

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

APORTACIONES DE LA QUÍMICA ANALÍTICA A LA  
RESOLUCIÓN DE DIVERSOS PROBLEMAS  
MEDIOAMBIENTALES

YOLANDA MOLINER MARTÍNEZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 5 de Juliol de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Miguel Valcárcel Cases
- D<sup>a</sup>. Miranda Keith-Roach
- D<sup>a</sup>. Amparo Salvador Carreño
- D. Ángel Rios Castro
- D<sup>a</sup>. Carmen Molins Legua

Va ser dirigida per:

D<sup>a</sup>. Pilar Campins Falcó

D<sup>a</sup>. Rosa Herráez Hernández

©Copyright: Servei de Publicacions  
Yolanda Moliner Martínez

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6366-3

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115



**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA  
FACULTAD DE QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

**APORTACIONES DE LA QUÍMICA ANALÍTICA A  
LA RESOLUCIÓN DE DIVERSOS PROBLEMAS  
MEDIOAMBIENTALES.**

**TESIS DOCTORAL  
Yolanda Moliner Martínez  
Abril 2005**





**UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA**

La Dra. Dña. Pilar Campíns Falcó, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia y la Dra. Dña. Rosa Herráez Hernández, Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que la presente Memoria, "*Aportaciones de la Química Analítica a la resolución de diversos problemas medioambientales*", realizada en el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Valencia, constituye la Tesis Doctoral en la modalidad Europea de Dña. Yolanda Moliner Martínez.

Así mismo, certifican haber dirigido y supervisado tanto los diferentes aspectos del trabajo así como su redacción.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos la presente en Valencia a 14 de Abril de 2005.

Dra. Pilar Campíns Falcó

Dra. Rosa Herráez Hernández



*A José y Toñi,  
mis padres.*





## ***Agradecimientos.***

*Son muchos los motivos que tengo para agradecer el estar escribiendo esta Tesis y seguramente las palabras que aquí escribo no son suficientes para expresar el agradecimiento, aprecio y cariño que siento por estas personas. En cualquier caso, lo intentaré.*

A Pilar y Rosa por haberme dado esta oportunidad. Por todo el esfuerzo, trabajo y dedicación con esta Tesis. Además de su labor como directoras de Tesis, la amistad durante estos años, es otro de los motivos que debo agradecerles.

A José y Toñi, mis padres, las personas que más admiro por el sacrificio que hicieron y siguen haciendo. Ellos como modelo a seguir y siempre a mi lado, han hecho que yo haya llegado hasta aquí, algo que nunca sabré como agradecerles.

A Laura, mi hermana, amiga y compañera. Le agradezco, su valentía, fuerza de voluntad y gran corazón que en tantas ocasiones ha mostrado. También al resto de mi familia, sobre todo a mi abuela Araceli.

A Alberto, que ha estado presente en cada una de las etapas de esta tesis apoyándome, ayudándome, haciéndome sonreír cada día y dando *vida* a mi vida.

A Adela, Carmen y Jorge, por haber estado cuando os he necesitado, no solo en cuestiones de trabajo, sino también, cuando he necesitado hablar con alguien.

A Susana, Chelo, Alberto, Maite, Luis, Victoria, Ángel, José Ramón y Virginia con los que he compartido tantos buenos ratos durante el trabajo, por su amistad y su apoyo.

A Paul Worfold, Miranda Keith-Roach y a todos los compañeros de su grupo de investigación por haberme dado la posibilidad de trabajar con ellos durante tres meses.

A Maria, Jordi, Felipe, Iván, Lourdes, Mamen, Rafa y Juan más que mis amigos, parte de mi familia, por todos y cada uno de los momentos que hemos pasado juntos durante y después de la carrera.

A Eli y Sara, mis amigas, por seguir ahí, después de más de quince años de alegrías y penas. También a Jorge, Maite y Paco.

Finalmente, recordar a Teresa, Pepe y Manolo, mis abuelos, porque creo les hubiera gustado ver esta Tesis.



## Índice.

<b>Listado de Figuras .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Listado de Tablas.....</b>	<b>XVII</b>
<b>Listado de símbolos y abreviaturas .....</b>	<b>XX</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>1</b>
<b><u>Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....</u></b>	<b>7</b>
<b>1.1. Análisis medioambiental.....</b>	<b>9</b>
1.1.1. Análisis de agua.....	11
1.1.2. Análisis de aire.....	15
<b>1.2. Analitos y métodos analíticos .....</b>	<b>23</b>
1.2.1. Cromo, cobalto, cobre y uranio.....	23
1.2.2. Amonio y amoniaco.....	26
1.2.3. Aminas primarias y secundarias.....	27
<i>Reacción con OPA.....</i>	<i>29</i>
<i>Reacción con DBS-Cl.....</i>	<i>29</i>
<i>Reacción con ninhidrina.....</i>	<i>30</i>
<i>Reacción con NQS.....</i>	<i>30</i>
<b>1.3. Tendencias actuales en la Química Analítica Medioambiental.....</b>	<b>33</b>
<b>1.4. Reactivos .....</b>	<b>35</b>
<b>1.5. Instrumentación, software y montajes.....</b>	<b>37</b>
<b>1.6. Bibliografía.....</b>	<b>41</b>
<b><u>Capítulo 2. RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN.....</u></b>	<b>47</b>
<b>2.1. Calidad del agua.....</b>	<b>49</b>
2.1.1. Influencia de los protocolos de acondicionamiento en muestras de agua en la detección quimioluminiscente directa de elementos traza.....	50
<i>Señal quimioluminiscente para patrones sin acidificar.....</i>	<i>52</i>
<i>Señal quimioluminiscente para patrones acondicionados         con HCl.....</i>	<i>54</i>
<i>Señal quimioluminiscente para patrones acondicionados         con HNO<sub>3</sub>.....</i>	<i>56</i>
<i>Aplicabilidad.....</i>	<i>56</i>

<i>Conclusiones</i> .....	59
2.1.2. Mejora de los límites de detección para amonio y amoniaco obtenidos con la reacción de Berthelot mediante el uso de extracción en fase sólida acoplada a reflectancia difusa.....	<b>61</b>
<i>Efecto de las variables experimentales</i> .....	62
<i>Parámetros analíticos</i> .....	63
<i>Comparación con el procedimiento UV-vis convencional y con el método basado en un sensor</i> .....	64
<i>Interferencias</i> .....	65
<i>Aplicación de la medida de amonio a muestras reales de agua</i> .....	66
<i>Conclusiones</i> .....	67
2.1.3. Determinación de amonio con el método basado en la reacción de indotimol en aguas contaminadas con ácidos húmicos y surfactantes.....	<b>69</b>
<i>Estudio preliminar</i> .....	71
<i>Influencia de los surfactantes en la reacción de derivatización</i> .....	72
<i>Influencia de los ácidos húmicos</i> .....	72
<i>Análisis de muestras de aguas</i> .....	75
<i>Conclusiones</i> .....	79
2.1.4. Guía para la elección del método más apropiado para la estimación de amonio en función de los requisitos del análisis de agua.....	<b>81</b>
<i>Características analíticas</i> .....	83
<i>Toxicidad de los reactivos</i> .....	86
<i>Adecuación de los métodos a distintos tipos de análisis</i> .....	87
<i>Conclusiones</i> .....	89
<b>2.2. The impact of a disused mine on uranium transport in river Fal, South West, England</b> .....	<b>91</b>
<i>Method development</i> .....	93
<i>Matrix effect for U determination</i> .....	93
<i>Quality assurance</i> .....	93
<i>Data</i> .....	94
<i>Field measurements and supporting physico-chemical data</i> ..	94
<i>Iron in water and sediment samples</i> .....	96
<i>Uranium in water and sediment sample</i> .....	96
<i>Discussion</i> .....	100
<b>2.3. Eutrofización del agua</b> .....	<b>103</b>
2.3.1. Ensayo fluorimétrico rápido para el screening de grupos amino primarios en muestras de agua.....	<b>104</b>
<i>Enriquecimiento de los analitos</i> .....	105
<i>Derivatización</i> .....	105
<i>Análisis de muestras reales de agua</i> .....	108

<i>Conclusiones</i> .....	109
2.3.2. Análisis de monoaminas alifáticas primarias de cadena corta por CL en muestras de agua.....	<b>111</b>
<i>Derivatización fuera de línea: derivatización en disolución frente a derivatización asistida en soporte sólido</i> .....	112
<i>Derivatización en columna</i> .....	118
<i>Derivatización asistida en soporte sólido en línea</i> .....	119
<i>Comparación de los procedimientos</i> .....	121
<i>Conclusiones</i> .....	121
2.3.3. Ventajas de la CL capilar para el screening de amonio y nitrógeno amino primario.....	<b>123</b>
<i>Análisis de screening</i> .....	124
<i>Cuantificación de amonio y aminos alifáticos</i> .....	127
<i>Comparación con la CL convencional</i> .....	129
<i>Análisis de muestras reales</i> .....	130
<i>Conclusiones</i> .....	133
2.3.4. Soportes detectores: aplicación a aminos alifáticos en aguas residuales.....	<b>134</b>
<i>Elección del soporte y optimización de las condiciones experimentales</i> .....	135
<i>Parámetros analíticos</i> .....	137
<i>Utilidad</i> .....	139
<i>Conclusiones</i> .....	140
<b>2.4. Calidad del aire y riesgos laborales</b> .....	<b>141</b>
2.4.1. Evaluación de los cartuchos de absorción C <sub>18</sub> para el muestreo y derivatización de aminos primarios.....	<b>142</b>
<i>Optimización del muestreo para patrones de aire</i> .....	143
<i>Respuestas para las disoluciones de patrones</i> .....	143
<i>Estudio de las respuestas de mezclas de aminos</i> .....	144
<i>Análisis de muestras de aire</i> .....	146
<i>Conclusiones</i> .....	146
2.4.2. Determinación de dimetilamina en aire mediante muestreo y derivatización en soporte sólido y análisis espectrofotométrico.....	<b>147</b>
<i>Generación de patrones en la cámara de volatilización abierta</i> .....	148
<i>Análisis de los patrones de gaseosos de las aminos</i> .....	150
<i>Inspección visual</i> .....	153
<i>Análisis de muestras de aire</i> .....	153
<i>Conclusiones</i> .....	156
2.4.3. Aplicación de la reacción de Berthelot a la determinación de amoniaco en aire mediante EFS acoplada a la espectroscopia de reflectancia difusa.....	<b>157</b>
<i>Generación de patrones en aire</i> .....	158

<i>Parámetros analíticos</i> .....	158
<i>Aplicación a muestras de aire</i> .....	159
<i>Conclusiones</i> .....	160
<b>2.5. Bibliografía</b> .....	<b>161</b>
<b>Capítulo 3. General Conclusions</b> .....	<b>169</b>
<b>Capítulo 4. Apéndices</b> .....	<b>181</b>
<i>Apéndice 1. *Influence of water sample storage protocols in chemiluminescence detection of trace elements</i> .....	185
<i>Apéndice 2. *Improved detection limit for ammonium and ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy</i> .....	187
<i>Apéndice 3. Determination of ammonium with the indophenol-type reaction method in polluted samples containing humic acids and/or surfactants</i> .....	189
<i>Apéndice 4. A guide for selecting the most appropriate method for ammonium estimation as function of water analysis requirements</i> .....	205
<i>Apéndice 5. *The impact of a disused mine on uranium transport in the River Fal, South West England</i> .....	219
<i>Apéndice 6. *Rapid fluorimetric assay for primary amine groups in water samples</i> .....	221
<i>Apéndice 7. *Analysis of primary aliphatic short-chain monoamines by LC in water samples</i> .....	223
<i>Apéndice 8. Advantages of Capillary LC for screening of ammonium and primary amino nitrogen and its contribution to eutrophication</i> .....	225
<i>Apéndice 9. *Detector supports: application to aliphatic amines in wastewater</i> .....	241
<i>Apéndice 10. Evaluation of C<sub>18</sub> adsorbent cartridges for sampling and derivatization of primary amines in air</i> .....	243
<i>Apéndice 11. *A method for the determination of dimethylamine in air by collection on solid support sorbent with subsequent derivatization and spectrophotometric analysis</i> .....	245

\* De los apéndices marcados solo se detalla la referencia bibliográfica y el enlace URL en el caso de que la versión electrónica esté contratada por la Universidad de Valencia, ya que se trata de artículos publicados en revistas comerciales.

## Listado de figuras.

	<u>Pag</u>
<b>Figura 1.</b> Interacciones entre los componentes de la biosfera..	9
<b>Figura 2.</b> Porcentajes de publicaciones para diversas muestras de interés ambiental	11
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de reacción propuesto para el luminol.....	25
<b>Figura 4.</b> Mecanismo de la reacción de Berthelot propuesto para el timol.....	27
<b>Figura 5.</b> Esquema de reacción del OPA/NAC con aminas primarias	29
<b>Figura 6.</b> Esquema de reacción para el DBS-Cl y aminas primarias.....	30
<b>Figura 7.</b> Esquema de reacción para la ninhidrina con metilamina.....	30
<b>Figura 8.</b> Esquema de reacción para el NQS con una amina secundaria.....	30
<b>Figura 9.</b> A) Bomba de aire, B) Medidor de flujo y C) Bomba de detección de gases.....	37
<b>Figura 10.</b> Fluorímetro Hitachi F4500.....	37
<b>Figura 11.</b> A) Espectrofotómetro de fila de diodos UV-vis HP8452. B) Espectrofotómetro de fila de diodos HP 8453 con accesorio Labsphere RSA 8453.....	38
<b>Figura 12.</b> A) Equipo cromatográfico HP1100. B) Detector de fluorescencia HP 1046...	38
<b>Figura 13.</b> Sistema de cromatografía líquida capilar HP 1100.....	39
<b>Figura 14.</b> Esquema montaje FIA utilizado en el <i>Apéndice 1</i> .....	39
<b>Figura 15.</b> Esquema de columnas acopladas empleado para el screening de aminas ( <i>Apéndice 7</i> ).....	40
<b>Figura 16.</b> Esquema para la volatilización y muestreo de patrones de aminas en aire.....	40
<b>Figura 17.</b> Esquema para la generación de muestras sintéticas de aire.....	40
<b>Figura 18.</b> Señales quimioluminiscentes para Cr y Co con el procedimiento en estático.....	57
<b>Figura 19.</b> Pendiente de la curva de calibrado en el intervalo lineal en las diferentes condiciones experimentales. <b>1:</b> Sin acondicionar; <b>2:</b> HCl $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>3:</b> HNO <sub>3</sub> 0.5; <b>4:</b> EDTA $10^{-2}$ ; <b>5:</b> EDTA $1 \cdot 10^{-2}$ , HCl $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>6:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>7:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ , HCl $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>8:</b> EDTA $10^{-2}$ (portador KOH); <b>9:</b> EDTA $10^{-2}$ (portador tampón); <b>10:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ (portador KOH); <b>11:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ (portador tampón); <b>12:</b> EDTA $10^{-2}$ (portador tampón), HCl $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>13:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ (portador KOH), HCl $5 \cdot 10^{-3}$ ; <b>14:</b> EDTA $5 \cdot 10^{-3}$ (portador tampón), HCl $5 \cdot 10^{-3}$ . (Concentración: M) .....	57
<b>Figura 20.</b> Porcentajes de recuperación de la señal para diferentes mezclas de metales...	58
<b>Figura 21.</b> Porcentajes de recuperación del SRM © 1640 respecto a mezcla de patrones en diferentes condiciones experimentales.....	59
<b>Figura 22.</b> Espectros de reflectancia difusa obtenidos bajo condiciones óptimas para el blanco y dos disoluciones de amonio.....	63
<b>Figura 23.</b> Asignación de concentración para el ensayo visual.....	64
<b>Figura 24.</b> Valores de reflectancia obtenidos para concentraciones variables de amonio por el método del soporte con EFS (1), y con los sensores preparados con (2) timol y salicilato (3).....	65
<b>Figura 25.</b> Efecto de los surfactantes catiónicos, aniónicos y no-iónicos en la señal de absorbancia del amonio.....	72
<b>Figura 26.</b> Pendientes de las curvas de calibrado en función de la longitud de onda obtenidas con el método colorimétrico para la determinación de amonio, 1: sin HA, 2:	73

HA 5 mg L <sup>-1</sup> , 3: HA 12.5 mg L <sup>-1</sup> y 4: 25 mg L <sup>-1</sup> .....	
<b>Figura 27.</b> Pendientes de las curvas de calibrado en función de la longitud de onda obtenidas con el método EFS/reflectancia para la determinación de amonio 1: sin HA, 2: HA 5 mg L <sup>-1</sup> , 3: HA 12.5 mg L <sup>-1</sup> y 4: 25 mg L <sup>-1</sup> .....	74
<b>Figura 28.</b> Concentración de amonio y ácido húmico (mg L <sup>-1</sup> ) en las muestras sintéticas analizadas por el a) método colorimétrico y b) método EFS/ reflectancia difusa.....	75
<b>Figura 29.</b> Gráficos a) A <sup>2</sup> /M <sup>2</sup> vs λ para la muestra sintética ss8 y b) R <sup>2</sup> /M <sup>2</sup> vs λ para la muestra real rs6.....	76
<b>Figura 30.</b> Recuperaciones para muestras reales de agua fortificadas con 0.25 mg L <sup>-1</sup> con 1: método colorimétrico y con 0.025 mg L <sup>-1</sup> para 2: método EFS/reflectancia.....	79
<b>Figura 31.</b> Concentración de amonio para las muestras de agua analizadas en la bibliografía y valores de referencia de amonio.....	88
<b>Figura 32.</b> Probabilidad de respuesta positiva con el método del indotimol vs concentración de amonio empleando las respuestas de dos operadores expertos y seis no expertos.....	89
<b>Figura 33.</b> Concentration of a) iron (mg L <sup>-1</sup> ) and b) uranium (µg L <sup>-1</sup> ) in the water samples taken on the 2nd expedition. The first column in each set (horizontal stripes) represents the total concentration; the second column (black) represents the operationally defined dissolved (<0.20 µm) fraction; the third column (white) represents the colloidal (0.20 - 0.45 µm) fraction; and, the final column (angled stripe) represents the particulate (>0.45 µm) fraction. Uncertainties show 1σ of 3 flame AAS measurements for Fe and 1σ of the RSD over 48 standard additions to the water samples for uranium. Where two samples are used to calculate the concentration in the fraction, the errors are calculated as the error sum of squares of the two component errors.....	99
<b>Figura 34.</b> Efecto del volumen de NaOH en la disolución de amina eluida en medio ácido acético.....	105
<b>Figura 35.</b> Espectros de emisión normalizados para metilamina; 1, 2, 3 y derivatización en disolución y concentración de amina 0.2, 0.3, 0.6 y 1 mg L <sup>-1</sup> respectivamente; 5, 6, 7 y 8 derivatización asistida en soporte sólido para una concentración de amina 0.125, 0.25, 0.5 y 1 mg L <sup>-1</sup> respectivamente.....	106
<b>Figura 36.</b> Variación con el tiempo del derivado OPA-metilamina formado en disolución, después de la reacción con: 1: OPA/NAC 3.7· 10 <sup>-3</sup> M (10:1) a pH 8 y 2: 3.7 10 <sup>-3</sup> M (1:1) a pH 8.....	112
<b>Figura 37.</b> Cromatogramas obtenidos para las aminas. a) derivatización en disolución, 3.7 10 <sup>-3</sup> M (1:1) (15 mg L <sup>-1</sup> ), b) derivatización en soporte sólido fuera de línea (0.2 mg L <sup>-1</sup> MA y 0.5 mg L <sup>-1</sup> las demás y c) derivatización en columna (1.5 mg L <sup>-1</sup> MA y 5 mg L <sup>-1</sup> las demás).....	113
<b>Figura 38.</b> Cromatogramas correspondientes a una mezcla de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina, a) derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea (0.2, 0.5, 0.5, 0.5 y 0.5 mg L <sup>-1</sup> ); b) derivatización en columna (0.75, 2.5, 2.5, 2.5 y 2.5 mg L <sup>-1</sup> ).....	116
<b>Figura 39.</b> Cromatogramas obtenidos para la muestra de agua residual y la muestra fortificada, a) derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea, b) derivatización en columna y c) derivatización en soporte sólido en línea.....	117
<b>Figura 40.</b> Recuperaciones obtenidas empleando una etapa de preconcentración con EFS fuera de línea.....	118
<b>Figura 41.</b> Efecto del tiempo de preconcentración en la respuesta analítica para la	119



derivatización asistida en soporte sólido en línea. Metilamina 1.5 mg L <sup>-1</sup> , etilamina 3.5 mg L <sup>-1</sup> , propilamina, butilamina y pentilamina 5 mg L <sup>-1</sup> .....	
<b>Figura 42.</b> Cromatogramas obtenidos con derivatización asistida en soporte sólido en línea para a) metilamina (0.75 mg L <sup>-1</sup> ) y etilamina (1.58 mg L <sup>-1</sup> ) y b) límite de detección de MA, EA, PA, BA y PenA: 2, 15, 20, 30 y 40 ng mL <sup>-1</sup> . Ambos comparados con una mezcla de MA, EA, PA, BA y PenA (0.75, 1.58, 2, 2 y 2 mg L <sup>-1</sup> ).....	120
<b>Figura 43.</b> Cromatogramas obtenidos con detección UV-vis para A) amino ácidos (1 mg L <sup>-1</sup> ) y aminas alifáticas (MA 0.25 mg L <sup>-1</sup> y EA, PA, BA, PenA 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) ( <i>Gradiente 1</i> ) y B) amonio (2 mg L <sup>-1</sup> ) y aminas alifáticas (MA 0.25 mg L <sup>-1</sup> y EA, PA, BA, PenA 0.5 mg L <sup>-1</sup> ) ( <i>Gradiente 2</i> ). 1: amonio, 2: metilamina, 3: etilamina, 4: propilamina, 5: butilamina y 6: pentilamina. aa1: valina, aa2: triptofano, aa3: fenilalanina, aa4: isoleucina, aa5: leucina y aa6: lisina.....	125
<b>Figura 44.</b> Cromatogramas obtenidos con detección fluorescente para A) amino ácidos (0.5 mg L <sup>-1</sup> ) y aminas alifáticas (MA 0.05 mg L <sup>-1</sup> y EA, PA, BA, PenA 0.1 mg L <sup>-1</sup> ) ( <i>Gradiente 3</i> ) y B) amonio (2 mg L <sup>-1</sup> ) y aminas alifáticas ((MA 0.08 mg L <sup>-1</sup> y EA, PA, BA, PenA 0.16 mg L <sup>-1</sup> ) ( <i>Gradiente 4</i> ). 1: amonio, 2: metilamina, 3: etilamina, 4: propilamina, 5: butilamina y 6: pentilamina.....	126
<b>Figura 45.</b> Pendientes (mg L <sup>-1</sup> ) obtenidas con detección UV-vis para las curvas de calibrado lineales con 1 y 0.1 mL de muestra.....	128
<b>Figura 46.</b> A) Cromatograma correspondiente a la muestra de agua residual obtenido con los <i>Gradientes 3</i> y <i>4</i> (detección fluorescente). 1: amonio, 2: metilamina, 3: etilamina, 4: propilamina y 5: pentilamina. B) Cromatograma obtenido para la muestra de agua de lluvia con el <i>Gradiente 2</i> (detección UV-vis). 1: amonio.....	132
<b>Figura 47.</b> Comparación de registros de reflectancia difusa a 8° para 10 mL de disolución de metilamina (1 mg L <sup>-1</sup> ) con DBS en función del disco de extracción 1 y 4: blanco y amina con discos SDB-XC y 2 y 3: blanco y amina con disco C <sub>18</sub> .....	135
<b>Figura 48.</b> Asignación de concentraciones de metilamina con inspección visual.....	136
<b>Figura 49.</b> Espectros de reflectancia difusa a 8° con ninhidrina (25· 10 <sup>-3</sup> M) en discos C <sub>18</sub> para 1: blanco, 2: pentilamina, 3: propilamina, 4: butilamina, 5: etilamina y 6: metilamina.....	136
<b>Figura 50.</b> Espectro obtenido con la transformación K-M para metilamina y dimetilamina derivatizadas con NQS. 1: blanco, 2 y 4: metilamina 10 y 20 mg L <sup>-1</sup> , 3 y 5: dimetilamina 20 y 75 mg L <sup>-1</sup> .....	137
<b>Figura 51.</b> Espectros normalizados para aire 1, 2, 3, 4, 5 y 6: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y una mezcla de todas respectivamente y para agua 7, 8, 9, 10, 11 y 12: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y una mezcla de todas. La concentración 1 µg por muestra excepto pentilamina 2 µg por muestra.....	144
<b>Figura 52.</b> Espectros normalizados para una mezcla de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina 1 µg por muestra y pentilamina 2 µg por muestra para 1,2: matrices de aire y 3 y 4: matrices de agua. ....	145
<b>Figura 53.</b> Eficiencias obtenidas para dimetilamina (20 µg) en función de a) disolvente de los patrones, b) concentración de NaOH y c) tiempo de muestreo.....	149
<b>Figura 54.</b> Espectros de los derivados de las aminas con NQS. Dimetilamina 40 µg, metil-, etil-, propil-, butil-, pentil- y dietilamina 80 µg.....	150
<b>Figura 55.</b> Sensibilidades (pendiente de la curva de calibrado lineal ) a 480 nm para las aminas ensayadas.....	152
<b>Figura 56.</b> Fotos de los cartuchos de EFS después de la derivatización de las aminas	

recogidas en aire a) blanco (izquierda), metilamina 20 $\mu\text{g}$ (centro) y 140 $\mu\text{g}$ , b) metilamina 140 $\mu\text{g}$ (izquierda), metilamina 140 $\mu\text{g}$ más dimetilamina 140 $\mu\text{g}$ (centro) y dimetilamina 140 $\mu\text{g}$ (derecha) y c) blanco (izquierda), dimetilamina 20 $\mu\text{g}$ (centro) y 140 $\mu\text{g}$ (derecha). .....	154
<b>Figura 57.</b> Concentración de dimetilamina ( $\text{mg m}^{-3}$ ) en muestras sintéticas de aire generadas después de 17 horas de contaminación en función del tiempo de muestreo.....	154
<b>Figura 58.</b> Asignación de cantidades de amoníaco en aire para el ensayo visual.....	159

## Listado de tablas.

	<u>Pag.</u>
<b>Tabla 1.</b> Especies presentes en el agua.....	12
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de contaminantes de agua en función de su naturaleza.....	12
<b>Tabla 3.</b> Legislación vigente en materia de aguas.....	14
<b>Tabla 4.</b> Composición química del aire en las proximidades del suelo.....	16
<b>Tabla 5.</b> Contaminantes primarios y secundarios más destacados.....	17
<b>Tabla 6.</b> Legislación vigente en materia de contaminación atmosférica.....	18
<b>Tabla 7.</b> Listado de algunos contaminantes en aire interior.....	19
<b>Tabla 8.</b> Normativa legal relacionada con la calidad del aire interior.....	21
<b>Tabla 9.</b> Concentraciones máximas permitidas y métodos de referencia para los analitos estudiados en aguas.....	31
<b>Tabla 10.</b> Valores límite ambientales y métodos de referencia para amoníaco y aminas en aire.....	32
<b>Tabla 11.</b> Listado de reactivos.....	35
<b>Tabla 12.</b> Estudios de la determinación quimioluminiscente en flujo de iones metálicos en muestras de agua.....	51
<b>Tabla 13.</b> Composición de SRM©1640: agua natural.....	52
<b>Tabla 14.</b> Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras no acidificadas con el procedimiento en flujo. a) KOH 0.02 M y b) $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 0.3 M pH 10.8.....	53
<b>Tabla 15.</b> Parámetros analíticos de las curvas de calibrado de patrones no acidificados mediante el procedimiento en estático.....	54
<b>Tabla 16.</b> Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras acidificadas con HCl $5 \cdot 10^{-3}$ M con el procedimiento en flujo. a) KOH 0.02 M y b) $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$ 0.3 M pH 10.8.....	55
<b>Tabla 17.</b> Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras acidificadas con $\text{HNO}_3$ y procedimiento en flujo.....	56
<b>Tabla 18.</b> Condiciones seleccionadas para la determinación de amonio en agua.....	63
<b>Tabla 19.</b> Parámetros analíticos obtenidos para amonio en agua por el procedimiento clásico y el método propuesto.....	64
<b>Tabla 20.</b> Efecto de algunas especies en la señal obtenida para amonio $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ .....	66
<b>Tabla 21.</b> Concentraciones de amonio encontradas ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en muestras reales de agua por diferentes métodos.....	67
<b>Tabla 22.</b> Características analíticas obtenidas con fenol, timol y salicilato con el método colorimétrico y con timol con el método EFS/reflectancia difusa.....	71
<b>Tabla 23.</b> Parámetros analíticos para la determinación de amonio en presencia de diferentes cantidades de ácido húmico.....	74
<b>Tabla 24.</b> Recuperaciones para las muestras sintéticas con ambas metodologías.....	77
<b>Tabla 25.</b> Concentración de amonio y %Er para muestras sintéticas y muestras reales.....	78
<b>Tabla 26.</b> Legislación, concentraciones máximas permitidas y valor guía de la OMS en función del tipo de agua.....	81
<b>Tabla 27.</b> Procedimientos empleados para la determinación de amonio.....	84
<b>Tabla 28.</b> Características analíticas de los procedimientos estudiados.....	85
<b>Tabla 29.</b> Reactivos, instrumentos y costes de personal para los procedimientos	

propuestos.....	86
<b>Tabla 30.</b> Toxicidad de los principales reactivos y residuos generados.....	87
<b>Tabla 31.</b> Concentración de amonio en los diferentes tipos de aguas.....	89
<b>Tabla 32.</b> Conductivity, pH, alkalinity and concentrations of calcium, magnesium, sodium and potassium in the 1 <sup>st</sup> and 2 <sup>nd</sup> expedition unfiltered water samples. The uncertainties show $\pm 1s$ on three replicates measurements, with exceptions of conductivity and pH which were measured once.....	95
<b>Tabla 33.</b> Loss on ignition (%) and iron and uranium concentrations ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) in two size fractions of the sediments samples, quoted to 1 decimal place. The uncertainties show $\pm 1s$ on three replicates for loss on ignition, $\pm 1s$ flame AAS measurements for iron and $\pm 1s$ of three ICP-MS measurements for uranium.....	95
<b>Tabla 34.</b> Matrix of correlations coefficients ( $R^2$ ) between sediments phase uranium and iron concentrations, uranium/iron ratios and loss on ignition values.....	96
<b>Tabla 35.</b> Uranium concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) in water samples collected on the 1 <sup>st</sup> expedition samples and in those collected at the same localities on the 2 <sup>nd</sup> expedition. The uncertainties show $\pm 1s$ of 5 $\text{mg L}^{-1}$ uranium standard addition to the 48 water samples.....	97
<b>Tabla 36.</b> Matrix of the correlation coefficients ( $R^2$ ) between water phase uranium concentrations.....	98
<b>Tabla 37.</b> Matrix of the correlation coefficients ( $R^2$ ) between uranium and total cation concentrations in the unfiltered and filtered (0.2 and 0.45 $\mu\text{m}$ ) water samples.....	98
<b>Tabla 38.</b> Parámetros analíticos para la determinación de aminas primarias en muestras.....	107
<b>Tabla 39.</b> Precisión del método para aminas alifáticas.....	107
<b>Tabla 40.</b> Resultados para mezclas de aminas. X( $\mu\text{M}$ ): concentración total de aminas considerando la señal individual de cada amina. Y( $\mu\text{M}$ ): concentración total de aminas empleando la curva de calibrado de la metilamina.....	108
<b>Tabla 41.</b> Determinación de grupos amino primarios en muestras reales de agua.....	109
<b>Tabla 42.</b> Parámetros analíticos obtenidos para las aminas ensayadas utilizando diferentes procedimientos.....	114
<b>Tabla 43.</b> Recuperación (%) de las aminas en muestras reales de agua aplicando la derivatización asistida en soporte sólido en línea (procedimiento II) y la derivatización en columna (procedimiento III).....	116
<b>Tabla 44.</b> Comparación de algunas características de los procedimientos.....	121
<b>Tabla 45.</b> Algunas figuras de mérito analíticas para los derivados de OPA con UV-vis ( <i>Gradiente 2</i> ) y detección fluorescente ( <i>Gradiente 4</i> ).....	127
<b>Tabla 46.</b> Datos de reproducibilidad (%CV) para CL capilar.....	128
<b>Tabla 47.</b> Comparación de las características experimentales y límites de detección obtenidos con CLAR convencional con y sin preconcentración y CL capilar con detección fluorescente.....	129
<b>Tabla 48.</b> Datos de reproducibilidad (%CV) para CLAR convencional.....	130
<b>Tabla 49.</b> Concentración hallada ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y recuperación (%) para muestras fortificadas con 0.5 $\text{mg L}^{-1}$ de MA, EA, PA, BA y PenA.....	131
<b>Tabla 50.</b> Concentración hallada para muestras reales de agua ( $\text{mg L}^{-1}$ ).....	131
<b>Tabla 51.</b> Ecuaciones del calibrado a 8° para metilamina con DBS (procedimiento I), para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina con ninhidrina (procedimiento II) y para metilamina y dimetilamina con NQS (procedimiento III).....	138
<b>Tabla 52.</b> Concentración hallada de metilamina con DBS o contenido total de aminas	

primarias con ninhidrina en una muestra de agua residual.....	140
<b>Tabla 53.</b> Comparación de algunos parámetros analíticos obtenidos para (1): patrones acuosos y (2): patrones de aire a temperatura ambiente (25°).....	143
<b>Tabla 54.</b> Recuperaciones a temperatura ambiente para mezclas binarias, ternarias, cuaternarias y de orden cinco de aminas.....	145
<b>Tabla 55.</b> Cantidad de metilamina determinada en dos muestras de aire sintéticas a temperatura ambiente.....	146
<b>Tabla 56.</b> Condiciones óptimas y eficiencia del muestreo y volatilización para aminas primarias y secundarias.....	148
<b>Tabla 57.</b> Parámetros analíticos obtenidos para las aminas ensayadas, 1: patrones acuosos procesados directamente con los cartuchos EFS y 2: patrones en aire generados en las condiciones óptimas (n=3).....	151
<b>Tabla 58.</b> Resultados obtenidos para el análisis de muestras (n=2).....	153
<b>Tabla 59.</b> Resultados obtenidos para las cámaras contaminadas durante 1 día y para muestras reales.....	155
<b>Tabla 60.</b> Condiciones seleccionadas para la determinación de amoniaco en aire.....	158
<b>Tabla 61.</b> Parámetros analíticos obtenidos para amonio en aire por el procedimiento clásico y el método propuesto.....	159
<b>Table 62.</b> Analyte and environmental samples in which they have been studied.....	171
<b>Table 63.</b> Features of the proposed procedures in water analysis.....	172
<b>Table 64.</b> Selection of the solid phase extraction support as function of the analyte and derivatizing reagent.....	173
<b>Table 65.</b> Some analytical characteristics for the proposed procedures in water analysis.....	175
<b>Table 66.</b> Features of the methods for air analysis.....	177
<b>Table 67.</b> Some analytical characteristics for the procedures for air analysis.....	177

### Listado de símbolos y abreviaturas.

%CV	Coefficiente de variación
%RSD	Relative standard deviation
A	Absorbancia
a	Ordenada en el origen
AAS	Atomic absorption spectroscopy
b	Pendiente
BA	Butilamina
$\beta$ -FEA	$\beta$ -Feniletilamina
CETAB	Cloruro de cetiltrimetil amonio
CG	Cromatografía de Gases
CL	Cromatografía líquida
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
Conc.	Concentración
C-SPE	Colorimetric solid phase extraction
DBS-Cl	Cloruro de dabsilo
DEA	Dietilamina
DMA	Dimetilamina
DNB-Cl	Cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo
DNS	Cloruro de dansilo
DRS	Diffuse reflectance spectroscopy
EA	Etilamina
EDTA	Ac. Etilendiaminotetracético
EFS	Extracción en fase sólida
F.M	Fase móvil
F(R)	Función de Kubelka Munk
FIA	Flow injection analysis
FMOC	Fluorenilmetil Cloroformiato
GHPSAM	Generalised H-point Standard Addition Method
HA	Ácidos húmicos
I.L.	Intervalo lineal
ICP-AES	Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy
ICP-MS	Inductively coupled plasma- mass spectrometry
INSHT	Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo
ISE	Ion Selective Electrode
K-M	Kubelka Munk
L.C	Límite de cuantificación
L.D.	Límite de detección
LOI	Loss on ignition
MA	Metilamina
MAS	Método de adición estándar
MeCN	Acetonitrilo
MeOH	Metanol

NAC	N-acetil-L- cisteina
NBD-Cl	4-cloro-7-nitrobenzofurazan
NIOSH	National Institute for Safety and Health
NITC	1- naftilisotiocianato
NOD	Nitrógeno Orgánico Disuelto
NQS	1,2- naftoquinona sulfonato
OMS	Organización mundial de la salud
OPA	o-ftaldialdehido
OSHA	Occupational safety and health administration
PA	Propilamina
PenA	Pentilamina
QL	Quimioluminiscencia
R	Reflectancia
R <sup>2</sup>	Coefficiente de correlación lineal
RSA	Reflectance spectroscopy accesory
s	Desviación estándar
s <sub>a</sub>	Desviación estándar de la ordenada en el origen
s <sub>b</sub>	desviación estándar de la pendiente
s <sub>bl</sub>	Desviación estándar del blanco
SDB-XC	Estireno divinilbenceno
SRM	Standard reference material
s <sub>x/y</sub> /b	Desviación estándar relativa del procedimiento
TAN	Total Ammonia
TBY	Total Blank Youden
TCPO	Bis (2,4,6-triclorofenil) oxalato.
UV-vis	Ultravioleta-visible
VLA-EC	Valor límite ambiental de corta exposición
VLA-ED	Valor límite ambiental de exposición diaria





## **OBJETIVOS.**



## Objetivos.

En el cambiante contexto socioeconómico de nuestros días, el panorama general del medioambiente resulta complejo. Se ha producido una mejora, por ejemplo, en la reducción de la contaminación del aire en algunas zonas del planeta, y también un importante avance en la gestión de los recursos hídricos y de la calidad del agua. Pero aún en esa zona correspondiente a los denominados países desarrollados todavía persisten numerosos y diversos problemas. La Química Analítica, junto con otras disciplinas contribuye al conocimiento y posible solución de algunos de estos problemas lo que contribuye a la sostenibilidad.

*Esta Tesis pretende ser una contribución para solucionar algunos problemas de interés medioambiental en el análisis de agua y de aire haciendo uso de las herramientas que la Química Analítica dispone para ello. Los objetivos de esta tesis se planearon estudiando el contexto científico y legal de la contaminación en agua y aire. Eligiendo algunos analitos de interés para los que se requieran nuevos métodos de análisis. Los analitos han sido seleccionados por ser contaminantes que pueden encontrarse en el medioambiente. Se han tenido en cuenta parámetros de la calidad de las aguas como el amonio y metales, y de la calidad del aire, como algunas aminas alifáticas. Los analitos también han sido elegidos por revertir importancia en la eutrofización de las aguas.*

La selección de los métodos analíticos se realizó con el fin de mejorar varios parámetros analíticos característicos como:

- Sensibilidad y selectividad.
- Precisión y exactitud.
- Bajo coste y bajo impacto medioambiental.
- Simplicidad y tiempo de análisis corto.
- Volumen de muestra reducido.

Los proyectos de investigación en los que esta Tesis se encuentra incluida son los siguientes:

- **Proyecto PPQ2000-1461** concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología: “Métodos totales de análisis de aminas en matrices de interés medioambiental”. Período de vigencia: 28-12-2000 a 27-12-2003.
- **Ayudas a grupos de investigación: GR00-36** concedido por la Generalitat Valenciana: “Establecimiento de métodos globales e interpretación de datos analíticos de calidad”. Año 2000.
- **Ayudas a grupos de investigación: GRUPOS03-178** concedido por la Generalitat Valenciana: “Establecimiento de métodos globales e interpretación de datos analíticos de calidad”. Año 2003/2004.

- **Proyecto BQU2003-6138** concedido por el Ministerio de Ciencia y Tecnología: Métodos totales de análisis de amoníaco, aminas y triazinas en matrices de interés ambiental: convencional, micro y nano”. Período de vigencia: 15-11-2003 a 14-11-2006.
- **Beca predoctoral FPU (2001-2005)** concedida por el Ministerio de Educación y Cultura.
- **Beca** para la realización de una **estancia breve** en el School of Earth, Ocean and Environmental Sciences (University of Plymouth, UK) (período del 1 de Septiembre al 30 de Noviembre de 2003), concedida por el Ministerio de Educación y Cultura.

Los **objetivos específicos** de esta Tesis se resumen en:

- Mejora de algunos parámetros relacionados con la **calidad del agua**. Evaluación de la influencia de los protocolos de acondicionamiento de muestras de agua para elementos traza analizados por quimioluminiscencia (**Apéndice 1**). Disminución de los límites de detección para amonio y amoniaco obtenidos con la reacción de Berthelot haciendo uso de la espectroscopía de reflectancia difusa (**Apéndice 2**). Estimación de la influencia de los ácidos húmicos y detergentes en la determinación de amonio (**Apéndice 3**). Elaboración de una guía para la elección del método analítico de amonio más apropiado en función de las necesidades del tipo de agua analizada (**Apéndice 4**).
- Estudio del impacto de una mina en desuso en el transporte de uranio en el Río Fal (**Apéndice 5**), resultado de una estancia de investigación en la Universidad de Plymouth (U.K).
- Eutrofización. Puesta a punto de métodos de screening de muestras para detectar la presencia de grupos amino primarios y métodos de screening de aminas alifáticas con cromatografía líquida convencional y cromatografía líquida capilar. También estudia la creación de soportes detectores para alguna de estas aminas (**Apéndice 6, 7, 8 y 9**).
- Desarrollo de sistemas detectores para estudiar la calidad del aire para aminas alifáticas primarias (**Apéndice 10**) y secundarias (**Apéndice 11**). Aplicación al análisis *in situ* tanto en ambientes laborales como en ambientes exteriores.





Capítulo 1.  
**INTRODUCCIÓN.**

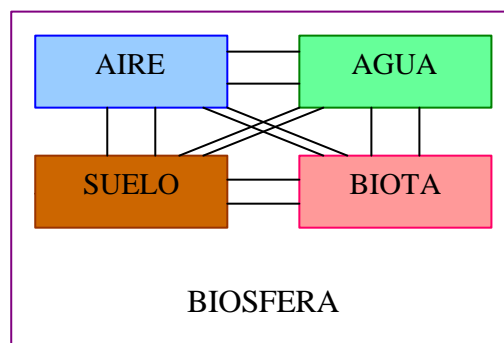




## 1.1. ANÁLISIS MEDIOAMBIENTAL.

El medioambiente constituye el sustrato que permite la supervivencia del ser humano aportándole recursos esenciales para sus actividades económicas y productivas. Es la suma total del entorno constituido por la atmósfera, la hidrosfera, la litosfera y la biosfera. Las interacciones entre los distintos componentes a través de diferentes procesos hacen que las especies químicas se muevan en el medioambiente y este transporte se define como ciclo biogénico. Debido a la total dependencia respecto del medioambiente es fundamental mantenerlo en las mejores condiciones posibles [1].

Los componentes de la biosfera y sus interacciones se muestran en la **Figura 1**. La biosfera es la parte del medioambiente donde existe vida. En ausencia de la actividad humana, los sistemas naturales tenderían a alguna clase de equilibrio. Los sistemas naturales son sistemas dinámicos, y tanto cambios naturales como inducidos por el ser humano provocan cambios importantes. De especial importancia son los antropogénicos, sobre todo los producidos después de la revolución industrial.



*Figura 1. Interacciones entre los componentes de la biosfera.*

La **ciencia del medioambiente** comprende el estudio del conjunto del entorno humano y haciendo esto hace uso de todas las disciplinas científicas. En un gran número de estudios la necesidad es la información de la composición de las partes del medioambiente. Por ejemplo no es posible estudiar el transporte de sustancias en el ciclo del agua, o en procesos naturales sin conocer las sustancias que están siendo transportadas [2,3].

En muchos casos se requiere conocer la estructura química exacta de los compuestos. Los compuestos orgánicos, cuyas diferencias estructurales son pequeñas, pueden tener efectos fisiológicos muy distintos. Metales pesados como plomo, mercurio o cromo son contaminantes peligrosos en alguna de sus formas [4-7].

Si importante es conocer la composición de las diferentes partes que constituyen el medioambiente, uno de los aspectos más importantes de la ciencia del medioambiente tiene que ver con la contaminación. **La contaminación** se define como la adición de una

sustancia al medioambiente por la actividad humana que causa daños a la salud humana o a los ecosistemas naturales [8].

La mayoría de las sustancias consideradas contaminantes son actualmente constituyentes naturales del medioambiente. Es el aumento de las concentraciones de estos constituyentes, normalmente por la acción humana incluso a niveles que pueden tener efectos nocivos, lo que es preocupante [1].

El número de fuentes de contaminación esta constantemente creciendo como consecuencia del crecimiento del desarrollo industrial. En el futuro, es de esperar que los problemas medioambientales aumenten ya que se introducen al ambiente nuevas sustancias. Se presentan problemas de contaminación global, la concentración urbana e industrial y la explosión demográfica que tuvo lugar en el siglo XX ocasionaron agravamientos en la contaminación [9].

La evolución del comportamiento de la humanidad nos ha llevado a una crisis ambiental. Entre las realidades más significativas que actúan como indicadores de esta crisis podríamos citar:

- Cambio climático.
- Deterioro del suelo.
- Perdida de especies.
- Aspectos socioeconómicos.
- Grave contaminación de las aguas, aire y suelo.
- Incremento de los accidentes medioambientales graves.

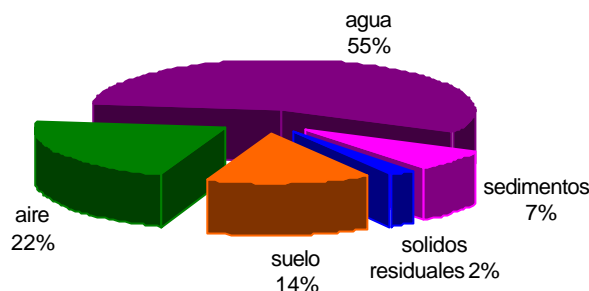
La **Química Analítica** tiene un papel fundamental dentro de la ciencia del medioambiente, ya que se encarga de realizar las medidas necesarias cuando se produce una contaminación además de asegurarnos los efectos de esa contaminación a corto y largo plazo. Así pues, el análisis medioambiental no solo se encarga de medir o determinar la concentración de especies contaminantes nocivas, sino que además debe determinar la concentración de los constituyentes químicos naturales en el medioambiente de forma exacta para que se puedan aplicar modelos de predicción.

La base de datos *Analytical Abstracts* de la *Royal Society Chemistry* entre los años 1980 y 2003, desvela que la química analítica se aplica a todo tipo de muestras ambientales para determinar las concentraciones de componentes naturales y de contaminantes. La **Figura 2** muestra el porcentaje de publicaciones para cada tipo de muestra.

La ciencia del medioambiente presenta a la química analítica problemas complicados tales como [8]:

- Rango de analitos muy amplio.
- Matrices de muestras muy complejas y desconocidas.
- Concentraciones de analitos muy pequeñas.

- Gran cantidad de muestras.
- Equipamientos analíticos portátiles y robustos que permitan el análisis *in-situ*.



**Figura 2.** Porcentajes de publicaciones para diversas muestras de interés medioambiental.

*Esta Tesis, aporta métodos de análisis para algunos contaminantes químicos que pueden encontrarse tanto en el medioambiente como en ambientes laborales, basándose en los requisitos que la ciencia del medioambiente exige a la química analítica. También se determinan especies constituyentes del medioambiente tratando de estudiar su transporte a través del medio en el cual se encuentran. Las muestras estudiadas han sido, muestras de agua de diversa naturaleza, muestras de aire y de sedimentos.*

### 1.1.1 ANÁLISIS DE AGUA.

El agua es una sustancia con un gran número de propiedades únicas que la hacen muy importante en el medioambiente. Es evidente que juega un papel fundamental en la vida humana así como en la actividad humana. El agua es vital para beber, sin la cual ni los seres humanos ni los animales pueden vivir. Las aguas naturales contienen una gran variedad de especies químicas. La presencia de seres vivos y microorganismos también va a afectar a la naturaleza y concentración de esas especies. Así en la composición de las aguas naturales van a influir: tipo de agua (marina, de lago, superficial, subterránea, hielo, lluvia), localización geográfica y época de año, entre otras. La **Tabla 1** muestra la naturaleza química y el estado disperso de las distintas sustancias más frecuentes en agua.

El uso del agua por los humanos ha desembocado en la degradación de la misma, hasta el punto de ser inservible, dañina e incluso mortal en algunos lugares. La contaminación del agua consiste en una modificación de la calidad del agua haciéndola impropia o peligrosa para el consumo humano, la agricultura, la pesca, actividades recreativas así como para los animales o la vida natural. Las fuentes primarias de contaminación de las aguas son producidas por desechos, residuos industriales, riego y vertidos de aceite [10-12].

**Tabla 1. Especies presentes en el agua.**

COMPONENTES EN SUSPENSIÓN	DISPERSIÓN COLOIDAL	DISOLUCIÓN.
Macropartículas orgánicas e inorgánicas	Partículas orgánicas e inorgánicas	Gases, Iones disueltos: $\text{HCO}_3^-$ , $\text{H}_3\text{O}^+$ , $\text{NH}_4^+$ , $\text{SO}_4^{2-}$ ...
Arenas	Sílice	Aniones, cationes de sales disueltas
Arcillas	Sustancias húmicas	
Sustancias húmicas		
Algas, otras plantas y animales acuáticos	Macromoléculas orgánicas	Moléculas orgánicas y especies inorgánicas provenientes de la descomposición de la materia orgánica
Bacterias	Virus	

La **Tabla 2** muestra una clasificación de los contaminantes que podemos encontrar en las aguas basándose en la naturaleza física, química o biológica de los agentes contaminantes.

**Tabla 2. Clasificación de contaminantes de las aguas en función de su naturaleza.**

CONTAMINANTE	EJEMPLOS
<i>Agente físico</i>	Calor
<i>Contaminantes inorgánicos</i>	Sales: Aniones y Cationes: $\text{Cl}^-$ , $\text{HCO}_3^-$ , $\text{CN}^-$ , $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$ , $\text{Na}^+$ Ácidos y bases: $\text{H}_2\text{SO}_4$ , $\text{HNO}_3$ , $\text{NaOH}$ , $\text{KOH}$ Elementos tóxicos: Hg, Fe, Mn, <b>Cr</b> , <b>Cu</b> , Pb... Elementos radioactivos: $^{137}\text{Cs}$ , $^{230}\text{Th}$ , $^{90}\text{Sr}$ , <b>U</b> Gases: <b>NH<sub>3</sub></b> , $\text{Cl}_2$ , $\text{CO}_2$ Especies minerales disueltas: Sílice, arcillas...
<i>Contaminantes orgánicos</i>	Hidratos de carbono, aminoácidos, proteínas. Aceites y grasas Hidrocarburos Jabones y detergentes Pesticidas Otros compuestos orgánicos: Fenoles, trihalometanos, nitrosaminas, <b>aminas</b> , clorofenoles.
<i>Bionutrientes</i>	Compuestos nitrogenados: <b>NH<sub>4</sub><sup>+</sup></b> , $\text{NO}_3^-$ , $\text{NO}_2^-$ Compuestos fosforados: $\text{PO}_4^{3-}$ , organofosforados
<i>Microorganismos</i>	

Algunos indicadores generales de la contaminación que afectan a la **calidad de las aguas** son: *demanda bioquímica de oxígeno (DBO)*, *la eutrofización*, *la acidificación* y *la salinidad*.

*Demanda bioquímica de oxígeno.*

Los contaminantes orgánicos presentes en muestras residuales presentan un problema de contaminación específico. Las bacterias del agua degradan los contaminantes orgánicos utilizando el oxígeno disuelto en este proceso. La cantidad de oxígeno necesario para descomponer la materia orgánica en una unidad de volumen de agua se llama *demanda bioquímica de oxígeno (DBO)*. Este parámetro es un indicador de la contaminación orgánica del agua.

*Eutrofización.*

El incremento en la concentración de nutrientes en el agua se denomina eutrofización. La eutrofización es un fenómeno natural y necesario, sin embargo, la actividad humana puede aumentar descontroladamente la presencia de nutrientes con grandes niveles de fósforo o de nitrógeno [13-15].

*Acidificación.*

La causa de la acidificación es la deposición de lluvia ácida, entre otras. Puede causar que metales tóxicos se introduzcan en el medio hídrico [16-18].

*Salinidad.*

La salinidad en muestras de agua naturales es indeseable. Se debe, por ejemplo a aguas residuales industriales, agua de riego, penetración del agua marina en los ríos. Los problemas que causa la salinidad son que las aguas naturales no puedan ser empleadas para el consumo humano, puede afectar a los organismos acuáticos y al crecimiento de las plantas en el caso de agua para riego [19-21].

Las exigencias del análisis de agua a la Química Analítica son:

- Gran variedad de muestras de agua: aguas naturales, residuales, marinas...
- Volúmenes de muestras variables: desde pocos microlitos a varios litros.
- Métodos de análisis sensibles debido a bajas concentraciones de analitos a determinar.
- Métodos selectivos y libres de interferentes.
- Métodos de especiación para analizar diferentes formas de especies inorgánicas.
- Métodos de screening tanto de muestras como de analitos para compuestos orgánicos.

Debido a la importancia del agua en la sociedad actual, existen distintas instituciones regionales, nacionales e internacionales que establecen el control de la calidad del agua a través de la **legislación vigente**. La **Tabla 3** muestra la legislación establecida en materia de aguas en función de la naturaleza o tipo de aguas a la que se aplica, aguas de consumo humano, de baño, residuales, de riego, entre otras.

Tabla 3. Legislación vigente en materia de agua.

ÁMBITO	NORMATIVA
Legislación europea	Directiva 76/464/CEE del Consejo, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas <b>sustancias peligrosas</b> vertidas en el medio acuático de la comunidad.
	Directiva relativa a <b>aguas de baño</b> 76/160/CEE
	Directiva relativa a <b>aguas destinada al consumo humano</b> 80/778/CEE Modificada por la directiva 98/83/CEE.
Legislación estatal	Directiva 2000/60/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas. ( <b>Directiva Marco de Aguas</b> ).
	Real Decreto 849/1986, de 11 de abril, por el que se aprueba el Reglamento del Dominio Público Hidráulico, que desarrolla los Títulos Preliminar, I, IV, V, VI y VII de la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas.
	Real Decreto 734/1988, de 1 de julio, establece normas de calidad de las aguas de baño (BOE nº 167, de 13.07.88).
	Ley 22/1988, de 28 de julio, de <b>Costas</b> . (BOE nº 181, de 29.07.88).
	Real Decreto 1541/1994, de 8 de julio, que modifica el Anexo I del Reglamento de la Administración pública del agua y de la planificación hidrológica aprobado por el Real Decreto 927/1988, de 29 de Julio de 1988
	Real Decreto 2116/1998, de 2 de octubre, por el que se modifica el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo, de desarrollo del Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al <b>tratamiento de las aguas residuales</b> .
	Orden de 13 de agosto de 1999 por la que se dispone la publicación de las determinaciones de contenido normativo del <b>Plan Hidrológico de Cuenca del Júcar</b> , aprobado por el Real Decreto 1664/1998, de 24 de julio.
	Real Decreto 995/2000, de 2 de junio, por el que se fijan <b>objetivos de calidad</b> para determinadas sustancias contaminantes y se modifica el Reglamento de Dominio Público Hidráulico, aprobado por el Real Decreto 849/1986, de 11 de abril.
	Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de julio, por el que se aprueba el <b>texto refundido de la Ley de Aguas</b> (Deroga la Ley 29/1985, de 2 de agosto, de Aguas)
	Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la <b>calidad del agua de consumo humano</b> .
Legislación autonómica	Ley 7/1986, de 22 de diciembre, sobre utilización de <b>aguas para riego</b> .
	Ley 2/1992, de 26 de marzo, de <b>saneamiento de las aguas residuales</b> de la Comunidad Valenciana.
	Orden de 3 de junio de 2003, de la Conselleria de Agricultura, Pesca y Alimentación, por la que se establece el Programa de Actuación sobre las Zonas Vulnerables designadas en la Comunidad Valenciana.

Por otra parte, el **análisis de sedimentos** está en muchas ocasiones directamente relacionado con el análisis de agua. Los sedimentos se forman como resultado de la deposición gravitacional de la materia suspendida presente en agua. Como la sedimentación es un proceso continuo, el análisis de sedimentos puede dar información acerca de la composición química de las partículas en suspensión. Los sedimentos revelan cambios químicos que ocurrieron en el medioambiente en el pasado. Muchas sustancias tóxicas se acumulan en los sedimentos, por ejemplo, muchas sustancias orgánicas de baja solubilidad pueden acumularse en los sedimentos. Pero, los sedimentos están especialmente contaminados con metales pesados a nivel de concentración de  $\text{mg Kg}^{-1}$ . Algunos ejemplos de metales pesados en sedimentos son As, Pb, Cd, Hg y U [1].

*Los métodos propuestos para algunos parámetros de la calidad de las aguas así como para especies causantes de la eutrofización en esta Tesis se han aplicado a diversas muestras de agua residuales, de río, grifo, riego, lluvia, mar, lago y pantano para abarcar una parte de la gran cantidad de muestras de agua que podemos encontrar en el medioambiente. También se estudia el transporte de uranio a través del medio hídrico y en sedimentos como constituyente natural de las aguas.*

### 1.1.2. ANÁLISIS DE AIRE.

La composición de la atmósfera, en sus componentes mayoritarios es bastante constante desde el nivel del suelo hasta una altura aproximada de 100 Km. La composición del aire seco a nivel del suelo libre de contaminación se muestra en la **Tabla 4**. El tiempo de permanencia se define como la vida media de las moléculas de un gas. Además de gases, la atmósfera también contiene aerosoles, materiales sólidos o líquidos en suspensión que provienen, fundamentalmente de procesos físico-químicos de diversos tipos: erosión, erupciones volcánicas e incendios forestales [9]. La **troposfera** es la región en contacto con la superficie terrestre. Tiene un espesor de unos 12 Km. Es la que tiene una densidad más elevada, de hecho se calcula que contiene aproximadamente el 75% de la masa de la atmósfera y prácticamente todo el vapor de agua y aerosoles. Esta es la región donde tienen lugar la mayor parte los fenómenos meteorológicos y movimientos horizontales y verticales, lo que proporciona un medio de transporte de materiales y dispersión de los contaminantes. De hecho la mayoría de contaminantes se emiten en la troposfera y en el hemisferio norte.

La **contaminación atmosférica** se define como la impurificación de la atmósfera por inyección y permanencia temporal en ella de materias gaseosas, líquidas o sólidas o radiaciones ajenas a su composición natural o en proporción superior a ella [9]. En general, una sustancia, solo se considera contaminante en el caso en que cause efectos perjudiciales en el hombre, los animales, los vegetales o los materiales.

A lo largo del siglo pasado y el actual, la contaminación atmosférica ha aumentado o lo que es lo mismo la **calidad del aire** [22,23] se ha ido deteriorando. Este deterioro no solo afecta a la salud humana [24,25] sino que además ha provocado cambios en el clima [26,27] y en la geografía de todo el planeta.

Las fuentes de contaminación pueden ser tanto de origen natural [28,29] (erupciones volcánicas y meteoritos) como de origen antropogénico [30-33] (transporte, combustiones y procesos industriales). Algunos aspectos que hacen sumamente importante a la contaminación antropogénica son:

- Contaminación localizada.
- Emisiones donde la existencia de sumideros es menor.
- La difusión de la contaminación depende de la climatología.
- La capacidad de algunos contaminantes de sufrir transformaciones provoca la aparición de nuevos compuestos en el aire.

**Tabla 4.** Composición química del aire en las proximidades del suelo.

GASES		%VOLUMEN	TIEMPO DE PERMANENCIA
<b>PERMANENTES</b>			
Nitrógeno	N <sub>2</sub>	78.08	10 <sup>6</sup> años
Oxígeno	O <sub>2</sub>	20.95	5 10 <sup>3</sup> años
Argón	Ar	0.93	-
Helio	He	0.00052	10 <sup>7</sup> años
Neón	Ne	0.00018	-
Krypton	Kr	0.0001	-
Xenón	Xe	0.000008	-
<b>VARIABLES</b>			
Dióxido de carbono	CO <sub>2</sub>	0.03	15 años
Metano	CH <sub>4</sub>	0.00015	5 años
Hidrógeno	H <sub>2</sub>	0.00005	7 años
Monóxido de dinitrógeno	N <sub>2</sub> O	0.00002	8 años
Ozono	O <sub>3</sub>	0.000002	2 años
<b>MUY VARIABLES</b>			
Agua	H <sub>2</sub> O	0-5	10 días
Monóxido de carbono	CO	0.00001	1/2 años
Amoníaco	NH <sub>3</sub>	0.0000006	7 días
Dioxido de nitrogeno	NO <sub>2</sub>	0.0000001	6 días
Dioxido de azufre	SO <sub>2</sub>	0.00000002	3 días
Sulfuro de hidrogeno	H <sub>2</sub> S	0.00000002	2 días

La gran mayoría de especies consideradas contaminantes, tienen en buena parte origen natural. El metano [34,35], mercaptanos [36], amoníaco [37], sulfuro de hidrógeno [38] se emiten por descomposición anaeróbica de la materia orgánica. La vegetación también es fuente de emisión, por ejemplo de etileno y las plantas emiten gran variedad de esteres a la atmósfera.

Las fuentes de contaminación de origen antropogénico pueden resumirse en once grupos:



- Generación de electricidad vía térmica y cogeneración.
- Combustión comercial, institucional y residencial.
- Combustión industrial y otros procesos industriales con combustión.
- Procesos industriales sin combustión.
- Extracción y distribución de combustibles fósiles.
- Uso de disolventes.
- Transporte en carretera.
- Otros transportes.
- Tratamiento y eliminación de residuos.
- Agricultura.
- Naturaleza.

La contaminación atmosférica puede ser de diversos tipos. En este trabajo nos centraremos en la contaminación de naturaleza química. Se divide en contaminantes primarios y secundarios. Los primarios son los compuestos que se emiten directamente a la atmósfera y los secundarios los que se forman por interacción de contaminantes primarios con componentes naturales y radiaciones incidentes. En la **Tabla 5** se muestran los contaminantes más destacados:

*Tabla 5. Contaminantes primarios y secundarios más destacados.*

<b>CONTAMINANTES PRIMARIOS</b>	<b>CONTAMINANTES SECUNDARIOS</b>
Monóxido de carbono	Ozono
Óxidos de nitrógeno	Oxidantes fotoquímicos
Óxidos de azufre	Sulfatos
Hidrocarburos, <b>compuestos orgánicos volátiles</b>	Nitratos
metánicos y no metánicos	
Partículas	Otros.
<b>Amoniacq</b> , Sulfuro de hidró geno,	
Halógenos, dióxido de carbono, metales..	

Dada la importancia de la calidad de aire atmosférico, existe **legislación europea, estatal y autonómica** que trata de disminuir la contaminación atmosférica así como controlar las emisiones de sustancias nocivas al medioambiente. La legislación contempla, por ejemplo, la regulación de sustancias que destruyen la capa de ozono y la emisión de gases de efecto invernadero. La protección de bosques contra la contaminación atmosférica es también un punto importante. Además se establecen normativas sobre el empleo y emisión de sustancias procedentes de los motores de combustión así como procedentes de actividades industriales. La legislación vigente trata de establecer valores límite con el fin de prevenir y corregir la contaminación ambiental. La **Tabla 6** muestra algunas Directivas, Decisiones y Reales Decreto, que forman parte de la legislación en materia de calidad del aire atmosférico.

