Tandem Mass Spectrometry for the Analysis of
Quaternary Ammonium Herbicides in Drinking Water**

Oscar Núñez, Encarnación Moyano and María Teresa Galceran*
Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona.
Martí i Franquès 1-11, E-08028, Barcelona, Spain.

ABSTRACT

Conditions for the simultaneous determination of quaternary ammonium herbicides by liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry were established. Two electrospray sources with different configurations and two mass analyzers were used: a Turbo IonsprayTM source with a triple quadrupole instrument and a Z-spray source with a quadrupole-time-of-flight (TOF) instrument. The separation was performed using ion pair reversed phase chromatography. An on-line solid-phase extraction procedure with polydivinylbenzene cartridges was automatized by using a Prospekt device coupled to both MS instruments. Good run-to-run precisions were obtained for both instruments, and the determination of quats in drinking water was evaluated using spiked samples. Better limits of detection were obtained using tandem mass spectrometry, although better confirmation was achieved by TOF because of its high mass accuracy. The results obtained allowed the analysis of quats in drinking water samples below the legislated levels.

Keywords: Quaternary ammonium herbicides; accurate mass measurement; tandem mass spectrometry; mass spectrometry

*Author to whom correspondence should be addressed

1. Introduction

Quaternary ammonium herbicides, commonly known as "quats", constitute a particularly difficult group of compounds to analyze. Included in this group are the three herbicides paraquat (PQ), diquat (DQ) and difenzoquat (DF), and the two plant-growth regulators chlormequat (CQ) and mepiquat (MQ). PQ and DQ are used as non-selective contact herbicides for the control of weeds and DF is a selective herbicide used for post-emergence control of wild oats in cereal crops. CQ is used to increase yield and to improve fruit setting in fruits and vegetables, while MQ is used on cotton to reduce vegetative growth and to inhibit sprouting [1]. On the basis of their toxicity, the World Health Organization (WHO) has classified PQ, DQ and DF as moderately hazardous and CQ and MQ as slightly hazardous [2]. Because of this, there is great concern about the presence of these compounds in different matrices such as fruits, soils and waters. For drinking waters, the US Environmental Protection Agency (EPA) has established a maximum contaminant level of $20 \mu\text{g l}^{-1}$ for DQ and a maximum contaminant level goal of $3 \mu\text{g l}^{-1}$ for PQ [3,4]. The European Union has not regulated the levels of these compounds in drinking water and continues to apply the values of $0.1 \mu\text{g l}^{-1}$ for individual pesticides and $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ for total pesticides [5].

The analysis of these compounds is difficult and although some methods have been published, liquid chromatography (LC) with direct UV detection [6,7] and capillary electrophoresis (CE) with direct [8,9] or indirect [10] UV detection, are frequently applied. The use of mass spectrometry (MS) as a detection technique allows to overcome the problems of identification and quantitation of the methods mentioned above. Moreover, MS also permits the simultaneous analysis of the three herbicides and the two plant growth

regulators. Thus, quats have been analyzed by LC-MS or LC-MS-MS using different MS spectrometers such as single quadrupoles [11-15], triple quadrupoles [16] and ion traps [14,17,18]. CE-MS has also been used for the determination of these compounds with these three previously mentioned analyzers [19-22]. Nevertheless, LODs achieved with the coupling of CE-MS for quats did not allow the analysis of these compounds in drinking water at the European Union legislated levels [5]. LC-MS has also been applied to the analysis of residues of chlormequat in fruits and fruit commodities such as purées and juice concentrates [23-27].

Unequivocal identification in LC-MS is not always possible when working with quadrupole and ion trap mass analyzers due to their low mass resolution. To overcome this problem, tandem mass spectrometry is frequently used but, for confirmation purposes, at least two MS-MS transitions are needed. However, this is only possible when the MS-MS spectrum of the target compound has more than one product ion. Moreover, the use of more than one transition for each compound in triple quadrupole instruments increases the number of ions to analyze which usually results in a loss of sensitivity.

Time-of-flight (TOF) mass analyzers provide a high selectivity because of the high resolutions (~ 10000) now attainable without loss in sensitivity, and a high mass accuracy [28]. These characteristics make it possible to overcome the problems mentioned above. Mass accuracy may be improved further by the introduction of an internal standard reference mass to perform the lock mass correction. Different approaches for the introduction of this lock mass reference compound are used, such as infusion in the same solution of the analytes [29], post column addition [30,31], or switching between separate sample and reference sprays [32,33]. The

lock mass correction can provide mass accuracy in the 5-10 ppm range [29,30,32].

Capillary electrophoresis-time-of-flight mass spectrometry has been used to analyze paraquat and diquat in drinking water [34] and matrix assisted Laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) has also been applied to the analysis of quats in standard solutions [35,36]. However, none of these publications used a lock mass correction for the accurate mass determination of these compounds.

The present paper compares two LC-MS methods for the analysis of quaternary ammonium herbicides in drinking water, using (i) a TOF instrument with high resolution and mass accuracy and (ii) a triple quadrupole mass analyzer which provides high sensitivity in selected reaction monitoring (SRM) mode. The automatization of a previously established on-line preconcentration method [17] by means of a Prospekt device was performed, and the procedure was applied to the analysis of spiked drinking water samples.

2. Experimental

2.1. Chemicals

The quaternary ammonium herbicides were obtained from the following sources: diquat (1,1'-diethylene-2,2'-bipyridinium ion, DQ), difenzoquat (1,2-dimethyl-3,5-diphenylpyrazolium ion, DF) and chlormequat (2-chloroethyltrimethyl ammonium ion, CQ) were purchased from Chemservice (West Chester, PA, USA), paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium ion, PQ) from Sigma (St. Louis, MO, USA) and mepiquat (1,1'-dimethylpiperidinium ion, MQ) from Riedel-de Haën (Seelze, Germany). Heptylviologen (1,1'-diheptyl-4,4'-bipyridinium ion, HV) purchased from TCI (Tokyo, Japan) was used as internal standard. The deuterated compounds paraquat- d_8 (1,1'-dimethyl-4,4'-

bipyridinium-rings- d_8 ion, PQ- d_8), diquat- d_4 (1,1'-ethylene- d_4 -2,2'-bipyridinium ion, DQ- d_4) and chlormequat- d_4 (2-chloroethyl- d_4 -trimethylammonium ion, CQ- d_4 , 100 mg l⁻¹) were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Ethylviologen (1,1'-diethyl-4,4'-bipyridinium ion, EV) from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) was used as internal standard reference mass for the lock mass correction with the Q-TOF instrument. The structures of all these compounds are shown in Fig. 1.

HPLC-gradient grade acetonitrile (ACN), sodium hydroxide, formic acid (98-100%), toluene and ammonia solution 25% (analytical grade) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Heptafluorobutyric acid (HFBA) and hexamethyldisilazane (HMDS) were obtained from Sigma (Poole, UK).

Stock standard solutions of individual quats, internal standard and deuterated compounds, 1000 mg l⁻¹, were prepared in water and stored in plastic vials to prevent adsorption. Working solutions were obtained by mobile phase dilution and passed through a 0.45 μ m nylon filter before use. All glass material in contact with quats, such as glass vials, were silanized for 24 hours with a 10% HMDS solution in toluene in order to prevent the adsorption of these compounds.

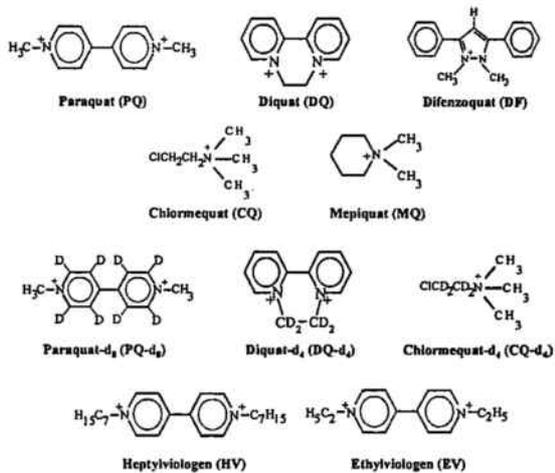


Figure 1. Structures of quats, internal standard, labeled compounds, and lock mass reference.

2.2. Instrumentation

A quaternary pump system from Agilent Technologies (USA) model Series 1100 was coupled to an API 3000TM (Perkin Elmer Sciex, Canada) equipped with a Turbo IonsprayTM ionization source working in positive mode and a triple quadrupole analyzer. Mass spectrometry data were processed with Analyst v1.1 software. Optimal ionization source working parameters were: electrospray voltage, 1.5 kV; nebulizer gas flow-rate, 11 a.u. (arbitrary units); curtain gas flow-rate, 13 a.u.; turbo ionspray gas flow-rate, 4000 cm³/min; turbo ionspray gas temperature, 550 °C and declustering potential, 38 V. For LC/MS selected ion monitoring (SIM) using the *m/z* corresponding to the ions [M]⁺ (CQ, CQ-d₄, MQ and DF) or [M-H]⁺ (PQ, PQ-d₈, DQ, DQ-d₄ and HV) are used (Table 1). For LC/MS/MS, SRM mode was used selecting as precursor ions the [M]⁺ and [M-H]⁺ mentioned above, and the *m/z* corresponding to the most abundant product ion was monitored. The collision cell offset voltage was between 33 and 45 V and the collision gas pressure (N₂) was 5 a.u. The chromatogram was segmented into 3 windows and only 3 or 4 transitions were monitored simultaneously for each one (Table 1). Both SIM and SRM acquisitions were performed in centroid mode.

A quaternary pump system from Waters (Milford, MA, USA) model Alliance 2690 was coupled to a Quadrupole-Time of Flight (Q-TOF Ultima) mass spectrometer (Micromass, Manchester, UK) equipped with a Z-spray ESI source working in positive mode and V-Optics configuration. Data acquisition was carried out with MassLynx v4.0 software. Optimal ionization source working parameters were: capillary voltage, 4.0 kV; cone voltage, 60 V; source temperature, 150 °C; desolvation temperature, 150 °C; cone gas flow rate, 100 m³ h⁻¹ and desolvation gas flow-rate, 900 m³ h⁻¹. The duty cycle for

the Q-TOF instrument was 1 s monitoring *m/z* values ranging from 50 to 400 (interscan time 0.1 s). Post-column addition by means of a zero-dead volume Valco T-piece (1 µl min⁻¹) of a 15 mg l⁻¹ solution of EV (*m/z* 214.1470) in mobile phase was used as lock mass for accurate mass measurement. Acquisition was performed in profile mode. Moreover, PQ-d₈, DQ-d₄ and HV were used as internal standards for PQ, DQ and DF, respectively, and CQ-d₄ as internal standard for CQ and MQ and a mass window of ±0.01 Da was used for quantitation purposes.

The Q-TOF instrument was calibrated using quats as calibrating standards. Moreover, to extend the mass range, diethylamine (M_r 74 Da), EV (M_r 214 Da) and HV (M_r 354 Da) were added to the calibration standard mixture. The calibration solution prepared in 400 mM formic acid/ammonium formate (pH 3.0):methanol (10:90) was infused using a syringe pump.

2.3. Chromatographic conditions

The chromatographic separation was carried out in a Kromasil C₈ column (200x21 mm, 5µm; Tracer Analytica, Spain). Gradient elution was used for optimal separation of quats; solvent A was 20 mM HFBA aqueous solution in 100 mM formic acid/ammonium formate buffer (pH 3.3) and solvent B was acetonitrile. The elution program consisted in an isocratic step of 2 min at 10% of solvent B, a linear gradient from 10 to 40% in 7.5 min, an isocratic step of 4 min at 40% and a stepwise elution from 40 to 70%. The flow rate was 200 µl min⁻¹. The temperature of the column was maintained at 50 °C using a CH-30 Column Heater (Eppendorf, Hamburg, Germany). The injection volume was 20 µl.

Table 1. SIM and MRM parameters used with triple quadrupole instrument.

Segment	Time (min)	Analyte	SIM m/z	SRM		Collision offset voltage (V)	dwell time ^a (ms)
				precursor m/z	product ion m/z		
1	0-12	CQ	122	122	58	38	400
		CQ-d ₄	126	126	58	45	400
		MQ	114	114	98	38	400
2	12-17	PQ	185	185	170	35	300
		PQ-d ₈	193	193	178	35	300
		DQ	183	183	157	33	300
		DQ-d ₄	186	186	158	33	300
3	17-25	DF	249	249	193	45	500
		HV	353	353	282	35	500

^a Interchannel time delay: 5 ms

2.4. Sample treatment and on-line trace enrichment

On-line trace enrichment was carried out with an automated SPE Prospekt device from Spark Holland (Emmen, The Netherlands) consisting of a high pressure dispenser and an automated cartridge exchange unit and following the procedure established by Castro et al. [17]. HySphere-Resin GP Prospekt SPE (5-15 μm polydivinylbenzene particles) cartridges were used and they were pre-conditioned with 10 ml of methanol, 10 ml of water and 10 ml of 20 mM HFBA adjusted to pH 9 with sodium hydroxide (10%). Water samples were then passed through the cartridges at a flow rate of 2.0 ml min^{-1} . Analytes were desorbed in backflush mode to the analytical column. In order to avoid the passage of HV and the labeled compounds used as internal standards through the cartridge, these compounds were injected (20 μl , 250 $\mu\text{g l}^{-1}$) via the LC autosampler at the beginning of the elution program (Prospekt valve on Purge position). One minute later, analytes were desorbed in the backflush mode to the analytical column (Prospekt valve on Elute position). This valve was returned to the Purge position within 30 s to avoid band broadening. Between runs, 30 ml of a solution ACN:water:formic acid (80:18:2) was passed through the Prospekt system to prevent memory effects and cross contamination between samples.

Before the analysis, drinking water samples were filtered through a 0.45 μm nylon membrane. HFBA was added to water samples to obtain a 20 mM solution and the pH was adjusted to 9 using a 10% sodium hydroxide solution.

3. Results and discussion

The cationic character of quaternary ammonium herbicides makes liquid chromatography separation difficult and ion-pair liquid chromatography coupled to mass spectrometry is the method of choice

for these ionic species. Nevertheless, this type of coupling presents some problems due to the requirement of high concentrations of non-volatile conventional ion-pair reagents. In a previous paper, where an on-axis ESI source was used, these problems have been overcome [11]. A relatively volatile ion-pair reagent, such as heptafluorobutyric acid at a relatively low concentration (15 mM), was used in combination with a post-column addition of acetonitrile to improve the ionic evaporation and consequently to increase the response of these compounds. Nevertheless, an important ionic suppression effect between quats was observed. For instance, DQ showed a 30% decrease in its response when coelution with PQ occurred, and the signal of CQ decreased 70% when coeluted with MQ. For these reasons, in the present work, both ionic suppression effect and post-column addition were evaluated in the two ESI configurations, Turbo Ionspray source and Z-spray source. Both ESI sources showed a similar behavior, post-column addition of acetonitrile was not needed and ionic suppression was not observed when the coelution of quats occurred. For this reason a high resolution LC separation is not imperative. Even though TurboIonspray and Z-spray sources have high ionization efficiency, working conditions must be energetic enough to enhance ionic evaporation. So, relatively high gas flow-rates and high temperatures were applied to obtain maximal responses. Moreover, to enable an efficient declustering but preventing fragmentation in the source, both the declustering potential (TurboIonspray source) and the cone voltage (Z-spray source) were optimized and values of 38 V and 60 V, respectively, were chosen.

3.1. Instrumental quality parameters

Instrumental quality parameters in both triple quadrupole and TOF instruments were obtained using standards in Milli-Q

water and the figures of merit are given in Table 2. The LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 were in the range 0.1-7 $\mu\text{g l}^{-1}$ when the triple quadrupole instrument equipped with the Turbo IonsprayTM source was used in SIM mode and decreased to 0.02-0.3 $\mu\text{g l}^{-1}$ with SRM mode. In both cases, PQ and DQ showed higher LODs than the other compounds, in agreement with the results observed by other authors working with other ionization techniques and mass analyzers [11,17]. Nevertheless, for CQ, MQ and DF the LODs were about 10 times lower with the triple quadrupole instrument than with the ion trap mass analyzer. With the TOF instrument in single MS acquisition mode, LODs in the range of 0.2 to 9.0 $\mu\text{g l}^{-1}$ were obtained (Table 2). These values are similar or slightly higher than those obtained with the SIM mode in the triple quadrupole instrument.

Calibration curves based on the peak area ratio ($A_{\text{compound}}/A_{\text{internal standard}}$) for the five herbicides at concentrations between 1 and 400 $\mu\text{g l}^{-1}$ (triple quadrupole instrument in SRM mode) and between 15 and 800 $\mu\text{g l}^{-1}$ (TOF instrument in single MS acquisition mode) were obtained showing acceptable linearities ($r^2 > 0.991$). Five replicate determinations of a standard solution of 75 $\mu\text{g l}^{-1}$ for PQ and 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ for the other quats (triple quadrupole instrument, SRM mode) and about 70 $\mu\text{g l}^{-1}$ for all quats (TOF analyzer) were carried out under optimum conditions to determine run-to-run reproducibility. The relative standard deviations (RSDs) based on concentrations were lower than 8% for both MS instruments.

3.2. On-line trace enrichment

Although the detection limits obtained with the triple quadrupole instrument in SRM conditions using only one transition for each compound (Table 1) were acceptable, the method would not permit the analysis of some of these compounds below the maximum contaminant level for

drinking water legislated by the European Union (0.1 $\mu\text{g l}^{-1}$). Moreover, for a more accurate confirmation in a triple quadrupole instrument, at least two transitions are necessary for each compound. In addition, for PQ and DQ at the conditions used in this work only one product ion is obtained in the MS-MS spectrum and to have a second transition for confirmation higher collision energies are needed. As a consequence, an increase in the detection limits occurred, with values close to those obtained by the TOF instrument where confirmation is given by accurate mass measurement.

In order to improve limits of detection, preconcentration methods are required. Castro et al. [17] have proposed a manual on-line trace enrichment procedure for quats using polydivinylbenzene cartridges and a LC-MS system equipped with an ion trap analyzer that provides results. We applied this preconcentration method using an automated system (SPE Prospekt device). Breakthrough volume and recoveries, calculated by dividing peak areas obtained when percolating a given volume by those obtained for the smallest volume at which breakthrough did not occur (10 ml), were similar to those of Castro et al. [17]. Therefore, a volume of 30 ml was chosen for the on-line sample enrichment.

Quality parameters of the automated on-line SPE-LC-MS methods using both the triple quadrupole and the TOF instruments were obtained and the results for standards in Milli-Q water are given in Table 2. As can be seen, the on-line preconcentration gave LODs for all the compounds lower than the legislated levels in drinking water. All compounds showed a decrease in limits of detection around two orders of magnitude. The on-line SPE-LC-MS-MS method (triple quadrupole in SRM mode) gave the lowest LODs, with values between 0.1 and 2 ng l^{-1} . As stated above, the LODs using the

Table 2. Quality parameters (standards in Milli-Q water).

Compound	LC-MS-MS		LC-MS		SPE-LC-MS-MS		SPE-LC-MS	
	Triple quadrupole		TOF		Triple quadrupole		TOF	
	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$) SIM	run-to-run ^a (% RSD, n=5) SRM	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$) SIM	run-to-run (% RSD, n=5)	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$) SIM	run-to-run ^a (% RSD, n=5) SRM	LODs ($\mu\text{g l}^{-1}$) SIM	run-to-run (% RSD, n=5)
PQ	7	0.2	6	7	0.04	0.002	0.02	8
DQ	3	0.3	7	8	0.01	0.001	0.01	9
CQ	0.3	0.05	3	4	0.003	$8 \cdot 10^{-4}$	0.01	8
MQ	0.3	0.05	2	5	0.002	$7 \cdot 10^{-4}$	0.02	5
DF	0.1	0.02	5	5	0.001	$1 \cdot 10^{-4}$	0.003	7

^a in SRM mode

Table 3. Analysis of spiked drinking water samples.

Compound (I.S.)	LODs				Sample quantitation (n=2)					
	Triple quadrupole (SRM)		TOF		Calculated value (% relative error)		TOF (ng l ⁻¹)			
	tap water	mineral water	ground water	mineral water	tap water	mineral water	tap water	ground water		
PQ (PQ-d ₈)	0.06	0.03	0.04	0.5	0.07	0.2	5.3 (4)	77 (4)	76 (4)	69 (6)
DQ (DQ-d ₄)	0.003	0.001	0.001	0.8	0.3	0.3	3.6 (3)	52 (7)	51 (9)	59 (5)
CQ (CQ-d ₄)	0.004	0.002	0.003	0.7	0.3	0.3	5.3 (2)	80 (2)	73 (8)	83 (5)
MQ (CQ-d ₄)	0.002	0.001	0.002	0.6	0.4	0.3	5.1 (4)	73 (4)	72 (5)	79 (4)
DF (HV)	$7 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	$5 \cdot 10^{-4}$	0.07	0.008	0.01	4.7 (2)	72 (2)	74 (4)	73 (3)

TOF instrument in single MS acquisition mode are similar to those obtained with the triple quadrupole in SIM mode. The three acquisition modes studied gave similar or better LODs than those previously reported with the same preconcentration method and working with an on-axis ESI source in a Classic LCQ ion-trap instrument [17].

Calibration curves based on the peak area ratio ($A_{\text{compound}}/A_{\text{internal standard}}$) for the five herbicides at concentrations between 0.005 and 1 $\mu\text{g l}^{-1}$ (triple quadrupole instrument in SRM mode) and between 0.05 and 20 $\mu\text{g l}^{-1}$ (TOF instrument) were established, showing acceptable linearities ($r^2 > 0.990$). To determine run-to-run reproducibility, five replicate determinations of a standard solution of the five herbicides of $\sim 0.05 \mu\text{g l}^{-1}$ were carried out under optimum conditions with the triple quadrupole instrument in SRM mode and $\sim 2.5 \mu\text{g l}^{-1}$ with the TOF instrument in single MS acquisition mode. Relative standard deviations (RSDs) based on concentrations were lower than 9% for both MS instruments. This reproducibility was only slightly higher than those obtained without the on-line SPE method, showing that the use of an automatic device for on-line preconcentration improved sensitivity without losses in reproducibility.

3.3. Application

To study the applicability of the on-line preconcentration method for the analysis of quats in water at low levels, spiked tap water, mineral water and groundwater samples were analyzed using both MS instruments. LODs based on a signal-to-noise ratio of 3:1 were estimated and the results are given in Table 3. For both instruments, the values are slightly higher than those obtained for standards in Milli-Q water. The on-line preconcentration method with the triple quadrupole instrument in SRM mode gave LODs in drinking water samples below the

maximum contaminant levels legislated by both the US EPA [3,4] and the European Union [5]. When using the TOF instrument, only DF gave detection limits below the levels legislated by the European Union, although for the other herbicides the values are only slightly higher.

A tap water sample spiked at a level below the US EPA legislation was analyzed with the TOF instrument. Fig. 2a shows the obtained chromatogram. Two replicate analyses of this sample were performed by external calibration using labeled compounds and HV as internal standards, and the results are given in Table 3. As can be seen, the TOF instrument showed good results for quantitation with relative errors lower than 4%. Since the on-line preconcentration method with the triple quadrupole instrument in SRM mode enabled the analysis of drinking water samples at European Union legislation levels [5], three spiked water samples of different origin (tap water, mineral water and groundwater) were analyzed at a level below 100 ng l^{-1} . Fig. 2b shows, as an example, the chromatogram of a spiked groundwater sample obtained with the triple quadrupole instrument. The quantitation of these samples was also carried out by duplicate and external calibration with internal standards, and the results are given in Table 3. As can be seen, good results were obtained with the triple quadrupole instrument, with relative errors lower than 9%.

4. Conclusions

Two LC-MS systems, one using a Z-spray ionization source and a TOF analyzer in single MS acquisition mode, the other using a Turbo IonsprayTM source in a triple quadrupole instrument (SRM mode), were compared for the analysis of quats in water samples. An on-line SPE preconcentration method was automatized by using a Prospekt device, showing a good run-to-run reproducibility. The low

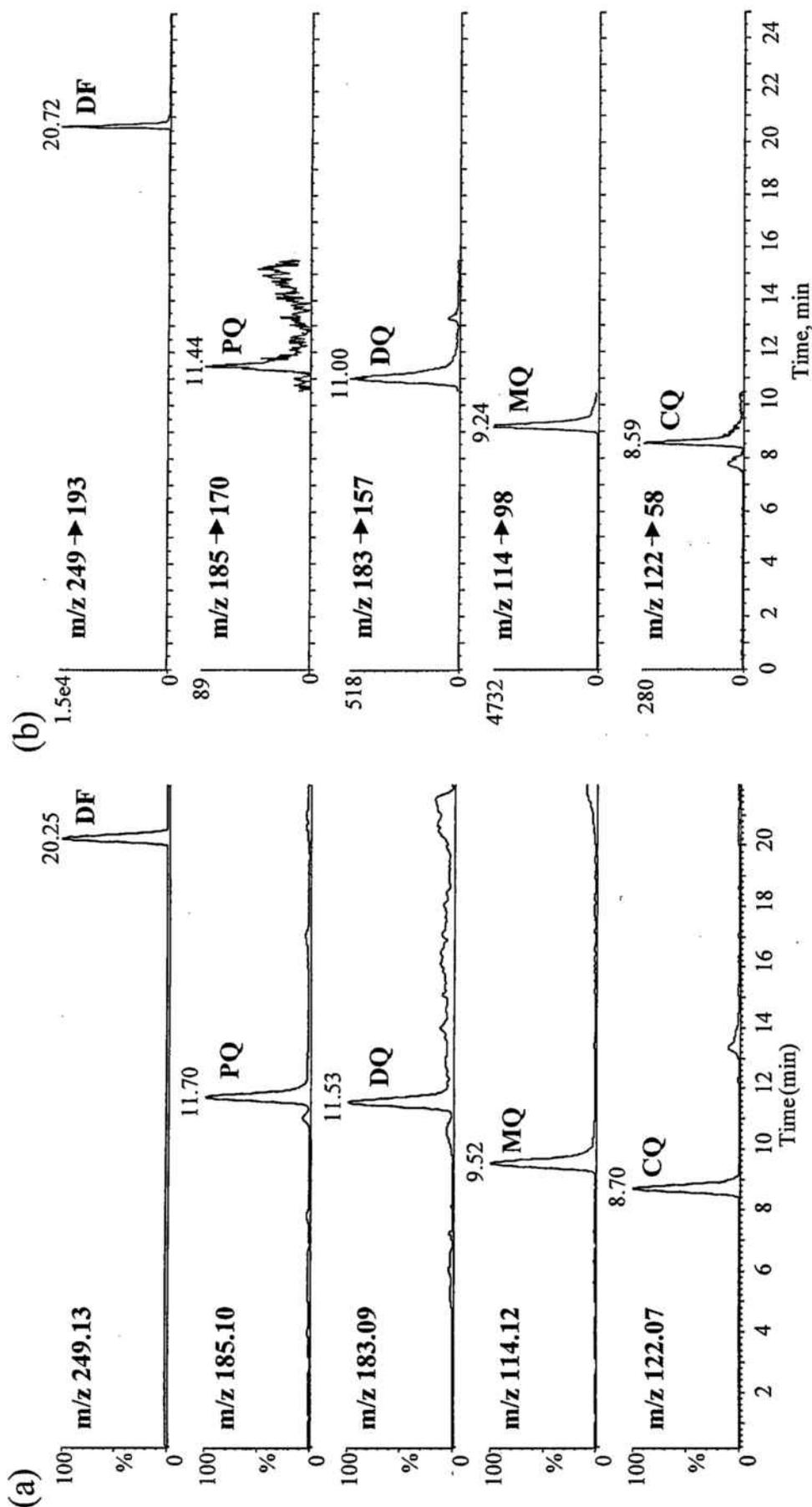


Figure 2. Chromatograms of spiked water samples obtained by automated on-line SPE-LC-MS. (a) Tap water spiked at ~5 µg l⁻¹ for PQ, CQ, MQ and DF, and at ~3.5 µg l⁻¹ for DQ in a TOF instrument. (b) Groundwater spiked at ~0.07 µg l⁻¹ for PQ, CQ, MQ and DF, and at ~0.05 µg l⁻¹ for DQ in a triple quadrupole instrument acquiring in SRM mode.

LODs and good precision of SRM mode led us to propose on-line SPE-LC-MS-MS with a triple quadrupole instrument for quantitation of quats in drinking water samples below the European Union legislated levels ($0.1 \mu\text{g l}^{-1}$), although the TOF analyzer can be proposed for the analysis of relatively contaminated samples, since LODs are only slightly higher than this level. Moreover, the accurate mass measurement with the TOF instrument can be used as a complementary confirmation tool, mainly for PQ and DQ since these compounds only give one product ion in the triple quadrupole instrument.

Acknowledgements

This work was supported by the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* of Spain and FEDER (project no. REN2003-02692/MAR). The authors thank the *Serveis Científico-Tècnics* of the University of Barcelona for instrument assistance. Oscar Núñez thanks the *Generalitat de Catalunya* for a grant (*Beca predoctoral per a la formació de personal investigador, FI*).

References

- [1] C. Tomlin (Ed.), *The Pesticide manual incorporating The Agrochemical Handbook*, 10th ed, The British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry, UK, 1995.
- [2] The WHO Recommended Classification of Pesticides By Hazard and Guidelines To Classification 1996-1997, WHO, Geneva, 1996.
- [3] US Environmental Protection Agency, *Drinking Water Health Advisory: Pesticides*, US Environmental Protection Agency, Lewis, Chelsea, MI, 1989.
- [4] Code of Federal Regulations, Title 40, Part 141, US Government Printing Office, 1 July 2002.
- [5] EEC Drinking Water Guidelines 80/779/EEC, EEC No. L229/11-29, Brussels, 1980.
- [6] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, *J. Chromatogr. A* 728 (1996) 325.
- [7] M. Ibáñez, Y. Picó, J. Mañes, *Chromatographia* 45 (1997) 402.
- [8] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 946 (2002) 275.
- [9] O. Núñez, J.B. Kim, E. Moyano, M.T. Galceran, S. Terabe, *J. Chromatogr. A* 961 (2002) 65.
- [10] M.T. Galceran, M.C. Carneiro, M. Díez, L. Puignou, *J. Chromatogr. A* 782 (1997) 289.
- [11] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 145.
- [12] M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi, *Anal. Sci.* 16 (2000) 707.
- [13] M. Yoshida, T. Watabiki, T. Tokiyasu, N. Ishida, *J. Chromatogr.* 628 (1993) 235.
- [14] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *Chromatographia* 53 (2001) 273.
- [15] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 441.
- [16] J.C. Marr, J.B. King, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 479.
- [17] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 914 (2001) 111.
- [18] C.S. Evans, J.R. Startin, D.M. Goodall, B.J. Keely, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 699.
- [19] D. Wycherley, M.E. Rose, K. Giles, T.M. Hutton, D.A. Rimmer, *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 339.
- [20] X.B. Song, W.L. Budde, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 981.
- [21] E. Moyano, D.E. Games, M.T. Galceran, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1379.
- [22] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 243.
- [23] J.R. Startin, S.J. Hird, M.D. Sykes, J.C. Taylor, A.R.C. Hill, *Analyst* 124 (1999) 1011.
- [24] R. Castro, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Aoac Int.* 84 (2001) 1903.

- [25] C.S. Evans, J.R. Startin, D.M. Goodall, B.J. Keely, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 112.
- [26] H.G.J. Mol, R.C.J. Vandam, R.J. Vreeken, O.M. Steijger, *J. Aoac Int.* 83 (2000) 742.
- [27] J. Hau, S. Riediker, N. Varga, R.H. Stadler, *J. Chromatogr. A* 878 (2000) 77.
- [28] Guilhaus M. *Time-of-flight Mass Spectrometry for the New Millenium*, In *Advances in Mass Spectrometry, Volume 15*, Gelpi E (ed). John Wiley; New York 2001; 19.
- [29] P. Cao, M. Moini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12 (1998) 864.
- [30] O. Núñez, E. Moyano, M.T. Galceran, *J. Mass. Spectrom.* (submitted) (2003)
- [31] I. Bobeldijk, J.P.C. Vissers, G. Kearney, H. Major, J.A. van Leerdam, *J. Chromatogr. A* 929 (2001) 63.
- [32] M.W.F. Nielen, J.P.C. Vissers, R.E.M. Fuchs, J.W. van Velde, A. Lommen, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 1577.
- [33] J.C. Wolff, C. Eckers, A.B. Sage, K. Giles, R. Bateman, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2605.
- [34] I.M. Lazar, M.L. Lee, *J. Microcolumn. Sep.* 11 (1999) 117.
- [35] Y. Cheng, D.M. Hercules, *J. Amer. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 590.
- [36] J. Horak, W. Werther, E.R. Schmid, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 241.

4.2.3. Discusión de resultados

En los trabajos desarrollados en nuestro grupo de investigación relacionados con la determinación de cuats mediante LC-MS se observó que con la fuente de ionización *electrospray* en configuración *on-axis* se producía una disminución de la señal de los compuestos cuando coeluían de dos de ellos debido a un efecto de supresión de la ionización que ejercía uno sobre el otro (Castro *et al.* 1999), lo que obligaba a trabajar en unas condiciones cromatográficas tales que permitieran una buena separación de los herbicidas. A fin de averiguar si este fenómeno también ocurría con las fuentes de *electrospray* utilizadas en esta memoria se procedió a inyectar los compuestos individualmente y en mezclas. En la Figura 4.5 se presentan las señales obtenidas para aquellas parejas de herbicidas que suelen presentar problemas de coelución, PQ/DQ y CQ/MQ, en las dos fuentes de *electrospray*: (a) la fuente TurboIonspray y (b) la fuente Z-spray, cuando los analitos son inyectados individualmente o en mezclas. Como puede observarse y a diferencia de lo ocurrido con la fuente de *electrospray* en configuración *on-axis* del instrumento LCQ, la señal obtenida para los compuestos inyectados individualmente es similar a la señal obtenida para los mismos cuando se inyectan en mezclas binarias con coelución, indicando que ninguna de estas dos fuentes de *electrospray* presenta problemas de supresión de la ionización para los cuats. Este hecho probablemente es debido a la mayor eficacia en la ionización y desolvatación que presentan estas fuentes con respecto a la de la configuración *on-axis* de Thermo-Finnigan.

Utilizando la fuente de *electrospray* en configuración *on-axis* también se observó que la señal de los cuats mejoraba considerablemente al realizar una adición post-columna de acetonitrilo (Castro *et al.*, 1999 y 2001), por lo que también se comprobó si la adición post-columna de acetonitrilo producía una mejora en la señal de los cuats al trabajar con las fuentes de ionización TurboIonspray y Z-spray. En la Figura 4.6, a modo de ejemplo, se muestra la señal obtenida para los herbicidas MQ y DF, el primero y último en eluir de la columna, sin la adición post-columna (Figura 4.6 a) y con una adición post-columna (Figura 4.6 b) de 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ de acetonitrilo. Como puede observarse, la señal obtenida es similar con o sin la adición post-columna de acetonitrilo en ambas fuentes de ionización lo que pone de manifiesto que con estas fuentes no es necesaria la adición post-columna de disolventes orgánicos. Este hecho también está relacionado con la mayor eficacia de ionización y desolvatación de estas fuentes con respecto a la de *electrospray* en configuración *on-axis*.

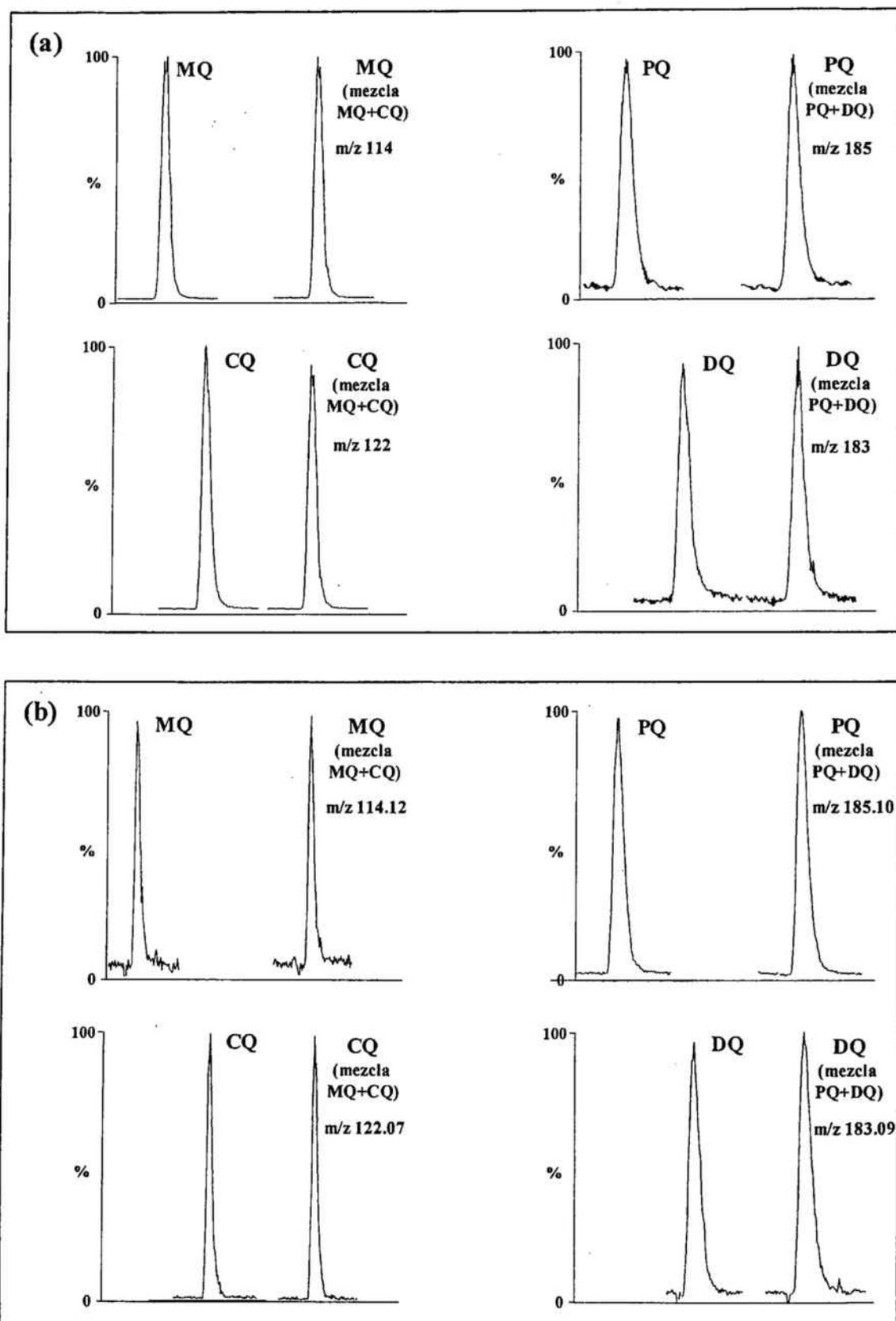


Figura 4.5. Estudio de supresión de la ionización de los cuats en las fuentes de *electrospray* (a) Turbolonspray y (b) Z-spray.

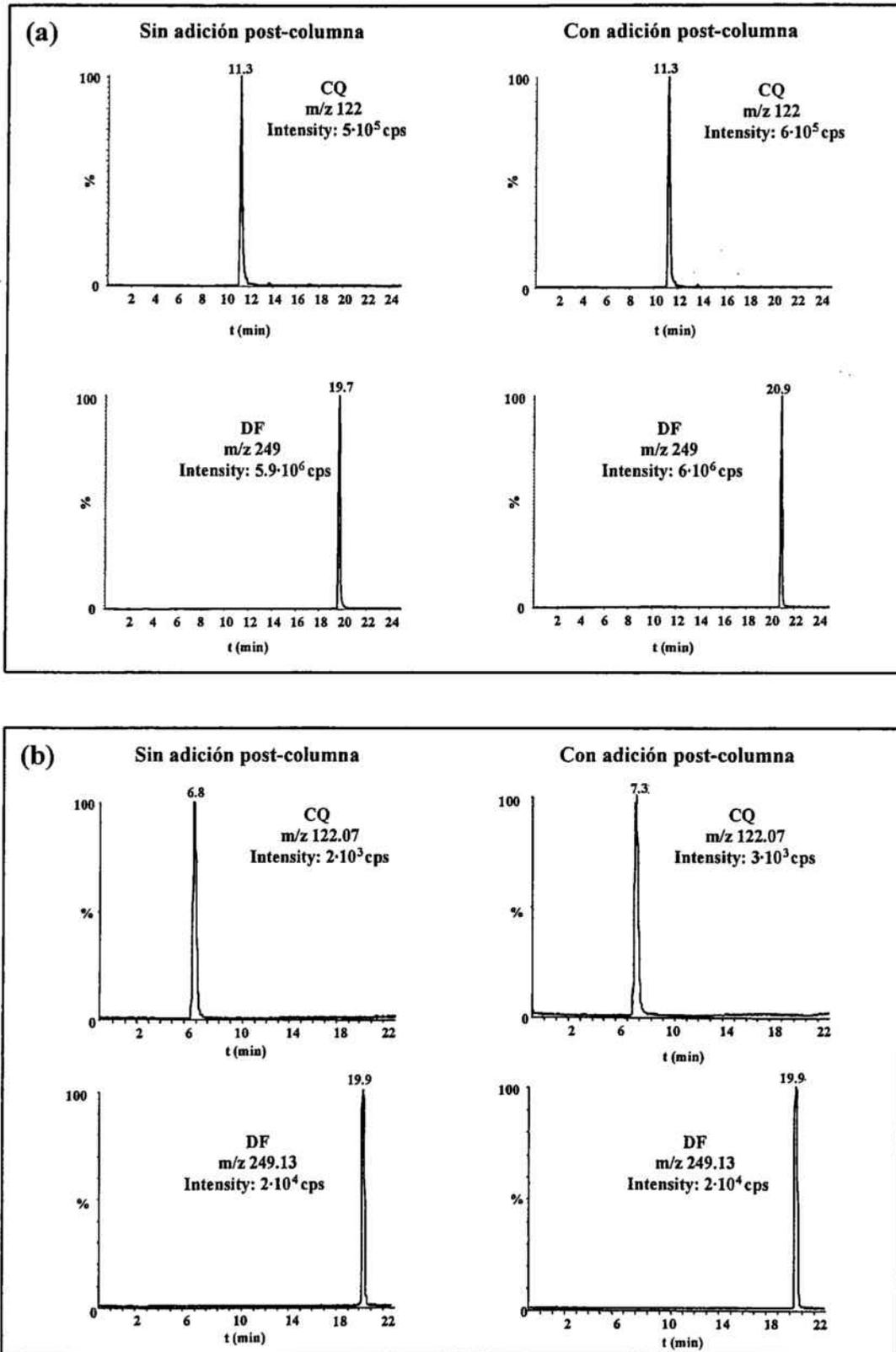


Figura 4.6. Efecto de la adición post-columna de acetonitrilo en la señal de los cuats utilizando las fuentes de *electrospray* (a) TurboIonSpray (adquisición con un analizador de triple cuadrupolo) y (b) Z-spray (adquisición con un analizador de TOF).

Tras la optimización de las condiciones de trabajo para el acoplamiento LC-MS con los dos instrumentos se procedió a automatizar el método de preconcentración *on-line* previamente establecido por Castro *et al.* (Castro *et al.*, 2001b). Sin embargo, en las primeras pruebas se observó un efecto memoria en el sistema Prospekt que obligó a introducir una etapa de limpieza y acondicionamiento entre cada uno de los análisis de las muestras. En la Figura 4.7 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante adquisición en SIM con el instrumento de triple cuadrupolo para la preconcentración de dos blancos de agua Milli-Q. En ambos casos la preconcentración se llevó a cabo tras realizar la preconcentración de una muestra de 10 mL adicionada a un nivel de 2,5 µg/L. En el análisis del primer blanco no se realizó ninguna etapa adicional de limpieza (Figura 4.7 a), es decir se utilizó el método establecido previamente (Castro *et al.*, 2001b), mientras que en el segundo (Figura 4.7 b), tras la preconcentración de la muestra adicionada, se añadió una etapa de limpieza consistente en pasar por el sistema 30 mL de una disolución acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:18:2 v/v) a un caudal de 2 mL/min. Como puede observarse, si no se realiza esta etapa de limpieza aparecen algunos de los cuats en el registro de la muestra blanco (Figura 4.7 a). La preconcentración se realizaba con un cartucho nuevo para cada muestra lo que indica que la aparición de cuats en el blanco se debe a problemas de memoria en el sistema Prospekt. Además, también se comprobó que esta etapa de limpieza era suficiente cuando se trabajaba en modo MRM que es más sensible. Esta etapa de limpieza supone un incremento de 15 min en el tiempo de tratamiento de muestra. Sin embargo, como el tiempo de separación cromatográfica es de unos 30 minutos (teniendo en cuenta el tiempo de estabilización de la columna para un nuevo análisis), mientras tiene lugar la separación cromatográfica se puede llevar a cabo la etapa de limpieza sin alargar significativamente el tiempo total de análisis.

Por lo que hace referencia a los resultados obtenidos, en la Tabla 4.2 se resumen algunos de los parámetros de calidad instrumentales obtenidos para la determinación de los cuats con el acoplamiento LC-MS con los dos analizadores utilizados en este trabajo. Se comparan, además, los límites de detección con los de la trampa de iones (Castro *et al.*, 2001b) así como con los correspondientes al acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas descrito en el capítulo 2. Como se puede observar en esta tabla, los mejores LODs se han obtenido por LC-MS/MS con el triple cuadrupolo en modo de adquisición SRM (valores entre 0,02 y 0,3 µg/L). Los LODs obtenidos con el triple cuadrupolo en modo SIM son del orden de los obtenidos con el TOF en modo de adquisición MS. Ambos métodos, SIM con el triple cuadrupolo y TOF, proporcionan a su vez LODs que vienen a ser similares a los obtenidos mediante LC-MS/MS con la trampa

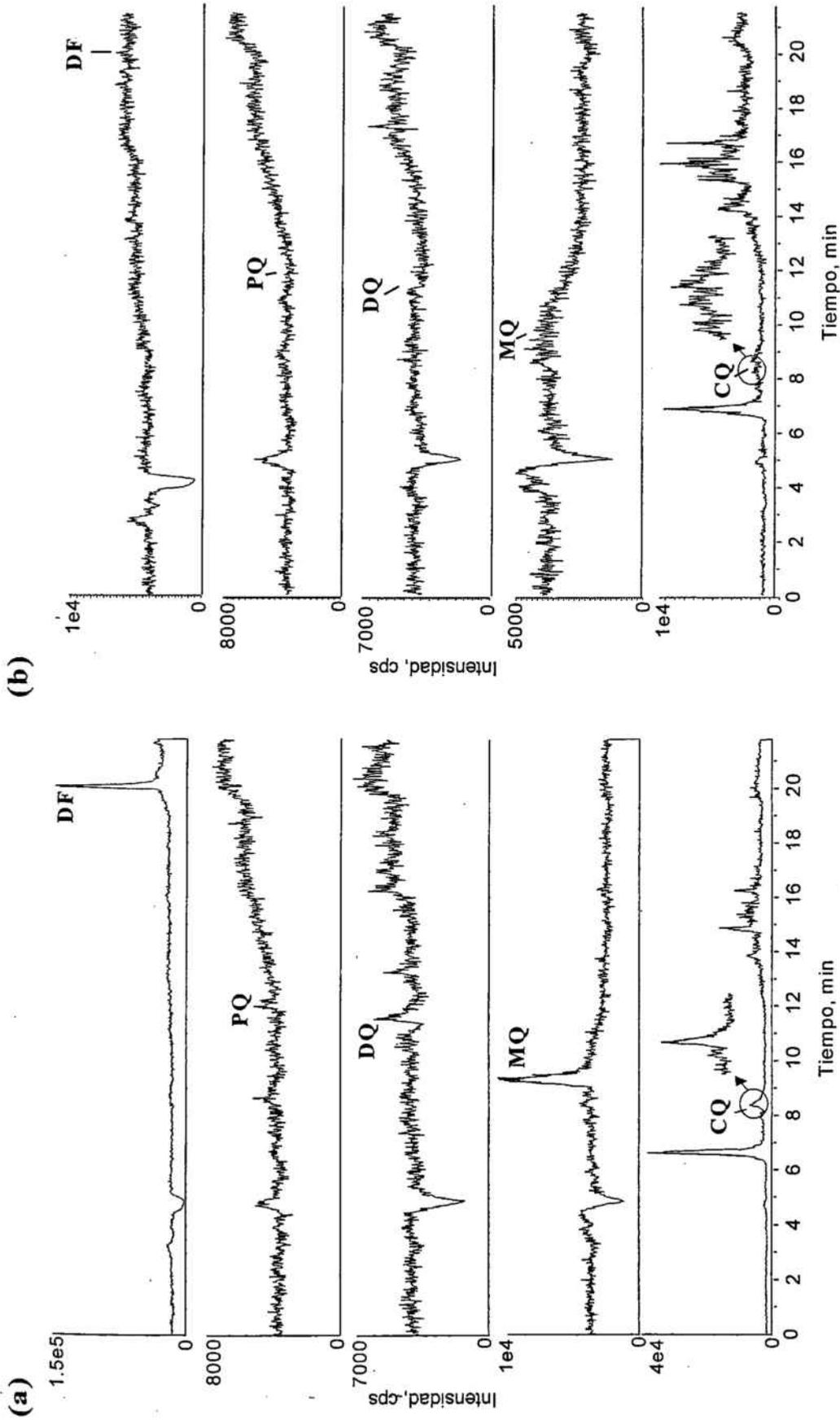


Figura 4.7. Preconcentración de 10 mL de agua Milli-Q no adicionada (muestras blanco). (a) Sin etapa de limpieza del sistema Prospekt, (b) con una etapa de limpieza de 30 mL de una disolución acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:18:2 v/v).

Tabla 4.2. Parámetros de calidad instrumentales (estándares en agua Milli-Q) con los diferentes métodos LC-MS i CE-MS evaluados para la determinación de cuats.

Cuat	Triple cuadrupolo			TOF			Trampa de iones			
	LC-MS/MS		run-to-run (%RSD, n=5)	LC-MS	run-to-run (%RSD, n=5)	LC-MS*	LC-MS/MS*	CE-MS ^b	CE-MS/MS ^c	
	LODs (µg/L)	SRM	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	LODs (µg/L)	
PQ	7	0,2	6	8,6	7	25	5	30	10	1
DQ	3	0,3	7	3,4	8	15	1	30	8	10
CQ	0,3	0,05	3	2,6	4	10	1	8	8	1
MQ	0,3	0,05	2	9,0	5	5	0,5	8	9	1
DF	0,1	0,02	5	0,2	5	1	<0,1	8	13	1

^a Castro *et al.*, 2001b

^b Inyección electrocinética (10 s, 10 kV)

^c Inyección electrocinética (20 s, 10 kV)

de iones. Sin embargo, con este último instrumento no se pueden mejorar los valores obtenidos en modo de adquisición SRM. Si comparamos estos resultados con los del acoplamiento CE-MS, en general, los LODs con LC-MS son mejores. Sin embargo, la inyección electrocinética CE-MS/MS proporciona LODs que, en algunos casos son ligeramente mejores a los obtenidos por LC-MS tanto con el TOF como con la trampa de iones. Sin embargo, y de nuevo, no son capaces de superar la sensibilidad proporcionada por el triple cuadrupolo especialmente en modo SRM.