**Tabla 6.** Legislación vigente en materia de contaminación atmosférica.

AMBITO	NORMATIVA
<b>Legislación Europea</b>	Decisión del Consejo 82/459/CEE del 24 de Junio, relativa al <b>intercambio</b> de informaciones y <b>datos</b> procedentes de las Redes de las Estaciones aisladas que miden la <b>contaminación atmosférica en los Estados Miembros</b> .
	Directiva 96/62/CE, del Consejo del 27 de Enero, sobre la evaluación y gestión de <b>calidad del aire ambiental</b> .
	Reglamento (CE) 307/97, del 17 de Febrero, relativa a la <b>protección de bosques</b> de la Comunidad contra la contaminación atmosférica.
	Directiva 99/30/CE del Consejo del 22 de Abril, relativa a <b>valores límite</b> de dióxido de nitrógeno, óxidos de nitrógeno, partículas y plomo en aire.
	Directiva 99/100/CE de la Comisión de 15 de Diciembre relativa a las <b>emisiones</b> de dióxido de carbono y consumo de vehículos de motor.
	Directiva 2001/81/CE del Parlamento Europeo y Consejo del 23 de Octubre relativa a la <b>emisión</b> de determinados <b>contaminantes atmosféricos</b> .
	Directiva 2003/87/CE del Parlamento Europeo y Consejo del 13 de Diciembre, relativa a la emisión de gases de efecto invernadero.
<b>Legislación Estatal</b>	Directiva 2004/42/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Abril, relativa a <b>emisión de compuestos orgánicos volátiles</b> .
	Ley 38/1072 del 22 de Diciembre de Protección del Ambiente Atmosférico.
	Real Decreto 2616/1985 del 9 de Octubre sobre la homologación de <b>vehículos</b> de motor relativo a la <b>emisión de gases</b> contaminantes.
	Real Decreto 717/1987 de 25 de Septiembre sobre contaminación atmosférica por <b>dióxido de nitrógeno</b> .
	Real Decreto 646/1991 del 22 de Abril relativo a la <b>limitación</b> de determinados agentes contaminantes procedentes de grandes instalaciones de combustión.
	Real Decreto 1088/1992 del 11 de Setiembre relativo emisiones a la atmósfera de <b>agentes contaminantes</b> procedentes de instalaciones de <b>residuos municipales</b> .
	Real Decreto 1494/1995 del 8 de Septiembre sobre la contaminación atmosférica por ozono.
	Real Decreto 117/2003 del 31 de Enero sobre la <b>emisión de compuestos orgánicos</b> .
<b>Legislación Autonómica</b>	Real Decreto 430/2004 relativo a nuevas normas sobre la <b>limitación</b> de contaminantes y <b>control</b> de emisiones a la atmósfera de refinerías de petróleo.
	Ley 7/2002 del 3 de Diciembre de la Generalitat Valenciana, para la <b>Protección</b> contra la <b>Contaminación atmosférica</b> .
	Decreto 211/2004 del 8 de Octubre del Consell de la Generalitat Valenciana, por el que se designan <b>órganos competentes</b> en materia de emisiones de gases de efecto invernadero

Además se necesitan acciones complementarias para reducir la contaminación y en especial teniendo en cuenta que los límites y objetivos pueden verse endurecidos en respuesta a la creciente evidencia de perjuicios para la salud incluso a concentraciones por debajo de los valores límites actuales. Las discusiones en curso en el marco del programa de la UE “Aire Limpio para Europa” [39] pueden tener como resultado una revisión y eventual endurecimiento de los límites actuales. Entre las propuestas objeto de debate se encuentra la fijación de objetivos de reducción a largo plazo para el año 2020 tanto en la concentración de sustancias contaminantes en el aire como de las emisiones de contaminantes.

Así pues, la calidad del aire que respiramos es hoy en día uno de los aspectos más importantes en materia de medioambiente. La calidad del aire se refiere tanto a la calidad del aire exterior (*outdoor air quality*) como interior (*indoor air quality*) [40,41]. Dentro de la calidad del aire interior podemos destacar la **calidad del aire de los ambientes laborales** y riesgos que ello conlleva. Los trabajadores se encuentran expuestos, generalmente por inhalación o vía dérmica, a un conjunto de riesgos que pueden tener su origen en los agentes químicos presentes en el lugar de trabajo y que pueden afectar a corto o largo plazo a su salud [42].

Los contaminantes presentes en el interior de un edificio pueden tener su origen en el aire exterior o pueden ser originados por las actividades interiores, el mobiliario, los materiales de construcción, los recubrimientos superficiales y los tratamientos del aire. En la **Tabla 7** se muestran algunos contaminantes químicos frecuentes en el aire interior en función de su posible procedencia.

*Tabla 7. Listado de algunos contaminantes del aire interior.*

<b>PRODUCTOS DE COMBUSTIÓN</b>	<b>MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN</b>	<b>PRODUCTOS DE CONSUMO</b>	<b>VARIOS</b>
NO <sub>2</sub>	Fibras de vidrio	Pinturas	O <sub>3</sub>
NO	Asbestos	Barnices	Pb
CO	Orgánicos:	Plásticos	Fe
CO <sub>2</sub>	Disolventes	Colas	Mn
SO <sub>2</sub>	Formaldehído	Pegamentos	
Orgánicos		Disolventes	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
		Productos sellado	Radón
Humo de tabaco:		Fibras textiles	
Aldehídos		Pesticidas	
Cetonas		Repelentes insectos	
HCN		Productos limpieza	
<b>Amoniaco</b>		Cosméticos	
Nitrilos		<b>Aminas</b>	
Nitrosaminas		<b>Amoniaco</b>	
Nicotina			
As, Cd			

Otros contaminantes del aire interior tienen origen biológico, son ejemplos la legionela, bacterias, hongos, microorganismos [43].

La reducción de la contaminación ambiental, tanto atmosférica como de ambientes laborales, pasa por el control de las emisiones al ambiente. De hecho todas las normativas concernientes a esta contaminación hacen referencia a valores permitidos de emisión e inmisión. La legislación relativa a los contaminantes distingue entre:

**Niveles de emisión:** la cuantía de cada contaminante vertida sistemáticamente a la atmósfera en un periodo de tiempo.

**Niveles de inmisión:** límites máximos tolerables de presencia en la atmósfera de cada contaminante, aisladamente o asociado a otros [9].

La exposición se define como la presencia de un agente químico en la zona de respiración del trabajador. La *exposición* puede ser *diaria (ED)*, que es la concentración media del contaminante para la jornada laboral real y referida a una jornada estándar de 8 horas diarias. La *exposición de corta duración (EC)* se calcula para un periodo de 15 minutos a lo largo de la jornada laboral.

Durante los últimos 20 años, ha habido una especial preocupación por la protección de la salud y de la seguridad de los trabajadores contra riesgos relacionados con agentes químicos en el trabajo, incluyendo aquellos factores de riesgo cuyos efectos se manifiesten a largo plazo como los que lo hacen a corto plazo. Para ello y entre otras actuaciones, se miden los niveles de contaminación y la exposición de los trabajadores al contaminante.

La evaluación de los **riesgos laborales** por inhalación, requiere de la realización de medidas de la concentración de agente químico. Una vez conocida, estos valores se comparan con los valores límite establecidos para esa sustancia. De modo que esta comparación debe permitir obtener conclusiones sobre la exposición, lo que conduce a decisiones sobre la actividad preventiva a desarrollar en un futuro inmediato.

Los niveles que establezca la legislación deben ser tales que garanticen que el aire tenga una calidad aceptable, aunque en muchos casos sabremos que existe cierto grado de contaminación. Las nuevas normativas de la UE tienden a establecer exigencias cada vez más estrictas y a establecer tres tipos de valores:

- **Valores límite:** Deben respetarse a lo largo de todo el territorio y en caso de superarse debe estudiarse las causas y establecer actuaciones.
- **Valores guías:** tienen la consideración de objetivo a alcanzar a más largo plazo y serán indicativos de un aire limpio
- **Valores de alerta:** establece concentraciones de contaminantes que obliguen a la toma inmediata de decisiones para atajar el problema.

En materia de calidad del ambiente laboral, primero deben considerarse los **Valores Límites Ambientales (VLA)**. Son los valores de referencia para las

concentraciones de agentes químicos en el aire y representan condiciones en las cuales se cree, basándose en los conocimientos actuales, que la mayoría de trabajadores pueden estar expuestos día tras día, durante su vida laboral, sin sufrir efectos adversos para su salud. Existen dos categorías **VLA-ED** valor de referencia para la exposición diaria y **VLA-EC** que son los valores límites ambientales de corta duración. Existen listas de valores límites ambientales de exposición profesional para algunos compuestos y valores límites biológicos del *Instituto Nacional del Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT)* [44]. Otros organismos públicos como la OSHA y OMS han desarrollado guías y valores de referencia de exposición [45,46].

La legislación relacionada con la higiene industrial en cuanto a contaminación química y biológica se muestra en la **Tabla 8**.

*Tabla 8. Normativa legal relacionada con la calidad del aire interior.*

AMBITO	NORMATIVA
Legislación Comunitaria	Directiva 83/477/CEE del Consejo del 19 de Septiembre, sobre la <b>protección de trabajadores</b> contra la exposición al amianto.
	Directiva 87/217/CEE del Consejo del 19 de Marzo sobre la <b>prevención y la reducción de la contaminación producida por amianto</b> .
	Directiva 88/364/CEE del 9 de Junio relativa a la protección mediante la <b>prohibición de agentes y/o actividades cancerígenas</b> .
	Directiva 97/42/CEE del Consejo del 27 de Junio relativa a la <b>protección de los trabajadores contra riesgos derivados de agentes cancerígenos</b> .
	Directiva 2000/39/CEE de la Comisión del 8 de Junio, por la que se establece una primera lista de <b>valores límite de exposición profesional</b> .
	Directiva 2000/54/CEE del Parlamento Europeo y Consejo del 18 de Septiembre sobre la protección de trabajadores contra <b>riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos</b> .
Legislación Estatal	Directiva 2004/37/CEE del Parlamento Europeo y Consejo del 29 de Abril relativa a la <b>protección contra agentes cancerígenos y mutagénicos</b> .
	Real Decreto 108/1991 del 1 de Febrero sobre la <b>prevención y reducción de la contaminación por amianto</b> .
	Real Decreto 665/1997 del 12 de Mayo para la <b>protección de trabajadores contra riesgos relacionados con la exposición a agentes cancerígenos</b> .
	Real Decreto 664/1997 del 12 de Mayo sobre la protección de los trabajadores contra los <b>riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos</b> .
	Real Decreto 374/2001 del 6 de Abril sobre la <b>protección de la salud y seguridad de los trabajadores relacionados con los agentes químicos durante el trabajo</b> .

La Química Analítica tiene un papel fundamental en el control de la calidad del aire tanto exterior como interior. De ella depende la medida de la concentración de las especies existentes en el aire y también de los contaminantes emitidos al ambiente. Así pues, la ciencia del medioambiente plantea dos tipos de medidas o monitorización de la contaminación del aire: *Monitorización del ambiente* y *monitorización de la fuente* [47,48]. La primera se refiere a la determinación de un contaminante en el aire que respiramos para asegurar la calidad del aire teniendo en cuenta los valores límites ambientales. La monitorización de fuente es la determinación de la concentración de un contaminante en una fuente determinada para tener bajo control las emisiones al ambiente [1]. El empleo de los métodos de referencia o nuevos métodos para el análisis de contaminantes ambientales debe encaminarse hacia procedimientos que permitan la monitorización *in situ* y con sensibilidad cada vez mayor por la reducción de los valores límite ambientales.

*En esta Tesis se proponen metodologías para la determinación de contaminantes ambientales en muestras de aire. Los métodos propuestos pretenden mejorar los ya existentes en cuanto a sensibilidad y selectividad. Además, se busca la posibilidad de realizar análisis semicuantitativos basados en reactivos coloreados con el fin de emplear los procedimientos como ensayos o dispositivos de alerta en caso de presencia de agentes químicos contaminantes en el aire ambiental.*

## 1.2. ANALITOS Y MÉTODOS ANALÍTICOS.

Se han estudiado **analitos** de diversa naturaleza: Metales Cr(III), Co(II) Cu(II) y U, este último en agua y sedimentos. Aminas alifáticas primarias y secundarias: metilamina (MA), etilamina (EA), propilamina (PA), butilamina (BA), pentilamina (PenA), **b**-feniletilamina (**b**-FEA), dimetilamina (DMA), dietilamina (DEA) en muestras de agua y de aire. También se han estudiado aminoácidos en agua y amonio y amoniaco en agua y aire.

### 1.2.1.CROMO, COBALTO, COBRE Y URANIO.

Estos metales pueden encontrarse en las aguas de forma natural en función del tipo de agua o de la localización geográfica, pero también debido a vertidos de origen industrial.

Las concentraciones típicas de **chromo** (Cr) en muestras de agua natural, río y mar son 1, 1, 0.05  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. El cromo se puede encontrar como Cr(III) y Cr(VI). El Cr(III) no es tóxico a bajos niveles y es necesario para los mamíferos. El Cr(VI) por su parte es más tóxico que el Cr(III). Los efectos tóxicos en agua no están bien descritos, sin embargo, el Cr(VI) como aerosol provoca daños en la piel, sistema respiratorio y puede provocar cáncer.

El cromo es un contaminante habitual superando sus niveles típicos en muestras de aguas, sobretodo naturales y residuales. El origen de la contaminación suele ser por diversas actividades industriales que vierten residuos a las aguas. Algunos ejemplos son industrias de curtidos, acero, tintes, de fabricación de pinturas, pigmentos o fungicidas. Además puede introducirse al medio hídrico como contaminante por el empleo de inhibidores de la corrosión, por ejemplo en cañerías.

El **cobalto** es también un elemento que se encuentra en la naturaleza. La concentración típica de este elemento en muestras de agua natural, río y mar son 0.05 0.2 y 0.02  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. La toxicidad de este elemento también depende del nivel de concentración al cual se encuentre. Es parte de la vitamina B12, por tanto a niveles de concentración bajos es beneficioso para la salud humana. Sin embargo a concentraciones elevadas es capaz de dañar pulmones y corazón [49].

El cobalto es un elemento ampliamente empleado en la industria, se utiliza para producir aleaciones que se emplean en la manufactura de aviones, herramientas de triturar y cortar, imanes, articulaciones artificiales. También la industria cerámica, de vidrio y pinturas hace uso de este metal para colorear y como secador de esmaltes.

El **cobre** es un elemento de los considerados esenciales para el hombre. En agua natural, de río y de mar las concentraciones normales son de 3, 5 y 2  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, sin embargo cuando se encuentra presente a concentraciones elevadas puede provocar daños en la salud humana [50]. Forma parte de aleaciones de latón y bronce. Se emplea para fabricar cables eléctricos, cañerías de agua y alambres. Sus sales

también se emplean como tratamientos para las plantas, como el moho y para tratar el agua además de ser conservantes de alimentos, cueros y telas.

La **Tabla 9** (pag. 31) muestra los valores de **concentraciones máximas permitidos** y los **métodos de referencia** para cromo y cobre en aguas de consumo humano. El cobalto no se encuentra legislado.

La Química Analítica esta aportando continuamente métodos alternativos a los de referencia para la determinación de metales a nivel de trazas. La quimioluminiscencia es una técnica muy adecuada para la determinación de metales a niveles de traza, caracterizándose por su elevada sensibilidad y selectividad. Su fusión con el análisis por inyección en flujo, proporciona reproducibilidad. Estos factores junto con el bajo coste y la simplicidad, hacen a la combinación quimioluminiscente-FI un método muy atractivo aumentando exponencialmente el interés analítico en la aplicación de la QL [51,52].

Una de las reacciones más empleadas es la oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazindiona). El luminol se oxida casi cuantitativamente a 3-aminofalato en medio básico tanto en disolventes polares como apolares. El mecanismo propuesto para la reacción [53] es el que se muestra en la **Figura 3**.

Aunque existen varios oxidantes, uno de los más empleados es el peróxido de hidrógeno. Cuando la reacción tiene lugar en medio acuoso, es necesario el empleo de un catalizador. Como catalizadores, se han utilizado diferentes metales de transición ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ , ...) [54-56], ferricianuro [57,58], o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina y peroxidasas [59,60]). La intensidad de emisión quimioluminiscente tiene un máximo a 425 nm en medio acuoso y el pH óptimo de la reacción está entre 8 y 11, dependiendo del catalizador.



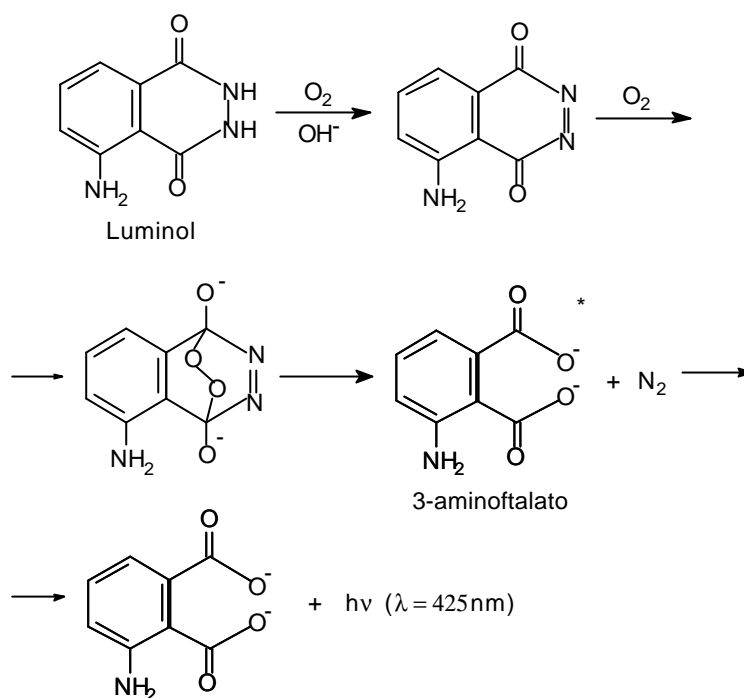


Figura 3. Mecanismo de reacción propuesto para el luminol.

El **Uranio** es un radionucleo que se encuentra en el medioambiente en forma de dos isótopos de vida larga  $^{238}\text{U}$  y  $^{235}\text{U}$ , la abundancia de estos isótopos es de 99.2739 y 0.7204 % respectivamente. La concentración típica de uranio en las muestras de agua natural varía desde  $0.1$  a  $7\text{ ng mL}^{-1}$  y de  $2$  a  $4\text{ ng mL}^{-1}$  para agua de mar. Esta distribución y la concentración normal pueden ser alteradas por los seres humanos a través de centrales nucleares, de residuos radioactivos [61] y la minería [62], que representa la mayor fuente de origen antropogénico de uranio al medioambiente. La toxicidad del uranio deriva de sus efectos radiotóxicos [63]. El uranio se almacena en el esqueleto reemplazando al calcio y además puede provocar enfermedades del hígado [64].

Además el uranio esta presente en rocas y sedimentos debido a la deposición de materia suspendida. El transporte de uranio a través de las interfases agua-sedimentos es por tanto fundamental para conocer la geoquímica de un determinado sistema.

La técnica más ampliamente empleada para la determinación de uranio es el ICP-MS [65], sobretodo por su rapidez y sencillez. Otras técnicas pueden ser cromatografía de intercambio iónico [66] o rayos X [67].

*En esta Tesis se estudia la determinación quimioluminiscente directa para el análisis de cromo, cobalto y cobre empleando procedimientos de inyección en flujo convencional haciendo uso del luminol como reactivo. Se evalúan los protocolos de conservación de metales en agua.*

*Se estudia también el transporte de uranio a través del Río Fal (Reino Unido), se analiza el agua y los sedimentos para conocer la distribución de uranio en cada uno de ellos y el impacto que una mina (South Terras mine) en desuso puede tener sobre la concentración de uranio en las muestras*

### 1.2.2. AMONIO Y AMONIACO.

El **amonio** es un microconstituyente presente en el medioambiente de forma natural, su medida es de suma importancia para entender la biogeoquímica de los sistemas acuáticos y tiene un papel importante en el ciclo del nitrógeno. Si bien suele ser la especie mayoritaria, puede existir la desprotonada, relación que depende del pH. El valor de amonio en muestras de agua superficiales, subterráneas y marinas es de  $10 \mu\text{g L}^{-1}$ . La forma desprotonada del amonio, el **amoniaco**, también forma parte de la composición del aire, siendo el porcentaje en aire muy variable y muy bajo (0.0000006 % en volumen).

Además el amonio es uno de los compuestos químicos más ampliamente empleados. Se utiliza principalmente como fertilizante, y también en la fabricación de fibras, explosivos o plásticos y como alimento de animales. También se usa en insecticidas, en la fabricación de detergentes y limpiadores y como refrigerante [68].

Debido a que es uno de los máximos responsables de los procesos de eutrofización de aguas [69], la legislación impone valores máximos para aguas de consumo, superficiales y de baño. La **Tabla 9** y **Tabla 10** (pag. 31) muestran los valores de concentración máximos permitidos y los métodos de referencia y recomendado en muestras de agua y aire, respectivamente. También se dan los valores límites ambientales para amonio en aire y los procedimientos de muestreo y determinación de referencia para muestras de aire

Los métodos de referencia son métodos basados en electrodos selectivos y en la espectrofotometría de absorción con el reactivo de Nessler y con el método del indofenol, conocida como la reacción de Berthelot. Otros métodos propuestos son el empleo de electrodo selectivo, métodos FIA con detección fluorimétrica o amperométrica (biosensores), quimioluminiscencia, cromatografía iónica.

A pesar de los métodos alternativos a los de referencia, la reacción con los reactivos de tipo indofenol es todavía una de las más ampliamente empleadas [70,71]. La reacción original ha sufrido numerosas modificaciones, relativo a esto, la sustitución del fenol por timol con el fin de disminuir la toxicidad del reactivo [72]. El mecanismo de reacción propuesto se muestra en **Figura 4**. En el primer paso del proceso de derivatización, el amonio reacciona con el hipoclorito para formar la monoamina y esta reacciona con timol obteniéndose una imina. La presencia de nitroprusiato ha sido

estudiada para acelerar este proceso [73]. En el segundo paso la imina reacciona con otra molécula de timol dando el azul de indotimol, cuyo máximo de absorción en disolución se encuentra a 675 nm. La cuantificación se suele realizar por medida de la absorbancia de la disolución resultante. Este método ha sido adaptado para muestras de aire [74,75].

Una crítica específica del método del indofenol es la dificultad para muestras de baja concentración [76]. Se ha propuesto la extracción líquido-líquido para la preconcentración del derivado [77] en el análisis de aguas.

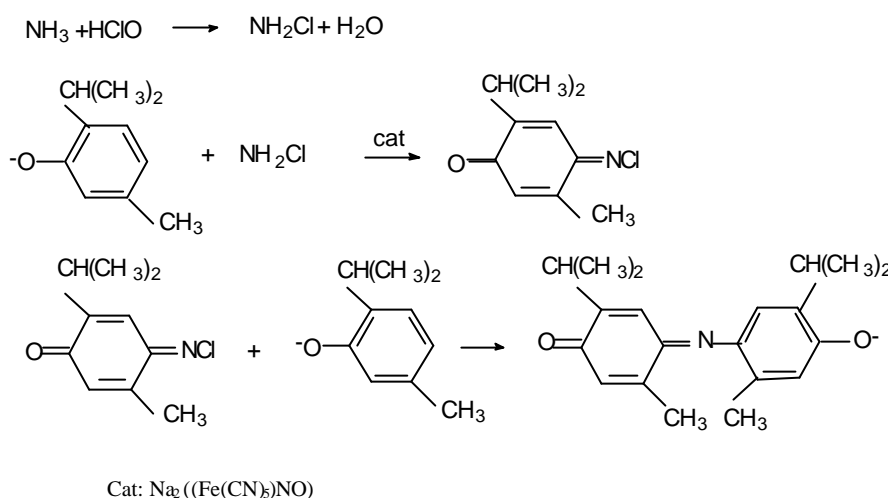


Figura 4. Mecanismo de la reacción de Berthelot propuesto para el timol

Esta Tesis aporta una metodología basada en la reacción de Berthelot para la determinación de amonio en muestras de agua. Para ello emplea la extracción en fase sólida en discos acoplada con la espectroscopía de reflectancia difusa para mejorar los límites de detección. Adicionalmente el procedimiento se adecua a la determinación de amoniaco en aire. También se evalúa el efecto de los ácidos húmicos y detergentes en la determinación de amonio. Además, se propone una guía para la elección del mejor método de determinación de amonio en función del tipo de análisis.

### 1.2.3. AMINAS PRIMARIAS Y SECUNDARIAS.

Las **aminas alifáticas** de cadena corta son compuestos ampliamente distribuidos en el medioambiente debido a que se emplean en gran variedad de industrias. Se emplean como materia prima o como intermediarios en la producción de fármacos, polímeros, pesticidas, pinturas e inhibidores de la corrosión. Las aminas alifáticas son también productos de degradación de materia orgánica como aminoácidos y proteínas.

Varias de ellas son de interés medioambiental debido a su toxicidad y reactividad. Además de problemas causados por su olor irritante, estos compuestos están considerados como peligrosos para la salud por ser irritantes de la piel, ojos, membranas mucosas y

sistema respiratorio y algunas de ellas forman parte de la lista de contaminantes orgánicos persistentes (POPs). También pueden reaccionar con compuestos que tengan nitrógeno en su estructura para formar nitrosaminas, altamente cancerígenas [78,79].

Estas aminas, que además son volátiles, tienen interés por el papel que juegan en el ciclo del nitrógeno, transferencia de nutrientes y son responsables de la basicidad atmosférica. Son compuestos altamente reactivos en la atmósfera para formar una gran variedad de productos, por ejemplo nitrosaminas. Así pues, la medida de estas aminas es importante tanto en muestras de agua como de aire.

Actualmente existe muy poca información acerca de la presencia de estas aminas en agua y en aire. De hecho no existen concentraciones máximas legisladas en muestras de agua ni métodos de referencia para la medida de las mismas. Sin embargo pueden ser encontradas en muestras de agua a bajas concentraciones, por lo que se requiere en general métodos sensibles para su determinación.

Los valores límite ambientales para las aminas legisladas en aire y los métodos de recomendados se muestran en la **Tabla 10**, respectivamente. También se dan los procedimientos de muestreo recomendados para las aminas con valores límite ambientales.

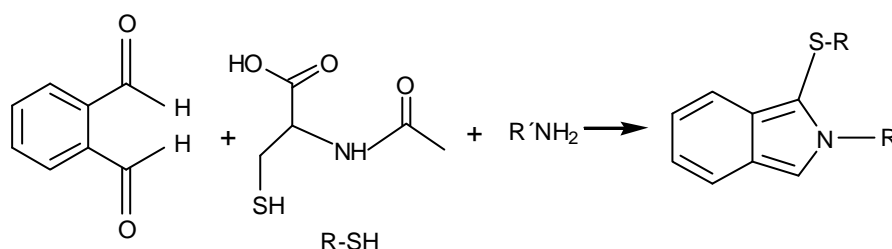
En general las aminas presentan bajas respuestas a los detectores, tales como UV, fluorescencia y electrotérmicos. Es por eso que la mayoría de métodos incorporan una reacción de derivatización para incrementar la sensibilidad [80,81]. La elección del reactivo derivatizante depende del tipo de muestra, la estructura de la amina (primaria, secundaria, terciaria), el sistema de detección. Además en el caso de la cromatografía líquida, depende de cómo se vaya a realizar la derivatización precolumna, en columna o postcolumna. Algunos reactivos para aminas primarias y secundarias son ftaldialdehído (OPA) [82], hidrato de tricetohidrendeno o ninhidrina, fluorenilmetil cloroformiato (FMOC) [83], 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS) [84], cloruro de 3,5-dinitrobenzoilo (DNB-Cl) [85], o cloruro de dabsilo (DBS-Cl) [86] entre otros.

*Los agentes derivatizantes para las aminas primarias y secundarias empleados en esta Tesis fueron el ftaldialdehído (OPA), la ninhidrina, el cloruro de dabsilo (DBS-Cl) y 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS).*

### Reacción con OPA.

Uno de los procedimientos más sensibles para la determinación de compuestos con grupos amino primarios es el método fluorimétrico de Roth [87]. En condiciones de pH básico, la reacción de derivatización del reactivo ftaldialdehído y un tiol con especies que contengan el grupo amino primario lleva a la formación del correspondiente isoindol. La reacción que tiene lugar se muestra en **Figura 5**. Los derivados formados absorben en el UV-vis a 333 nm y son fluorescentes si se excitan a 330 nm y se registra la emisión a 440 nm.

Las ventajas que presenta son la rapidez de la reacción a temperatura ambiente, elevada sensibilidad, fácil manejo del reactivo y bajo coste. En el caso de emplear la N-acetilcisteína como tiol, la estabilidad de los derivados se mejora frente al tiol inicialmente propuesto 2-mercaptoetanol (2-MCE).



**Figura 5.** Esquema de reacción del OPA/NAC con aminas primarias.

La capacidad de este reactivo para la derivatización asistida en soporte sólido ha sido demostrada en varios estudios. Desde 1996, nuestro grupo de investigación ha estado desarrollando la metodología de derivatización asistida en soporte sólido, en la que la etapa de lavado, preconcentración y derivatización de los analitos se lleva a cabo en un único soporte de extracción en fase sólida. Esta metodología ha sido empleada para cuantificar compuestos en análisis clínico y farmacéutico [88,89]. Este reactivo también ha sido empleado para el análisis de aminoácidos [90,91].

### Reacción con DBS-Cl.

Este reactivo fue introducido inicialmente por Chang y sus colaboradores [92] para la detección de aminoácidos en el intervalo visible. Este reactivo reacciona con compuestos que tengan grupos amino primarios y secundarios. La reacción tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 70 °C y a pH entre 8 y 8.5, produciendo derivados de color naranja altamente estables en 10 o 15 min. La **Figura 6** muestra el esquema de reacción para la formación de derivados entre aminas secundarias y el DBS-Cl.

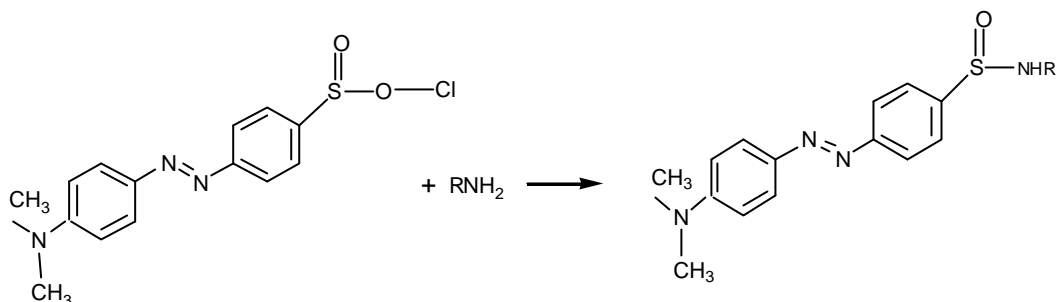


Figura 6. Esquema de reacción para el DBS-Cl y aminas primarias.

### Reacción con la ninhidrina.

La ninhidrina reacciona con compuestos que contengan grupos amino primarios en medio ácido y en caliente produciendo un complejo de color púrpura azulado. Todos los compuestos con grupos amino primarios forman el mismo derivado, haciendo a este agente derivatizante poco selectivo [93]. El esquema de reacción para la reacción entre la ninhidrina y la metilamina se muestra en la **Figura 7**.

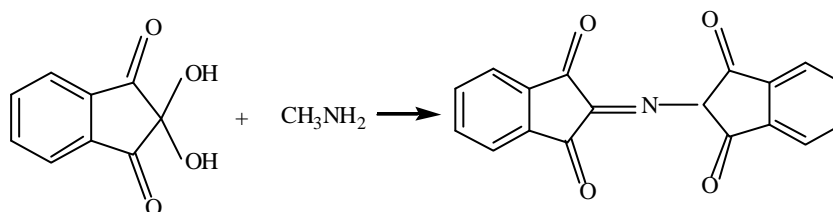


Figura 7. Esquema de reacción para la ninhidrina con metilamina

### Reacción con 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS).

Este reactivo ha sido empleado para la derivatización de compuestos con grupos amino [94]. El NQS reacciona tanto con grupos amino primarios como con grupos amino secundarios. La reacción tiene lugar en medio básico el tiempo de reacción es de 15 min, produciéndose un derivado coloreado (rojo o naranja) que absorbe entre 444 y 480 nm. El esquema de reacción se muestra en la **Figura 8**.



Figura 8. Esquema de reacción para el NQS con una amina secundaria.

Al igual que en el caso del OPA, el NQS ha sido empleado con éxito para la derivatización asistida en soporte sólido, para diversos tipos de analitos, i.e. anfetaminas y aminoácidos.

**Tabla 9.** Concentraciones máximas permitidas y métodos de referencia para los analitos estudiados en muestras de agua.

Analito	Tipo de agua	Concentración máxima permitida	Método de referencia
<i>Cromo</i>	Agua de consumo humano	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	Espectrofotometría de emisión por Plasma-ICP o absorción atómica (RD 995/2000)
<i>Cobalto</i>	-	-	Espectrofotometría de emisión por Plasma-ICP o absorción atómica (RD 995/2000)
<i>Cobre</i>	-Agua de consumo humano -Superficiales destinadas a potabilización	2 $\mu\text{g L}^{-1}$ 50 $\mu\text{g L}^{-1}$	Espectrofotometría de emisión por Plasma-ICP o absorción atómica (RD 995/2000)
<i>Uranio</i>	-Agua de consumo humano	*15 $\mu\text{g L}^{-1}$	Espectrofotometría de emisión por Plasma-ICP.
<i>Amonio</i>	-Aguas de consumo humano -Superficiales destinadas a potabilización	0.5 $\text{mg L}^{-1}$ 1.5 $\text{mg L}^{-1}$	Espectrofotometría de absorción, reactivo de Nessler, método del indofenol

\* Valor máximo provisional.

**Tabla 10.** Valores límite ambientales y métodos de referencia para amoniaco y aminas en aire.

Analito	Muestreo	Valor límite ambiental (mg m <sup>-3</sup> )		Método recomendado
		VLA-ED	VLA-EC	
<i>Amoniaco</i>	Tubo de adsorbente sólido, sílica gel	14	36	Espectrofotometría de absorción, método del indofenol. Cromatografía iónica con detección conductimétrica.
<i>Metilamina</i>	*Adsorbente sólido, XAD-7 recubierto con NBD-Cl	6.5	19	*Cromatografía líquida
<i>Etilamina</i>	*Adsorbente sólido, XAD-7 recubierto con NBD-Cl	9	-	*Cromatografía líquida
<i>Propilamina</i>	-	-	-	-
<i>Butilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, sílica gel	-	15	Cromatografía gaseosa.
<i>Pentilamina</i>	-	-	-	-
<i>Dimetilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, sílica gel y *XAD-7 recubierto con NBD-Cl	3.8	9.4	Cromatografía gaseosa. *Cromatografía líquida
<i>Dietilamina</i>	Tubo de adsorbente sólido, sílica gel y *XAD-7 recubierto con NITC	30	75	Cromatografía gaseosa. *Cromatografía líquida

\*: métodos de muestreo y de análisis recomendados por la OSHA. El resto son los procedimientos de muestreo y análisis del NIOSH.

*Esta Tesis propone diversas alternativas para el análisis de aminas en agua y en aire, desde métodos de screening de muestras selectivos para análisis in situ a métodos de screening de aminas que hacen uso de la derivatización asistida en soporte sólido, propuesta por nuestro grupo de investigación y además se incorpora la Cromatografía Capilar.*



### 1.3. TENDENCIAS ACTUALES DE LA QUÍMICA ANALÍTICA MEDIOAMBIENTAL.

Los esfuerzos de la Química Analítica medioambiental deben ir encaminados hacia la mejora de los procedimientos ya existentes y/o desarrollo de nuevos procedimientos que permitan adecuar los avances metodológicos y químicos a las necesidades del análisis del medioambiente.

El **control de los constituyentes naturales** que se encuentran presentes en las muestras medioambientales es fundamental para la detección y diagnóstico de cualquier incidente de origen natural o antropogénico que ocurra en el ambiente que nos rodea. Adicionalmente, existe un creciente interés por comprender el transporte de estos componentes en el medioambiente y el movimiento entre las distintas fases geoquímicas: aire-agua, agua-alimentos o agua-sedimentos. *El estudio del transporte de uranio a través del río Fal (Reino Unido) así como la relación agua-sedimentos es uno de los trabajos realizados en esta Tesis, evaluando así los efectos de una actividad industrial, minería, en la concentración de uranio en el medio hídrico.*

En la actualidad, nos encontramos en un período de **evolución de la Química Analítica Medioambiental**, caracterizado por el **desarrollo de nuevas y mejores técnicas analíticas**. Las etapas del proceso analítico vienen marcadas por las necesidades del análisis: el muestreo tanto de muestras de agua como de aire, debe, además de ser representativo, evitar las alteraciones de la muestra, sobretodo si los analitos se encuentran a nivel de trazas. Por ello es fundamental el establecimiento de la influencia de protocolos de almacenamiento y conservación de las muestras en la respuesta del analito. *En esta Tesis se evalúan los protocolos de conservación de muestras para el análisis de metales a nivel de trazas por quimioluminiscencia para garantizar la calidad de los resultados obtenidos.* La extracción en fase sólida es cada vez más empleada para el muestreo, preconcentración y purificación de las muestras. *En este sentido, esta Tesis aplica la extracción en fase sólida para el muestreo, preconcentración e incluso derivatización de la muestra y detección en algunos casos, tanto en muestras de agua como de aire.*

La **mejora de los métodos analíticos** ya existentes es también otro reto de Química Analítica ambiental. La mejora de la selectividad, de la sensibilidad e incluso la búsqueda de reactivos menos tóxicos es otro de los puntos importantes. También el efecto de ciertos componentes naturales presentes en las muestras y que pueden afectar a la concentración de los analitos a estudiar. Este es el caso de los ácidos húmicos y detergentes presentes en muestras de agua. *La sustitución de uno de los métodos de referencia para la determinación de amonio y amoniaco en muestras de agua y aire respectivamente es otro de los objetivos de esta Tesis. La modificación del fenol como reactivo derivatizante, por el timol en combinación con el empleo de la reflectancia difusa empleando como soportes los discos de extracción en fase sólida, no solo disminuye la toxicidad del reactivo sino que optimiza los límites de detección en muestras de aire y agua. También se estudia el efecto de los ácidos húmicos y detergentes en la determinación de amonio en agua. Se realizó un estudio comparativo de métodos de*

*determinación de amonio en agua y se dieron pautas para la elección de los mejores procedimientos en función de los requisitos del análisis.*

El creciente interés por el empleo de **sensores** viene marcado por las posibilidades que estos ofrecen al control de la contaminación. La combinación de los métodos colorimétricos con los avances tecnológicos, tecnología de membrana con reactivos inmovilizados, biosensores y sensores fluorescentes permiten la obtención de resultados a tiempo real para la detección de incidentes y control de procesos sin la necesidad de personal especializado para este fin. *El desarrollo de soportes detectores para la aplicación a la determinación de metilamina en aguas residuales, es uno de estudios realizados en esta Tesis, en éste se comparan distintos reactivos derivatizantes combinados con discos de extracción en fase sólida como soportes detectores. La medida de la reflectancia difusa posibilita una detección de sensibilidad adecuada, de forma rápida y sin necesidad de tratamientos previos de la muestra.*

Por otra parte se estudia la creación de **kits de ensayo** que permitan resultados cuantitativos o cualitativos inmediatos de forma sencilla. *Relacionado con este punto, en esta Tesis, se han propuesto ensayos para la determinación de amonio, amoniaco y aminas alifáticas en aire y en agua mediante el empleo de reactivos coloreados que permiten el análisis semi-cuantitativo y/o cuantitativo in situ.*







Hay que resaltar el aumento en el empleo de **métodos de screening** tanto de muestras como de analitos, ya que permiten el control y avisan de una posible situación de alerta, teniendo en cuenta los valores legales tanto en muestras de agua como los valores límite ambientales para muestras de aire. *Referente a este tema, esta Tesis propone un método de screening de muestras que permite la estimación de grupos amino primarios en muestras de agua y aire. Además propone un método de screening de aminas primarias mediante cromatografía líquida de alta resolución de columnas acopladas, metodología que mejora la sensibilidad.*

Otro campo de importancia actualmente en la Química Analítica es la **miniaturización** de los equipos ya existentes. Un ejemplo es la miniaturización de los equipos de CLAR, denominada CLAR capilar, micro o nano-CLAR. La principal ventaja de estos nuevos sistemas es la reducción de los volúmenes (micro o nano litros) de fase móvil y de muestra, por tanto la disminución en los residuos. Además de un incremento muy notable en la sensibilidad de las determinaciones. *Un sistema de estas características, en concreto la cromatografía líquida capilar, ha sido empleado en esta Tesis para el screening de aminas primarias en muestras de agua con detección UV-vis y fluorescente, para ello se empleo el reactivo OPA/NAC. La influencia y la eliminación de algunos interferentes como son los aminoácidos (contienen grupos amino primarios) fue también estudiada.*

### 1.4. REACTIVOS.







La **Tabla 11** muestra los reactivos empleados en la realización de esta Tesis así como las casas comerciales que los suministran y los pictogramas de seguridad de cada reactivo empleado.

**Tabla 11.** Listado de reactivos.

Reactivo	Casas Comerciales						
		X <sub>i</sub>	X <sub>n</sub>	T/T+	I/I+	C	N
1,2-naftoquinona-4-sulfonato	Sigma	X					
Ac Etilendiaminotetracético	Probus						
Ac Glutámico	Aldrich						
Ac. Aspártico	Aldrich						
Acetaminda	Prolabo						
Acetonitrilo	J.T. Baker		X		+X		
Ácido acético	Probus					X	
Ácido bórico	Scharlau, Sigma		X				
Ácido clorhídrico	Merck, Panreac					X	
Ácido nítrico	Merck					X	
Ácido sulfúrico	Fluka					X	
Ácidos húmicos	Aldrich	X					
Alanina	Aldrich						
Amoniaco	Prolabo	X					
Arginina	Aldrich	X					
β-feniletilamina	Sigma	X					
Butilamina	Sigma				+X	X	
Carbonato de sodio	Merck, Prolabo, Probus	X					
Celulosa	Fluka						
CETAB	Fluka		X				X
Cisteína	Aldrich						
Cloruro de aluminio	Prolabo						
Cloruro de amonio	Probus		X				
Cloruro de Bezalconio	Fluka					X	X
Cloruro de dabsilo	Fluka	X				X	
Cloruro de hierro (III)	Prolabo		X				
Cloruro de magnesio	Prolabo						
Cloruro de manganeso	Prolabo						
Cloruro de mercurio	Prolabo			+X			
Cloruro de sodio	Prolabo						
Diclorocianurato de sodio	Fluka	X					X
Dietilamina	Sigma		X		+X	X	
Dietiléter	Scharlau		X		+X		
Dimetilamina	Sigma				+X	X	
Dodecibencenosulfonato de sodio	Fluka		X		X		
Estándares de Hierro	VWR	X					
Estándares de Uranio	VWR						
Etilamina	Sigma			X	X		
Fenilalanina	Aldrich						

Reactivos

Fenol	Probus		X	X			X
Ftalaldehido	Fluka	X					
Glicina	Aldrich						
Hexano	Merck		X		X		X
Hidrogenocarbonato de sodio	Probus						
Hidrogenofosfato de sodio	Merck						
Hidróxido de potasio	Probus					X	
Hidróxido de sodio	J.T. Baker, Panreac					X	
Hipoclorito de sodio	Probus					X	
Histidina	Aldrich						
Isoleucina	Aldrich						
Leucina	Aldrich						
Luminol	Fluka	X					
Metanol	Merck, Scharlau, J.T. Baker			X	+X		
Metilamina	Sigma	X					
Metionina	Aldrich						
N-acetil-L-cisteina	Fluka, Aldrich						
Ninhidrina	Sigma	X					
Nitrato de cobalto (II) hexahidrato	Panreac						
Nitrato de níquel hexahidrato	Panreac						
Nitroprusiato	Probus			X			
Nonilfenol	Fluka	X					X
Pentilamina	Sigma				+X	X	
Peroxido de hidrogeno	Panreac					X	
Propilamina	Sigma				+X	X	
Salicilato de sodio	Riedel de Häen	X					
Serina	Aldrich						
Sulfato amónico de Fe (III) dodecahidrato	Panreac						
Sulfato amónico de Fe(II) hexahidrato	Panreac						
Sulfato de Cu pentahidrato	Merck, Prolabo	X					
Sulfato de cromo (III) dodecahidrato	Merck						
Sulfato de manganeso hidrato	Panreac						
Sulfato de potasio	Prolabo						
Timol	Riedel de Häen					X	X
Tirosina	Aldrich						
Treonina	Aldrich						
Triptofano	Aldrich						
Triton X-100	Fluka		X				
Urea	Prolabo						
Valina	Aldrich						

\* Oxidante.  X<sub>i</sub>: Irritante.  X<sub>n</sub>: Nocivo.  T/T+: Tóxico/muy tóxico.  I/I+: Inflamable/Muy inflamable.  C: Corrosivo.  N: Peligroso para el medio ambiente.

## 1.5. INSTRUMENTACIÓN, SOFTWARE Y MONTAJES.

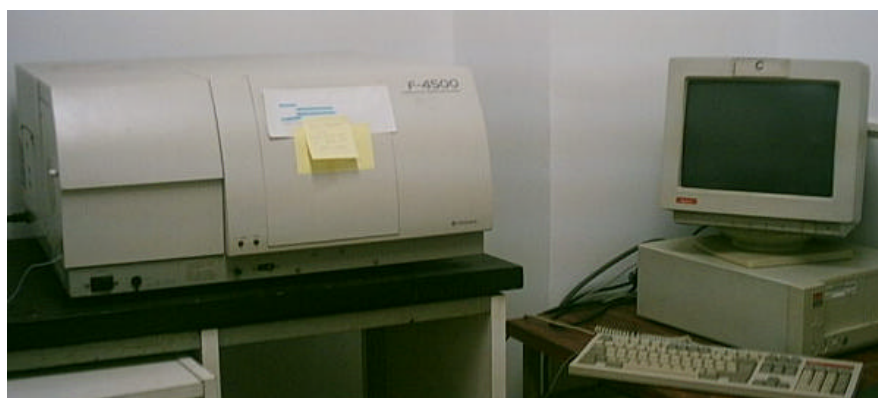
Los instrumentos, aparatos y software fueron los siguientes:

- Sistema de purificación de agua Nanopure II (UK).
- pH-metro micropH 2000.
- pH-metro portátil Hanna modelo HI9025.
- Conductímetro portátil HI9033.
- Baño de agua termostatazo Gilson (UK).
- Bomba peristáltica Wilson Miliplus 3 (Francia).
- Válvula FIA Rheodyne 5041 (USA).
- Equipo de vacío de columnas de extracción.
- Bomba de aire Buck-Genie VSS-5 (USA) (**Figura 9A**).
- Medidor de flujo de aire Multicom KS (**Figura 9B**).
- Bomba de detección de gases (Dräger, Alemania) (**Figura 9C**).



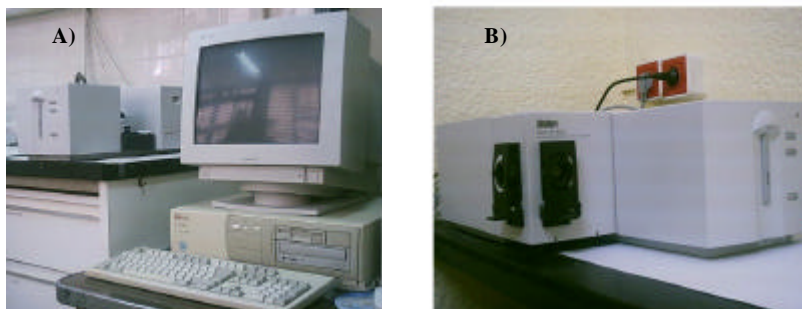
*Figura 9. A) Bomba de aire, B) Medidor de flujo y C) Bomba de detección de gases*

- Fluorímetro Hitachi F4500 (Japón) equipado con una cubeta de 1 cm de camino óptico (**Figura 10**).



*Figura10. Fluorímetro Hitachi F4500.*

- Espectrofotómetro de fila de diodos HP 8452 Uv-vis (Alemania), equipado con una celda de 1 cm de camino óptico, conectado a un PC HP Vector XM 5/90, controlado por el software G1115AA (**Figura 11A**).
- Espectrofotómetro de fila de diodos HP 8453 Uv-vis (Alemania) equipado con un accesorio de reflectancia difusa Labsphere RSA HP 8453 (USA) (**Figura 11B**).



*Figura 11. A) Espectrofotómetro de fila de diodos UV-vis HP 8452.  
B) Espectrofotómetro de fila de diodos UV-vis HP 8453 equipado con un accesorio Labsphere RSA 8453*

- Sistema cromatográfico equipado con una bomba cuaternaria (Hewlett Packard Series 1100, USA) y una válvula de 6 vías para alta presión Rheodyne modelo 7000 (**Figura 12**). Detector programable de fluorescencia (Hewlett Packard 1046 A). Estaba conectado con el sistema de almacenamiento y procesamiento de datos Hewlett Packard Chem-Station.



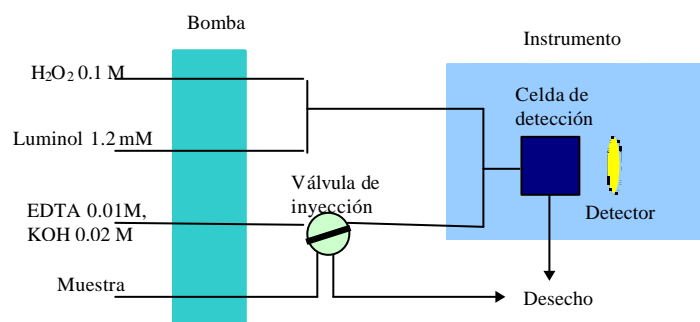
*Figura 12. A) Equipo cromatográfico HP1100. B) Detector fluorescente HP 1046*

- Sistema de cromatografía líquida capilar equipado bomba cuaternaria 1100 Series Hewlett Packard (USA) y una válvula de inyección de 6 vías con un loop interno de 2  $\mu$ L. Detector UV-vis 1100 Series (Hewlett Packard, USA) y detector de fluorescencia Hewlett Packard (USA) **Figura 13**.



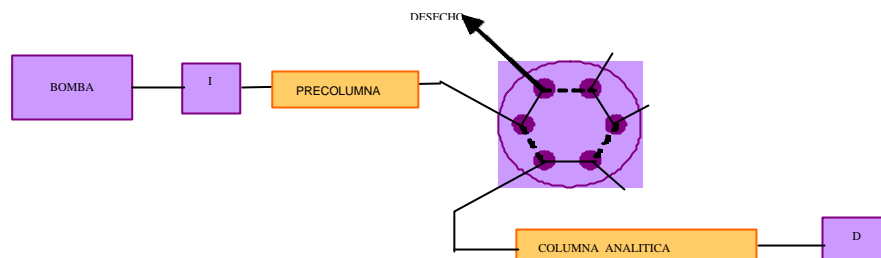
**Figura 13.** Sistema de cromatografía líquida capilar HP 1100.

- Espectrofotómetro de ICP-AES Liberty (Australia).
- Espectrofotómetro ICP-MS de cuadrupolo plasmaQuad2+ (Elemental, UK).
- Espectrofotómetro de absorción atómica de llama SpectrAA (Australia).
- El montaje empleado para el estudio de los protocolos de acondicionamiento de muestras de agua en la detección quimioluminiscente de elementos traza (*Apéndice 1*), se muestra en la **Figura 14**.



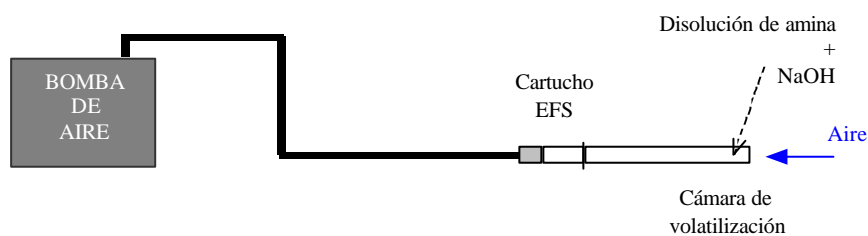
**Figura 14.** Esquema del montaje FIA aplicado al Apéndice 1.

- El esquema empleado para el screening de aminas primarias mediante cromatografía líquida de columnas acopladas se representa en la **Figura 15**.

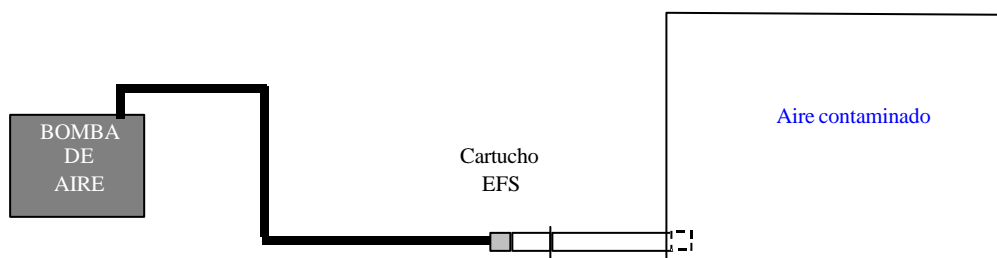


**Figura 15.** Esquema de columnas acopladas empleado para el screening de aminas (Apéndice 6)

- El esquema empleado para el muestreo de aire para la determinación de aminas alifáticas primarias mediante fluorescencia (Apéndice 10) y para la determinación de dimetilamina con NQS (Apéndice 11) se muestra en la **Figura 16**.
- El esquema empleado para la generación de muestras sintéticas de aminas primarias y secundarias para la aplicación del método de determinación de aminas alifáticas primarias en aire con OPA/NAC (Apéndice 10) y para la aplicación del método que emplea NQS para la determinación de DMA en aire (Apéndice 11) se muestra en la **Figura 17**.



**Figura 16.** Esquema para la volatilización y muestreo de patrones de aminas (Apéndices 10 y 11)



**Figura 17.** Esquema para la generación de muestras sintéticas de aire (Apéndices 10 y 11)



## 1.6. BIBLIOGRAFIA.

- [1] *Practical Environmental Analysis*. M. Rodajevic and V.N. Bashkin. RSC, Cambridge, 1999.
- [2] S.L. Simpson, E.J. Maher, D.F. Jolley. *Chemosphere* **56** (2004) 821.
- [3] O.S. Pokrovsky and J. Schott. *Chemical Geology* **190** (2002) 141.
- [4] N. Roney and J. Colman. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **18** (2004) 231.
- [5] S.A. Counter and L.H. Buchanan. *Toxicology and Applied Pharmacology* **198** (2004) 209.
- [6] G. Krumschnabel and M. Nawaz. *Aquatic Toxicology* **70** (2004) 159.
- [7] M. Ermolli, C. Menné, G. Pozzi, M.A. Serra and L.A. Clerici. *Toxicology* **159** (2001) 23.
- [8] *Environmental Analytical Chemistry*. F.W. Fifield and P.J. Hannes. Blackie A., London, 1995.
- [9] *Contaminación Ambiental*. C. Orozco, A. Pérez, M.N. Gonzalez, F.J. Rodriguez and J.M. Alfayate. Thompson, España, 2003.
- [10] R.T. Nickson, J.M. McArthur, B. Shrestha, T.O.K Myint and D. Lowry. *Applied Geochemistry* **20** (2005) 55.
- [11] M. Vitali, F. Ensabella, D. Stella and M. Guidotti. *Chemosphere* **57** (2004) 1637.
- [12] V. Cheevapon and P. Menasuetta. *Marine Pollution Bulletin* **47** (2003) 43.
- [13] H. Clarck and J.N Kremer. *Marine Environmental Research* **59** (2005) 349.
- [14] R.W.P.N. Laane, V. Brockmann, L. Van Lieve and R. Bovelander. *Estuarine, Coastal and shelf Science* **62** (2005) 495.
- [15] E. Pehlivanoglu and D.L. Sedlak. *Water Research* **38** (2004) 3189.
- [16] M. Olias, J.M. Nieto, A.M. Sarmiento, J.C. Cerón, C.R. Cánovas. *The Science of the Total Environment* **333** (2004) 267.
- [17] L. Duan, J. Hao, S. Xie and K. Du. *The Science of the Total Environment* **246** (2000) 1.
- [18] K. Acka, D. Mollér, W. Marguart, E. Brüggemann, W. Wieprecht, R. Auel, D. Kala. *Atmospheric Environment* **32** (1998) 3435.
- [19] A. Kumar and A. Bandhu. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60** (2005) 324.
- [20] B. Van der Bruggen and G. Vandecasteele. *Environmental Pollution* **122** (2003) 435.
- [21] B.T. Hart, P. Barley, R. Edwards, K. Hortle, K. Janes, A. MacMahon, C. Meredith and K. Swadling. *Water Research* **24** (1990) 1103.
- [22] R. M Harrison. *The Science of the Total Environment* **334-335** (2004) 3.
- [23] M. Williams. *The Science of the Total Environment* **334-335** (2004) 15.
- [24] A. Monzó and M.J. Guerrero. *The Science of the Total Environment* **334-335** (2004) 427.
- [25] B.N. Tam and C.M. Neumann. *Journal of Environment Management* **73** (2004) 131.
- [26] J. Sliggers. *Environmental Science Policy*. **7** (2004) 47.
- [27] F. Semazzi. *Environmental International* **29** (2003) 253.
- [28] D.M. Gaiero, J.L. Probst, P.J. Depetris, S.M. Bidant and L. Leleyter. *Geochimica et Cosmochimica Acta* **67** (2003) 3603.
- [29] R. Terrara, B. Mazzolai, E. Lanzillotta, E. Nucaro and N. Pirrone. *The Science of the Total Environment* **259** (2000) 115.

- [30] H. Peace, B. Owen and D.W. Raper. *The Science of the Total Environment* **334-335** (2004) 347.
- [31] H. Wang and D. Shooter. *Chemosphere* **56** (2004) 725.
- [32] K.N.Yu, Y.P. Cheung, T. Cheung, R.C. Henry. *Atmospheric Environment* **38** (2004) 4501.
- [33] Y. Qin and K. Oduyemi. *Atmospheric Environment* **37** (2003) 1799.
- [34] D.R. Chadwick. *Atmospheric Environment* **39** (2005) 787.
- [35] A.E. Johansson, A.M. Gustavsson, M.G. Öquist and B.H. Svensson. *Water Research* **38** (2004) 3960.
- [36] C. Haberhauer, E. Rosenberg and M. Grasserbauer. *J.Chromatogr. A* **852** (1999) 589.
- [37] B.P. Hyde, O.T. Carton, P. O'Toole and T.H. Misselbrook. *Atmospheric Environment* **37** (2003) 245.
- [38] A. Muezzinoglu. *Chemosphere* **51** (2003) 245.
- [39] *Señales Medioambientales de la AEMA*. Agencia Europea del Medioambiente, 2004.
- [40] C.H. Halios, V.D. Assimakopoulos, C.G. Helmis and H.A. Flocas. *The Science of the Total Environment* **337** (2005) 183.
- [41] K. Sakai, D. Norbäck, Y. Mi, E. Shibata, M. Kamijima, T. Yamada and Y. Takeuchi. *Environment Research* **337** (2005) 183.
- [42] *Guía Técnica para la Evaluación y Prevención de los Riesgos en los Lugares de Trabajo relacionados con Agentes Químicos*. INSHT. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales (Real Decreto 374/2001, 6 de Abril. BOE nº 104, del 1 de Mayo).
- [43] *Indoor Air Pollution*. G.B. Leslie and F.W. Lunan. Cambridge, U.K., 1992.
- [44] [http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp\\_243.htm](http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_243.htm) Ministerio de Trabajo y asuntos sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (España).
- [45] <http://www.osha-slc.gov>. Occupational Safety & Health Administration (U.S.A)
- [46] <http://www.who.int/topics/air/es/>. Organización Mundial de la Salud.
- [47] A. Alastuey, X. Querol, S. Rodriguez, F. Phana, A. Lopez, C. Ruiz and E. Mantilla. *Atmospheric Environment* **38** (2004) 252.
- [48] V. Desauziers. *Trends in Anal Chem.* **23** (2004) 252.
- [49] [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts33.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts33.pdf). Agency of Toxic Substances and Disease Register.
- [50] [http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es\\_tfacts132.pdf](http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts132.pdf). Agency of Toxic Substances and Disease Register.
- [51] K. Tsukagoshi, Y. Shikata, R. Nakajima, M. Murata and M. Maeda. *Analytical Sciences* **18** (2002) 1195.
- [52] D. Brannegan, M. Ashraf and L.T. Taylor. *J. of Chromatogr. Sciences* **39** (2001) 217.
- [53] A.M. Gracia-Campaña, W.R.G. Baeyens, X. Zhang, F. Alés and L. Gámiz. *Ars Pharmaceutica* **42** (2001) 81.
- [54] S. Meseguer, P. Campíns, L.A. Tortajada and F. Blasco. *International J. Environmental Analytical Chemistry* **83** (2003) 405.
- [55] Y. Moliner, S. Meseguer, L.A. Tortajada, P.Campíns. *Talanta* **60** (2003) 257
- [56] P. Campíns, L.A. Tortajada, S. Meseguer and F. Bosch. *Anal. and Bioanal. Chemistry* **374** (2002) 1223.
- [57] Y. Lv, Z. Zhang and F. Chen. *Talanta* **59** (2003) 571.
- [58] B. Li and Z. Zhang. *Sensors and Actuators B* **69** (2000) 70.

- [59] S.R. Jain, E. Borowska, R. Davidson, M. Tudorache, E. Pontén and J. Emnéus. *Biosensor and Bioelectronics* **19** (2004) 795.
- [60] H.C. Hong and H.J. Huang. *Anal. Chim. Acta* **499** (2003) 41.
- [61] T.O. Passel. *J. Chromatogr. A* **671** (1994) 331.
- [62] J. Gonzalez, J.P. Bolivar and R. Garcia. *Radiation Physics and Chemistry* **61** (2001) 643.
- [63] E. Bosshand, B. Zimmerli and Ch. Schlatta. *Chemosphere* **24** (1992) 309.
- [64] H. Mirto, M.H. Hengé, R. Gibert, A. Ansoborlo, M. Fournier and J. Cambor. *Toxicology Letters* **104** (1999) 249.
- [65] E.R. Unsworth, J.M. Cook and S.J. Hill. *Anal. Chim. Acta* **442** (2001) 141.
- [66] M.J. Shaw, P.Jones, P.N. Nesterenko. *J. Chromatogr. A* **953** (2002) 141.
- [67] E. Herrera, M. Renteria, M.E. Montero, A. Muñoz. *Spectrochimica Acta part B* **59** (2004) 1695.
- [68] <http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxprfiles/tp126-c5.pdf>. Agency of Toxic Substances and Disease Register.
- [69] *Europe's Water: An indicator-based assesment*. Agencia Europea del Medioambiente. Luxemburgo, 2003.
- [70] S.-C. Pai, Y.-J. Tsau and T.-I. Yang. *Anal. Chim. Acta* **434** (2001) 209.
- [71] R. Roskam and D. de Langen. *Anal. Chim. Acta* **30** (1963) 56.
- [72] F. Jüttner. *Fresenius, J. Analytical. Chemistry* **363** (1999) 128.
- [73] M. Okamura, K. Fujinaga, Y. Seine and S. Honda. *Fresenius, J. Analytical Chemistry* **365** (1999) 467.
- [74] S. G. Yeatman, L. J. Spokes and T. D. Jickells. *Atmospheric Environment* **35** (2001) 1321.
- [75] NIOSH Manual of analytical methods, 4<sup>th</sup> edition 15/5/1996.
- [76] R. M. Holmes, A. Aminot, R. Kérouel, B. A. Hooker and B. J. Peterson. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56** (1999) 1801.
- [77] N. Hata, I. Kasahara and S. Taguchi. *Analytical Sciences* **18** (2002) 697.
- [78] J.K. Lin. *Clinical Biochemistry* **23** (1990) 67.
- [79] P. Simon and C. Lemacon. *Anal. Chem.* **59** (1987) 480.
- [80] N. Seiler, *Hanbook of Derivatives for Chromatography*, ed. K. Blau and J. Halket, Wiley, Chichester, 1993.
- [81] A. Marzo, N. Monti, M. Ripamonti, S. Muck and A.R. Martelli. *J. of Chromatogr.* **507** (1990) 241.
- [82] K. Saito, M. Horie and H. Nakazawa. *Anal. Chem.* **66** (1994) 134.
- [83] G. Malder, M. Pelletier and W. Haerdi. *J. of Chromatogr.* **59** (1992) 9.
- [84] B.M. Farell and T.M. Jefferies. *J. of Chromatogr.* **272** (1983) 111.
- [85] R. Herráez, P. Campíns and A. Sevillano. *J. Chromatogr. Science.* **3** (1997) 169.
- [86] M.A. Castillo, R.C. Castells. *Journal of Chromatography A* **921** (2001) 121.
- [87] F. Dai, V.P. Burkert, H. N. Singh and W.L. Hinze. *Microchemistry Journal* **57** (1997) 166.
- [88] C. Molins, P. Campíns and A. Sevillano. *Anal. Chim. Acta* **378** (1999) 83.
- [89] R. Herráez, P. Campíns and A. Sevillano. *Anal. Chem.* **68** (1996) 734.
- [90] Y. Mengerink, D. Kutlán, F. Tóth, A. Csámpai and I. Molnár. *J. of Chromatogr. A.* **949** (2002) 99.

*Bibliografía*

---

- [91] I. Molnár and I. Bozor. *J. of Chromatogr. A.* **798** (1998) 99  
[92] J.Y. Chang and R. Knecht. *Analytical Biochemistry* **197** (1991) 52.  
[93] G. Fang, N. Liu. *Anal. Chim. Acta* **445** (2001) 245.  
[94] P. Campíns, C. Molins, A. Sevillano and R. Porras. *Analyst* **122** (1997) 673.





Capítulo 2.  
**RESULTADOS OBTENIDOS Y DISCUSIÓN**





### **2.1. CALIDAD DEL AGUA.**

En esta sección se estudiaron los siguientes apartados:

- Influencia de los protocolos de acondicionamiento en muestras de agua en la detección quimioluminiscente directa de elementos traza.
- Mejora de los límites de detección para amonio y amoniaco conseguidos con la reacción de Berthelot mediante el uso de extracción en fase sólida acoplada a la espectroscopía de reflectancia difusa.
- Determinación de amonio con el método basado en los reactivos tipo indofenol en muestras contaminadas con ácidos húmicos y detergentes.
- Guía para la elección del método más apropiado para la estimación de amonio en función de los requisitos del análisis de agua.

### 2.1.1. INFLUENCIA DE LOS PROTOCOLOS DE ACONDICIONAMIENTO EN MUESTRAS DE AGUA EN LA DETECCIÓN QUIMIOLUMINISCENTE DE ELEMENTOS TRAZA.

La conservación de las muestras es un problema de interés analítico porque la completa estabilidad de cada constituyente nunca puede ser conseguida. Después de la toma de muestra la conservación simplemente retarda los cambios químicos y biológicos [1]. Cuando las muestras se almacenan sin acidificar y sin congelar tienen lugar procesos de adsorción sobre las paredes de los recipientes, de modo que para preservar la distribución original de las especies, las muestras deben almacenarse sin acidificar pero congeladas [2]. La mayoría de los autores recomiendan la acidificación inmediata de la muestra después del muestreo si lo que se quiere analizar son iones metálicos.

En la determinación de metales en muestras de agua se recomienda el análisis inmediato siempre que sea posible. Las muestras pueden ser almacenadas durante un periodo corto de tiempo a 4°C. En estos casos la medida se realiza sin un paso previo de acondicionamiento de las muestras. Lo mismo ocurre para muestras de agua embotellada. El procedimiento más empleado para el acondicionamiento de muestras donde se van a analizar metales, es la acidificación de la muestra con HCl a pH entre 2 y 3. Las muestras previamente filtradas se almacenan en recipientes lavados con ácidos a 4°C. El tiempo máximo de almacenamiento son 6 meses.

En el caso de almacenamiento durante periodos de tiempo más largo, las muestras se acondicionan con HNO<sub>3</sub>. Las muestras se filtran, se acidifican y se almacenan a 4°C. Las botellas de polietileno pueden ser selladas en bolsas de plástico aluminizadas. El periodo de almacenamiento oscila entre 2 y 3 años. Por ejemplo, los materiales de referencia estándar se preparan de acuerdo a este procedimiento.

La quimioluminiscencia acoplada a sistemas de inyección en flujo proporciona, sensibilidad, selectividad, rapidez y reproducibilidad en la inyección y mezclado de los reactivos. Estos factores junto con la simplicidad, bajo coste y la posibilidad de realizar los análisis *in situ*, hacen a esta combinación extremadamente atractiva.

En la **Tabla 12** se muestra algunas determinaciones de iones metálicos en muestras de agua propuestas en la literatura [3-23]. La reacción más empleada es la oxidación del luminol por el peróxido de hidrógeno en medio básico catalizada por iones metálicos, produciendo emisión quimioluminiscente a 425 nm (**Figura 3**). La mayoría de los métodos determinan Cr(III) sin preconcentración. Para la cuantificación de Fe(II), Fe(III), Mn(II) y Cu(II) se requiere de una etapa de preconcentración que generalmente se realiza con cromatografía de intercambio iónico. Factores importantes son el efluente y el pH. Para enmascarar interferencias se han empleado agentes complejantes tales como 8-quinolinol, citrato sódico, EDTA o ácido fosfórico.

En este trabajo se estudió la señal quimioluminiscente directa para Cr(III), Co(II), Fe(II), Fe(III), Ni(II) y Mn(II) en función del procedimiento de acondicionamiento de las muestras con la reacción del luminol y peróxido de hidrógeno.

**Tabla 12.** Estudios de la determinación quimioluminiscente en flujo de iones metálicos en muestras de agua

Ref.	Iones	Reacción	Pre-conc	Consideraciones del método	Muestra de agua
[3]	Mn(II)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Muestra acidificada HAc/NH <sub>4</sub> Ac pH 5. Conc: 0.05-0.5 μg L <sup>-1</sup>	marina
[4]	Fe(II)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> patrones/muestras pH 6 Conc: 10-70 μg L <sup>-1</sup>	-
[5]	Co(II) Cu(II) Fe(II)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Patrones HCl 0.01M. F.M. ácido oxálico pH 4.2. Conc Co 0.05 μg L <sup>-1</sup> , Cu: 20-200 μg L <sup>-1</sup> , Fe semicuantitativo	-
[6]	Fe(III)	Sulfoflavina-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Patrones HCl 0.05 M. Muestras pH 5.5 Conc: 0.02-5.6 μg L <sup>-1</sup>	marina
[7]	Fe(III)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Muestra acidificada HAc/NH <sub>4</sub> Ac pH 3. Conc: 0.005-0.1 μg L <sup>-1</sup>	Océano
[8]	Cr(VI)	Luminol-hexa cianoferrato (II)	Si	Sin acondicionamiento- Conc: 0.04-1 μg L <sup>-1</sup>	Residual
[9]	Co(II)	Ac.Gálico- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Muestras Ac fórmico/formiato pH 3.6 Conc: 0.0006-1 μg L <sup>-1</sup>	Marina de referencia
[10]	Mn(II)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Patrones HCl 0.1M. Conc: 0.002-110 μg L <sup>-1</sup>	Marina de referencia
[11]	Fe(II) Fe(III)	Luminol-O <sub>2</sub>	Si	Patrones HCl pH 3.5. Conc 0.001-1 μg L <sup>-1</sup>	Suelo, río, lluvia y lago
[12]	Fe(II) Fe(III)	Luminol-O <sub>2</sub>	Si	Patrones y muestras HCl 0.1M. Con: 0.002-0.56 μg L <sup>-1</sup>	Océánica y marina
[13]	Fe(II) Fe total	Sulfoflavina-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Si	Patrones HCl. Muestras en tampon acetato pH 4.4. Conc 0.05-11 μg L <sup>-1</sup>	Lluvia, río Grifo y costa
[14]	Co(II) Fe(II) Fe(III)	Pirogalol- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - NaOH	Si	Patrones HCl purificado 0.1 M. Conc Co: 5-850 μg L <sup>-1</sup> . Fe: -	Estuario
[15]	Cr(III) Fe(II) Co(II)	Luminol- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - haluro	No	Con/sin EDTA. Conc Cr: 0.005-5.2 μg L <sup>-1</sup> . Fe: 0.6-56 μg L <sup>-1</sup> . Co: 0.06-59 μg L <sup>-1</sup>	-
[16]	Co(II) Mn(II)	Luminol-IO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	No	Muestras H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . quinolinol para determ Mn y citrato para Mn y Co. Conc Co: 0.01-12, Mn: 0.02-9 μg L <sup>-1</sup>	Natural Contaminada
[17]	Cr(III)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No	Patrones/muestras EDTA 10 <sup>-4</sup> M y H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 3 10 <sup>-4</sup> M. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en EDTA. Conc: 0.01-6 μg L <sup>-1</sup>	Mineral Potable Contaminada
[18]	Mn(II)	TCNQ- O <sub>2</sub> -OH- Eosina Y	No	Análisis inmediato. Disol. DDAB vesicular. Conc: 4-4000 μg L <sup>-1</sup>	Potable
[19]	Fe(II) Mn(II)	Luminol-IO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	No	o-fenantrolina activador de determ Fe y TEA complejante determ Mn. Conc Fe 0.003-0.1, Mn : 0.005-0.1 μg L <sup>-1</sup>	Suelo Potable
[20]	Cr(III)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No	Patrones y muestras H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> . EDTA 10 <sup>-4</sup> M en portador. Conc: 0.5-500 μg L <sup>-1</sup>	Grifo
[21]	Cu(II)	Fenantrolina-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No	Patrones HCl pH 3. Muestras pH 2. Conc: 0.006-0.45 μg L <sup>-1</sup>	Marina
[22]	Cr(III)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No	Patrones/muestras EDTA 10 <sup>-3</sup> M. Conc 5.2-5200 μg L <sup>-1</sup>	Natural
[23]	Cr(III)	Luminol-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	No	EDTA en portador pH 10.8. Muestras ácidas. Conc: 0.5-50 μg L <sup>-1</sup>	Río, grifo y potable

Se ensayaron muestras no acidificadas y acidificadas con HCl y HNO<sub>3</sub>. Las muestras acidificadas se analizaron en *estático* y en *inyección en flujo*. Se estudió el efecto del EDTA como enmascarante para aumentar la selectividad en la determinación de Cr(III) y se empleó un material de referencia SRM© 1640 para evaluar la exactitud y establecer las conclusiones. La parte experimental se puede consultar en el *Apéndice I* y el montaje FIA utilizado se muestra en la **Figura 14** (pag 39).

### Señal quimioluminiscente para patrones sin acidificar.

Primero se estudió la señal quimioluminiscente de patrones preparados en agua ultrapura. Leyes específicas fijan los límites superiores de estos metales en agua: 200 µg L<sup>-1</sup> para Fe, 20 µg L<sup>-1</sup> para Ni, 2µg L<sup>-1</sup> para Cu y 50µg L<sup>-1</sup> para Cr (Directiva Europea 98/83/EC). La composición de los elementos en un agua mineral puede ser descrita por el contenido de SRM©1640 (**Tabla 13**).

**Tabla 13.** Composición del SRM©1640: agua natural.

Elementos		Elementos	
<i>Fracción másica certificada</i>	mg Kg <sup>-1</sup>	<i>Fracción másica de referencia</i>	mg Kg <sup>-1</sup>
Aluminio	52.0±1.5	Cobre	34.3±1.6
Antimonio	13.79±0.42	Litio	27.89±0.14
Arsénico	26.67±0.41	Níquel	27.4±0.8
Bario	148.0±2.2	Potasio	994±27
Berilio	34.94±0.41	Rubidio	2.00±0.02
Boro	301.1±6.1	Cinc	53.2±1.1
Cadmio	22.79±0.96	Calcio	7.045±0.089
Cromo	38.6±1.6	Magnesio	5.819±0.056
Cobalto	20.28±0.31	Silicio	4.73±0.12
Hierro	34.3±1.6	Sodio	29.35±0.31
Plomo	27.89±0.14	Talio*	<0.1
Manganeso	121.5±1.1		
Molibdeno	46.75±0.26		
Selenio	21.96±0.51		
Plata	7.62±0.25		
Estroncio	124.2±0.7		
Vanadio	12.99±0.37		

\* Información en fracción másica.

Se estudió la quimioluminiscencia acoplada a *inyección en flujo*. Las señales del Ni y Mn fueron similares al blanco. Para Fe(II) y Fe(III) solo eran cuantificables concentraciones por encima de los límites superiores legislados. Por tanto, sería necesario emplear un paso de preconcentración para determinar estos metales. Cr(III), Co(II) y Cu(II) proporcionaron señal suficiente para ser cuantificados directamente. Algunos autores han propuesto el empleo de EDTA para enmascarar interferencias, especialmente en la determinación de Cr(III). El EDTA se añadió al portador o la disolución de muestra de modo que el complejo se formó en el sistema FI o antes, respectivamente.

La señal ( $S$ ) puede ser descrita en función de la concentración de metal ( $c_M$ ):  $S = ac_M^b$ , donde  $a$  y  $b$  son constantes. Se obtuvo una línea recta para la curva de calibrado doble logarítmica:  $\log S = \log a + b \log c_M$ . La **Tabla 14** muestra los parámetros para las regresiones doble logaritmo y potencial en las distintas condiciones experimentales.

**Tabla 14.** Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras no acidificadas con el procedimiento en flujo, (a) KOH 0.02 M y (b)  $CO_3^{2-}/HCO_3^-$  0.3M pH 10.8

		Sin EDTA	EDTA en la muestra		EDTA en portador de KOH <sup>(a)</sup>		EDTA en portador de carbonato <sup>(b)</sup>	
		-	1 10 <sup>-2</sup>	5 10 <sup>-3</sup>	1 10 <sup>-2</sup>	5 10 <sup>-3</sup>	1 10 <sup>-2</sup>	5 10 <sup>-3</sup>
<b>Doble Logarítmica</b>								
Cr(III)	loga	1.82±0.06	2.4±1.7	1.5±0.6	2.2±1.5	1.84±0.03	1.9±0.7	2.32±0.03
	a	66±9	247±54	32±4	163±34	69±5	99±6	211±16
	b	1.32±0.06	0.4±0.1	1.14±0.06	0.65±0.09	1.16±0.03	0.95±0.03	0.92±0.04
	R <sup>2</sup>	0.977	0.7086	0.9846	0.8284	0.9907	0.9926	0.985
	n,	4	3	3	4	4	3	4
	s <sub>yx</sub>	0.0135	0.208	0.1090	0.202	0.0763	0.0625	0.1466
Co(II)	loga	3.0±0.1	-0.6±1.2	-0.7±1.7	0.44±0.16	0.8±0.4	1.5±.7	1.0±0.3
	a	1009±121	0.27±0.06	0.21±0.02	2.7±1.0	6.8±2.6	32±5	10±2
	b	0.70±0.08	1.53±0.05	1.51±0.02	1.08±0.08	0.82±0.08	0.62±0.03	0.86±0.04
	R <sup>2</sup>	0.8941	0.9919	0.9442	0.9502	0.9112	0.9821	0.9825
	n,	4	3	3	4	4	3	4
	s <sub>yx</sub>	0.1373	0.0887	0.162	0.1406	0.1466	0.053	0.065
Cu(II)	loga	2.45±0.04	-	-	-	-	-	-
	a	265±34	-	-	-	-	-	-
	b	0.690.04	-	-	-	-	-	-
	R <sup>2</sup>	0.9809	-	-	-	-	-	-
	n,	4	-	-	-	-	-	-
	s <sub>yx</sub>	0.0682	-	-	-	-	-	-
<b>Intervalo lineal</b>								
Cr(III)	b <sub>0</sub>	108±77	115±50	-9±17	45±49	-71±32	30±19	6±44
	b <sub>1</sub>	155±8	51±6	47±2	69±5	105±3	85±2	176±4
	R <sup>2</sup>	0.9647	0.8943	0.9816	0.9327	0.9868	0.9937	0.9913
	n,	5	4	4	5	5,	4	5
	s <sub>yx</sub>	172.3	111.6	38.54	110.62	72.47	42.62	97.98
Co(II)	b <sub>0</sub>	251±190	2.4±23	22±13	-19±33	19±18	87±31	37±17
	b <sub>1</sub>	553±39	3.1±0.3	1.8±0.2	4.2±0.3	2.71±0.15	4.1±0.3	14.64±0.12
	R <sup>2</sup>	0.9396	0.9166	0.9606	0.949	0.9604	0.9648	0.9899
	n,	5	3	3	5	5	4	5
	s <sub>yx</sub>	425.76	43.23	103.35	74.24	41.79	66.78	35.56
Cu(II)	b <sub>0</sub>	98±38						
	b <sub>1</sub>	111±3						
	R <sup>2</sup>	0.9972						
	n,	5						
	s <sub>yx</sub>	58.61						

Como señal analítica se empleó la altura de pico. El intervalo de concentración para Cr(III) de 3 a 15  $\mu\text{g L}^{-1}$  proporcionó un modelo de calibración lineal. Los intervalos lineales para Co(II) y Cu(II) fueron 2-8  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Co y por encima de 20  $\mu\text{g L}^{-1}$  para Cu. Los límites de detección calculados para una relación señal-ruído de 3 estuvieron entre 0.5-2,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Estos valores son similares a los que se obtienen con la absorción atómica electrotermica para estos elementos [24].

Con el fin de incrementar la selectividad en la determinación de Cr(III), se añadió EDTA tanto a las muestras como a la disolución del portador. La sensibilidad del Co(II) disminuyó drásticamente en presencia de EDTA y la señal del Cu desapareció.

La sensibilidad del Cr(III) disminuyó cuando el EDTA 0.01M se añadió al portador (**Tabla 14**). Al utilizar EDTA  $5 \cdot 10^{-3}$  M en el portador (tampón) la sensibilidad del Cr(III) era similar a la obtenida en ausencia de EDTA, por lo que en estas condiciones la sensibilidad se mantenía y la reacción era selectiva para el Cr(III). La adición del EDTA a las muestras proporcionó peores resultados similares a los obtenidos con EDTA 0.01 M en la disolución de portador.

Las curvas de calibrado para el Cr(III) y Co(II) para el procedimiento en estático y en presencia de EDTA  $3 \cdot 10^{-3}$  M se muestran en la **Tabla 15**. La sensibilidad para el Cr(III) fue tres veces mayor que para el Co(II). Las medidas en estático proporcionaron la siguiente ecuación:  $(0.07 \pm 0.05) + (0.30 \pm 0.02)c_M$  ( $R^2=0.997$ ,  $S_x=0.07$ ). Comparando las dos pendientes de calibrado, la pérdida de sensibilidad del sistema FI fue de alrededor del 55%.

**Tabla 15.** Parámetros analíticos de las curvas de calibrado de patrones no acidificados mediante el procedimiento en estático.

Metal	Metal añadido	$b_0 \pm s_{b_0}$	$b_1 \pm s_{b_1}$	$R^2$	$S_{v_x}$	n
Cr	-	0.3 $\pm$ 0.6	0.75 $\pm$ 0.05	0.97	1.2	8
Co	-	-0.2 $\pm$ 0.7	0.24 $\pm$ 0.01	0.99	0.9	5
Co	-	-0.2 $\pm$ 1	0.27 $\pm$ 0.01	0.99	3	8
Co	-	-0.2 $\pm$ 0.6	0.26 $\pm$ 0.01	0.996	0.8	4
Cr	80 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co	19 $\pm$ 3	0.85 $\pm$ 0.11	0.98	3	3
Cr	100 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co	30.5 $\pm$ 0.3	0.77 $\pm$ 0.02	0.999	0.3	3
Cr	200 $\mu\text{g L}^{-1}$ Co	53.1 $\pm$ 0.8	0.68 $\pm$ 0.16	0.95	3	3
Co	20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr	16 $\pm$ 2	0.26 $\pm$ 0.02	0.98	3	5
Co	20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr	15 $\pm$ 2	0.24 $\pm$ 0.04	0.97	2	3
Co	20 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cr	39 $\pm$ 3	0.23 $\pm$ 0.04	0.94	3	4

### Señal quimioluminiscente para patrones acondicionadas en HCl.

La calibración en condiciones ácidas se evaluó adicionando a los patrones HCl  $5 \cdot 10^{-3}$  M. Sin EDTA, las sensibilidades obtenidas para Cr(III), Co(II) y Cu(II) fueron similares a las obtenidas con patrones no acidificados. También se estudió la presencia

de EDTA en la disolución de portador y en las muestras. La **Tabla 16** muestra los parámetros de calibración para los distintos modelos y condiciones experimentales.

**Tabla 16.** Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras acidificadas con HCl  $5 \cdot 10^{-3}$  M con el procedimiento en flujo. (a) KOH 0.02 M y (b)  $\text{CO}_3^{2-}/\text{HCO}_3^-$  0.3M pH 10.8

		Sin EDTA	EDTA en muestra		EDTA portador KOH <sup>(a)</sup>	EDTA en portador tampón <sup>(b)</sup>	
		-	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$5 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-2}$	$5 \cdot 10^{-3}$
<b>Doble logarítmica</b>							
Cr(III)	loga	2.31±0.02	1.2±0.3	1.3±0.5	2.1±1.1	2.1±0.9	2.5±1.6
	a	203±8	18±2	22±3	129±13	144±9	334±39
	b	0.88±0.02	1.43±0.05	1.50±0.06	0.89±0.04	0.89±0.03	0.78±0.05
	R <sup>2</sup>	0.9958	0.9913	0.9870	0.9747	0.9914	0.9574
	n, S <sub>yx</sub>	4,0.0383	3,0.217	3,0.1312	4,0.0979	4,0.0628	4,0.1122
Co(II)	loga	2.99±0.03	1.0±0.7	-(0.8±1.4)	0.7±0.6	0.9±0.2	1.4±0.3
	a	976±78	11±5	0.17±0.04	6±4	9±1	25±2
	b	0.81±0.05	1.04±0.09	1.63±0.06	1.14±0.15	0.88±0.02	0.718±0.017
	R <sup>2</sup>	0.9621	0.9442	0.9914	0.8595	0.9948	0.9939
	n, S <sub>yx</sub>	4,0.0916	3,0.162	3,0.0972	4,0.263	4,0.041	4,0.0319
Cu(II)	loga	3.06±0.04	-	-	-	-	-
	a	1276±146	-	-	-	-	-
	b	0.30±0.03	-	-	-	-	-
	R <sup>2</sup>	0.8783	-	-	-	-	-
	n, S <sub>yx</sub>	4,0.0744	-	-	-	-	-
<b>Intervalo lineal</b>							
Cr(III)	b <sub>0</sub>	71±30	-15±22	-80±56	69±48	39±19	153±137
	b <sub>1</sub>	144±3	54±3	90±6	93±5	106±2	184±14
	R <sup>2</sup>	0.9938	0.9773	0.9528	0.9629	0.9963	0.9368
	n, S <sub>yx</sub>	5, 68.16	4, 49.72	4, 126.41	5, 108.95	4, 42.82	5, 275.59
Co(II)	b <sub>0</sub>	374±184	79±55	-10±26	83±41	31±9	66±12
	b <sub>1</sub>	613±37	11.1±0.8	3.4±0.4	9.6±0.6	5.33±0.13	6.55±0.18
	R <sup>2</sup>	0.8535	0.9606	0.9095	0.9701	0.9955	0.9953
	n, S <sub>yx</sub>	5, 411.12	3, 103.35	3, 49.57	3, 77.97	3, 16.56	3, 20.27
Cu(II)	b <sub>0</sub>	483±389	-	-	-	-	-
	b <sub>1</sub>	131±27	-	-	-	-	-
	R <sup>2</sup>	0.8185	-	-	-	-	-
	n, S <sub>yx</sub>	3, 606.64	-	-	-	-	-

Los valores de sensibilidad obtenidos fueron similares a los obtenidos con las condiciones previas. Los límites de detección conseguidos en ausencia de EDTA para Cr(III), Co(II) y Cu(II) fueron similares a los anteriores. En presencia de EDTA los límites de detección para Cr(III) fueron similares, el Cu(II) no se detectó y el límite de detección de Co(II) aumentó por encima de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Las sensibilidades obtenidas para Cr y Co con el *procedimiento en estático* fueron 0.898 y 0.35, respectivamente. Estos valores fueron similares a los obtenidos en la **Tabla 15** para muestras no acidificadas.

**Señal quimioluminiscente para patrones acondicionados con HNO<sub>3</sub>.**

La emisión quimioluminiscente se estudió en condiciones ácidas drásticas (0.5M HNO<sub>3</sub>).

La **Tabla 17** muestra los parámetros de calibración en ausencia de EDTA y con el *procedimiento en flujo*. Las sensibilidades para los tres elementos traza, Cr(III), Co(II) y Cu(II) fueron peores que las obtenidas en las condiciones anteriores sin EDTA. Sin embargo, la sensibilidad para el Cr(III) fue similar a la obtenida con patrones sin acidificar y patrones acidificados con HCl cuando se empleó EDTA 0.01M. Los límites de detección calculados para una relación señal/ruido de 3 fueron 3, 3.5 y 10 µg L<sup>-1</sup>, para Cr(III), Co(II) y Cu(II) respectivamente.

**Tabla 17.** Parámetros analíticos para Cr(III), Co(II) y Cu(II) en muestras acidificadas con HNO<sub>3</sub> y procedimiento en flujo.

	Cr(III)	Co(II)	Cu(II)
<b>Doble logarítmica</b>			
loga	2.6±1.6	2.8±1.6	2.6±1.6
a	455±44	678±43	367±38
b	0.39±0.05	0.35±0.04	0.26±0.03
R <sup>2</sup>	0.8799	0.8816	0.9143
n, S <sub>yx</sub>	4, 0.0932	4, 0.0733	3, 0.040
<b>Intervalo lineal</b>			
b <sub>0</sub>	513±29	484±48	579±15
b <sub>1</sub>	60±3	130±10	9.1±0.5
R <sup>2</sup>	0.9619	0.9296	0.9717
n, S <sub>yx</sub>	5, 66.33	5, 108.63	4, 31.80

Para el *procedimiento en estático*, fue necesaria una etapa de neutralización de la muestra. Los mejores resultados se obtuvieron empleando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.2272 M considerando una dilución de las muestras 7/10. Las señales quimioluminiscentes se dan en la **Figura 18**. Las curvas de calibrado fueron:

Para Cr(III),  $S = (-0.4 \pm 0.2) + (0.38 \pm 0.01)c_{Cr}$ ; (R<sup>2</sup>=0.99, S<sub>yx</sub>=1.5)  
 Para Co(II),  $S = (-0.2 \pm 0.2) + (0.54 \pm 0.01)c_{Co}$ ; (R<sup>2</sup>=0.99, S<sub>yx</sub>=0.1)

**Aplicabilidad.**

La **Figura 19** muestra la señal obtenida en las distintas condiciones empleando el *procedimiento en flujo*.



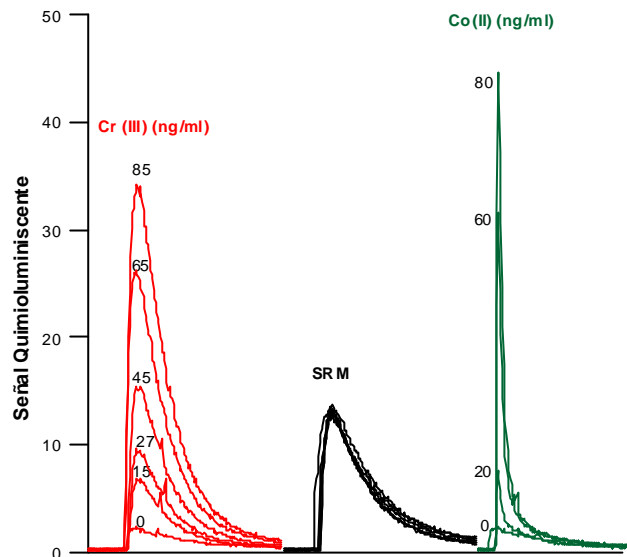


Figura 18. Señales quimioluminiscentes para Cr y Co con el procedimiento en estático.

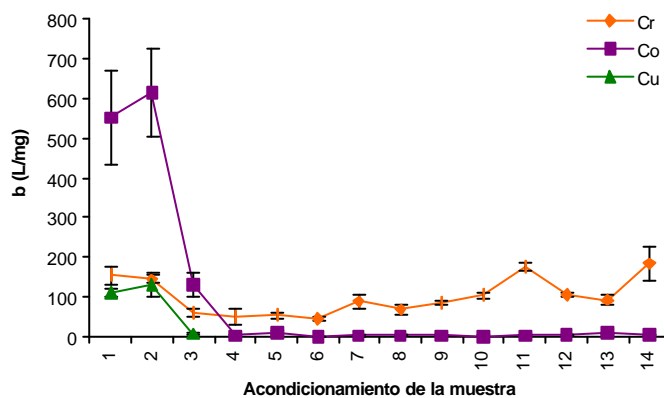
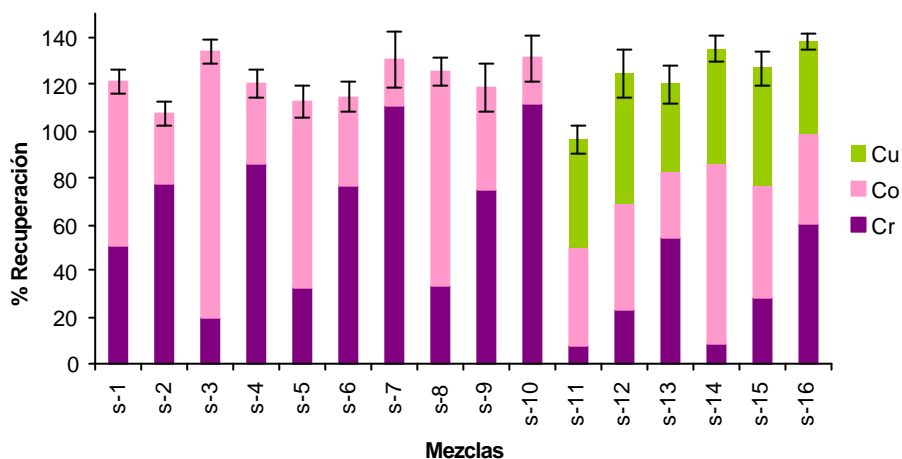


Figura 19. Pendiente de la curva de calibrado en el intervalo lineal en las diferentes condiciones experimentales. 1: Sin acondicionar; 2:  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 3:  $HNO_3\ 0.5$ ; 4:  $EDTA\ 10^{-2}$ ; 5:  $EDTA\ 1 \cdot 10^{-2}$ ,  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 6:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 7:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$ ,  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 8:  $EDTA\ 10^{-2}$  (portador  $KOH$ ); 9:  $EDTA\ 10^{-2}$  (portador tampón); 10:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$  (portador  $KOH$ ); 11:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$  (portador tampón); 12:  $EDTA\ 10^{-2}$  (portador tampón),  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 13:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$  (portador  $KOH$ ),  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ ; 14:  $EDTA\ 5 \cdot 10^{-3}$  (portador tampón),  $HCl\ 5 \cdot 10^{-3}$ . Concentración: M.

La señal quimioluminiscente para cada metal fue función del procedimiento de acondicionamiento y de la presencia de agente enmascarante, aunque para el Cr(III) la influencia fue poco considerable. La especificidad en la determinación de Cr(III) se puede conseguir adicionando EDTA. En la determinación de Cr con el *procedimiento en flujo* no es necesario un paso de neutralización para procesar las muestras en las diferentes condiciones ensayadas. Con el *procedimiento en estático* se debe adicionar  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  para procesar las muestras acondicionadas en medio ácido. Eligiendo las condiciones experimentales la determinación puede ser selectiva para el Cr o Cr, Co y Cu pueden ser evaluados conjuntamente o individualmente cuando los otros dos no están presentes.

Para estudiar la señal quimioluminiscente total se llevaron a cabo diferentes experiencias. El objetivo era evaluar la aditividad de las señales en las diferentes condiciones experimentales. Se analizaron mezclas binarias y ternarias sin acidificar y acidificadas con el procedimiento en flujo (ver parte experimental del *Apéndice I*).

La **Figura 20** muestra los porcentajes de recuperación obtenidos. Se demuestra que una mezcla de metales puede ser calculada como suma de señales individuales.



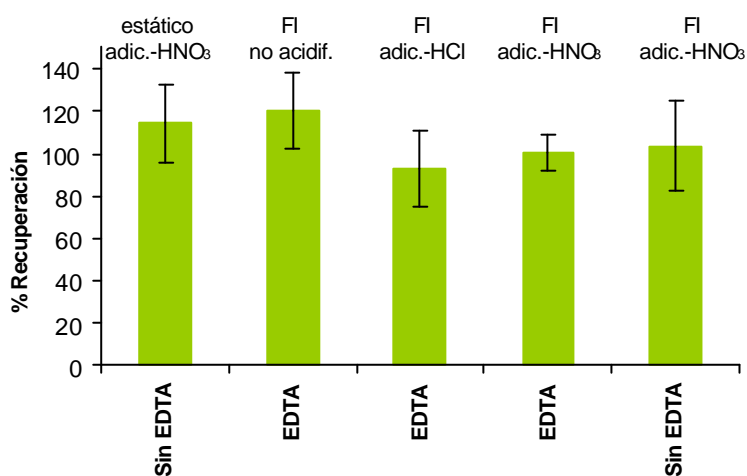
**Figura 20.** Porcentajes de recuperación para las mezclas de metales.

Las barras de error representan  $3s$  para medidas por triplicado.

Se evaluó un diseño experimental  $2^5$  con el *procedimiento en estático* para mezclas. Un test  $t$  mostró las pendientes de las distintas curvas de calibrado de Cr(III) en presencia de diferentes concentraciones de Co(II) eran similares a un nivel de confianza del 95%. Los mismos resultados se obtuvieron para las pendientes de las curvas de calibrado de Co(II) en presencia de diferentes cantidades de Cr(III). Algunas de las curvas de calibrado se dan en la **Tabla 15**. Los valores de las pendientes de las mezclas fueron similares a los obtenidos para los elementos solos. Así, la señal total puede ser considerada como suma de las señales de Cr(III) y Co(II). Los mismos estudios se llevaron a cabo para mezclas con el *procedimiento en flujo* (**Tabla 16**). En todos los casos, el test  $t$  mostró que no había diferencias significativas entre las pendientes de los calibrados para un nivel de confianza del 95%.

Se analizó el material estándar de referencia SRM©1640. Los elementos de la muestra de agua mineral se conservan en HNO<sub>3</sub> 0.5M. El contenido de metales en la muestra se da en la **Tabla 13**. La señal analítica con el *procedimiento en estático* se da en la **Figura 18**. Al igual que para los patrones se añadió Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al material de referencia. Se comparó la señal del patrón de referencia con la señal de mezclas de Cr y Co reproduciendo los contenidos en el SRM©1640. Como se muestra en la **Figura 20**, se obtuvieron buenos porcentajes de recuperación. Por tanto, solo la señal de estos dos elementos contribuye a la señal analítica. Principalmente, la señal corresponde al Cr porque el contenido de Co en una dilución 7/10 se encuentra próximo al límite de detección. Se podría emplear una técnica de regresión multivariante para estudiar Cr y Co a partir de sus registros (*pag 57*).

Haciendo uso del *procedimiento en flujo*, se pudo cuantificar Cr selectivamente adicionando EDTA 0.01M. Para determinar Cr, fue posible el empleo de patrones acidificados o sin acidificar para procesar muestras acondicionadas en diferentes condiciones. Este hecho puede observarse a partir de los valores de sensibilidad y los resultados para el SRM©1640 (diluido 6.4 veces) que se dan en la **Figura 21**. En ausencia de EDTA, los patrones y las muestras deben acondicionarse de igual modo con el fin de obtener estimaciones exactas. La **Figura 21** muestra que se obtuvieron los mismos resultados para el material de referencia SRM©1640 que para una mezcla de Cr, Co y Cu preparada en HNO<sub>3</sub>.



**Figura 21.** Porcentajes de recuperación para el material de referencia comparado con mezclas de patrones en las diferentes condiciones experimentales. Las barras de error representan 3s para medidas por triplicado.

## Conclusiones.

Se ha llevado a cabo un estudio de la señal quimioluminiscente en función de distintos procedimientos de acondicionamiento de las muestras. A su vez, se ha realizado un estudio paralelo de selectividad. La aditividad de las señales ha sido demostrada

mediante estudios de recuperación. Empleando un material de referencia se ha estudiado la selectividad, exactitud y precisión.

Se ha propuesto una guía para la determinación de metales empleando señales quimioluminiscentes. Los procedimientos de acondicionamiento de muestras y patrones deben ser seleccionados de acuerdo a la estrategia de muestreo, los objetivos del análisis (uni- o multielemental) y a las necesidades del acondicionamiento. Por tanto, los métodos quimioluminiscentes en *estático* y en *flujo* pueden ser aplicados con éxito a muestras de aguas naturales acondicionadas en diferentes condiciones.

Es posible la determinación selectiva de Cr(III) en aguas naturales en presencia de EDTA. La determinación de Cr(III) no depende del protocolo de acondicionamiento trabajando con el *procedimiento en flujo*. Así pues, es posible emplear patrones preparados en agua para procesar muestras acondicionadas en distintas condiciones, si en la disolución de portador esta presente el EDTA 0.01M. Cuando se elige el *procedimiento en estático*, el pH de la muestra debe controlarse añadiendo Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>.

Se pueden analizar conjuntamente Cr(III) y Co(II) utilizando el procedimiento en estático regulando la concentración de EDTA y una técnica de calibración multivariante. En ausencia de EDTA es factible estimar la concentración global de Cr, Co y Cu, Co en ausencia de Cr y Cu o Cu en ausencia de Cr y Co.

### **2.1.2. MEJORA DE LOS LÍMITES DE DETECCIÓN PARA AMONIO Y AMONIACO OBTENIDOS CON LA REACCIÓN DE BERTHELOT MEDIANTE EL USO DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A LA ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DIFUSA.**

La medida exacta de la concentración de amonio es fundamental para entender la biogeoquímica del nitrógeno en los ecosistemas acuáticos. La determinación de nitrógeno a bajas concentraciones requiere de una reacción química para transformarlo en un derivado adecuado para su detección colorimétrica, fluorimétrica o quimioluminiscente [25-27].

Recientemente, se ha prestado especial atención a la cuantificación directa de especies coloreadas retenidas en la superficie de soportes sólidos (*i.e.* papel de filtro) mediante la espectroscopía de reflectancia difusa. De hecho, esto puede ser extendido al análisis de compuestos que puedan ser transformados en especies coloreadas mediante una reacción química. La aproximación más simple, es la derivatización en disolución para formar compuestos coloreados. La disolución resultante se hace pasar a través del papel de filtro, y el derivado queda retenido en la superficie. Finalmente el papel de filtro se seca y se miden los valores de reflectancia difusa a la longitud de onda adecuada. Alternativamente, el papel de filtro puede ser sumergido en una disolución de agente derivatizante para fijar el compuesto. Si la reacción de derivatización tiene lugar en condiciones suaves, el derivado puede ser formado directamente en la superficie del papel. De particular interés son los procedimientos que emplean las membranas de EFS como soportes sólidos porque con la inmovilización de las especies coloreadas pueden obtenerse elevados factores de concentración [28]. También existe la posibilidad de inmovilizar el reactivo en la membrana de EFS. Los analitos se extraen y derivatizan en las membranas cuando las muestras se hacen pasar a través de ellas [28-30]. La metodología EFS/espectroscopía de reflectancia difusa ofrece ventajas adicionales como el incremento en grado de reacción o la simplificación del procedimiento analítico global [29-31]. La combinación de la EFS y la espectroscopía de reflectancia difusa han sido aplicadas con éxito a la determinación de algunos metales en agua [28-30, 32-35]. Más recientemente, ha sido empleada para la determinación de aminos alifáticos en agua [31].

La posibilidad de determinar amonio con la espectroscopía de reflectancia difusa ha sido demostrada con el reactivo de Nessler [32]. La respuesta era positiva cuando aparecía un precipitado de color amarillo en la superficie del papel de filtro. Para concentraciones de amonio entre 9 y 900 mg L<sup>-1</sup> las respuestas fueron lineales. Estas condiciones no son adecuadas para la cuantificación de amonio a las bajas concentraciones en las que el amonio se encuentra presente en las muestras reales.

En este estudio, evaluamos la posibilidad de cuantificar amonio como azul de indotimol mediante la combinación de EFS y espectroscopía de reflectancia difusa. Los reactivos y procedimiento experimental se pueden consultar en el *Apéndice 2*.

### Efecto de las variables experimentales.

- *Elección de membrana de EFS:* Para retener el derivado formado, azul de indotimol, se consideraron dos tipos de discos de extracción, membranas Empore cargadas con partículas de sílica C<sub>18</sub> y cargadas con partículas de SDB-XC. La eficiencia se evaluó comparando la respuesta de reflectancia difusa. Se obtuvieron respuestas mayores con los discos C<sub>18</sub>, así, se prefirieron las membranas C<sub>18</sub>.
- *Acondicionamiento de las membranas C<sub>18</sub>:* Se ensayaron distintos procedimientos para el acondicionamiento de las discos (ver la sección experimental del *Apéndice 2*). Los mayores incrementos de la reflectancia se observaron cuando los discos se acondicionaron con 2 mL de MeOH seguido de 0.5 mL de CETAB. El efecto del surfactante en la adsorción del analito derivatizado es probablemente debido a su acción como contraión, tal y como se deriva del mecanismo de reacción **Figura 4** (pag. 27). Ésto explicaría el aumento de la señal analítica en un factor de 1.7 cuando se emplea CETAB en lugar de agua para el acondicionamiento de los discos.
- *Volumen de la muestra de agua:* Se ensayaron varios volúmenes de agua en el rango de 5 a 20 mL con el fin de conseguir el máximo factor de preconcentración. Los resultados obtenidos mostraron que un volumen de 10 mL proporcionó la mejor sensibilidad en la determinación de amonio. Para volúmenes mayores se produjeron pérdidas del azul de indotimol debido a la autoelución.
- *Concentraciones del catalizador y de los reactivos:* El efecto de la concentración de catalizador fue evaluado adicionando diferentes volúmenes de nitroprusiato 0.1M al medio de reacción. Los volúmenes ensayados variaron de 0.1 a 0.4 mL (dando concentraciones finales de  $9.4 \cdot 10^{-4}$ - $3.59 \cdot 10^{-3}$  M). La mejor concentración de catalizador fue  $10^{-3}$  M.  
Igualmente, la influencia del porcentaje de HClO 3% (cloro activo) en el medio de reacción fue examinada variando los volúmenes adicionados de HClO 3%. Se ensayaron dos volúmenes, 0.025 y 0.05 mL, resultando unos porcentajes finales de 0.007% y 0.014 %, respectivamente. Se observó que la adición de HClO 0.007% fue suficiente para alcanzar las concentraciones máximas de azul de indotimol.  
Finalmente, la concentración de timol se varió entre 0.22 y 1.6 M. Los resultados obtenidos indicaron que la mejor opción era emplear timol 0.8 M (equivalente a una concentración en la mezcla de reacción de 0.037 M).

La **Tabla 18** resume las condiciones óptimas de derivatización y preconcentración del amonio en discos de extracción C<sub>18</sub>. No se detectó azul de indotimol en la disolución resultante después de la retención en la membrana. La **Figura 22** muestra el espectro de reflectancia obtenido para el blanco y para disoluciones de amonio (0.1 y 0.25 mg L<sup>-1</sup>) procesadas en las condiciones óptimas. Como se observa, la máxima sensibilidad se consiguió a 675 nm, por tanto los estudios cuantitativos fueron realizados a esta longitud de onda.

Tabla 18. Condiciones seleccionadas para la determinación de amonio en agua.

ETAPAS	CONDICIONES ÓPTIMAS
<i>Formación del azul de indotimol</i>	10 mL de muestra  +0.2 mL de tampón carbonato 0.05M pH 10.7 +0.025 mL de HClO (3% cloro activo) +0.1 mL de nitroprusiato 0.1 M (agitando 1min) +0.5 mL de timol 0.8 M (reacción 5 min)
<i>Extracción</i>	Membranas C <sub>18</sub> acondicionadas con 2 mL de MeOH seguido de 0.5 mL de CETAB 1% (m/v)
<i>Medida</i>	Reflectancia difusa a $\lambda=675$ nm

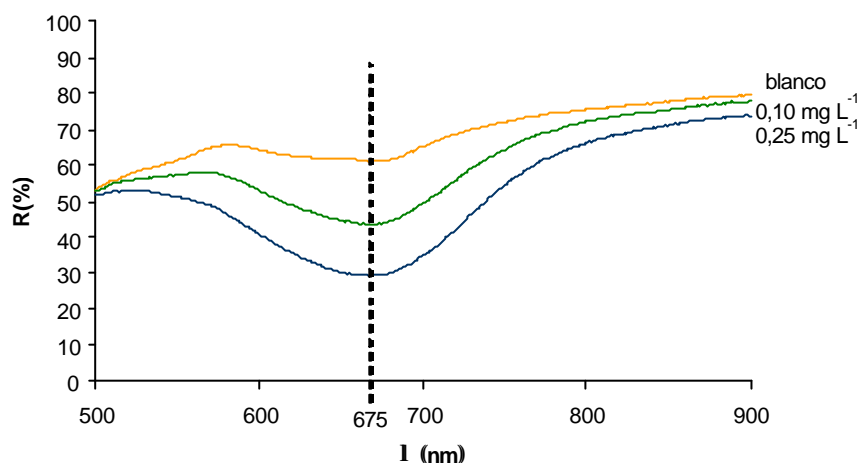


Figura 22. Espectros de reflectancia difusa obtenidos bajo condiciones óptimas para el blanco y dos disoluciones de amonio.

### Parámetros analíticos.

Las condiciones para la derivatización y extracción de amonio (**Tabla 18**) se aplicaron para el análisis de patrones de amonio en el intervalo de 0.025 y 0.5 mg L<sup>-1</sup>. Como señales analíticas para obtener las curvas de calibrado se emplearon dos parámetros, la reflectancia difusa,  $R$ , y la función de Kubelka-Munk  $F(R)$ , calculada como  $(1-R)^2/2R$ . Los resultados obtenidos se resumen en la **Tabla 19**. Como se observa el empleo de  $F(R)$  proporcionó un intervalo lineal más amplio. Las medidas de  $R$  proporcionaron mejor precisión que las de la transformación  $F(R)$ . Los valores de %CV intradía e interdía se dan en la **Tabla 19**. Estos valores pueden ser considerados satisfactorios en las determinaciones basadas en la reflectancia [32]. Los límites de detección calculados como  $3s_{bl}/b$  donde  $s_{bl}$  es la desviación estándar de diez blancos y  $b$  es la pendiente correspondiente a las curvas de calibrado, también se muestran en la **Tabla 19**.

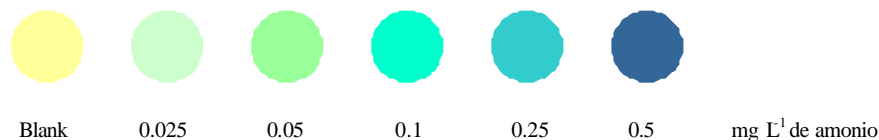
**Tabla 19.** Parámetros analíticos obtenidos para amonio en agua por el procedimiento clásico y el método propuesto.

	Linealidad ( $y=a+bx$ )				Reproducibilidad (% C.V.)		L.D. (mg L <sup>-1</sup> ) (n=10)
	a±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	I.L. (mg L <sup>-1</sup> )	Intradía (n=3)	Interdía (n=6)	
<b>R</b>	56.2±0.9	-128±7	0.990	0.025-0.250	9 <sup>a</sup> 9 <sup>b</sup>	16 <sup>a</sup>	0.015
<b>F(R)</b>	0.152±0.002	2.41±0.01	0.9999	0.025-0.500	16 <sup>a</sup> 12 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	0.01
<b>A</b>	0.022±0.003	0.26±0.01	0.995	0.250-5.00	5 <sup>c</sup>	3 <sup>c</sup>	0.08

a: 0.1 mg L<sup>-1</sup>, b: 0.25 mg L<sup>-1</sup>, c: 1.0 mg L<sup>-1</sup>

De la **Tabla 19** se deriva que el factor de concentración conseguido fue de 10. Este valor se obtuvo por comparación de los intervalos lineales obtenidos con el método del azul de indofenol convencional y el método propuesto.

Cabe destacar que en las condiciones óptimas, el amonio puede ser identificado en agua a niveles de concentración de 0.025 mg L<sup>-1</sup> por inspección visual de la superficie de la membrana, debido a que el color de superficie se distingue fácilmente del color marrón-amarillento pálido del blanco, tal como se muestra en la **Figura 23**. La **Figura 23** muestra la asignación de concentración en función del color para el ensayo visual.



**Figura 23.** Asignación de concentración para el ensayo visual.

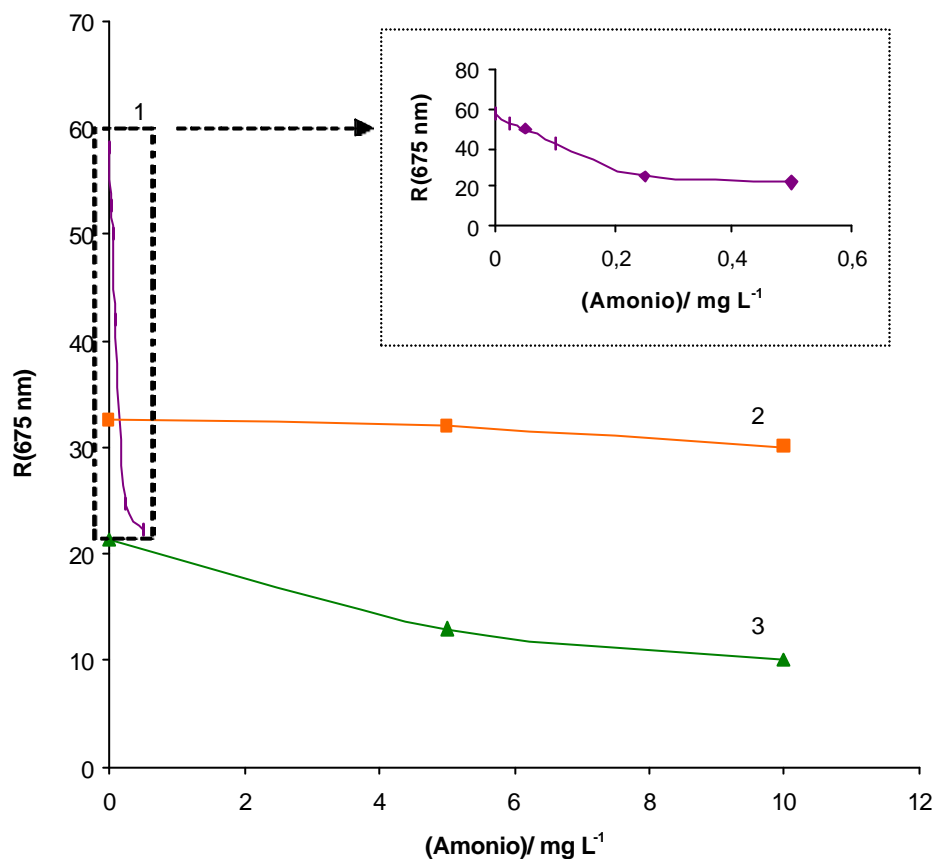
### Comparación con el procedimiento UV-vis convencional y con el método basado en un sensor.

Las características analíticas del método EFS/espectroscopía de reflectancia difusa propuesto se compararon con el método convencional basado en la medida de la absorbancia de la disolución de azul de indotimol. Los resultados obtenidos se dan en la **Tabla 19**.

El método propuesto proporciona mejor sensibilidad. Este hecho puede ser explicado por la etapa de preconcentración añadida en el método propuesto. Además los residuos generados con el procedimiento propuesto son menos contaminantes.



La **Figura 24** muestra las señales de reflectancia obtenidas con un sensor fabricado con salicilato y propuesto en [36]. También se procesó un sensor basado en timol. Como se puede ver, el sensor de salicilato proporcionó mejor sensibilidad que el de timol. Además, el sensor fabricado con timol no fue tan homogéneo como el de salicilato.



**Figura 24.** Valores de reflectancia obtenidos para concentraciones variables de amonio por el método del soporte con EFS (1) y con los sensores preparados con timol (2) y salicilato (3).

Los resultados obtenidos con el sensor fueron comparados con los obtenidos con la metodología propuesta (**Figura 24**). La metodología propuesta fue más sensible que los sensores. La identificación de amonio por inspección visual (ver **Figura 23**) fue 20 veces inferior que la mínima concentración detectable proporcionada con el sensor. La metodología propuesta es útil para detectar y/o determinar amonio a niveles de concentración bajos (**Tabla 19**) cuando el sensor no es adecuado.

### Interferencias.

Se evaluó el efecto sobre la determinación de amonio de algunos metales y amino compuestos potencialmente presentes en muestras reales de agua [37].

Las especies ensayadas se muestran en la **Tabla 20**. El efecto de cada especie fue primero evaluado por comparación de las absorbancias de las mezclas amonio-interferente con las obtenidas con disoluciones patrón de amonio a la misma concentración. Las concentraciones ensayadas de los interferentes fueron mucho mayores que las concentraciones máximas permitidas [38], y alrededor de 1-3 ordenes de magnitud mayor que las concentraciones encontradas en muestras reales de agua. Los resultados se muestran en la **Tabla 20**. Como puede observarse, solo el hierro y la metilamina causaron modificaciones de las absorbancias mayores que el 10%.

Teniendo en cuenta los resultados de la **Tabla 20**, el hierro y la metilamina fueron evaluados como interferentes de método EFS/espectroscopía de reflectancia difusa propuesto. Las variaciones en la reflectancia difusa obtenidas se muestran en la **Tabla 20**. Como era de esperar, se observaron variaciones significativas en los valores de reflectancia difusa en relación con los valores medidos para disoluciones de amonio. A pesar de este hecho, y como se ha comentado antes, las concentraciones ensayadas fueron mucho mayores que las que normalmente se encuentran en aguas naturales, y por tanto, estas especies solo serían interferentes en aguas altamente contaminadas.

**Tabla 20.** Efecto de algunas especies en la señal obtenida para amonio  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Especie	Conc. Añadida ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Variación Absorbancia (%)	Especie	Conc. Añadida ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Variación Absorbancia (%)
<i>Cu(II)</i>	16	0	$\text{SO}_4^{2-}$	1000	0
<i>Fe(II)</i>	2	$19 \pm 2$ $27 \pm 1^*$	Metilamina	0.5	$22 \pm 2$ $35 \pm 3^*$
<i>Hg(II)</i>	25	$1.6 \pm 0.8$	Etilamina	2	$4 \pm 1$
$\text{K}^+$	1000	0	Propilamina	10	$5.3 \pm 0.5$
<i>Mn(II)</i>	10	$9.8 \pm 0.8$	Butilamina	10	0
$\text{Na}^+$	500	$4 \pm 1$	Pentilamina	10	0
<i>Cl</i>	500	$4 \pm 1$	Dimetilamina	10	0
$\text{NO}_3^-$	25	$1.6 \pm 0.8$	Dietilamina	10	0

\*: Reflectancia difusa y amonio  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$ .

### Aplicación de la medida de amonio a muestras reales de agua.

El procedimiento desarrollado se aplicó a la determinación de amonio en diferentes muestras reales de agua. Se empleó el método de adición estándar (MAS) para detectar posibles efectos matriz. Si se encontraba efecto matriz en alguna muestra, se empleaba la pendiente de las adiciones estándar para estimar la concentración en lugar de la pendiente del calibrado obtenido con patrones.

En la **Tabla 21** se muestran las concentraciones de amonio encontradas en las muestras reales de agua. Las muestras 3 y 4 (ver la sección experimental del Apéndice 2) no fueron incluidas en la tabla porque el contenido de amonio estuvo por debajo del límite de detección del método propuesto (**Tabla 19**). Con el fin de evaluar la exactitud

del método, los resultados se compararon con los obtenidos con el método fluorimétrico del OPA/tiol descrito previamente para la determinación selectiva de amonio [39]. Este método se basa en la derivatización del analito con OPA/NAC y posterior medida fluorescente. Las concentraciones halladas con los valores de reflectancia directa estuvieron próximas a las obtenidas con el método del OPA/NAC (ver **Tabla 21**). La concentración de amonio en las muestras 2, 3 y 4 no pudo ser determinada con el ensayo del OPA/NAC, ya que los valores estuvieron por debajo del límite de detección de este método, que es  $0.070 \text{ mg L}^{-1}$ . Debe indicarse que la sensibilidad cuando se emplea sulfito [40] en lugar de NAC fue peor. El método propuesto EFS/espectroscopía de reflectancia difusa fue más sensible que los ensayos basados en el reactivo OPA/NAC.

**Tabla 21.** Concentraciones de amonio encontradas ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en muestras reales de agua por diferentes métodos.

	Método Fluorimétrico OPA/NAC	Método basado en la Reflectancia
Muestra 1	$0.070 \pm 0.005$	$0.089 \pm 0.001$
Muestra 2	< L.D.	$0.041 \pm 0.009$
Muestra 5	$1.24 \pm 0.03$	$1.20 \pm 0.02$
Muestra 6	$1.19 \pm 0.04$	$1.00 \pm 0.04$
Muestra 7	$0.46 \pm 0.03$	$0.561 \pm 0.003$

Un test  $t$  aplicado a las muestras 1, 5, 6 y 7 determinadas con el método propuesto empleando valores  $R$  y con el método de OPA/NAC indicó que los resultados eran estadísticamente similares a un nivel de confianza del 95% ( $t_{\text{calc}}=0.453$   $\alpha=0.681$ ). Se obtuvo la misma conclusión cuando se emplearon valores de  $F(R)$ , aunque se encontró un valor peor para el estadístico  $t$  ( $t_{\text{calc}}=1.236$   $\alpha=0.304$ ). Por tanto, el uso de valores de  $R$  mejora la exactitud del método, así que se propone el empleo de  $R$  en lugar de los valores transformados  $F(R)$ . La razón de esa mejora puede ser explicada porque la variación global (precisión) del procedimiento analítico fue la principal contribución a la incertidumbre del procedimiento. Los valores de  $F(R)$  presentan peor precisión que los valores de  $R$ , como puede verse en la **Tabla 19**, siendo esto consistente con la ley de propagación de errores.

### Conclusiones.

Este trabajo ha ilustrado la utilidad de la combinación EFS en membranas  $C_{18}$  con la espectroscopía UV-reflectancia difusa para la determinación sensible de amonio en agua formando el azul de indotimol. Comparado con el procedimiento convencional, basado en la medida de la absorbancia del azul de indotimol en disolución, el procedimiento propuesto mejora la sensibilidad por la introducción de una etapa de preconcentración. Comparado con métodos descritos previamente, que emplean la extracción líquido-líquido [41] el ensayo propuesto es más simple y menos contaminante.

Las únicas dos especies que dan reacción con el método del azul de indotimol (hierro y metilamina) no serían interferentes a los niveles de concentraciones esperados

en aguas naturales. Además, el método podría ser empleado para identificar amonio a niveles de concentraciones por encima de  $0.025 \text{ mg L}^{-1}$  por inspección visual de la superficie de la membrana, mejorando marcadamente la sensibilidad del sensor propuesto en [36]. El límite de detección del método fue mejor que el obtenido con el método fluorimétrico basado en el OPA/NAC [39].

Este método constituye una forma rápida, simple y de bajo coste para determinar amonio sin necesidad de personal entrenado o tratamientos complicados de las muestras. Además se ha eliminado la principal limitación de método del indofenol, que es la dificultad con muestras de baja concentración.

Las características subrayadas hacen a este procedimiento especialmente adecuado para el screening de muestras y control o monitorización en laboratorios medioambientales o para determinaciones *in situ*.

### **2.1.3. DETERMINACIÓN DE AMONIO CON EL MÉTODO BASADO EN LA REACCIÓN DEL INDOFENOL EN AGUAS CONTAMINADAS CON ÁCIDOS HÚMICOS Y SURFACTANTES.**

Las sustancias húmicas son los compuestos orgánicos disueltos más abundantes en aguas naturales. El contenido normal de estos compuestos puede variar desde 1 a 20 mg L<sup>-1</sup> [42,43], aunque en algunos casos se pueden encontrar concentraciones mayores [44]. Los compuestos húmicos se forman en el suelo y en el sistema acuático, derivados de la materia orgánica durante la degradación de plantas y animales, y juegan un papel fundamental en muchos procesos medioambientales y geoquímicos [45]. Generalmente se caracterizan por ser de color entre amarillo y negro. La estructura de los ácidos húmicos es una red de cadenas orgánicas entrecruzadas con grupos funcionales tales como carboxilos, hidroxilos alifáticos y aromáticos y aminos, con espacios vacíos que pueden atrapar y unir otros compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el sistema acuático [46]. Por esta razón, la determinación de muchos compuestos potencialmente presentes en agua puede verse afectada por la posible asociación con las sustancias húmicas. Por ejemplo, una fracción importante de metales se compleja con las sustancias húmicas, lo que debería ser especialmente considerado en la determinación de metales a nivel de trazas [47].

Se han propuesto diferentes estrategias para eliminar el efecto negativo de las sustancias húmicas en la determinación de varios compuestos tales como pesticidas [48,49], hidrocarburos policíclicos aromáticos [43] y muchos metales. La mayoría de estos se basan en aislar o degradar las sustancias húmicas [50]. Sin embargo, la presencia de compuestos húmicos no se ha tenido en cuenta en muchas otras determinaciones de importancia medioambiental. Este es el caso del amonio, el que es un importante indicador de la calidad del agua.

Por otra parte, hoy en día, los detergentes son ampliamente empleados. Se emplean en la agricultura, en los hogares y en diferentes industrias (de metales, minería, cosmética). Por tanto, pueden estar presentes en aguas naturales [51] residuales [52] y costeras [53]. Además se han propuesto para eliminar sustancias húmicas de muestras de agua [54,55], de modo que pueden estar presentes en el agua después de su tratamiento en depuradoras. También pueden interferir en la determinación de algunos compuestos orgánicos [56] por interaccionar con los reactivos, enmascarar a los analitos, modificar la señal o reducir la recuperación del analito.

En el trabajo anterior, se ha propuesto un método de determinación de amonio basado en la reacción de Berthelot (que conduce a la formación del azul de indotimol) retención del mismo en una membrana y medida de la reflectancia difusa. Se han estudiado algunas interferencias, tales como aminas, péptidos, aminoácidos y metales [57]. Sin embargo, hasta lo que nosotros conocemos, no se han realizado estudios de la interferencia de ácidos húmicos y surfactantes, a pesar que algunos estudios sugieran que estos compuestos pueden ser interferentes directos [58].

Este trabajo evalúa el efecto de los ácidos húmicos entre 5 y 25 mg L<sup>-1</sup> y surfactantes en la cuantificación de amonio a niveles de entre 0.025 a 1.5 mg L<sup>-1</sup> en aguas contaminadas. Se ha empleado el método EFS/reflectancia difusa para estimar concentraciones de amonio bajas (0.025-0.25 mg L<sup>-1</sup>) y el método colorimétrico para concentraciones entre 0.25 y 1 mg L<sup>-1</sup>. El procedimiento experimental se puede consultar en el *Apéndice 3*.

**Estudio preliminar.**

Se han evaluado y comparado tres reactivos propuestos en la literatura: fenol, timol y salicilato. Se ensayaron diferentes concentraciones de reactivo así como diferentes tiempos de reacción cuando se empleó *fenol*. Para una concentración fija de amonio y un tiempo de reacción fijo, la máxima absorbancia se obtuvo con concentraciones de reactivo entre 0.014 y 0.03 M (datos no mostrados). Teniendo en cuenta la toxicidad del reactivo, se eligió una concentración de fenol de 0.014 M. Para esta concentración el tiempo óptimo de reacción fue 3 min. Los parámetros analíticos en estas condiciones se muestran en la **Tabla 22**.

Cuando se empleó timol como reactivo derivatizante, las condiciones se eligieron de acuerdo con las establecidas en el *Apéndice 2*. Los resultados obtenidos para la cuantificación de amonio en el intervalo de concentraciones de 0.25-1 mg L<sup>-1</sup> se resumen en la **Tabla 22**. Las mismas condiciones se emplearon para la determinación de amonio con salicilato (0.25-1 mg L<sup>-1</sup>) (ver **Tabla 22**).

**Tabla 22.** Parámetros analíticos obtenidos para distintos reactivos tipo *fenol* con el método colorimétrico y para *timol* con el método EFS/reflectancia difusa.