Con respecto a la repetitividad, podemos ver que ambos instrumentos, triple cuadrupolo y TOF, presentan valores de RSDs muy similares, que van desde un 2% a un 8%. Estos valores son ligeramente mejores que los obtenidos para CE-MS, aunque hay que tener en cuenta que los valores mostrados en la Tabla 4.2 se han obtenido con inyección electrocinética que, como ya se ha comentado en el capítulo 2 de esta memoria, suele estar caracterizada por una peor repetitividad que la inyección hidrodinámica. Con esta última, los valores de RSDs obtenidos (entre 2-5%) son similares a los descritos para LC-MS.

A fin de evaluar los parámetros de calidad del método de preconcentración automatizado mediante el sistema Prospekt, en la Tabla 4.3 se muestran los límites de detección en agua Milli-Q y en agua potable, así como los valores de RSD obtenidos para la repetitividad, de los tres métodos de preconcentración *on-line* estudiados: los dos automatizados utilizando los analizadores de triple cuadrupolo y de tiempo de vuelo y el método no automatizado utilizando un analizador de trampa de iones.

Como se puede observar en la Tabla 4.3, todos los métodos proporcionan límites de detección inferiores a 100 ng/L utilizando patrones en agua Milli-Q. Sin embargo, los mejores LODs se obtienen utilizando el analizador de triple cuadrupolo en tándem en modo de adquisición SRM, encontrándose valores inferiores a 1 ng/L para todos los cuats, los cuales son, además, entre 3 y 20 veces inferiores a los obtenidos con el mismo analizador utilizando el modo de adquisición SIM. En resumen podemos decir que la aplicación del método de preconcentración *on-line* con los analizadores de triple cuadrupolo y tiempo de vuelo proporcionan, por lo general, límites de detección similares (TOF) o mejores (triple cuadrupolo) a los obtenidos con la trampa de iones. Cabe comentar, sin embargo, que en aguas potables los límites de detección aumentan considerablemente. Así, los valores obtenidos con el triple cuadrupolo en modo SRM son similares a los obtenidos con SIM para agua Milli-Q, aunque para todos los compuestos los valores obtenidos son inferiores al legislado por la UE (100 ng/L). Con el TOF, los valores son superiores excepto para el DF, aunque en matrices más limpias como, por ejemplo, en aguas subterráneas son tan solo ligeramente superiores a 100 ng/L.

Tabla 4.3. Límites de detección y repetitividad de los métodos de preconcentración *on-line* acoplados a LC-MS.

Cuat	SPE(Prospekt)-LC-MS/MS		SPE(Prospekt)-LC-MS		SPE-LC-MS/MS				
	Triple cuadrupolo		TOF		Trampa de iones ^a				
	Agua Milli-Q	Agua potable	Agua Milli-Q	Agua potable	Agua Milli-Q	Agua Milli-Q			
LODs (ng/L)	run-to-run (%RSD, n=5)	LODs (ng/L)	LODs (ng/L)	run-to-run (%RSD, n=5)	LODs (ng/L)	run-to-run (%RSD, n=6)			
SIM	SRM								
PQ	40	2	7	60	20	8	500	30	8
DQ	10	1	8	3	10	9	800	30	9
ĈQ	3	0,8	6	4	10	8	700	20	9
MQ	2	0,7	7	2	20	5	600	10	9
DF	1	0,1	8	0,7	3	7	70	40	11

^a Castro *et al.*, 2001b

Con respecto a la repetitividad, podemos ver en la Tabla 4.2 que los valores de las RSDs obtenidos con los tres analizadores son muy buenos, obteniéndose siempre valores inferiores al 11%. Además, parece observarse una ligera mejora en las RSDs debido a la automatización del método con el sistema Prospekt, obteniéndose valores de RSD entre 5-9% frente a valores de RSD entre 8-11% para el método de preconcentración *on-line* sin automatizar.

A fin de comparar los métodos de preconcentración propuestos en este capítulo con algunos de los descritos recientemente en la literatura se incluyen en la Tabla 4.4 algunas de las características de los mismos. A partir de los resultados expuestos en esta tabla podemos concluir que el método SPE(Prospekt)-LC-MS/MS (Método 1 en la Tabla 4.4) que proponemos en este estudio es el que proporciona las mejores características. Así, permite y se ha utilizado para el análisis simultáneo de los cinco herbicidas, proporciona los mejores límites de detección en muestras de agua de bebida (muy inferiores al valor legislado por la UE, de 100 ng/L), presenta una buena repetitividad (inferior a la de otros métodos) y, además, se consiguen estos resultados preconcentrando un volumen de muestra relativamente pequeño (tan solo 30 mL), frente a volúmenes de hasta 200-500 mL que son los que se utilizan en los trabajos que emplean preconcentraciones *off-line*.

Una ventaja importante que presenta el método propuesto en esta memoria frente a otros descritos para la determinación de cuats en muestras de agua es su automatización. Al estar completamente automatizado se pueden procesar un elevado número de muestras al día, sin necesidad de aumentar el horario de trabajo de los técnicos y, además, se garantiza que todas las muestras han sido procesadas siguiendo exactamente el mismo procedimiento, lo que disminuye las fuentes de error en los resultados.

Tabla 4.4. Métodos de preconcentración con LC-MS para la determinación de cuats en muestras de agua.

Característica	Método 1	Método 2	Taguchi et al., 1998	Castro et al., 2000	Castro et al., 2001b	Grey et al., 2002
Tipo de preconcentración	<i>on-line</i> automatizado	<i>on-line</i> automatizado	<i>off-line</i>	<i>on-line</i> no automatizado	<i>on-line</i> no automatizado	<i>off-line</i>
Tipo de cartucho	Polimérico	Polimérico	Envi-8 DSK	C8	Polimérico	C18
Volumen de muestra preconcentrado	30 mL	30 mL	500 mL	50 mL	30 mL	200 mL
Técnica de análisis	LC-MS/MS (SRM)	LC-MS	LC-MS	LC-MS	LC-MS/MS	LC-MS (SIM)
Analizador	triple cuadrupolo	TOF	sector magnético	trampa de iones	trampa de iones	Cuadrupolo
LODs en Aguas (ng/L)	0,3-60	8-800	100-200	5-60 (Agua Milli-Q)	10-40 (Agua Milli-Q)	100-200
Repetitividad (RSDs)	6-8%	5-9%	12-14%	7-13%	8-11%	5-7%
Cuats analizados	Todos	Todos	PQ y DQ	Todos	Todos	PQ y DQ

Método 1: SPE(Prospekt)-LC-MS/MS con el triple cuadrupolo.

Método 2: SPE(Prospekt)-LC-MS con el TOF.

4.3. DETERMINACIÓN DE CLORURO DE BENZALCONIO Y DDMAC POR LC-MS

4.3.1. Introducción

Tal como se ha descrito en la introducción de esta memoria, la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar, ambas con detección UV, se han utilizado con frecuencia para la determinación de cloruro de benzalconio (BAC) en diversas matrices. Estas metodologías, no obstante, no han podido ser utilizadas para el análisis del cloruro de didecildimetilamonio (DDMAC) ya que este compuesto carece de grupos cromóforos. El acoplamiento tanto de la cromatografía de líquidos como de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas se presenta, por tanto, como una técnica ideal para el análisis de estos compuestos con el objetivo de disponer de métodos más selectivos y sensibles. Recientemente se ha empezado a utilizar el acoplamiento LC-MS para el análisis de los homólogos del BAC en muestras medioambientales como aguas, sedimentos y fangos residuales, ya que los niveles de concentración son muy bajos y las matrices de las muestras son mucho más complejas que las de los productos oftálmicos y nasales en los que normalmente se han analizado estos compuestos. En estos casos se utiliza, en general, la cromatografía de líquidos con detección UV ya que las concentraciones son elevadas y las matrices acuosas son sencillas.

En la Tabla 4.5 se resumen los principales métodos descritos en la literatura que utilizan el acoplamiento LC-MS para el análisis de esta familia de compuestos. Como se puede observar, la separación cromatográfica se suele llevar a cabo en fase invertida con formación de pares iónicos utilizando columnas de fases enlazadas C₈, C₁₈ o ciano. En todos los casos se emplean fases móviles con tampones de ácido fórmico-formiato de amonio y un gradiente con acetonitrilo o metanol como modificador orgánico.

Por lo que respecta a los espectrómetros de masas utilizados, en todos los casos se ha empleado el *electrospray* como fuente de ionización ya que el carácter iónico de estas sustancias hace que esta fuente sea la más adecuada. Además, debido al alto contenido en modificador orgánico que se utiliza en las separaciones cromatográficas no es necesaria la adición post-columna de un disolvente orgánico para modificar la composición del eluyente cromatográfico con el objetivo de favorecer el proceso de evaporación iónica en el *espray*.

El tipo de analizador empleado en las diferentes aplicaciones es tanto la trampa de iones (Ferrer y Furlong, 2001 y 2002; Merino *et al.*, 2003) como el triple cuadrupolo (Ford

Tabla 4.5. Métodos para la determinación de cloruro de benzalconio por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

Homólogos	Muestra	Procedimiento		Interfase	Analizador	Detección	LOD	Ref.
		Tipo / Columna	Fase Móvil					
C12 C14 C16	Agua piscina, desinfectantes	Formación pares iónicos / Hypersil CN (125x4 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : tampón ác. fórmico/formiato de amonio 100 mM pH 3,7 (55:45 v/v) 1 mL/min ^a	<i>Electrospray</i>	Triple cuadrupolo	MS	3-4 µg/L	Ford <i>et al.</i> , 2002
C12 C14	Agua	Formación pares iónicos / Phenomenex RP18 (250x3 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : tampón formiato de amonio 10 mM (1:1), gradiente con acetonitrilo 0,6 mL/min	<i>Electrospray</i>	Trampa de iones	MS	3-5 ng/L ^b	Ferrer y Furlong, 2001
C12 C14 C16 C18	Sedimentos	Formación pares iónicos / Phenomenex RP18 (250x3 mm d.i., 5 µm)	Acetonitrilo : tampón formiato de amonio 10 mM (1:1), gradiente con acetonitrilo 0,6 mL/min	<i>Electrospray</i>	Trampa de iones	MS/MS	0,16-0,2 µg/Kg ^c	Ferrer y Furlong, 2002
C12 C14	Fangos de depuradora	Formación pares iónicos / Nova Pack C ₈ (150x3,9 mm d.i., 5 µm)	Tampón formiato de amonio 50 mM (pH 3,5), gradiente con metanol 0,8 mL/min	<i>Electrospray</i>	Trampa de iones	MS	2 µg/Kg	Merino <i>et al.</i> , 2003

^a Con split para reducir flujo a 100 µL/min

^b Con preconcentración *on-line* de 50 mL de agua utilizando cartuchos poliméricos de fase invertida (PLRPs).

^c Con preconcentración *on-line* de 50 mL de un extracto líquido de sedimento (obtenida mediante *Accelerated Solvent Extraction*) utilizando cartuchos poliméricos de fase invertida (PLRPs).

et al., 2002). Sin embargo, a pesar de que ambos instrumentos ofrecen la posibilidad de llevar a cabo las determinaciones utilizando espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), en general tan sólo se ha recurrido a esta herramienta para la confirmación de los analitos.

Por lo que hace referencia a los límites de detección conseguidos cabe señalar que son relativamente bajos. Así, utilizando un instrumento de triple cuadrupolo, pero con adquisición en modo SIM en el primer cuadrupolo, se han alcanzado valores del orden de 3-4 $\mu\text{g/L}$, en muestras de agua de piscina (Ford *et al.*, 2002). No obstante, una preconcentración *on-line* (50 mL de muestra) con cartuchos poliméricos previa al análisis LC-MS con un instrumento de trampa de iones ha permitido analizar los homólogos C₁₂-BAC y C₁₄-BAC en muestras de agua (Ferrer y Furlong, 2001) con límites de detección mucho más bajos (alrededor de 3-5 ng/L). Por otro lado, los límites de detección obtenidos para algunos de los homólogos del BAC en muestras más complejas como son los fangos de depuradora han sido de alrededor de 2 $\mu\text{g/Kg}$ utilizando también un analizador de trampa de iones en modo MS (Merino *et al.*, 2003). En todos estos casos, sólo se ha utilizado MS/MS para confirmar la presencia de los analitos, pero no se ha explotado la selectividad y mejora de la relación señal/ruido que proporciona la espectrometría de masas en tandem para llevar a cabo un análisis cuantitativo, especialmente en el análisis de muestras complejas. Con este último objetivo, tan sólo se ha utilizado en una ocasión para la determinación de los homólogos más importantes del BAC en sedimentos (Ferrer y Furlong, 2002) donde se utiliza una extracción del sedimento mediante ASE (*Accelerated Solvent Extraction*) y la posterior preconcentración *on-line* de 50 mL del extracto, lo que unido a la determinación mediante LC-MS/MS, permite analizar muestras con niveles de concentración del orden de 0,16-0,2 $\mu\text{g/Kg}$.

El DDMAC es un biocida que no presenta grupos cromóforos y, por lo tanto como ya hemos indicado, la espectrometría de masas se presenta como una técnica ideal para su análisis. Sin embargo, no son muchos los trabajos en los que se ha estudiado. Por ejemplo, se ha analizado conjuntamente con el cloruro de benzalconio en muestras de agua de piscina y en muestras de desinfectantes utilizando LC-MS con un analizador de triple cuadrupolo con un límite de detección de 4 $\mu\text{g/L}$ (Ford *et al.*, 2002). De nuevo, el tándem sólo se ha utilizado como método de confirmación. Cabe comentar que ambos compuestos, el BAC y el DDMAC, se fragmentan poco dando espectros de MS/MS sencillos. Algunos autores han estudiado estos espectros MS/MS con el objetivo de encontrar las transiciones más adecuadas para llevar a cabo la cuantificación mediante LC-MS/MS (Ferrer y Furlong, 2001) o bien como método de confirmación (Ford *et al.*, 2002).

De entre las otras técnicas de espectrometría de masas tan sólo se ha utilizado el MALDI-TOF/MS para el análisis de formulaciones de desinfectantes y preparados orales en los que se ha detectado presencia de DDMAC y de algunos homólogos del BAC (Morrow *et al.*, 2001). Sin embargo, en ningún momento se ha utilizado esta técnica con fines cuantitativos.

A diferencia de los cuats, para los que se ha utilizado la electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas (CE-MS) (Moyano *et al.*, 1996; Lazar *et al.*, 1999), en el momento de redactar esta memoria no existe ningún trabajo en el que se haya utilizado esta técnica para la determinación del DDMAC o de alguno de los homólogos del BAC.

Como ya se ha comentado, no son muchos los trabajos publicados que utilizan la determinación de estos biocidas mediante LC-MS y además, la separación cromatográfica casi siempre se ha llevado a cabo en columnas relativamente largas (de 12,5 a 25 cm) lo que ha dado lugar a tiempos de análisis elevados. Por ello, uno de los objetivos que nos hemos propuesto en esta memoria es el desarrollo de un método de análisis rápido, sensible y selectivo para la determinación de esta familia de biocidas y para ello se ha utilizado una columna cromatográfica de 5 cm adecuada para reducir el tiempo de análisis y la detección se ha llevado a cabo acoplando el sistema de cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas utilizando una fuente de *electrospray* y un analizador de trampa de iones que nos permite trabajar en el modo MS/MS para alcanzar una mayor selectividad y sensibilidad.

4.3.2. Trabajo experimental

El desarrollo y la optimización de la metodología basada en LC-MS y LC-MS/MS utilizando un analizador de trampa de iones y una fuente de ionización *electrospray* en configuración on-axis para la determinación de BAC y DDMAC en muestras medioambientales, productos oftálmicos y formulaciones comerciales se encuentra descrito con detalle en la comunicación científica Artículo VII que se incluye en el apartado 4.3.2.2 de esta memoria. Sin embargo, algunos aspectos del desarrollo de este trabajo, como es la optimización de los parámetros de fuente, son sólo comentados de manera superficial en este artículo, por lo que se explican con más detalle en el siguiente apartado. Finalmente se incluye un apartado de discusión de los resultados obtenidos.

4.3.2.1. Optimización de las condiciones de trabajo

Para obtener las condiciones de máxima sensibilidad, se optimizaron cada uno de los parámetros característicos de la fuente como son los caudales de los gases envolvente y auxiliar, la temperatura del capilar (*heated capillary*) y el voltaje del *electrospray*. Para ello se introdujo por infusión a 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ una disolución de DDMAC (5 mg/L) preparada en fase móvil (tampón ácido fórmico/formiato de amonio 50 mM (pH 3,5):acetonitrilo 30:70 v/v) que se mezcló con la misma fase móvil (300 $\mu\text{L}/\text{min}$), mediante una T, antes de introducirse en el espectrómetro de masas. En la Figura 4.8 se muestra como varía la respuesta obtenida para este biocida en función de cada uno de los parámetros. También se estudió el efecto de la adición post-columna de acetonitrilo en la señal del DDMAC, mostrándose la curva obtenida en la Figura 4.8 e.

El aumento del caudal de gas envolvente (Figura 4.8 a) produce un incremento considerable en la señal, siendo máxima cuando éste es de 70 u.a. (unidades arbitrarias) y a partir de este momento empieza a disminuir debido probablemente a que se desestabiliza el *espray* formado pues es un caudal demasiado grande para el flujo de líquido (300 $\mu\text{L}/\text{min}$) procedente del sistema cromatográfico. En cambio, el aumento del caudal de gas auxiliar (Figura 4.8 b) produce tan solo un incremento de alrededor de un 20% en la señal del DDMAC, estabilizándose la señal a partir de un caudal de gas de 20-30 u.a., por lo que se seleccionó un valor de 40 u.a. como caudal óptimo. En el estudio del efecto de la temperatura del *heated capillary* (Figura 4.8 c) se observa un máximo en la señal del DDMAC a 200 °C. El incremento de señal con la temperatura puede explicarse por una mayor desolvatación mientras que la disminución de señal a temperaturas más elevadas podría estar relacionada con problemas de descomposición térmica de los biocidas. En el caso del voltaje de *electrospray* se observó también un máximo de señal a 1 kV (Figura 4.8 d) y a partir de este valor la señal disminuía gradualmente.

También se estudió el efecto en la señal de una adición post-columna de acetonitrilo. Como se puede observar en la curva obtenida (Figura 4.8 e), se produce un aumento de señal de aproximadamente un 20 % al realizar una adición post-columna de 150 $\mu\text{L}/\text{min}$. A partir de este valor, la señal más o menos se estabiliza, por lo que se seleccionó este caudal como óptimo.

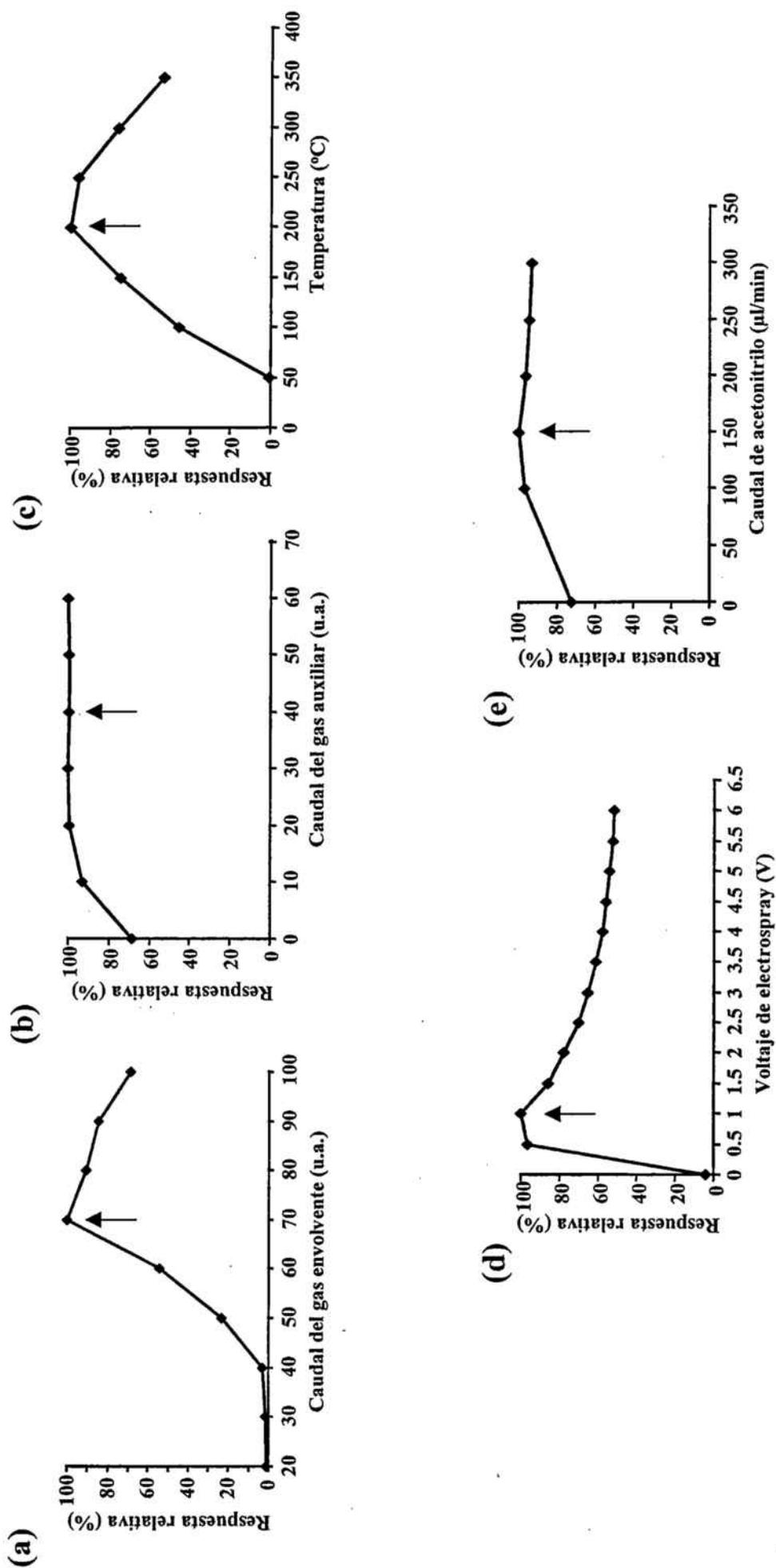


Figura 4.8. Optimización de los parámetros de la fuente de electrospray *on-axis* en la trampa de iones. (a) Caudal del gas envolvente, (b) Caudal del gas auxiliar, (c) Temperatura del capilar (*heated capillary*), (d) Voltaje de electrospray. (e) Efecto de la adición post-columna de acetonitrilo. Parámetros optimizados mediante infusión de una disolución patrón de DDMAC (5 mg/L).

4.3.2.2. Artículo VII

Determination of quaternary ammonium biocides by liquid chromatography-mass spectrometry

O. Núñez, E. Moyano y M.T. Galceran

Journal of Chromatography A (2004) submitted.

Manuscrito enviado a la revista *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A* para su
Publicación

**Determination of Quaternary Ammonium Biocides by Liquid Chromatography-Mass
Spectrometry.**

Oscar Núñez, Encarnación Moyano and Maria Teresa Galceran*
Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona.
Martí i Franquès 1-11, E-08028, Barcelona, Spain.

ABSTRACT

In this study we have developed a method for the direct determination of benzalkonium chloride (BAC) homologues and didecyldimethylammonium chloride (DDMAC), generally used as biocides. The chromatographic separation was performed using a Luna C18 column and gradient elution. A 50 mM formic acid-ammonium formate buffer at pH 3.5 was used as aqueous phase to allow ion-pair formation with the quaternary ammonium biocides. The detection was carried out using an ion trap mass analyser and electrospray ionisation source. Parameters such as the magnitude and duration of the resonant excitation voltage and the magnitude of the trapping RF voltage for full scan tandem mass spectrometry (MS-MS) experiments were studied to establish the optimal experimental conditions. Instrumental quality parameters of both LC-MS and LC-MS-MS methods were studied and good run-to-run and day-to-day precision values (RSDs lower than 11%) and LODs down to $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (LC-MS-MS) were obtained. Finally, the applicability of the LC-MS-MS method was demonstrated by analysis of a spiked water sample and some commercial products containing BAC.

Keywords: Quaternary ammonium biocides; benzalkonium chloride; tandem mass spectrometry

*Author to whom correspondence should be addressed

1. Introduction

Some quaternary ammonium compounds containing at least one long alkyl chain have biocidal properties and are widely used as general fabric softeners, disinfectants, preservatives, pest-control and anti-fouling products. They frequently leak into surface waters from wastewater treatment plants, disturbing the ecological balance due to their toxicity to aquatic organisms [1]. Their fate in the environment is of concern since there is a lack of data on their degradation [2] and some of them are known to be toxic even at low concentrations [3]. The Biocidal Products Directive (BPD) aims to establish a single European market for biocides and to ensure that protection is provided for users as well as for the public and the environment [4]. For these reasons, reliable analytical methods for the determination of quaternary ammonium biocides are required for the effective monitoring of occupational and environmental exposure as well as in the quality control of manufactured products.

Benzalkonium chloride (BAC) is a mixture of alkylbenzyltrimethylammonium chlorides in which the alkyl groups have a chain length from C₈ to C₁₈ [5]. This mixture is widely used as an active substance in anti-bacterial and anti-fungal products, in can preservatives, medical disinfectants and ophthalmic systems [6,7]. The most commonly used homologues are C₁₂-BAC, C₁₄-BAC and C₁₆-BAC. Each homologue possesses different physical, chemical and biocidal properties. In general, the C₁₂-BAC homologue is most effective against yeast

and fungi, the C₁₄-BAC homologue against gram-positive bacteria, and the C₁₆-BAC homologue against gram-negative bacteria [8]. Other quaternary ammonium compounds (QACs), such as dialkyldimethylammonium compounds, are also commonly used as biocides and some manufacturers of hospital disinfectant products have substituted BAC with didecyldimethylammonium chloride (DDMAC).