		Parámetros analíticos						
		a±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	n	S <sub>x/y</sub> /b	LD (mg L <sup>-1</sup> )	CV (%)
<i>Colorimétrico</i>	<i>Fenol</i>	0.060±0.020	0.587±0.014	0.998	11	0.04	0.16	2.7
	<i>Timol</i>	0.030±0.010	0.514±0.019	0.998	11	0.05	0.05	1.4
	<i>Salicilato</i>	0.031±0.006	0.400±0.010	0.994	11	0.04	0.05	8.4
<i>EFS/ reflectancia</i>	<i>Timol</i>	56.1±0.7	-185±13	0.990	5	0.005	0.010	7.0

Como se puede ver en la **Tabla 22**, los tres procedimientos proporcionaron linealidad adecuada en los intervalos de concentración ensayados, sin embargo, los LD obtenidos con fenol fueron considerablemente mayores. Los LD obtenidos con timol y salicilato fueron similares. Pero con timol los resultados fueron más reproducibles. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el timol se seleccionó como el mejor reactivo para cuantificar amonio con el método colorimétrico.

Se evaluó la dependencia de la sensibilidad en función del pH con timol como reactivo derivatizante. Los pH ensayados fueron 9.02, 10.7 y 11.06 y las pendientes obtenidas fueron 0.150, 0.260 y 0.514 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. La sensibilidad fue máxima a pH 11.06, por tanto éste fue el pH elegido para el resto de experiencias.

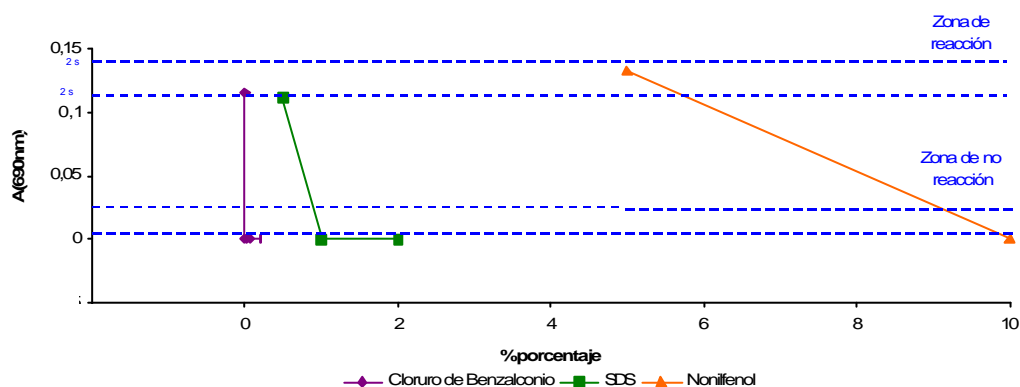
La **Tabla 22** también muestra los datos analíticos obtenidos en el intervalo de 0.025 a 0.25 mg L<sup>-1</sup> por el método de EFS/reflectancia difusa. Este método proporcionó precisión y linealidad satisfactoria con mejores límites de detección, lo que es consistente con los resultados del trabajo anterior (*Apéndice 2*).

Los espectros de los ácidos húmicos en el intervalo de concentraciones de 5 a 100 mg L<sup>-1</sup> fueron directamente medidos para obtener las curvas de calibrado de los ácidos húmicos. La ecuación de la curva de calibrado a 300 nm fue:  $y=(0.0172\pm0.004)x + (0.06\pm0.02)$ ,  $R^2=0.9961$  y  $S_{xy}=0.0459$ . Estos parámetros de calibración permiten calcular la cantidad de ácidos húmicos en muestras reales de agua.

### Influencia de los surfactantes en la reacción de derivatización.

El efecto de los surfactantes se evaluó midiendo blancos y disoluciones de amonio de 0.5 mg L<sup>-1</sup> en presencia de diferentes porcentajes de cloruro de benzalconio (catiónico), dodecilbencenosulfonato sódico (aniónico) y nonilfenol (no iónico). La **Figura 25** muestra el efecto de los surfactantes en la señal de absorbancia del amonio.

De la **Figura 25** se deriva que el nonilfenol no fue un interferente a porcentajes inferiores a 5%. El dodecilbencenosulfonato sódico se estudió entre 0.2 y 2%. El estudio mostró que a porcentajes superiores al 0.5 % interfería en el método propuesto. Si la muestra contenía cloruro de benzalconio a porcentajes superiores al 0.001% la formación del derivado azul de indotimol se inhibía. Por tanto, el método propuesto no podría ser aplicado a muestras con elevado contenido en surfactantes aniónicos, catiónicos y no iónicos porque inhiben la formación del derivado.

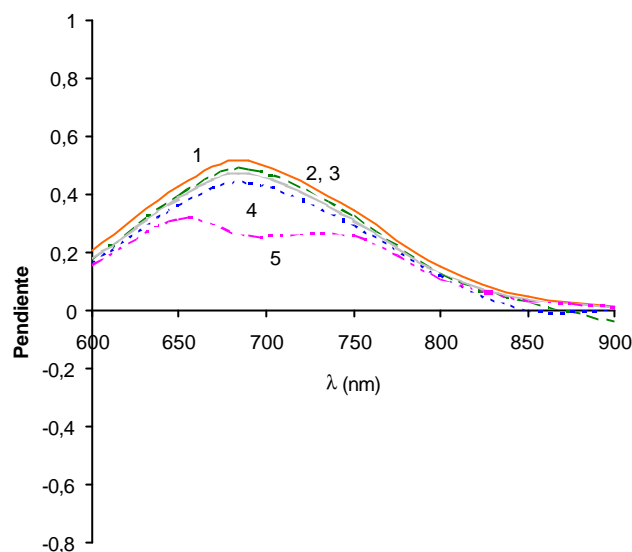


**Figura 25.** Efecto de los surfactantes catiónicos, aniónicos y no-iónicos en la señal de absorbancia del amonio

### Influencia de los ácidos húmicos.

Concentraciones de amonio entre 0.25 y 1 mg L<sup>-1</sup>: La **Figura 26** muestra las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para amonio con el método colorimétrico en el intervalo de longitudes de onda ensayados en presencia de varias cantidades de ácido húmico. Las pendientes obtenidas solo fueron significativamente modificadas en presencia de ácido húmico a concentraciones mayores o iguales a 25 mg L<sup>-1</sup>.





**Figura 26.** Pendientes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de las curvas de calibrado lineales en función de la longitud de onda con el método colorimétrico 1: sin HA, 2: HA  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , 3: HA  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$ , 4:  $25 \text{ mg L}^{-1}$  y 5:  $50 \text{ mg L}^{-1}$

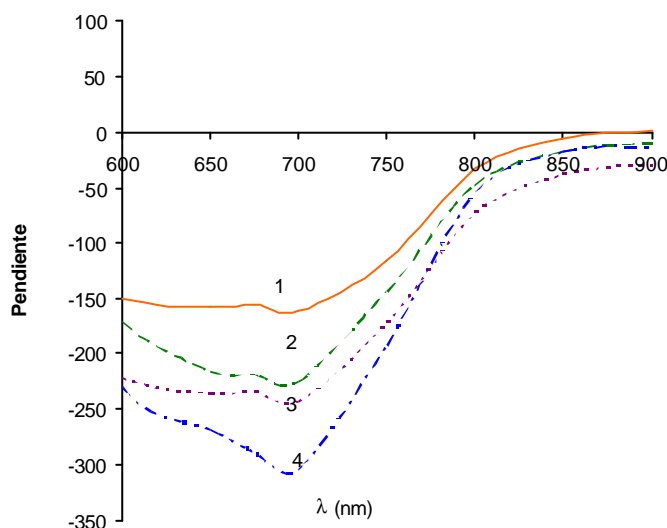
La **Tabla 23** muestra las ecuaciones de calibrado obtenidas en presencia de las cantidades de ácido húmico a  $690 \text{ nm}$ . La aplicación de un test  $t$  demostró que las pendientes de las curvas de calibrado para muestras que contenían entre  $5$  y  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$  de ácidos húmicos eran estadísticamente comparables a las obtenidas en ausencia de ácido húmico (ver **Tabla 22**). Sin embargo cuando la concentración de ácido húmico fue de  $25$  o  $50 \text{ mg L}^{-1}$ , las pendientes fueron significativamente distintas. El efecto matriz aumentó en función del ácido húmico en las muestras. Además, se observó un aumento en la ordenada en el origen si la concentración de ácido húmico era de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  con respecto a la obtenida en ausencia de ácidos húmicos (**Tabla 22**).

Estas mismas disoluciones se almacenaron y se midieron cada día durante siete días para estudiar el efecto del tiempo en la absorción o liberación de amonio de los ácidos húmicos. En ningún caso se encontraron diferencias significativas en las pendientes de las curvas de calibrado. Los coeficientes de variación calculados para las siete pendientes de las curvas de calibrado de amonio fueron  $5\%$ ,  $4\%$  y  $4\%$  para patrones de amonio que contenían concentraciones de ácido húmico de  $5$ ,  $12.5$  y  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabla 23.** Parámetros analíticos para la determinación de amonio en presencia de diferentes concentraciones de ácido húmico.

	Parámetros analíticos en presencia de ácido húmico.				
	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$R^2$	n	$S_{x/y}/b$
<i>Colorimétrico</i>					
5	$0.008 \pm 0.006$	$0.490 \pm 0.010$	0.995	4	0.029
12.5	$0.062 \pm 0.004$	$0.501 \pm 0.008$	0.997	4	0.019
25	$0.023 \pm 0.007$	$0.430 \pm 0.010$	0.994	4	0.033
50	$0.094 \pm 0.006$	$0.380 \pm 0.010$	0.993	4	0.030
<i>EFS/ reflectancia</i>					
5	43.60.8	$-225 \pm 15$	0.991	4	-0.005
12.5	$46 \pm 1$	$-234 \pm 24$	0.979	4	-0.008
25	$46 \pm 1$	$-295 \pm 22$	0.989	4	-0.005

Concentraciones de amonio entre  $0.025$  y  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ : La **Figura 27** muestra las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas para amonio con el método de EFS/reflectancia difusa en el intervalo de longitudes de onda ensayados en presencia de diferentes cantidades de ácido húmico. Las pendientes de las curvas de calibrado lineales se vieron afectadas por la presencia de ácido húmico a concentraciones de  $5$ ,  $12.5$  y  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .



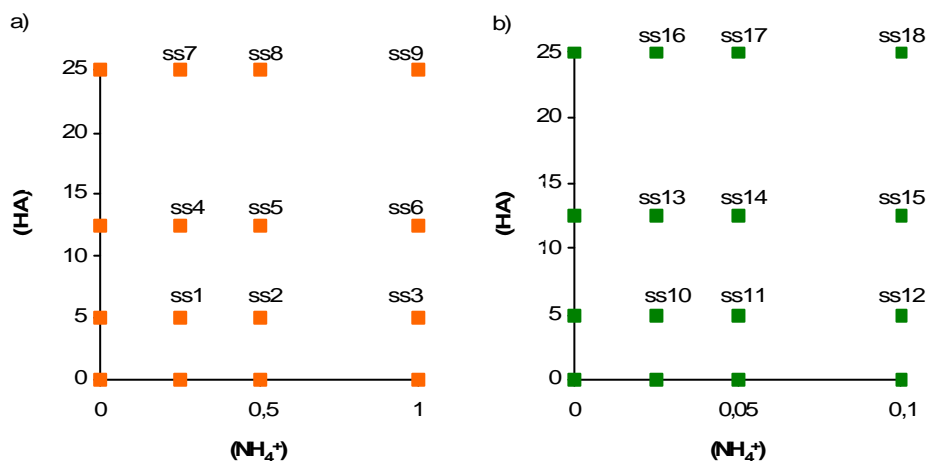
**Figura 27.** Pendientes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de las curvas de calibrado lineales en función de la longitud de onda con el método EFS/reflectancia  
 1: sin HA, 2: HA  $5 \text{ mg L}^{-1}$ , 3: HA  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$ , 4:  $25 \text{ mg L}^{-1}$  y 5:  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

Las ecuaciones obtenidas para amonio (ver **Tabla 23**) mostraron efecto matriz (pendientes significativamente diferentes a las obtenidas en ausencia de ácido húmico) aún a concentraciones bajas de ácido húmico ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Las ordenadas en el origen también se modificaron comparadas con las obtenidas en ausencia de ácido húmico.

### Análisis de muestras de agua.

Se analizaron diversas muestras de agua sintéticas y once muestras reales. El método colorimétrico se empleó para concentraciones elevadas de amonio y el método EFS/reflectancia para contenidos de amonio bajos.

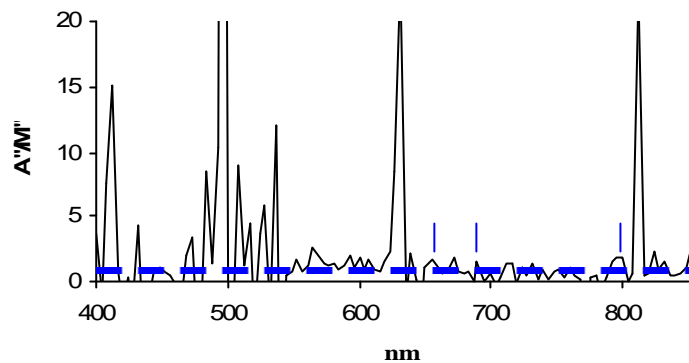
El método colorimétrico se empleó para las muestras sintéticas (de ss1 a ss9) (ver **Figura 28a**) y el método EFS/reflectancia para las muestras sintéticas desde ss10 a ss18 (**Figura 28b**). La concentración en las muestras ss1, ss2, ss3, ss4, ss5 y ss6 se determinó con la curva de calibrado obtenida con patrones porque no se observó influencia del ácido húmico. El GHPSAM se empleó para las muestras ss7 hasta ss18 debido a que los húmicos introducían fuentes de errores, tal como ha sido demostrado en la sección anterior.



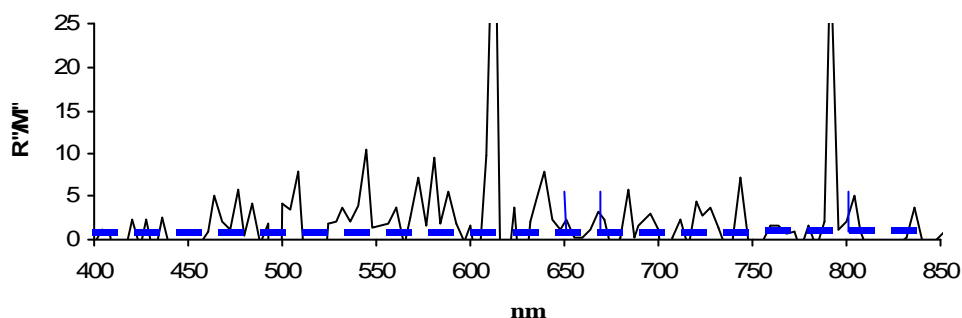
**Figura 28.** Concentraciones de amonio ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y ácidos húmicos ( $\text{mg L}^{-1}$ ) en las muestras sintéticas, a) medidas con el método colorimétrico y b) medidas con el método EFS/reflectancia

El método GHPSAM [59,60] (ver *Apéndice A del Apéndice 3*) elige las zonas espectrales donde la interferencia es lineal y elimina su contribución trabajando con tríos de longitudes de onda, además corrige el efecto matriz. Las longitudes de onda de trabajo seleccionadas fueron 650, 690 y 800 nm para el método colorimétrico y 650, 675 y 800 nm para el método EFS/reflectancia. Como ejemplos, la **Figura 29** muestra los gráficos  $A''/M''$  o  $R''/M''$  vs  $\lambda$  para las muestras ss8 y rs6. Estos gráficos muestran las zonas espectrales donde la interferencia puede considerarse lineal.

a)



b)



**Figura 29.** Gráficos a)  $A''/M''$  vs  $\lambda$  para la muestra sintética ss8 y b)  $R''/M''$  vs  $\lambda$  para la muestra real rs6.

La **Tabla 24** y **Tabla 25** muestran las recuperaciones y concentraciones halladas de amonio en las muestras sintéticas (desde las muestras ss1 a ss8), respectivamente. Cuando se empleó el GHPSAM (ver **Tabla 25**), los valores de  $M_j$ ,  $M_R$  y  $M_K$  en la ecuación A.8 del Apéndice A (Apéndice 3) fueron los valores de las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas con patrones que contenían la correspondiente concentración de ácido húmico a las tres longitudes de onda (650, 690 y 800 nm para el método colorimétrico y 650, 675 y 800 nm para el método EFS/reflectancia). Como muestran los resultados de las **Tablas 24** y **25**, se obtuvieron buenos valores de recuperaciones y concentraciones de amonio en todos los casos.

**Tabla 24.** Recuperaciones para las muestras sintéticas con ambas metodologías.

	Método colorimétrico		Método EFS/Reflectancia difusa	
	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> ) añadida	%Recuperación	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> ) añadida	%Recuperación
5	0.25	104±5	0.025	104
	0.5	94±6	0.05	120
	1	101±3	0.1	96
12.5	0.25	113±2	0.025	106
	0.5	94±4	0.05	121
	1	102±2	0.1	115
25	0.25	107±8	0.025	82
	0.5	104±2	0.05	84
	1	101±10	0.1	94

Se procesaron varias muestras reales de agua por el método colorimétrico o por el EFS/reflectancia y si era posible por ambos métodos. En primer lugar, se estudió la presencia o ausencia de ácido húmico, para ello se registró el espectro de la muestra entre 200 y 900 nm. Los espectros para las muestras rs1, rs2, rs3, rs4, rs5, rs8, rs9, rs10 y rs11 indicaron la ausencia de ácido húmico.

Las concentraciones de amonio en las muestras rs1, rs8 y rs11 se calcularon con las curvas de calibrado con patrones (**Tabla 22**). También se analizaron las fortificaciones con concentraciones conocidas de amonio, obteniéndose buenas recuperaciones (ver **Figura 30**). La muestra rs11 solo se analizó con el método colorimétrico debido al elevado contenido en amonio.

Las concentraciones de amonio en las muestras rs2 y rs3 se calcularon con el método de adición estándar (MAS) debido a la existencia de efecto matriz producido por otros componentes de la muestra diferentes del ácido húmico o surfactantes. Empleando la curva de calibrado del MAS y considerando la señal correspondiente a la fortificación de amonio añadida, se obtuvieron buenos valores de recuperación, como puede verse en la **Figura 30**.

Para las muestras rs4 y rs5, el método EFS/reflectancia estableció concentraciones de amonio por debajo del límite de detección (0.011 mg L<sup>-1</sup>).

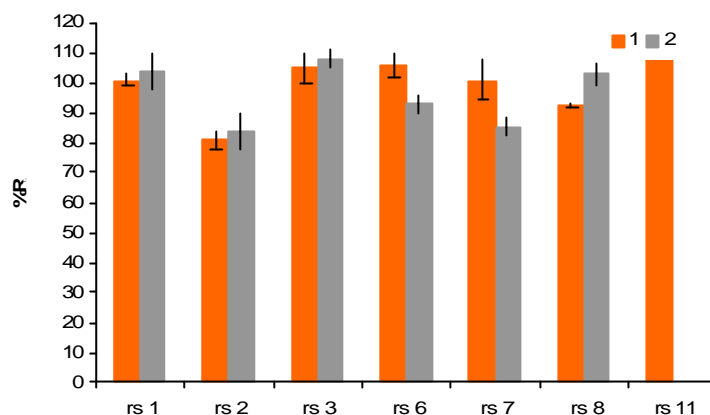
Las muestras rs6 y rs7 presentaban color negro y amarillo respectivamente debido a la presencia de ácido húmico. La concentración de ácido húmico se calculó con la curva de calibrado a 300 nm. Los valores fueron 15±1 mg L<sup>-1</sup> y 4.6±0.1 mg L<sup>-1</sup> para rs6 y rs7, respectivamente. Con el método de EFS/reflectancia fue necesaria la aplicación del GHPSAM. La **Tabla 25** da los valores de las concentraciones halladas. El GHPSAM se empleó para calcular la concentración de amonio y las recuperaciones para las muestras fortificadas de rs6 y rs7, medidas con EFS/reflectancia. Como valores de M<sub>J</sub>, M<sub>R</sub> y M<sub>K</sub> (ecuación A.8, *Apéndice 3*) se emplearon las pendientes obtenidas con el MAS a 650 nm,

675 y 800 nm. La **Figura 6** muestra que las recuperaciones obtenidas fueron adecuadas en ambos casos.

**Tabla 25.** Concentración de amonio y %Er para muestras sintéticas y reales.

	Influencia de HA. GHPSAM	MOSA	Concentración de amonio; Error relativo (%Er)	
			Método colorimétrico (n=3)	Método EFS/reflectancia (n=3)
<i>Muestras sintéticas</i>				
ss1	-	-	0.26±0.01; 4	-
ss2	-	-	0.47±0.03; -6	-
ss3	-	-	1.01±0.03; 1	-
ss4	-	-	0.28±0.04; 12	-
ss5	-	-	0.47±0.02; 6	-
ss6	-	-	1.02±0.02; 2	-
ss7	X	-	0.27±0.02; 8	-
ss8	X	-	0.52±0.01; 4	-
ss9	X	-	1.0±0.1; 0	-
ss10	X	-	-	0.027; 8
ss11	X	-	-	0.060; 20
ss12	X	-	-	0.096; -4
ss13	X	-	-	0.026; 4
ss14	X	-	-	0.060; 20
ss15	X	-	-	0.11; 10
ss16	X	-	-	0.020; -20
ss17	X	-	-	0.042; -16
ss18	X	-	-	0.094; -6
<i>Muestras reales</i>				
rs1	-	-	0.93±0.13	1.15±0.03*
rs2	-	X	3.9±0.1	3.78±0.01*
rs3	-	X	0.52±0.05	0.56±0.01
rs6	X	-	0.50±0.06	0.44±0.02
rs7	X	-	0.58±0.08	0.59±0.03
rs8	-	-	0.63±0.01	0.67±0.03
rs11	-	-	8.9±0.2	-

Las muestras rs8, rs9, rs10 y rs11 eran muestras contaminadas con surfactantes. Las muestras rs8 y rs11 se fortificaron con 0.25 mg L<sup>-1</sup> de amonio. La **Figura 6** muestra las recuperaciones obtenidas, como puede comprobarse, no hubo efecto matriz, ya que los porcentajes fueron próximos al 100%. Así pues, las concentraciones de amonio en las muestras rs8 y rs11 se calcularon con curvas de calibrado obtenidas con patrones. La **Tabla 25** muestra los resultados obtenidos. En el caso de las muestras rs9 y rs10 no se observó ningún derivado de color azul. Ambas dos, eran muestras contaminadas con concentraciones desconocidas de SDS y cloruro de benzalconio. Esos resultados indicaron la presencia de detergentes a niveles que producen la inhibición de la reacción. Por lo que no puede emplearse este método para estimar la concentración de amonio.



**Figura 30.** Recuperaciones para las muestras reales de agua fortificadas con  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$  para el método colorimétrico(1) y con  $0.025 \text{ mg L}^{-1}$  con el método EF/reflectancia difusa (2).

### Conclusiones.

En este trabajo se ha evaluado la influencia de los ácidos húmicos y surfactantes en la determinación de amonio en los métodos basados en los reactivos tipo indofenol. Se ha empleado el método colorimétrico clásico para concentraciones de amonio entre  $0.25$  y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y el desarrollado en el apartado anterior basado en la EFS y espectroscopía de reflectancia difusa para concentraciones entre  $0.025$  y  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ .

Respecto a la influencia de los surfactantes, se concluyó que estos contaminantes inhiben la formación del derivado indotimol-amonio si los porcentajes en las muestras superan el  $0.5 \%$  para los aniónicos,  $0.001\%$  para los catiónicos y  $5\%$  para no iónicos. De modo que, sería necesaria la aplicación de otro método para la determinación de amonio en el caso en que los surfactantes superen estos porcentajes.

Los ácidos húmicos tienen un efecto negativo en la respuesta de amonio, sin embargo con el método colorimétrico este efecto fue despreciable a concentraciones inferiores a  $25 \text{ mg L}^{-1}$ . Debido a que la concentración de ácido húmico en aguas naturales suele ser inferior a  $6 \text{ mg L}^{-1}$ , la determinación de amonio con ese método no se vería afectada. Para muestras con elevados contenidos en ácidos húmicos, la interferencia puede ser corregida aplicando el GHPSAM.

El análisis de muestras con bajos niveles de amonio se puede realizar con el método EFS/reflectancia (para concentraciones entre  $0.025$  y  $0.25 \text{ mg L}^{-1}$ ). Este método mostró menos tolerancia a los ácidos húmicos. Sin embargo, el GHPSAM elimina su contribución.

La influencia de los surfactantes y ácidos húmicos en la determinación de amonio se observó en algunas muestras reales. El GHPSAM fue necesario para dos de las muestras cuyo contenido en ácido húmico era significativo. Si existe efecto matriz debido a otros componentes de la muestra, el método de adición estándar puede corregirlo, siendo este el caso de dos de las muestras.



### 2.1.4. GUÍA PARA LA SELECCIÓN DEL MÉTODO MÁS APROPIADO PARA LA ESTIMACIÓN DE AMONIO EN FUNCIÓN DE LOS REQUISITOS DEL ANÁLISIS DE AGUA.

Ya se ha indicado con anterioridad que en muestras de agua es muy importante conocer las concentraciones de amonio para poder comprender la biogeoquímica del nitrógeno en los ecosistemas acuáticos, así tener una visión global del impacto medioambiental de los contaminantes y de las acciones humanas (ensayos de monitorización) [61] o para detectar el estado de eutrofización de las aguas. En este caso sería necesario estimar el amonio cuantitativamente. También es interesante como indicador de la calidad del agua, expresado como amonio. Los valores máximos de amonio permitidos dependen del tipo de agua. La **Tabla 26** muestra la legislación europea aplicada a algunos tipos de muestras de agua y el valor guía dado por la OMS. Adicionalmente, se muestra la concentración máxima permitida. En este caso podría resultar tan solo necesario conocer si satisface la legislación, y un test cualitativo podría ser útil.

**Tabla 26.** Legislación europea, concentraciones máximas permitidas y valor guía de la OMS para amonio en función del tipo de agua.

Tipo de muestra		Legislación Europea	Concentración máxima permitida (mg L <sup>-1</sup> )
Agua de consumo		EEC/98/83	0.5
Agua superficial destinada a la potabilización	<b>OMS</b> Valor guía	EEC/98/3	1.5
Agua de baño		-	*
Agua residual		EEC/91/271	20 expresado como nitrógeno total

\*no existe valor límite, pero debe ser medido cuando exista tendencia a la eutrofización

La selección del procedimiento es de crucial importancia. Determina el coste del análisis en cuanto al personal y esfuerzo experimental, también depende de las condiciones, tales como el tamaño de la muestra, tiempo, disponibilidad y la información previa del contenido de la muestra. El objetivo de este trabajo será evaluar varios procedimientos de determinación amonio/amoniaco, para facilitar la elección del método más apropiado dependiendo de las necesidades del análisis de amonio. Los métodos evaluados son:

- Métodos ya propuestos, método del reactivo de Nessler y el electrodo selectivo.
- Métodos basados en el método fluorimétrico de Roth.
- Métodos basados en quimioluminiscencia generada con el reactivo TCPO y luminol.
- Dos métodos basados en los reactivos de tipo indofenol (fenol y timol).

- Un método basado en la reflectancia difusa del derivado amonio-timol.

Para demostrar la calidad de los métodos analíticos se comparan parámetros tales como sensibilidad, límite de detección, límite de cuantificación, intervalo de trabajo, linealidad, precisión (repetitibilidad y reproducibilidad), exactitud, recuperación y selectividad/especificidad (efecto matriz y blanco).

Además se evaluaron otros parámetros que no están directamente relacionados con las propiedades analíticas pero que pueden ser decisivos para la elección del procedimiento. Estos parámetros fueron, volumen de muestra, aplicabilidad dependiendo del tipo de muestra, reactivos empleados (cantidad, toxicidad, peligrosidad y seguridad), instrumentación (coste y disponibilidad), tiempo de análisis, grado de automatización y coste del análisis. El nitrógeno determinado por estos métodos es el TAN. Las reacciones se llevan a cabo a pH básico transformando el amonio presente en las muestras en amoníaco.

Los detalles sobre los procedimientos experimentales empleados para cada método se pueden consultar en el *Apéndice 4*.

### Características analíticas.

La **Tabla 27** muestra los reactivos y el volumen de muestra necesario para todos los procedimientos evaluados. Para todos los métodos la cantidad de muestra procesada dependió del tipo de muestra, de la concentración de amonio en las muestras y del procedimiento. El procedimiento del electrodo selectivo, ISE es el método que requiere mayor cantidad de muestra, entre 7 y 20 mL. En resumen y sin tener en cuenta el ISE, no existen diferencias importantes en el volumen de muestra tomado para los distintos procedimientos. Es posible realizar análisis por inspección visual con los métodos que emplean reactivos coloreados, por ejemplo, Nessler, indofenol e indotimol en ambas formas. En el caso del indofenol existen kits comerciales.

La sensibilidad es principalmente el factor limitante en el análisis de trazas, es evidente que el método aplicado debe ser suficientemente sensible para determinar niveles de concentración muy bajos, especialmente en muestras de agua de mar donde el amonio se encuentra a nivel de ppb. La sensibilidad obtenida con cada uno de los métodos se muestra en la **Tabla 28**, esta propiedad junto con el tratamiento de la muestra permite alcanzar los límites de detección necesarios. De acuerdo con estos resultados el método más sensible es la reacción del peroxioxalato con un límite de detección de  $0.008 \text{ mg L}^{-1}$ . Límites de detección similares se obtienen con el método del indotimol acoplado a la EFS y reflectancia difusa ( $0.01 \text{ mg L}^{-1}$ ) procesando 10 mL de muestra. El salicilato puede emplearse como un reactivo tipo fenol, pero no proporciona mejores resultados que el timol ( $LD 0.051 \text{ mg L}^{-1}$ ). Basándonos en nuestros resultados, el método del electrodo selectivo proporcionó el mayor límite de detección ( $1.6 \text{ mg L}^{-1}$ ). Los límites de cuantificación, los intervalos de trabajo y la linealidad también se muestran en la **Tabla 28**. El método del electrodo selectivo proporcionó el mayor intervalo de trabajo, permitiendo la medida por encima de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ . Los métodos del luminol, Roth modificado, indofenol e indotimol presentaron intervalos similares mientras que los métodos del peroxioxalato y el indotimol-EFS proporcionaron el intervalo de trabajo más amplio y bajo, siendo posible la medida desde 25 ppb.

La selectividad garantiza que un método esta midiendo realmente la sustancia de interés. La **Tabla 28** muestra la evaluación de los procedimientos en función de la selectividad (5: método más selectivo). Teniendo en cuenta la reacción, los más selectivos fueron el método de Roth modificado, trabajando a una longitud de onda selectiva para la determinación de amonio y el método de Nessler. La reacción del TCPO fue selectiva debido a la incorporación de una etapa de separación en el procedimiento. Los métodos ISE y luminol fueron N-selectivos, excepto para aminas terciarias y compuestos de nitrógeno aromático. La metilamina y el hierro fueron compuestos interferentes para los métodos del indofenol, indotimol y EFS/indotimol a concentraciones entre 1 y 3 ordenes de magnitud superiores a las encontradas normalmente en agua (hierro  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  y metilamina  $<0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ). Por tanto, estos procedimientos fueron selectivos a concentraciones normales de hierro y metilamina.

Tabla 27. Procedimientos empleados para la determinación de amonio.

Método	Procedimiento		Medida de la señal analítica	Inspección visual	Ref.
	Reactivo	Volumen de muestra (mL)			
<i>Nessler</i>	Tartrato de sodio-potasio. Reactivo Nessler (KI+HgCl+NaOH)	0.05-2	Espectrofotometría Uv-vis	X	39,62
<i>Indofenol</i>	Sulfato de Manganeso, HClO, Fenol.	1.8	Espectrofotometría Uv-vis	X	27,63
<i>Indotimol</i>	Tampón borato pH 10.7. Nitroprusiato HClO, timol.	1.8	Espectrofotometría Uv-vis	X	57,64
<i>EFS-Indotimol</i>	Tampón borato pH 10.7. Nitroprusiato HClO, timol.	10	EFS/Reflectancia difusa	X	29,30
<i>ISE</i>	NaOH.	7-20	Potencial		39,65
<i>Roth modificado</i>	OPA/NAC. Tampón carbonato pH 10.8.	0.8	Espectrofluorimetría		66-68
<i>TCPO</i>	DnsCl, tampón carbonato pH 9, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TCPO en THF-MeCN.	0.15-1.5	Reactor de HPLC postcolumna y detector QL		69,70
<i>Luminol</i>	HClO, tampón carbonato pH 12, luminol	0.035-4.45	Sistema FIA y detector fluorescencia o QL		71,72

Se evaluó la presencia de errores sistemáticos para diferentes muestras de agua fortificadas. Solo, el método del electrodo selectivo estuvo completamente libre de errores sistemáticos, los demás métodos mostraron efecto matriz en función de la muestra (indofenol, reacción del peroxioxalato y el método modificado de Roth) o de la composición de la muestra (método del luminol en presencia de S o Cu(II) causa efecto matriz). El método de Nessler, fue el único que presentó efecto matriz independientemente de la muestra y además presentó errores sistemáticos constantes (blanco total de Youden, BTY) para muestras de agua residuales. Desde este punto de vista, el método de Nessler es el menos recomendado, además tiene el inconveniente de la aparición de turbidez en muestras y el blanco de reactivo da señal a la longitud de onda de medida.

**Tabla 28.** Características analíticas de los procedimientos estudiados.

	Métodos evaluados							
	Nessler	Indo-fenol	Indo-timol	EFS-indotimol	ISE	Roth modif.	TCPO	Luminol
<i>LOD</i> (mgL <sup>-1</sup> )	0.6	0.16	0.05	0.010	1.6	0.07	0.008	0.07
<i>Int.trabajo linealidad</i> (mgL <sup>-1</sup> )	0.85-5	0.35-1.8	0.25-2.5	0.025-0.50	5-100	0.2-1.4	0.027-0.750	0.24-4
<i>Selectividad</i>	5	4	4	4	2	5	5	1
<i>Precisión (%CV)</i>	5.1±1.2	2.7	1.4	7.0	4.2±1.9	6±5	7±2	-
<i>Método calibración</i>	MAS o GHPSAM	MAS o directo	MAS o directo	MAS o directo	Directo	MAS	MAS o directo	Directo
<i>Velocidad (muestra/h)</i>	4	10	10	10	7	7	6	60
<i>Grado de automatización</i>	2	2	2	2	2	2	3	5

Las reacciones más ventajosas en cuanto a tiempo de análisis fueron el método del luminol con mayor capacidad de automatización (**Tabla 28**). El método del indofenol, indotimol y EFS-indotimol también fueron rápidos, pero menos automatizados, igual que el electrodo selectivo (ISE). Los métodos de Nessler, el de Roth modificado y el del TCPO fueron similares en cuanto a rapidez y grado de automatización.

También se evaluó el coste del análisis. Como puede verse (**Tabla 29**) los métodos del TCPO y el luminol fueron los más caros teniendo en cuenta el coste de la instrumentación (**Tabla 29**). El método EFS-indotimol fue también más caro que el del indotimol debido a que requiere un accesorio para la medida de la reflectancia y los discos de extracción en fase sólida. Adicionalmente, el coste del análisis se evaluó teniendo en cuenta los reactivos, tiempo y personal, considerando que el salario es de 2000 €/mes. El método basado en la reacción del peroxioxalato resultó, comparativamente, más caro debido a la separación cromatográfica y la reacción postcolumna. Mientras que el método del luminol fue el método de menor coste.

**Tabla 29.** Costes de reactivos, instrumentación y personal en cada procedimiento.

Método	Coste de reactivo (€) por muestra	Instrumentación		Coste de personal €/muestra
		Aparatos	Precio	
<i>Nessler</i>	0.022	Espectrofot UV-vis	4000-12000	2.80
<i>Indofenol</i>	0.0032	Espectrofot UV-vis	4000-12000	1.14
<i>Indotimol</i>	0.0025	Espectrofot UV-vis	4000-12000	1.14
<i>EFS-indotimol</i>	1.25	Espectrofot UV-vis + accesorio RD	4000-12000 2500	1.14
<i>ISE</i>	-	Electrodo	500	1.70
<i>Roth modificado</i>	0.006	Fluorímetro	18000-30000	1.70
<i>TCPO</i>	0.25	Sistema LC Reactor postcolumna Detector fluorescencia y/o QL	18000 15000 9000 9000	1.90
<i>Luminol</i>	0.002	Sistema FIA Detector fluorescente	3000 18000-30000	0.19

### Toxicidad de los reactivos.

A menudo la química analítica se centra en un método con el fin de desarrollar procedimientos muy sensibles y selectivos. En los últimos años, se ha dedicado especial atención al término “*Química Sostenible*”, en el que se tienen en cuenta tanto las propiedades físicas y químicas de los reactivos empleados como el manejo seguro de los mismos en el lugar de trabajo y para el medioambiente. En este sentido, los principales reactivos empleados para cada procedimiento se evaluaron desde el punto de vista del riesgo, la seguridad y la contaminación ambiental. La **Tabla 30** muestra la evaluación de los reactivos (1: reactivo más dañino).

Como se muestra en la **Tabla 30**, los reactivos más contaminantes son el  $\text{HgCl}_2$  y el nitroprusiato empleados en el método de Nessler y en el del indotimol, respectivamente. De modo que desde el punto de vista de la toxicidad y contaminación ambiental estos dos métodos no son recomendables. Teniendo en cuenta el tipo de reactivos y la cantidad empleada de los mismos, clasificamos los métodos en el orden siguiente en orden creciente de toxicidad:

ISE, Roth modificado y EFS-indotimol < Luminol e Indotimol < Reacción del peroxioxalato, Indofenol y Nessler.

**Tabla 30.** Toxicidad de los principales reactivos y residuos generados.

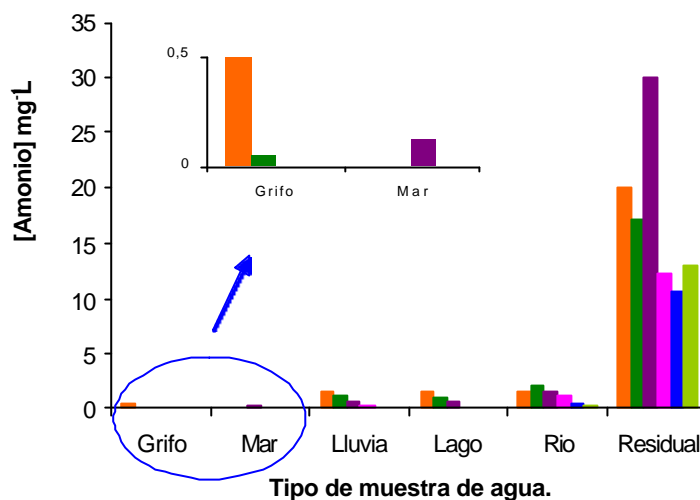
Método	Reactivo	Toxicidad	Comentario	Residuos generados
<i>Nessler</i>	HgCl <sub>2</sub>	1	Tóxico y peligroso para el medioambiente	1
<i>Indofenol</i>	Fenol	1	Tóxico y peligroso para el medioambiente	2
<i>Indotimol</i>	Nitroprusiato	2	Tóxico y peligroso para el medioambiente	3
<i>EFS-Indotimol</i>	Nitroprusiato	2	Reducción por incluir una etapa de EFS.	4
<i>ISE</i>	-	-		5
<i>Roth modificado</i>	OPA	5	Irritante para ojos, piel y sist respiratorio	2
<i>TCPO</i>	MeCN	3	Inflamable, forma explosivos.	2
	THF	4	Causa quemaduras.	
	Dns-Cl	2	Irritante para ojos, piel y sist respiratorio.	
	TCPO	5	Irritante para ojos, piel y sist respiratorio.	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	Causa quemaduras	
<i>Luminol</i>	Luminol	5	Irritante para ojos, piel y sist. respiratorio.	3
	HClO	2	Causa quemaduras. Libera ácidos tóxicos	

### Adecuación de los métodos a los distintos tipos de muestras.

La **Figura 31** muestra los niveles de amonio citados en la bibliografía y correspondientes a agua residual [73,76], agua de río [64,75,77-79], agua de lago [80], agua de lluvia [27,79], agua de mar [40,81] y agua de grifo [82,83]. Además se dan los valores establecidos por la Comunidad Europea (primera columna **Figura 31**). De modo que el límite de detección es el factor más importante para la elección del método más apropiado para cada tipo de muestra. Como puede comprobarse, las concentraciones de amonio son muy dependientes del tipo de agua, desde niveles bajos para agua de mar y grifo (ng mL<sup>-1</sup>) hasta contenidos elevados en muestras de agua residuales (mg L<sup>-1</sup>).

Otro factor limitante para la selección de un procedimiento es la necesidad de realizar un análisis cuantitativo o un análisis de control. Un análisis cuantitativo debe ser llevado a cabo cuando se requiere conocer exactamente la concentración de amonio, por ejemplo en el caso de indicios de eutrofización y para estimar el nitrógeno biogeoquímico

en aguas. Sin embargo muchas veces es necesario responder a problemas sociales de modo rápido e inequívoco. En estos casos, el análisis cualitativo podría ser la solución.



**Figura 31.** Concentración de amonio para muestras de agua analizadas en la bibliografía y valores de referencia (primera columna)

Como ejemplo, se evaluó el método del indotimol por varios operadores, dos expertos y seis operados inexpertos en el procedimiento. Se ensayó un conjunto de patrones con concentraciones de amonio entre 0 y 0.15 mg L<sup>-1</sup>, con cinco replicas para cada concentración. Los resultados del ensayo fueron positivos o negativos en función del color. Sin embargo el criterio y las características de los test de screening son aspectos claves, como mencionan M. Varcarcel *et al* [84] y K. Ashley *et al* [85,86]. La **Figura 32** muestra la probabilidad de obtener respuesta positiva P(x) vs la concentración de amonio empleando las respuestas de los ocho operadores. Se construyeron dos curvas, una para los operadores expertos y otra para las respuestas de los operadores inexpertos y sin indicaciones acerca del color. Seleccionamos esa situación con el fin de conocer los resultados en el mejor y en el peor caso.

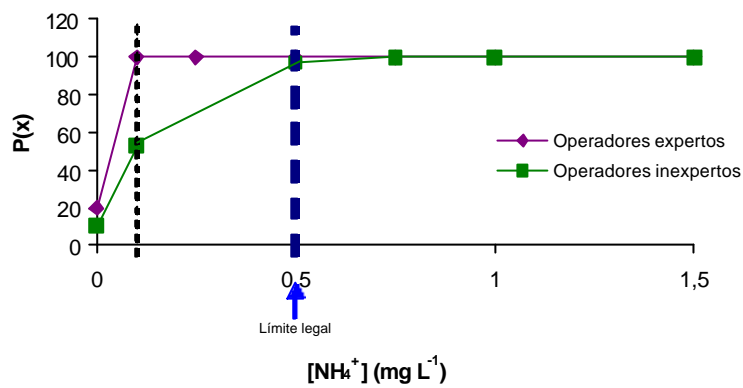
Como puede verse, la curva obtenida para los operadores no expertos se ajusta al valor límite legal. Sin embargo los operadores expertos minimizaron la zona de falsos positivos (entre 0 y 0.1 mg L<sup>-1</sup>). El análisis de screening es orientativo y siempre es posible medir valores de amonio con el fin de delimitar el contenido en amonio.

La comparación entre la **Figura 31**, los límites de detección y los intervalos de trabajo de la **Tabla 28**, muestra que el agua residual se puede analizar por cualquiera de los procedimientos. El método del electrodo selectivo puede ser empleado sin necesidad de diluir la muestra, con determinación directa y bajo coste siempre y cuando no haya aminas en dicha muestra. Para muestras de agua de río, lago y lluvia, los métodos de Nessler, indofenol, indotimol, el de Roth modificado y el del luminol podrían ser



adecuados en términos de sensibilidad. De modo que la selectividad, intervalo de trabajo, número de muestras y otras características deberán proporcionar el criterio para la elección del método más adecuado. En el caso de muestras de agua de mar, grifo y en general, muestras con bajo contenido en amonio, los mejores procedimientos son los basados en la reacción del TCPO y EFS-indotimol.

Se analizaron varias muestras por varios procedimientos. La **Tabla 31** muestra las concentraciones de amonio encontradas empleando los distintos procedimientos. Los resultados obtenidos indicaron que todos los procedimientos y los métodos de calibración elegidos fueron adecuados y proporcionando buenos resultados.



**Figura 32.** Probabilidad de obtener respuesta positiva vs concentración de amonio empleando las respuestas de dos operadores expertos y seis operadores inexpertos.

**Tabla 31.** Concentraciones de amonio en diferentes tipos de muestras.

	Concentración de amonio (mg L <sup>-1</sup> )						
	Nessler	Indotimol	EFS-indotimol	ISE	Roth	TCPO	Luminol
Riego		0.52±0.052	0.56±0.01				0.52±0.04
Residual	17.1±0.5 232±3**			16.8±1.0	14.1±0.2 213±3**		
Fuente					0.37±0.02	0.367±0.012	0.35±0.05
Lago		0.93±0.13	1.15±0.03				0.92±0.15
Río			0.070±0.005		0.089±0.001		
Pantano			0.56±0.01		0.46±0.03		
Agua			0.58±0.08		0.59±0.03		
Tratada							
Mar						0.098	N.D.

### **Conclusiones.**

El método basado en el OPA-NAC (Roth modificado), es una buena alternativa para el análisis de rutina de amonio. Es de bajo coste, no contaminante y rápido. Además es selectivo, sensible y con exactitud y precisión satisfactorias. Es aplicable a muchas muestras de agua y además requiere poco volumen de muestra.

El método del luminol es recomendable para estimar el contenido en amonio si no existen otros compuestos amino en la muestra.

Cuando se necesite detectar concentraciones de amonio muy pequeñas, el método más sensible es el basado en la reacción del peroxoxalato. Y como una alternativa de menor coste se puede emplear el método EFS/indotimol procesando 10 mL de muestra. Este último, además, puede ser empleado para la inspección visual.

A pesar de que el método más barato es el del ISE, no es suficientemente sensible, presenta interferencias y además no es aplicable a muestras de agua de mar.

El método del indotimol puede ser empleado como ensayo visual con solo respuestas positivas y negativas.

Los métodos de Nessler e indofenol ofrecen propiedades analíticas aceptables, aunque no se recomiendan, especialmente por la toxicidad de los reactivos que emplean.

## **2.2. THE IMPACT OF A DISUSED MINE ON URANIUM TRANSPORT IN RIVER FAL, SOUTH WEST, ENGLAND.**

Uranium, as a primordial radionuclide, is important globally and there is interest in understanding both its fluxes through the environment and movement between different geochemical compartments of a system. Riverine transport is by far the largest flux of uranium in the global cycle [87] and, globally, uranium concentrations in filtered (0.45  $\mu\text{m}$ ) river water relate to the extent of limestone dissolution [88]. Carbonate is also important for stabilising the uranyl ion ( $\text{UO}_2^{2+}$ ) in solution through complexation, which is why uranium concentrations are relatively high in alkaline waters such as seawater [89]. However, uranium is present in river water predominantly sorbed to particles [87,90] and colloids [90,91,92].

The physico-chemical form of uranium in rivers controls its fate as it enters the marine sink [92]. Organic colloids can coagulate in estuaries as salinity increases and, for example, approximately 50% of the uranium in River Kalix water, equivalent to the total colloidal fraction, is removed on entering the Baltic Sea [92]. Salt marshes are therefore an important sink for uranium [94], including uranium complexed by dissolved organic carbon. Another potential particulate/colloidal vector for riverine uranium is hydrous metal oxides [91], which is the predominant phase for trace metal transport in the Amazon River [95]. Desorption of uranium from particle-bound iron oxyhydroxides may enhance dissolved uranium concentrations in estuaries [96], but the most effective scavenge/release mechanisms involve redox change and the associated precipitation or dissolution of the oxyhydroxide matrix.

Mining represents a major input of uranium to the environment [97]. South West England has five historic uranium mines of which South Terras mine, St Stephen was the most important, with 736 tonnes of ore recovered up to 1910 [98]. This site has spoil heaps lying close to the River Fal and has previously been studied as a natural analogue site for a shallow, land-based facility for radioactive waste disposal [99]. This study showed that active migration of uranium occurs, measured in waters filtered to  $<3$  nm, and the PHREEQE modelling code, excluding interactions with organic matter, predicted that uranium was present predominantly as either carbonate or phosphate inorganic complexes. A separate study of this site showed that 62 - 69% of the uranium in 0.45  $\mu\text{m}$  filtered river water was present as organic complexes [100]. Water running from a mine adit towards the river Fal showed an elevated concentration of uranium ( $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and implicated the mine as a source of uranium to the river [100]. Pirrie *et al.* [101] noted that particulate releases from mining activity into fluvial catchments are important, both in general and specifically in the Fal Estuary, with a significant fraction of the total metal load arising directly from the ore.

The aims of this study were: (1) To investigate the distribution of uranium in different water and sediment fractions along the River Fal, Cornwall, UK in order to examine uranium transport; (2) To test the hypothesis that South Terras mine is a significant source of uranium to this river and increases the riverine uranium flux in the dissolved, colloidal and particulate phases to the Fal Estuary. Ancillary physico-chemical

### *Uranium transport*

---

data were also collected to gain a better understanding of the river system and aid interpretation of the uranium data. In order to generate reliable data, protocols for the determination of the uranium distribution in the different components of this river system (unfiltered and filtered waters and sediments) were developed for inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) analysis. The experimental procedures can be seen in *Appendix 5*.

## Method development.

### *Matrix effect for U determination*

The calibration curves constructed using standard additions to the water samples from the first expedition showed good linearity in all cases ( $0.9912 < R^2 < 0.9995$ ). Matrix effects were identified through the slopes of the standard addition curves which differed by 0 - 20% from the slope of the standard linear calibration curve. *t-tests* showed that the differences were significant at the 95% confidence level for both filtered and unfiltered water samples from sites 1, 3 and 4 ( $t_{\text{tab}} = 2.074$ ;  $t_{\text{calc}}$  ranged from 4.61 – 8.26). However, in all cases, the slopes obtained for the filtered and unfiltered samples collected at each location were not systematically different at the 95% confidence level ( $t_{\text{tab}} = 2.074$ ;  $t_{\text{calc}}$  ranged from 0.268 – 2.060) thus the matrix effect was not directly related to particulate matter. Therefore, although a standard addition calibration curve was required for each sample location, it could be applied to all water samples from that location.

A similar matrix effect was found with the sediments, with *t-tests* showing significant differences at the 95% confidence level between the standard addition slopes obtained for the samples and the standard curve, with the exception of one sample ( $t_{\text{tab}} = 2.074$ ;  $t_{\text{calc}}$  ranged from 0.356 – 19.61). Equally, the slopes obtained for the two sediment size fractions from each location were not significantly different at the 95% confidence level ( $t_{\text{tab}} = 2.074$ ;  $t_{\text{calc}}$  ranged from 0.025 – 2.06). Therefore, both sediment fractions from a given location could be quantified using a single standard addition calibration curve. Correlation coefficients ( $R^2$ ) were in the range 0.9902 - 0.9994. These results show that matrix effects in water and sediment digests must be addressed by a standard addition protocol to obtain accurate uranium concentration data by ICP-MS.

### *Quality assurance*

Three separate uranium analyses of sediment T (<0.18  $\mu\text{m}$ ) gave a relative standard deviation (RSD) of 1.3%, which was lower than the typical RSD of three replicate measurements of one sample. Thus, the standard deviation of the three replicate measurements was used as the uncertainty on the uranium concentration in each sediment sample. The water samples were measured at concentrations one order of magnitude lower than the sediment digests (0.1 – 1.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  as opposed to 4 - 12  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), and the RSD on a single standard addition to the sample, after calibration by standard addition, was  $\pm 9\%$  ( $n = 48$ ) for water samples. This RSD was therefore used as the analytical error for all water samples. Where results from two fractions have been subtracted from one another, the combined error (error sum of squares) was  $\pm 13\%$ .

The instrumental detection limit for uranium (mean blank plus 3 $\sigma$ ), varied between 0.003 and 0.005  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The procedural blanks were higher than the detection limit, at  $0.043 \pm 0.018 \mu\text{g L}^{-1}$  ( $n = 3$ ). The uranium concentrations of the 10 mL aliquots of water from site V filtered through 0.2  $\mu\text{m}$  and 0.45  $\mu\text{m}$  filters showed RSDs of 15% (0.45  $\mu\text{m}$ ;  $n = 5$ ) and 11% (0.2  $\mu\text{m}$ ;  $n = 5$ ) with random variation between subsequent aliquots. In view of the 9% analytical uncertainty for the water samples, and the fact that these samples were only 20% of the volume used for the full analyses, these standard

deviations over the five fractions indicate that no significant artefacts were introduced through the filtration process.

**Data.**

In the following sections, the “dissolved” phase concentrations are those in the water filtered to 0.2 µm, and the concentrations in the “colloidal” and “particulate” phases are calculated from the concentration differences between the 0.45 µm and 0.2 µm filtered water samples and 0.45 µm filtered and unfiltered water samples, respectively. Ultrafiltration to 10 kDa is often used to divide the colloidal phase from the dissolved phase [92], but the use of 0.2 µm filtration in this work reflects the practical requirements of speed and commonality and availability of filtration equipment.

*Field measurements and supporting physico-chemical data*

The total sodium, potassium, calcium and magnesium concentrations, alkalinity and conductivity varied both between sampling expeditions and along the river (**Table 32**). The conductivity of the water close to South Terras mine was lower on the 2<sup>nd</sup> expedition (T, U, V, W) than on the first expedition (1, 2, 3, 4) (For more details, see the experimental section of *Appendix 5*) The alkalinity measurements showed no difference outside analytical uncertainty between the sites at the two different times with the exception of site 4/W.

More than 90% of the total sodium, calcium and magnesium concentrations was found in the combined colloidal and dissolved fraction for samples from the first expedition, and 85 - 120% were found in the dissolved phase on the 2<sup>nd</sup> expedition, with the exception of calcium in samples R and S, where 61% and 68% were in this phase. In general, the differences between the concentrations in the unfiltered water and dissolved fraction (85 - 120%) suggest analytical uncertainties that are much larger than the reproducibility of a single measurement (**Table 32**). However the more significant differences for calcium in samples R and S appear to relate to the presence of particulate calcium. The potassium data were less reliable, showing filtered water concentrations that were typically 50 - 150% of the unfiltered concentration.

In this study, loss on ignition was used as an indicator of organic carbon in sediment. The smaller particles are richer in organic carbon than the larger particles, with the exception of sample 1 (**Table 33**).

**Table 32.** Conductivity, pH, alkalinity and concentrations of calcium, magnesium, sodium and potassium in the 1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> expedition unfiltered water samples. The uncertainties show  $\pm 1s$  on three replicates measurements, with the exceptions of conductivity and pH which were measured once.

Water samples	Conductivity mS cm <sup>-1</sup>	pH	Alkalinity mg CaCO <sub>3</sub> L <sup>-1</sup>	Ca mg L <sup>-1</sup>	Mg mg L <sup>-1</sup>	Na mg L <sup>-1</sup>	K mg L <sup>-1</sup>
<i>1<sup>st</sup> expedition</i>							
1	4.5		220±20	5.98±0.02	3.52±0.03	29.7±0.2	-
2	4.8		190±50	5.54±0.07	3.14±0.07	27.6±0.1	9.0±0.2
3	4.4		170±40	6.14±0.05	3.52±0.02	29.1±0.2	23.3±0.1
4	4.7		140±20	5.99±0.06	3.19±0.04	29.6±0.2	9.7±0.5
<i>2<sup>nd</sup> expedition</i>							
R	3.1	6.5	150±20	3.10±0.20	4.87±0.08	15.0±0.2	0.8±0.4
S	6.4	6.7	180±20	5.70±0.10	5.29±0.06	37.0±0.5	5.0±0.6
T	3.6	7.2	190±20	4.10±0.10	4.78±0.14	30.1±0.5	4.1±0.4
U	4.0	7.3	220±30	4.30±0.20	5.22±0.06	27.9±0.2	3.9±0.3
V	3.4	7.4	220±20	4.90±0.20	5.33±0.09	29.0±0.1	2.6±0.4
W	4.1	7.2	180±20	4.40±0.10	4.60±0.20	30.2±0.4	4.1±0.2
X	4.2	7.1	210±40	4.90±0.20	4.80±0.10	31.4±0.3	4.6±0.4
Y	3.5	6.4	100±20	4.10±0.10	4.12±0.03	26.5±0.5	2.8±0.2
Z	4.3	6.3	100±20	6.04±0.05	5.42±0.09	34.0±0.3	3.0±0.3

**Table 33.** Loss on ignition (%), iron and uranium concentrations (mg Kg<sup>-1</sup>) in two size fractions of sediments samples, quoted to 1 decimal place. The uncertainties show  $\pm 1s$  on three replicate analysis for loss on ignition;  $\pm 1s$  flame AAS measurements for iron and  $\pm 1s$  of three ICP-MS measurements for uranium.

Sediment sample	Loss on ignition (%)		Fe mg Kg <sup>-1</sup>		U mg Kg <sup>-1</sup>	
	180- 1000mm	<180 mm	180- 1000mm	<180 mm	180- 1000mm	<180 mm
<i>1<sup>st</sup> expedition</i>						
1	16.1±0.5	11.8± 0.5	29.5± 0.3	33.6± 0.6	6.0 ± 0.1	31.1± 0.5
2	4.3 ± 0.3	6.2 ± 1.1	20.7± 0.3	26.5± 0.4	995 ± 26	877 ± 14
3	2.3 ± 0.3	24.0± 1.4	5.2 ± 0.1	16.9± 0.4	1.2 ± 0.1	9.2 ± 0.4
4	2.5 ± 0.5	17.6± 0.5	4.6 ± 0.2	38.0± 0.2	1.5 ± 0.1	16.0± 1.0
<i>2<sup>nd</sup> expedition</i>						
R	2.6 ± 0.3	11.5± 0.6	17.8± 0.2	103 ± 1	1.1 ± 0.1	4.8 ± 0.1
S	4.2 ± 0.4	12.5± 0.5	6.5 ± 0.1	63.3± 0.4	1.8 ± 0.1	23.2± 0.5
T	1.9 ± 0.1	6.4 ± 2.0	6.7 ± 0.1	27.0± 3.0	0.9 ± 0.7	6.2 ± 0.1
U	5.2 ± 0.3	7.7 ± 0.2	6.0 ± 0.5	29.7± 0.1	1.4 ± 0.1	11.4± 0.1
X	2.0 ± 0.2	12.5± 0.2	9.5 ± 0.1	26.7± 0.2	3.1 ± 0.1	19.7± 0.2
Y	2.4 ± 0.3	6.8 ± 0.2	15.6± 0.1	9.7 ± 0.1	10.2± 0.3	6.5 ± 0.1
Z	7.5 ± 0.1	20.3±0.2	22.2±0.1	29.3±0.1	24.0±2.0	28.2±0.4

*Iron in water and sediment samples.*

Iron was measured in sediment (1<sup>st</sup> and 2<sup>nd</sup> expedition samples) and water samples (2<sup>nd</sup> expedition). The calibration curves gave correlation coefficients ( $R^2$ ) that exceeded 0.99 at both 386 nm and 248 nm. Iron concentrations in the samples are given in **Table 33** (sediments) and **Figure 33a** (waters). The smaller sediment particles were generally richer in iron than the larger particles, but no significant correlation was found between the Fe concentrations in the two fractions ( $R^2 = 0.01$ ; **Table 34**). The highest iron concentrations in the water were found at sites R ( $7.4 \pm 0.7 \text{ mg L}^{-1}$ ) and S ( $1.5 \pm 0.2 \text{ mg L}^{-1}$ ), where there were also high iron concentrations in the sediment ( $103$  and  $63.3 \text{ mg kg}^{-1}$ , respectively in the 180 - 2000  $\mu\text{m}$  fraction). In the water, the colloidal fraction generally contained the highest fraction of the total iron ( $70 \pm 22\%$ ), which is consistent with iron being present as Fe(III) in the oxygen-rich waters and a low turbidity.

**Table 34.** Matrix of correlations coefficients ( $R^2$ ) between sediments phase uranium and iron concentrations, uranium/iron ratios and loss on ignition values.

	[U]<180mm	Fe 180-1000mm	LOI 180-1000mm	LOI <180mm	U/Fe <180mm
[U] 180-1000mm	0.22	0.34	0.11		
[Fe]<180mm	0.01	0.01		0.00	
LOI <180mm	0.10		0.00		
LOI 180-1000mm		0.54		0.00	
U/Fe 180-1000mm					0.51

*Uranium in water and sediment samples.*

- Uranium in sediment samples.
- 

The uranium concentrations in the sediment samples varied from 1-1000  $\text{mg Kg}^{-1}$  (**Table 33**), with all but one site (2) in the range 1 - 31  $\text{mg Kg}^{-1}$ . This high spatial variation of uranium in the sediments is consistent with the high variation in sediment type along the river (**Table 33**). Sediments taken from the same site (1 and U) also showed large differences in their uranium and iron concentrations and LOI values, which illustrates the high intra-site spatial variation of the sediments. The <180  $\mu\text{m}$  fraction in general had higher concentrations of uranium than the 180 – 1000  $\mu\text{m}$  fraction. Sediment 2, with a uranium concentration at least thirty times higher than the other sediments, was collected below an outflow pipe running from South Terras mine. When sample 2 is excluded to prevent skewing of the data, neither the U concentrations nor the U/Fe ratios in the two fractions correlated particularly well over the data set ( $R^2 = 0.22$  and  $0.51$ , respectively; **Table 34**). The smaller particles tended to contain more organic carbon and more uranium, but there was no significant inter-site correlation between these factors.



For reference, soil uranium concentrations worldwide range between 0.16 and 55 mg Kg<sup>-1</sup> [102], the average concentration of uranium in granite is 4 mg Kg<sup>-1</sup>, and high grade uranium ores contain around 20000 mg U Kg<sup>-1</sup> [103].

- Uranium in water samples.

Variations in uranium concentrations in unfiltered and 0.45 µm filtered water between the two sampling expeditions were assessed by comparison of samples U, V and W with samples 1, 2 and 4, which were collected from the same locations (**Table 35**). Sample 3 was taken from the immediate vicinity on the first expedition. The concentrations of uranium in the 0.45 µm filtered water for 1, 2, 3, U and V are within 1s measurement uncertainty of each other, thus the differences in the unfiltered water uranium concentrations were due to the particulate uranium content. A generally higher turbidity at these sites on the first sampling expedition is consistent with the higher river flow rate on that day [104]. Samples 4 and W were taken slightly downstream of the mine and the uranium concentration in the 0.45 µm filtered water changed significantly here.

**Table 35.** Uranium concentration (mg L<sup>-1</sup>) in water samples collected on the 1<sup>st</sup> expedition samples and in those collected at the same localities on the 2<sup>nd</sup> expedition. The uncertainties show ±1s of a 5 mg L<sup>-1</sup> uranium standard addition to the 48 water samples

	Uranium concentration mg L <sup>-1</sup> .			
	Unfiltered water		Water filtered to 0.45 µm	
	1 <sup>st</sup> expedition	2 <sup>nd</sup> expedition	1 <sup>st</sup> expedition	2 <sup>nd</sup> expedition
<b>1 and U</b>	0.61±0.05	0.45±0.04	0.40±0.04	0.47±0.04
<b>2 and V</b>	0.93±0.09	0.47±0.04	0.48±0.04	0.46±0.04
<b>3</b>	1.35±0.12	-	0.50±0.05	-
<b>4 and W</b>	0.81±0.07	0.86±0.08	0.33±0.03	0.57±0.05

The uranium concentrations of the water samples collected on the 2<sup>nd</sup> expedition showed significant spatial variations (**Figure 33b**). Uranium was found in all water fractions, except at sites U and V where no uranium was found in the particulate fraction. The highest total uranium concentration was found at location S, next to the China Clay works, and the uranium concentrations also showed a general increase downriver from the South Terras mine building. On average, the dissolved phase contained the largest percentage of the total uranium on the second expedition (46%).

The concentrations of uranium in the unfiltered water samples correlated well with those in the dissolved (R<sup>2</sup> = 0.82; n = 9) and colloidal (R<sup>2</sup> = 0.81; n = 9) phases but not with those in the particulate fraction (R<sup>2</sup> = 0.40; n = 9), see **Table 36**. There is a bias in these correlations in that the uranium concentration in each fraction is a component of the total concentration. However, a reasonable direct correlation was also found between the uranium concentration in the dissolved and colloidal fractions (R<sup>2</sup> = 0.60; n = 9). Normalising the uranium concentration in each fraction to that of iron reduces the

correlation between the water fractions. This suggests that iron is not a controlling factor in the uranium distribution between the water fractions.

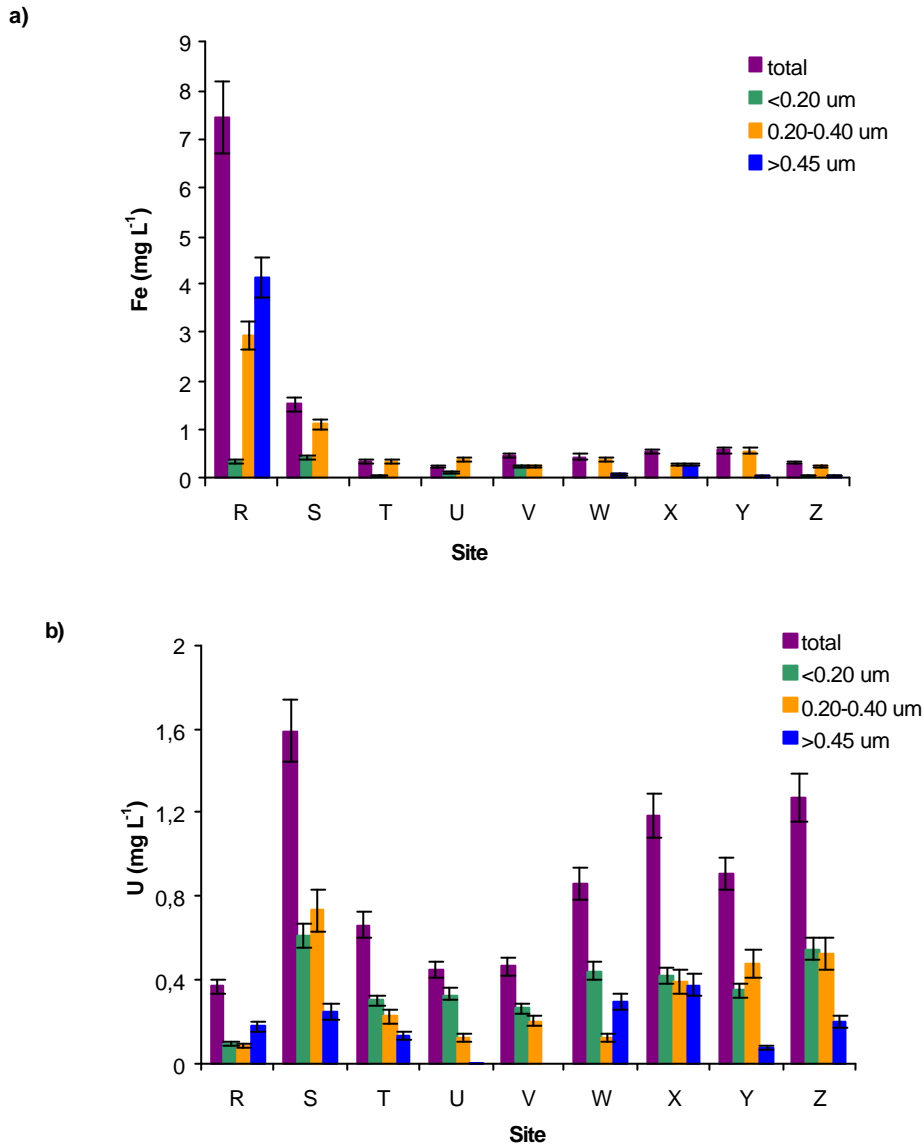
**Table 36.** Matrix of the correlation coefficients ( $R^2$ ) between water phase uranium concentrations

	Dissolved U	Colloidal U	Particulate U
Dissolved U	X	0.60	0.19
Colloidal U	0.60	X	0.09
Particulate U	0.19	0.09	X
Total U	0.82	0.81	0.40

**Table 37** shows the correlation coefficients between the concentrations of uranium and total cations (sum of calcium, magnesium and sodium concentrations, potassium was excluded because the data were not reliable). The total cation concentration can be used as a measure of weathering processes in the vicinity of each sampling site, analogous to the use of total anion concentration by Palmer and Edmond [88]. It is clear that the unfiltered water cation concentrations show the best correlation with the uranium concentrations in all three sets of samples, and notably with the dissolved uranium concentration (**Table 37**;  $R^2 = 0.83$ ;  $n = 9$ ). The reason for the variation in the correlation coefficients may be analytical uncertainties in the total cation data, given that the dissolved fractions contain 85 – 120% of the cations present in the unfiltered water samples. In this case the mean cation concentration for the three samples from each site is the most accurate value, and this produces a correlation coefficient of 0.68 with dissolved uranium concentrations. However, the cation concentration in the unfiltered water may also provide the best indicator of weathering in the area. The sample sites lying closest to the mine and spoil heaps show uranium/total cation concentration ratios that are typical or slightly low for the river.

**Table 37.** Matrix of the correlation coefficients ( $R^2$ ) between uranium and total cation concentrations in the unfiltered and filtered (0.2 and 0.45 m) water samples.

	[Cation] <0.2 m	[Cation] <0.45 m	[Cation] unfiltered	[Cation] average
[U] <0.2 m	0.40	0.65	0.83	0.68
[U] <0.45 m	0.38	0.52	0.68	0.60
[U] unfiltered	0.36	0.46	0.60	0.51



**Figure 33.** Concentration of a) iron ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and b) uranium ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) in the water samples taken on the 2<sup>nd</sup> expedition. The first column in each set (horizontal stripes) represents the total concentration; the second column (black) represents the operationally defined dissolved ( $<0.20 \mu\text{m}$ ) fraction; the third column (white) represents the colloidal ( $0.20 - 0.45 \mu\text{m}$ ) fraction; and, the final column (angled stripe) represents the particulate ( $>0.45 \mu\text{m}$ ) fraction. Uncertainties show 1 $\sigma$  of 3 flame AAS measurements for Fe and 1 $\sigma$  of the RSD over 48 standard additions to the water samples for uranium. Where two samples are used to calculate the concentration in the fraction, the errors are calculated as the error sum of squares of the two component errors.

- Comparison of uranium concentrations in the water and sediment samples.

The sediment uranium concentrations varied greatly between sampling locations, even when these were within meters of each other. For example, the high uranium concentrations at site 2 ( $\sim 1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) had reduced to  $<20 \text{ mg Kg}^{-1}$  by site 3. Intra-site variability was also high, as demonstrated by samples 1 and U. This high spatial variation makes it difficult to compare water and sediment concentrations. This is shown particularly clearly by the data from site 2/V where there is no evidence of uranium enrichment in the water above the highly enriched sediment ( $880 - 1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ). However, the sediments remain a potential source of uranium to all size fractions of the overlying water.

### **Discussion.**

The sediment and water samples collected in this study showed significant spatial variations. The sediments showed highly variable uranium and iron concentrations and organic content and, visually, they varied between fine, soft particles to coarse sands. On the second expedition, the river water showed two-fold variations in alkalinity and conductivity, and the U, Fe and total ion water concentrations varied several fold. In the combined dissolved and colloidal phase ( $<0.45 \mu\text{m}$ ) of the water collected on this expedition, the uranium concentration varied 7-fold, from  $0.19 \mu\text{g L}^{-1}$ , which is close to the global average of  $0.30 \mu\text{g L}^{-1}$ , to  $1.34 \mu\text{g L}^{-1}$ . The uranium concentrations fluctuated along the river, showing that there are both inputs and removal/dilution mechanisms. This is exemplified by the high uranium concentrations in all water fractions at site S, beside a china clay mine, which had decreased downstream at site T. This demonstrates that when examining uranium fluxes, one location is not representative of the river as a whole.

The high uranium concentrations in sediments taken below a mine waste pipe at site D/V ( $880 - 1000 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) are only one order of magnitude lower than found in the spoil heap [99]. This suggests that the high concentrations are a result of the movement of small uranium-rich particles from the mine. It is interesting to note that these sediments, however, are neither carried significantly into the water column as particles nor reflected in the uranium concentrations in the colloidal or dissolved phases. In fact, the water phase uranium concentrations were at the lower end of the concentration range in this section of the river. Therefore, South Terras mine appears to be a source of uranium to the River Fal with regard to the sediment immediately below an outflow pipe but not to sediments 10 m beyond this or to the river water. Elevated concentrations of uranium have previously been found in water flowing from a mine adit at the site ( $8 \mu\text{g L}^{-1}$ ) [100], but the adit was dry on our expeditions. If other mine/spoil heap leachates contained similar uranium concentrations, an input of approximately  $0.035 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  of water would have been required on the second expedition to equal the uranium concentration in the river water ( $\sim 0.5 \mu\text{g L}^{-1}$ ) when the mean river flow rate was  $0.529 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$  [104]. Since both river flow and outflow from the mine are controlled by rainfall, it appears highly unlikely that mine runoff will result in local uranium water concentrations that are high for the River Fal as a whole.

The data show that particles were the least important vector for water-phase uranium transport on the second expedition, with an average of 20% of the uranium held in this phase. This is notably lower than the estimated global average of 86% of riverine uranium transported on particles [87]. However, the proportion was highly variable, at 1 - 48% of the total, and on the first expedition it was higher at 34 - 63%, and turbidity will affect this fraction considerably. Overall, the data compare reasonably well with the 20 - 50% of uranium found in the particulate ( $>0.45 \mu\text{m}$ ) fraction in the water of the River Kalix [90]. Our lower filtration limit of  $0.2 \mu\text{m}$  is above the lower size limit considered colloidal, as colloids are often defined as  $10 \text{ kDa} - 0.45 \mu\text{m}$  [92]. Therefore, the proportions of uranium in the operationally defined colloidal fraction are likely to be minimum values (average 35%) when compared with other data, and those in the dissolved phase maximum values (average 45%). Results from an earlier study [100] suggest that the uranium-binding colloids are predominantly organic, which agrees with the observations of Porcelli *et al.* [92] for the river Kalix.

The strong correlation between the total cation and dissolved phase uranium concentrations along the river is in agreement with the observation of Palmer and Edmond that areas with high mineral weathering have elevated dissolved uranium concentrations. Although limestone is virtually absent in Cornwall [103], the geology changes along the river. The Meadfoot Beds mineralogy appears to be the least prone to weathering as the total cation and uranium concentrations were lowest around site R and South Terras mine (upstream of 4, W and X). Moreover, the typical to slightly low uranium/total cation concentration ratios close to the main South Terras site and the second spoil heap, suggest that the weathering of uranium-rich ores and spoils has a limited impact on the uranium concentration of the river water. Weathering also explains why the uranium concentrations were at a maximum beside the clay mining area.

In terms of variation between the two expeditions, the similar  $<0.45 \mu\text{m}$  water phase uranium concentrations at sites 1/U, 2/V and 3 correspond to similar water chemistries (**Tables 32 and 35**). However, the uranium concentration at site 4/W was significantly higher on the second expedition and this corresponded to an increased alkalinity. Carbonate is the main cause of alkalinity in natural waters and is known to solubilise the uranyl ion through complexation [89]. Therefore, while the variation in the uranium concentration of the  $<0.45 \mu\text{m}$  fraction (dissolved plus colloidal) was limited between these two expeditions, the results do not preclude more significant change when there is greater variation in the water chemistry. Further investigation is required to provide a full understanding of the influence of the physico-chemical variables on the uranium concentration of the water overall, and the individual size fractions.



### **2.3. EUTROFIZACIÓN DEL AGUA.**

El nitrógeno es un nutriente clave en aguas naturales, pero el exceso del mismo puede llevar a la eutrofización. Las especies de nitrógeno predominantes en agua son: nitrógeno inorgánico disuelto (amonio, nitrato y nitrito), nitrógeno orgánico disuelto (la mayor fracción esta compuesta por amino ácidos y péptidos y a menudo se le llama nitrógeno amino) y nitrógeno particulado orgánico e inorgánico [105]. Las fuentes de nitrógeno orgánico disuelto (NOD) en las aguas naturales son resultado de procesos biológicos autóctonos. Adicionalmente, fuentes externas de NOD vienen desde residuos y efluentes industriales y deposición atmosférica [106].

Las aminas alifáticas son importantes fuentes de NOD debido al gran número de aplicaciones en las que están envueltas, de hecho su presencia en distintos tipos de agua esta documentada [69]. Estas aminas son además productos de degradación de materia orgánica como proteínas y aminoácidos. Además pueden formar nitrosaminas cancerígenas cuando reaccionan con algunos compuestos que contienen nitrógeno [107]. Los niveles de concentración de estos compuestos en aguas naturales hacen necesario emplear sistemas de detección sensibles [69] o incluir una etapa de preconcentración [108]. Este trabajo va en esa dirección, mejora de la sensibilidad sin ningún paso adicional.

En este apartado se han desarrollado cuatro partes:

- Ensayo fluorimétrico rápido para el screening de muestras de agua conteniendo grupos amino primarios.
- Análisis de monoaminas alifáticas primarias de cadena corta por CL en muestras de agua.
- Ventajas de la CL Capilar para el screening de amonio y nitrógeno amino primario.
- Soportes detectores: aplicación a aminas alifáticas en agua residual.

### **2.3.1. ENSAYO FLUORIMÉTRICO RÁPIDO PARA EL SCREENING DE MUESTRAS DE AGUA CONTENIENDO GRUPOS AMINO PRIMARIOS.**

El análisis de aminas alifáticas en medio acuoso es difícil por la elevada polaridad de estos compuestos. Además, como ya se ha comentado, las aminas de bajo peso molecular se encuentran a nivel de sub-miligramos-por-litro en muestras de agua. Los métodos UV-vis y fluorimétrico pueden ser empleados para el screening de muestras para reducir costes y reducir el tiempo de análisis en un laboratorio medioambiental o para la determinación *in-situ*. Este hecho es importante sobretodo cuando un gran número de muestras deben ser procesadas. En esta dirección se centra el interés de este trabajo.

Como se ha comentado en la introducción, el o-ftaldialdehído (OPA)-2-mercaptoetanol (MCE) es un agente derivatizante que en condiciones básicas se ha empleado para la derivatización de aminas primarias [109]. Se ha estudiado la efectividad de diferentes tioles, N-acetil-cisteína entre ellos, y los medios micelares en el método fluorimétrico de Roth para la determinación de compuestos amino primarios [110-112]. El uso de tioles voluminosos como NAC, proporciona isoindoles más estables que los formados con MCE.

Desde 1996, nuestro grupo ha desarrollado una metodología en la que la etapa de lavado, enriquecimiento y derivatización de los analitos tiene lugar en un único cartucho de extracción en fase sólida como un procedimiento total de extracción en fase sólida. El potencial de esta metodología ha sido ilustrado para la cuantificación de distintos amino-compuestos de interés en el análisis clínico o farmacéutico [113-118]. Ahora nuestro interés se centra en el análisis de agua [119-121].

En este trabajo se investiga la posibilidad del reactivo OPA/NAC como reactivo derivatizante asistido en soporte sólido para metil-, etil-, propil-, butil-, pentil y *n*-feniletilamina. El extracto obtenido se midió fluorimétricamente. En nuestro conocimiento un método de estas características no existe. Finalmente, el método fue aplicado a la determinación de aminas primarias en diversos tipos de muestras de agua. El método propuesto puede ser útil para el screening de muestras *in situ* o para laboratorios donde no existan CG o CLAR.

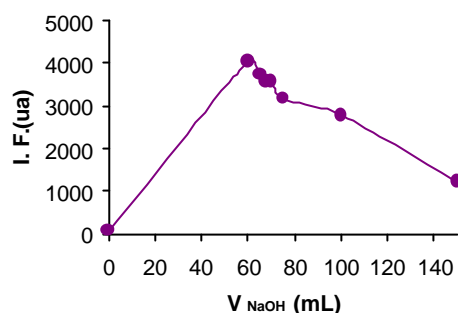
La parte experimental de este apartado se puede consultar en el *Apéndice 6*.



### Enriquecimiento de los analitos.

Basándonos en experiencias previas con diferente tipo de aminas, los cartuchos Bond-Elut C<sub>18</sub> fueron seleccionados para la preconcentración de los analitos [112,114,121]. El factor de concentración fue de entre 2 y 12.5, dependiendo del volumen de muestra procesado (entre 4 y 25 mL).

La **Figura 34** muestra que un volumen de 60 ìL de hidróxido de sodio 1 M fue el óptimo para neutralizar el extracto de aminas obtenido en ácido acético 0.1 M.



**Figura 34.** Efecto del volumen de NaOH en la disolución de amina eluida en medio ácido acético.

La **Figura 35** da un ejemplo de los registros normalizados para los derivado de la metilamina, como puede verse son idénticos para las distintas concentraciones. Espectros similares fueron obtenidos para las otras aminas ensayadas.

Las recuperaciones fueron calculadas con la expresión: señal fluorescente de la derivatización en disolución dividido por al señal fluorescente usando el procedimiento de preconcentración. Las recuperaciones obtenidas para metilamina se encontraron en el intervalo de  $87 \pm 13$  % para volúmenes de muestra entre 25 y 4 mL. Sin embargo, para las demás aminas, las recuperaciones encontradas se encontraron por debajo del 87 % para un volumen de muestra de 25 mL. De acuerdo con estos resultados, 10 mL fue el volumen de muestra óptimo. Con el fin de obtener mejores retenciones para las aminas, se estudiaron dos tampones de acondicionamiento a pHs 8 y 10.4, el último valor proporcionó mejores señales.

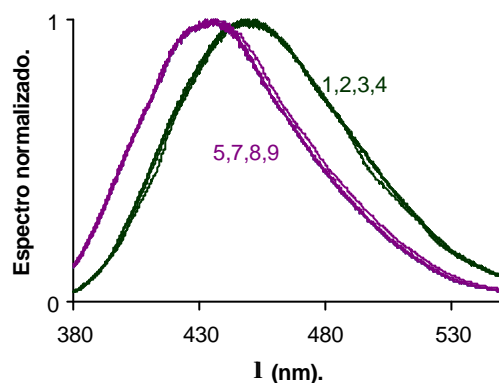
### Derivatización.

Se ensayó un diseño factorial 2<sup>3</sup> para estudiar la concentración de OPA/NAC para una relación 1:1, tiempo de reacción y cantidad de tampón. Las condiciones ensayadas fueron:

- Dos concentraciones de OPA/NAC: 3.7 y 11.1 mM,
- Dos tiempos de reacción: 1 y 3 min y
- Dos cantidades de tampón: 100 y 250 µL.

El único factor relevante fue el tiempo de reacción, siendo las condiciones escogidas 0.9 mL de 3.7 mM OPA/NAC (1:1), 100  $\mu$ L de tampón borato a pH 8 y 3 min como tiempo de reacción.

Los espectros normalizados obtenidos para metilamina se muestran en la **Figura 35**, éstos difieren de los obtenidos con la derivatización en disolución. De forma que, se pueden formar diferentes derivados con la derivatización asistida en soporte sólido. En un artículo anterior [112] se demostró que para aminas biogénicas la derivatización asistida en soporte sólido aumentaba la estabilidad del isoindol formado. Este hecho puede explicar las diferencias encontradas en los espectros de emisión mostrados en la **Figura 35**. Resultados similares fueron obtenidos para las demás aminas. En todos los casos, los espectros normalizados fueron independientes de la concentración de analitos y el mismo espectro se obtuvo para todas las aminas ensayadas, de modo que la señal fluorescente puede ser empleada para hacer una estimación de los grupos amino primarios.



**Figura 35.** Espectros de emisión normalizados para metilamina; 1, 2, 3 y 4: derivatización en disolución y concentración de amina medida 0.2, 0.3, 0.6 y 1  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente; 5, 6, 7 y 8: derivatización asistida en soporte sólido para una concentración de amina 0.125, 0.25, 0.5 y 1  $\text{mg L}^{-1}$  respectivamente.

Además, no se encontraron diferencias significativas (varianzas homogéneas,  $F_{\text{calc}} 1.74 < F_{\text{tab}} (\dot{a}, 4, 4) = 9.605$  y pendientes comparables,  $t_{\text{calc}} 01.00 < t_{\text{tab}} (\dot{a}, 6) = 2.447$ ) en los resultados entre columnas de 200 mg y 400 mg a un nivel de confianza del 95%; de modo que se escogieron las columnas de 200 mg para el resto de experiencias. La **Tabla 38** muestra las ecuaciones de las curvas de calibrado en las condiciones óptimas para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y  $\beta$ -feniletilamina. Los resultados mostrados en esta tabla indican que la precisión del método dada como la desviación estándar del procedimiento ( $s_{x/y}/b$ ) fue satisfactoria. Los límites de detección fueron alrededor de 10 veces menores que los obtenidos con derivatización en disolución (entre 0.3 y 0.9  $\text{mg L}^{-1}$ ).

Utilizando este procedimiento, el amonio no fue un interferente a concentraciones inferiores a 1.5  $\text{mg L}^{-1}$ . Las normas europeas recomiendan que el agua no debe contener cantidades de amonio superiores a 0.5  $\text{mg L}^{-1}$ .

Si se obtienen las ecuaciones de las curvas de calibrado lineales frente a valores de concentración molar, los valores de pendientes son comparables (ver **Tabla 38**) para todas las aminas ensayadas. También para la  $\beta$ -feniletilamina que no es una amina alifática (**Tabla 38**). El valor medio de la pendiente fue  $5.1 \cdot 10^8$  M y el % de desviación estándar relativa fue 14. La **Tabla 39** da la precisión obtenida para las aminas alifáticas. Los %CV intradía e interdía fueron satisfactorios.

**Tabla 38.** Parámetros analíticos para la determinación de aminas primarias en muestras.

	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ ( $\text{mg}^{-1} \text{L}$ ) o *(M)	$R^2$	$S_{yx}/b$	L.D. ( $\text{mg L}^{-1}$ )	L.C. ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Metilamina</b>	400±150	19000±1200 *(6.0±0.4)10 <sup>8</sup>	0.99	0.01	0.01	0.05
<b>Propilamina</b>	500±100	9000±1000 *(4.2±0.5)10 <sup>8</sup>	0.97	0.02	0.03	0.10
<b>Etilamina</b>	530±50	8300±400 *(4.9±0.3)10 <sup>8</sup>	0.992	0.008	0.03	0.11
<b>Butilamina</b>	490±90	6300±800 *(4.6±0.5)10 <sup>8</sup>	0.97	0.02	0.04	0.14
<b>Pentilamina</b>	400±100	6000±500 *(5.2±0.4)10 <sup>8</sup>	0.98	0.03	0.04	0.15
<b>b-etilfenilamina</b>	420±70	4900±800 *(5.9±0.6)10 <sup>8</sup>	0.95	0.02	0.05	0.18

Los resultados obtenidos para la estimación total de grupos amino primarios para mezclas se muestran en la **Tabla 40**. Se ensayaron dos opciones, considerando la señal analítica individual de cada amina o empleando la curva de calibrado de la metilamina como ejemplo (se podría emplear la curva de calibrado de otra amina). Teniendo en cuenta estos resultados, el procedimiento puede ser empleado para cuantificar la concentración total de grupos amino primarios expresados en molaridad o como  $\text{mg de N L}^{-1}$ .

**Tabla 39.** Precisión del método para aminas alifáticas.

	Precisión (%CV)	
	Intradía (0.1 $\text{mg L}^{-1}$ )	Interdía (0.1 $\text{mg L}^{-1}$ y 0.2 $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>Metilamina</b>	8 (n=4)	15 (n=11) y 12 (n=8)
<b>Etilamina</b>	5 (n=2)	6 (n=5)
<b>Propilamina</b>	3 (n= 2)	3 (n=3)
<b>Butilamina</b>	9 (n= 4)	5 (n=3)
<b>Pentilamina</b>	3 (n=4)	10 (n= 3)

**Tabla 40.** Resultados para mezclas de aminas. X(**mM**): concentración total de aminas considerando la señal individual de cada amina y Y(**mM**): concentración total de aminas empleando la curva de calibrado de la metilamina

Concentración de amina añadida (mM)					Concentración hallada		
MA	EA	PA	BA	PenA	%Error relativo [(Encontrada-Añadida/Encontrada)100]		
					X(μM)	Y(μM)	Y (-NH <sub>2</sub> -N mg L <sup>-1</sup> )
3.2	2.2				<b>5.35, 5.2</b> -0.9,-5	<b>5.2, 4.9</b> -5, -9	<b>0.073, 0.069</b>
6.4	2.2				<b>7.9, 8.0</b> -8,-7	<b>8.0, 8.0</b> -7,-7	<b>0.110, 0.110</b>
3.2	4.4				<b>7.0, 6.6</b> -8,-13	<b>7.5, 6.9</b> -1,-9	<b>0.105, 0.097</b>
6.4		1.15			<b>8.15, 8.3</b> 8,10	<b>7.8, 7.8</b> 3,3	<b>0.109, 0.109</b>
3.2		2.3			<b>6.2, 6.2</b> 12,12	<b>4.8, 4.8</b> -12,-12	<b>0.067, 0.067</b>
3.2			1.4		<b>4.8, 4.7</b> 5,3	<b>5.1, 5.2</b> 10,13	<b>0.071, 0.073</b>
3.2			2.7		<b>6.6, 6.95</b> 12,18	<b>6.9, 7.0</b> 16,18	<b>0.097, 0.098</b>
6.4				2.3	<b>7.7, 7.4</b> -11,-15	<b>8.4, 8.1</b> -3,-7	<b>0.118, 0.113</b>
3.2				2.3	<b>6.5, 6.6</b> 19,20	<b>6.5, 6.5</b> 19,19	<b>0.091, 0.091</b>
6.4				5.7	<b>10.5, 10.5</b> -13,-13	<b>11.4, 11.2</b> -6,-7	<b>0.160, 0.157</b>
3.2	2.2	1.15			<b>6.0, 5.6</b> -8,-14	<b>5.4, 5.3</b> -17,-19	<b>0.076, 0.074</b>
		1.15	1.4	2.3	<b>5.2, 5.3</b> 7,9	<b>4.0, 4.0</b> -17,-17	<b>0.056, 0.056</b>
3.2		1.15		2.3	<b>5.5, 5.3</b> -17,-20	<b>5.4, 5.4</b> -19,-19	<b>0.076, 0.076</b>
	2.2	1.15	1.4		<b>4.4, 4.4</b> -7,-7	<b>4.0, 4.0</b> -16,-16	<b>0.056, 0.056</b>
3.2	2.2	1.15	1.4		<b>8.1, 8.0</b> 2,1	<b>8.4, 8.3</b> 6,4	<b>0.118, 0.116</b>
	2.2	1.15	1.4	2.3	<b>6.0, 6.0</b> -15,-15	<b>5.8, 5.7</b> -18,-19	<b>0.081, 0.080</b>
3.2	2.2	1.15	1.4	2.3	<b>10.0, 9.8</b> -2,-4	<b>10.7, 10.5</b> 4,2	<b>0.150, 0.147</b>

#### **Análisis de muestras reales de agua.**

El método propuesto se empleó para la determinación de grupos amino primarios en tres muestras de agua natural (grifo, de campo, de una fuente) y a un agua residual (de una industria). Las muestras se fortificaron con metilamina a un nivel de concentración

0.01 mg L<sup>-1</sup>, procesándose alícuotas de 10 mL. Para el agua residual, se procesaron 2 mL de muestra fortificada a 25 mg L<sup>-1</sup>. La **Tabla 41** muestra los resultados obtenidos para las muestras expresados como -NH<sub>2</sub>-N mg L<sup>-1</sup>. Los resultados fueron satisfactorios en cuanto a la recuperación.

En la muestra de agua residual, la cantidad de grupos amino primarios fue elevada. En las otras muestras analizadas, los valores obtenidos estuvieron cerca del límite de detección. Como puede verse, la concentración obtenida para agua de campo, del grifo y de fuente en las muestras fortificadas estuvo de acuerdo con la añadida. Se obtuvieron recuperaciones similares para todo tipo de muestras, indicando que no existía efecto matriz.

**Tabla 41.** Determinación de grupos amino primarios en muestras reales de agua.

Encontrada (NH <sub>2</sub> -N mg L <sup>-1</sup> ) <sub>1</sub>	Añadida (NH <sub>2</sub> -N mg L <sup>-1</sup> )	Medida (NH <sub>2</sub> -N mg L <sup>-1</sup> )	Medida- Encontrada (NH <sub>2</sub> -N mg L <sup>-1</sup> )	Recuperación (%)
<b>Agua de grifo</b>				
0.017±0.005	0.045	0.061±0.005	0.052±0.007	115.0
<b>Agua campo</b>				
0.016±0.005	0.045	0.059±0.005	0.043±0.009	96.0
<b>Agua fuente</b>				
0.023±0.002	0.045	0.070±0.001	0.047±0.001	104.0
<b>Agua residual</b>				
5.8±0.3	11.3	17.0±0.8	11.2±0.6	99.0

## Conclusiones.

En este estudio se ha mostrado la posibilidad de determinar fluorimetricamente aminas primarias con un procedimiento de extracción en fase sólida total, a niveles de sub mg L<sup>-1</sup>. Las señales de las distintas aminas en las muestras fueron aditivas y los valores de las pendientes expresados en concentración molar. Así, este procedimiento puede emplearse para hacer una estimación de los grupos amino primarios totales.

El procedimiento propuesto puede ser aplicado a la determinación de grupos amino primarios en muestras reales de agua con una exactitud adecuada. Además no se encontraron diferencias en la cuantificación de los analitos entre los distintos tipos de muestras ensayadas.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el uso de cartuchos de EFS para el enriquecimiento y derivatización es una alternativa válida para la determinación de aminas primarias en muestras de agua. Los límites de detección se mejoraron en 10 veces comparado con los obtenidos mediante derivatización en

disolución. El procedimiento propuesto es simple, de bajo coste y rápido. El tiempo necesario para el análisis manual (preparación de la muestra y medida) fue de aproximadamente 5 min, sin embargo cabe la posibilidad de procesar varias muestras a la vez haciendo uso de una estación de vacío. Estas características hacen que el procedimiento sea adecuado para el screening de muestras y para medidas *in situ*.

### 2.3.2. ANÁLISIS DE MONOAMINAS ALIFÁTICAS PRIMARIAS DE CADENA CORTA POR CL EN MUESTRAS DE AGUA.

La cromatografía líquida (CL) es una de las técnicas más frecuentemente empleadas para el análisis de aminas alifáticas en medio acuoso. Debido a que las aminas presentan bajas respuestas frente a los detectores comunes de CL (UV, fluorescencia o electrotérmicos), la mayoría de los métodos incluyen una etapa de derivatización para aumentar la sensibilidad [122-125]. Algunos factores para la elección del reactivo derivatizante son:

- El tipo de muestra.
- La estructura de las aminas (primaria, secundaria o terciaria).
- La sensibilidad y/o selectividad.
- El sistema de detección.
- El modo en que se va a llevar a cabo la derivatización (pre-columna, post-columna o en la columna).

Reactivos como OPA combinado con un tiol [111,112], FMOC [126], NQS [127], DNB-Cl [128] o DNS [70], entre otros, han sido propuestos para la determinación de aminoácidos y aminas primarias y secundarias.

Como en el capítulo anterior el OPA ha sido elegido como reactivo derivatizante. Ventajas de este reactivo son la formación de derivados altamente fluorescentes, en tiempos cortos y con sensibilidad adecuada. Sin embargo, el principal inconveniente de los derivados de OPA es su falta de estabilidad [111,112]. Por esta razón, se han llevado a cabo varios estudios sobre la estabilidad de los isoindoles formados. Se han propuesto diferentes relaciones OPA/NAC y pHs.

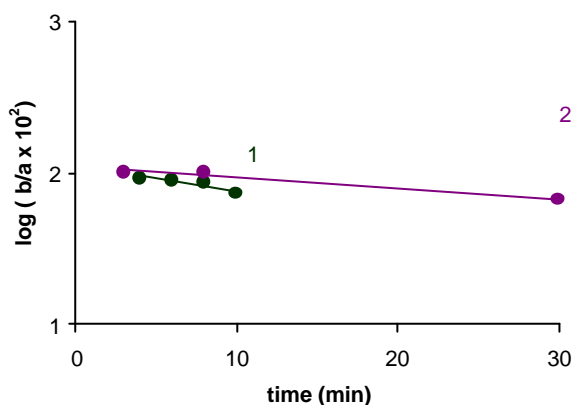
La estabilidad de los derivados de aminas de bajo peso molecular, como la metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina no ha sido investigada en detalle. Por eso, un estudio comparativo de los datos analíticos y de recuperación dependiendo de las condiciones y el procedimiento para optimizar el método analítico, es necesario, sobretodo si se requiere un análisis de screening de estos compuestos.

En este trabajo se ensayaron diferentes procedimientos de derivatización para las aminas basados en estudios previos del grupo de investigación tales como derivatización en columna [129] donde los derivados se forman en el sistema cromatográfico, derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea [113,117,118,121], donde los derivados se forman en un cartucho de EFS y derivatización asistida en soporte sólido en línea [114,118,130,131], donde los derivados se forman en una precolumna empaquetada con material C<sub>18</sub> (30 μm). En este caso los derivados se transfieren a la columna analítica a través de una válvula de selección de flujo.

Este estudio evalúa las ventajas e inconvenientes de la aplicación de los procedimientos mencionados para aminas alifáticas primarias usando OPA/NAC como reactivo derivatizante. La parte experimental se muestra en el *Apéndice 7*.

### Derivatización fuera de línea: derivatización en disolución frente a derivatización asistida en soporte sólido.

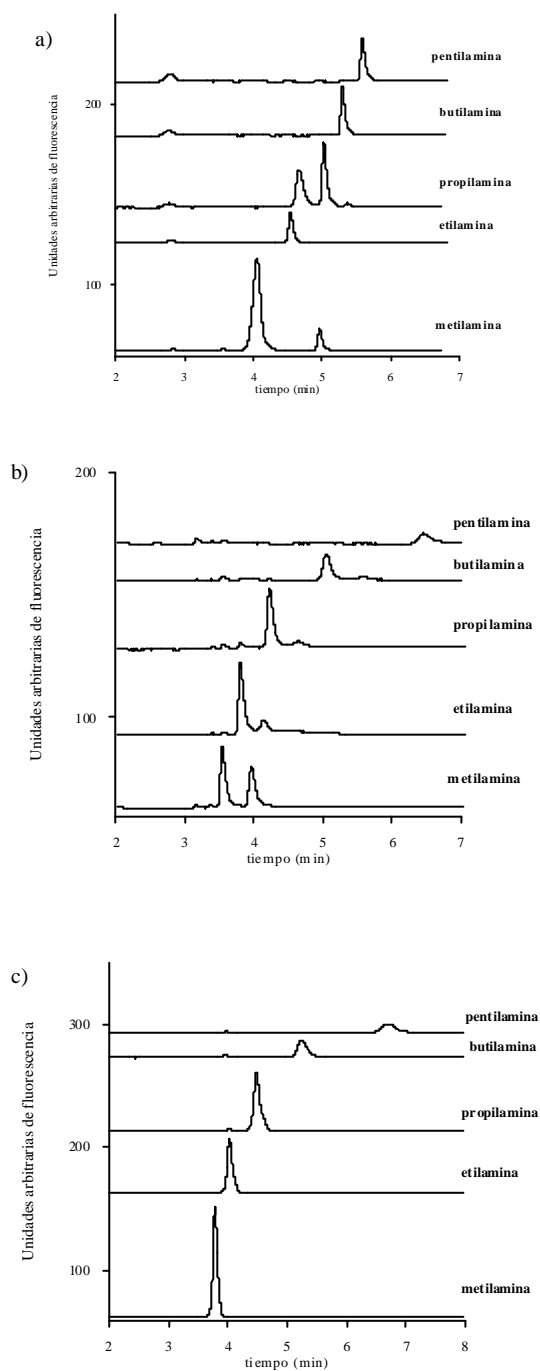
Mediante derivatización en disolución y distintas concentraciones de OPA/NAC ensayadas, se obtuvieron varios derivados para metilamina, etilamina y propilamina para tiempos de reacción entre 30 y 600 s. La formación de más de un derivado se debe a la degradación del isoindol formado [111,112]. La **Figura 36** muestra la degradación en función del tiempo del fluoróforo OPA-metilamina en las mejores condiciones ensayadas. Debido a que 3 min fue el tiempo óptimo para derivatización en disolución, la variación con el tiempo fue evaluada tomando 3 min como tiempo cero. La degradación de los derivados de OPA/NAC sigue una cinética de pseudo-primer orden, tal y como se muestra en la **Figura 36** y de acuerdo con [112]. La constante cinética ( $k$ ), calculada como la pendiente de la representación  $\log(b/a)$  vs el tiempo, fueron  $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  ( $n=5$ ) y  $0.7 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  ( $n=4$ ) para  $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (10:1) y  $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (1:1) respectivamente. Para concentraciones de OPA/NAC más elevadas  $8.8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (1:1) la constante de degradación fue  $8.8 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$  ( $n=4$ ). Estos resultados sugieren que la estabilidad del isoindol aumenta cuando el exceso de reactivo disminuye. Además, cuando las concentraciones de OPA y NAC son equivalentes, se consigue una mejora en la estabilidad. Si el pH de trabajo era 9 no se observó un efecto estabilizante. Todos estos hechos están en concordancia con los encontrados por Saito *et al* [111].



**Figura 36.** Variación con el tiempo del derivado OPA-metilamina formado en disolución, después de la reacción con OPA/NAC, 1:  $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (10:1) a pH 8 y 2:  $3.7 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  (1:1) a pH 8

Tal como se deriva de la **Figura 37a** el análisis de screening de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina fue difícil en estas condiciones. Los cromatogramas de la **Figura 37a** se obtuvieron para un tiempo de reacción de 3 min. Algunas de las aminas eluyeron en dos picos a tiempos de retención muy similares entre ellas. La **Tabla 42** da las ecuaciones de las curvas de calibrado lineales considerando el área de los dos picos y considerando solo el área del primer derivado para metilamina, etilamina y propilamina. Las ecuaciones de la regresión para butilamina y pentilamina se obtuvieron del área de su correspondiente pico.





**Figura 37.** Cromatogramas obtenidos para las aminas. a) derivatización en disolución,  $3,7 \cdot 10^{-3} M$  (1:1) ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ), b) derivatización en soporte sólido fuera de línea ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$  MA y  $0,5 \text{ mg L}^{-1}$  las demás) y c) Derivatización en columna ( $1,5 \text{ mg L}^{-1}$  MA y  $5 \text{ mg L}^{-1}$  las demás)

**Tabla 42.** Parámetros analíticos obtenidos para las aminas ensayadas utilizando diferentes procedimientos.

	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$R^2$	$S_{yx}/b$	L.D. ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<b>I 'A'</b>					
Metilamina	-9±19	34±2	0.9967	0.612	0.31
Etilamina	4±8	10.9±0.9	0.9935	0.857	0.22
Propilamina	-17±36	22±4	0.9920	1.8000	0.84
Butilamina	1±2	8.0±0.2	0.9940	0.260	0.70
Pentilamina	-2±5	8.0±0.5	0.9956	0.707	0.50
<b>I 'B'</b>					
Metilamina	-12±26	30±3	0.9920	0.952	0.35
Etilamina	4±8	10.9±0.9	0.9935	0.857	0.22
Propilamina	2±3	11.5±0.3	0.9992	0.295	0.40
<b>II 'A'</b>					
Metilamina	-6±11	1162±97	0.9862	0.012	0.005
Etilamina	-3±7	417±29	0.9859	0.030	0.006
Propilamina	-9±9	328±31	0.9822	0.036	0.028
Butilamina	2±5	183±18	0.9727	0.037	0.010
Pentilamina	-2±3	97±9	0.9835	0.033	0.023
<b>II 'B'</b>					
Metilamina	0±4	648±34	0.9946	0.030	0.001
Etilamina	0±3	338±14	0.9946	0.017	0.002
Propilamina	-7±7	306±25	0.9869	0.007	0.028
<b>III</b>					
Metilamina	-16±11	215±13	0.9729	0.039	0.077
Etilamina	-8±11	69±4	0.9754	0.245	0.116
Propilamina	-6±9	46±3	0.9815	0.310	0.130
Butilamina	-6±6	32±2	0.9759	0.337	0.196
Pentilamina	-4±5	23±2	0.9769	0.375	0.164
<b>IV</b>					
Metilamina	28±35	1169±39	0.9955	0.045	0.002
Etilamina	18±26	589±10	0.9985	0.071	0.015
Propilamina	21±25	699±11	0.9987	0.085	0.020
Butilamina	11±29	667±10	0.9989	0.069	0.030
Pentilamina	37±30	584±10	0.9986	0.083	0.040

I: derivatización en disolución, II: derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea, III: derivatización en columna y IV: derivatización asistida en soporte sólido en línea. Señales analíticas: A: área de todos los picos para cada amina y B: área del primer derivado eluido.

El nivel de concentración con el procedimiento en disolución fue demasiado alto para ser aplicable a muestras reales de agua (**Tabla 42**), requiriéndose un paso de preconcentración antes de la inyección en el sistema cromatográfico

De acuerdo con los estudios precedentes [112], OPA/NAC  $3.7 \cdot 10^{-3}$  M (1:1) y tampón borato a pH 8, fueron elegidas como las condiciones óptimas para la derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea. El procedimiento habitual cuando se emplean cartuchos de EFS para la preconcentración y derivatización es hacer pasar una alícuota de reactivo a través de los cartuchos que contienen el analito ya purificado. Después de un periodo de tiempo de reacción, los derivados se desorben con un disolvente adecuado.

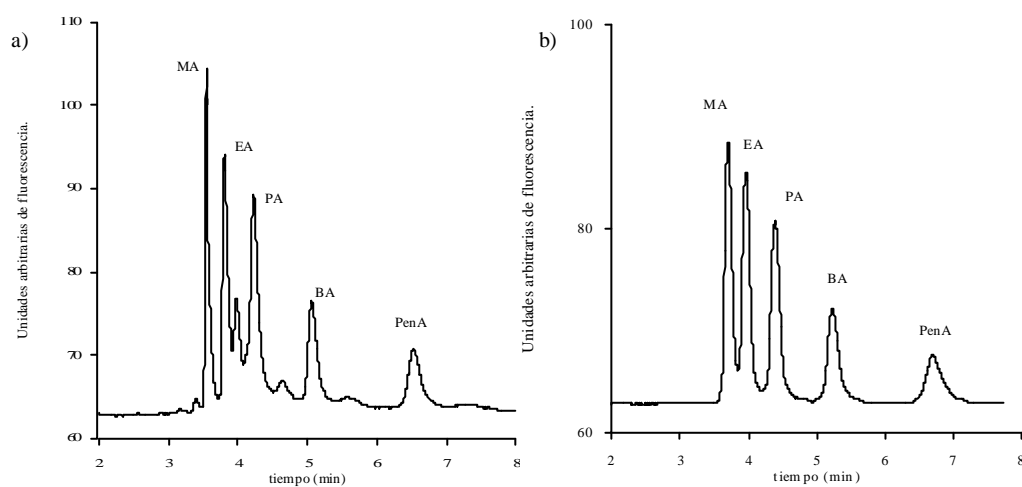
El factor de preconcentración fue de aproximadamente 5 para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina para la derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea (10 mL de muestra) comparado con el obtenido mediante derivatización en disolución (1.8 mL de muestra). Se obtuvieron dos picos para metilamina, etilamina y propilamina, aunque con diferente relación con respecto a los de derivatización en disolución. Para butilamina y pentilamina solo se obtuvo un pico (**Figura 37**). La cantidad y número de derivados formados depende del tiempo de reacción, tiempos cortos fueron mejores que tiempos largos, porque la degradación del isoindol disminuye. Teniendo en cuenta el tiempo de formación y la cinética de degradación del isoindol, un tiempo de reacción de 3 min fue elegido como tiempo de reacción óptimo. Este valor estuvo de acuerdo con [112].

La **Tabla 42** muestra las ecuaciones de las curvas de calibrado obtenidas considerando los dos picos y el área del primer derivado para metilamina, etilamina y propilamina. Se obtuvieron buenos resultados en ambos casos. En el caso de la propilamina, se obtuvieron valores de pendientes comparables en los dos casos, indicando esto que el segundo pico era despreciable. Las sensibilidades fueron entre 10 y 20 veces superiores a las obtenidas mediante derivatización en disolución (**Tabla 42**). La desviación estándar del procedimiento y los LDs (calculados como la concentración requerida para generar una señal/ruido de 3) también se dan en la **Tabla 42**. Este procedimiento fue empleado para analizar el agua del grifo, agua de campo, agua de fuente y agua residual. La **Tabla 43** muestra las recuperaciones obtenidas para muestras fortificadas con cada amina. Estos valores indicaron que la determinación de estas aminas no depende del tipo de matriz del agua.

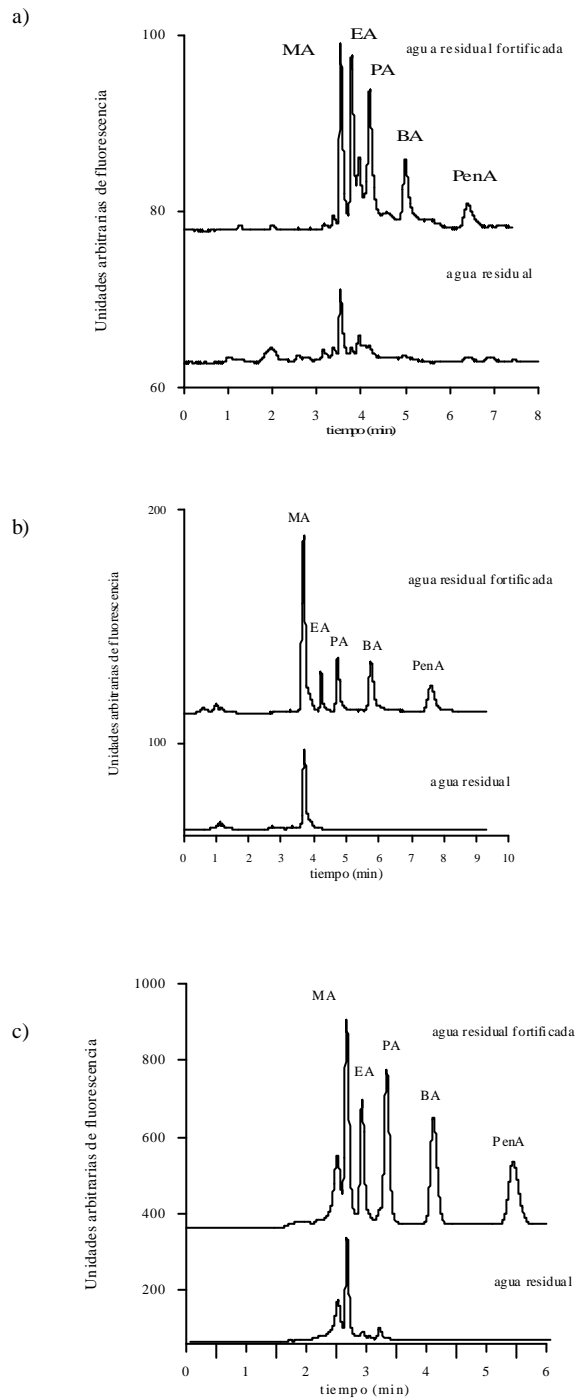
La **Figura 38a** muestra el cromatograma correspondiente a una mezcla de las cinco aminas. En la **Figura 39a** se representa el cromatograma obtenido para la muestra de agua residual y la muestra de agua fortificada con una mezcla de aminas (metilamina  $0.2 \text{ mg L}^{-1}$  y etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Estos cromatogramas demuestran que el análisis es selectivo para propilamina, butilamina y pentilamina. Se puede realizar el screening de metilamina mientras que la etilamina fue la que peor resultado mostró. La muestra de agua residual contenía metilamina y las demás aminas se encontraron por debajo del límite de detección.

**Tabla 43.** Recuperación (%) de las aminas en muestras reales de agua aplicando la derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea (procedimiento II) y la derivatización en columna (procedimiento III).

Procedimiento	Amina	Muestras de agua fortificadas			
		Agua del grifo	Agua de campo	Agua de fuente	Agua residual
<b>II</b>	Metilamina	79	87	-	68
	Etilamina	85	108	-	-
	Propilamina	-	129	85	130
	Butilamina	87	98	79	82
	Pentilamina	83	103	88	78
<b>III</b>	Metilamina	93	102	83	104
	Etilamina	91	123	74	69
	Propilamina	107	76	70	114
	Butilamina	99	96	73	96
	Pentilamina	97	82	130	130



**Figura 38.** Cromatogramas correspondientes a una mezcla de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina, a) Derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea (0.2, 0.5, 0.5, 0.5, 0.5 mg L<sup>-1</sup>) y b) derivatización en columna (0.75, 2.5, 2.5, 2.5, 2.5 mg L<sup>-1</sup>)



**Figura 39.** Cromatogramas obtenidos para la muestra de agua residual y la muestra fortificada, a) derivatización asistido en soporte sólido fuera de línea, b) derivatización en columna y c) derivatización en soporte sólido en línea.

### Derivatización en columna.

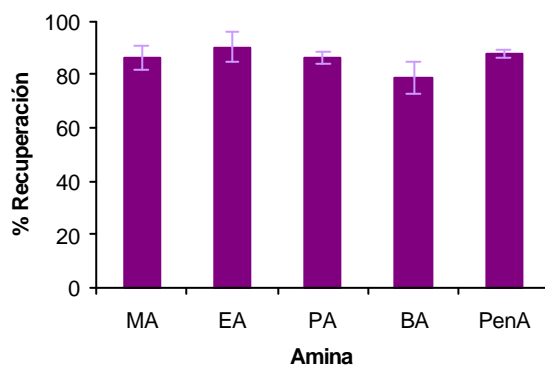
En este caso la reacción entre el OPA/NAC y las aminas primarias tiene lugar en el sistema cromatográfico en presencia de tampón borato en la fase móvil. La **Figura 37c** muestra los cromatogramas para un patrón de metilamina ( $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y de etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ). Esa figura muestra que se obtiene un solo pico para cada una de las aminas de modo que eluyó un solo derivado para cada amina en estas condiciones.

La **Tabla 42** muestra las ecuaciones de las curvas de calibrado de cada amina. La sensibilidad expresada como  $\text{L mg}^{-1}$  decreció a medida que aumenta el número de átomos de carbono, disminución en la pendiente y aumentó el límite de detección. La precisión del procedimiento, estimada a partir de la desviación estándar fue buena. Este procedimiento fue entre cuatro y siete veces menos sensible que el de derivatización en soporte sólido fuera de línea.

El cromatograma obtenido para una mezcla de aminas primarias (**Figura 38b**) muestra que el procedimiento de derivatización en columna puede ser empleado para el screening de estas aminas en muestras en las que todas estén presentes.

Solo se encontró metilamina en la muestra de agua residual (**Figura 39b**). En la muestra de agua del grifo, de campo y de fuente los analitos no pudieron ser detectados debido a la falta de sensibilidad de este procedimiento. Las recuperaciones para las muestras fortificadas se dan en la **Tabla 43**, todos esos valores indicaron la ausencia de efecto matriz.

Los límites de detección, establecidos para una relación señal/ruido de 3, fueron de entre  $0.08$  y  $0.16 \text{ mg L}^{-1}$ . Estos límites de detección no son lo suficientemente bajos para determinar aminas en algunas muestras reales. Con el fin de mejorarlos, fue necesario incluir una etapa de preconcentración fuera de línea basada en la extracción en fase sólida. Las recuperaciones obtenidas se muestran en la **Figura 40**.

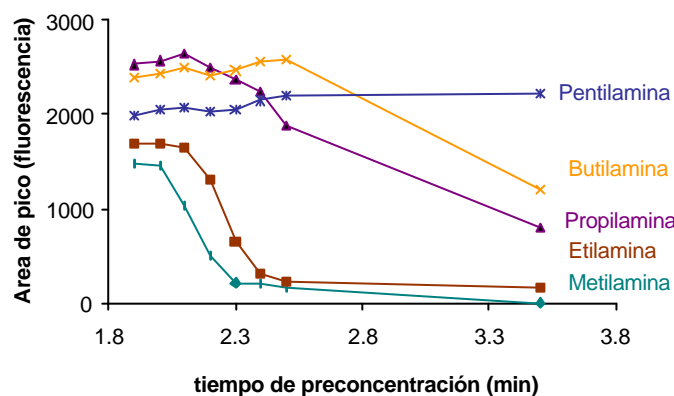


**Figura 40.** Recuperaciones obtenidas empleando una etapa de preconcentración con EFS fuera de línea.

Como puede verse en la **Figura 40**, los analitos fueron prácticamente eluidos al 100 % empleando ácido acético como disolvente. Los límites de detección conseguidos fueron alrededor de cinco veces menores que los obtenidos sin preconcentración.

### Derivatización asistida en soporte sólido en línea.

Inicialmente investigamos la retención de los analitos en la precolumna. Se optimizó el tiempo de reacción en la precolumna, ya que la metilamina y etilamina se retienen menos en la precolumna debido a que son más polares que la propilamina, butilamina y pentilamina. Basándonos en los resultados del procedimiento fuera de línea, las condiciones para el procedimiento en línea fueron estudiadas inyectando 100  $\mu\text{L}$  de disoluciones de patrones. La representación señal analítica *versus* tiempo de preconcentración (1.90-3.5 min) se muestran en la **Figura 41**.

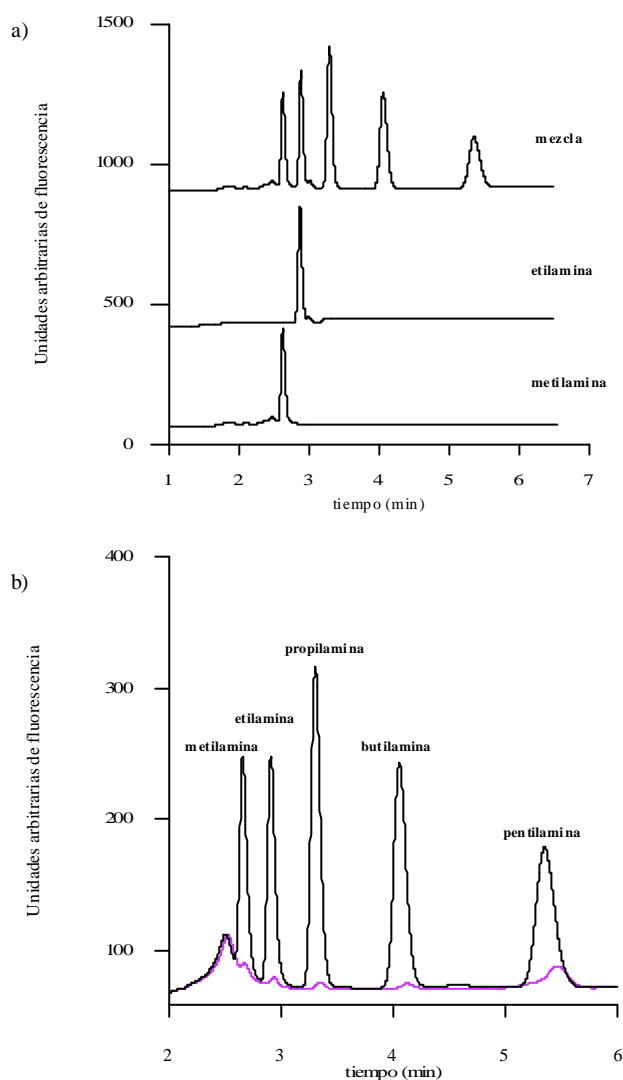


**Figura 41.** Efecto del tiempo de preconcentración en la respuesta analítica para la derivatización asistida en soporte sólido en línea. Metilamina  $1.5 \text{ mg L}^{-1}$ , etilamina  $3.5 \text{ mg L}^{-1}$ , propilamina, butilamina y pentilamina  $5 \text{ mg L}^{-1}$ .

Como puede verse, a medida que aumenta el tiempo de reacción la señal para la metilamina disminuye. Con un tiempo de 2 min la sensibilidad fue satisfactoria para todas las aminas. Si se inyectaba un volumen de 150  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico, la sensibilidad aumentó en un factor de 1.4, así 150  $\mu\text{L}$  fue el volumen de inyección óptimo.

La **Figura 42a** muestra que solo se formó un derivado con la derivatización asistida en soporte sólido en línea haciendo uso de un sistema de columnas acopladas. La **Figura 42b** muestra un cromatograma para la mezcla de las cinco aminas. Los parámetros analíticos de la **Tabla 42** indican que la linealidad fue buena con este procedimiento. La **Figura 42b** también muestra los límites de detección experimentales para metilamina, etilamina, propilamina y butilamina, siendo estos 2, 15, 20, 30 y 40  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente.

Como era de esperar, las sensibilidades de la derivatización en línea y fuera de línea con soportes  $C_{18}$  fue comparable y claramente mejor que las obtenidas con la derivatización en columna (ver **Tabla 42**). Además la derivatización asistida en soporte sólido en línea dió los mismos resultados que la derivatización fuera de línea, pero sin manipulación de la muestra y con solo 150  $\mu\text{L}$  de muestra en lugar de 10 mL. El tiempo de análisis disminuyó con respecto a los otros procedimientos y la resolución cromatográfica fue mejor.



**Figura 42.** Cromatogramas obtenidos con derivatización asistida en soporte sólido en línea para a) metilamina ( $0.75 \text{ mg L}^{-1}$ ) y etilamina ( $1.58 \text{ mg L}^{-1}$ ) y b) límite de detección de MA, EA, PA, BA y PenA: 2, 15, 20, 30, 40  $\text{ng mL}^{-1}$ . Ambos comparados con una mezcla de MA; EA, PA, BA y PenA ( $0.75, 1.58, 2, 2, 2 \text{ mg L}^{-1}$ ).



Las recuperaciones para la muestra de agua residual fortificada fueron entre 93 y 120 %. Los cromatogramas para la muestra de agua residual y la muestra de agua residual fortificada con las aminas se comparan en la **Figura 39c**. La metilamina pudo ser determinada mientras que las otras aminas se encontraron por debajo del límite de detección. Esto sugiere que la derivatización con OPA/NAC mediante este procedimiento mejora tanto la sensibilidad como la resolución cromatográfica.

### Comparación de los procedimientos.

La **Tabla 44** compara algunas de las características de los procedimientos estudiados.

**Tabla 44.** Comparación de algunas características de los procedimientos.

	Volumen de muestra	Screening	Tiempo de análisis (min)	Manip. de muestra	Coste	Sensibilidad
<b>Disolución</b>	*	*	15	**	*	*
<b>Asistida en soporte sólido fuera de línea</b>	*	**	12	*	**	***
<b>En columna</b>	*	***	8	**	*	*
<b>En columna + preconcentración</b>	*	***	12	*	**	**
<b>Asistida en soporte sólido en línea</b>	****	***	10	****	**	***

A mayor número de asteriscos, mejor condición.

El volumen de muestra se optimiza con el procedimiento de derivatización en línea;  $\mu\text{L}$  en vez de  $\text{mL}$ . Comparando la capacidad de screening, las derivatizaciones en columna y asistida en soporte sólido en línea son los mejores procedimientos. Además el tiempo de análisis es menor que en los procedimientos fuera de línea. Aunque la derivatización en columna es menos sensible que la derivatización asistida en soporte sólido en línea. Para mejorar los límites de detección de la derivatización en columna es necesario incluir una etapa de preconcentración fuera de línea, aumentando el tiempo de análisis y disminuyendo la automatización. No hay diferencias significativas en el coste de la derivatización en columna con preconcentración, asistida en soporte sólido fuera de línea y en línea. La manipulación de la muestra se eliminó con este último procedimiento.

### Conclusiones.

En este trabajo se presentan varios procedimientos para el screening y la determinación de aminas primarias con OPA/NAC como agente derivatizante.

Cuando se emplea la derivatización en disolución fuera de línea se forman dos derivados para las aminas de cadena más corta (1C-3C) y este hecho depende de las condiciones experimentales y del tiempo de reacción. Por eso, el screening de estas aminas con este procedimiento resulta difícil, además de la pobre sensibilidad alcanzada.

Mejores resultados se obtienen con la derivatización asistida en soporte sólido fuera de línea, sin embargo el screening no es del todo satisfactorio.

Con el procedimiento en columna se forma un solo derivado para cada amina (1C-6C), siendo el principal inconveniente la falta de sensibilidad. Si se incluye una etapa de preconcentración con EFS fuera de línea antes de la derivatización, se pueden alcanzar mejores límites de detección; los factores de preconcentración estuvieron alrededor de 5. Sin embargo, de este modo aumenta la manipulación de la muestra.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la derivatización asistida en soporte sólido en línea fue la mejor opción para el screening de aminas en muestras de agua. Este procedimiento permite el screening de aminas con la sensibilidad y selectividad adecuadas. Las muestras de agua pueden ser directamente procesadas y el análisis está completamente automatizado. Solo se requieren 150  $\mu\text{L}$  de muestra y el tiempo de análisis por muestra es de 10 min.

### 2.3.3. VENTAJAS DE LA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA CAPILAR PARA EL SCREENING DE AMONIO Y NITRÓGENO AMINO PRIMARIO.

Durante los últimos años, la miniaturización de CLAR ha sido uno de los retos más importantes en la Química Analítica [132]. Las principales características de estos sistemas son el pequeño diámetro de las columnas y los bajos flujos. Las principales ventajas de la cromatografía líquida capilar son:

- Reducción del consumo de disolventes.
- Habilidad para trabajar con pequeños volúmenes de muestra.
- Facilidad y eficiencia para el acoplamiento con otros instrumentos *e.g.* ionización de electrospray (ESI) o masas (MS) [133,134].

Además, se han empleado sistemas de columnas acopladas para mejorar la eficiencia de los procesos de miniaturización en CL [135]. Esta técnica se ha empleado para separar biomoléculas, tales como proteínas y péptidos [136,137]. También ha sido aplicada al análisis de drogas [137,138].

En este trabajo, proponemos métodos para el análisis de screening de amonio, aminas alifáticas de cadena corta y aminoácidos empleando la cromatografía líquida capilar combinada con detección UV-vis y fluorescente. De hecho, y desde nuestro conocimiento este es el primer método que emplea la cromatografía líquida capilar para este análisis. Se evaluó la sensibilidad, resolución, exactitud y precisión del procedimiento comparándolas, además, con la cromatografía convencional. Este trabajo contribuye a conocer la naturaleza del NOD en muestras de agua, así pues el método propuesto puede ser útil para estudios de eutrofización.

Los distintos procedimientos experimentales se pueden consultar en el *Apéndice 8*.

### Análisis de screening.

Para la **detección UV-vis** se emplearon dos condiciones cromatográficas, dependiendo de los analitos. La separación de las cinco aminas primarias, metil-, etil-, propil-, butil- y pentilamina, y de los diecisiete aminoácidos se hicieron con el *Gradiente 1* (ver parte experimental *Apéndice 8*). La **Figura 43A** muestra los cromatogramas obtenidos para la mezcla de aminoácidos y aminas. Como puede verse en la **Figura 43A**, las aminas eluyeron después de 30 min. Los aminoácidos, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glicina, histidina, metionina, serina, treonina y tirosina coeluyeron en varios picos aun con un 100% de agua como fase móvil y disminuyendo el flujo a  $5 \mu\text{L min}^{-1}$ . En estas condiciones, se separaron valina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina.