Due to their cationic character, Liquid Chromatography (LC) and Capillary Electrophoresis (CE) are the techniques most frequently used for the analysis of quaternary ammonium biocides. In this way, BAC has been analysed using LC with UV-detection in ophthalmic solutions [6,9-12] and CE with both direct [13-21] and indirect UV-detection [20,22] using standards or in nasal and ophthalmic solutions. Recently, Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry (LC-MS) has also been applied to the analysis of BAC in several matrices [23-25]. The C₁₂-BAC and C₁₄-BAC homologues have been determined in water samples after preconcentration with on-line solid-phase extraction and using an ion trap analyser but, although MS-MS fragmentation studies were performed, LC-MS-MS was only applied for confirmation [24]. Nevertheless, for the determination of some BAC homologues in sediment samples, accelerated solvent extraction followed by an on-line preconcentration procedure and LC-MS-MS was necessary [25]. The same analyser was also used for the analysis of BAC and other cationic

surfactants in sewage sludge [23]. Moreover, a triple quadrupole instrument was used for the analysis of these compounds in environmental media and occupational hygiene samples by LC-MS, also performing some MS/MS analysis [26].

The DDMAC biocide does not have chromophore groups, making MS the ideal technique for its analysis. Ford et al. [26] determined this compound simultaneously with some BAC homologues in environmental and occupational hygiene samples using a triple quadrupole instrument. The presence of these compounds in oral rinses and disinfectant formulations was also analysed by means of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation-Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOFMS) [27].

The aim of this work was to develop sensitive and rapid LC-MS and LC-MS-MS methods using an electrospray ionisation source and an ion trap analyser for the analysis of BAC homologues and DDMAC in samples such as environmental samples, ophthalmic solutions and formulations.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Benzyltrimethylammonium bromide, benzyltrimethyltetradecylammonium chloride, benzyltrimethylhexadecyl ammonium chloride, N-Benzyl-N,N-dimethyl octadecylammonium chloride hydrate (90%) and didecyltrimethyl ammonium bromide (98%) were obtained from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)

and their structures are given in Figure 1. HPLC-gradient grade acetonitrile and water, formic acid (98-100%), ammonia solution (25%) and Hexadecyltrimethylammonium bromide (used as internal standard) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany).

Stock standard solutions of quaternary ammonium biocides and internal standard (1000 mg L⁻¹) were prepared in acetonitrile. Working solutions and calibration standards were prepared by dilution of the stock standard solutions in mobile phase (acetonitril:50 mM formic acid-ammonium formate, pH 3.5, 40:60 v/v solution).

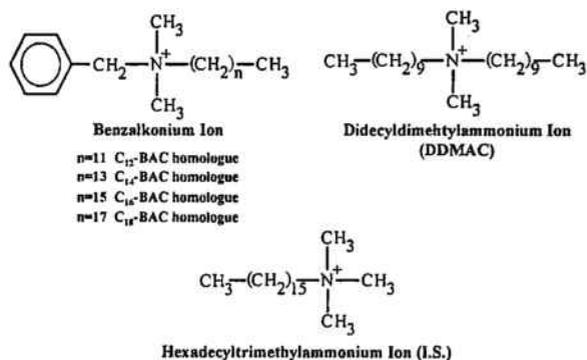


Figure 1. Molecular structures of quaternary ammonium biocides and internal standard.

2.2. Chromatography

Chromatographic separation on a Luna C18 column (50x2.00 mm, 5 μm, Phenomenex) was performed using a Waters 2695 separation module (Milford, MA, USA) equipped with a quaternary solvent delivery system and autosampler. Acetonitrile post-column addition was carried out using an LKB-HPLC Pump 2248

from Pharmacia (Bromma, Sweden) and a Valco stainless-steel T-piece (Supelco, Alcobendas, Spain).

A gradient elution program was used for the separation of quaternary ammonium biocides; solvent A was formic acid-ammonium formate buffer (50 mM, pH 3.5) and solvent B was acetonitrile. The elution program started with an isocratic step of 2 min at 40 % solvent B, a linear gradient from 40 to 70% in 3 min and then a 70% solvent B isocratic step. The flow rate was $300 \mu\text{L min}^{-1}$, the column was maintained at room temperature and the injection volume was $20 \mu\text{L}$. Post-column addition of acetonitrile was carried out at a flow rate of $150 \mu\text{l min}^{-1}$ and a switch valve was used before the mass spectrometer to divert the flow to waste for 1.5 min at the beginning of the chromatogram.

2.3. Mass Spectrometry

Mass spectrometry was carried out using an LCQ Classic (Thermo Electron Corporation, San Jose, CA, USA) equipped with a pneumatically assisted electrospray ionisation (ESI) source and an ion trap analyser, and controlled by Xcalibur vs. 1.3 software. A metallic capillary tube was used as electrospray sample inlet to avoid adsorptions of the biocides on the wall tube. The ESI was pneumatically assisted by nitrogen using a sheath gas flow rate of 70 a.u. (arbitrary units) and an auxiliary gas flow rate of 40 a.u. The heated capillary was held at 200°C . A tube lens offset voltage of 1.0 V and an electrospray voltage of 1.0 kV were used. Single MS data acquisition was

performed in scan mode from m/z 50 to 450 using a maximum injection time of 200 ms and 3 μscans . Moreover, the molecular ion $[\text{M}]^+$ was used as diagnostic ion for quantitation purposes. For LC-MS-MS the chromatogram was segmented in three windows (Table 1) and data acquisition was carried out in product ion scan mode. The m/z range acquired and the MS-MS transitions monitored for quantitation purposes are also given in Table 1. The activation Q (AQ) and the activation time (AT) were set at 0.40 and 30 ms, respectively. Moreover, an isolation width of m/z 1.5 was applied. The normalised collision energy (%NCE) selected for each analyte is also indicated in Table 1. The acquisition was performed with a maximum injection time of 150 ms and 3 μscans . Both single MS and MS-MS data acquisitions were performed in centroid mode.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic separation and optimisation of ESI parameters.

In this work, the separation of quaternary ammonium biocides was carried out by ion-pair liquid chromatography. For this purpose, a volatile formic acid-ammonium formate buffer was used as the aqueous phase, formate being the ion-pair reagent. Although the chromatographic separation of these compounds is not critical, their separation being possible by isocratic elution with a high percentage of organic solvent, some parameters such as buffer concentration and pH were optimised.

Table 1. MS and MS-MS acquisition parameters.

Segment	Time (min)	Analyte	MS m/z ^a	MS-MS product full scan m/z	Diagnostic product ion m/z	Normalised collision energy (NCE, %)
1	0-7.0	C ₁₂ -BAC	304	150-350	212	46
2	7-10.5	C ₁₄ -BAC	332	145-350	240	46
		C ₁₆ -BAC	360	155-400	268	47
		DDMAC	326	140-350	186	55
		I.S.	284	140-350	270	56
3	10.5-15.0	C ₁₈ -BAC	388	170-400	296	48

^a Precursor ion for MS-MS experiments

For this purpose, the buffer concentration was varied from 50 mM to 150 mM and pH values of 3.0, 3.5 and 4.0 were evaluated. In the conditions studied the resolution between the biocides was always good enough to allow baseline separation. However, as the buffer concentration increased, both the analysis time and the peak width also increased. Buffer concentrations lower than 50 mM were also evaluated, but an unstable electrospray was observed. An increase in the pH of the mobile phase produced a slight enhancement in sensitivity because of a decrease in peak width. However, the ionic strength also increased, producing high currents in the electrospray source, and consequently produced a very unstable spray. A buffer solution of 50 mM formic acid-ammonium formate at pH 3.5 provided a stable spray and good sensitivity and chromatographic efficiency. The application of a gradient elution (see experimental section) reduced both the analysis time (to less than 12 min) and peak widths.

The ESI-MS instrument parameters such as sheath gas and auxiliary gas flow rate, the electrospray voltage and the heated capillary temperature were optimised in order to obtain the highest response. For this purpose, a solution of DDMAC (5 mg L^{-1}) was infused at a flow rate of $3 \text{ } \mu\text{L min}^{-1}$ using the syringe pump included in the LCQ Classic instrument, and it was mixed with the mobile phase (70% ACN) by means of a Valco zero dead volume T-piece (Supelco, Alcobendas, Spain). In order to enhance ionic evaporation and to obtain the maximal response, relatively high flow rate values for

sheath and auxiliary gases (70 a.u. and 40 a.u., respectively) were necessary. The maximum signal was also observed when the spray voltage was increased to 1.0 kV; over this value the response decreased with a coincident increase in noise and the occurrence of spark formation. Increases in heated capillary temperature up to $100 \text{ } ^\circ\text{C}$ also enhanced the signal; above this temperature it remained constant. However, due to the relatively high buffer concentration used, a high source temperature was necessary to ensure good evaporation efficiency; thus, $200 \text{ } ^\circ\text{C}$ was chosen as the optimum value.

3.2. Mass spectrometry

The single MS spectra (full scan) of the quaternary ammonium biocides were obtained by infusion under the working conditions previously established. The molecular ion $[\text{M}]^+$ was the base peak in these spectra and no fragmentation or cluster formation was observed. To perform the MS-MS experiments, these molecular ions were used as precursor ions and an isolation width of m/z 1.5 was required to obtain the maximum trapping efficiency without interference from isotopic species or matrix components. To induce fragmentation of the precursor ions, a resonance excitation voltage was applied to the endcap electrodes and the degree of fragmentation was controlled by the magnitude of the trapping radiofrequency (RF) voltage (activation Q, AQ), the normalised collision energy (NCE), and the time of application of these parameters (activation time, AT).

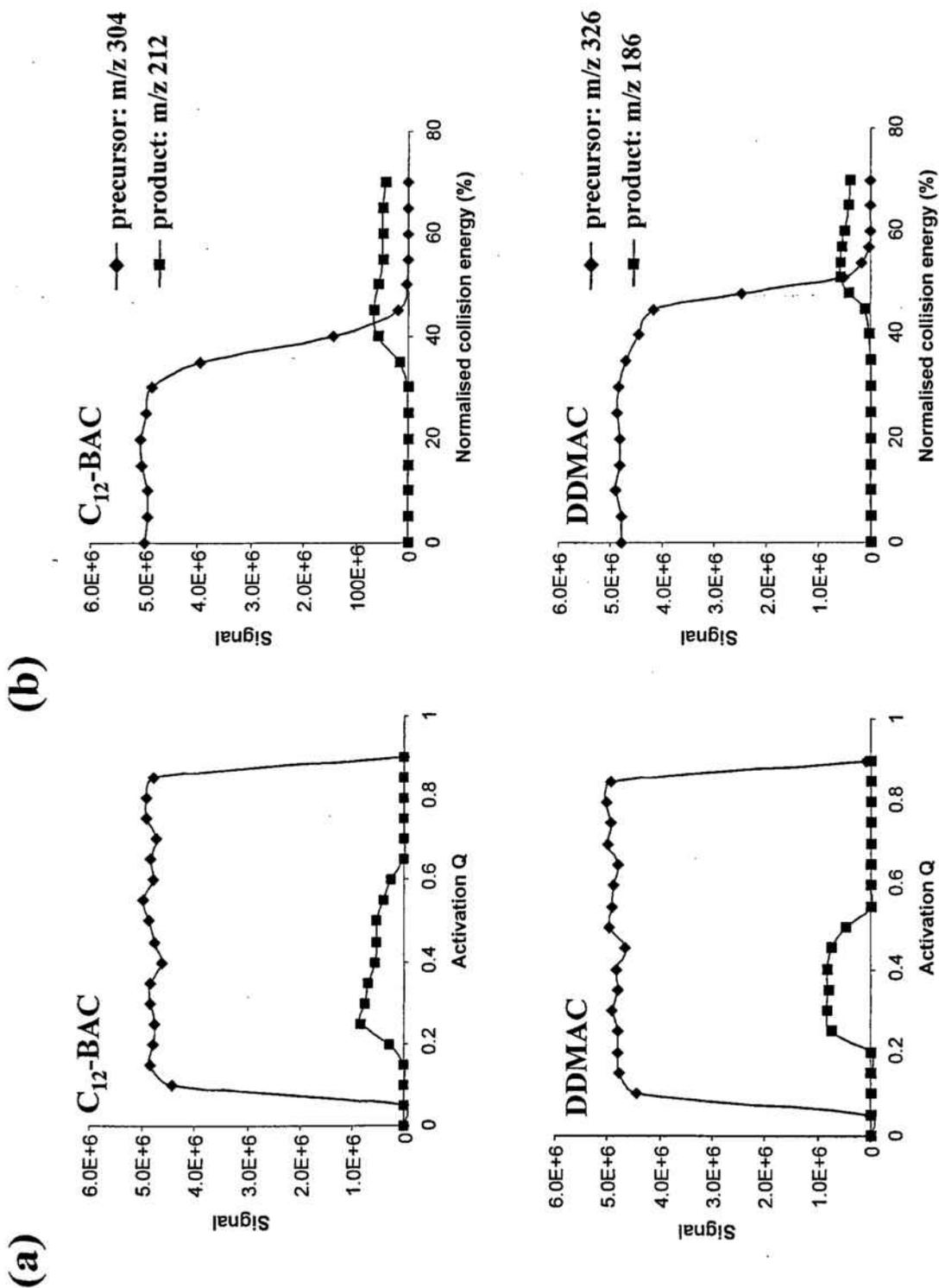


Figure 2. (a) Variation of ion intensities versus AQ for C₁₂-BAC and C₁₄-BAC homologues. (b) Effect of the Normalised Collision Energy on both precursor and product ions for C₁₂-BAC and C₁₄-BAC homologues.

The study of the activation Q voltage allowed the establishment of the stability range for both precursor ion and product ion. As an example, Fig. 2a shows the AQ curves obtained for the C₁₂-BAC homologue and DDMAC. The stability range of the precursor ion was obtained by varying the AQ from 0 to 1, whilst the magnitude of the normalised collision energy was fixed to zero to prevent fragmentation. As expected, a wide stability range was obtained for all the precursor ions. To study the product ion stability range fragmentation is required, so normalised collision energies between 40-50%, depending on the compound, were used. As can be seen from Fig. 2a, the stability range for product ions narrowed with respect to that of the precursor ion. However, for this family of compounds a relatively wide stability range was observed (AQ from 0.25 to 0.6 for BAC homologues and from 0.25 to 0.5 for DDMAC) and as a compromise an AQ value of 0.4 was chosen as optimum for the five herbicides.

The normalised collision energy (NCE) caused fragmentation of the biocides inside the ion trap and its effect was studied. The AQ was set at 0.40, the AT was fixed at 30 ms and the NCE was varied from 0 to 70%. As an example, Fig. 2b shows the curves obtained for the C₁₂-BAC homologue and DDMAC. For each biocide, the NCE value that produced the highest intensity product ion and at least 10% of the precursor ion was chosen as the optimum value (Table 1). For instance, the BAC homologues required an NCE higher than 45%, whilst the DDMAC fragmented at a higher value (55%).

Using the optimised working conditions the MS-MS spectra of the five herbicides were obtained. The fragmentation pattern was very simple and for all the BAC homologues only two fragment ions were observed. The base peak corresponded to the loss of a CH₃C₆H₅ group and this product ion was used as a diagnostic ion for quantitation purposes. The other fragment (*m/z* 91) showed an abundance lower than 20% and corresponded to the tropylium ion. In contrast, the DDMAC biocide only gave one ion (*m/z* 186) due to the loss of a C₁₀H₂₀ group. These results agree with those obtained by other authors [24,26], although for DDMAC other fragments (*m/z* 85, 71 and 57) have also been reported using a triple quadrupole instrument [26]. These ions could be explained by multiple collisions in the triple quadrupole instrument since they only appeared in the MS³ spectrum when working with the ion trap instrument. Fig. 3 shows the multistep fragmentation ion trap spectra for DDMAC.

Fig. 4 shows the chromatogram of a standard solution of biocides (50 µg L⁻¹) obtained by LC-MS-MS under the optimal conditions indicated above. As can be seen, the separation of all the biocides was good enough for their analysis in less than 12 min, but co-elution between the internal standard and the C₁₄-BAC homologue occurred. Nevertheless, as no ionic suppression between the two species was observed, baseline chromatographic separation of both compounds was not required.

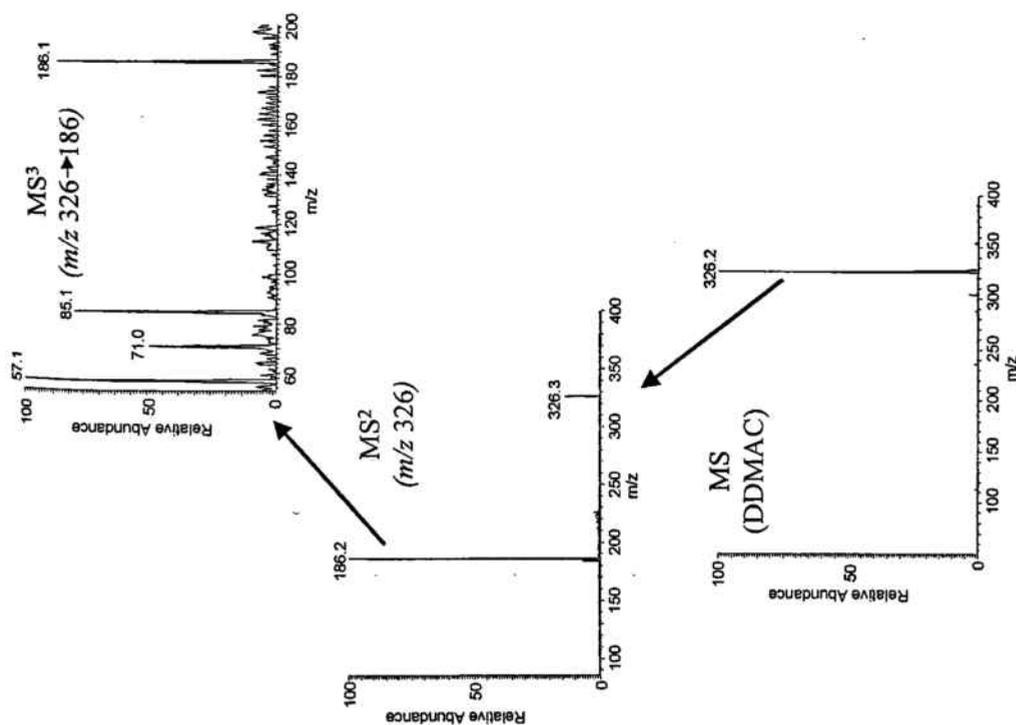


Figure 3. MSⁿ fragmentation for DDMAC biocide.

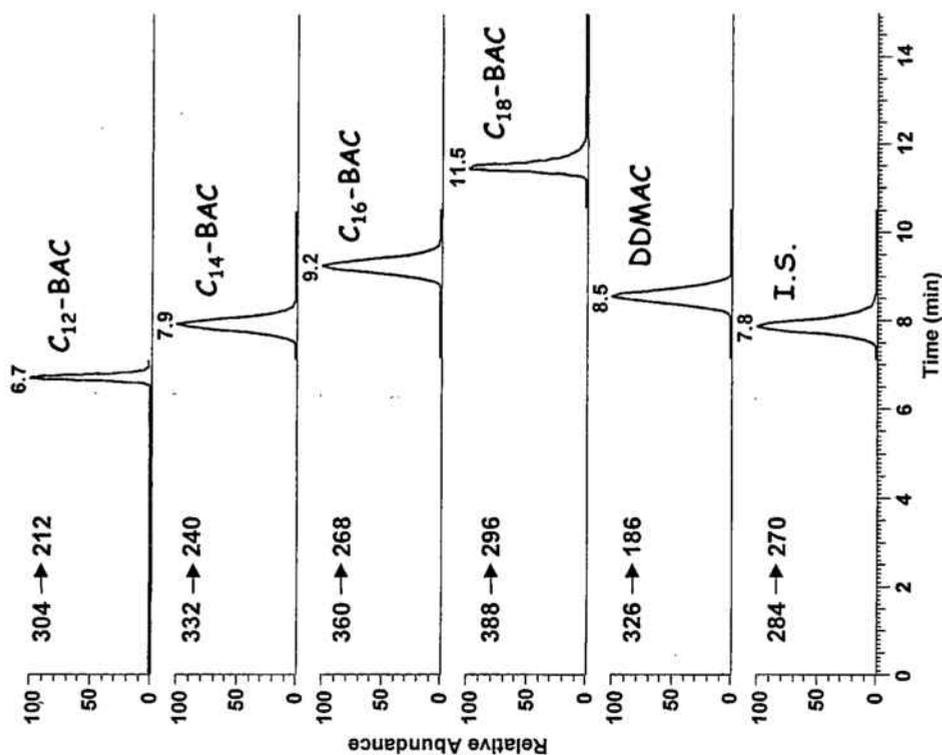


Figure 4. LC-MS-MS chromatogram of quaternary ammonium biocides (standard of 50 µg L⁻¹).

3.3. Instrument quality parameters

Instrument quality parameters such as limits of detection (LODs) and run-to-run and day-to-day precisions were obtained for both LC-MS and LC-MS-MS methods and the figures of merit are provided in Table 2. To obtain the LODs, different standard solutions of the five biocides prepared in Milli-Q water (Millipore, Bedford, MA, USA) were analysed. However, when non-spiked Milli-Q water was analysed, the C₁₂-BAC and C₁₄-BAC homologues were observed. This was due to contamination of the Milli-Q water with BAC as a result of the use of benzalkonium chloride as a disinfectant in the Milli-Q exchange resins and not to a memory effect of the LC-MS system. To overcome this problem, HPLC water from Merck was used for both mobile phase preparation and the determination of the instrument quality parameters. The LODs, based on a signal-to-noise ratio of 3:1, were ca. 1.0 µg L⁻¹ for LC-MS and dropped to 0.01-0.1 µg L⁻¹ with LC-MS-MS. The LC-MS LODs obtained for BAC homologues in this study were between 2 and 4 times lower than those reported by Ford et al. [26] using electrospray and a triple quadrupole instrument. Moreover, these authors did not analyse the C₁₈-BAC homologue. Ferrer and Furlong [24] achieved LODs around 3-5 ng L⁻¹ by LC-MS with an ion trap instrument after an on-line preconcentration of 50 ml of water using PLRPs cartridges. However, they only analysed the C₁₂-BAC and C₁₄-BAC homologues and identified the presence of the C₁₆-BAC homologue in some

environmental samples. In addition, both studies [24,26] used LC-MS-MS for identification but not for quantitation purposes.

Calibration curves based on the peak area ratio ($A_{\text{compound}}/A_{\text{internal standard}}$) for the five biocides at concentrations between 20 and 250 µg L⁻¹ for the LC-MS method and between 5 and 100 µg L⁻¹ for the LC-MS-MS method showed acceptable linearity ($r^2 > 0.996$ and $r^2 > 0.993$ for LC-MS and LC-MS-MS, respectively). Five replicate determinations of a standard solution that contained the five biocides at a concentration level of ~50 µg L⁻¹ for LC-MS and ~30 µg L⁻¹ for LC-MS-MS method were carried out under the optimised conditions to determine run-to-run reproducibility. The relative standard deviations (RSDs) based on concentration ranged from 1.5 to 2.0% for LC-MS and were slightly higher for LC-MS-MS (4.3 to 5.5%). The day-to-day reproducibility was calculated from 15 replicate determinations of the same standard solutions mentioned above, performed on three different days (five replicates each day). The RSD values based on concentration ranged from 2.0 to 4.3% (LC-MS) and from 7.0 to 10.7% (LC-MS-MS), only slightly higher than those for the run-to-run precision. Moreover, the comparison of the calculated concentration of the replicates with the target value provided low relative errors ranging from 0.8 to 6.8% for LC-MS and 0.2 to 7.8% for LC-MS-MS.

3.3. Application

To assess the applicability of the LC-MS-MS method (which provided the lowest LODs) a spiked river water sample and some commercial samples (an ophthalmic solution and a BAC standard) were analysed. Fig. 5a shows the LC-MS-MS chromatogram of a spiked river water sample at a concentration level of $\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$, which is close to the values found in some environmental water samples [24]. LODs were estimated using a river water sample free of BAC and ranged from 0.05 to $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ (Table 3); the values were similar to those obtained with standards. Moreover, these values are more than 10 times lower than the lowest concentration found in environmental samples ($1\text{--}30 \mu\text{g L}^{-1}$) [24], allowing direct analysis without on-line preconcentration. Analysis of the spiked river water samples was performed in triplicate by external calibration using hexadecyltrimethylammonium ion as internal standard and both target values and calculated values are given in Table 3. As can be seen, low relative errors, from 1.0 to 5%, were obtained.

The LC-MS-MS method was also applied to the analysis of two commercial products containing BAC, an ophthalmic solution (Liquifilm Lagrimas, Allergan, Madrid, Spain) containing 50 mg L^{-1} of benzalkonium chloride, and a BAC standard from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Fig. 5b shows the LC-MS-MS chromatogram of the ophthalmic solution (diluted 1:1000) and the MS-MS spectra of the identified compounds. As can be seen,

only the C_{12} -BAC and C_{14} -BAC homologues were found. These two homologues are the most frequently used in this kind of sample. The ophthalmic sample was quantified by external calibration ($n=3$) and the concentrations found were 32.3 ± 0.5 and 16.6 ± 0.9 for the C_{12} -BAC and C_{14} -BAC homologues, respectively, (confidence interval using a $t_{\text{student}}(95\%)$ value of 4.3). The RSDs obtained for the three determinations were 0.74% and 2.49% for the C_{12} -BAC and C_{14} -BAC homologues, respectively. The commercial BAC standard was analysed in order to obtain the relative composition of each homologue in the sample. For this purpose, a normalization method with response factors to correct peak areas was used. Three replicate determinations of ca. $20 \mu\text{g L}^{-1}$ of BAC were analysed by LC-MS-MS, obtaining the following results: C_{12} -BAC, 64.9%; C_{14} -BAC, 28.8%; C_{16} -BAC, 3.8% and C_{18} -BAC, 2.5% (RSDs of 1.7, 2.1, 1.9 and 1.6%, respectively).