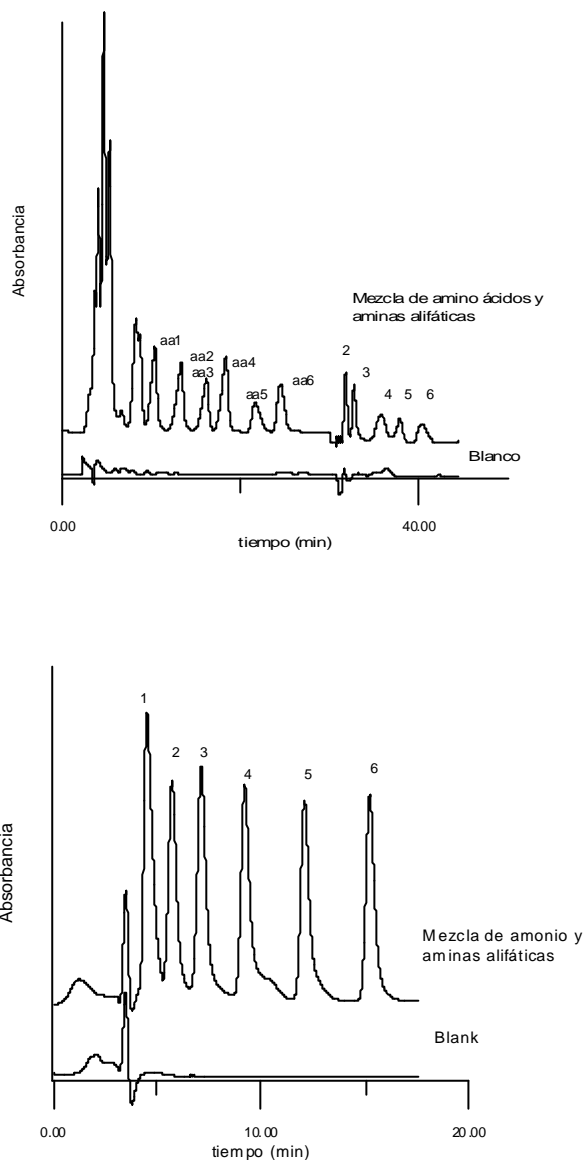
En muestras en las que no estén presentes los aminoácidos o su concentración sea baja, el *Gradiente 1* podría ser demasiado lento para el screening de aminas alifáticas. De modo que se modificó el *Gradiente 1* con el fin de reducir el tiempo de análisis. Se empleó el *Gradiente 2* (*Apéndice 8*) para elucidar las mezclas de aminas. Los cromatogramas obtenidos para una mezcla de aminas y el blanco se muestran en la **Figura 43B**. Además, se incluyó amonio en esa mezcla. Como puede verse en la **Figura 43B**, el *Gradiente 2* fue apropiado para el análisis de screening de las aminas y amonio cuando los aminoácidos no estén presentes en esas muestras de agua.

Si se aplica el *Gradiente 2* a una mezcla de aminoácidos y aminas, el análisis de screening de metilamina resulta complicado debido a que los aminoácidos coeluyen en dos picos, uno de ellos en el mismo tiempo de retención de la metilamina.

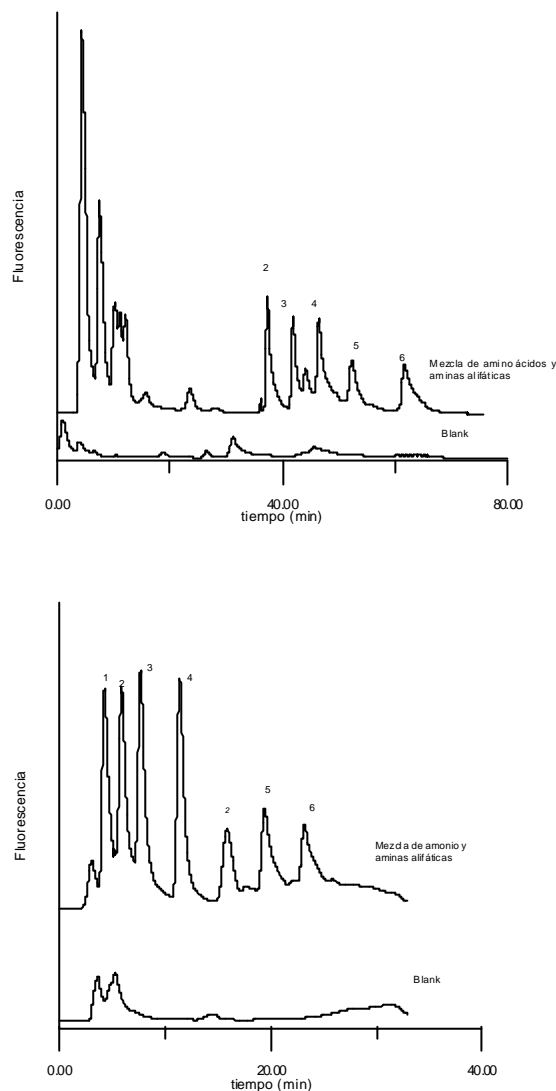
Para la **detección fluorescente**, el flujo fue  $15 \mu\text{L min}^{-1}$  en todos los casos, debido al volumen de la celda de la celda de flujo ( $8 \mu\text{L}$ ). La separación de los diecisiete aminoácidos y las cinco aminas se llevo a cabo con el *Gradiente 3* (*Apéndice 8*). La **Figura 44A** muestra el cromatograma para la mezcla de compuestos amino y para el blanco. Se obtuvo una buena separación para las cinco aminas. En ese caso, el análisis de screening de los aminoácidos no fue posible, porque coelúan en varios picos, aun con el 100% de agua en la fase móvil, debido al flujo ( $15 \mu\text{L min}^{-1}$ ).

Como en el caso anterior, el *Gradiente 3* se modificó para el screening de la mezcla de las cinco aminas y amonio. Los cromatogramas típicos obtenidos con el *Gradiente 4* (*Apéndice 8*) para el blanco, aminas y amonio se muestran en **Figura 44B**.

Los picos obtenidos para amonio con detección UV-vis y fluorescente estaban completamente separados del resto de aminas. Por lo tanto, puede llevarse a cabo un análisis de screening de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y amonio con los *Gradientes 2 y 4*. Los *Gradientes 1 y 3* no pueden ser empleados para la identificación y/o cuantificación de amonio porque su picos coeluyen con los picos correspondientes a los aminoácidos. Si en una muestra se encuentran amonio, aminoácidos y aminas, solo se podría realizar un análisis de screening de aminas.



**Figura 43.** Cromatogramas obtenidos con detector de UV-vis para A) aminoácidos ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) y aminas alifáticas ( $MA 0.25 \text{ mg L}^{-1}$  y EA, PA, BA y PenA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradiente 1) y B) amonio ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y aminas alifáticas ( $MA 0.25 \text{ mg L}^{-1}$  y EA, PA, BA y PenA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradiente 2). 1: amonio, 2: metilamina, 3: etilamina, 4: propilamina, 5: butilamina y 6: pentilamina. aa1: valina, aa2: triptofano, aa3: fenilalanina, aa4: isoleucina, aa5: leucina y aa6: lisina.



**Figura 44.** Cromatogramas obtenidos con detector de fluorescencia para A) aminoácidos ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) y aminas alifáticas (MA  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  y EA, PA, BA y PenA  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradiente 3) y B) amonio ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) y aminas alifáticas (MA  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$  y EA, PA, BA y PenA  $0.16 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradiente 4). 1: amonio, 2: metilamina, 3: etilamina, 4: propilamina, 5: butilamina y 6: pentilamina.

La **Tabla 45** muestra los límites de detección experimentales obtenidos para las aminas alifáticas y amonio con detección UV-vis (*Gradiente 2*) y fluorescente (*Gradiente 4*). Con los *Gradientes 1* y *3* se obtuvieron los mismos valores. La detección fluorescente permitió alcanzar límites de detección menores, pero la limitación del sistema (volumen de la celda de flujo) hizo que se obtuviera mejor resolución en la detección espectrofotométrica.

**Tabla 45.** Figuras de merito analíticas para los derivados de OPA con UV-vis (Gradiente 2) y con detección fluorescente (Gradiente 4).

	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ ( $\text{mgL}^{-1}$ )	n	$S_{x/y}$	$R^2$	LD ( $\mu\text{gL}^{-1}$ )
<b>UV-vis</b>						
MA	4±3	488±16	7	48	0.9943	8
EA	7±3	212±8	7	51	0.9823	10
PA	7±2	204±7	7	36	0.9956	10
BA	1±8	195±2	7	15	0.9920	50
PenA	13±5	161±2	7	9	0.9997	50
$\text{NH}_4^+$	-11±15	135±12	6	18	0.9920	50
<b>Fluorescente</b>						
MA	-18±7	3238±30	6	12	0.9996	0.40
EA	38±30	1395±63	6	51	0.9919	0.50
PA	82±53	1653±60	6	53	0.9820	0.50
BA	-21±15	1413±32	6	27	0.9980	1.25
PenA	13±20	676±43	6	20	0.9838	2.50
$\text{NH}_4^+$	42±27	420±19	6	36	0.9957	10

Se midieron otros compuestos amino como la urea, un mezcla de simazina, atrazina, propiazina, ametrina, promatrine y terbutrine ( $0.70 \text{ mg L}^{-1}$  cada una) y acetamida. Además, se analizó una disolución de ácidos húmicos. No se obtuvo ningún pico para estos compuestos.

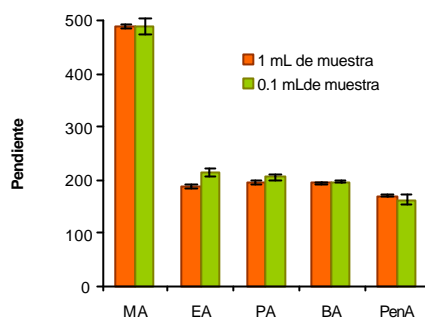
#### Cuantificación de amonio y aminas alifáticas.

Se calcularon las curvas de calibrado área de pico vs concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y otros parámetros analíticos empleando la detección UV-vis y el Gradiente 2 para 1 y 0.1 mL de muestra. La **Figura 45** muestra la pendiente de las curvas de calibrados lineales para ambos procedimientos, la sensibilidad fue similar en ambos casos. Tampoco se encontraron diferencias en los otros parámetros analíticos. Por tanto, los volúmenes de muestra, OPA/NAC y tampón empleados para el resto de experiencias fueron 0.1, 0.01 y 0.01 mL, respectivamente.

La **Tabla 45** muestra las curvas de calibrado obtenidas. La linealidad fue buena para las aminas alifáticas desde 0.5 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . Los límites de detección se determinaron experimentalmente y fueron desde 8 a  $50 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Las figuras de merito para las aminas obtenidas con detección fluorescente (*Gradiente 4*) también se muestran en la **Tabla 45**. Se obtuvo buena linealidad para la metilamina desde 0.05 y  $1 \text{ mg L}^{-1}$  y para etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina desde 0.1 a  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . Los límites de detección estuvieron entre 0.4 a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Las curvas de calibrado lineales para el amonio se obtuvieron desde 0.5 a  $2 \text{ mg L}^{-1}$  con detección UV-vis y detección fluorescente. Los parámetros analíticos se muestran en la **Tabla 45**.



**Figura 45.** Pendientes ( $\text{mg L}^{-1}$ ) obtenidas con UV-vis para el intervalo lineal con 1 y 0.1 mL de muestra.

Se calcularon los coeficientes de variación para las áreas de pico y para los tiempos de retención. Se ensayaron dos niveles de concentración para ambos sistemas de detección. La **Tabla 46** muestra los valores expresados como %CV. Los valores interdía e intradía obtenidos con UV-vis fueron satisfactorios a los niveles de concentración de los analitos. Lo mismo se concluyó a partir de los valores de %CV con detección fluorescente.

**Tabla 46.** Datos reproducibilidad (%CV) para CL capilar.

			%CV Intradía (n=3)		%CV Interdía (n=6)		
			t <sub>R</sub>	Area	t <sub>R</sub>	Area	
	[amina]	(mgL <sup>-1</sup> )					
<b>UV-vis</b>	MA	0.25	2.5	6.0	6.0	10.4	
		2.5	0.2	6.1	6.0	7.1	
	EA	0.5	2.2	6.6	0.7	6.1	
		5	6.3	5.2	6.7	8.4	
	PA	0.5	1.1	8.2	6.8	12.0	
		5	1.1	6.1	5.3	8.1	
	BA	0.5	1.1	8.4	7.7	7.7	
		5	0.2	3.6	3.4	8.5	
	PenA	0.5	0.7	3.4	9.0	3.8	
		5	0.09	1.5	2.6	12.0	
	<b>Fluorescencia</b>	MA	0.05	1.8	13	7.6	16.1
			0.5	4.4	1.2	5.0	15.0
EA		0.1	1.8	12.4	7.2	20.0	
		1	1.9	1.0	4.6	16.3	
PA		0.1	1.2	8.8	5.6	10.0	
		1	1.0	1.3	4.9	19.4	
BA		0.1	0.4	5.6	2.0	8.6	
		1	0.3	2.9	4.8	8.7	
PenA		0.1	1.1	5.0	0.4	10.5	
		1	0.1	7.9	1.4	20.4	



**Comparación con la CL convencional.**

Se comparó la sensibilidad del procedimiento con la obtenida en el apartado anterior (*apartado 2.2.2*) en el que se propone un método de screening de aminas con CLAR y detección fluorescente [108]. La cromatografía líquida capilar proporciona límites de detección menores que CLAR convencional (**Tabla 47**). Los límites de detección fueron mejores que los obtenidos con la derivatización en línea asistida en soporte sólido, la cual incluye una etapa de preconcentración. Además, la cromatografía líquida capilar fue también ventajosa debido al pequeño volumen de muestra empleado. Sin embargo, el sistema requiere más tiempo de análisis porque el sistema necesita más tiempo para ser reequilibrado.

**Tabla 47.** Comparación de las características instrumentales y límites de detección obtenidos con CLAR convencional con y sin preconcentración y con CL capilar con detección fluorescente.

	CLAR convencional		CL Capilar	
	Sin preconcentración	Con preconcentración		
<b>Flujo (<math>\mu\text{L min}^{-1}</math>)</b>	1000	1000	15	
<b>Fase móvil</b>	Tampón borato:MeOH	OPA-NAC/ tampón Borato: MeOH	Agua: MeOH	
<b>Volumen inyección (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	30	150	3	
<b>Columna secundaria</b>	-	Hypersyl ODS- C <sub>18</sub> (30 $\mu\text{m}$ ) (20x2.1 i.d) mm	-	
<b>Columna primaria</b>	LiChrosphere 100RP C <sub>18</sub> (5 $\mu\text{m}$ ) (125x4.1 i.d)mm	LiChrosphere 100RP C <sub>18</sub> (5 $\mu\text{m}$ ) (125x4.1 i.d)mm	Zorbax SB C <sub>18</sub> (5 $\mu\text{m}$ ) (150x0.5 i.d) mm	
<b>LD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>				
	MA	310	2	0.4
	EA	220	15	0.5
	PA	840	20	0.5
	BA	700	30	1.25
	PenA	500	40	2.5

La reproducibilidad de la cromatografía capilar también se comparó. Se compararon los coeficientes de variación (CV) del tiempo de retención con los obtenidos con CLAR convencional (**Tabla 48**). En general, los %CV para la cromatografía convencional fueron menores que para la cromatografía capilar, pero ambos valores variaron desde 0.2 a 4 % para CLAR y entre 0.1 y 7.6 % para la cromatografía capilar.

**Tabla 48.** Datos de reproducibilidad (%CV) para CLAR convencional.

	[Amina] (mg L <sup>-1</sup> )	%CV	
		tiempo de retención	
		Intradía (n=3)	Interdía (n=6)
<i>Metilamina</i>	2	0.8	0.9
<i>Etilamina</i>	5	0.4	0.5
<i>Propilamina</i>	5	0.2	3
<i>Butilamina</i>	5	0.6	2
<i>Pentilamina</i>	5	3	4

### Análisis de muestras reales.

El procedimiento se aplicó a diez muestras reales de agua. La exactitud del método se validó fortificando las muestras S1, S2, S3 y S4 con cantidades conocidas de las cinco aminas. Las concentraciones halladas con detección UV-vis y las recuperaciones se muestran en la **Tabla 49**. Los valores obtenidos fueron satisfactorios, teniendo en cuenta los niveles de concentración. El resto de las muestras se fortificaron solo con el analito o analitos que contenían. En el caso de la muestra S5 y S6, que contenían amonio, las recuperaciones obtenidas con detección fluorescente fueron 104±4 y 99±3, respectivamente. Por tanto, no se observó efecto matriz para ningún analito en ninguna de las muestras.

Se encontró amonio en las muestras de agua natural S5 y S6. Las concentraciones se muestran en la **Tabla 50**. Para las dos muestras se emplearon ambos sistemas de detección debido al elevado contenido de amonio (*Gradiente 2 y 4*). Adicionalmente, se aplicó el *Gradiente 1* a la muestra S6 para asegurar que la señal era completamente debido a al amonio y no a algún aminoácido. No se encontró ningún aminoácido en la muestra.

El análisis de screening de la muestra S1 mostró que la metilamina estaba presente a concentraciones próximas al límite de detección. La aplicación del *Gradiente 2* y *Gradiente 4* a la muestra S8 (agua residual), indicó que los aminoácidos podrían estar presentes en esa muestra. De modo que se aplicaron los *Gradientes 1 y 3* a esa muestra. El sistema de detección UV-vis mostró que existían algunos aminoácidos, pero a niveles de concentración bajos. Se halló amonio, metilamina, etilamina y pentilamina con ambos sistemas de detección (ver **Tabla 50**). La **Figura 46A** muestra el cromatograma obtenido para la muestra de agua residual con detección fluorescente con los *Gradientes 3 y 4*. El *Gradiente 4* demostró la presencia de etilamina, propilamina y pentilamina. No fue posible concluir si el amonio o la metilamina estaban presentes en la muestra debido a la coelución de varios picos en esa región. El *Gradiente 3* mostró que la metilamina estaba en la muestra. El pico a tiempo de retención 9 min fue del amonio y no de los

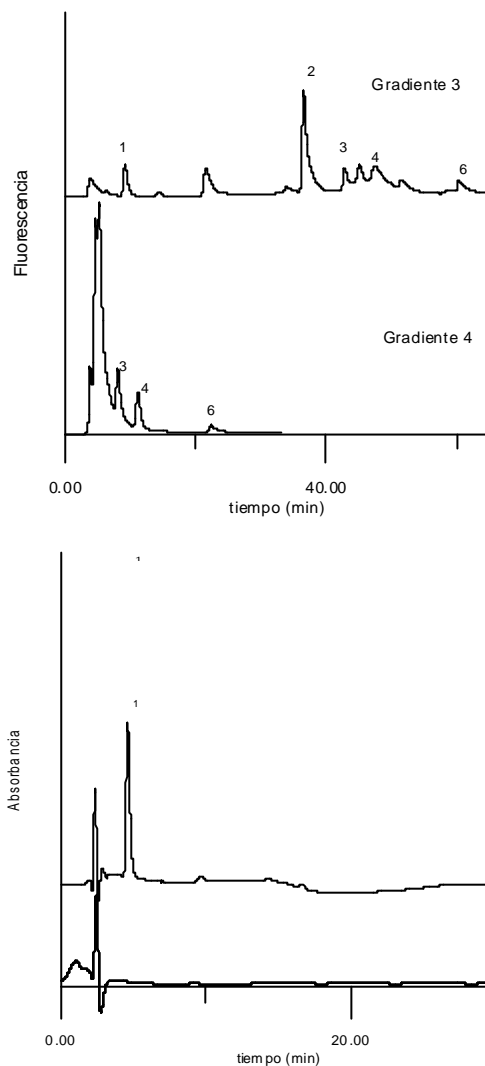
aminoácidos. Las recuperaciones obtenidas para todos los analitos fueron de alrededor del 100%.

**Tabla 49.** Concentración hallada ( $\text{mg L}^{-1}$ ) y recuperación para muestras fortificadas con  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  de MA, PA, BA, PenA.

	Concentración ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	MA	EA	PA	BA	PenA
S1	0.48±0.01	0.54±0.03	0.55±0.04	0.57±0.02	0.54±0.1
S2	0.49±0.02	0.49±0.020	0.547±0.003	0.51±0.03	0.51±0.03
S3	0.52±0.02	0.52±0.04	0.56±0.07	0.53±0.02	0.52±0.05
S4	0.52±0.02	0.53±0.03	0.58±0.05	0.52±0.03	0.50±0.02
	Recuperación (%)				
	MA	EA	PA	BA	PenA
S1	97±2	109±7	111±8	111±7	109±2
S2	98±4	99±6	105±1	102±7	103±7
S3	104±3	103±8	103±1	106±4	104±9
S4	103±4	105±6	110±2	104±5	100±4

**Tabla 50.** Concentración hallada para muestras reales de agua ( $\text{mg L}^{-1}$ )

	Detección UV-vis	Detección fluorescente
	Analito/s encontrados ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Analito/s encontrados ( $\text{mg L}^{-1}$ )
S1	-	MA, LD
S5	( $\text{NH}_4^+$ )=1.47±0.03	( $\text{NH}_4^+$ )=1.43±0.04
S6	( $\text{NH}_4^+$ )=9.8±0.2	( $\text{NH}_4^+$ )=9.4±0.5
S8	( $\text{NH}_4^+$ )=0.80±0.07 (MA)=0.60±0.02 (EA)=0.26±0.03 (PA)=0.27±0.02 (PenA)=0.26±0.03	( $\text{NH}_4^+$ )=0.82±0.08 (MA)=0.57±0.04 (EA)=0.28±0.03 (PA)=0.22±0.07 (PenA)=0.239±0.008
S10	( $\text{NH}_4^+$ )=1.00±0.09	( $\text{NH}_4^+$ )=0.92±0.08



**Figura 46.** A) Cromatograma correspondiente a la muestra de agua residual obtenido con el Gradiente 3 y 4 (detector fluorescencia). 1: amonio, 2: metilamina, 3:etilamina, 4: propilamina y 5: pentilamina. B) Cromatograma correspondiente a la muestra de agua de lluvia con el Gradiente 2 (detector UV-vis). 1: amonio.

El procedimiento fue útil para micro-muestras, como es el agua de lluvia depositada en la superficie de hojas (S10, 0.5 mL). Para el screening de esta muestra se emplearon los dos sistemas de detección. La **Figura 46B** muestra el cromatograma obtenido para el blanco y la muestra con detección Uv-vis, como puede verse en esta muestra se halló amonio (ver **Tabla 50**).

En las muestras S2, S3, S4, S7 y S10 no se encontraron amonio, aminos y aminoácidos.

### **Conclusiones.**

Este trabajo ha evaluado la capacidad de la novedosa cromatografía líquida capilar para el screening de compuestos amino, tales como los aminoácidos, aminos alifáticos de cadena corta y amonio. La principal ventaja fue la identificación y cuantificación de los analitos a bajas concentraciones sin la necesidad de incluir una etapa de preconcentración. Además, el volumen de muestra se redujo hasta 100  $\mu$ L. De modo que el procedimiento fue también adecuado para screening de compuestos amino en muestras reales de agua de reducido volumen.

Se han propuesto diversos modos de elución en gradiente en función de los analitos y del sistema de detección. El *Gradiente 1* con detección UV-vis fue útil para el screening de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, valina, triptofano, fenilalanina, isoleucina, leucina y lisina. El *Gradiente 2* se empleó para el screening de aminos y amonio en ausencia de aminoácidos. Lo mismo se realizó con detección fluorescente. El *Gradiente 3* para el análisis de screening de aminos en presencia de aminoácidos y el *Gradiente 4* para aminos y amonio.

Los resultados de precisión obtenidos con la cromatografía líquida capilar fueron comparados con los obtenidos por CLAR convencional. No se encontraron diferencias significativas.

Se han analizado diferentes tipos de muestras de agua (natural, residual y de lluvia) con ambos sistemas de detección. La metodología ha probado ser una herramienta prometedora para el screening y cuantificación de compuestos amino. Esta nueva técnica analítica podría ofrecer un importante avance para el análisis de screening en muestras reales de agua a niveles de concentración bajos y con pequeños volúmenes de muestra.

#### **2.3.4. SOPORTES DETECTORES: APLICACIÓN A AMINAS ALIFÁTICAS EN AGUAS RESIDUALES.**

Empezando desde la introducción de los ensayos con tiras de reactivos [139,140], muchos estudios han sido propuestos para su extensión. Uno de ellos es la extracción en fase sólida (EFS) cuando la situación requiere del uso de una etapa de preconcentración para llegar a los límites de detección requeridos.

En la forma mas usada de la EFS, una muestra acuosa se trata, en primer lugar, con el reactivo, el complejo resultante se captura en el soporte sólido y se mide por espectroscopía de reflectancia difusa (DRS) [141-143]. El uso de esferas integradoras (medidas de reflectancia hemisférica) no solo simplifica el método para extender la capacidad de medida de un espectrofotómetro UV-vis a medidas de reflectancia sino que mejora la precisión y las características cuantitativas de la espectroscopía de reflectancia [32].

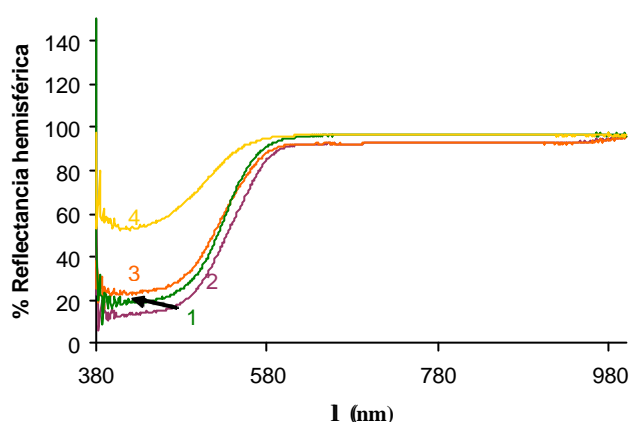
J.S. Fritz *et al.* introdujo la extracción en fase sólida colorimétrica (C-SPE). En esta técnica se impregna directamente un disco con el reactivo colorimétrico. El complejo coloreado se forma cuando la muestra se hace pasar a través del disco, eliminando la manipulación de la muestra previo a la extracción [29,30]. Hoy en día, la importancia de disponer de herramientas de fácil manejo y adecuadas para el análisis *in situ* esta creciendo en la Química Analítica.

En este trabajo se estudia el acoplamiento entre la derivatización asistida en soporte sólido y la reflectancia difusa. Se evaluaron varios agentes derivatizantes colorimétricos para compuestos que contuvieran grupos amino primarios. Entre ellos ensayamos: DBS, ninhidrina y NQS. Se estudia la aplicabilidad de este acoplamiento para el análisis de aminas en aguas residuales debido a la dificultad de la matriz. Se evalúa la utilidad de discos y cartuchos de extracción en fase sólida C<sub>18</sub>. La parte experimental de este trabajo se puede consultar en el *Apéndice 9*.

### Elección del soporte y optimización de las condiciones experimentales.

#### a) Cloruro de dabsilo (DBS).

Las diferencias de reflectancia obtenidas, tanto para medidas a  $0^\circ$  como a  $8^\circ$ , entre el blanco y una disolución de metilamina de  $1 \text{ mg L}^{-1}$  fueron mayores cuando se emplearon discos SDB-XC que con discos  $C_{18}$ . La **Figura 47** muestra el % de reflectancia medida a  $8^\circ$  para discos de extracción  $C_{18}$  y SDB-XC. Peores resultados se obtuvieron en el caso de cartuchos de extracción en fase sólida. De modo que, los discos SDB-XC fueron elegidos como óptimos y empleados para el estudio de la concentración de reactivo (DBS).

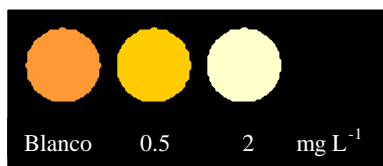


**Figura 47.** Comparación entre los registros de reflectancia difusa a  $8^\circ$  para 10 mL de disolución de metilamina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) con DBS en función del disco de extracción. 1 y 4: blanco y amina con discos SDB-XC y 2 y 3: blanco y amina con disco  $C_{18}$ .

Cuando la concentración de DBS fue  $0.4 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  apareció un precipitado en la superficie del disco después de calentar, lo que hizo que esta concentración no fuera adecuada.  $0.2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  fue la concentración óptima,  $0.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  proporcionó menor sensibilidad. Los tiempos de calentamiento y la temperatura también fueron ensayados teniendo en cuenta los datos bibliográficos [144,145]. 10 min y  $100^\circ \text{ C}$  respectivamente fueron elegidos como valores óptimos. En un intento de mejorar la sensibilidad, se procesaron 20 mL de disolución patrón de metilamina pero los analitos auto-eluyeron, de modo que 10 mL de muestra de agua o disolución de amina se eligió como volumen de muestra.

La eficiencia de la extracción en los discos SDB-XC fue independiente de la concentración de metilamina. Las recuperaciones obtenidas fueron  $66 \pm 2$  (s, n=3) y  $61.2 \pm 0.7$  (s, n= 3) para 0.5 y  $2 \text{ mg L}^{-1}$  de amina, respectivamente. El contenido de metilamina fue analizado en la disolución resultante de hacer pasar la muestra inicial a través del disco y se midió empleando el reactivo OPA/NAC con el procedimiento mencionado en el apartado 2.3.1.

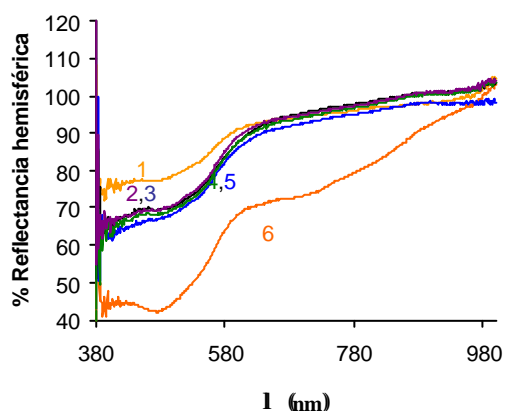
El color naranja del reactivo sufrió una degradación cuando se formó el derivado amina-DBS y esta degradación fue función de la concentración de amina. La **Figura 48** muestra la coloración de los discos SDB-XC en función de la concentración. En las condiciones óptimas se midieron aminas primarias tales como, metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina y aminas secundarias como la dimetilamina y la dietilamina. La metilamina presentó la mayor señal, mientras que la señal del resto de aminas fue similar a la del blanco, sobretodo midiendo la reflectancia difusa a 8°.



**Figura 48.** Asignación de concentraciones para el ensayo visual.

*b) Ninhidrina.*

Como en el caso del cloruro de dabsilo, se estudiaron los discos SDB-XC y C<sub>18</sub>, previamente acondicionados con 0.5 mL MeOH y 0.5 mL de agua. El tiempo de calentamiento para formar el derivado coloreado fue de 15 min, ya que es el tiempo más empleado en la bibliografía [145,146]. Si la concentración de ninhidrina era  $25 \cdot 10^{-3}$  M, una concentración de metilamina de  $5 \text{ mg L}^{-1}$  podía ser medida con los discos C<sub>18</sub>, y había que aumentar hasta  $100 \text{ mg L}^{-1}$  para medirla con discos SDB-XC. Además con discos C<sub>18</sub> el derivado fue marrón y con discos SDB fue morado. Los discos C<sub>18</sub> se prefirieron con el fin de aumentar la sensibilidad. La eficiencia en la extracción estimada del mismo modo que en el caso anterior, fue independiente de la concentración. Los valores de recuperación estuvieron entre  $98.4 \pm 0.4$  (s, n=3) y  $99.76 \pm 0.06$  (s, n=3). Los espectros de reflectancia para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) se muestran en la **Figura 49**. El volumen de muestra procesado fue 1 mL.



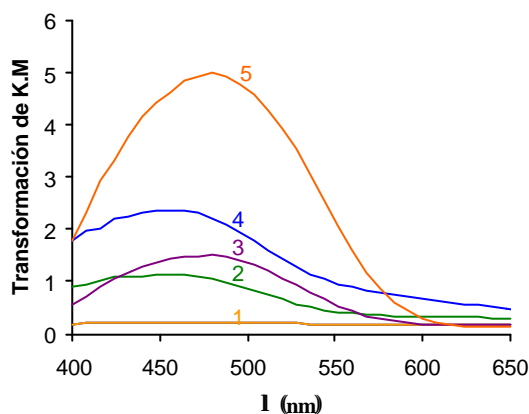
**Figura 49.** Espectros de reflectancia difusa a 8° con ninhidrina ( $25 \cdot 10^{-3}$  M) en discos C<sub>18</sub> para 1: blanco, 2: pentilamina, 3: propilamina, 4: butilamina, 5 etilamina y 6: metilamina.



A pesar de que con cartuchos de extracción EFS se obtuvo la misma eficiencia en la extracción, los resultados obtenidos fueron peores. Se ensayaron niveles de concentración baja, media y alta para la ninhidrina. Las concentraciones fueron  $1 \cdot 10^{-3}$ ,  $25 \cdot 10^{-3}$  y  $50 \cdot 10^{-3}$  M. Las mayores diferencias de color se obtuvieron con una concentración de ninhidrina de  $25 \cdot 10^{-3}$  M.

c) 1,2-naftoquinona-4-sulfonato (NQS).

Empleamos las condiciones previamente establecidas para otras aminas [115]. Se obtuvieron resultados mejorados cuando se midió el adsorbente  $C_{18}$ , de un cartucho de EFS comercial. Los discos de extracción proporcionaron peores resultados. La **Figura 50** muestra los espectros obtenidos aplicando la transformación de Kubelka-Munk (K-M) en espectroscopía de reflectancia  $F(R)=(1-R)^2/2R$  a los valores de reflectancia del blanco y varios de estándares de metilamina y dimetilamina (volumen de muestra procesado fue 2 mL). Las medidas se hicieron a  $8^\circ$  ya que se obtuvieron mejores resultados. Para aminas secundarias se obtuvieron derivados de color naranja mientras que para aminas primarias fueron de color rojo oscuro.



**Figura 50.** Espectro obtenido con la transformación de K-M para metilamina y dimetilamina derivatizadas con NQS. 1: blanco, 2 y 4: metilamina de 10 y 20  $\text{mg L}^{-1}$ , 3 y 5: dimetilamina 20 y 75  $\text{mg L}^{-1}$ .

### Parámetros analíticos.

Las medidas de reflectancia a  $8^\circ$  para metilamina con DBS fueron consideradas como óptimas ya que las ecuaciones de calibrado a  $8^\circ$  fueron mejores que a  $0^\circ$  ( $a=33$ ,  $s_a=6$ ,  $b=40$ ,  $s_b=7$ ,  $R^2=0.932$ ), Linealidad ( $t=5.215$ ,  $a=0.035$ ), ( $n=4$ ,  $S_{y/x}/b=0.16$ ) como muestra la **Tabla 51**. Además la señal analítica fue selectiva para la metilamina, a los niveles de concentración ensayados. La recuperación de la señal de metilamina para una mezcla que contenía metilamina ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ), etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina, dimetilamina, dietilamina ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) fue  $(100.1 \pm 0.7) \%$ .

**Tabla 51.** Ecuaciones de calibrado a 8° para metilamina con DBS (procedimiento I), para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina con ninhidrina (procedimiento II) y para metilamina y dimetilamina con NQS (procedimiento III).

		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ (mg L <sup>-1</sup> )	Linealidad (t,a)	R <sup>2</sup>	n, S <sub>yx</sub> /b
<b>Reflectancia Directa</b>						
I	MA	21±1	34±2	19.11, 0.000	0.992	5, 0.05
II	MA	78±3	-34±0.5	6.77, 0.002	0.920	6, 1.5
	EA	86.1±0.7	-1.8±0.1	15.73, 0.000	0.984	6, 0.6
	PA	86±1	-1.8±0.1	12.56, 0.001	0.984	5, 0.7
	BA	85.2±1.1	-1.7±0.2	18.89, 0.002	0.975	5, 0.8
	PenA	84.2±1.5	-1.6±0.2	7.625, 0.005	0.951	5, 1.1
III	MA	48±5	-1.9±0.8	4.95, 0.038	0.925	4, 2.9
	DMA	38±±8	-0.4±0.1	2.69, 0.075	0.706	5, 27
<b>Transformación K-M</b>						
I	MA	1.4±0.2	-1.3±0.3	4.28, 0.050	0.902	5, 0.19
II	MA	(-8±15)· 10 <sup>-2</sup>	(3.7±0.8)· 10 <sup>-2</sup>	4.42, 0.012	0.830	6, 2.3
	EA	(7±5)310 <sup>-3</sup>	(6.3±0.8)· 10 <sup>-3</sup>	7.59, 0.002	0.935	6, 1.3
	PA	(5±7)· 10 <sup>-3</sup>	(6±01)· 10 <sup>-3</sup>	6.37, 0.008	0.931	5, 1.3
	BA	(9±4)· 10 <sup>-3</sup>	(6.4±0.6)· 10 <sup>-3</sup>	7.62, 0.005	0.972	5, 0.8
	PenA	(1.3±0.1)· 10 <sup>-2</sup>	(5.5±0.2)· 10 <sup>-3</sup>	21.93, 0.000	0.994	5, 0.4
III	MA	0.1±0.2	0.11±0.01			
	DMA	0.3±0.1	(5.5±0.2)· 10 <sup>-2</sup>	19.26, 0.000	0.992	5, 3.6

La **Tabla 51** muestra las ecuaciones de calibración empleando como señales analíticas la reflectancia difusa y la función de Kubelka-Munk a 450 nm. Si el reactivo derivatizante es DBS, se obtiene mejor linealidad empleando  $R$  en lugar de los valores de  $K-M$  tal y como muestra un test  $t$  (**Tabla 51**). Por lo tanto, la desviación estándar del procedimiento fue peor con los valores de  $K-M$  que con los valores de  $R$ . Consecuentemente, se alcanzaron mejores límites de detección con  $R$  como señal analítica. El valor del límite de detección para la metilamina fue de 0.15 mg L<sup>-1</sup>. Visualmente, este valor puede ser distinguido del blanco. La precisión (expresada como %CV) para 1 mg L<sup>-1</sup> de metilamina estuvo entre 2 y 7% (n=3) empleando las señales de  $R$  y  $K-M$ , respectivamente.

Empleando ninhidrina como reactivo, la mínima concentración que hizo posible el análisis cualitativo, por inspección visual del derivado marrón formado fue 5 mg L<sup>-1</sup> para cada una de las aminas. Como se deriva de la **Tabla 51**, concentraciones similares fueron calculadas empleando el valor aproximado del límite de detección  $3 s_{yx}/b$ . Teniendo en cuenta la desviación estándar del blanco de reactivo ( $s_{bl}$ ), medida en tres distintos, los límites de detección calculados como  $3s_{bl}/b$  fueron 3, 5, 5, 5.5 y 6 mg L<sup>-1</sup> para metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina, respectivamente. Para

la metilamina, se midió la reflectancia difusa a  $8^\circ$  y a  $0^\circ$ . Solo las medidas a  $8^\circ$  y a 480 nm dieron buena linealidad para la metilamina comparado con las obtenidas a  $0^\circ$  ( $a=81$ ,  $s_a=5$ ,  $b=-2.9$ ,  $s_b=0.9$ ,  $R^2=0.849$ , Linealidad ( $t=3.362$ ,  $\alpha=0.078$ ),  $n=4$ ,  $S_{yx}/b=2.1$ ). Las curvas de calibrado para etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina a  $8^\circ$  se muestran en la **Tabla 51**. Tanto los valores  $R$  como  $K-M$  proporcionaron ecuaciones de calibrado con calidad similar. La precisión obtenida para  $5 \text{ mg L}^{-1}$  de amina estuvo entre 1.7 y 2.3 % y 8.5 y 15 % para  $R$  y  $K-M$  respectivamente. Para  $10 \text{ mg L}^{-1}$  los coeficientes de variación fueron entre 2.8 y 14 % para medidas de  $R$  y entre 6.8 y 7.5 % para valores de  $K-M$ .

El valor medio de la pendiente para las aminas considerando la concentración expresada como  $-\text{NH}_2\text{-N}$   $\text{mg L}^{-1}$  y  $R$  como señal analítica fue  $7.9 \text{ mg L}^{-1}$  con una desviación estándar de 1.5. El valor medio de la ordenada fue 83.9 y su desviación estándar 3.3. Estos valores pueden ser empleados para hacer una estimación total de grupos amino.

Los parámetros analíticos para metilamina y dimetilamina empleando señal de reflectancia  $R$  o los valores de la transformación de  $K-M$  a 480 y 460 nm con NQS como agente derivatizante se dan en la **Tabla 51**. La linealidad de la ecuación de calibrado obtenida con la transformación de Kubelka-Munk fue mejor que la obtenida con valores de  $R$ . El intervalo lineal para la metilamina estuvo por encima de  $20 \text{ mg L}^{-1}$  para metilamina y de  $75 \text{ mg L}^{-1}$  de dimetilamina. Los límites de detección alcanzados con NQS, alrededor de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , fueron peores que los obtenidos con los otros reactivo, DBS y ninhidrina. La precisión fue del 10 % para señales de  $K-M$ .

### Utilidad.

El procedimiento con DBS se empleó para estimar la concentración de metilamina en un agua residual. Esta muestra contenía además pentilamina, hecho que demostró un trabajo previo basado en la CL. La **Tabla 52** muestra la concentración encontrada con el soporte sólido de dabsilo y la medida de reflectancia difusa. Este valor estuvo en concordancia con el contenido de metilamina determinado a partir de la dansilación y CL. Este procedimiento proporciona selectividad para la metilamina, sin necesidad de emplear un sistema cromatográfico. Podría ser empleado como un procedimiento de screening de muestras con el fin de reducir los costes, el tiempo de análisis en el laboratorio medioambiental o para determinaciones *in situ*. Hecho importante, sobretodo cuando un gran número de muestras tienen que ser procesadas. En nuestro conocimiento, en la bibliografía no existe un método con estas características.

El contenido total de aminas primarias fue estimado empleando el procedimiento con ninhidrina. El valor obtenido expresado como  $-\text{NH}_2\text{-N}$   $\text{mg L}^{-1}$  (ver **Tabla 52**), es consistente con el obtenido por cromatografía líquida y similar al valor obtenido en el apartado 2.3.1 para la misma muestra de agua y analizada por fluorimetría con el reactivo OPA (**Tabla 52**). Este procedimiento es una alternativa al método fluorimétrico con OPA/NAC como reactivo propuesto en el apartado 2.3.1 [147].

**Tabla 52.** Concentración hallada de metilamina con DBS o contenido total de aminas primarias con ninhidrina en una muestra de agua residual.

Procedimiento	Metilamina encontrada media $\pm$ s (mg L <sup>-1</sup> )	N-NH <sub>2</sub> encontrado media $\pm$ s (mg L <sup>-1</sup> )
CLAR- detección UV-vis	10.1 $\pm$ 0.5	-
Soporte detector de dabsilo/ Reflectancia	10.2 $\pm$ 0.5	-
Ensayo fluorimétrico con OPA/NAC	-	5.8 $\pm$ 0.3
Soporte detector de ninhidrina/ Reflectancia	-	6.4 $\pm$ 0.2

### Conclusiones.

Este trabajo ha mostrado la posibilidad de acoplar la derivatización asistida en soporte sólido propuesta por este grupo de investigación a principios de 1996 a la técnica de espectroscopía de reflectancia difusa. Se eligió el análisis de aminas en muestras de agua como ejemplo.

Se estudió la utilidad de discos de extracción, cartuchos G<sub>8</sub> y tres reactivos, cloruro de dabsilo, ninhidrina y NQS. En todos los casos, el acoplamiento fue posible escogiendo el mejor soporte y las mejores condiciones experimentales. Se estudió el aumento y disminución de la señal en función de la concentración. Se evaluaron las medidas de R (reflectancia directa) y los valores de K-M (transformación de Kubelka-Munk).

Los reactivos condicionaron los límites de detección y el intervalo lineal de concentraciones. El DBS proporciona los mejores límites de detección y principalmente fue selectivo para la metilamina. Este soporte detector permite trabajar sin CL para este reactivo derivatizante y para la determinación de metilamina. La ninhidrina puede ser empleada para estimar los grupos totales amino primarios. El NQS proporcionó peores límites de detección aunque se podrían mejorar procesando mayores volúmenes de agua que los empleados en este trabajo evitando la extracción líquido-líquido necesaria para separar los derivados del NQS.

Los ensayos propuestos constituyen una forma rápida, simple y de bajo coste para detectar y determinar sustancias sin personal entrenado o sin tratamientos de muestras tediosos. También, estos ensayos se mantienen estables, al menos seis meses de modo que los soportes detectores pueden ser archivados durante este periodo de tiempo.

Las características subrayadas hacen a estos procedimientos especialmente adecuados para el screening de muestras y análisis de control o en laboratorios ambientales o para determinaciones *in situ*.

#### **2.4. CALIDAD DEL AIRE Y RIESGOS LABORALES.**

En esta sección se estudiaron tres apartados:

- Evaluación de los cartuchos de adsorción C<sub>18</sub> para el muestreo y derivatización de aminas primarias.
- Determinación de dimetilamina en aire mediante muestreo y derivatización en soporte sólido y análisis espectrofotométrico.
- Aplicación de la reacción de Berthelot a la determinación de amoníaco en aire mediante extracción en fase sólida acoplada a espectroscopía de reflectancia difusa.

#### **2.4.1. EVALUACIÓN DE LOS CARTUCHOS DE ADSORCIÓN C<sub>18</sub> PARA EL MUESTREO Y DERIVATIZACIÓN DE AMINAS PRIMARIAS.**

Hoy en día, las aminas alifáticas primarias se encuentran presentes en la atmósfera. Sus aplicaciones industriales y su uso como intermediarios químicos han llevado a su presencia en agua, aire, etc. De modo que la salud humana está expuesta a estos compuestos tanto por ingestión como por inhalación.

Con respecto a la muestra, ha habido una creciente demanda de métodos de muestreo de aire y de métodos de análisis. Se requiere de métodos rápidos, simples, de bajo coste, sensibles y con capacidad de muestrear a tiempo real para muchos contaminantes de aire, principalmente para estimar los de exposición a corto plazo (VLA-EC).

Los métodos que emplean sílica gel [148-151] como adsorbente son los más usuales. Muestreadores activos son por ejemplo, burbujeadores [152-154] de aire en disoluciones ácidas o básicas o los filtros [155]. El muestreo con líquidos tiene algunos inconvenientes sobretodo para su aplicación a muestreos personales, por eso se prefiere los muestreadores en seco. También se han empleado métodos de microextracción en fase sólida.

Este trabajo muestra la utilidad de cartuchos C<sub>18</sub> para el muestreo de aminas alifáticas primarias. El procedimiento propuesto emplea el OPA/NAC como agente derivatizante en soporte sólido y medida fluorimétrica de los derivados eluidos.

La extracción en fase sólida fue empleada para el muestreo de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y mezclas de ellas, para la preconcentración de los analitos y para el análisis en el laboratorio. La utilidad del procedimiento tanto para medidas puntuales como de rutina se determinó aplicándolo a muestras generadas en el laboratorio.

Se puede consultar el *Apéndice 10* para conocer los procedimientos operativos desarrollados.

### Optimización del muestreo en cartuchos C<sub>18</sub> para patrones de aire.

Los parámetros a optimizar fueron la longitud de la cámara de volatilización de la **Figura 16** (pag. 40) y la concentración de NaOH empleada para facilitar la volatilización de las aminas.

- Cámara de volatilización: 75 cm y [NaOH]= 1 M : %R= 27.10±0.14 % (n=3).
- Cámara de volatilización: 75 cm y [NaOH]= 2.5 M : %R= 31±2 % (n=3).
- Cámara de volatilización: 11.5 cm y [NaOH]= 1 M : %R= 99.5±5 % (n=3).

Donde %R, es la eficiencia del muestreo calculada por comparación de la fluorescencia medida para patrones de aire comparada con la de patrones de acuosos conteniendo cantidades equivalentes de analito y sujetos directamente a derivatización con OPA-NAC propuesto en el *apartado 2.3.1*. Las condiciones seleccionadas fueron:

- Cámara de volatilización: 11.5 cm.
- [NaOH]= 1M.
- Tiempo de muestro: 15 min.
- Temperatura ambiente: 25 °C.

### Respuestas para las disoluciones de patrones.

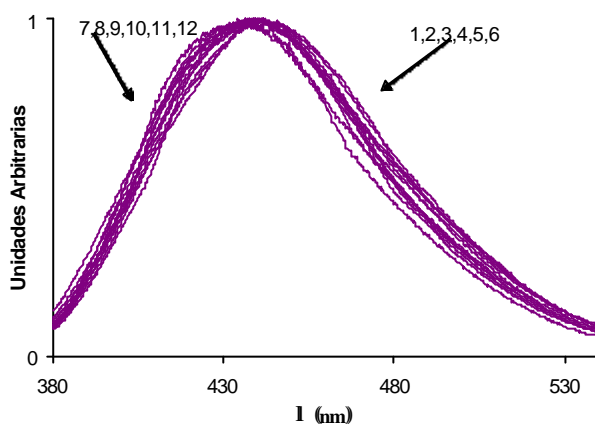
Las curvas de calibrado lineales fueron obtenidas en el intervalo de 0.5 y 2 µg por muestra para metilamina, etilamina, propilamina y butilamina y 1.5-5 µg por muestra de pentilamina. Estos intervalos de concentración fueron independientes del tiempo de muestreo (aire o agua). Los parámetros analíticos para aire y agua se muestran en **Tabla 53**.

**Tabla 53.** Comparación de algunos parámetros analíticos obtenidos para (1): patrones acuosos y (2): patrones de aire a temperatura ambiente (25 °C).

		a±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> (mg)	(b±s <sub>b</sub> ) 10 <sup>-7</sup> (M)	R <sup>2</sup>	S <sub>yx</sub> /b	LD (mg)
<b>Metilamina</b>	1	390±90	1570±70	9.7±0.4	0.993	0.09	
	2	190±70	1360±60	8.4±0.4	0.993	0.09	0.16
<b>Etilamina</b>	1	350±129	1150±100	9.7±0.4	0.970	0.17	
	2	190±80	900±60	8.4±0.4	0.980	0.14	0.24
<b>Propilamina</b>	1	200±100	1040±90	9.7±0.4	0.970	0.17	
	2	280±50	840±20	8.4±0.4	0.997	0.06	0.24
<b>Butilamina</b>	1	380±60	680±40	9.7±0.4	0.980	0.13	
	2	480±20	490±20	8.4±0.4	0.994	0.08	0.45
<b>Pentilamina</b>	1	630±50	480±50	9.7±0.4	0.960	0.5	
	2	560±70	430±20	8.4±0.4	0.990	0.3	0.52

Un test *t* mostró que las pendientes de las ecuaciones de calibrados para patrones de agua y de aire de metilamina y butilamina eran comparables a un nivel de confianza del 99%. El test *t* aplicado a las pendientes de etilamina, propilamina y pentilamina mostró que eran comparables a un nivel de confianza del 95%. Por tanto, se demostró que las curvas de calibrado de patrones acuosos podían ser empleadas para determinar metilamina, etilamina, propilamina, butilamina y pentilamina en muestras de aire. Cuando se emplea silica gel como adsorbente ocurre lo mismo [148].

La **Figura 51** muestra los espectros normalizados para las distintas aminas ensayadas en patrones de agua y aire. Los espectros de emisión fueron similares en ambos casos.



**Figura 51.** Espectros normalizados para aire 1, 2, 3,4, 5, 6: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y una mezcla de todas respectivamente y para agua 7, 8, 9, 10, 11 y 12: metilamina, etilamina, propilamina, butilamina, pentilamina y una mezcla de todas. La concentración 1  $\mu\text{g}$  por muestra excepto pentilamina 2  $\mu\text{g}$  por muestra.

### Estudio de las respuestas de mezclas de aminas.

Las mezclas ensayadas se muestran en la **Tabla 54**. El objetivo fue evaluar la aditividad de las señales. Como puede verse en la **Tabla 54**, las recuperaciones son independientes de la concentración y del número de aminas en la muestras tanto en la matriz de agua como de aire. Los valores medios fueron  $97 \pm 12$  ( $n=36$ ) y  $98 \pm 14$  ( $n=35$ ), respectivamente. Un test *t* para muestras independientes mostró que los valores medios eran estadísticamente similares a un nivel de confianza del 95% ( $t=0.524$ ,  $\alpha=0.602$ ) y que las varianzas fueron homogéneas (*test de Levene*,  $F=0.864$ ,  $\alpha=0.356$ ).

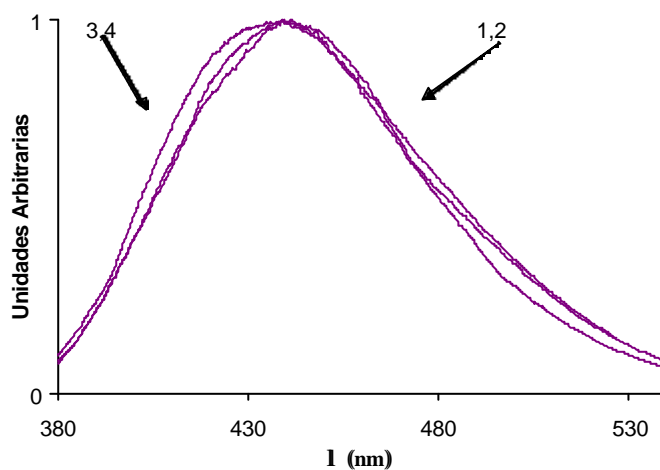
La **Figura 52** muestra los espectros normalizados para muestras de las cinco aminas en agua y en aire. Los espectros obtenidos fueron similares.



**Tabla 54.** Recuperaciones a temperatura ambiente para mezclas binarias, ternarias, cuaternarias y de orden cinco de amina.

		Amina (mg)			% Recuperación	
MA	EA	PA	BA	PenA	Mezclas agua	Mezclas aire
1	1				99; 96	107; 113
2	1				92; 93	103; 98
1	2				92; 87	93; 93
2		1			93; 90	89; 89
1		2			113; 112	104; 113
1			1		105; 103	103; 110
2			1		80; 81	109; 106
1			2		112; 118	114; 118
2				2	89; 85	85; 88
1				2	119; 122	131
2				5	87; 87	88; 89
1	1	1			90; 88	101; 98
		1	1	2	112; 107	107; 105
1		1		2	80; 80	80; 73
	1	1	1		94; 93	120; 115
1	1	1	1		111; 109	76; 78
	1	1	1	1	83; 82	83; 82
1	1	1	1	2	98; 96	90; 88

Este estudio indicó que el método propuesto puede ser empleado para estimar las aminas primarias totales de interés.



**Figura 52.** Espectros normalizados para una mezcla de metilamina, etilamina, propilamina, butilamina 1 mg por muestra y pentilamina 2 mg por muestra para 1,2: matrices de aire y 3,4 matrices de agua

### Análisis de muestras de aire.

Las muestras de aire se prepararon contaminando el aire en una cámara cerrada durante 24 h con metilamina; después el aire fue muestreado durante 15 min. La **Figura 17** (pag. 40) muestra un diagrama esquemático del montaje empleado. Se analizaron tres réplicas. El mismo procedimiento se llevó a cabo en tres días distintos para demostrar la reproducibilidad. Además se preparó una muestra de aire saturado en metilamina, la cual se analizó del mismo modo.

La concentración de cada muestra se calculó con la curva de calibrado obtenida con patrones de aire y con la obtenida con patrones de agua. La **Tabla 55** muestra la concentración de metilamina en las muestras. Los resultados obtenidos con las dos curvas fueron similares. De modo que el trabajo experimental queda reducido porque es posible aplicar los parámetros obtenidos de los patrones acuosos para determinar metilamina en aire. Cuando se analizó la muestra de aire saturada en metilamina, los resultados fueron similares.

**Tabla 55.** Cantidad de metilamina determinada en dos muestras de aire sintéticas a temperatura ambiente.

	Día	Metilamina (mg) <sup>a</sup>	
		Calibración en agua	Calibración en aire
<b>Muestra 1</b>	1	0.36 ±0.02	0.41±0.02
	2	0.38±0.03	0.44±0.04
	3	0.39±0.07	0.44±0.8
<b>Muestra 2</b>	-	1.14±0.06	1.31±0.06

Muestra 1: en función del tiempo de contaminación. Muestra 2: muestra saturada.

a: media ±s. (n=3)

### Conclusiones.

Este trabajo ha mostrado la posibilidad de determinar aminas alifáticas primarias empleando OPA/NAC como reactivo derivatizante y detección fluorimétrica. El uso de cartuchos de extracción en fase sólida C<sub>18</sub> es una alternativa rápida y simple para el muestreo de aire. Esta metodología permite el análisis cuantitativo de aminas volátiles para calcular los límites de exposición de corta duración (VLA-EC), que requieren de métodos de suficiente sensibilidad. Los métodos recomendados basados en el muestreo en silica gel no son suficientemente sensibles para establecer los límites VLA-EC, siendo los límites de detección de 0.02 mg por muestra [148].

Además, este estudio ha probado que el método no necesita de calibración en aire pudiendo determinarse las aminas con la calibración en agua. La principal ventaja es la reducción del esfuerzo experimental porque se evitan los patrones en aire. El método puede ser empleado para hacer una estimación de la concentración total de aminas primarias en aire.

#### 2.4.2. DETERMINACIÓN DE DIMETILAMINA EN AIRE MEDIANTE MUESTREO Y DERIVATIZACIÓN EN SOPORTE SÓLIDO Y ANÁLISIS ESPECTROFOTOMÉTRICO.

El muestreo y la derivatización juegan un papel muy importante en el análisis de aminas alifáticas de cadena corta en aire. Como se ha comentado en el apartado 2.3.1. el empleo de disoluciones ácidas o básicas para retener compuestos en aire [156] o el empleo de sílica gel [148] como sorbente son los más empleados. Con el fin de evitar la inestabilidad de las muestras en sílica gel, la OSHA ha desarrollado un procedimiento (OSHA 34), que emplea XAD-7 recubierto de 7-cloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol [157]. En los últimos años, se han propuesto diferentes métodos basados en la microextracción en fase sólida [158-160].

En el apartado anterior se ha demostrado la posibilidad de emplear el procedimiento convencional de extracción en fase sólida para el muestreo de aire [161,162]. Esta metodología ha sido aplicada con éxito a la determinación de aminas alifáticas en aire. También esta metodología en combinación con el reactivo FMOC se ha aplicado a la determinación de trimetilamina mediante CLAR con detección fluorescente y UV-vis.

En este trabajo, se evalúa la posibilidad de extender la derivatización asistida en soporte sólido al análisis de dimetilamina en aire. Tanto los métodos de UV-vis como fluorimétricos pueden ser empleados para el screening de muestras con el fin de reducir costes y tiempo en el laboratorio medioambiental o en determinaciones *in situ*.

Se ha seleccionado el reactivo NQS como agente derivatizante ya que forma derivados coloreados [115]. De manera, que la información puede ser obtenida por colorimetría después de la desorción de los analitos y/o por inspección visual de los cartuchos. Estos pueden ser soportes detectores para determinaciones *in situ*. En este estudio se han incluido tanto aminas primarias como secundarias. En trabajo intenta proponer un ensayo para la dimetilamina, que es uno de contaminantes prioritarios en Europa y su presencia esta documentada en humos de volcanización ( $0.1 \text{ mg m}^{-3}$ ) [107], en plantas poliméricas, en plantas de procesado de pescado, puestos de pescado en mercados ( $140.1$  y  $79.2 \text{ mg m}^{-3}$ ) y en atmósferas de granjas de animales [160,163]. Tanto los límites de exposición de corta duración (VLA-EC) como los de larga duración (VLA-ED) están legislados, siendo  $9.4$  y  $3.8 \text{ mg m}^{-3}$  en aire a  $20^\circ\text{C}$  y a  $1.013 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ , respectivamente [165].

Detalles sobre la parte experimental se dan en al *Apéndice 11*.

### Generación de patrones con la cámara de volatilización abierta.

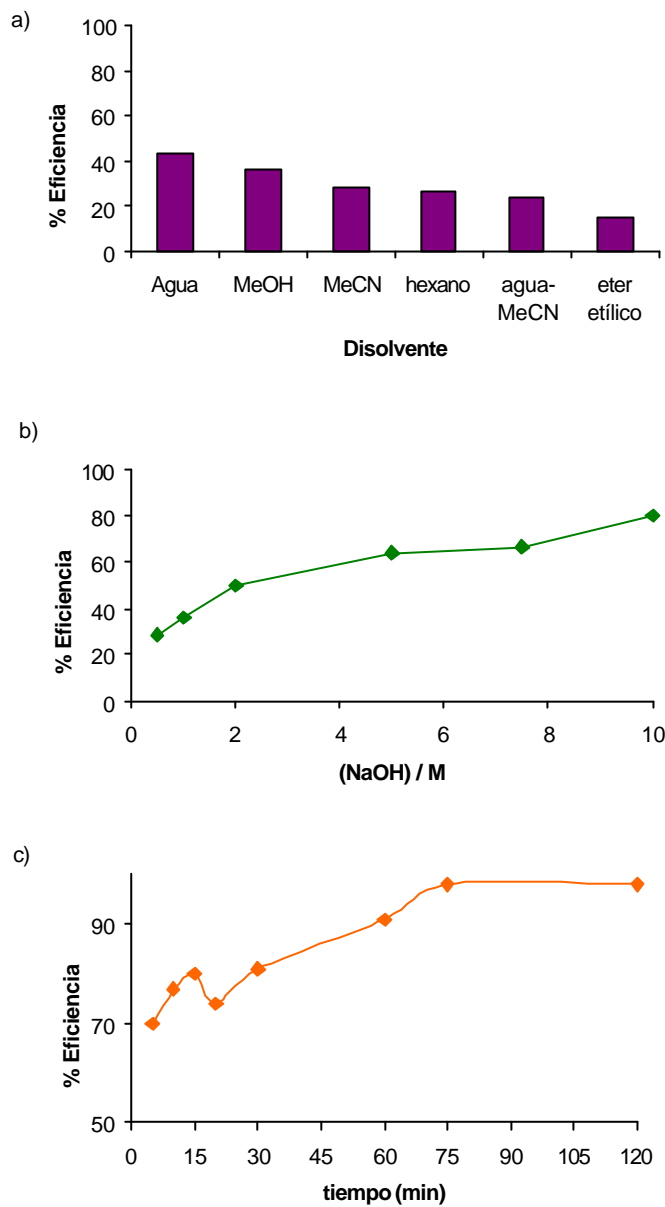
En este trabajo, empezamos a trabajar con las condiciones de volatilización de las aminas primarias en el apartado anterior, el muestreo se realizó durante 15 min a temperatura ambiente. Se obtuvieron buenos resultados para aminas primarias como puede verse en la **Tabla 56**, sin embargo las eficiencias fueron pequeñas para dimetilamina. Estos valores fueron calculados por comparación de las absorbancias medidas para patrones gaseosos con los obtenidos para patrones acuosos conteniendo cantidades equivalentes de aminas y sometidos a las mismas condiciones de derivatización en cartuchos de EFS con NQS. La retención fue cuantitativa para patrones acuosos porque la señal del blanco fue obtenida en la segunda fracción del patrón en un segundo cartucho procesado del mismo modo.

**Tabla 56.** Condiciones óptimas y eficiencia del muestreo y volatilización para aminas primarias y secundarias.

	[NaOH] añadida a patrones acuosos		Tiempo de muestreo (min)	Eficiencia (%) (n=6)
	[NaOH] (M)	Temperatura		
<b>Metilamina</b>	1	Ambiente	15	97±3
<b>Etilamina</b>	1	Ambiente	15	84±6
<b>Propilamina</b>	1	Ambiente	15	94±1
<b>Butilamina</b>	1	Ambiente	15	105±2
<b>Pentilamina</b>	1	Ambiente	15	83±9
<b>Dimetilamina</b>	10	85°C	75	97±4
<b>Dietilamina</b>	10	85°C	75	82±5

Con respecto a la volatilización, la primera variable que se estudió fue el disolvente empleado para preparar las disoluciones estándar de dimetilamina. No se observaron mejoras en la eficiencia comparadas con las obtenidas con patrones acuosos (**Figura 53a**), y por tanto agua fue el disolvente empleado para preparar las disoluciones de patrones. Un diseño factorial  $2^3$  fue empleado para determinar el efecto de la longitud de la cámara de volatilización, la concentración de NaOH y el orden de encendido de la bomba, antes o después de la adición de NaOH a la disolución de dimetilamina. Se ensayaron dos longitudes (11.5 y 6 cm) y dos concentraciones de NaOH (1 y 0.5 M). Del diseño factorial se dedujo que la secuencia de tiempo empleada para añadir NaOH y el orden de encendido de la bomba en la **Figura 16** (pag.40) tenía un efecto importante en la respuesta de los analitos. El factor más relevante fue el momento en el que la bomba era activada. Los mejores resultados se obtuvieron cuando la bomba se activó antes de la adición de NaOH. Las mejores eficiencias se obtuvieron con una longitud de la cámara de volatilización de 11.5 cm.