4. Conclusions

LC-MS and LC-MS-MS methods using an electrospray ionisation source and an ion trap analyser have been developed for the analysis of biocides such as benzalkonium chloride (BAC) homologues and didyldimethylammonium chloride (DDMAC). The LC-MS-MS method provided LODs in the low ppb range with a very good linearity and good run-to-run and day-to-day precisions. The analysis of control samples provided satisfactory results with bias lower than 8% when compared

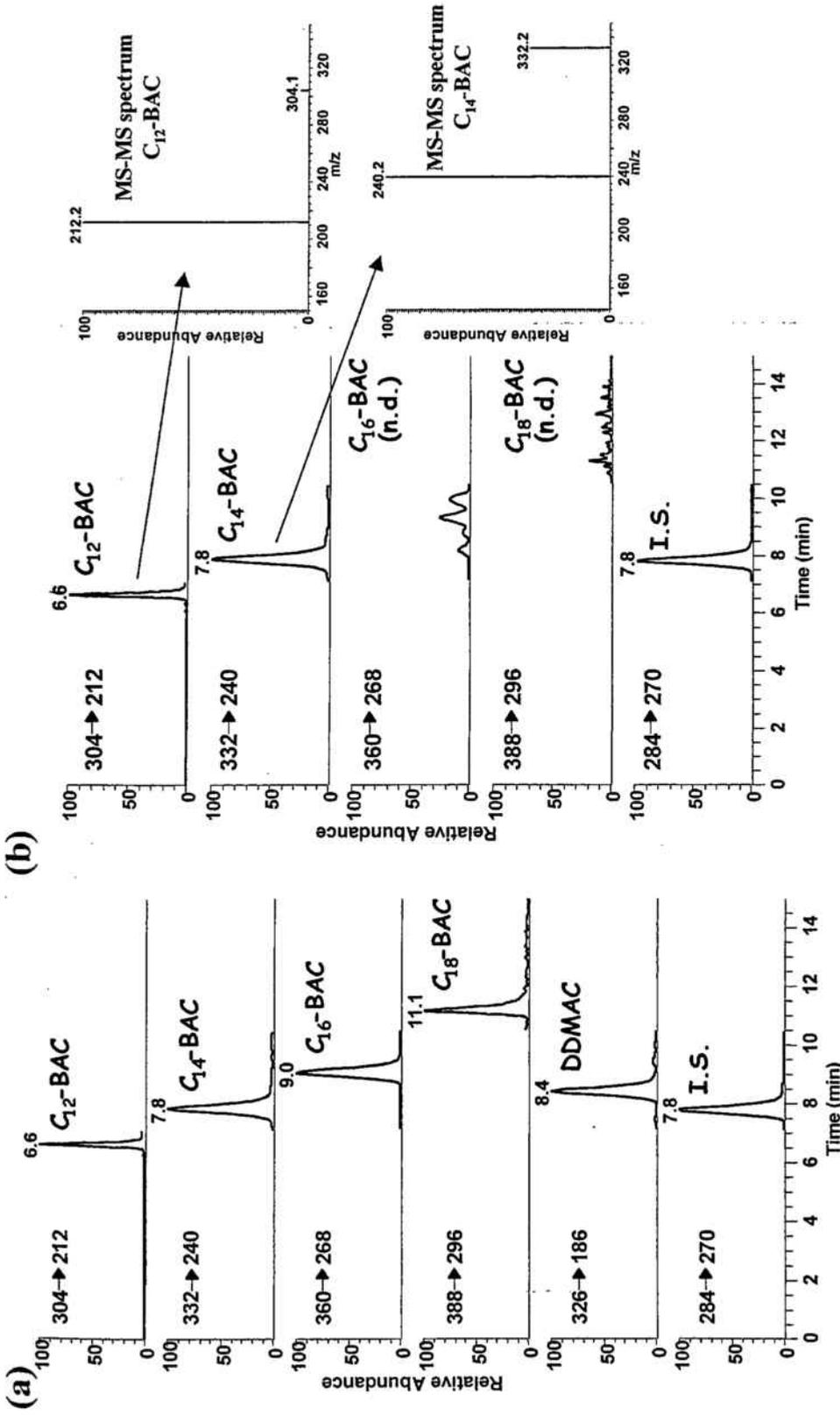


Figure 5. LC-MS-MS chromatograms of (a) a spiked river water sample ($\sim 10 \mu\text{g L}^{-1}$) for each biocide and (b) an ophthalmic solution containing 50 mg L^{-1} of BAC (diluted 1:1000). MS-MS spectra are shown for the identified homologues.

with target values. The LC-MS-MS method was applied to the analysis of a spiked river water sample, an ophthalmic solution and a commercial product, and the results achieved showed that the method could be applied to the fast identification and determination of quaternary ammonium biocides in these kinds of environmental and pharmaceutical samples.

Acknowledgements

This work was supported by the *Ministerio de Ciencia y Tecnología* of Spain and FEDER (project no. REN2003-02692/MAR). Oscar Núñez thanks the *Generalitat de Catalunya* for a grant (*Beca predoctoral per a la formació de personal investigador, FI*).

References

- [1] R.M.E. Richards, D.K.L. Xing, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 1218.
- [2] J.S. Matthew, N.J. Malcolm, *Biochim. Biophys. Acta* 1508 (2000) 235.
- [3] J. Sánchez-Leal, J.J. González, K.L.E. Kaiser, V.S. Palabrica, F. Comelles, M.T. Garcia, *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 22 (1994) 13.
- [4] Directive 98/8/EC Of the European Parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market, No. L123, 24 April 1998.
- [5] Merck. Merck index, 13th ed. Whitehouse station: Merck Research Laboratories, 2001. p. 1060.
- [6] A. Gomez-Gomar, M.M. Gonzalez-Aubert, J. Garces-Torrents, J. Costa-Segarra, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 8 (1990) 871.
- [7] G. Ambrus, L.T. Takahashi, P.A. Marty, *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 174.
- [8] J.J. Merianos, in: S.S. Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lea and Kebiger, Pittsburg, PA, 1991, p. 225.
- [9] G. Parhizkari, G. Delker, R.B. Miller, C. Chen, *Chromatographia* 40 (1995) 155.
- [10] G. Parhizkari, R.B. Miller, C. Chen, *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 553.
- [11] T.Y. Fan, G.M. Wall, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 1172.
- [12] R.B. Miller, C. Chen, C.H. Sherwood, *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3801.
- [13] J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, J.C. Diez-Masa, A. Cifuentes, *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 423.
- [14] M. Jimidar, I. Beyns, R. Rome, R. Peeters, G. Musch, *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 128.
- [15] C.E. Lin, W.C. Chiou, W.C. Lin, *J. Chromatogr. A* 722 (1996) 345.
- [16] J.M. Herrero-Martínez, E.F. Simó-Alfonso, C. Mongay-Fernández, G. Ramis-Ramos, *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 227.
- [17] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 500.
- [18] S.J. Prince, H.J. Mclaury, L.V. Allen, P. Mclaury, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 19 (1999) 877.
- [19] R.B. Taylor, S. Toasaksiri, R.G. Reid, *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 335.
- [20] C.S. Weiss, J.S. Hazlett, M.H. Datta, M.H. Danzer, *J. Chromatogr.* 608 (1992) 325.

[21] K.D. Altria, J. Elgey, J.S. Howells, J. Chromatogr. B 686 (1996) 111.

[22] K. Heinig, C. Vogt, G. Werner, J. Chromatogr. A 781 (1997) 17.

[23] F. Merino, S. Rubio, D. Pérez-Bendito, J. Chromatogr. A 998 (2003) 143.

[24] I. Ferrer, E.T. Furlong, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 2583.

[25] I. Ferrer, E.T. Furlong, Anal. Chem. 74 (2002) 1275.

[26] M.J. Ford, L.W. Tetler, J. White, D. Rimmer, J. Chromatogr. A 952 (2002) 165.

[27] A.P. Morrow, O.O. Kassim Folahan, O. Ayorinde, Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 15 (2001) 767.

4.3.3. Discusión de resultados

Durante el desarrollo de esta metodología para el análisis de los biocidas se observó que al realizar el análisis de blancos (agua Milli-Q no adicionada), éstos contenían algunos de los homólogos del BAC y se comprobó que no provenían de efectos de memoria atribuibles al sistema cromatográfico sino al hecho de que el agua Milli-Q utilizada contenía estos compuestos. Esto es posible debido a que para la conservación de las resinas de intercambio iónico del sistema purificador de agua utilizado (Elix 3 acoplado a un sistema Milli-Q de Millipore) se utiliza cloruro de benzalcónio como desinfectante. Este hecho obligó a la utilización de un agua libre de BAC como es el agua de grado HPLC de Merck. En la Figura 4.9 se muestran a modo de ejemplo los cromatogramas obtenidos para los blancos de agua Milli-Q (Figura 4.9 a) y de agua Merck (Figura 4.9 b) mediante el análisis por LC-MS/MS. En estos cromatogramas se incluyen las trazas de los cuatro homólogos del BAC así como la del DDMAC. Como puede observarse, el blanco de la muestra de agua Milli-Q muestra la presencia de los cuatro homólogos del BAC, siendo los más abundantes el C₁₂-BAC y el C₁₄-BAC (un orden de magnitud por encima de los otros dos), lo que viene a ser normal pues suelen ser los homólogos mayoritarios en los desinfectantes y productos comerciales. La muestra blanco del agua Merck no muestra, en cambio, la presencia de estos compuestos, lo que confirma que la contaminación no proviene de un efecto memoria del sistema cromatográfico sino del agua Milli-Q, como se ha comentado anteriormente. Lógicamente, en ninguna de las dos muestras aparece el DDMAC, lo que reafirma que el desinfectante utilizado en las resinas de intercambio del sistema Milli-Q era el BAC. En base a estos resultados se decidió utilizar agua HPLC Merck para preparar tanto la fase móvil de la separación cromatográfica como todos los patrones utilizados para la obtención de los parámetros de calidad y la cuantificación de las muestras.

En la Tabla 4.6 se comparan algunas de las características instrumentales de los métodos descritos en la literatura para el análisis de BAC y DDMAC con las de los métodos LC-MS y LC-MS/MS desarrollados en este capítulo. Como se puede observar en la tabla, la mayoría de los métodos tan solo utilizan la adquisición MS para cuantificar y, aun tratándose de instrumentos que tienen la posibilidad de la cuantificación en tándem, ésta solo se utiliza como método de confirmación, lo que supone realizar un doble análisis de la muestra. El método LC-MS/MS propuesto en esta memoria, sin embargo, permite la cuantificación y la identificación en un mismo análisis. Los LODs obtenidos en nuestro trabajo utilizando LC-MS son del orden de los descritos por Ford *et al.* (Ford *et al.*, 2002), y se consiguen disminuir

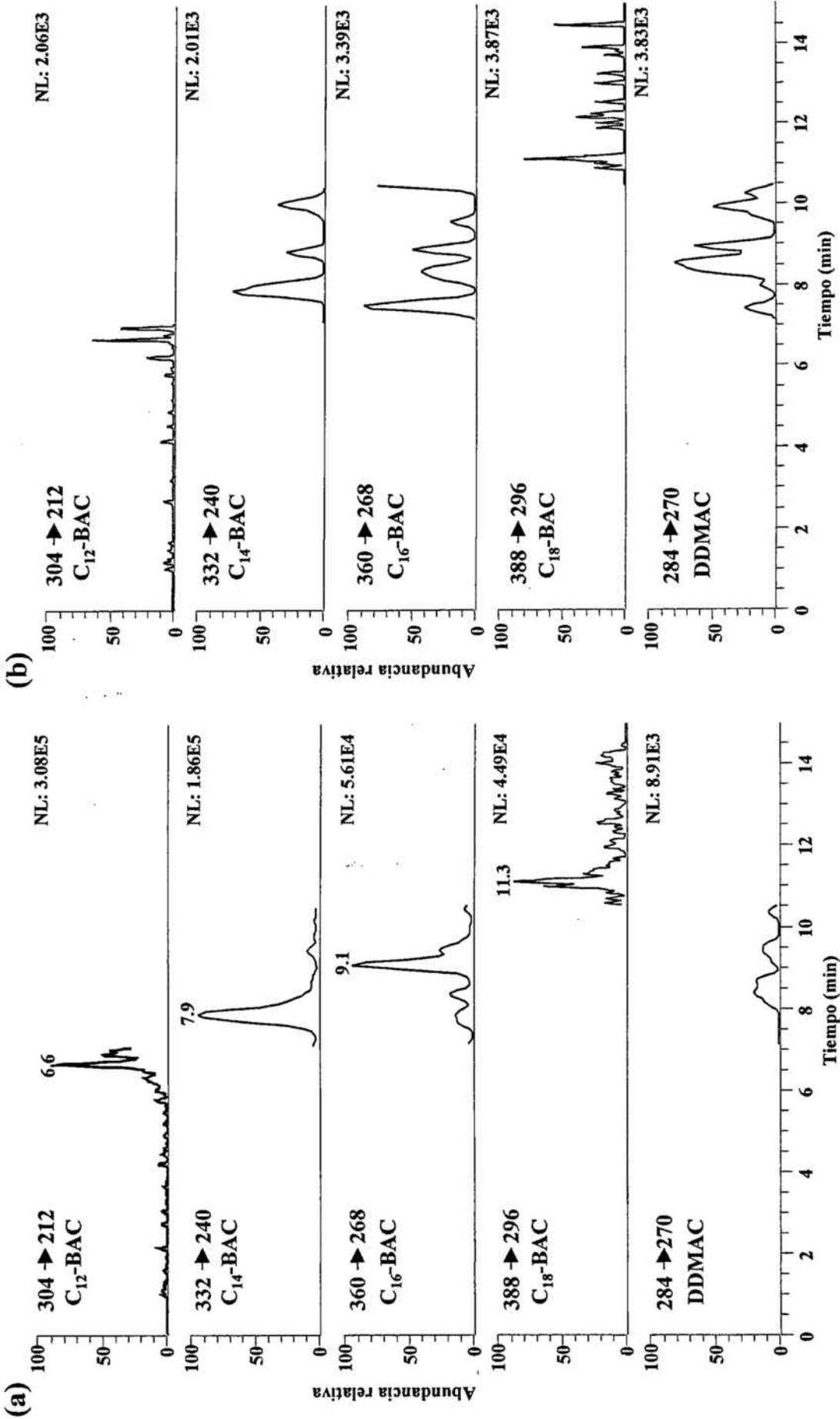


Figura 4.9. Cromatogramas de muestras blanco, (a) agua Milli-Q y (b) agua HPLC de Merck, obtenidos por LC-MS/MS.

Tabla 4.6. Características de los métodos de determinación de BAC y DDMAC mediante LC-MS.

Característica	Método 1	Método 2	Ferrer y Furlong, 2001	Ford <i>et al.</i> , 2002
Técnica de análisis	LC-MS	LC-MS/MS	LC-MS	LC-MS
Analizador	Trampa de iones	Trampa de iones	Trampa de iones	Triple cuadrupolo
Identificación	MS/MS	directa	MS/MS	MS/MS
Tiempo de análisis	12 min	12 min	25 min (no analiza C ₁₈ -BAC)	25 min
anchura pico (10%) (del último compuesto)	0,7 min (C ₁₈ -BAC)	0,7 min (C ₁₈ -BAC)	2,7 min (C ₁₆ -BAC)	2,6 min (C ₁₈ -BAC)
LODs (µg/L)	1-2	0,01-0,1	0,003-0,005 ^a	3-4
Compuestos analizados	Todos	Todos	C ₁₂ , C ₁₄ y C ₁₆ -BAC	Todos

Método 1: LC-MS (trampa de iones) propuesto

Método 2: LC-MS/MS (trampa de iones) propuesto

^a Con preconcentración de 50 mL de muestra con cartuchos PLRP.

hasta 0,01-0,1 µg/L al aplicar LC-MS/MS. Los LODs obtenidos por Ferrer y Furlong (Ferrer y Furlong, 2001) son inferiores, están entre 3 y 5 ng/L pero, sin embargo, estos autores realizan una preconcentración de 50 mL de muestra. Cabe mencionar, además, que no se observa un aumento significativo de los LODs en muestras de agua. Así por ejemplo, para una muestra de río adicionada están entre 0,05 y 0,1 µg/L. Estos valores indican que el método propuesto puede permitir el análisis de este tipo de matrices, sin ningún problema, a los niveles en que se suelen encontrar los compuestos en estudio ya que en la literatura hay datos que indican que algunos homólogos del BAC (generalmente el C₁₂-BAC y el C₁₄-BAC) se han encontrado en muestras de agua de río a niveles entre 1 y 36 µg/L (Ferrer y Furlong, 2001).

Una de las ventajas que presentan los métodos propuestos en este trabajo es la disminución en el tiempo total de análisis debido al hecho de utilizar una columna cromatográfica de tan sólo 5 cm de longitud. En general, las separaciones cromatográficas descritas en la literatura suelen presentar tiempos de análisis superiores a los 25 minutos (Tabla 4.7). Con la utilización de la columna Luna C₈ descrita en este trabajo, los tiempos de análisis se han reducido a menos de 12 minutos (más de la mitad con respecto a otros trabajos) sin perder resolución en los picos. Además, se ha conseguido también una reducción considerable en las colas de los picos con respecto a otras separaciones descritas en la

literatura. De hecho, la anchura de los picos al 10 % es de tan sólo 0,7 min, frente a valores de hasta 2,6 min (para el C₁₈-BAC, que es el último en eluir).

Finalmente, el método LC-MS/MS propuesto es también válido para el análisis de BAC en soluciones oftálmicas y en preparados comerciales, como demuestra la cuantificación de las muestras incluida en el Artículo VII de este capítulo, en la que se han obtenido valores de RSD inferiores al 2,5%.

4.4. CONCLUSIONES

En este capítulo se han desarrollado métodos de cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas para el análisis de dos familias de sales de amonio cuaternario. El estudio efectuado nos ha permitido obtener las siguientes conclusiones:

Sales de amonio cuaternario con carácter herbicida: cuats

- Se ha automatizado el método de preconcentración *on-line* previamente establecido (Castro *et al.*, 2001b) mediante la utilización de un sistema de preconcentración Prospekt, y se ha aplicado al acoplamiento de la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas utilizando dos analizadores diferentes, un triple cuadrupolo y un tiempo de vuelo.
 - Para evitar los efectos de memoria observados con el sistema Prospekt, se ha modificado el método de preconcentración *on-line* mediante la incorporación de una etapa de limpieza consistente en pasar a través del cartucho una disolución de acetonitrilo:agua:ácido fórmico (80:18:2 v/v). Esta etapa adicional no implica un incremento del tiempo total de análisis.
 - La mayor eficacia de ionización y desolvatación de las fuentes de *electrospray* utilizadas en este estudio (TurboIonspray con el instrumento de triple cuadrupolo y Z-spray con el de tiempo de vuelo) ha permitido eliminar los problemas de supresión de ionización que pueden ocurrir con las mezclas de cuats. Además, estas fuentes no requieren la adición post-columna de un disolvente orgánico.
 - La automatización del método de preconcentración *on-line* ha permitido mejorar ligeramente la repetitividad con respecto a los valores obtenidos con el método sin automatizar. Además, hace posible procesar un mayor número de muestras al día reduciendo el coste de personal.
 - Los mejores límites de detección del método SPE(Prospekt)-LC-MS se han obtenido con el triple cuadrupolo (modo de adquisición en SRM). A su vez, los LODs obtenidos para los cuats en muestras de agua potable con este método son los mejores de entre todos los descritos en la literatura (valores entre 0,7 y 60 ng/L).

- La elevada sensibilidad obtenida con el triple cuadrupolo permite proponer el método *on-line* SPE-LC-MS/MS (SRM) para el análisis de los cuats en muestras de agua de bebida por debajo de los niveles legislados por la UE, aunque el tiempo de vuelo puede proponerse para el análisis de muestras relativamente contaminadas. Además, la determinación con masa exacta proporcionada por el TOF puede utilizarse como una herramienta complementaria de confirmación, sobre todo para el análisis de PQ y de DQ, herbicidas que presentan un sola transición en las condiciones de máxima sensibilidad utilizadas con el triple cuadrupolo.

Sales de amonio cuaternario con carácter biocida: BAC y DDMAC

- El acoplamiento de la cromatografía de líquidos con la espectrometría de masas utilizando *electrospray* como fuente de ionización y una trampa de iones como analizador permite la determinación simultánea de los homólogos del BAC y del DDMAC en muestras de agua de río a los niveles en los que se encuentran estos compuestos en este tipo de matrices.
 - La separación de los biocidas estudiados ha sido posible mediante cromatografía de líquidos en fase invertida C18 y formación de pares iónicos utilizando el formiato incluido en la fase móvil como formador de pares iónicos. La utilización de una columna de 5 cm de longitud y 2 mm de diámetro ha permitido reducir los tiempos de análisis a menos de 12 min, lo que implica una disminución considerable con respecto a los métodos descritos de la literatura (tiempos de análisis superiores a 25 minutos).
 - Tanto para la preparación de la fase móvil como para la preparación de los patrones ha sido necesario utilizar agua HPLC de Merck ya que se detectó la presencia de BAC en el agua Milli-Q. Esto es debido a que este desinfectante se utiliza para la conservación de las resinas de intercambio iónico del sistema Milli-Q utilizado.
 - Se han obtenido LODs entre 1 y 2 $\mu\text{g/L}$ con LC-MS y entre 0,01 y 0,1 $\mu\text{g/L}$ en LC-MS/MS para patrones. Se ha evaluado la repetitividad de ambos métodos, encontrándose valores de RSDs inferiores al 2% con LC-MS y al 6% con LC-MS/MS. Con respecto a la reproducibilidad, esta empeora ligeramente, encontrándose valores de RSDs que llegan hasta un 4% con LC-MS y hasta un

11% con LC-MS/MS. Las linealidades dentro del intervalo de trabajo fueron aceptables, con coeficientes de regresión siempre superiores a 0,993.

- Se han determinado los LODs en una muestra de agua de río encontrándose valores entre 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/L}$, lo que permite la utilización de este método para el análisis de muestras de aguas a los niveles descritos en la literatura (superiores a 1 $\mu\text{g/L}$). La cuantificación de una muestra de río adicionada a 10 $\mu\text{g/L}$ presentó errores en la determinación de la concentración inferiores a un 4,6%, mostrando que el método es válido para el análisis de este tipo de compuestos en dichas matrices.
- Se propone el método LC-MS/MS desarrollado para la determinación de los homólogos del BAC en preparados comerciales y en formulaciones oftálmicas. Los valores de RSDs (n=3) son inferiores a un 2,5% en la cuantificación de dichas muestras.

**CONCLUSIONES
DE LA MEMORIA**

Del trabajo realizado a lo largo de esta Tesis Doctoral se pueden extraer las siguientes conclusiones globales:

- El estudio de la fragmentación de los cuats, llevado a cabo tanto con espectrometría de masas en tándem múltiple (MS^n) en un instrumento de trampa de iones como con espectrometría de masas en tándem con colisión en la fuente con un instrumento híbrido cuadrupolo-tiempo de vuelo (*in-source* CID-MS/MS), ha permitido caracterizar y establecer unas rutas de fragmentación consistentes para estos compuestos. La mayor exactitud en la determinación de la relación masa/carga proporcionada por el analizador de tiempo de vuelo ha permitido la correcta asignación de las composiciones elementales de aquellos fragmentos con pérdidas en las que interviene el nitrógeno, reasignándose la composición elemental descrita en la literatura para algunos iones.

Este estudio ha permitido, además, demostrar la posibilidad de intercambio hidrógeno/deuterio para los compuestos deuterados PQ-d₈ y DQ-d₄. También se han constatado diferencias significativas entre los espectros de masas obtenidos con los dos instrumentos. De entre ellas, la más destacable es la gran diferencia de abundancias relativas para algunos fragmentos en el espectro MS/MS del DF, lo que ha permitido demostrar la presencia de reacciones ión-molécula en los analizadores de trampa de iones.

Finalmente, se propone una estrategia de trabajo para la obtención de rutas de fragmentación de moléculas orgánicas relativamente pequeñas a partir de la información obtenida con los dos sistemas de espectrometría de masas comentados anteriormente.

- Para el análisis de cuats en muestras de agua de bebida se propone el uso de la preconcentración *on-line* automatizada con la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (SPE-LC-MS/MS) utilizando un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo. Este método es robusto, presenta una gran selectividad y sensibilidad, permite reducir las interferencias de la matriz y proporciona mejores límites de detección para los cuats que los publicados hasta el momento (0,7-60 ng/L). Los niveles alcanzados permiten analizar sin ningún problema los cuats en aguas a los niveles requeridos tanto por la US EPA como por la UE. Por otro lado, la completa automatización de este método permite analizar

un elevado número de muestras al día con una elevada precisión, reduciéndose las fuentes de error.

- Se propone el uso de la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS) utilizando un analizador de trampa de iones para el análisis de los homólogos del cloruro de benzalconio y el cloruro de didecildimetilamonio en muestras de agua de río o equivalentes. Los límites de detección obtenidos permiten el análisis de esta familia de biocidas a los niveles descritos en la literatura para estas matrices. La utilización de una columna de C₁₈ de 5 cm de longitud ha permitido disminuir considerablemente los tiempos de análisis con respecto a los descritos en la literatura en más de 10 minutos, así como mejorar la simetría de los picos reduciéndose su anchura.