El efecto de la concentración de NaOH en la eficiencia de la volatilización de dimetilamina se representa en la **Figura 53b**. Como puede observarse un aumento en la concentración de base provoca un aumento en la eficiencia. Si la disolución de NaOH se calienta a 85°C la señal aumenta sustancialmente.



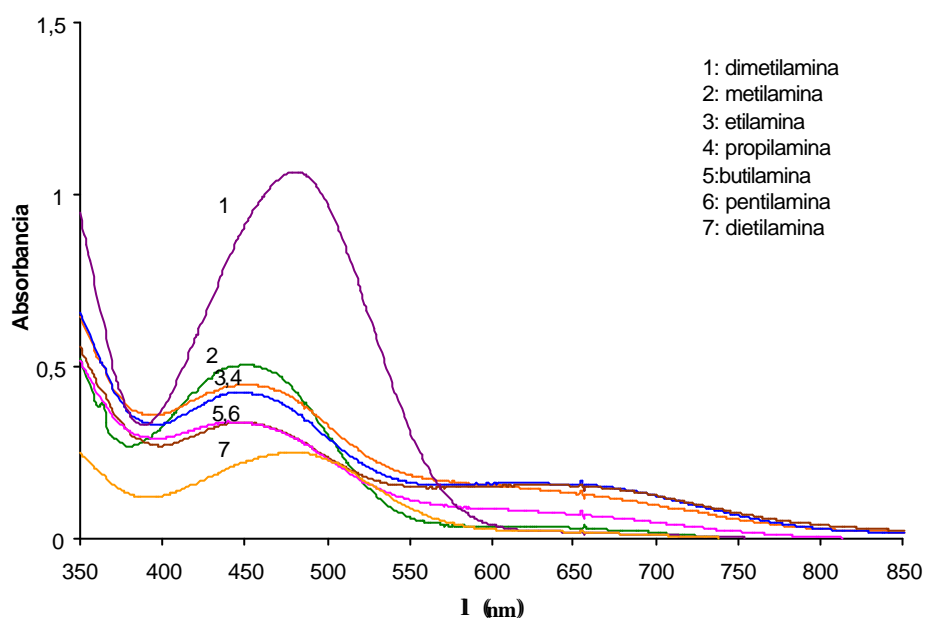
**Figura 53.** Eficiencias obtenidas para dimetilamina (20 µg) en función de a) disolvente de los patrones, b) concentración de NaOH y c) tiempo de muestreo

Finalmente, el efecto del tiempo de volatilización también se estudió. Como muestra la **Figura 53c**, el tiempo requerido para conseguir la recuperación cuantitativa de

dimetilamina fue de 75 min, ya que no se encontró ninguna amina en el residuo que quedo en la cámara de volatilización. En la **Tabla 56** se dan las condiciones optimizadas para esta amina así como la eficiencia alcanzada. Las condiciones óptimas para dimetilamina se aplicaron a la volatilización de dietilamina.

### Análisis de patrones gaseosos de las aminas.

Se procesaron patrones gaseosos de las aminas, generados en las condiciones de la **Tabla 56** para obtener los parámetros analíticos. Con fines cuantitativos las absorbancias de los derivados de cada amina fueron medidas a sus respectivos máximos de absorción (**Figura 54**).



**Figura 54.** Espectros de los derivados de las aminas con NQS.  
Dimetilamina 40  $\mu\text{g}$ , metil-, etil-, propil-, butil-, pentil- y dietilamina 80  $\mu\text{g}$ .

La longitud de onda del máximo de absorción para los derivados de aminas primarias fue 444 nm y para los derivados de aminas secundarias 480 nm. Como muestra la **Tabla 57**, las curvas de calibrado fueron lineales en los intervalos de concentración ensayados. La **Tabla 57** también muestra las ecuaciones de calibrado obtenidas para patrones acuosos conteniendo cantidades equivalentes de analitos, y procesadas directamente en los cartuchos de extracción en fase sólida. Se demuestra que las curvas de calibrado fueron estadísticamente equivalentes (a un nivel de confianza del 95%). Este hecho prueba que en las condiciones propuestas, las aminas son volatilizadas y retenidas cuantitativamente en los cartuchos de EFS.

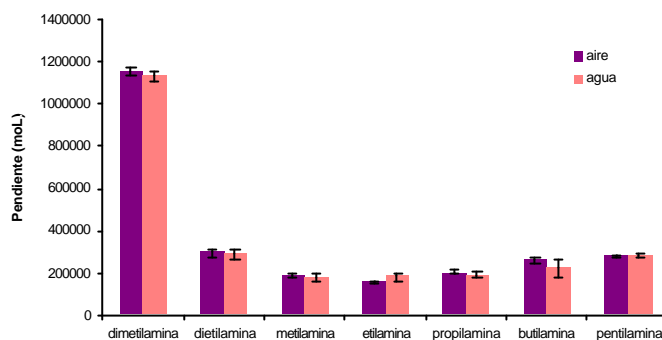
**Tabla 57.** Parámetros analíticos obtenidos para las aminas ensayadas, 1: patrones acuosos procesados directamente con los cartuchos de EFS y 2: patrones de aire generados en las condiciones optimas (n=3).

		$a \pm s_a$	$(b \pm s_b) 10^2$ ( $\text{mg}^{-1}$ )	$R^2$	$S_{yx}; n$	LD ( $\text{mg}^{-1}$ )
<b>Absorbancia vs mg</b>						
Metilamina	1	0.07±0.03	0.80±0.03	0.9974	0.0400,4	9
	2	0.01±0.03	0.85±0.03	0.9931	0.0713,4	9
Etilamina	1	0.08±0.04	0.43±0.03	0.9700	0.0723,4	17
	2	0.09±0.02	0.37±0.02	0.9820	0.0509,4	21
Propilamina	1	0.06±0.02	0.41±0.02	0.9889	0.0418,6	18
	2	0.08±0.03	0.40±0.02	0.9810	0.0562,6	19
Butilamina	1	0.05±0.03	0.40±0.02	0.9910	0.0448,6	19
	2	0.04±0.02	0.41±0.01	0.9903	0.0394,6	19
Pentilamina	1	0.02±0.01	0.36±0.01	0.9962	0.0219,6	20
	2	0.030±0.009	0.31±0.06	0.9967	0.0169,6	25
Dimetilamina	1	<b>0.05±0.01</b>	<b>2.56±0.04</b>	<b>0.9987</b>	<b>0.0181,4</b>	<b>2</b>
	2	<b>0.09±0.03</b>	<b>2.5±0.1</b>	<b>0.9932</b>	<b>0.0416,4</b>	<b>2</b>
Dietilamina	1	0.02±0.04	0.40±0.03	0.9862	0.0666,5	11
	2	0.00±0.05	0.39±0.03	0.9832	0.0719,5	10
		$a \pm s_a$	$(b \pm s_b) 10^{-4}$ ( $\text{mol}^{-1}$ )	$R^2$	$S_{yx}; n$	
<b>Aborbancia vs mol</b>						
Metilamina	1	0.07±0.03	24.7±0.9	0.9974	0.0400,4	
	2	0.01±0.03	26.3±0.8	0.9934	0.0713,4	
Etilamina	1	0.08±0.04	19.0±1.5	0.9677	0.0723,4	
	2	0.09±0.02	16.9±0.9	0.9820	0.0509,4	
Propilamina	1	0.06±0.02	24.0±0.9	0.9889	0.0418,6	
	2	0.08±0.03	23.0±1.2	0.9811	0.0562,6	
Butilamina	1	0.05±0.03	28.0±1.3	0.9910	0.0448,6	
	2	0.04±0.02	30.0±1.1	0.9903	0.0394,6	
Pentilamina	1	0.02±0.01	32.0±0.9	0.9963	0.0219,6	
	2	0.030±0.009	27.3±0.5	0.9967	0.0169,6	
Dimetilamina	1	<b>0.05±0.01</b>	<b>115±2</b>	0.9987	<b>0.0181,4</b>	
	2	<b>0.09±0.03</b>	<b>113±5</b>	0.9932	<b>0.0416,4</b>	
Dietilamina	1	0.02±0.04	29±2	0.9820	0.0666,5	
	2	0.00±0.05	29±20	0.9832	0.0719,5	

Las mismas conclusiones se derivan de los límites de detección (calculados como  $3s_{bl}/b$  donde  $s_{bl}$  es la desviación estándar de 10 blancos y  $b$  es la pendiente de las curvas de calibrado) encontrados para los dos tipos de muestras. Los valores obtenidos estuvieron en el rango de 2 a 25  $\mu\text{g}$ . Por tanto se demuestra que los patrones acuosos pueden ser empleados para la determinación de las aminas en aire. Este hecho también ocurre en el caso de la silica gel [148].

Los límites de cuantificación (LCs) para las aminas ensayadas pueden ser estimados como  $10 s_{bl}/b$ , *i.e.* multiplicando los valores de los LDs por un factor de 10/3.

La **Figura 55** compara las sensibilidades a 480 nm de todas las aminas. Puede verse que la dimetilamina presenta la sensibilidad más elevada, siendo unas cinco veces superior a la sensibilidad del resto de aminas. La interferencia de estas aminas en la determinación de dimetilamina sería pequeña si estas se encuentran en concentración similar a la dimetilamina. El amonio no fue un interferente ya que el derivado NQS-amonio no se formó.



**Figura 55.** Sensibilidades (pendiente de la curva de calibrado lineal) a 480 nm para las aminas ensayadas.

Sin embargo en atmósferas en las que la dietilamina se encuentre a concentraciones más elevadas que la dimetilamina, el método conduciría a error debido a la dietilamina. Las fuentes de error debido a las aminas primarias, si estuviesen presentes, podrían ser eliminadas con calibración bivariante o multivariante. En ese trabajo proponemos la calibración bivariante por simplicidad. Las longitudes de onda de medida fueron 444nm y 480 nm. Se estudió la aditividad de las señales para mezclas de aminas. El procedimiento propuesto fue aplicado a diferentes mezclas de aminas. Las muestras y concentraciones ensayadas se resumen en la **Tabla 58**. Como se muestra en la tabla, las señales medidas para las mezclas de aminas son comparables a los obtenidos por adición de los valores obtenidos para las aminas individualmente. Por tanto, las señales fueron aditivas.



Tabla 58 Resultados obtenidos para el análisis de muestras (n=2).

Composición de la muestra (mg/muestra)							Señal de la mezcla
MA	EA	PA	BA	PenA	DMA	DEA	$\sum$ (señal de las disoluciones individuales) %
40	40						67, 73
		40	40				125, 135
					40	40	96, 98
40					40		115, 117
				40		40	108, 114
		40	40	40			103, 84
				40	40	40	68, 67
40					40	40	71, 76

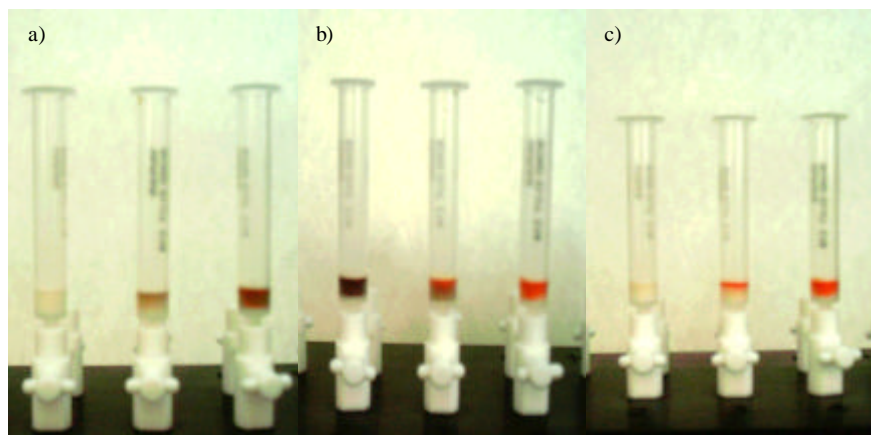
Por otra parte la pendiente expresada como  $\text{mol}^{-1}$  para las aminas primarias a 444nm fueron similares (Tabla 57), el valor medio y la desviación estándar fueron  $25 \cdot 10^4$  y 5, respectivamente. Con estos resultados queda demostrado que la respuesta de las aminas primarias en la reacción del NQS era independiente de la amina primaria y que cualquier amina podía ser empleada como un compuesto representativo expresando la concentración de amina primaria total como mol o como  $\text{mg L}^{-1}$  de N. Una muestra que contenía metilamina (1.3  $\mu\text{mol}$ ) y dimetilamina (0.9  $\mu\text{mol}$ ) se analizó por duplicado. Seleccionamos esta muestra porque los estudios que tratan este tema señalan a que estas dos aminas pueden encontrarse juntas en las muestras [107,160,163]. Empleando la calibración bivariada (usando medidas a 444 y 480 nm) se estimó las concentraciones de metilamina y dimetilamina, siendo estas 0.9 y 1.1  $\mu\text{mol}$ , respectivamente. Estos valores indican que es posible la determinación de ambas, dimetilamina y aminas primarias.

### Inspección visual.

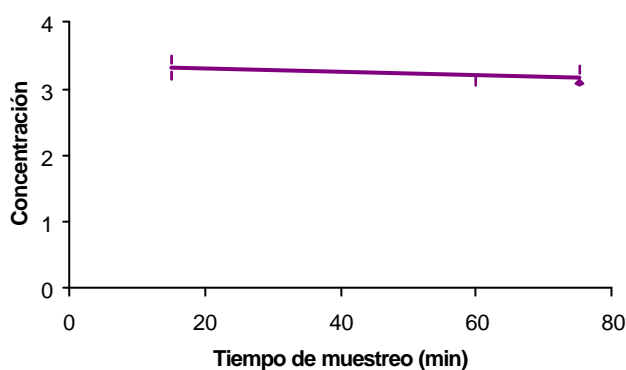
Las aminas primarias forman un derivado rojo-marrón, mientras que las aminas secundarias presentan color naranja (ver Figura 56). Por tanto, el empleo de NQS en combinación con los cartuchos de EFS para el muestreo y derivatización es ventajoso frente a los otros estudios porque permite distinguir *in situ* si aminas primarias están presentes junto con dimetilamina por inspección visual de los cartuchos después de la derivatización. El área coloreada en los cartuchos puede también ser útil para la determinación semicuantitativa de la concentración de amina, como se deriva de la Figura 56, lo cual es una clara ventaja del procedimiento propuesto sobre los otros métodos basados en el empleo de reactivos no coloreados. Además este ensayo mejora marcadamente la selectividad alcanzada con tubos colorimétricos basados en reacciones ácido-base, los cuales responden a todos los grupos amino básicos.

### Análisis de muestras de aire.

La Figura 57 muestra los resultados obtenidos después de 17 h de contaminación de la cámara con dimetilamina. Se obtuvieron valores similares para esa atmósfera muestreando 15 y 75 min, el valor medio fue  $3.0 \pm 0.5 \text{ mg m}^{-3}$ .



**Figura 56.** Fotos de los cartuchos de EFS después de la derivatización de las aminas recogidas en aire. a) blanco (izquierda, metilamina 20 µg (centro) y 140 µg (derecha). b) metilamina 140 µg (izquierda), metilamina 140 µg más dimetilamina 140 µg (centro) y dimetilamina 140 µg (derecha). c) blanco (izquierda), dimetilamina 20 µg (centro) y 140 µg (derecha)



**Figura 57.** Concentración de dimetilamina ( $\text{mg m}^{-3}$ ) en muestras sintéticas de aire generadas después de 17 horas de contaminación en función del tiempo de muestreo.

El procedimiento puede ser empleado para estimar los límites VLA-EC y VLA-ED. Para el primer límite el tiempo recomendado es de 15 min y para el segundo la normativa europea establece muestrear el 25% del tiempo de exposición (8h) si la atmósfera es uniforme. Si el tiempo de muestreo es de 15 min, se requieren ocho muestras. Si el tiempo de muestreo es de 1h, solo se necesitan dos muestras. Los límites de detección expresados en  $\text{mg m}^{-3}$  ( $20^\circ\text{C}$ ,  $1.023 \cdot 10^5 \text{ Pa}$ ) considerando 15 y 60 min como tiempo de muestreo a un flujo de  $30 \text{ mL min}^{-1}$  fueron 3.2 y 1.1  $\text{mg m}^{-3}$  respectivamente. Estos valores indican que el procedimiento es adecuado para estimar los valores de VLA-EC y VLA-ED.

La atmósfera de 17 h de contaminación fue generada durante cuatro días distintos y el valor medio de  $3.2 \text{ mg m}^{-3}$  fue obtenido muestreando 15 min con una desviación estándar relativa del 8%.

Para las atmósferas de 10 y 20 h de contaminación, la concentración de las aminas fue calculada con las curvas de calibrado de los patrones de aire y con las de los patrones de agua procesados directamente en los cartuchos (**Tabla 57**). Las concentraciones medidas fueron  $1.05 \pm 0.03$  y  $3.82 \pm 0.03 \text{ mg m}^{-3}$ , después de 10 y 20h, respectivamente. Los valores calculados con las curvas de calibrado obtenidas por derivatización de patrones acuosos fueron  $1.08 \pm 0.03$  y  $3.81 \pm 0.01 \text{ mg m}^{-3}$ . Esto confirma, que se pueden emplear patrones de agua, en vez de los patrones de aire para el análisis de muestras de aire [161].

Se llevó a cabo un estudio comparativo entre el método propuesto y el test de aminas de tubos colorimétricos (Dräger) para las cámaras contaminadas un día. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 59**. Puede verse que se obtuvieron resultados comparables para dimetilamina en presencia y en ausencia de dimetilamina cuando se aplicó el procedimiento propuesto.

Los tubos colorimétricos proporcionaron una estimación semicuantitativa de la dimetilamina (**Tabla 59**). El valor medio obtenido para las cámaras con solo dimetilamina fue un 35% mayor que las calculadas con el método propuesto. Este porcentaje es consistente con las especificaciones del fabricante de los tubos. Los valores obtenidos para la cámara contaminada con metilamina y dimetilamina no fueron comparables con los obtenidos con el método propuesto debido a que los tubos responden a todas las aminas. Como se deriva de la **Tabla 59**. Además la precisión obtenida con los tubos colorimétricos fue peor que la obtenida con el procedimiento del NQS,

**Tabla 59.** Resultados obtenidos para las cámaras contaminadas durante un día y para muestras reales.

Muestra	Concentración hallada ( $\text{mg} \pm \text{s}$ )	
	NQS	Tubo colorimétrico
Cámara contaminada 1 día con dimetilamina	$6.8 \pm 0.6$	$9.5 \pm 1.5$
Cámara contaminada 1 día con metilamina y dimetilamina	$7.0 \pm 0.4 (11 \pm 1)^a$	$12 \pm 2$
Mercado, puesto 1	$7^b \pm 1^c$	
Mercado, puesto 2	$9^b \pm 2^c$	
Mercado, puesto 2	$11^b \pm 2^c$	

a: Concentración hallada ( $\mu\text{g}$ ).

b: Concentraciones expresadas en  $\text{mg m}^{-3}$ .

c: incertidumbre expandida.

La **Tabla 59** además da los resultados obtenidos para muestras reales. Aunque solo se realizó el acondicionamiento de los cartuchos *in situ*, debido a la proximidad del

laboratorio. El análisis completo podría haberse llevado a cabo en el lugar de muestreo, excepto la medida de la absorbancia a no ser que se disponga de un colorímetro portátil.

En la **Tabla 59** se dan las incertidumbres expandidas empleando un factor de 2. La estimación se realizó en base a la guía EURACHEM/CITAC [165] y es una estimación completa basada en el método de validación. La concentración másica de la muestra final viene dada por  $m_b = m_{ref}(A_o/A_{ref})$ , donde  $m_{ref}$  es la concentración másica del patrón de referencia expresada en  $\mu\text{g}$  y  $A_o$  y  $A_{ref}$  son las absorbancias de la muestra y del patrón respectivamente. La estimación de dimetilamina en la atmósfera viene dada por la ecuación  $C_o = m_{ref}(A_o/A_{ref}) Q t$ , donde  $Q$  es el flujo de la bomba y  $t$  el tiempo de muestreo. La precisión del procedimiento analítico fue la principal contribución a la incertidumbre. Se obtuvieron valores de precisión comparables procesando patrones de aire y agua (alrededor de un CV del 8%), muestras de cámaras (**Tabla 59**) y muestras reales del mercado. Para estas muestras reales la precisión se estimó considerando la desviación estándar de las diferencias normalizadas de los datos (las diferencias de dos réplicas para cada muestra dividido por la media) y dividido por  $\sqrt{2}$ . Las contribuciones de la incertidumbre introducidas por la pureza del patrón de referencia y por el tiempo de muestreo son pequeñas (comparadas con la precisión estimada) de modo que pueden ser obviadas con seguridad de no introducir errores. La precisión de la bomba fue del 3% considerando las especificaciones del fabricante. La incertidumbre estándar combinada fue 0.1.

## Conclusiones.

Este trabajo muestra un método simple, de bajo coste y rápido para la determinación de dimetilamina en aire basándose en el empleo de cartuchos de EFS C<sub>18</sub> para el muestreo y derivatización con NQS. Además se ha confirmado que el empleo de la cámara de volatilización abierta es una buena opción para generar patrones gaseosos de las aminas. El ensayo combina la EFS y las medidas colorimétricas o visuales y puede ser empleado *in situ*.

Una ventaja adicional sobre los métodos basados en reactivos no coloreados es que la inspección visual del área coloreada en el cartucho después de la derivatización permite diferenciar entre aminas primarias y secundarias, así como la estimación semicuantitativa del total de aminas. En términos de selectividad y precisión, el ensayo visual es mejor que el basado en tubos colorimétricos.

El procedimiento asistido en soporte sólido propuesto permite estimar los límites VLA-EC y VLA-ED establecidos por la legislación para la dimetilamina midiendo la absorbancia de los derivados de NQS después de la desorción de los mismos del cartucho.

### **2.4.3. APLICACIÓN DE LA REACCIÓN DE BERTHELOT A LA DETERMINACIÓN DE AMONÍACO EN AIRE MEDIANTE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA ACOPLADA A ESPECTROSCOPIA DE REFLECTANCIA DIFUSA.**

El amoníaco es el gas alcalino más abundante en la atmósfera. Este reacciona con ácidos tales como el ácido sulfúrico, ácido nítrico o nitroso y ácido clorhídrico para formar amonio, siendo responsable del transporte de contaminantes ácidos. Las principales fuentes de amoníaco son la descomposición de residuos de animales, los fertilizantes sintéticos, quemado de biomasa, pérdidas desde el suelo y la combustión del fuel fósil [166]. Los efectos del amoníaco y del amonio abarcan desde la acidificación a la eutrofización del medioambiente. Además provocan cambios en el balance radiativo global de la atmósfera y la reducción de la visibilidad atmosférica [167]. Por tanto la determinación de amoníaco en aire es una tarea importante relacionada con la polución atmosférica.

Basándonos en el procedimiento propuesto y resultados obtenidos en el *apartado 2.1.2*, en esta sección se evaluará la posibilidad de cuantificar amoníaco en muestras de aire con el procedimiento propuesto, el método de EFS/espectroscopía de reflectancia difusa. El método del azul de indotimol se ha adaptado para muestras de aire. Los detalles experimentales se pueden consultar en el *Apéndice 2*.

### Generación de patrones de aire.

Para generar patrones de aire, patrones acuosos de amonio se colocaron en la cámara de volatilización [161] y fueron tratados con una disolución de NaOH, con el fin de transformar el amonio en amoniaco. El analito fue arrastrado y burbujeado a través de 10 mL de una disolución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por medio de una bomba de aire. Se ensayaron diferentes concentraciones de las disoluciones de NaOH y de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> así como diferentes tiempos de muestreo. Los mejores resultados se obtuvieron empleando NaOH 2M en la etapa de volatilización y 0.01 M de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para la retención del analito en combinación con un tiempo de muestreo de 15 min. La **Tabla 60** muestra las condiciones óptimas para la determinación de amoniaco en aire.

**Tabla 60.** Condiciones seleccionadas para la determinación de amonio en aire.

ETAPAS	CONDICIONES OPTIMAS
<i>Muestreo</i>	Bombear aire a través de 10 mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.01 M durante 15 min a 1000 mL min <sup>-1</sup> , ajuste del pH a 6-7 con NaOH 4M.
<i>Formación del azul de indotimol</i>	10 mL de muestra  +0.2 mL de tampón carbonato 0.05M pH 10.7 +0.025 mL de HClO (3% cloro activo) +0.1 mL de nitroprusiato 0.1 M (agitando 1min) +0.5 mL de timol 0.8 M (reacción 5 min)
<i>Extracción</i>	Membranas C <sub>18</sub> acondicionadas con 2 mL de MeOH seguido de 0.5 mL de CETAB 1% (m/v)
<i>Medida</i>	Reflectancia difusa a $\lambda=675$ nm

El porcentaje de amoniaco volatilizado, retenido y derivatizado fue (102±1)% (calculado midiendo las absorbancias de la disolución derivatizada). Esto significa que el analito fue cuantitativamente volatilizado y retenido.

### Parámetros analíticos.

Las condiciones óptimas para el muestreo, derivatización y extracción de amoniaco en muestras de aire se dan en la **Tabla 60**. En estas condiciones, el método fue aplicado a patrones de aire conteniendo amoniaco en el intervalo de 0.24-4.7 µg. Las curvas de calibrado se calcularon teniendo en cuenta  $R$ , reflectancia difusa directa y la transformación de Kubelka-Munk,  $F(R)$ . Los resultados se dan en la **Tabla 61**. Al igual que en el caso de muestras de agua, se mejora la linealidad con  $F(R)$ , pero la precisión fue peor. Un test  $t$  mostró que las pendientes de las curvas de calibrado para patrones acuosos y patrones gaseosos generados eran estadísticamente comparables a un nivel de confianza del 95%. Por tanto las curvas de calibrado obtenidas para patrones acuosos pueden ser empleadas para realizar una estimación de amoniaco en aire, lo cual implica una

reducción significativa el trabajo experimental necesario para obtener las curvas de calibrado.

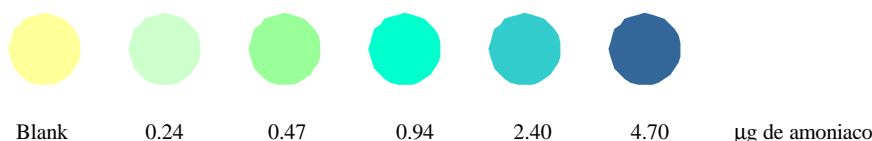
Igual que en el caso del agua el ensayo EFS/reflectancia difusa propuesto dió mejor sensibilidad que los ensayos convencionales. Esta metodología es también más sensible que la obtenida con procedimientos previamente propuestos, los cuales obtienen LDs alrededor de cinco veces mayores que los que aquí se presentan [148].

**Tabla 61.** Parámetros analíticos obtenidos para amoníaco en aire por el procedimiento clásico y el método propuesto.

		Linealidad ( $y=a+bx$ )			Reproducibilidad (% C.V.)			L.D. (mg) (n=10)
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ (mg)	$R^2$	I.L. (mg)	Intradía (n=3)	Interdía (n=6)	
<b>Patrones acuosos</b>	R		-12.8±0.7					
	F(R)		0.40±0.03					
	A		(2.59±0.06)10 <sup>-2</sup>					
<b>Patrones aire</b>	R	50.7±0.7	-10.2±0.5	0.98	0.24-2.4	3 <sup>d</sup>	7 <sup>d</sup>	0.11
	F(R)	0.20±0.01	0.339±0.009	0.99	0.24-4.7	9 <sup>d</sup>	13 <sup>d</sup>	0.03
	A	0.136±0.004	(2.66±0.08)10 <sup>-2</sup>	0.992	2.4-9.4	4 <sup>e</sup>	5 <sup>e</sup>	0.54

d: 0.24 µg y e: 4.7 µg

El amoníaco puede ser identificado por inspección visual de la superficie de la membrana en aire cuando el contenido sea de al menos 0.24 µg. La **Figura 58** muestra la asignación de cantidades de amoníaco en función del ensayo visual.



**Figura 58.** Asignación de cantidades de amoníaco para el ensayo visual.

### Aplicación a muestras de aire.

El método propuesto se aplicó a la medida de amoníaco en una muestra de aire exterior (muestra 8). Al igual que en el caso de las muestras de agua (*apartado 2.1.2*), los

valores de reflectancia difusa se emplearon para la cuantificación. La cantidad encontrada de amoniaco era de  $(2.41 \pm 0.07)$   $\mu\text{g}$ , equivalente a una concentración de amoniaco en aire de  $(0.161 \pm 0.005)$   $\text{mg m}^{-3}$  (calculada considerando el volumen de aire total bombeado a 25 °C y  $1.023 \cdot 10^5$  Pa). Finalmente, el método se empleó para la determinación de amoniaco en muestras de aire contaminadas. Las cantidades halladas en las muestras contaminadas por amoniaco puro fueron de  $(231 \pm 17)$   $\mu\text{g}$  y  $(38 \pm 1)$   $\mu\text{g}$  (muestras 9 y 10, respectivamente). El valor obtenido para aire contaminado con humo de cigarro (muestra 11) fue de  $(199 \pm 11)$   $\mu\text{g}$ .

### **Conclusiones.**

En esta sección se ha adecuado la metodología de EFS/reflectancia difusa propuesta para la determinación de amonio en muestras de agua a la determinación de amoniaco en muestras de aire. Comparado con los métodos existentes, el ensayo propuesto es ventajoso debido a la elevada sensibilidad obtenida. Además el tiempo de muestreo queda reducido considerablemente. Esta metodología es adecuada para la determinación de los límites de exposición profesional.



## 2.5. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] *Standard Methods for Examination of Water and Wastewaters*, American Public Health Association, Washington D. C., 1992
- [2] M. Stoeppler *Sampling and sample preparation*, Elsevier, Berlin, 1997
- [3] E. Nakayama, K. Isshiki, Y. Sohrin and H. Karatami, *Anal. Chem.* **61** (1989) 1392
- [4] A.A. Alwarthan, K.A.J. Habib and A. Townshend, *Fresenius J. Anal. Chem.* **337** (1990) 848
- [5] B. Yan and P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta.* **236** (1990) 287
- [6] V.A. Elron, K.S. Johnson and K.H. Coale, *Anal. Chem.* **63** (1991) 893
- [7] H. Obata, H. Karatani and E. Nakayama, *Anal. Chem.* **65** (1993) 1524
- [8] Z. Zhang, W. Qin and S. Liu, *Anal. Chim. Acta.* **318** (1995) 71
- [9] S. Hirata, Y. Hashimoto, M. Aihara and G. Vitharana-Mallika, *Fresenius J. Anal. Chem.* **355** (1996) 676
- [10] K. Okamura, T. Gamo, H. Obata, E. Nakayama and Y. Nozaki, *Anal. Chim. Acta.* **377** (1998) 125
- [11] W. Qin, Z.J. Zhang and F.C. Wang, *Fresenius J. Anal. Chem.* **360** (1998) 130
- [12] A.R. Bowie, E.P. Achterberg, R.F.C. Mantoura and P.J. Worsfold, *Anal. Chim. Acta.* **361** (1998) 189
- [13] S. Hirata, H. Yoshihara and M. Aihara, *Talanta.* **49** (1999) 1059
- [14] V. Cannizzaro, A.R. Bowie, A. Sax, E.P. Achterberg and P.J. Worsfold, *Analyst.* **125** (2000) 51
- [15] C.A. Chang and H.H. Patterson, *Anal. Chem.* **52**, (1980) 653
- [16] Q.X. Lin, A. Guirarum, R. Escobar and F.F. de la Rosa, *Anal. Chim. Acta.* **283** (1993) 379
- [17] R. Escobar, Q.X. Lin, A. Guirarum and F.F. de la Rosa, *Analyst.* **118** (1993) 643
- [18] A.R. Bowie, P.R. Fielden, R.D. Lowe and R.D. Snook, *Analyst.* **120** (1995) 2119
- [19] Y. Zhou and G. Zhu, *Talanta.* **44** (1997) 2041
- [20] A. Economou, A.K. Clark and P.R. Fielden, *Anal. Commun.* **35** (1998) 389
- [21] H. Zamrow, K.H. Coale, K.S. Johnson and C.M. Sakamoto, *Anal. Chim. Acta.* **377** (1998) 133
- [22] Y. Xu, F.G. Bessoth, J.C.T. Eijkel and A. Manz, *Analyst.* **125** (2000) 677
- [23] P. Campíns-Falcó, L.A. Tortajada-Genaro and F. Bosch-Reig, *Talanta.* **55** (2001) 403
- [24] F.W. Fifield, P.J. Haines, *Environmental Analytical Chemistry*, Blackie, London, 1995
- [25] E. Ballesteros, A. Rios and M. Valcarcel, *The Analyst* **122** (1997) 309.
- [26] R. M. Holmes, A. Aminot, R. Kérouel, B. A. Hooker and B. J. Peterson, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **56** (1999) 1801.
- [27] W. Qin, Z. Zhang, B. Li and Y. Peng, *Talanta* **48** (1999) 225.
- [28] J. S. Fritz, M. P. Arena, S. A. Steiner and M. D. Porter, *J. Chromatogr. A.* **997** (2003) 41.
- [29] M. P. Arena, M. D. Porter and J. S. Fritz, *Anal. Chem.* **74** (2002) 185.
- [30] M. P. Arena, M. D. Porter and J. S. Fritz, *Anal. Chim Acta* **482** (2003) 197.
- [31] Y. Moliner-Martínez and P. Campíns-Falcó, *Talanta* **65** (2004) 217.

- [32] A. Ghauch, J. Rima, A. Charef, J. Suptil, C. Fachinger and M. Martín-Bouyer, *Talanta* **48** (1999) 385.
- [33] A. Ghauch, C. Turnar, C. Fachinger, J. Rima, A. Charef, J. Suptil and M. Martín-Bouyer, *Chemosphere* **40** (2000) 1327.
- [34] N. I. Ershova and V. M. Ivanov, *Anal. Chim Acta* **408** (2001) 145
- [35] O. A. Zaporozhets and L. Y. Tsyukalo, *Talanta* **58** (2001) 861.
- [36] K.T. Lau, S. Eduardo and D. Diamond, *Sens. Actuators B* **98** (2004)12.
- [37] M. Okamura, K. Fujinaga, Y. Seine and S. Honda. *Fresenius, J. Anal. Chem.* **365** (1999) 467.
- [38] EC Directive 98/83.
- [39] S, Meseguer, C. Molins and P. Campíns. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **82** (2002), 475.
- [40] S.-C. Pai, Y.-J. Tsau and T.-I. Yang, *Anal Chim. Acta* **434** (2001) 209.
- [41] N. Hata, I. Kasahara and S. Taguchi. *Anal. Sci.***18** (2002), 697
- [42] J.C.A. De Wuilloud, R.G. Wuillod, B.B.M Sadi and J.A. Caruso. *Analyst* **128** (2003) 453.
- [43] N. Li and H.K. Lee. *J. Chromatogr. A* **921** (2001) 255.
- [44] E. Achterberg, C. Braungart, R. Sandford and P. Worsfold. *Anal. Chim. Acta* **440** (2001) 27.
- [45] C. Zwiener and F.H Frimmel *Anal Bioanal Chem.* **378** (2004) 862.
- [46] M.J. Avena, A.W.P Vermeer and L.K. Koopal. *Colloids and Surfaces* **151** (1999) 213.
- [47] H.T. Lin, M.C. Wang and G.C. Li. *Chemosphere* **56** (2004) 1105.
- [48] M. Schellin, B. Hauser and P. Popp. *J. Chromatogr A.* **1040** (2004) 251.
- [49] H.P. Li, G.C Li and J.F. *J Chromatogr A.* **1012** (2003) 129.
- [50] L. Zhao, L. Zhu and H.K. Lee. *J. Chromatogr A* **963** (2002) 239.
- [51] B. Shao, J. Hu and M. Yang. *J. Chromatogr A* **950** (2002) 167.
- [52] D. Barcelo et all. *J. Chromatogr A* **889** (2000) 195.
- [53] J. Riu, P. Eichhorn, J.A. Guerrero, Th. Knepeer and D. Barcelço. *J. Chromatogr A* **889** (2000) 221.
- [54] L. Koopal, T. Goloub and T. Davis. *J. Colloids and Interfece Science.* **275** (2004) 360.
- [55] A. Zouboulis, W. Ioannis and A. Katsayiannis. *Colloids and Surfaces* **231** (2003) 181.
- [56] C. Madichie, G.M. Greenway and T. McCreedy. *Anal Chim Acta* **392** (1999) 39.
- [57] Y. Moliner, R. Herráez and P. Campíns. *Anal. Chim Acta* . In press.
- [58] D.A. Lambropoulou, V.A. Sacas and T.A. Albanis. *J. Chromatogr A* **952** (2002) 215.
- [59] P. Campíns, F. Bosch, J. Verdú. *Anal. Chim. Acta* **315** (1995) 267.
- [60] L.A. Tortajada, P. Campíns, F. Blasco and F. Bosch. *Analyst* **125** (2000) 771.
- [61] G. Karakoc, K. Unlu, H. Katircioglu. *Environment Internationa* , **29** (2003) 21.
- [62] M. Menezes, F. Freire and H. Bergamin. *Anal Chim Acta* **261** (1992) 339.
- [63] M.T. Oms, A. Cerda, A. Caldra, V. Cerda and R. Forteza. *Anal Chim Acta* **318** (1996) 251.
- [64] F. Jüttner, *Fresenius Anal Chem.* **363** (1999) 128.
- [65] H. Schwarz and G. Pausch. *J. Anal Chem* **366** (2000)825.
- [66] S. Meseguer, J. Verdu, C. Molins and P. Campins. *Talanta*, in press
- [67] A. Aminot, R. Kerouel, D. Birot. *Water Research* **35** (2001) 177.
- [68] R. Kerouel and A Aminot, *Mar Chem.* **57** (1997) 265.

- [69] S. Meseguer, C. Molins, J. Verdu and P. Campins. *J of Cromatography A* **1035** (2004) 75.
- [70] M. Cobos, M. Silva *J of Cromatography A* **848** (1999)105.
- [71] J. Li, P. Purnenedu and K. Dasgusta. *Anal. Chim. Acta* **398** (1999) 33
- [72] J. Li and P.K. Dasgupta. *Anal Chim Acta* **398** (1999) 33.
- [73] L. Wang, T.J. Cardwell, R.W. Catrall, M.D. Luque and S.D. Kolev. *Anal Chim Acta* **416** (2000) 177
- [74] B. Roig, F. Pouly, C. Gonzalez and O. Thomas. *Anal Chim Acta* **437** (2001) 145
- [75] R. Nunes and B. Reis. *Talanta* **58** (2002)729.
- [76] M. El-Shahat, H. Adbel and A. El-Din Mokhtar. *Mikrochim Acta* **140** (2002) 51.
- [77] J.P. Hart, A.K. Abass, D. Cowell and A. Chapel. *Electroanalysis* **11** (1999) 406
- [78] H. Parham and M. Mobarakzadeh *Talanta* **58** (2002) 281.
- [79] M. Mori, K. Tanaka, M. Helaleh, Q. Xu, M. Ikedo, Y. Ogura, S. Saito, W. Hu and K. Hasebe. *J of Chromatogr A* **997** (2003)191.
- [80] M.F. Lehmann, S.M. Bernasconi and J.A. McKenzie. *Anal Chem* **73** (2001) 4717.
- [81] Y. Huang S. Mou and J.M. Riviello. *J. of Chromatogr. A* **868** (2002)209
- [82] H. Mana and U. Spohn *Fresenius J. Anal Chem* **366** (2000) 825.
- [83] R. Lanem C. Chow, D. Davey. D. Mulcahy and S. McLeaod. *Analyst* **122** (1997) 1549.
- [84] B.M. Simonet, A. Rios and M. Varcarcel. *Anal. Chim. Acta* **516** (2004) 67.
- [85] K. Ashley, R. Song and P.C. Schelecht. *Am. Lab.* **34** (2002) 32
- [86] R. Song, P.C. Chelecht and K. Ashley. *J. Hazard. Meter.* **83** (2004) 29.
- [87] K. Morris and R. Raiswell, in *Interactions of microorganisms with radionuclides*, eds. M. J. Keith-Roach and F. R. Livens, Elsevier, Amsterdam, 2002, p 101-141.
- [88] M. R. Palmer and J. M. Edmond, *Geochim. Cosmochim. Acta* **57** (1993) 4947.
- [89] J. W. Morse and G. R. Choppin, *Rev. Aquatic. Sci.*, **4** (1991) 1.
- [90] P. S. Andersson, D. Porcelli, G. J. Wasserburg and J. Ingri, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **62** (1998) 385.
- [91] P. W. Swarzenski, B. A. McKee and J. G. Booth, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **59**, (1995) 7.
- [92] D. Porcelli, P. S. Andersson, G. J. Wasserburg, J. Ingri and M. Baskran, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **61** (1997) 4095.
- [93] P. S. Andersson, D. Porcelli, Ö. Gustafsson, J. Ingri and G. J. Wasserburg, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **65** (2001)13.
- [94] T. M. Church, M. M. Sarin, M. Q. Fleisher and T. G. Ferdelman, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **60** (1996) 3879.
- [95] R. J. Gibbs, *GSA Bull.*, **88** (1977) 127.
- [96] B. A. McKee, D. J. DeMaster and C. A. Nittrouer, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **51** (1987) 2779.
- [97] K. B. Krauskopf, *Radioactive waste disposal and geology*, Chapman and Hall, London, UK, 1988.
- [98] H. G. Dines. *The metalliferous mining region of south-west England*. HMSO, 1956, vol II, p. 540.
- [99] D. Read, P. J. Hooker, M. Ivanovich and A.E. Milodowski. *Radiochim. Acta*, **52/53**, (1991) 349.
- [100] E. R. Unsworth, PhD Thesis, University of Plymouth, U.K., 2001.

- [101] D. Pirrie, M. R. Power, G. Rollinson, G. S. Camm, S. H. Hughes, A.R. Butcher and P. Hughes, *Sedimentology*, **50** (2003) 579.
- [102] UNSCEAR, 2000, *Sources and effects of ionizing radiation Volume I: Sources*, United Nations, New York.
- [103] World Nuclear Association, 2004, <http://www.world-nuclear.org/info/inf75.htm>, Accessed 12th August 2004.
- [104] Environment Agency Data, U.K.
- [105] T.P. Buró, A.L. Heathwaite, S.T. Trudgill. *Nitrate: Processes, Patterns and Management*. John Wiley & Sons, New York, 1993.
- [106] E-S. A. Badr, E.P. Achterberg, A.L. Tappin, S.J. Hill ad C.B. Braungardt. *Trends Anal. Chem.*, **22** (2003) 819.
- [107] P.Simon and C. Lemacon. *Anal Chem*, **59** (1987) 480.
- [108] Y. Moliner, C. Molins and P. Campíns. *Talanta*, **62** (2004) 373.
- [109] G. Lunn and L.C. Hellwig, *Handbook of Derivatization Reactions for HPLC*, Wiley, New York, 1998.
- [110] F. Dai, V.P. Burkert, H. N. Singh and W.L. Hinze, *Microchem. J.*, **57** (1997) 166.
- [111] K. Saito, M. Horie and H. Nakazawa, *Anal. Chem.*, **66** (1994) 134.
- [112] P. Campíns-Falcó, C. Molins-Legua, A. Sevillano-Cabeza and L.A. Tortajada Genaro, *J. Chromatogr. B*, **759** (2001) 285.
- [113] P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza, C. Molins-Legua and M. Kohlman, *J. Chromagr.*, **687** (1996) 239.
- [114] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó and A. Sevillano-Cabeza, *Anal. Chem.*, **68** (1996) 734.
- [115] P. Campíns-Falcó, C. Molins-Legua, A. Sevillano-Cabeza and R. Porras-Serrano, *Analyst*, **122** (1997) 673.
- [116] R. Herráez-Hernández, P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza and I. Trümpler, *Anal. Chim. Acta*, **334** (1997) 125.
- [117] C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó and A. Sevillano-Cabeza, *Anal. Chim. Acta*, **378** (1999) 83.
- [118] C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó, A. Sevillano-Cabeza and M. Pedrón-Pons, *Analyst*, **124** (1999) 477.
- [119] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó and R. Herráez-Hernández, *Analyst*, **126** (2001) 1683.
- [120] S. Meseguer-Lloret, C. Molins-Legua and P. Campíns-Falcó, *J. Chromatogr. A* **978** (2002) 59.
- [121] J. Verdú-Andrés, P. Campíns-Falcó and R. Herráez-Hernández, *Chromatographia*, **55** (2002) 129.
- [122] N. Seiler, *Hanbook of derivatives for Chromatography*, ed. K. Blau and J. Halket, Wiley, Chichester, 1993.
- [123] A. Marzo, N. Monti, M. Ripamonti, S. Muck and A.R. Martelli, *J. Chromatogr.*, **507** (1990) 241.
- [124] J. Krol, P.G. Alden, J. Morawski, and P.E. Jackson, *J. Chromatogr.*, **626** (1992) 165.
- [125] H. Wang, J. Li, X. Liu and H.-S. Zhang, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **423**, 77.
- [126] G. Malder, M. Pelletier and W. Haerdi, *J. Chromatogr.*, 1992, **59**, 9 .
- [127] B.M. Farrell and T.M. Jefferies, *J. Chromatogr.*, **272** (1983) 111 .

- [128] R. Herráez Hernández, P. Campíns Falcó and A. Sevillano Cabeza, *J. Chromatogr. Sci.*, **35** (1997) 169.
- [129] R. Herráez-Hernandez, P. Campíns-Falcó and S. Diaz-Oltra. *Chromatographia*. **49** (1999) 188.
- [130] C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó and A. Sevillano-Cabeza, *Analyst*, **123** (1998) 2871.
- [131] R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó, *Chromatographia*, **52** (2000) 169.
- [132] T. Tsuda and M. Novotny. *Anal Chem*, **50** (1978) 632.
- [133] T. Takeuchi. *Anal. Bioanal. Chem.* **375** (2003) 26.
- [134] W. Haskins, Z. Wang, C. Watson, R. Rostand, S. Witowski, D. Powell and R. Kennedy. *Anal. Chem*, **73** (2001) 5005.
- [135] E. Pitarch, F. Fernandez, J. Hove, H. Meiring, W. Niesing, E. Dijkman, L. Stolker and E. Hogendoorn. *J. Chromatogr A*, **1031** (2004) 1.
- [136] Y. Shen, N. Tolíc, R. Zhao, L. Pasa-Tolic, L. Li, S. Berger, R. Harkewicz, G. Anderson, M. Belov and R. Smith. *Anal Chem*. **73** (2001) 3011.
- [137] E. Varesio, S. Rudaz, K. Vrause and J. Veuthey. *J. Chromatogr A*, **974** (2002) 135.
- [138] P. Vallano and V. Remcho. *J. Chromatogr A*, **888** (2000) 23.
- [139] B. Walter. *Anal. Chem.* **55** (1983) 499A.
- [140] A. Zipp, W.E. Hornby. *Talanta*. **31** (1984) 863.
- [141] S.G. Dmitrienko, O.A. Sviridova, L.N. Pyatkova, V.A. Zhukova, Yu. A. Zolotov. *Anal. Chim. Acta*. **405** (2000) 231.
- [142] S.G. Dmitrienko, O.M Medvedeva, A.A Ivanov, O.A. Shipigun, Y.A. Zolotov. *Anal. Chim. Acta*. **469** (2002) 295.
- [143] M. Miró, W. Frenzel, J.M. Estela, V. Cerdá. *Analyst*. **126** (2001) 1740.
- [144] L. Perbellini, L. Maestri, N. Veronese, S. Romani, F. Brugnone. *J. Chromatogr. B*. **759** (2001) 349.
- [145] M.A. Castillo, R.C. Castells. *J. Chromatogr. A*. **921** (2001) 121.
- [146] G. Fang, N. Liu. *Anal. Chim. Acta*. **445** (2001) 245.
- [147] A. Sevillano Cabeza, Y. Moliner Martinez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó. *Anal. Bioanal. Chem.* **376** (2003) 918.
- [148] NIOSH Manual of Analytical Methods (NMAM), Fourth Edition (1994).
- [149] C.J. Elskamp and G.R. Schultz, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **47** (1986) 47.
- [150] C.X. Gao, I.S. Krull and T.M. Trainor, *J. Chromatogr.* **463** (1989) 192.
- [151] C.X. Gao, I.S. Krull and T. Trainor, *J. Chromatogr. Sci.* **28** (1990) 102.
- [152] H. Tinnerberg, M. Spanne, M. Dalene and G. Skarping, *Analyst* **122** (1997) 275.
- [153] D. Karlsoon, M. Spanne, M. Dalene and G. Skarping, *Analyst* **123** (1998) 117.
- [154] P. Ferrari, J.P. Guenier and J. Muller, *Chromatographia* **20** (1985) 5.
- [155] T. Pal, A. Pal, G.H. Miller and T. Dinh, *Anal. Chim. Acta*. **263** (1992) 175.
- [156] L. Groenberg, P. Loevkvist and J. A. Joensson, *Chemosphere* **24** (1992) 1533.
- [157] OSHA Manual of Analytical Methods, 1991 (USA).
- [158] J. Koziel, M. Jia, A. Khaled, J. Noah and J. Pawliszyn. *Anal. Chim. Acta*. **400** (1999) 153.
- [159] J. Koziel, M. Jia and J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* **72** (2000) 5178.
- [160] J. Namiesnik, A. Jastrzebska and B. Zygmunt, *J. Chromatogr. A* **1016** (2003)
- [161] Y. Martínez-Moliner, P. Campíns-Falcó, R. Herráez-Hernández and J. Verdú-Andrés *Anal. Chim Acta* **502** (2004) 235.

*Bibliografía*

---

- [162] C. Cháfer-Pericás, R. Herráez-Hernández and P. Campíns-Falcó *J. Chromatogr. A* **1042** (2004) 291.
- [163] I-H Chang, C-G Lee and D.S. Lee, *Anal. Chem.* **75** (2003) 6141.
- [164] European Directive 2000/39/CE, Brussels 6/8/2000.
- [165] EURACHEM/CITAC (1995) Guide Quantifying uncertainty in analytical measurement, 2<sup>nd</sup> ed. 2000.
- [166] S.V. Krupa, *Environmental pollution.* **124** (2003), 179.
- [167] C. Perrino, M. Catrambone, A. Di Menno Di Bucchianico and I. Allegrini. *Atmospheric Environment.* **36** (2002), 5385.







Capítulo 3.  
**GENERAL CONCLUSIONS**



### 3. GENERAL CONCLUSIONS.

The works presented in this Thesis, pretend to contribute with new methodologies based on different techniques to the determination of some analytes of environmental interest. Some of the selected analytes have been studied in different types of matrices. **Table 62** shows the analytes and the matrices studied.

*Table 62. Analytes and environmental samples in which they have been studied.*

	Cr(III) Co(II) Cu(II)	U	Ammonium/ ammonia	Primary aliphatic amines	Amino Acids	Secondary aliphatic amines
Water	X	X	X	X	X	X
Sediments	-	X	-	-	-	-
Air	-	-	X	X	-	X

All the analytes have been studied in water samples. And uranium was the unique element studied in sediment samples, owing to the importance of uranium transport in the interfaces water-sediments. Primary and secondary amines and ammonia were also studied in air because they are volatile organic compounds and their presence in indoor and outdoor air is well documented.

In this Thesis, two types of works are carried out. For one hand, new methodologies have been proposed for the determination of the analytes such as ammonium, amines and amino acids or some steps of analytical procedures proposed in the bibliography have been optimized. For the other hand, a study of the transport of a natural component in a river has been done.

#### **Analysis of the analytes in water samples.**

The characteristics of the employed techniques for the different analytes in water samples and sediments are shown in **Table 63**. In addition, **Table 63** gives the validation methods as well as the evaluated steps for each method.

With regard to the sample pretreatment, only two studies have been done in which it was necessary this step. This step was the aim of the study in the determination of Cr(III), Co(II) and Cu(II), to establish a guide for the conditioning of water samples before the analysis. In the case of U determination, this step was only necessary for the extraction of the metal from the sediment samples.

This step was not used for the amines or ammonium determination because of the employment of solid phase extraction for isolating the analyte from the matrix.

Table 63. Features of the proposed procedures in water analysis.

	Cr, Co Cu- conditioning	U-transport	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> Colorimetric method	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> EFS/diffuse reflectance	Assay-Primary amines- OPA/NAC	Primary amines -HPLC - OPA/NAC	Primary amines, ammonium, Amino acids- Capillary LC	Primary amines Detector support	Secondary amines -Detector support
<b>Sample Pretreatment</b>	Conditioning with acids	Digestion sediments							
<b>Preconcentration</b>				SFE disks	C <sub>18</sub> cartridges	C <sub>18</sub> cartridges Precolumn	-	SFE disks C <sub>18</sub> cartridges	SFE disks C <sub>18</sub> cartridges
<b>Catalytic effect</b>	Luminol								
<b>Derivatization</b>			Thymol phenol Salicylate	Thymol	OPA	OPA	OPA	DBS Nin. NQS	NQS
<b>Interferents</b>	X		X	X			X		
<b>Detection</b>	QL	MS	Uv-vis	DR	FLW	FLW	UV-vis FLW	DR *UV-vis	DR UV-vis
<b>Screening of sample</b>					X			X	X
<b>Screening of amines</b>						X	X		
<b>Validation</b>	SRM	MS	Reference method	Reference method %R	%R	%R	%R	%R	%R
<b>Analysis in situ</b>			X	X	X			X	X
<b>Visual Inspection</b>			X	X				X	X

\*only for NQS.

In addition, solid phase extraction has also been used for analyte preconcentration. Methods based on SPE in C<sub>18</sub> cartridges for primary and secondary amines and methods based on SPE using solid phase extraction disks (ammonium, primary and secondary amines) have been developed. Different types of extraction disks have been evaluated (C<sub>18</sub> and SDB-XC). The selection of the more appropriate support was made as function of the analyte (primary or secondary amines) or the derivate (ammonium) and as function of the derivatizing reagent. **Table 64** shows the supports used bearing in mind the analytes and reagents.

The extraction disks were employed for preconcentration and, moreover, as detector supports when using coloured reagents. Another preconcentration mode was employed, that method consisted in the on-line preconcentration in a C<sub>18</sub> precolumn integrated in a chromatographic system of coupled columns. The principal advantage was the automatization of all the steps of the analytical procedure.

**Table 64.** Selection of the solid phase extraction support as function of the analyte and derivatizing reagent.

	OPA	Thymol	NQS	Ninhydrine	DBS
<i>C<sub>18</sub> Cartridges</i>	R-NH <sub>2</sub>	-	R-NH <sub>2</sub> R,R'-NH	-	-
<i>C<sub>18</sub>-SPE disks</i>	-	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-	R-NH <sub>2</sub>	-
<i>SDB-XC-SPE disks</i>	-	-	-	-	CH <sub>3</sub> NH <sub>2</sub>

The signal source was normally proporcioned by a derivate of the analyte. As the derivates of ammonium with phenoI-type reagents, primary amines with OPA/NAC, NQS, ninhydrin, dabsyl or secondary amines with NQS. For Cr, Co and Cu with the luminol reaction, the signal was produced by a reaction intermediate (exited 3-aminophthalate) formed by the presence of the analyte was the catalyser. And for U the signal was obtained with MS.

Possible interferent species in the determination of some analytes have also been studied, because these species could be natural components of real water samples or because they could be contaminants of those samples.

- Co(II) and Cu(II) when the selective determination of Cr(III) was required in the study of the conditioning protocols. Both metals were masked with EDTA.
- Special interest had the evaluation of the effect of humic acid and surfactants in the ammonium determination. Fe and methylamine could be interferents at high concentration levels. Thus, they were only considered interferences in case of very polluted samples
- Compounds such as urea, acetamide and humic acid were not interferents in the screening of amines using Capillary LC.

Respect to the detection system, it is important to remark the use of diffuse reflectance when extraction disks were employed. The principal advantage was the reduction of the experimental effort because the elution step was avoided for detecting the analytes. Despite of this, sensitivity achieved with chemiluminiscence, MS and fluorescence was better.

The measurement of diffuse reflectance was evaluated with the direct reflectance measurements and applying the Kubelka-Munk conversion. For determining ammonium and methylamine with thymol and DBS respectively, direct reflectance measurement were chosen, because the K-M transformation produced a reduction in the precision. K-M conversion was employed for the measurements of MA and DMA derivatives obtained with NQS.

A method for the screening of samples to estimate total amino primary groups has been developed based on the use of SPE cartridges and fluorescent of UV-vis detection and extraction disks with diffuse reflectance measures. Moreover, methods for screening of primary amines using HPLC and screening of ammonium, primary amines and some amino acids using capillary LC have also been proposed. The last one had the advantage of an improved sensitivity compared with the conventional HPLC, without the necessity of preconcentration steps

Owing to the characteristics of the proposed procedures for the analysis of primary and secondary amines and ammonium, all, except those which employed LC, can be used for the analysis *in situ*. Apart from this, the phenol-type reagents (phenol, thymol and salicylate), NQS, DBS and ninhydrin permitted the semiquantitative determination by visual inspection of the derivative formed in solution and in solid supports (cartridges or disks).

Ammonium not only contributes to eutrophication but also is one of the legislated parameters related with water quality. For this reason, a guide for selecting the most appropriate method of analysis as function of the water sample requirements has been developed. For this aim, the methods proposed in this thesis have been compared with other methods proposed by this research group, being the sensitivity the limiting factor for the selection of the better procedure.

Some analytical characteristics of the studies are shown in **Table 65**. The consumption of reagents was higher and the instrumentation more complex for the method based on FIA or chromatography separation with HPLC. Capillary LC not only decrease the consumption of reagents in the mobile phase but also improved the volumes of derivatizing reagents.

The proposed procedures were, in general, selective for the determination of the analytes. Determination of amines with OPA/NAC and ninhydrin was not selective for a special analyte because they were proposed for estimating the total primary amino groups. The %RSD were satisfactory for the concentration levels assayed in each case.

Detection limits were, in all cases, adequate for the application of the procedures to real water samples. The employment of a preconcentration step with extraction disks in the ammonium determination improved the detection limit 4.6 times. Moreover it permitted the analysis by visual inspection from 0.025 mg L<sup>-1</sup> of ammonium. Although the detection limits achieved with extraction disks and coloured reagents were worse than those obtained with fluorescence, HPLC or capillary LC.

Comparing the detection limits obtained with conventional HPLC with those obtained with capillary LC (Table 47, pag.129), it is noticed that capillary LC proporcioned detection limits five times lower than column switching LC, without the necessity of a preconcentration step.

Table 65. Some analytical characteristics for the proposed procedures in the water analysis (the more asteriscs: \* the better the procedure)

	Cr-Co-Cu conditioning	U in water samples	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> UV-vis	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> SFE/DR	Rapid assay primary amines	HPLC Amines	Capillary LC Amino compounds	Detector supports.		
								DBS	NQS	Nin
Reagent	*	****	***	***	***	*	****	**	***	***
Consum. Instrument	**	***	****	***	****	**	***	***	***	***
Selectivity	Yes, cond	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	No
Precision (%RSD)	-	9-15	1.4	7.0	8	0.8	6 (UVvis) 13 (FLW)	2	10	1.7
LOD (µg L <sup>-1</sup> )	2.2 Cr 0.5 Co 2.1 Cu	5	46	10	10 (MA)	2 (MA)	8 (UVvis) 0.4 (FLW) (MA)	150 (MA)	10000 (MA)	3000 (MA)
LI	3-15 Cr 2-8 Co 10-50 Cu	0.1-1.6	0.25-5.0	0.025-0.25	0.05-1.5	0.75-1.5	0.5-10 0.05-1	0.5-2	20-100	5-25
Analysis time	****	****	***	***	***	**	**	**	*	*

Analysis time was lower for those procedures without reation time, such as FIA methods or ICP-MS measurements, followed by those with short reaction times and chromatographic method that analysed more than one derivate simultaneously. The last ones, were the methods with long reaction times.

The study of the conditioning protocols for determining Cr, Co and Cu gave a guide for selecting the best protocol when the direct chemiluminescence signal is measured. Evaluation of the impact of the desused mine on the uranium transport revealed than the mine is a source of uranium to the River Fal in the sediments under and in the outflow of the pipe but not to the sediments 10 m. beyond or to the river water.

The proposed methods for ammonium determination optimized the reference method based on phenol, in terms of reagent toxicity. If a preconcentration step was included an improvement of the sensitivity was also obtained in simple and rapid reaction

conditions. The inclusion of a preconcentration step will depend on the concentration level of ammonium in the sample. The influence of humic acid and surfactants has also been evaluated. The first ones interfered, overall, in the SPE method and GHPSAM must be applied to avoid bias of error. If the percentage of anionic surfactants exceed 0.5%, for cationic 0.001% and for non-ionic 5% the derivatizing reaction was inhibited.

The marked tendency of Analytical Chemistry to the development of screening systems has been reflected in *section 2.3*. The principal characteristics are the simplicity of the instrumentation and the rapidity in the responses. Those characteristics make them optima to select between a group of samples, those which the content is higher than a determinate level (legislation, recommendation...). In *section 2.3*, methods for screening of samples as well as amines has been developed. It is important to remark the employment of the novel technique Capillary LC for the screening not only of amines but also ammonium and some amino acids. In addition, the development the detectors supports that allows the analysis by visual inspection for water samples with high content of amines, i.e. waste waters.

#### **Analysis of the analytes in air samples.**

Volatile analytes have been studied in air samples. Once sampling has been done, primary amines were determined using OPA/NAC. Dimethylamine was selectively determined with NQS and the ammonium with thymol. **Table 66** shows some characteristics of the employed procedures.

Sampling was done with C<sub>18</sub> cartridges for primary and secondary amines. For ammonium a imprinter flasks was used because the retention of ammonium in C<sub>18</sub> cartridges was not quantitative.

Derivatizing reagents as well as detection systems were the same that those employed for the determination of the analytes in water. Validation was done by recovery studies in all cases.

If C<sub>18</sub> cartridges were used for sampling first and derivatizing after, the analysis can be done *in situ*. Analysis by visual inspection of dimethylamine and ammonia can be done with NQS and thymol, respectively. The difference of the derivate colour for primary and secondary amines formed with NQS permitted the distinction between both types of amines. For ammonia the visual inspection can be done from 0.24 µg.

The analytical characteristics of the procedures employed for the analysis of primary and secondary amines in air are shown in **Table 67**.



**Tabla 66.** Features for the methods for air analysis

	Primary amines - OPA/NAC	DMA-NQS	Ammonia-Thymol
<i>Sampling</i>	C <sub>18</sub> -cartridges	C <sub>18</sub> -cartridges	Impringer flasks
<i>Derivatization</i>	OPA	NQS	Thymol
<i>Interferents</i>	X	X	X
<i>Detection</i>	FLW	UV-vis	UV-vis
<i>Validation</i>	%R	%R	RD
<i>Análisis in situ</i>	X	X	-
<i>Visual inspection</i>	-	X	X

The NQS and thymol methods were selective for dimethylamine and ammonia, respectively. While, OPA/NAC based method was used to estimate the total concentration of primary amino groups in air.

The detection limits achieved allowed the estimation of the STEL and TLV established by the legislation for primary amines, dimethylamine and ammonia.

**Tabla 67.** Some analytical characteristics for the procedures for air analysis

	Primary amines - OPA/NAC	DMA-NQS	Ammonia-Thymol
<i>Reagent consum</i>	***	***	**
<i>Instrumentation</i>	****	****	***
<i>Selectivity</i>	No	Yes	Yes
<i>Precision (%RSD)</i>	7	2	5
<i>LOD (ng)</i>	0.16 (MA)	9 (DMA)	0.54 (UV-vis) 0.11 (RD)
<i>LI (ng)</i>	0.5-2	10-100	2.5-50 (UV-vis) 0.25-25 (RD)
<i>Analysis time</i>	****	**	***

The proposed procedures for aliphatic amines and ammonia show some advantages compared with other methods proposed in the literature. Reduction of the experimental effort because the generation of gaseous standards are not necessary and an improvement of sensitivity.