Además, el método propuesto también se recomienda para la determinación rápida y precisa de los diferentes homólogos del cloruro de benzalconio en preparados oftálmicos.

- La utilización de métodos de preconcentración *on-line* en electroforesis capilar basados en los fenómenos de *stacking* y *sweeping* ha permitido reducir considerablemente los límites de detección obtenidos para los cuats en muestras de agua de consumo, llegando a obtenerse valores ligeramente superiores a los legislados por la UE.
- El acoplamiento de la electroforesis capilar con la espectrometría de masas utilizando un analizador de trampa de iones se puede recomendar para la determinación de cuats en muestras de agua de bebida ligeramente contaminadas o a los niveles legislados por la US EPA. El método propuesto es rápido, sencillo y permite la determinación de estos compuestos con una buena exactitud. Sin embargo, para conseguir disminuir los límites de detección hasta cumplir los niveles legislados por la UE son necesarios más estudios para compatibilizar los métodos de preconcentración *on-line* desarrollados en esta memoria con el acoplamiento de la electroforesis capilar a la espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamus, G. and Kowalczyk, M., "Electrospray multistep ion trap mass spectrometry for the structural characterisation of poly[(R,S)-3-hydroxybutanoic acid] containing β -lactam end group", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000) 195-202.
- Adelson, L. and Sunshine, I., "Fatal poisoning due to a cationic detergent of the quaternary ammonium compound type", *Am. J. Clin. Pathol.* 7 (1952) 711-719.
- Agudo, M., Ríos, A. and Valcárcel, M., "Automatic determination of diquat at the subnanogram per millilitre level in waters by use of a flow-through spectrophotometric sensor", *Química Analítica* 12 (1993) 100-104.
- Agudo, M., Ríos, A. and Varcárcel, M., "Automatic continuous-flow determination of paraquat at the subnanogram per millilitre level", *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 103-109.
- Ahmad, I., "Rapid Method for Extraction and Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination of Paraquat Residues in Water", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 86 (1983) 663-666.
- Ahmad, I., "Trace enrichment of difenzoquat in water and its determination by reversed phase high performance liquid chromatography", *Analytical Letters* 15 (1982) 27-37.
- Allender, W.J., "Determination of chlormequat residues in cotton seed by gas chromatography", *Pest. Sci.* 35 (1992) 265-269.
- Altria, K.D., Elgey, J. and Howells, J.S., "Validated capillary electrophoretic method for the quantitative analysis of histamine acid phosphate and/or benzalkonium chloride", *J. Chromatogr. B* 686 (1996) 111-117.
- Ambrus, G., Takahashi, L.T. and Marty, P.A., "Direct determination of benzalkonium chloride in ophthalmic systems by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Pharm. Sci.* 76 (1987) 174-176.
- Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., Kinoshita, H. and Ijiri, I., "Simultaneous quantitation of diquat and its two metabolites in serum and urine by ion-paired HPLC", *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 2115-2121.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienists, Inc. 1986. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices. Fifth edition. Cincinnati, OH, Publications Office, ACGIH.
- Aturki, Z., Desiderio, C. and Polcaro, C.M., "Analysis of Acidic Photosystem-II Interacting Herbicides in Lake and River Water by Capillary Electrophoresis", *Chromatographia* 54 (2001) 489-494.
- Ayanthi, N. and Nalaka, S., "An electroanalytical sensor for the detection of Gramoxone (paraquat)", *Anal. Letters* 33 (2000) 1491-1499.
- Banks, J.F. and Dresch, T., "Detection of Fast Capillary Electrophoresis Peptide and Protein Separations Using Electrospray Ionization With a Time-of-Flight Mass Spectrometer", *Anal. Chem.* 68 (1996) 1480-1485.
- Banks, J.F., "Optimization of conditions for the analysis of a peptide mixture and a tryptic digest of cytochrome c by capillary electrophoresis-electrospray-ionization mass spectrometry with an improved liquid-sheath probe", *J. Chromatogr. A* 712 (1995) 245-252.
- Baraud, L., Tessier, D., Aaron, J.J., Quisefit, J.P. and Pinart, J., "A multi-residue method for characterization and determination of atmospheric pesticides measured at two French urban and rural sampling sites", *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 1148-1152.
- Barceló, D., Durand, G. and Vreeken, R.J., "Determination of quaternary amine pesticides by thermospray mass spectrometry", *J. Chromatogr.* 647 (1993) 271-277.
- Barceló-Barrachina, E., Moyano, E. and Galceran, M.T., "Analysis of heterocyclic amines by liquid chromatography coupled to a quadrupole-time-of-flight mass spectrometer", *J. Chromatogr. A* (2004a) "in press".

- Barceló-Barrachina, E., Moyano, E. and Galceran, M.T., "State-of-the-art of the hyphenation of capillary electrochromatography with mass spectrometry", *Electrophoresis* 25 (2004b) "in press"
- Barry, C. and Pike, R.K., "High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Difenzoquat in Formulations", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63 (1980) 647-649.
- Bataller, R., Bragulat, E., Nogué, S., Görbig, M., Bruguera, M. and Rodés, J., "Prolonged Cholestasis After Acute Paraquat Poisoning Through Skin Absorption", *Am. J. Gastroenterology* 95 (2000) 1340-1343.
- Belal, F., Walash, M.I., Aly, F.A. and Mesbah, A.O., "Spectrophotometric determination of benzalkonium chloride in dosage forms through charge-transfer complexation", *Anal. Letters* 30 (1997) 1321-1335.
- Bernal, J.L., del Nozal, M.J., Martín, M.T., Diez-Masa, J.C. and Cifuentes, A., "Quantitation of active ingredients and excipients in nasal sprays by high-performance liquid chromatography, capillary electrophoresis and UV spectroscopy", *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 423-431.
- Bernstein, J.A., Stauder, T., Bernstein, D.I. and Bernstein, I.L., "A combined respiratory and cutaneous hypersensitivity syndrome induced by work exposure to quaternary amines", *J. Allergy Clin. Immun.* 2 (1994) 257-259.
- Bianco, P. and Aghroud, N., "Electrochemical Detection of Herbicides and Plant Growth Regulators at Membrane Glassy Carbon Electrodes", *Electroanalysis* 9 (1997) 602-607.
- Bismuth, C., Dally, S., Fournier, P.E., Garnier, R. and Scherrmann, J.M., "Prognosis and treatment of paraquat poisoning: A review of 28 cases", *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 19 (1982) 461-474.
- Bleau, G. and Desaulniers, M., "High-performance liquid chromatography assay of benzalkonium in plasma", *J. Chromatogr.* 487 (1989) 221-227.
- Brienne, S.H.R., Boyd, P.D.W., Schwerdtfeger, P., Bowmaker, G.A. and Cooney, R.P., "Infrared spectra and theoretical studies of bridged diquaternary 2,2'-dipyridinium compounds", *J. Molecular Structure* 365 (1995) 81-94.
- Britz-McKibbin, P. and Chen, D.Y., "Selective Focusing of Catecholamines and Weakly Acidic Compounds by Capillary Electrophoresis using a Dynamic pH Junction", *Anal. Chem.* 72 (2000a) 1242-1252.
- Britz-McKibbin, P., Bebault, G.M. and Chen, D.Y., "Velocity-difference Induced Focusing of Nucleotides in Capillary Electrophoresis with a Dynamic pH Junction", *Anal. Chem.* 72 (2000b) 1729-1735.
- Britz-McKibbin, P., Otsuka, K. and Terabe, S., "On-line focusing of flavin derivatives using Dynamic pH Junction-sweeping-Capillary Electrophoresis with Laser-Induced Fluorescence Detection", *Anal. Chem.* 74 (2002) 3736-3743.
- Brunetto, M.R., Morales, A.R., Gallignani, M., Burguera, J.L. and Burguera, M., "Determination of paraquat in human blood plasma using reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography with direct sample injection", *Talanta* 59 (2003) 913-921.
- Cai, J. and El Rassi, Z., "Capillary zone electrophoresis of two cationic herbicides, paraquat and diquat", *J. Liq. Chromatogr.* 15 (1992) 1193-1200.
- Calderbank, A. and Yuen, S.H., "An improved method for determining residues of diquat", *Analyst* 91 (1966) 625-629.
- Cannard, A.J. and Criddle, W.J., "A Rapid Method for the Simultaneous Determination of Paraquat and Diquat in Pond and River Waters by Pyrolysis and Gas Chromatography", *Analyst* 100 (1975) 848-853.
- Careri, M., Elviri, L., Mangia, A. and Zagnoni, I., "Rapid method for determination of chlomequat residues in tomato products by ion-exchange liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16 (2002) 1821-1826.

- Carneiro, M.C., Puignou, L. and Galceran, M.T., "Comparison of capillary electrophoresis and reversed-phase ion-pair high-performance liquid chromatography for the determination of paraquat, diquat and difenzoquat", *J. Chromatogr. A* 669 (1994) 217-224.
- Carneiro, M.C., Puignou, L. and Galceran, M.T., "Comparison of silica and porous graphitic carbon as solid-phase extraction materials for the analysis of cationic herbicides in water by liquid chromatography and capillary electrophoresis", *Anal. Chim. Acta* 408 (2000) 263-269.
- Castro, R., "La cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas como técnica analítica para la determinación de pesticidas catiónicos (cuats)", Tesis doctoral, Universitat de Barcelona, Febrero de 2001.
- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T., "Determination of Chlormequat in Fruit Samples by Liquid Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry", *J. AOAC Int.* 84 (2001a) 1903-1908.
- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T., "Determination of quaternary ammonium pesticides by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 914 (2001b) 111-121.
- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T., "Ion-pair liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of quaternary ammonium herbicides", *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 145-154.
- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T., "On-line ion-pair solid-phase extraction-liquid chromatography-mass spectrometry for the analysis of quaternary ammonium herbicides", *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 441-449.
- Castro, R., Moyano, E. and Galceran, M.T., "Ion-Trap versus Quadrupole for Analysis of Quaternary Ammonium Herbicides by LC-MS", *Chromatographia* 53 (2001c) 273-278.
- Chang, H.C., Cheng, T.J. and Chen, R.J., "EQCM Studies of Paraquat on Gold Electrode Modified with Electropolymerized Film", *Electroanalysis* 10 (1998) 1275-1280.
- Chataigner, D., Garnier, R., Sans, S. and Efthymiou, M.L., "Intoxication aigue accidentelle par un désinfectant hospitalier. 45 cas dont 13 d'évolution mortelle", *La Presse Médicale* 20 (1991) 741-743.
- Cheng, Y. and Hercules, D.M., "Studies of Pesticides by Collision-Induced Dissociation, Postsource-Decay, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 590-598.
- Cherkaoui, S. and Veuthey, J.L., "Nonaqueous Capillary Electrophoresis-Electrospray-Mass Spectrometry for the Analysis of Fluoxetine and its Related-Compounds", *Electrophoresis* 23 (2002) 442-448.
- Chernushevich, I.V., Loboda, A.V. and Thomson, B.A., "An introduction to quadrupole-time-of-flight mass spectrometry", *J. Mass Spectrom.* 36 (2001) 849-865.
- Chichila, T.M. and Walters, S.M., "Liquid Chromatographic Determination of Paraquat and Diquat in Crops Using a Silica Column with Aqueous Ionic Mobile Phase", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74 (1991) 961-967.
- Chichila, T.M.P. and Gilvydis, D.M., "Determination of Paraquat and Diquat in Low-Moisture Food Crops Using Silica Column Cleanup and Liquid Chromatography with UV Detection", *J. AOAC International* 76 (1993) 1323-1328.
- Chico Guijarro, E., Yáñez-Sedeno, P. and Polo Díez, L.M., "Determination of paraquat by flow-injection spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 199 (1987) 203-208.--
- Chien, R.L. and Burgi, D.S., "On-column concentration using Field Amplification in CZE", *Anal. Chem.* 64 (1992a) A489-A496.

- Chien, R.L. and Burgi, D.S., "Sample Stacking of an Extremely Large Injection Volume in High-Performance Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 64 (1992b) 1046-1050.
- Cibulsky, Z.R., "Determination of Benzalkonium Chloride by Gas Chromatography", *J. Pharm. Sci.* 73 (1984) 1700-1702.
- Clarke, N.J. and Naylor, S., "Capillary isoelectric focusing-mass spectrometry: analysis of protein mixtures from human body fluids", *Biomed. Chromatogr.* 16 (2002) 287-297.
- Compendium of Pesticide Common Names, ISO Technical Committee 81, ISO1750, November 2003, www.alanwood.net/pesticides/index.html
- Corasaniti, M.T., Strongoli, M.C. and Nisticò, G., "Determination of paraquat in rat brain using ion-pair solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection", *J. Chromatogr.* 527 (1990) 189-195.
- Craig, C.R. and Stitzel, R.R., *Modern Pharmacology* 4th edition, Little, B. and Co., Boston, 1994.
- Croes, K., Martens, F. and Desmet, K., "Quantitation of Paraquat in Serum by HPLC", *J. Anal. Toxicol.* 17 (1993) 310-312.
- Cross, J. and Singer, E.J. *Cationic Surfactants. Analytical and Biological Evaluation (Surfactant Science Series, Vol. 53)*, Marcel Dekker, Nueva York, 1994. Cap. 3, p. 3.
- de Liñán, V.C. "Vademecum de productos fitosanitarios y nutricionales 1999", Ediciones Agrotécnicas, S.L., España, 1999.
- de Liñán, V.C. "Farmacología vegetal", Ediciones Agrotécnicas, S.L., España, 1997.
- Ding, W.H. and Liao, Y.H., "Determination of Alkylbenzyltrimethylammonium Chlorides in River Water and Sewage Effluent by Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 73 (2001) 36-40.
- Ekström, G. and Akerblom, M., "Pesticide management in food and water safety: international contributions and national approaches", *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 114 (1990) 23-55.
- Ellenhorn, M.J., Schonwald, S., Ordog, G. and Wasserberger, J., *Ellenhorn's medical toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning*, 2nd ed. Williams and Wilkins, Maryland, USA. 1997, pp. 1204-1235.
- Elrod, L. Jr., Golich, T.G. and Morley, J.A., "Determination of benzalkonium chloride in eye care products by high-performance liquid chromatography and solid-phase extraction or on-line column switching", *J. Chromatogr.* 625 (1992) 362-367.
- Erikson, T., Brown, K.M., Wigder, H. and Gillespie, M., "A case of paraquat poisoning and subsequent fatality presenting to an emergency department", *J. Emerg. Med.* 15 (1997) 649-652.
- European Union, Commission Directive 2003/60/EC of 18 June 2003 amending the Annexes to Council Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC as regards the fixing of maximum levels for certain pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables (Text with EEA relevance). 2003a.
- European Union, Commission Directive 2000/42/EC of 22 June 2000 amending the Annexes to Council Directives 86/362/EEC, 86/363/EEC and 90/642/EEC on the fixing of maximum levels for pesticide residues in and on cereals, foodstuffs of animal origin and certain products of plant origin, including fruit and vegetables respectively (Text with EEA relevance). 2000a.
- European Union, Commission Directive 2001/21/EC of 5 March 2001 amending Annex I to Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market to include amitrole, diquat, pyridate and thiabendazole as active substances. 2001.
- European Union, Commission Directive 2003/112/EC of 1 December 2003 amending Council Directive 91/414/EEC to include paraquat as an active substance (Text with EEA relevance). 2003b.

- European Union, Commission Directive 2003/69/EC of 11 July 2003 amending the Annex to Council Directive 90/642/EEC as regards maximum residue levels for chlormequat, lambda-cyhalothrin, kresoxim-methyl, azoxystrobin and certain dithiocarbamates (Text with EEA relevance). 2003c.
- European Union, Commission Regulation (EC) No 1191/98 of 9 June 1998 amending Annexes I and II to Council Regulation (EEC) No 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residues limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin (Text with EEA relevance). 1998a.
- European Union, Commission regulation (EC) No 2076/2002 of 20 November 2002 extending the time period referred to in Article 8(2) of Council Directive 91/414/EEC and concerning the non-inclusion of certain active substances in Annex I to that Directive and the withdrawal of authorisation for plant protection products containing these substances (Text with EEA relevance). 2002.
- European Union, Council Directive 96/33/EC of 21 May 1996 amending the Annexes to Directives 86/362/EEC and 86/363/EEC on the fixing of maximum levels for pesticides residues in and on cereals and foodstuffs of animal origin respectively. 1996.
- European Union, Directive 98/8/EC of the European parliament and of the Council of 16 February 1998 concerning the placing of biocidal products on the market. 1998b.
- European Union, EEC Drinking Water Guidelines 80/779/EEC, EEC No. L229/11-29, EU, Brussels, 1980.
- European Union, Twenty-fourth Commission Directive 2000/6/EC of 29 February 2000 adapting to technical progress Annexes II, III, VI and VII to Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetic products (Text with EEA relevance). 2000b.
- Evans, C.S., Startin, J.R., Goodall, D.M. and Keely, B.J., "Optimisation of ion trap parameters for the quantification of chlormequat by liquid chromatography/mass spectrometry and the application in the analysis of pear extracts", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14 (2000a) 112-117.
- Evans, C.S., Startin, J.R., Goodall, D.M. and Keely, B.J., "Tandem mass spectrometric analysis of quaternary ammonium pesticides", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 699-707.
- Evans, C.S., Startin, J.R., Goodall, D.M. and Keely, F.J., "Improved sensitivity in detection of chlormequat by liquid chromatography-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 897 (2000b) 399-404.
- Fan, T.Y. and Wall, G.M., "Determination of Benzalkonium Chloride in Ophthalmic Solutions Containing Tyloxapol by Solid-Phase Extraction and Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 1172-1174.
- Fegert, A., Schepers, U. and Schwarz, B., "Determination of mepiquatchloride in animal and plant matrices by ion chromatography with conductivity detection", *Fresenius J. Anal. Chem.* 339 (1991) 441-443.
- Fernández, M., Ibáñez, M., Picó, Y. and Mañes, J., "Spatial and Temporal Trends of Paraquat, Diquat, and Difenzoquat Contamination in Water from Marsh Area of the Valencian Community (Spain)", *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (1998) 377-384.
- Ferrer, I. and Furlong, E.T., "Accelerated Solvent Extraction Followed by On-Line Solid-Phase Extraction Coupled to Ion Trap LC/MS/MS for Analysis of Benzalkonium Chlorides in Sediment Samples", *Anal. Chem.* 74 (2002) 1275-1280.
- Ferrer, I. and Furlong, E.T., "Identification of Alkyl Dimethylbenzylammonium Surfactants in Water Samples by Solid-Phase Extraction Followed by Ion Trap LC/MS and LC/MS/MS", *Environ. Sci. Technol.* 35 (2001) 2583-2588.
- Fisher, A.A. and Stillman, M.A., "Allergic contact sensitivity to benzalkonium chloride", *Arch. Dermatol.* 106 (1972) 169-171.
- Ford, M.J., Tetler, L.W., White, J. and Rimmer, D., "Determination of alkyl benzyl and dialkyl dimethyl quaternary ammonium biocides in occupational hygiene and environmental media by liquid

- chromatography with electrospray ionisation mass spectrometry and tandem mass spectrometry*", J. Chromatogr. A 952 (2002) 165-172.
- Freudemann, T., von Brocke, A. and Bayer, E., "On-Line Coupling of Capillary Gel Electrophoresis with Electrospray Mass Spectrometry for Oligonucleotide Analysis", Anal. Chem. 73 (2001) 2587-2593.
- Fuke, C., Arao, T., Morinaga, Y., Takaesu, H., Ameno, K. and Miyazaki, T., "Analysis of paraquat, diquat and two diquat metabolites in biological materials by high-performance liquid chromatography", Legal Med. 4 (2002) 156-163.
- Galceran, M.T., Carneiro, M.C. and Puignou, L., "Capillary Electrophoresis of Quaternary Ammonium Ion Herbicides: Paraquat, Diquat and Difenzoquat", Chromatographia 39 (1994) 581-586.
- Galceran, M.T., Carneiro, M.C., Díez, M. and Puignou, L., "Separation of quaternary ammonium herbicides by capillary electrophoresis with indirect UV detection", J. Chromatogr. A 782 (1997) 289-295.
- Galeano Díaz, T., Guiberteau Cabanillas, A. and Salinas, F., "Square-Wave and Differential Pulse Oxidative Voltammetric Determination of Diquat and Paraquat in Alkaline Medium", Electroanalysis 12 (2000) 616-621.
- Gill, R., Qua, S.C. and Moffat, A.C., "High-performance liquid chromatography of paraquat and diquat in urine with rapid sample preparation involving ion-pair extraction on disposable cartridges of octadecyl-silica", J. Chromatogr. 255 (1983) 483-490.
- Giulivi, C., Lavagno, C.C., Lucesoli, F., Bermudez, M.J.N. and Boveris, A., "Lung damage in paraquat poisoning and Hyperbaric oxygen exposure: superoxide-mediated inhibition of phospholipase A2", Free Radic. Biol. Med. 18 (1995) 203-213.
- Gómez-Gomar, A., González-Aubert, M.M., Garces-Torrents, J. and Costa-Segarra, J., "Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography", J. Pharm. Biomed. Anal. 8 (1990) 871-876.
- Gomez-Gomar, A., Gonzalez-Aubert, M.M., Garces-Torrents, J. and Costa-Segarra, J., "Determination of benzalkonium chloride in aqueous ophthalmic preparations by high-performance liquid chromatography", J. Pharm. & Biom. Sci. 8 (1990) 871-876.
- Graf, P., Hallen, H. and Juto, J.E., "Benzalkonium chloride in a decongestant nasal spray aggravates rhinitis medicaments in healthy volunteers", Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 395-400.
- Greve, P.A. and Hogendoorn, E.A., *Chlormequat en Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*, General Inspectorate for Health Protection, Ministry of Health, Welfare and Sports, The Netherlands, 1996.
- Grey, L., Nguyen, B. and Yang, P., "Liquid chromatography-electrospray ionization isotope dilution mass spectrometry analysis of paraquat and diquat using conventional and multilayer solid-phase extraction cartridges", J. Chromatogr. A 958 (2002) 25-33.
- Guilhaus, M., *Time-of-flight Mass Spectrometry for the New Millenium*, In *Advances in Mass Spectrometry, Volume 15*, Gelpi, E. (ed). John Wiley; New York, 2001. pp. 19.
- Guzman, N.A. and Stubbs, R.J., "The use of selective adsorbents in capillary electrophoresis-mass spectrometry for analyte preconcentration and microreactions: a powerful three-dimensional tool for multiple chemical and biological applications", Electrophoresis 22 (2001) 3602-3628.
- Hager, J.W., "A new linear ion trap mass spectrometer", Rapid Commun. Mass Spectrom. 16 (2002) 512-526.
- Hajšlová, J., Cuhra, P., Davidek, T. and Davidek, J., "Gas chromatographic determination of diquat and paraquat in crops", J. Chromatogr. 479 (1989) 243-250.
- Hallen, H. and Graf, P., "Benzalkonium chloride in nasal decongestive sprays has a long-lasting adverse effects on the nasal mucosa of the healthy volunteers", Clin. Exp. Allergy 25 (1995) 401-405.

- Hantson, P., Wallemacq, P. and Mahieu, P., "A Case of Fatal Diquat Poisoning: Toxicokinetic Data and Autopsy Findings", *Clin. Toxicol.* 38 (2000) 149-152.
- Hau, J., Riediker, S., Varga, N. and Stadler, R.H., "Determination of the plant growth regulator chlormequat in food by liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 787 (2000) 77-86.
- Hayes, W.J. Pesticides studied in man. Baltimore, MD. Williams and Wilkins, 1982.
- Heegaard, N.H.H., Nilsson, S. and Guzman, N.A., "Affinity Capillary Electrophoresis - Important Application Areas and Some Recent Developments", *J. Chromatogr. B* 715 (1998) 29-54.
- Heinig, K., Vogth, C. and Werner, G., "Determination of cationic surfactants by capillary electrophoresis", *Fresenius J. Anal. Chem.* 358 (1997) 500-505.
- Hennion, M.C., "Graphitized carbons for solid-phase extraction", *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 73-95.
- Herrero-Martínez, J.M., Simó-Alfonso, E.F., Mongay-Fernández, C. and Ramis-Ramos, G., "Determination of cationic surfactants by capillary zone electrophoresis and micellar electrokinetic chromatography with deoxycholate micelles in the presence of large organic solvent concentrations", *J. Chromatogr. A* 895 (2000) 227-235.
- Hitosugi, M., Maruyama, K. and Takatsu, A., "A case of fatal benzalkonium chloride poisoning", *Int. J. Legal Med.* 111 (1998) 265-266.
- Hodgeson, J., Bashe, W. and Eichelberger, J. EPA Method 549.1, *Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with UV detection*, 1992.
- Homer, R.F., Mees, G.C. and Tomblinson, T.E., "Mode of action of bipyridyl quaternary salts as herbicides", *J. Sci. Food Agri.* 11 (1960) 309-315.
- Horak, J., Werther, W. and Schmid, E.R., "Optimisation of the quantitative determination of chlormequat by matrix-assisted laser desorption/ionisation mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 241-248.
- Horstkotter, C., Kober, S., Spahn-Langguth, H., Mutschler, G. and Blaschke, G., "Determination of Triamterene and its main metabolite Hydroxytriamteren Sulfate in Human Urine by Capillary Electrophoresis using ultraviolet absorbency and Laser-Induced Fluorescence Detection", *J. Chromatogr. B* 769 (2002) 107-117.
- Hou, Y.H., Wu, C.Y. and Ding, W.H., "Development and validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of benzalkonium chlorides in ophthalmic solutions", *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 207-213.
- Hwang, K.Y., Lee, E.Y. and Hong, S.Y., "Paraquat intoxication in Korea", *Arch. Environ. Health* 57 (2002) 162-166.
- Ibáñez, M., Picó, Y. and Mañes, J., "Improving the solid-phase extraction of "quat" pesticides from water samples. Removal of interferences", *J. Chromatogr. A* 823 (1998) 137-146.
- Ibáñez, M., Picó, Y. and Mañes, J., "Influence of organic matter and surfactants on solid-phase extraction of diquat, paraquat and difenzoquat from waters", *J. Chromatogr. A* 727 (1996a) 245-252.
- Ibáñez, M., Picó, Y. and Mañes, J., "On-Line Determination of Bipyridylum Herbicides in Water by HPLC", *Chromatographia* 45 (1997) 402-407.
- Ibáñez, M., Picó, Y. and Mañes, J., "On-line liquid chromatography trace enrichment and high-performance liquid chromatography determination of diquat, paraquat and difenzoquat in water", *J. Chromatogr. A* 728 (1996b) 325-331.

- Itagaki, T., Lai, S.J. and Binder, S.R., "A rapid monitoring method of paraquat and diquat in serum and urine using ion-pairing bare-silica stationary phase HPLC following a single acidification step of sample pretreatment", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 20 (1997) 3339-3350.
- Ito, S., Nagata, T., Kudo, K., Kimura, K. and Imamura, T., "Simultaneous determination of paraquat and diquat in human tissues by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 617 (1993) 119-123.
- Jain, A., Verma, K.K. and Townshend, A., "Determination of paraquat by flow-injection spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta* 284 (1993) 275-279.
- Jimidar, M., Beyns, I., Rome, R., Peeters, R. and Musch, G., "Determination of Benzalkonium Chloride in Drug Formulations by Capillary Electrophoresis (CE)", *Biomed. Chromatogr.* 12 (1998) 128-130.
- Juhler, R.K. and Vhal, M., "Residues of Chlormequat and Mepiquat in Grain-Results from the Danish National Pesticide Survey", *J. of AOAC Int.* 82 (1999) 331-336.
- Juo, A.S.R. and Oginni, O.O., "Adsorption and desorption of paraquat in acid tropical soils", *J. Environ. Qual.* 7 (1978) 9-12.
- Kambhampati, I., Roinestad, K.S., Hartman, T.G., Rosen, J.D., Fukuda, E.K., Lippincott, R.L. and Rosen, R.T., "Determination of diquat and paraquat in water using high-performance liquid chromatography with confirmation by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 688 (1994) 67-73.
- Kaniansky, D., Iványi, F. and Onuska, F.I., "On-Line Isotacophoretic Sample Pretreatment in Ultratrace Determination of Paraquat and Diquat in Water by Capillary Zone Electrophoresis", *Anal. Chem.* 66 (1994) 1817-1824.
- Karas, M. and Hillenkamp, F., "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons", *Anal. Chem.* 60 (1988) 2299-2301.
- Kawano, Y., Audino, J. and Edlung, M., "Analysis of paraquat formulations by liquid chromatography", *Chrom.* 8593 (1975) 289-292.
- Kawase, S., Kanno, S. and Ukai, S., "Determination of the herbicides paraquat and diquat in blood and urine by gas chromatography", *J. Chromatogr.* 283 (1984) 231-240.
- Kesari, R., Rai, M. and Gupta, V.K., "Spectrophotometric Method for Determination of Paraquat in Food and Biological Samples", *J. of AOC Int.* 80 (1997) 388-391.
- Khan, S.U., "Determination of Diquat and Paraquat Residues in Soil by Gas Chromatography", *J. Agr. Food Chem.* 22 (1974) 863-867.
- Kim, J.B., Otsuka, K. and Terabe, S., "Anion-Selective Exhaustive Injection-sweep-Micellar Electrokinetic Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 932 (2001a) 129-137.
- Kim, J.B., Quirino, J.P., Otsuka, K. and Terabe, S., "On-line Sample Concentration in Micellar Electrokinetic Chromatography using Cationic Surfactants", *J. Chromatogr. A* 916 (2001b) 123-130.
- Koleček, J., Říha, V. and Vytřas, K., "Determination of 2-chloroethyltrimethylammonium chloride in Retacel by ion-selective electrode potentiometry and capillary isotacophoresis", *Anal. Chim. Acta* 273 (1993) 431-433.
- Kovács-Hadady, K. and Fábrián, I., "The determination of benzalkonium chloride in eye-drops by difference spectrophotometry", *J. Pharm. Biomed. Analysis* 16 (1998) 733-740.
- Krogsrud, N.E. and Larsen, A.I., "Airbone irritant contact dermatitis from benzalkonium chloride", *Contact Dermatitis* 36 (1997) 112.

- Kümmerer, K., Eitel, A., Braun, U., Hubner, P., Daschner, F., Mascart, G., Milandri, M., Reinthaler, F. and Verhoef, J., "Analysis of benzalkonium chloride in the effluent from European hospitals by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with post-column ion-pairing and fluorescence detection", *J. Chromatogr. A* 774 (1997) 281-286.
- Lam, H.F., Gupta, B.N., Takezawa, J. and Vanstee, E.W., "A comparison of the effects of paraquat and diquat on lung compliance, lung-volumes and single-breath diffusing-capacity in the rat", *Toxicology* 18 (1980) 111-123.
- Lamoree, M.H., Tjaden, U.R. and van der Greef, J., "Use of microdialysis for the on-line coupling of capillary isoelectric focusing with electrospray mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 777 (1997) 31-39.
- Lautié, J.P., Stankovic, V. and Sinoquet, G., "Determination of chlormequat in pears by high-performance thin layer chromatography and high-performance liquid chromatography with conductimetric detection", *Analisis* 28 (2000) 155-158.
- Lawrence, J.F., Panopio, L.G. and McLeod, H.A., "Analysis of Difenzoquat Herbicide in Wheat Products by Reversed-Phase Liquid Chromatography", *J. Agric. Food Chem.* 29 (1981) 887-889.
- Lay-Keow, N.G., Hupé, M. and Harris, A.G., "Direct gas chromatographic method for determining the homologue composition of benzalkonium chlorides", *J. Chromatogr.* 351 (1986) 554-559.
- Lazar, M.I. and Lee, M.L., "Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry of Paraquat and Diquat Herbicides", *J. Microcol. Sep.* 11 (1999) 117-123.
- Lee, E.D., Muck, W., Henion, J.D. and Covey, T.R. "On-line capillary zone electrophoresis-ion spray tandem mass spectrometry for the determination of dynorphins", *J. Chromatogr.* 458 (1988) 313-321.
- Lee, H.S., Kim, K., Kim, J.H., Do, K.S. and Lee, S.K., "On-line sample preparation of paraquat in human serum samples using high-performance liquid chromatography with column switching", *J. Chromatogr. B* 716 (1998) 371-374.
- Lee, S.K., Ameno, K., In S.W., Yang J.Y., Kim, K.U., Koo, K.S., Yoo, Y.C., Ameno, S. and Ijiri, I., "Levels of paraquat in fatal intoxications", *Int. J. Legal Med.* 112 (1999) 198-200.
- Lin, C.E., Chiou, W.C. and Lin, W.C., "Capillary zone electrophoretic separation of alkylbenzyl quaternary ammonium compounds: effect of organic modifier", *J. Chromatogr. A* 722 (1996a) 345-352.
- Lin, C.E., Chiou, W.C. and Lin, W.C., "Separation of alkylbenzyl quaternary ammonium compounds by capillary zone electrophoresis. Effect of organic solvent in sample solution", *J. Chromatogr. A* 723 (1996b) 189-195.
- Lin, C.E., Liu, Y.C., Yang, T.Y., Wang, T.Z. and Yang, C.C., "On-line concentration of S-Triazine Herbicides in Micellar Electrokinetic Chromatography using a Cationic Surfactant", *J. Chromatogr. A* 916 (2001) 239-245.
- Lu, T.H. and Sun, I.W., "Electrocatalytic determination of paraquat using a nafion film coated glassy carbon electrode", *Talanta* 53 (2000) 443-451.
- Luque, M., Ríos, A. and Valcárcel, M., "Sensitive determination of paraquat and diquat at the sub-ng ml⁻¹ level by continuous amperometric flow methods", *Analyst* 123 (1998) 2383-2387.
- Madhu, C., Gregus, Z. and Klaassen, C.D., "Simple method for analysis of diquat in biological fluids and tissues by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 674 (1995) 193-196.
- Mallat, E., Barceló, D., Barzen, C., Gauglitz, G. and Abuknesha, R., "Immunosensors for pesticide determination in natural waters", *Trends in Anal. Chem.* 20 (2001a) 124-132.
- Mallat, E., Barzen, C., Abuknesha, R., Gauglitz, G. and Barceló, D., "Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection", *Anal. Chim. Acta* 427 (2001b) 165-171.

- Marr, J.C. and King, J.B., "A Simple High Performance Liquid Chromatography/Ionspray Tandem Mass Spectrometry Method for the Direct Determination of Paraquat and Diquat in Water", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 11 (1997) 479-483.
- Marsh, D.F. and Takahashi, L.T., "Determination of Benzalkonium Chloride in the Presence of Interfering Alkaloids and Polymeric Substrates by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography", *J. Pharm. Sci.* 72 (1983) 521-525.
- Martin, R.L. and Brancia, F.L., "Analysis of high mass peptides using a novel matrix-assisted laser desorption/ionization quadrupole ion trap time-of-flight mass spectrometer", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 1358-1365.
- Martínez, D., Cugat, M.J., Borrull, F. and Calull, M., "Solid-phase extraction coupled to Capillary Electrophoresis with emphasis on Environmental Analysis", *J. Chromatogr. A* 902 (2000) 65-89.
- Martínez, L.C., Pérez-Ruiz, T., Tomas, V. and Yague, E., "Determination of paraquat in biological and environmental samples by a photokinetic method", *Anal. Chim. Acta* 209 (1988) 79-86.
- Mastichiadis, C., Kakabakos, S.E., Christofidis, I., Koupparis, M.A., Willetts, C. and Misiakos, K., "Simultaneous Determination of Pesticides Using a Four-Band Disposable Optical Capillary Immunosensor", *Anal. Chem.* 74 (2002) 6064-6072.
- Mathieu-Nolf, M., Mathieu, D., Leblanc, J.H., Frimat, P. and Furon, D., "Les intoxications par les antiseptiques de la classes des ammoniums quaternaires sont-elles toujours bénignes?", *J. Toxicol. Clin. Exper.* 5 (1985) 406.
- McLuckey, S.A. and Wells, J.M., "Mass Analysis at the Advent of the 21st Century", *Chem. Rev.* 101 (2001) 571-606.
- Merck. Merck index, 13th ed. Whitehouse station: Merck Research Laboratories, 2001. p. 1060.
- Merianos, J.J., in : S.S. Block (Ed.), *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Lea and Kibiger, Pittsburg, PA, 1991, p. 225.
- Merino, F., Rubio, S. and Pérez-Bendito, D., "Mixed aggregate-based acid-induced cloud-point extraction and ion-trap liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of cationic surfactants in sewage sludge", *J. Chromatogr. A* 998 (2003) 143-154.
- Meyer, R.C., "Determination of Benzalkonium Chloride by Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography", *J. Pharm. Sci.* 69 (1980) 1148-1150.
- Miller, R.B., Chen, C. and Sherwood, C.H., "High-performance liquid chromatographic determination of benzalkonium chloride in Vasocidin ophthalmic solution", *J. Liq. Chromatogr.* 16 (1993) 3801-3811.
- Minakata, K., Suzuki, O., Saito, S. and Harada, N., "A new diquat derivative appropriate for colourimetric measurements of biological materials in the presence of paraquat", *Int. J. Legal Med.* 114 (2000) 1-5.
- Moctezuma, E., Leyva, E., Monreal, E., Villegas, N. and Infante, D., "Photocatalytic degradation of the herbicides paraquat", *Chemosphere* 39 (1999) 511-517.
- Mol, H.G.J., Van Dam, R.C.J., Vreeken, R.J. and Steijger, O.M., "Determination of Chlormequat in Pears by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry", *J. AOAC Int.* 83 (2000) 742-747.
- Moody, G.J., Owusu, R.K. and Thomas, J.D.R., "Analysis of diquat by ion selective electrodes", *Anal. Letters* 12 (1988) 1653-1664.
- Moody, G.J., Owusu, R.K. and Thomas, J.D.R., "Ion-pairing Agents in Ion-selective Electrodes for Diquat, Paraquat and 4,4'-Dipyridinium Dications", *Analyst* 112 (1987a) 1347-1353.
- Moody, G.J., Owusu, R.K. and Thomas, J.D.R., "Liquid Membrane Ion-selective Electrodes for Diquat and Paraquat", *Analyst* 112 (1987b) 121-127.

- Moring, S.E., Reel, R.T. and van Soest, R.E.J., "Optical improvements of a Z-Shaped Cell for High-Sensitivity UV Absorbency Detection in Capillary Electrophoresis", *Anal. Chem.* 65 (1993) 3454-3459.
- Morrow, A.P., Kassim Folahan, O.O. and Ayorinde, O., "Detection of cationic surfactants in oral rinses and a disinfectant formulation using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15 (2001) 767-770.
- Mortimer, R.D. and Weber, D.F., "Some comments on a recently proposed method of determining chlormequat residues by derivatization with pentafluorotiofenol", *Pest. Sci.* 40 (1994) 31-35.
- Moyano, E., Games, D.E. and Galceran, M.T., "Determination of Quaternary Ammonium Herbicides by Capillary Electrophoresis/Mass Spectrometry", *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 10 (1996) 1379-1385.
- Munch, J.W. and Bashe, W.J. *EPA Method 549.2, Determination of diquat and paraquat in drinking water by liquid-solid extraction and high performance liquid chromatography with ultraviolet detection, Revision 1.0, (Revision of EPA Method 549.1, Hodgeson, J.W., Bashe, W.J. and Eichelberger, J.W., Revision 1.0, August 1992).*, June 1997.
- Nagayama, T., Maki, T., Kan, K., Iida, M. and Nishima, T., "Reverse-Phase Liquid Chromatographic Determination of Paraquat and Diquat in Agricultural Products", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 70 (1987) 1008-1011.
- Nakagari, I., Suzuki, K., Shiaku, Y., Kuroda, Y., Takasu, N. and Kohama, A., "Rapid quantification of paraquat and diquat in serum and urine using high-performance liquid chromatography with automated sample pretreatment", *J. Chromatogr.* 481 (1989) 434-438.
- National Library of Medicine. Hazardous Substances Databank, Paraquat, 1992.
- Needham, L., Paschal, D., Rollen, Z.J., Liddle, J. and Bayse, D., "Determination of Paraquat in Marijuana by Reversed-Phase-Ion High Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. Sci.* 17 (1979) 87-90.
- Nicola, B., Nicolas, E., Junice, R. and Clyn, V., *Paediatric Toxicology Handbook of poisoning in children*, McMillan reference Ltd., London, (1997), pp. 166-169.
- Nordquist, R.E., Nguyen, H., Poyer, J.L. and Carubelli, R., "The role of free radicals in paraquat-induced corneal lesions", *Free Radic. Res.* 23 (1995) 61-71.
- Núñez, O. and Sentellas, S., "Métodos de preconcentración on-line en electroforesis capilar", *CTA* 23 (2002) 28-34.
- Occupational Health Services, Inc. 1991 (Sept. 16). MSDS for Diquat. OHS Inc., Secaucus, NJ.
- Olgemöller, J., Hemple, G., Boos, J. and Blaschke, J., "Determination of (E)-5-(2-Bromovinyl)-2'-Deoxyuridine in plasma and urine by Capillary Electrophoresis", *J. Chromatogr. B* 726 (1999) 261-268.
- Olivares, J.A., Nguyen, N.T., Yonker, C.R. and Smith, R.D., "On-line mass spectrometric detection for capillary electrophoresis", *Anal. Chem.* 59 (1987) 1230-1232.
- Olson, K.R., "Paraquat and diquat", En: Olson, K.R. et al. (eds), "Poisoning and Drug Overdose", 2nd ed. Norwalk C.T.: Appelton and Lange, 1994, pp. 245-246.
- Ortiz-Frutos, F.J., Argila, D., River, R., Zamarro, O. and Miguelez, S., "Allergic contact dermatitis from benzalkonium chloride used as a denaturant of ethanol", *Contact Dermatitis* 35 (1996) 302.
- Osborn, D.M., Weiss, D.J. and Lunte, C.E., "On-line preconcentration methods for capillary electrophoresis", *Electrophoresis* 21 (2000) 2768-2779.
- Ouyang, Y., Mansell, R.S. and Nkedi-Kizza, P., "A Simple High Performance Liquid Chromatography Method for Analyzing Paraquat in Soil Solution Samples", *J. Environ. Qual.* 33 (2004) 406-408.

- Pailleret, A., Rapicault, S. and Degrand, C., "Quantification of the Adsorption of Methyl Viologen on Pyrex Glass using a Renewable Perfluorosulfonated Ionomer Carbon Paste Electrode", *Electroanalysis* 9 (1997) 378-382.
- Paixao, P., Costa, P., Bugalho, T., Fidalgo, C. and Pereira, L.M., "Simple method for determination of paraquat in plasma and serum of human patients by high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr. B* 775 (2002) 109-113.
- Parhizkari, G., Delker, G., Miller, R.B. and Chen, C., "A stability-indicating HPLC method for the Determination of Benzalkonium Chloride in 0,5 % Tramadol Ophthalmic Solution", *Chromatographia* 40 (1995a) 155-158.
- Parhizkari, G., Miller, R.B. and Chen, C., "A stability-indicating HPLC Method for the determination of benzalkonium chloride in phenylephrine HCl 10% ophthalmic solution", *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995b) 553-563.
- Parkin, J.E., "The assay of benzalkonium chloride in pilocarpine, hypromellose and polyvinyl alcohol ophthalmic drops by second-order derivative ultraviolet spectrophotometry", *J. Pharm. Biom. Anal.* 11 (1993) 609-611.
- Paschal, D.C., Needham, L.L., Rollen, Z.J. and Liddle, J.A., "Determination of paraquat in sunflower seeds by reversed-phase high-performance liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 177 (1979) 85-90.
- Peeters, M.C., Defloor, I., Coosemans, J., Delcour, J.A., Ooms, L., Deliever, R. and De Vos, D., "Simple ion chromatographic method for the determination of chlormequat residues in pears", *J. Chromatogr. A* 920 (2001) 255-259.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A. and Tomás, V., "Simultaneous Determination of Diquat and Paraquat Residues in Various Matrices by Capillary Zone Electrophoresis with Diode Array Detection", *Chromatographia* 43 (1996) 468-472.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Sanz, A., Tomás, V. and Casajús, R., "Kinetic-spectrophotometric determination of diquat based on a charge-transfer complex with cysteine", *Analyst* 119 (1994) 1557-1560.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V. and Fenoll, J., "Spectrofluorimetric determination of paraquat by manual and flow injection methods", *Analyst* 123 (1998) 1577-1581.
- Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, M.C., Tomás, V. and Yagüe, E., "Determination of Diquat by a Photokinetic Method", *Analyst* 115 (1990) 783-786.
- Peterson, Z.D., Bowerbank, C.R., Collins, D.C., Graves, S.W. and Lee M.L., "Advantages and limitations of coupling isotachopheresis and comprehensive isotachopheresis-capillary electrophoresis to time-of-flight mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 992 (2003) 169-179.
- Petersson, P., Jörntén-Karlsson, M. and Stålebro, "Direct coupling of micellar electrokinetic chromatography to mass spectrometry using a volatile buffer system based on perfluorooctanoic acid and ammonia", *Electrophoresis* 24 (2003) 999-1000.
- Pinilla Macías, J.M., Hernández Hernández, L., Moreno Sobrino, M. and Sevilla Escribano, M.T., "Determination of Paraquat by Cathodic Stripping Voltammetry after accumulation Through the Formation of an Ion Pair on a Hanging Mercury Drop Electrode", *Electroanalysis* 5 (1993) 79-83.
- Pinzauti, S. and La Porta, E., "Use of the Silver Electrode in the Potentiometric Determination of Quaternary Ammonium Compounds", *Analyst* 102 (1977) 938-942.
- Placucci, F., Benini, A. and Tosti, A., "Occupational allergic contact dermatitis from disinfectant wipes used in dentistry", *Contact Dermatitis* 35 (1996) 306.
- Pond, S.M., "Toxicology 5. Manifestations and Management of Paraquat poisoning", *Med. J. Aust.* 152 (1990) 256-259.

- Prieto-Blanco, M.C., López-Mahía, P. and Prada-Rodríguez, D., "Analysis of Residual Products in Benzalkonium Chloride by High-Performance Liquid Chromatography", *J. Chromatogr. Sci.* 37 (1999) 295-299.
- Prince, S.J., McLaury, H.J., Allen, L.V. and McLaury, P., "Analysis of benzalkonium chloride and its homologs: HPLC versus HPCE", *J. Pharm. Biomed. Sci.* 19 (1999) 877-882.
- Prochazkova, A., Krivankova, L. and Bocek, P., "Quantitative trace analysis of L-Ascorbic acid in Human Body Fluids by on-line combination of Capillary Isotachopheresis and Zone Electrophoresis", *Electrophoresis* 19 (1998) 300-304.
- Pryde, A. and Darby, F.J., "The analysis of paraquat in urine by high-speed liquid chromatography", *J. Chromatogr.* 115 (1975) 107-116.
- Que, A.H. and Novotny, M.V., "Separation of Neutral Saccharide Mixtures with Capillary Electrochromatography Using Hydrophilic Monolithic Columns", *Anal. Chem.* 74 (2002) 5184-5191.
- Que, A.H., Mechref, Y., Huang, Y., Taraszka, J.A., Clemmer, D.E. and Novotny, M.V., "Coupling Capillary Electrochromatography with Electrospray Fourier Transform Mass Spectrometry for Characterizing Complex Oligosaccharide Pools", *Anal. Chem.* 75 (2003) 1684-1690.
- Querée, E.A., Dickson, S.J. and Shaw, S.M., "Extraction and Quantification of Paraquat in Liver and Hemolyzed Blood", *J. Anal. Toxicol.* 9 (1985) 10-14.
- Quirino J.P. and Terabe, S., "Approaching a Million-Fold Sensitivity increase in Capillary Electrophoresis with direct Ultraviolet detection. Cation-Selective Exhaustive Injection and Sweeping", *Anal. Chem.* 72 (2000) 1023-1030.
- Quirino, J.P. and Terabe, S., "Exceeding 5000-Fold concentration of Dilute Analytes in Micellar Electrokinetic Chromatography", *Science* 282 (1998a) 465-468.
- Quirino, J.P. and Terabe, S., "On-line Concentration of Neutral analytes for Micellar Electrokinetic Chromatography. V- Field Enhanced Sample Injection with Reverse Migrating Micelles", *Anal. Chem.* 70 (1998b) 1893-1901.
- Quirino, J.P. and Terabe, S., "On-line Concentration of Neutral analytes for Micellar Electrokinetic Chromatography. IV- Field-Enhanced Sample Injection", *J. Chromatography A* 798 (1998c) 251-257.
- Quirino, J.P. and Terabe, S., "Sweeping of Analyte Zones in Electrokinetic Chromatography", *Anal. Chem.* 71 (1999) 1638-1644.
- Quirino, J.P., Iwai, Y., Otsuka, K. and Terabe, S., "Determination of Environmentally relevant Aromatic Amines in the ppt levels by Cation-Selective Exhaustive Injection-sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography", *Electrophoresis* 21 (2000a) 2899-2903.
- Quirino, J.P., Terabe, S. and Bocek, P., "Sweeping of neutral analytes in Electrokinetic Chromatography with High-Salt Containing Matrices", *Anal. Chem.* 72 (2000b) 1934-1940.
- Rai, M.K., Das, J.D. and Gupta, V.K., "A sensitive determination of paraquat by spectrophotometry", *Talanta* 45 (1997) 343-348.
- Rao, P.S.C. and Davidson, J.M. "Estimation of Pesticide Retention and Transformation Parameters Required in Nonpoint Source Pollution Models", In "Environmental Impact of Nonpoint Source Pollution". M.R. Overcash and J.M. Davidson, eds. Ann Arbor Science, 1980.
- Reed, D.R. and Kass, S.R., "Hydrogen-Deuterium Exchange at Non-Labile Sites: A New Reaction Facet With Broad Implications for Structural and Dynamic Determinations", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 1163-1168.
- Reigart, J.R. and Roberts, J.R., "Paraquat and diquat" in *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*, Reigart, J.R. and Roberts, J.R. (eds), 5th edition, Washington, DC, 1999, pp. 108-117.

- Reynolds, J.E.F., ed. *Martindale: the Extra Pharmacopoeia*, 31st ed. The pharmaceutical press, London, pp. 117-118.
- Richards, R.M.E. and Xing, D.K.L., "In vitro evaluation of the antimicrobial activities of selected lozenges", *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 1218-1220.
- Riediker, S., Obrist, H., Varga, N. and Stadler, R.H., "Determination of chlormequat and mepiquat in pear, tomato, and wheat flour using on-line solid-phase extraction (Prospekt) coupled with liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 966 (2002) 15-23.
- Riu, J. and Barceló D., "Determination of linear alkylbenzene sulfonates and their polar carboxylic degradation products in sewage treatment plants by automated solid-phase extraction followed by capillary electrophoresis-mass spectrometry", *Analyst* 126 (2001) 825-828.
- Routt Reigart, J. and Roberts, J.R. (eds.). *Recognition and Management of Pesticide Poisonings*, 5th edition, 1999.
- Ruhling, I., Schafer, H., Ternes, W., "HPLC on-line reductive scanning voltammetric detection of diquat, paraquat and difenzoquat with mercury electrodes", *Fresenius J. Anal. Chem* 364 (1999) 565-569.
- Saad, B., Ariffin, M. and Saleh, M.I., "Flow injection potentiometric determination of paraquat in formulations and biological samples", *Talanta* 47 (1998) 1231-1236.
- Saad, B., Ariffin, M.M. and Saleh, M.I., "Paraquat sensors containing membrane components of high lipophilicities", *Anal. Chim. Acta* 338 (1997) 89-96.
- Sakai, T., "Extraction-spectrophotometric determination of benzethonium and benzalkonium salts with bromocresol green and quinine", *Anal. Chim. Acta* 147 (1983) 331-337.
- Sakai, T., "Spectrophotometric Determination of Quaternary Ammonium Salts by a Flow Injection Method Coupled With Thermochromism of ion Associates", *Analyst* 117 (1992) 211-214.
- Sánchez Sellero, I., Cruz, A., Fernández, P. and López-Rivadulla, M., "Liquid chromatographic method for simultaneous determination of paraquat and diquat in plasma, urine and vitreous humour", *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 19 (1996) 2009-2024.
- Sánchez-Leal, J., González, J.J., Kaiser, K.L.E., Palabrica, V.S., Comelles, F. and Garcia, M.T., "Toxicity and biodegradation of cationic surfactants", *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 22 (1994) 13-18.
- Santilio, A., Casentini, B., Spagnoli, M. and Dommarco, R., "Analysis of bipyridilium herbicides by capillary electrophoresis", *J. Cap. Elec. and Microchip Tech.* 8 (2003) 1-5.
- Santoni, G., Medica, A., Gratteri, P., Furlanetto, S. and Pinzauti, S., "High-performance liquid chromatographic determination of benzalkonium and naphazoline or tetrahydrozoline in nasal and ophthalmic solutions", *Il Farmaco* 49 (1994) 751-754.
- Schmitt-Kopplin, P. and Frommberger, M., "Capillary electrophoresis-mass spectrometry: 15 years of developments and applications", 24 (2003) 3837-3867.
- Schweitz, L., Petersson, M., Johansson, T. and Nilsson, S., "Alternative methods providing Enhanced Sensitivity and Selectivity in Capillary Electroseparation", *J. Chromatogr. A* 892 (2000) 203-217.
- Selim, M.I., Achutan, C., Starr, J.M., Jiang, T. and Young, B.S., "Comparison of Immunoassay to High-Pressure Liquid Chromatography and Gas Chromatography-Mass Spectrometry Analysis of Pesticides in Surface Water", *ACS Symposium Series* 657 (1997) 234-244.
- Selisker, M.Y., Herzog, D.P., Erber, R.D., Fleeker, J.R. and Itak, J.A., "Determination of Paraquat in Fruits and Vegetables by a Magnetic particle Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay", *J. Agric. Food Chem.* 43 (1995) 544-547.

- Sendra, B., Panadero, B. and Gomezzens, A., "Selective Kinetic Determination of Paraquat using Long-Wavelength Fluorescence Detection", *J. Agricultural and Food Chem.* 47 (1999) 3733-3737.
- Shamsi, S.A. "Micellar Electrokinetic Chromatography-Mass Spectrometry Using a Polymerized Chiral Surfactant", *Anal. Chem.* 73 (2001) 5103-5108.
- Shibukawa, M., Eto, R., Kira, A., Miura, F., Oguma, K., Tatsumoto, H., Ogura, H. and Uchiumi, A., "Separation and determination of quaternary ammonium compounds by high-performance liquid chromatography with a hydrophilic polymer column and conductometric detection", *J. Chromatogr. A* 830 (1999) 321-328.
- Shihabi, Z.K., "Serum Procainamide analysis based on Acetonitrile Stacking by Capillary Electrophoresis", *Electrophoresis* 19 (1998) 3008-3011.
- Shivhare, P. and Gupta, V.K., "Spectrophotometric method for the determination of paraquat in water, grain and plant materials", *Analyst* 116 (1991) 391-393.
- Simon, V.A. and Taylor, A., "High-sensitivity High-performance liquid chromatography analysis of diquat and paraquat with confirmation", *J. Chromatogr.* 479 (1989) 153-158.
- Smith, R.D., Barinaga, C.J. and Udseth, H.R., "Improved Electrospray Ionization for Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry", *Anal. Chem.* 60 (1988) 1948-1952.
- Somsen, G.W., Mol, R. and de Jong, G.J., "On-line micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry: feasibility of direct introduction of non-volatile buffer and surfactant into the electrospray interface", *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 953-961.
- Song, X. and Budde, W.L., "Capillary Electrophoresis-Electrospray Mass Spectra of the Herbicides Paraquat and Diquat", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 7 (1996) 981-986.
- Spinks, C.A., Wang, B., Clare Mills, E.N. and Morgan, M.R.A., "Development of an ELISA for paraquat; improvement of antibody characteristics by reversed affinity chromatography", *Analyst* 124 (1999) 847-850.
- Stahl, M., Jakob, A., von Brocke, A., Nicholson, G. and Bayer, E., "Comparison of different setups for one- and two-dimensional capillary high-performance liquid chromatography and pressurized capillary electrochromatography coupled on-line with mass spectrometry", *Electrophoresis* 23 (2002) 2949-2962.
- Startin, J.R., Hird, S.J., Sykes, M.D., Taylor, J.C. and Hill, A.R.C., "Determination of residues of the plant growth regulator chlormequat in pears by ion-exchange high performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry", *Analyst* 124 (1999) 1011-1015.
- Stevens, J.T. and Darrell D.S. 1991. *Herbicides in Handbook of Pesticide Toxicology. Volume 3. Classes of Pesticides.* Wayland J. Hayes and Edward T. Laws editors. Academic Press, NY:
- Stránský, Z., "Isotachopheresis of cationic herbicides in waters and soils", *J. Chromatogr.* 320 (1985) 219-231.
- Suzuki, S., Nakamura, Y., Kaneko, M., Mori, Ken'Ichiro and Watanabe, Y., "Analysis of benzalkonium by gas chromatography", *J. Chromatogr.* 463 (1989) 188-191.
- Tafari, F., Businelli, M. and Giusquiani, P.L., "Gas-chromatographic Determination of Chlorcholine Chloride Residues in Natural Tomato Juice", *Analyst* 95 (1970) 675-679.
- Taguchi, V.Y., Jenkins, S.W.D., Crozier, P.W. and Wang, D.T., "Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography-(Electrospray Ionization) Mass Spectrometry", *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 9 (1998) 830-839.
- Takeda, S., Tanaka, Y., Yamane, M., Siroma, Z., Wakida, S., Otsuka, K. and Terabe, S., "Ionization of dichlorophenols for their analysis by capillary electrophoresis-mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 924 (2001) 415-420.

- Takeda, S., Wakida, S.I., Yamane, M., Siroma, Z., Higashi, K. and Terabe, S., "Use of several anionic surfactants for the separation of aniline derivatives in micellar electrokinetic chromatography", *J. Chromatogr. A* 817 (1998) 59-63.
- Takino, M., Daishima, S. and Yamaguchi, K., "Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography/Electrospray-Mass Spectrometry Using Volatile Ion-Pairing Reagents", *Anal. Sci.* 16 (2000) 707-711.
- Tanaka, Y., Otsuka, K. and Terabe, S., "Evaluation of an atmospheric pressure chemical ionization interface for capillary electrophoresis-mass spectrometry", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1889-1895.
- Taylor, M.R. and Teale, P., "Gradient capillary electrochromatography of drug mixtures with UV and electrospray ionisation mass spectrometric detection", *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 89-95.
- Taylor, P.J., Salm, P. and Pillans, P.I., "A Detection Scheme for Paraquat Poisoning: Validation and a Five-Year Experience in Australia", *J. Anal. Toxicol.* 25 (2001) 456-460.
- Taylor, R.B., Toasaksiri, S. and Reid, R.G., "Determination of antibacterial quaternary ammonium compounds in lozenges by capillary electrophoresis", *J. Chromatogr. A* 798 (1998) 335-343.
- Tegeler, T. and El Rassi, Z., "Electrically driven Microseparation methods for Pesticides and Metabolites. I-Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography of Carbamate Insecticides with Mega-Borate and SDS Surfactants", *J. AOAC International* 82 (1999) 1542-1549.
- Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando T., "Electrokinetic Separations with Micellar Solutions and Open-Tubular", *Anal. Chem.* 56 (1984) 111-113.
- The Merck Index, 12 edition, Merck Research Laboratories, Merck & Co. Inc., USA, 1996.
- The Pesticide Manual, incorporating The Agrochemicals Handbook, 10th edition, The British Crop Protection Council and the Royal Society of Chemistry, Bath, UK, 1994.
- Thurman, E.M., Ferrer, I. and Barceló, D., "Choosing between Atmospheric Pressure Chemical Ionization and Electrospray Ionization Interfaces for the HPLC/MS Analysis of Pesticides", *Anal. Chem.* 73 (2001) 5441-5449.
- TIS, Technical Information Sheet, Preventol R 50 and Preventol R 80, Bayer, Leverkusen, August 1995.
- Tomita, M., Okuyama, T. and Nigo, Y., "Simultaneous Determination of Paraquat and Diquat in Serum using Capillary Electrophoresis", *Biomed. Chromatogr.* 6 (1992) 91-94.
- Tomlinson, A.J., Benson, L.M., Guzman, N.A. and Naylor, S., "Preconcentration and Microreaction Technology On-line with Capillary Electrophoresis", *J. Chromatogr. A* 744 (1996) 3-15.
- Toribio, F., Moyano, E., Puignou, L. and Galceran, M.T., "Multistep mass spectrometry of heterocyclic amines in a quadrupole ion trap mass analyser", *J. Mass Spectrom.* 37 (2002) 812-828.
- Tucker, B.V. *Diquat environmental chemistry*. Chevron Chemical Corporation, Ortho Agricultural Division, Richmond, VA., 1980.
- Tungsanga, K., Chusilp, S., Israsena, S. and Sitprija, V., "Paraquat poisoning: Evidence of systemic toxicity after dermal exposure", *Postgrad. Med. J.* 59 (1983) 338-339.
- U.S. Department of Agriculture, Soil Conservation Service. SCS/ARS/CES Pesticide Properties Database: Version 2.0 (Summary). USDA-Soil Conservation Service, Syracuse, NY., 1990.
- U.S. Environmental Protection Agency, electronic Code of Federal Regulations (eCFR), Title 40, Part 141, US Government, Rev. 20 february 2004.
- U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances. R.E.D. Facts Mepiquat Chloride, EPA-738-F-96-019, March, 1997.

- U.S. Environmental Protection Agency. 2002 Edition of the Drinking Water Standards and Health Advisories. EPA 822-R-02-038. Office of Water. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2002.
- U.S. Environmental Protection Agency. Code of Federal Regulations, Title 40, Part 141, US Government Printing Office, 1 July 2001.
- U.S. Environmental Protection Agency. New Jersey Department of Health and Senior Services. *Hazardous Substance Fact Sheet Chlormequat*, April, 1999.
- U.S. Environmental Protection Agency. Office of Drinking Water. Paraquat Health Advisory, August 1987. Draft.
- Vahl, M., Graven, A. and Juhler, R.K., "Analysis of Chlormequat residues in grain using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)", *Fresenius J. Anal. Chem.* 361 (1998) 817-820.
- Vale, J.A. and Meredith, T.J., *A concise guide to the management of poisoning*, 3rd editio, Churchill Livingstone, New York, p. 42.
- Vale, J.A., Meredith, T.J. and Buckley, B.M., "Paraquat poisoning: Clinical features and immediate general management", *Hum. Toxicol.* 6 (1987) 41-47.
- Van Berkel, M. and de Wolff, F.A., "Survival after benzalkonium chloride poisoning", *Human Toxicol.* 7 (1988) 191-193.
- Van Emmon, J., Hammock, B. and Seiber, J.N., "Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Paraquat and Its Application to Exposure Analysis", *Anal. Chem.* 58 (1986) 1866-1873.
- Vanholder, R., Colardyn, F., Dereuck, J., Lameire, N., Praet, M. and Ringoir, S., "Diquat intoxication: Report of two cases and review of the literature", *Am. J. Med.* 70 (1981) 1267-1271.
- Veraart, J.R., Lingeman, H. and Brinkman, U.A.T., "Coupling of Biological Sample Handling and Capillary Electrophoresis", *J. Chromatogr. A* 856 (1999) 483-514.
- Vinner, E., Stievenart, M., Humbert, L., Mathieu, D. and Lhermitte, M., "Separation and quantification of paraquat and diquat in serum and urine by capillary electrophoresis", *Biomed. Chromatogr.* 15 (2001) 342-347.
- von Brocke, A., Freudemann, T. and Bayer, E., "Performance of capillary gel electrophoretic analysis of oligonucleotides coupled on-line with electrospray mass spectrometry", *J. Chromatogr. A* 991 (2003) 129-141.
- von Brocke, A., Nicholson, G. and Bayer, E., "Recent advances in capillary electrophoresis/electrospray-mass spectrometry", *Electrophoresis* 22 (2001) 1251-1266.
- Vytras, K. and Simickova-Stajerova, B., "Potentiometric ion-pair formation titrations of bisquaternary cations: determination of diquat and paraquat", *Anal. Chim. Acta* 226 (1989) 177-182.
- Wade, A. and Weller, P.J., ed. *A handbook of pharmaceutical excipients*, 2nd ed. The pharmaceutical press, London, pp. 27-31.
- Wagner, S.L., "Clinical Toxicology of Agricultural Chemicals", Noyes Data Corporation, 1983.
- Walcarius, A. and Lamberts, L., "Square wave voltammetric determination of paraquat and diquat in aqueous solution", *J. Electroanal. Chem.* 406 (1996) 59-68.
- Walker, M.M. and Lawrence, H.K., EPA's Pesticide Fact Sheed Database. Lewis Publishers, Chelsea, MI., 1992.
- Walker, P.A. III, Morris, M.D., Burns, M.A. and Johnson, B.N., "Isotachophoretic Separations on a Microchip. Normal Raman Spectroscopy Detection", *Anal. Chem.* 70 (1998) 3766-3769.

- Walker, P.A., Shaver, J.M. and Morris, M.D., "Identification of Cationic Herbicides in Deionized Water, Municipal Tap Water, and River Water by Capillary Isotachophoresis/On-Line Raman Spectroscopy", *Appl. Spectrosc.* 51 (1997) 1394-1399.
- Warrington, H.P., "Determination of Homolog Distribution of Mixed Alkylbenzyltrimethyl Ammonium Chlorides", *Anal. Chem.* 33 (1961) 1898-1900.
- Waterval, J.C.M., Krabbe, H., Teeuwsen, J., Bult, A., Lingeman, H. and Underberg W.J.M., "Comparison between Transient Isotachophoretic Capillary Zone Electrophoresis and Reversed-Phase Liquid Chromatography for the determination of Peptides in plasma", *Electrophoresis* 20 (1999) 2909-2916.
- Wee, V.T. and Kennedy, J.M., "Determination of Trace Levels of Quaternary Ammonium Compounds in River Water by Liquid Chromatography with Conductimetric Detection", *Anal. Chem.* 54 (1982) 1631-1633.
- Weiss, C.S., Hazlett, J.S., Datta, M.H. and Danzer, M.H., "Determination of quaternary ammonium compounds by capillary electrophoresis using direct and indirect UV detection", *J. Chromatogr.* 608 (1992) 325-332.
- Wey, A.B. and Thromann W., "Capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-ion trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation and identification of oxycodone and its major metabolites in human urine", *J. Chromatogr. B* 770 (2002) 191-205.
- Wigfield, Y.Y., McCormack, K.A. and Grant, R., "Simultaneous Determination of Residues of Paraquat and Diquat in Potatoes Using High-Performance Capillary Electrophoresis with Ultraviolet Detection", *J. Agric. Food. Chem.* 41 (1993) 2315-2318.
- Wilson, J.T. and Burr, I.M., "Benzalkonium chloride poisoning in infants twins", *Am. J. Dis. Child* 129 (1975) 1208-1209.
- Winek, C.L., Wahba, W.W. and Edelstein, J.M., "Sudden Death Following Accidental Ingestion of Chlormequat", *J. Anal. Toxicol.* 14 (1990) 257-258.
- Wittcoff, H.A. and Rewben, G., "Productos Químicos Orgánicos Industriales, Vol. 2: Tecnología, formulación y usos", ed. Limusa, México, 1987.
- World Health Organization. The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 1996-1997. (1996).
- Worobey, B.L., "Analytical Method for the Simultaneous Determination of Diquat and Paraquat Residues in Potatoes by High-Pressure Liquid Chromatography", *Pestic. Sci.* 18 (1987) 245-257.
- Worobey, B.L., "Liquid Chromatographic Method for Determination of Diquat and Paraquat Herbicides in Potatoes: Collaborative Study", *J. AOAC International* 76 (1993) 881-887.
- Worthing, C.R., ed. 1983. The Pesticide Manual: A world compendium. Croydon, England. The British Crop Protection Council.
- WSSA Herbicide Handbook Committee. Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America, 6th Ed. WSSA, Champaign, IL. 1989.
- Wu, W.S. and Tsai, J.L., "Simultaneous determination of paraquat and diquat in urine by capillary electrophoresis", *Kaohsiung J. Med. Science* 14 (1998) 76-80.
- Wycherley, D., Rose, M.E., Giles, K., Hutton, T.M. and Rimmer, D.A., "Capillary electrophoresis with detection by inverse UV spectroscopy and electrospray mass spectrometry for the examination of quaternary ammonium herbicides", *J. Chromatogr. A* 734 (1996) 339-349.
- Xue, Y., Hieda, Y., Kimura, K., Nishiyama, T. and Adachi, T., "Sensitive determination of benzalkonium chloride in blood and tissues using high-performance liquid chromatography with solid-phase extraction", *Legal Medicine* 4 (2002) 232-238.

- Yáñez-Sedeño, P. and Díez, L.M.P., "Spectrophotometric determination of paraquat with Bil4 in the presence of gum arabic", *Talanta* 33 (1986) 745-747.
- Yeung, J.M., Mortimer, R.D. and Collings, P.G., "Development and Application of a Rapid Immunoassay for Difenzoquat in Wheat and Barley Products", *J. Agric. Food Chem.* 44 (1996) 376-380.
- Yoshida, M., Watabiki, T., Tokiyasu, T. and Ishida, N., "Determination of paraquat and diquat by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry", *J. Chromatogr.* 628 (1993) 235-239.
- Yuen, S.H., Bagness, J.E. and Myles, D., "Spectrophotometric Determination of Diquat and Paraquat in Aqueous Herbicide Formulations", *Analyst* 92 (1967) 375-381.
- Zen, J.M., Jeng, S.H. and Chen H.J., "Determination of Paraquat by Square-Wave Voltammetry at a perfluorosulfonated Ionomer/Clay-Modified Electrode", *Anal. Chem.* 68 (1996) 498-502.
- Zeneca points to strong results, *Agrow.* No. 225, 3 February 1995.
- Zhang, C.X. and Thormann, W., "Head-Column Field-Amplified Sample Stacking in Binary System Capillary Electrophoresis. 2- Optimization with a Preinjection Plug and Application to Micellar Electrokinetic Chromatography", *Anal. Chem.* 70 (1998) 540-548.
- Zhao, Y., Lazou, K., Schelfaut, M., De Reu, L. and Sandra, P., "Determination of Chlormequat Residues in Pears and Pear Concentrates by Benchtop LC-ESI-MS", *Chromatographia* 51 (2000) 531-535.
- Zhu, L.Y., Tu, C.H. and Lee, H.K., "Liquid-phase Microextraction of Phenolic compounds combined with on-line preconcentration by Field-Amplified Sample Injection at low pH in Micellar Electrokinetic Chromatography", *Anal. Chem.* 73 (2001) 5655-5660.
- Zrostlíková, J., Hajšlová, J., Poustka, J. and Begany, P., "Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticides residues in plant materials", *J. Chromatogr. A* 973 (2003) 13-26.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

$\mu_{ep}(a)$	Mobilidad Electroforética de la especie "a"
ACN	Acetonitrilo
APCI	Ionización Química a Presión Atmosférica (<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>)
AQ	Voltaje de radiofrecuencia de activación (<i>Activation Q</i>)
ASE	<i>Accelerated Solvent Extractio</i>)
ASEI	Inyección Amplificada y Selectiva de Aniones (<i>Anion-Selective Exhaustive Injection</i>)
BAC	Cloruro de Benzalconio (<i>Benzalkonium Chloride</i>)
BDP	Directiva de Productos Biocidas (<i>Biocidal Products Directive</i>)
BGE	Electrolito de Trabajo (<i>Background Electrolyte</i>)
BZK	Cloruro de Benzalconio (<i>Benzalkonium Chloride</i>)
C ₁₀	Decilo
C ₁₂	Dodecilo
C ₁₄	Tetradecilo
C ₁₆	Hexadecilo
C ₁₈	Octadecilo
C ₈	Octilo
CAS	<i>Chemical Abstract Service</i>
CE	Electroforesis Capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CEC	Electrocromatografía Capilar (<i>Capillary Electrochromatography</i>)
CID	Fragmentación Inducida por Colisión (<i>Collision-induced Dissociation</i>)
CIEF	Isoelectroenfoque Capilar (<i>Capillary Isoelectrofocusing</i>)
cITP	Isotacoforesis Capilar (<i>Capillary Isotachophoresis</i>)
CN	Ciano
CQ	Clormecuat
CSEI	Inyección Amplificada y Selectiva de Cationes (<i>Cation-Selective Exhaustive Injection</i>)
CZE	Electroforesis Capilar de Zona (<i>Capillary Zone Electrophoresis</i>)
d.i.	Diámetro Interno
DDMAC	Cloruro de dimetildidecilaamonio (<i>Dimethyldidecylammonium Chloride</i>)
DF	Difenzocuat
DQ	Dicuat
DWEL	Nivel Equivalente para Aguas de Consumo (<i>Drinking Water Equivalent Level</i>)

EC _x	Concentración Efectiva (<i>Effective Concentration</i>)
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EOF	Flujo Electroosmótico (<i>Electroosmotic Flow</i>)
ESI	Ionización por Electropulverización (<i>Electrospray Ionisation</i>)
EV	Etilviológeno
FASI	<i>Field-Amplified Sample Inyección</i>
FASS	<i>Field-Amplified Sample Stacking</i>
FESI	<i>Field-Enhancement Sample Injection</i>
FT-ICR	Resonancia Ciclotrónica de Iones con Transformada de Fourier (<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance</i>)
GC	Cromatografía de Gases (<i>Gas Chromatography</i>)
GCE	Electroforesis Capilar en Gel (<i>Capillary Gel Electrophoresis</i>)
HCS	Disolución de Elevada Conductividad (<i>High Conductivity Solution</i>)
HV	Heptilviológeno
IA	Ingrediente Activo
ISEI	Inyección Amplificada y Selectiva de Iones (<i>Ion-Selective Exhaustive Injection</i>)
IT	Trampa de Iones (<i>Ion-Trap</i>)
ITC	Isotacoforesis Capilar
IUPAC	Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
k	Factor de retención / cte. de asociación soluto-micela
K _{ow}	Constante octanol-agua
LBS	Laurilbencenosulfonato de Sodio (<i>Sodium Laurylbencenesulfonate</i>)
LC	Cromatografía de Líquidos (<i>Liquid Chromatography</i>)
LC _x	Concentración Letal (<i>Lethal Concentration</i>)
LD ₅₀	Dosis Letal para el 50% población de muestra (<i>Lethal Dose</i>)
LDS	Dodecilsulfato de Litio (<i>Litium dodecylsulfate</i>)
LE	Electrolito de cabeza (<i>Lead Electrolyte</i>)
LIF	Fluorescencia Inducida por Láser (<i>Laser Induced Fluorescence</i>)
LMT	N-lauril-N-metilaurato de Sodio (<i>Sodium N-lauryl-N-methyltaurate</i>)
LOD	Límite de Detección (<i>Limit of Detection</i>)
LSA	Laurilsulfoacetato de Sodio (<i>Sodium laurylsulfoacetate</i>)
MALDI	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation</i>

mBGE	Electrolito de Trabajo micelar (<i>Micellar Background Electrolyte</i>)
MCL	Nivel máximo para un contaminante (<i>Maximum Contaminant Level</i>)
MCLG	Nivel máximo objetivo para un contaminante (<i>Maximum Contaminant Level Goal</i>)
MCX	Resinas de intercambio iónico débil
MEKC	Cromatografía Electrocinética Micelar (<i>Micellar Electrokinetic Chromatography</i>)
MQ	Mepicuat
MRM	<i>Multiple Reaction Monitoring</i>
MS	Espectrometría de Masas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometría de Masas en Tándem
MS ⁿ	Espectrometría de Masas en Tándem Múltiple (<i>Multi-step Mass Spectrometry</i>)
nmBGE	Electrolito de Trabajo no micelar (<i>Non-micellar Background Electrolyte</i>)
PGC	Carbono grafitado poroso (<i>Porous Graphitic Carbon</i>)
PQ	Paracuat
Q	Cuadrupolo (<i>Quadrupole</i>)
RfD	Dosis de Referencia (<i>Reference Dose</i>)
RSD	Desviación Estándar Relativa (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SCS	Cetilsulfato de Sodio (<i>Sodium cetylsulfate</i>)
SCX	Resinas de intercambio iónico fuerte
SDS	Dodecilsulfato de sodio (<i>Sodium dodecylsulfate</i>)
SIM	<i>Single Ion Monitoring</i>
SMS	Miristilsulfato de Sodio (<i>Sodium myristilsulfate</i>)
SPE	Extracción en Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SRM	<i>Selected Reaction Monitorin</i>
TE	Electrolito Terminal (<i>Terminal Electrolyte</i>)
tITP	<i>Transient Isotachopheresis</i>
TOF	Tiempo de Vuelo (<i>Time-of-Flight</i>)
TQ	Triple Cuadrupolo (<i>Triple Quadrupole</i>)
u.a.	Unidades arbitrarias
UE	Unión Europea
US EPA	Agencia de Protección del Medioambiente de los EEUU (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)
UV	Ultravioleta