The methods using coloured reagents permitted the analysis by visual inspection and the semiquantitative estimation of ammonia and dimethylamine. Employing NQS

distinction of primary and secondary amines are also possible. Moreover, the results obtained were better than those obtained with colorimetric tubes.

Summarizing and bearing in mind the specific objectives marked in *page 4*, this Thesis :

- Has studied the influence of the conditioning protocol in water samples for chemiluminescent detection of Cr, Co and Cu.
- Has reduced the toxicity and improve the LOD of ammonium determination with indophenol-type reagents.
- Has evaluated the effects of humic and surfactants in the procedure above mentioned.
- Has proposed a guide to select the more appropriate method for ammonium determination.
- Has estimated the impact of a disused mine on uranium transport in south England.
- Has proposed different screening methods for amines which contribute to eutrophication knowledge.
- Has proposed of rapid, simple, sensitive and alternative methods for analysis of aliphatic amines and ammonia in air samples.

***Sugerencias para trabajos posteriores.***

La tendencia de los trabajos de investigación posteriores a esta Tesis, continuaran con el desarrollo de nuevas metodologías aplicadas a los mismos analitos o a nuevos analitos basadas en la *Cromatografía Líquida Capilar*, técnica novedosa y tema prioritario en el grupo para el que se ha conseguido financiación (**BQU2003-6134**).



Capítulo 4.  
**APÉNDICES.**



### **Apéndice 1.**

Y. Moliner Martínez, S. Meseguer Lloret, L.A. Tortajada Genaro and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Influence of water sample storage protocols in chemiluminescence detection of trace elements.*  
Talanta **60** (2003) 257.

### **Apéndice 2.**

Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Improved detection limit for ammonium and ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy.*  
Anal. Chim. Acta. **534** (2005) 327

### **Apéndice 3.**

Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Determination of ammonium with the indophenol-type reaction method in polluted samples containing humic acids and/or surfactants.*  
Enviado.

### **Apéndice 4.**

C. Molins Legua, S. Meseguer Lloret, Y. Moliner Martínez and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*A guide for selecting the most appropriate method for ammonium estimation as function of water analysis requirements.*  
Enviado.

### **Apéndice 5.**

Y. Moliner Martínez<sup>a</sup>, P. Campíns Falcó<sup>a</sup>, P. J. Worsfold<sup>b</sup> and M. Keith-Roach<sup>b</sup>  
<sup>a</sup>Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
<sup>b</sup>School of Earth, Ocean and Environmental Sciences, University of Plymouth.  
*The impact of a disused mine on uranium transport in the River Fal, South West England.*  
J. Environ. Monit. **6** (2004) 1.

### **Apéndice 6.**

A. Sevillano Cabeza, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Rapid fluorimetric assay for primary amine groups in water samples.*  
Anal. Bioanal. Chem **376** (2003) 918.

### **Apéndice 7.**

Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Analysis of primary aliphatic short-chain monoamines by LC in water samples.*  
Talanta **62** (2004) 374.

### **Apéndice 8.**

Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Advantages of Capillary LC for screening of ammonium and primary amino nitrogen and its contribution to eutrophication.*  
Enviado.

### **Apéndice 9.**

Y. Moliner Martínez and P. Campíns Falcó.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Detector supports: application to aliphatic amines in wastewater.*  
Talanta **65** (2005) 217.

### **Apéndice 10.**

Y. Moliner Martínez, P. Campíns Falcó, R. Herráez Hernández and J. Verdú Andrés.  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*Evaluation of C<sub>18</sub> adsorbent cartridges for sampling and derivatization of primary amines in air.*  
Anal. Chim Acta **502** (2004) 235.

### **Apéndice 11.**

Y. Moliner Martínez, P. Campíns Falcó and R. Herráez Hernández  
Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.  
*A method for the determination of dimethylamine in air by collection on solid support sorbent with subsequent derivatization and spectrophotometric analysis.*  
J. Chromatogr. A **1059** (2004) 17.



## **Apéndice 1.**

Y. Moliner Martínez, S. Meseguer Lloret, L.A. Tortajada Genaro and P. Campíns Falcó.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Influence of water sample storage protocols in chemiluminescence detection of trace elements.*

Talanta **60** (2003) 257.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).



## Apéndice 2.

Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Improved detection limit for ammonium and ammonia achieved by Berthelot's reaction by use of solid-phase extraction coupled to diffuse reflectance spectroscopy.*

Anal. Chim. Acta. **534** (2005) 327.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).



### Apéndice 3.

#### REVISED PAPER.

#### **Determination of ammonium with the indophenol-type reaction method in polluted samples containing humic acids and/or surfactants**

Y. Moliner Martínez, P. Campíns Falcó\* and R. Herráez Hernández.

Department of Analytical Chemistry, University of Valencia. Dr. Moliner, 50, 46100, Burjassot, Valencia, Spain.

#### **Abstract.**

This work has evaluated the influence of humic acid and/or surfactants in the quantification of ammonium in contaminated waters with the indophenol-type reaction method. Thymol has been employed with the colorimetric method for sample ammonium concentrations between 0.25 and 1 mg L<sup>-1</sup>. In addition, SPE/diffuse reflectance method, has been used for quantification of ammonium at low concentrations (between 0.025 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>). Matrix effect owing to the humics substances were observed with the colorimetric method when the concentration was equal or higher than 25 mg L<sup>-1</sup>. Lower concentrations of humic compounds were necessary to observe matrix effects with the more sensitive SPE/diffuse reflectance method. GHPSAM was employed for evaluating the effect of humic acids and for eliminating the bias error produced by humic acid. Real water samples of different types were analysed, accurate results for ammonium concentration were obtained with both procedures in presence or absence of humic acids. Cationic and anionic surfactants inhibited the derivatization reaction at percentages up to 0.001% and 0.5%, respectively, and non-ionic surfactants at percentages of 5%.

\*corresponding author: Tel 34-96-3543002; Fax 34-96-3544436  
E-mail address: [pilar.campins@uv.es](mailto:pilar.campins@uv.es).

## 1. Introduction.

Humic substances are the most abundant dissolved organic compounds present in natural waters. The normal content of these compounds could varied from 1 to 20 mg L<sup>-1</sup> [1,2]. Although in some cases higher concentrations can be found [3]. Humic compounds are formed in soil and in aquatic systems during the degradation of plant and animal derived organic matter, and they play an important role in several environmental and geochemical processes [4]. They are generally characterized as being yellow to black in color. The structure of humic substances is believed to be a crosslinked network of organic chains containing functional groups such as carboxylic, aliphatic, aromatic, hydroxyl and amino, with empty spaces that can trap and bind other organic and inorganic compounds present in aquatic system [5]. For this reason the determination of several compounds potentially present in natural waters may be affected by their possible association with humic substances. For example, an important fraction of metals is complexed by humic substances, which should be considered specially in the determination of metals at trace levels [6].

Different strategies have been proposed for eliminating the negative effect produced by humic substances on the determination compounds of environmental relevance such as pesticides [7,8], polycyclic aromatic hydrocarbon [2] and several metals. Most of those methods are based on the isolation or the degradation of humic matter to release the target compounds during the sample treatment [9]. However, the presence of humic compounds has been not taken in consideration in many other determinations of environmental relevance. This is the case of ammonium which is an important indicator of water quality.

On the other hand, nowadays, surfactants are used in a wide range of applications. They are used in agriculture, households and different industries (metal working, mining, cosmetics, etc.). Thus, they could be present in natural [10], waste [11] and coastal [12] waters samples. They also has been proposed to remove humic acids from water samples [13,14], so they could be present in water after water-treatment plants. In addition they could interfere in the determination of some organic compounds [15] by interacting with the reagents, masking the analyte, modifying the signal or reducing the recovery of the analyte.

The most widely accepted method for the determination of ammonium in natural water is based on the Berthelot reaction [16]. In this method the samples are treated with phenol and an oxidizing agent, typically chlorine, to transform ammonium into indophenol blue, which is then determined colorimetrically. The original method has been subjected to numerous modifications, for example the replacement of phenol by less toxic reagents such as thymol or salicylate, and the addition of a catalyst [17,18]. We have recently described a modification for improving the sensitivity based on isolation onto SPE membranes of the indothymol blue formed and subsequent measurement of the diffuse reflectance. Possible interferences in the determination of ammonium by the indophenol-type reactions caused by potential interferents such as aliphatic amines, peptides, aminoacids and metals have been systematically evaluated [19]. However, to our knowledge, no similar studies have been undertaken with the humic substances and

surfactants in spite of fact that, as suggested in published studies, these compounds may be direct interferents in the determination of ammonium [20].

In this work we evaluated the effect of humic substances and surfactants present in polluted water samples in the quantification of ammonium at levels between 0.025 and 1.5 mg L<sup>-1</sup>. SPE-diffuse reflectance approach has been used in order to study low concentrations of ammonium

## **2. Experimental section.**

### 2.1. Apparatus.

For UV-vis measures a HP-8453 UV-vis spectrophotometer from Hewlett Packard (USA) furnished with 1-cm and 5-cm pathlength quartz cells were employed, absorption spectra were registered from 400 to 800 nm. Humic acid spectra were recorded from 200 to 900 nm.

Reflectance measures were done with the UV-vis spectrophotometer combined with a Labsphere RSA-HP-8453 reflectance spectroscopy accessory (d/8°) from Labsphere (Hewlett Packard, USA). Diffuse reflectance spectra were collected from 400 to 800, using a certified reflectance standard USRS-99-010 from Labsphere (Hewlett Packard, USA)

### 2.2. Chemicals and solutions.

All the reagents were of analytical grade, and all solutions were prepared in nanopure water from a Nanopure II system (Barnstead, USA). Ammonium chloride was purchased from Probus (Spain). Humic acid was obtained from Aldrich (Germany). Stock standard solution of ammonium and humic acids (100 mg L<sup>-1</sup>) were prepared by dissolving the pure reagents in water. Working standard solutions were prepared by diluting the stock solutions with water.

Sodium hypochlorite 15% was obtained from Probus (Spain). Solution of 3% and 5% (active chlorine) were prepared by diluting the adequate amount with water. Thymol and sodium salicylate (Riedel-de Häen, Seelze, Germany) 0.8 M were prepared dissolved the adequate amount in 2 M NaOH (J.T. Baker, Holland). Phenol solutions at a concentration 0.5 M were prepared by dissolving the pure compound (Probus Spain) in 0.625 M NaOH solution. Nitroprusside (Probus, Spain) at a concentration 0.1 M was used as a catalyst in the thymol and salicylate based method, whereas 3 mM manganese sulphate (Prolabo, Spain) was the catalyst in the variant using phenol.

Carbonate buffer 0.05 M was prepared by dissolving the appropriate amount of sodium carbonate (Panreac, Spain) and sodium hydrogencarbonate (Probus, Spain) to obtain pH 11.06. Sodium chloride was obtained from Prolabo (Spain). Surfactants cetyl trimethyl ammonium chloride (CETAB), benzalkonium chloride, nonylphenol and sodium dodecyl benzenesulfonate were also employed.

### 2.3. Procedures.

#### *Colorimetric methods:*

Indophenol method: 2 mL working standard solutions of ammonium, 0.35-1.4 mg L<sup>-1</sup>, were mixed with one drop of manganese sulphate, 0.5 mL of hypochlorite 5% active chlorine and variable phenol concentrations 0.005, 0.014 and 0.03 M. Total volume was 10.3 mL. A 5-cm pathlength cuvette was used to measure the adsorption spectra from 1 to 10 min, each 30 s. Absorbance measurements were done at 640 nm.

Indothymol method:

2 mL of ammonium working standard solutions, from 0.25 to 1 mg L<sup>-1</sup>, was mixed with 40 µL of carbonate buffer, 5 µL of hypochlorite 5% and 20 µL of nitroprusside. The resulting solution was mixed during 1 min. Then, 0.1 mL of thymol (0.8 M) was added and the absorbance measurement was done after 5 min of reaction time at 690 nm.

Salicylate method: The derivatization procedure was that described in the above section, the thymol solution was replaced by 0.8 M salicylate and absorbance measurements were done at 690 nm. Ammonium working range was from 0.25 to 1.0 mg L<sup>-1</sup>.

All the measurements were done in triplicate unless stated otherwise.

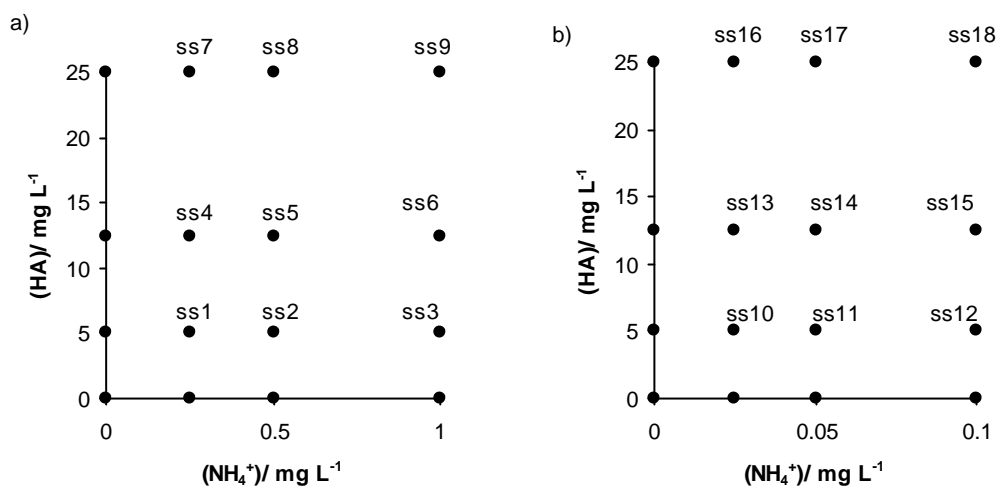
*SFE/diffuse reflectance method:*

Thymol derivatives were formed by mixing 10 mL of ammonium working standard solution (at concentrations ranging from 0.025 and 0.25 ppm) with 200 µL of carbonate buffer, 25 µL of HClO 3% and 100 µL of nitroprusside. The mixture was agitated, and then 0.5 mL of thymol were added. After 5 min the resulting solution was passed through a quarter part of C18 Empore extraction disks (Varian, USA), previously conditioned with 2 mL of MeOH and 0.5 mL of CETAB 1% (m/v). Samples, reagents and standards were passed through the extraction membranes by means of a solvent filtration unit at a flow rate of 2 mL min<sup>-1</sup>. Reflectance measurements were done at 675 nm. Measurements were done in duplicate, unless state otherwise.

#### 2.4. Synthetic water samples.

Synthetic samples named ss1 to ss18 were done adding different concentrations of humic acid to ammonium solutions, as can be seen in **Figure 1a** and **Figure 1b** for the colorimetric method and SFE/reflectance method, respectively. Concentrations of ammonium were from 0.25 to 1 mg L<sup>-1</sup> (colorimetric method) and from 0.025 to 0.1 mg L<sup>-1</sup> (SFE/diffuse reflectance method). Concentrations of humic acid in the samples were 5, 12.5, 25 mg L<sup>-1</sup>. Blanks containing humic acids were also processed. Derivatization was effected with thymol as derivatizing reagent.





**Figure 1.** Concentrations of ammonium and humic acid in synthetic samples.

## 2.5. Real water samples.

Thymol was used as derivatizing reagent and colorimetric as well as reflectance procedure were applied. Sample rs1 (lake), rs2 (river), rs3 (dam), rs4 (irrigation ditch), rs5 (irrigation ditch) and rs6 (muddy puddle) were natural waters. Sample rs7 was obtained from a water-treatment plant after the cleaning. Sample rs8, rs9, rs10 and rs11 were washing waters from a detergent factory. All these samples were from Comunidad Valenciana, (Spain). They were analysed with the colorimetric or SFE/reflectance methods depending on the concentration of ammonium.

## 3. Results and discussion.

### 3.1. Preliminary studies.

Three reagents proposed in the literature have been evaluated and compared: phenol, thymol and salicylate. For phenol variant different concentrations of the reagent as well as different reaction times were assayed. For a fixed concentration of ammonium and a fixed reaction time, maximum absorbances were obtained using concentrations of reagent between 0.014-0.03 M (data not shown). Taking into account the toxicity of the reagent, a concentration of phenol 0.014 M was selected for further experiments. For this concentration, maximum absorbances were achieved with a reaction time of 3 min. The analytical parameters achieved in such conditions for standard solutions of ammonium in the 0.35-1.4  $\text{mg L}^{-1}$  range are shown in **Table 1**.

**Table 1.** Analytical parameters obtained for different phenol-type reagent with the colorimetric method and for thymol with SPE/ diffuse reflectance method.

Method	Derivatizing reagent	Analytical Parameters						
		$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	n	S <sub>x/y</sub> /b	LOD (mg L <sup>-1</sup> )	RSD (%)
Colorimetric	<i>Phenol</i>	0.060±0.020	0.587±0.014	0.998	11	0.036	0.160	2.7
	<i>Thymol</i>	0.030±0.010	0.514±0.019	0.998	11	0.048	0.046	1.4
	<i>Salicylate</i>	0.031±0.006	0.400±0.010	0.994	11	0.035	0.051	8.4
SFE/ reflectance	<i>Thymol*</i>	56.1±0.7	-185±13	0.9902	5	0.005	0.011	7.0

When using thymol as derivatization reagent the reaction conditions were selected according to [19]. The results obtained in the quantification of ammonium within the 0.25 to 1 mg L<sup>-1</sup> concentration range are also summarised in **Table 1**. The same conditions were also adopted for the measurement of ammonium (0.25 to 1 mg L<sup>-1</sup>) in the variant using salicylate (see also Table 1).

As derived from **Table 1**, the three procedures provided adequate linearity within the tested concentration intervals, although the detection limit (LOD) attainable with phenol was significantly higher. The LODs of the variants using thymol and salicylate were comparable. However, the employment of thymol lead to more reproducible results. Taking into account the above results thymol was selected as the best option to quantify ammonium by the colorimetric approach. The dependence of sensitivity as function of pH was evaluated when using thymol as derivatizing reagent. The slopes of the calibration curves were 0.150, 0.260 and 0.514 mg L<sup>-1</sup> at pH 9.02, 10.7 and 11.06, respectively. Sensitivity was maximum at 11.06. Therefore pH 11.06 was selected for further studies.

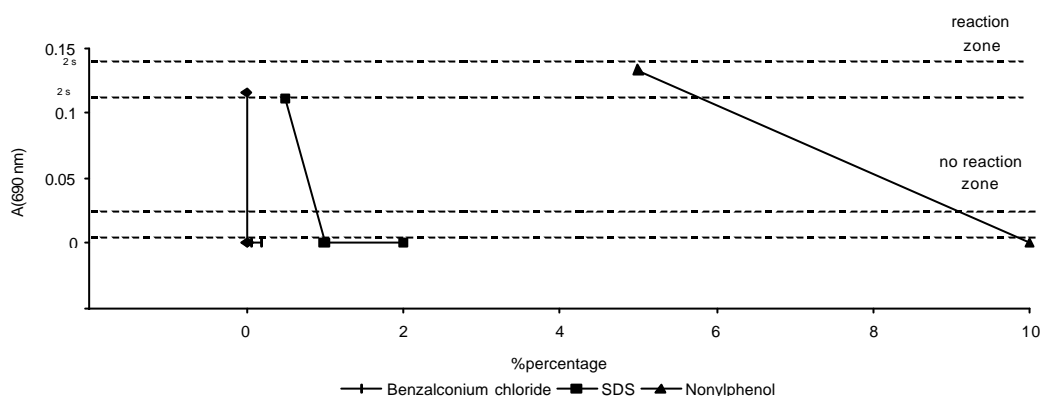
The analytical data obtained for ammonium within the 0.025-0.25 mg L<sup>-1</sup> concentration interval by SPE/diffuse reflectance method are also listed in **Table 1**. As observed, the SPE/reflectance based method also provided satisfactory linearity and precision and improved sensitivity, which is consistent with that observed previously [19].

The spectra of humic acid solutions within 5 and 100 mg L<sup>-1</sup> concentration range were directly measured in order to obtain a calibration curve of humic substances. Calibration curve at 300 nm was:  $y = (0.0172 \pm 0.004)x + (0.06 \pm 0.02)$ ,  $R^2 = 0.9961$  and  $S_{xy} = 0.0459$ . These calibration parameters would be useful to calculate the amount of humic substances in real water samples.

### 3.2. Influence of surfactants in the derivatizing reaction.

The effect of surfactants was evaluated by measuring blanks and ammonium solution (0.5 mg L<sup>-1</sup>) in the presence of different percentages of benzalkonium chloride (cationic), sodium dodecyl benzenesulfonate (anioninc) and nonylphenol (non-ionic).

**Figure 2** shows the effect of surfactants in the ammonium absorbance signal. As can be seen nonylphenol was not an interferent at percentage lower than 5%. Dodecil benzenesulfonate from 0.2 to 2% was studied. The results showed that percentages higher than 0.5% interfere in the proposed method. The formation of the indothymol blue derivate was not possible if benzalkonium chloride was present at percentages higher than 0.001%. Therefore, the proposed procedure could not be applied to samples with those contents of anionic, cationic and non-ionic surfactant because they inhibit the formation of the derivate.



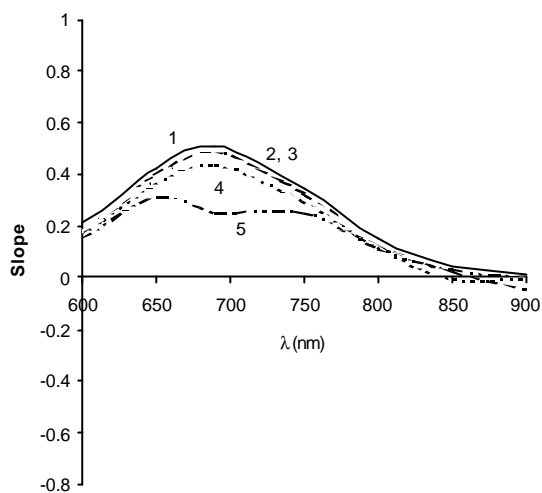
**Figure 2.** Effect of the cationic, anionic and non-ionic surfactants tested in the absorbance signal of ammonium.

### 3.3. Influence of humic acid.

Ammonium concentrations between  $0.25$  and  $1 \text{ mg L}^{-1}$ . **Figure 3** shows the slopes of the calibration curves obtained for ammonium by the colorimetric method within the tested wavelength interval in the presence of different amount of humic acid. The slopes obtained for ammonium were only significantly modified in the presence of humic acid at concentration equal or higher than  $25 \text{ mg L}^{-1}$ .

**Table 2** shows the calibrations equations obtained in presence of different amounts of humic acid at  $690 \text{ nm}$ . The application of a *t-test* demonstrate that the slopes of the calibrations curves from standard containing between  $5$  and  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$  of humic acid were statistically comparable to that obtained in absence of humic acid (see **Table 1**). At concentrations of  $25$  and  $50 \text{ mg L}^{-1}$  the values obtained were different. The matrix effect increased as function of humic acid in the samples. An increase of the ordinate value was obtained in reference to that achieved in absence of humic acid (**Table 1**) when humic acid was present at  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

The solutions were stored and measured every day during seven days in order to study the effect of time in the possible absorption or liberation of ammonium from the humic acid. No significant differences were found in the slopes of ammonium calibration curves. The %RSD calculated from the seven slopes of the ammonium calibration curves were 5%, 4% and 4% for standards containing humic acid at  $5 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $12.5 \text{ mg L}^{-1}$  and  $25 \text{ mg L}^{-1}$ , respectively.



**Figure 3.** Slopes of the linear calibration curves as function of wavelength obtained with the colorimetric based method for ammonium determination  
 1: without HA, 2: HA 5 mg L<sup>-1</sup>, 3: HA 12.5 mg L<sup>-1</sup> and 3: 25 mg L<sup>-1</sup>.

Ammonium concentration between 0.025 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>: **Figure 4** shows the slopes of the calibration lines obtained for ammonium by the SFE/reflectance diffuse method within the tested wavelength range in the presence of different amounts of humic acid. The slopes of the calibration curves were affected by the presence of humic acid at 5, 12.5 and 25 mg L<sup>-1</sup>.

The equations obtained for ammonium (**Table 2**) showed matrix effect (slopes statistically different to those obtained in absence of humic acid) even for the lowest concentration of humic acid assayed (5 mg L<sup>-1</sup> HA). The ordinate was also modified as compared to that obtained in absence of humic acid (**Table 1**).

**Table 2.** Analytical parameters for ammonium determination in the presence of different amounts of humic acid with standard addition method

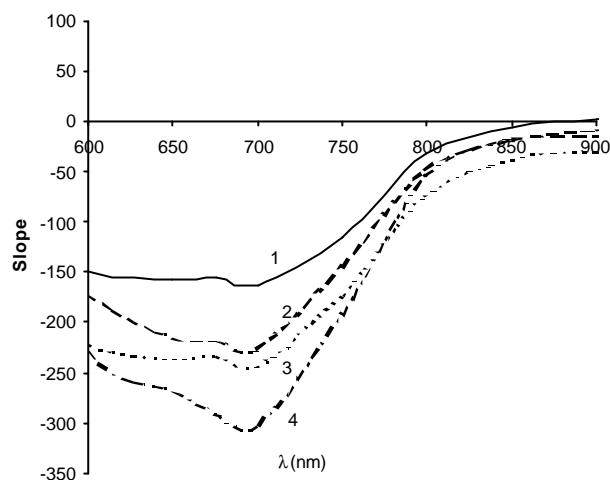
Method	Humic acid (mg L <sup>-1</sup> )	Analytical parameters in presence of humic acid				
		a ±s <sub>a</sub>	b±s <sub>b</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>	n	S <sub>x/y</sub> /b
<i>Colorimetric</i>	5	0.008±0.006	0.490±0.010	0.995	4	0.029
	12.5	0.062±0.004	0.501±0.008	0.997	4	0.019
	25	0.023±0.007	0.430±0.010	0.994	4	0.033
	50	0.094±0.006	0.380±0.010	0.993	4	0.030
<i>SFE/reflectance</i>	5	43.6±0.8	-225±15	0.991	4	-0.005
	12.5	46±1	-234±24	0.979	4	-0.008
	25	46±1	-295±22	0.989	4	-0.005

### 3.4. Analysis of water samples.

Several synthetic samples and eleven real water samples were analysed. Colorimetric method was used for high ammonium content samples and SFE/reflectance for samples with low content of ammonium.

Colorimetric method was used for synthetic samples (ss1 to ss9) (see Figure 1a) and SFE/reflectance method was used for synthetic samples from ss10 to ss18 (see Figure 1b). Ammonium concentration in samples ss1, ss2, ss3,ss4, ss5 and ss6 was determined with the calibration curves obtained with standards, because no influence of humic acid was observed. For samples ss7, ss8 and ss9 until ss18, GHPSAM was employed to determine the concentration of ammonium because the humic acid introduced bias error as it has been demonstrated in the previous section.

GHPSAM [21] method (see *appendix A*) chooses the spectral zones where the interference is linear and avoids its contribution by working with trios of wavelengths and also corrects the matrix effect. The working wavelengths selected for the colorimetric method were 650, 690 and 800 nm and for SPE/reflectance, the wavelengths were 650, 675 and 800 nm. As two examples **Figure 5** shows the graphics  $A''/M''$  or  $R''/M''$  vs  $I$  for sample ss8 and rs6. These graphics shows the zones of the spectra where the interference can be considered linear.



**Figure 4.** Slopes of the linear calibration curves as function of wavelength obtained with the SFE/reflectance method for ammonium determination: 1: without HA, 2: HA 5 mg L<sup>-1</sup>, 3: HA 12.5 mg L<sup>-1</sup> and 4: 25 mg L<sup>-1</sup>.

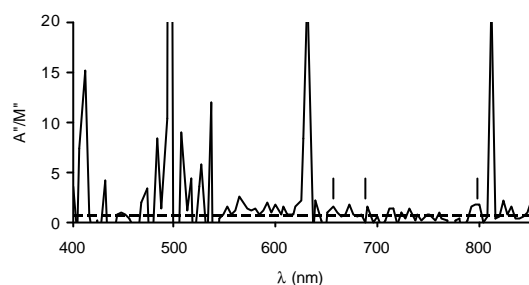
**Table 3** and **Table 4** give the obtained recoveries and found concentration of ammonium in the synthetic samples (from ss1 to ss18), respectively. When the GHPSAM method was used (see **Table 4**) the values of  $M_j$ ,  $M_R$  and  $M_k$  in equation A.8 of the Appendix were the slopes obtained of the calibrations graphs with standards containing the correspondent humic acid concentration at the three wavelengths (650 nm, 675 nm and 800 nm and 650 nm, 675 nm and 800 nm for colorimetric and SFE/reflectance method, respectively). Good recovery values and suitable ammonium concentration were obtained in all cases as results of **Table 3** and **Table 4** show.

Different real water samples were processed by the colorimetric method or by the SPE/diffuse reflectance method and if possible with both methods. Firstly, the presence or absence of humic acids was tested by registering the spectrum between 200 and 900 nm. The spectra for samples rs1, rs2, rs3, rs4, rs5, rs8, rs9, rs10 and rs11 indicated the absence of humic acid.

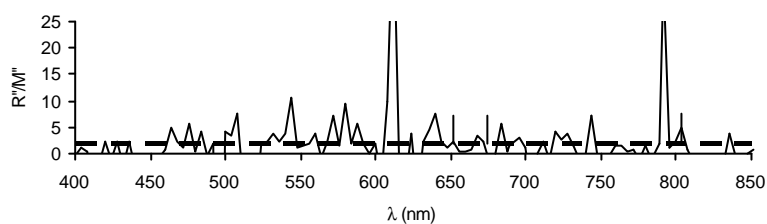
The ammonium concentrations in samples rs1, rs8 and rs11 were calculated from the standard calibration graphs (**Table 1**) because matrix effect was absent. Spikes with known ammonium concentrations of rs1 and rs8 samples were also analysed and good recoveries were obtained (see **Figure 6**). Sample rs11 was only analysed by the colorimetric method due to its high level of ammonium.

Concentrations of ammonium in samples rs2 and rs3 were established by the MOSA method due to existence of matrix effects produced by other components of the matrix different to humic acid or surfactants. By using the slope of the MOSA calibration curve and considering the signal corresponding to the spike of ammonium added, good recovery values were obtained as can be seen in **Figure 6**.

a)



b)



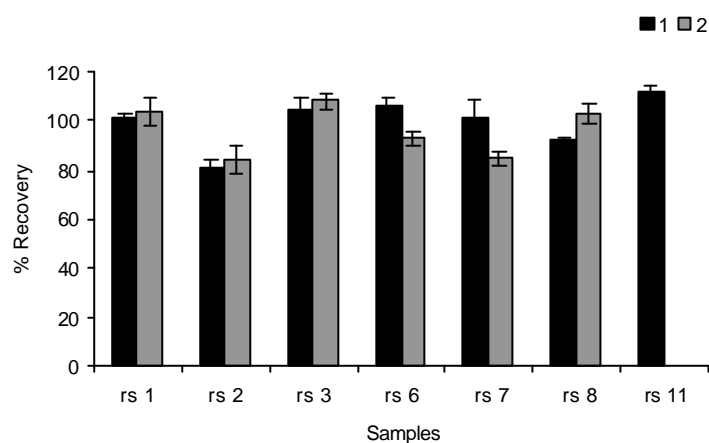
**Figure 5.** Graphics a)  $A''/M''$  vs  $\lambda$  for synthetic samples *ss8* and b)  $R''/M''$  vs  $\lambda$  for real water sample *rs6*.

For samples *rs4* and *rs5* the SFE/diffuse reflectance method established ammonium concentrations below detection limit ( $0.011 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Samples *rs6* and *rs7* presented black and yellow appearance respectively owing to humic acid. The concentration of humic acid was calculated from the humic acid calibration curve at  $300 \text{ nm}$ . Those values were  $15 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$  and  $4.6 \pm 0.1 \text{ mg L}^{-1}$  for sample *rs6* and *rs7*, respectively. The application of GHPSAM was necessary for these samples with SFE/diffuse reflectance. Table 4 gives the values of the found concentration of ammonium in those samples. GHPSAM was used to estimate ammonium concentration and to calculate the recovery for spiked *rs6* and *rs7* samples, measured with SFE/reflectance. As  $M_j$ ,  $M_i$  and  $M_k$  values in *equation A.8* of the appendix were used the slopes of the MOSA method at wavelengths  $650 \text{ nm}$ ,  $675 \text{ nm}$  and  $800 \text{ nm}$ . **Figure 6** shows that the recoveries achieved were adequate.

**Table 3.** Recoveries for synthetic samples obtained with the GHPSAM with both methodologies.

Humic acid (mg L <sup>-1</sup> )	Colorimetric method		SFE/reflectance method	
	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> ) added	%Recovery	[NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ] (mg L <sup>-1</sup> ) added	%Recovery
5	0.25	104 ± 5	0.025	108
	0.5	94 ± 6	0.05	120
	1	101 ± 3	0.1	96
12.5	0.25	113 ± 2	0.025	106
	0.5	94 ± 4	0.05	121
	1	102 ± 2	0.1	115
25	0.25	107 ± 8	0.025	82
	0.5	104 ± 2	0.05	84
	1	101 ± 10	0.1	94



**Figure 6.** Recoveries for real water samples spiked with 0.25 mg L<sup>-1</sup> with 1: colorimetric and 0.025 mg L<sup>-1</sup> with 2: SFE/ reflectance methods.



**Table 4.** Ammonium concentration and %Er for synthetic and real water samples.

	Influence of humic acid. GHPSAM	MOSA	Ammonium concentration; Relative error (%Er)	
			Colorimetric method (n=3)	SFE/Reflectance method (n=3)
<i>Synthetic samples</i>				
ss1	-	-	0.26±0.01; 4	-
ss2	-	-	0.47±0.03; -6	-
ss3	-	-	1.01±0.03; 1	-
ss4	-	-	0.28±0.04; 12	-
ss5	-	-	0.47±0.02; 6	-
ss6	-	-	1.02±0.02; 2	-
ss7	X	-	0.27±0.02; 8	-
ss8	X	-	0.52±0.01; 4	-
ss9	X	-	1.0±0.1; 0	-
ss10	X	-	-	0.027; 8
ss11	X	-	-	0.060; 20
ss12	X	-	-	0.096; -4
ss13	X	-	-	0.026; 4
ss14	X	-	-	0.060; 20
ss15	X	-	-	0.11; 10
ss16	X	-	-	0.020; -20
ss17	X	-	-	0.042; -16
ss18	X	-	-	0.094; -6
<i>Real samples</i>				
rs1	-	-	0.93 ± 0.13	1.15 ± 0.03*
rs 2	-	X	3.9 ± 0.1	3.78 ± 0.01*
rs 3	-	X	0.52 ± 0.05	0.56 ± 0.01
rs 6	X	-	0.50 ± 0.06	0.44 ± 0.02
rs 7	X	-	0.58 ± 0.08	0.59 ± 0.03
rs 8	-	-	0.63 ± 0.01	0.67 ± 0.03
rs 11	-	-	8.9 ± 0.2	-

Sample rs8, rs9, rs10 and rs11 were samples polluted with surfactants. Samples rs8 and rs11 were spiked with 0.25 mg L<sup>-1</sup> of ammonium. Figure 6 shows the recoveries achieved, as can be seen, there was not matrix effect, as percentages were near 100%. Therefore, ammonium concentrations in samples rs8 and rs11 were calculate with the calibration curve obtained with standards. Table 4 shows the results obtained. Any blue deriviate was obtained for samples rs9 and rs10. They were polluted samples with unknown concentrations of SDS and benzalkonium chloride. Those results indicated the presence of detergents at amounts producing the inhibition of the reaction. Then, the ammonium concentration can not be estimated by the indophenol based method.

#### 4. Conclusions.

In this work we have evaluated the effect of humic substances and surfactants on the determination of ammonium by a method based on the indophenol-type reaction. Two approaches have been tested and compared, the classical colorimetric method for ammonium concentrations between 0.25 and 1 mg L<sup>-1</sup> and the previously developed method which uses SPE and diffuse reflectance spectroscopy for ammonium concentrations between 0.025 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>.

The effect of surfactants in the formation of the derivate was evaluated. In general, they inhibit the formation of the thymol-ammonium derivate. The limiting percentage of surfactants are 0.5% for anionic, 0.001% for cationic and 5% for non-ionic surfactants. Therefore, another method must be applied for ammonium determination in those cases.

Humic substances cause a negative effect on the response obtained for ammonium, but in the colorimetric method the effect is negligible for concentrations of humic acid smaller than 25 mg L<sup>-1</sup>. Since in the most natural water the expected level for humic substances is lower than 6 mg L<sup>-1</sup>, the determination of ammonium would be not affected if present between 0.25 and 1 mg L<sup>-1</sup>. For samples with high contents of humic acid, this interference can be corrected by applying the GHPSAM method.

In the analysis of samples containing ammonium at lower concentration levels (between 0.025 and 0.25 mg L<sup>-1</sup>) the SPE/diffuse reflectance method has to be applied. This method showed less tolerance to humic acids. Nevertheless, in the presence of such substances, the GHPSAM can be used to eliminate the error due to the absorbent blank.

The influence of surfactants and humic acid on the quantification of ammonium was observed in some of the real water samples tested. The GHPSAM was necessary for two samples which contained humic acid at significative levels. If the matrix effect is caused by other components of the matrix, MOSA was employed to correct it, that was the case of two real water samples.

#### Acknowledgement.

The authors would like to thank to the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for financial support received for the **Project BQU2003-06138**. Y. Moliner Martínez expresses her grateful to Ministerio de Educación, Cultura y Deporte of Spain for her pre-doctoral grant.

#### References.

- [1] De Wuilloud J.C.A., Wuilloud R.G., Sadi B.B.M. and Caruso J.A. *Analyst*. 128 (2003) 453.
- [2] Li N. and Lee H.K. *J Chromatogr A*. 921 (2001) 255.
- [3] Achterberg E., Braungart C., Sandford., R. and Worsfold P. *Anal. Chim Acta* 440 (2001) 27.
- [4] Zwiener C. and Frimmel F.H. *Anal Bioanal Chem*. 378 (2004) 862.
- [5] Avena M.J., Vermeer A.W.P. and Koopal L.K. *Colloids and Surfaces* 151 (1999) 213.
- [6] Lin H-T, Wang M.C and Li G-C. *Chemosphere* 56 (2004) 1105.
- [7] Schellin M., Hauser B. and Popp P. *J Chromatogr A* 1040 (2004) 251.

- [8] Li H-P, Li G-C and Jen J-F. *J Chromatogr A* 1012 (2003) 129.  
 [9] Zhao L. And Zhu L. and Lee H.K. *J Chromatogr A* 963 (2002) 239.  
 [10] Shao B., Hu J. and Yang M. *J Chromatogr A*. 950 (2002) 167.  
 [11] Barcelo D. *et all.* *J Chromatogr A* 889 (2000) 195.  
 [12] Riu J., Eichhorn P., Guerrero J.A., Knepper Th. and Barceló D. *J Chromatogr A* 889 (2000) 221.  
 [13] Koopal L., Goloub T. and Davis T. *J. Colloid and Interface Science.* 275 (2004) 360.  
 [14] Zouboulis A., Ioannis W. and Katsoyiannis A. *Colloids and Surfaces* 231 (2003) 181.  
 [15] Madichie C., Greenway G.M. and McCreedy T. *Anal. Chim. Acta* 392 (1999) 39.  
 [16] Díaz Santos S.A. *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales.* Ed. Apha-Awwe-WPCF . Ed 1992.  
 [17] Okamura M., Fujinaga K., Seine Y. and Honda S.. *Fresenius, J. Anal. Chem.* 365 (1999) 467.  
 [18] Lau K.T., Edwards s. and Diamond D. *Sensors and Actuators B* 98 (2004) 12.  
 [19] Moliner Y, Herráez R and Campíns. *Anal. Chim. Acta. In press*  
 [20] Lambropoulou D.A., Sakkas V.A. and Albanis T.A. *J Chromatogr A* 952 (2002) 215.  
 [21] Campíns P., Bosch F., Verdú J. *Anal. Chim Acta* 315 (1995) 267.  
 [22] Tortajada L.A, Campíns P., Blasco F. and Bosch F. *Analyst.* 125 (2000) 771.

#### APPENDIX A: GHPSAM THEORETICAL BACKGROUND.

The GHPSAM makes it possible to estimate the concentration of an analyte in presence of an unknown interferent. The first step to apply the GHPSAM is the location of linear intervals in the interferent spectrum.

Let us assume that X is the analyte or the selected form of it to be determined and Z is the unknown global interference. If the spectral behaviour of the interferent Z ( $A_{z,j}$ ) in the range of wavelengths  $I_l$ - $I_m$ , can be described as a straight line with an  $a$  intercept and a  $b$  slope then it can be written:

$$A_{z,j} = a + b I_j \quad I_j \in [I_l, I_m] \quad [\text{A.1}]$$

The absorbance of the sample S at each wavelength in the interval selected will be the sum of the absorbances of X at a concentration  $c_x$  and of Z:

$$A_{s,j} = A_{x,j} + A_{z,j} = M_{x,j} c_x + a + b I_j \quad [\text{A.2}]$$

where  $A_{x,j}$  is the absorbance at  $I_j$  of X and  $M_j$  is the molar absorption coefficient and the optical path product (or related measure) at  $I_j$  of the analyte X.

The second derivative absorbance of the sample with regard to the wavelength in this interval is:

$$A_{s,j}^* = \frac{d^2 A_{x,j}}{dI^2} + \frac{d^2 A_{z,j}}{dI^2} = M_j^* c_x \quad [\text{A.3}]$$

Equation [A.3] can be re-written as:

$$\frac{A_{S,j}''}{M_j''} = c_X \quad [\text{A.4}]$$

Thus, when plotting the values of the ratio  $A_{S,j}''/M_j''$  vs.  $I_j$  constant values equal to the analyte concentration will be obtained in those intervals where the interferent spectrum presents a linear behaviour.

Three wavelengths  $I_j$ ,  $I_k$  and  $I_l$  within the interferent linear interval  $[I_j, I_m]$  must be selected to calculate the concentration of the analyte. The absorbance of the sample at those wavelengths, considering that the standard addition method has been followed, can be written as:

$$\begin{aligned} A_{S,j} &= M_{X,j} c_X^0 + M_{X,j} c_X^i + a + b I_j \\ A_{S,k} &= M_{X,k} c_X^0 + M_{X,k} c_X^i + a + b I_k \\ A_{S,l} &= M_{X,l} c_X^0 + M_{X,l} c_X^i + a + b I_l \end{aligned} \quad [\text{A.5}]$$

where  $c_X^0$  is the analyte concentration in the sample,  $c_X^i$  is the analyte added concentration (the  $i$  superscript denotes the different standard additions) and  $M_{X,j}$ ,  $M_{X,k}$  and  $M_{X,l}$  are the slopes of the calibration lines (or the molar absorption coefficients or related measure) at  $I_j$ ,  $I_k$  and  $I_l$  of the analyte X.

Two parameters,  $p$  and  $q$ , can be defined as:

$$p = \frac{I_k - I_j}{I_l - I_j} \quad q = \frac{I_l - I_k}{I_l - I_j} \quad [\text{A.6}]$$

and also two lines can be defined as the weighted differences between  $A_{S,j}$  and  $A_{S,l}$  and between  $A_{S,j}$  and  $A_{S,k}$

$$\begin{aligned} q \mathbf{DA}_{S,k,j} &= q (A_{S,k} - A_{S,j}) = q \mathbf{DM}_{k,j} c_X^0 + q (A_{Z,k} - A_{Z,j}) + q \mathbf{DM}_{k,j} c_X^i \\ p \mathbf{DA}_{S,l,k} &= p (A_{S,l} - A_{S,k}) = p \mathbf{DM}_{l,k} c_X^0 + p (A_{Z,l} - A_{Z,k}) + p \mathbf{DM}_{l,k} c_X^i \end{aligned} \quad [\text{A.7}]$$

These two lines permit the calculation of the concentration of the analyte from the abscissa of their intersection point, the so-called H point ( $-c_H$ ,  $\mathbf{DA}_H$ ), where  $c_H$  is equal to  $c_X^0$ , the analyte concentration in the sample:

$$-c_H = \frac{q \mathbf{DA}_{S,k,j} - p \mathbf{DA}_{S,l,k}}{q \mathbf{DM}_{k,l} - p \mathbf{DM}_{l,k}} = \frac{A_{X,k}^0 - q A_{X,j}^0 - p A_{X,l}^0}{q M_j + p M_l - M_k} \quad [\text{A.8}]$$

From this expression we can optimise the wavelengths ( $I_j$ ,  $I_k$  and  $I_l$ ) to be those that make bigger the denominator in equation [A.8], in order to obtain the most accurate results.

**Apéndice 4.**  
**REVISED PAPER.**

**A guide for selecting the most appropriate method for ammonium estimation as  
function of water analysis requirements.**

C. Molins-Legua, S. Meseguer-Lloret, Y. Moliner-Martinez and P. Campíns-Falcó\*

*Department de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Valencia  
C/Dr. Moliner 50, E46100- Burjassot, Valencia. SPAIN*

**ABSTRACT**

A critical evaluation of the main parameters involved in the determination of ammonium in water samples by different methods have been performed in order to select the most suitable one depending on the analysis requirements. Several methods have been compared: Reference methods (ISE, Nessler and indophenol), Roth's modified method, a method based on luminol reaction and a method based on peroxioxalate reaction.

\*corresponding author: Tel 34-96-3543002; Fax 34-96-3544436  
E-mail address: [pilar.campins@uv.es](mailto:pilar.campins@uv.es)

## 1. Introduction.

Nitrogen is an essential nutrient for all forms of life, and even small changes in biologically available nitrogen levels can dramatically affect the levels of microbiological, plants and eventually animal life. In water the toxic unionised ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and the relatively non-toxic ionized form, ammonium ion ( $\text{NH}_4^+$ ) exists. In the pH range of most natural waters, ammonia nitrogen will exist mainly as  $\text{NH}_4^+$ . Both are easily converted into the other with the ratio of ammonia to ammonium being largely dependent upon pH, salinity and temperature. Ammonium is predominant when the pH is below 8.75, and ammonia is predominant above pH 9.75. Total ammonia (TAN) is the sum of ammonium and ammonia concentrations.

In water samples it is important to know TAN concentration in order to understand nitrogen biogeochemistry in aquatic ecosystems, to have an overall picture of the environmental impact of pollutants and human actions [1] or to detect eutrophication stage. In such case it will be necessary to estimate TAN quantitatively. Other interest is its estimation as a water quality parameter, expressed as ammonium. The maximum accepted levels of ammonium depend on the water type. **Table 1** shows the European legislation applicable to some types of water samples and the WHO guide value. In addition the maximum concentration allowed is also given. In such case, it could be interesting to know if the legislation is satisfied and then, a qualitative test employing a rapid method could be of use. In the case of swing water, it is necessary to know the exact ammonium concentration in order to find out the tendency to eutrophication. Therefore the ammonium analysis could be performed with distinct aims, and the analytical procedure required would be different.

**Table 1.** WHO guide value and European legislation and maximum concentrations for ammonium as function of the type of water.

Type of sample		European Legislation	Maximum concentration allowed ( $\text{mg L}^{-1}$ )
Drinking water	-	EEC/98/83	0.5
Superficial water destined to consumption	WHO (guide value)	EEC/98/83	1.5
Swing water (included seawater)	-	-	*
Waste water.	-	EEC/91/271	20, expressed as N total

The limit value does not exist, but this parameter should be measure when tendency to eutrophication can exist

The selection of a procedure is of crucial importance. It determines the cost of the analysis in terms of instrumental effort and personnel involved. This selection is also influenced by framework conditions such as size of sample, time, availability and prior information about the content of the sample. The aim of this paper has been to evaluate

several ammonia/ammonium procedures, in order to help in the selection of the most appropriate method depending on the ammonium analysis requirements. The evaluated methods are the nessler method, the selective electrode, indophenol type methods, Roth's fluorimetric method and two based on the measurement of chemiluminescence generated by the luminol and TCPO reagents. To demonstrate the quality of these analytical methods some characteristic such as sensitivity, limit of detection, limit of quantification, working range and linearity, precision (repeatability, reproducibility), accuracy/trueness, recovery, selectivity/ specificity have been compared. Other parameters, which are not directly related with the analytical properties, but can be decisive in the selection procedure, such as sample volume, applicability depending on the sample type, reagents used (amount, toxicity, dangerous, safety), instrumentation (cost, availability), analysis time, capability of automatization, cost of analysis (, have been evaluated.

## 2. Experimental.

The apparatus and reagents employed are described in the references in which the methods are based on.

*Nessler method [2].:* In a plastic cuvette were place variable volumes of ammonium stock standard solutions or 0.05 mL of sample S2 (residual water) , 10  $\mu$ L of 0.177 M sodium-potassium tartrate and water up to constant volume (2.4 mL).0.1 mL of Nessler reagent was added to the mixture and 0.1 mL NaOH was added when NR2 was used. The reaction was assumed to start after the addition of the last drop of reagent. Absorbance signal at 425 nm was measured against water blank.

*Indopheno [3]l:* 2 mL working standard solutions of ammonium, 0.35-1.4  $\text{mg L}^{-1}$ , were mixed with one drop of manganese sulphate, 0.5 mL of hypochlorite 5% and phenol at concentration 0.014 M. Total volume was 10.3 mL. A 5-cm pathlength cuvette was used to measure the adsorption spectra from 1 to 10 min, each 30 s. Absorbance was measured at 640 nm.

*Indothymol [7]:* 1.8 mL of standard solutions of ammonium or water samples S1 (irrigation ditch water), S4 (lake water) and S7 (dam water) were mixed with 0.08 mL of 0.05 M carbonate buffer, 0.4 mL of 0.1 M nitroprusside and 0.01mL of HClO 3 % (Cl active). After 1 min 0.08 mL of a solution of 0.8 M thymol were added, and the mixture was lead to react for five minutes. Finally, the reaction mixture was transferred to a quartz cell for measurement of the absorbance at 690 nm. The solutions of thymol, HClO and nitroprusside were prepared by dissolving the commercial reagents in water. The carbonate buffer (0.05 M) was prepared by dissolving sodium carbonate in water. Then the pH was adjusted to 10.7 with 1 M NaOH.

*SPE-indothymo[7]l:* Based in previous works, thymol derivates were done by mixing 10 mL of ammonium working standard solution (from 0.025 and 0.25 ppm) with 200  $\mu$ L of carbonate buffer, 25  $\mu$ L of HClO 3% and 100  $\mu$ L of nitroprusside. After 1 min agitating, 0.5 mL of thymol was added. Reaction time was 5 min. The resulting solution

was passed through the C18 Empore extraction disks, previously conditioned with 2 mL of MeOH and 0.5 mL of CETAB 1%. After, diffuse reflectance was measured at 675 nm.

Analysed samples were S1: irrigation ditch, S4: lake water, S5: River water, S6: dam water and S7: water from a treatment plant. Samples S1, S5, S6 and S7 2.5 were diluted four times (2.5 mL to 10 mL) and sample S4 was diluted six times (1.67 in 10 mL).

*ISE method* [2]: 0.25 mL of 10 M NaOH was added to 25 mL of standard or 20 mL of sample S2 (residual water). Potential measurement was registered when potential value remains constant one minute with time.

*Modified's Roth's* [12]: In a quartz cuvette were place variable volumes of ammonium stock solution and nanopure water if necessary up to volume of 1 mL, 0.1 mL of borate buffer 0.5 M (pH 10.8) and 0.9 mL of OPA-NAC reagent. Signal was obtained at 5 min at  $\lambda_{ex}=415$  nm and  $\lambda_{em}=485$  nm. Volume of sample for S3, S5 and S6 was 0.8 mL and for sample S2 (residual water) was 0.05 mL diluted to 0.8 mL.

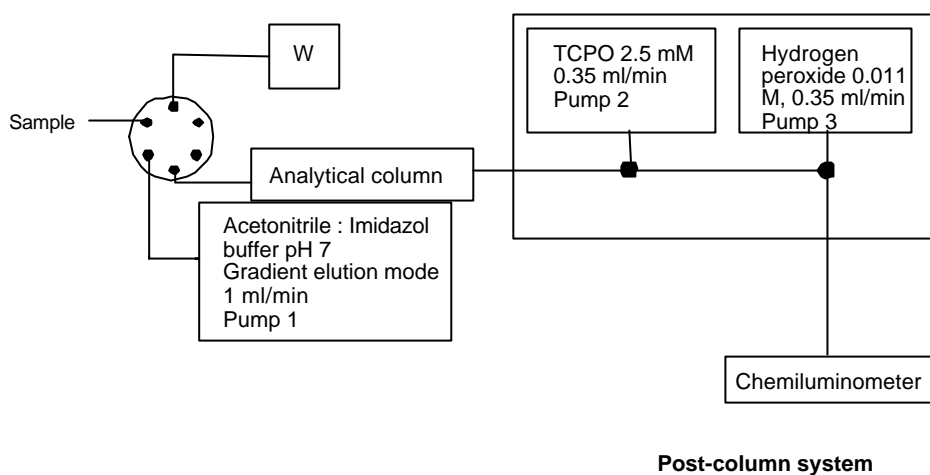
*TCPO method* [15]: The assembly used for this work is shown in Figure 1A. Reagents and mobile phases are also shown. Working amine solutions were prepared by diluting the standard solutions in water. Dns-Cl 12.5 mM solution was prepared by dissolving the pure compound in acetone. A mixture 2:3 v/v of Dns-Cl in acetone and carbonate solution (33.3 mM) pH 9.5, was daily prepared. All solutions were stored in the dark at 4 °C. *Extraction and derivatization into solid-phase supports*: SPE cartridges were conditioned with 1.0 ml of methanol, followed by 1.0 ml of carbonate buffer 10 mM (pH=12). Variable volumes of standard solution (1 to 25 ml) or 0.64 mL for samples S3 (fountain water) and 1.5 mL for sample S8 (sea water) sample were then transferred to the cartridges. 0.5 ml of 5 mM reagent (DNS-Cl in acetone:hydrogen carbonate buffer solution (pH=9.5, 33.3 mM), 2:3 v/v) was flushed through the cartridges, which were incubated at 110 °C for ten minutes. The derivatives were desorbed from the cartridges with 0.5 or 1 ml of acetonitrile. A 20  $\mu$ l aliquot of the resulting mixture was finally injected into the chromatographic system. *Post-column generation of chemiluminescence*: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (11 mM, prepared in acetonitrile) and TCPO (2.5 mM, prepared in acetonitrile:tetrahydrofuran (75:25)) were used as post column reagents. The post column system was running continuously during all runs at a flow rate of 0.35 ml/min, with TCPO (pump 2) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pump 3) (see the assembly on **Figure 1A**). The dansyl derivatives, were transferred to the post column system, where the intermediate generated from the TCPO and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> served to excite the Dns-amines derivatives so that they could undergo chemiluminescence emission. The distance between the reagents confluence and the detector was a tube of 5 cm (i.d. 0.508 mm). This was the minimum possible distance in the assembly, due to the fast speed of the chemiluminescence reaction

*Luminol* [17]: The flow injection assembly is shown in **Figure 1B**. The working concentration were: HClO 0.9 mM (in HCO<sup>2-</sup>/CO<sup>3-</sup> 0.144 mM, pH 11.2). Luminol 1mM (HCO<sup>2-</sup>/CO<sup>3-</sup> 0.2 M pH 11.2). The emission wavelength was 427 nm. The volume of

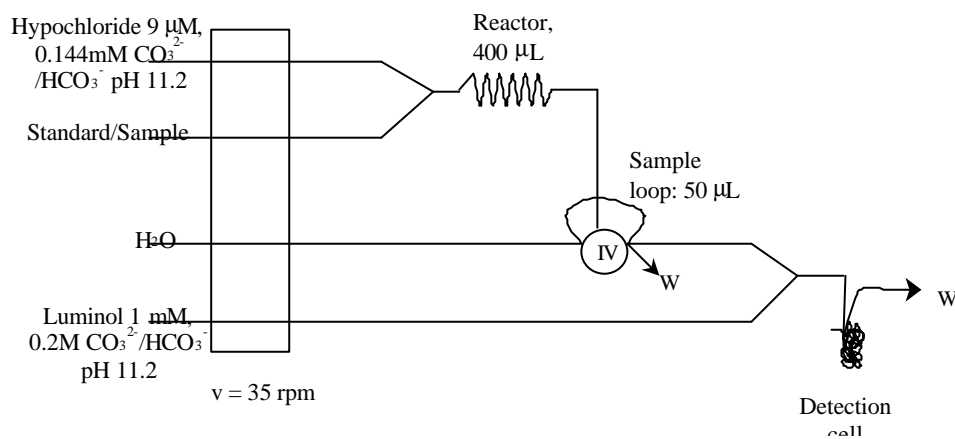


water sample was 4.45 mL for samples S1 (irrigation ditch water), S3 (fountain water), S4 (lake water) and S8 (sea water).

A)



B)



**Figure 1.** Assemblies employed for A) TCPO method and B) Luminol method.

### 3. Results and discussion.

#### *Analytical characteristics.*

**Table 2** shows the reagents and the volume of sample necessary for all the procedures evaluated. For all the methods the sample amount processed was dependent of the sample type, ammonium concentrations in the samples and the followed procedure. The ISE procedure required the highest sample amount, between 7 and 20 mL. In

summary and leaving out ISE, no large differences between the sample volume taken by the different procedures were observed. The analysis by visual inspection could be done with the method using coloured reagents, i.e Nessler, indophenol, and indothymol in both forms. In the case of indophenol method, commercial kits are available.

The sensibility is mainly a limiting factor in trace analysis, it is evident that the method applied should be sensitive enough to determine very low concentrations, specially in tap and sea water where ammonium is present at ppb levels. The sensitivity obtained by the different methods is shown in **Table 3**, this property join to the sample treatment followed allow to reach the limits of detection. According to these results the most sensitive method is the peroxioxalate reaction with a detection limit of 0.008 mg/L. Similar detection limits can be reached by indothymol method coupled with SPE-Reflectance diffuse (0.01 mg/L) by processing 10 mL samples. Salicylate can be used as phenol-type reagent, but it did not provided better results than thymol (LOD 0.051 mg L<sup>-1</sup>). Based on our results, the ISE method provided the highest detection limit (1.6 mg/L). The quantification limits and the working range and linearity are also showed in **Table 3**. ISE method provided the upper working range, allowing to measure up to 100 mg/L. Luminol method, Roth's modified, Nessler, indophenol and indothymol present similar ranges, while the peroxioxalate method and SPE-indothymol method provided the wider and lower working ranged, being possible to quantify from 25 ppb.

The selectivity guarantees that the method is really measuring the substances of interest. **Table 3** shows the evaluation of the procedures referring to selectivity (5: the most selective method). Taking into account the reaction, the most selective were Roth's modified working at specific wavelengths for ammonium determination, and Nessler method. The TCPO method was selective due to the incorporation of a separation step in the procedure. ISE and luminol methods were N selective except for tertiary amines and aromatic nitrogen compounds. Methylamine and iron were the interfering compounds for indophenol, indothymol and SPE-indothymol at concentrations (iron 0.5 mg L<sup>-1</sup> and methylamine <0.1 mg L<sup>-1</sup>) about 1-3 orders of magnitude higher than the concentrations encountered in environmental waters. Therefore, those procedures were selective at normal concentration of methylamine and iron.

The presence of systematic errors was evaluated from different spiked water samples. Only ISE method was completely absent of systematic errors, the other methods present matrix effect depending on the sample (indophenol, peroxioxalate reaction and roth's modified) or sample composition (luminol method, the presence of S, or Cu (II) causes matrix effect). Nessler method, was the only one which presents matrix effect independently on the sample, and also present constant systematic error (Total Blank Youden, TYB) for residual waters. From this point of view the Nessler method was the less recommended, moreover present turbidity in the samples and the blank reagent produced a signal at the measuring wavelength.

The less time consuming analysis was luminol method, with high capability of automatization (**Table 3**). Indophenol, indothymol and SPE-indothymol were also rapid, but with less degree of automatization, as in the case of ISE. Nessler, Roth's modified and peroxilate reaction methods were similar in rapidity and automatization.

**Table 2.** Procedures employed for ammonium determination.

Method name	Procedure		Measure of the analytical signal	Visual Inspection	Ref.
	Reagent	Volume of sample (mL)			
<i>Nessler</i>	Sodium-potassium tartrate. Nessler reagent (KI+HgCl+NaOH)	0.05-2	Spectrophotometer UV-vis	X	2,4
<i>Indophenol</i>	Manganeso sulphate HClO Phenol	1.8	Spectrophotometer UV-vis	X	5,6
<i>Indothymol</i>	Carbonate buffer pH10.7. Nitroprusside HClO Thymol	1.8	Spectrophotometer UV-vis	X	7,8
<i>SPE- Indothymol</i>	Carbonate buffer pH10.7. Nitroprusside HClO Thymol	10	SPE/ reflectance diffuse	X	9,10
<i>ISE</i>	NaOH	7-20	Potential		2,11
<i>Modified's Roth's</i>	OPA-NAC Borate buffer pH 10.8	0.8	Spectrofluorimeter		12,14
<i>TCPO</i>	DnsCl, carbonate buffer pH 9, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , TCPO in THF-MeCN	0.15-1.5	Post-column reactor HPLC Chemiluminscence detector		15,16
<i>Luminol</i>	HclO, carbonate buffer pH 12, luminol	0.035-4.45	FIA system and fluorescence chemiluminiscence detector	o	18

**Table 3.** Analytical characteristics of the procedures studied.

	Methods							
	Nessler	Indo phenol	Indo thymol	SPE-Indothy mol	ISE	Modified Roth's	TCPO	Luminol
<i>LOD</i> ( $mg L^{-1}$ )	0.6	0.160	0.05	0.010	1.6	0.07	0.008	0.07
<b>Working range and linearity</b> ( $mg L^{-1}$ )	0.85-5	0.35-1.8	0.25-2.5	0.025-0.50	5-100	0.2-1.4	0.027-0.750	0.24-4
<i>Selectivity</i>	5	4	4	4	2	5	5	1
<i>Precision</i> (RSD %)	5.08±1.2	2.7	1.4	7.0	4.2±1.9	6±5	7±2	-
<i>Calibration method</i>	MOSA or GHPSA M	MOSA or direct	MOSA or direct	MOSA or direct	Direct	MOSA	Direct or MOSA	Direct
<i>Rapidity</i>	4sample/h	10sample/h	10sample/h	10sample/h	7sample/h	7sample/h	6sample/h	60sample/h
<i>Automatization degree.</i>	2	2	2	2	2	2	3	5

Cost of the analysis was also evaluated. As can be seen TCPO and luminol methods were the most expensive method bearing in mind the cost of the instrumentation (Table 4). SPE-Indothymol was also more expensive than indothymol, owing to the necessity of a accessory for reflectance diffuse measurements and solid-extraction disks. Additionally to the instrumental cost, the analysis cost was evaluated, considering the reagent, time and personnel cost taking into account that a the salary is 2000 €/months. The method with peroxioxalate reaction results comparatively more expensive due to involve a chromatographic separation and post column reaction. While, the luminol procedure is the cheapest method.

**Table 4.** Reagents, instrumentation and personnel costs for each proposed procedure.

Method	Reagent cost (€/per sample)	Instrumentation (€)		Personal cost €/sample
		Apparatus	Price	
Nessler	0.022	Spectrophot. UV-vis	4000-12000	2.80
<i>Indophenol</i>	0.0032	Spectrophot. UV-vis	4000-12000	1.14
<i>Indothymol</i>	0.0025	Spectrophot. UV-vis	4000-12000	1.14
<i>SPE- Indothymol</i>	1.25	Spectrophot. UV-vis + Accesory DR	4000-12000 2500	1.14
<i>ISE</i>	-	Electrode	500	1.70
<i>Modified's Roth's</i>	0.006	Fluorimeter	18.000-30.000	1.70
<i>TCPO</i>	0.25	LC system	18.000	1.90
		Post-column reactor	15.000	
		FLW detector	9000	
		CL detector	9000	
<i>Luminol</i>	0.002	FIA system	3000	0.19
		FLW detector	18.000-30.000	

### Toxicity and waste of the reagents

Often the analytical chemistry is focused on the method in order to develop procedures very sensitive and selective. In the last years some attention has been paid to the term "Suitable chemistry" in which chemical and physical properties of the reagents employed and all the areas involved for the safe handling and use of them in the work place and in the environmental are taken into account. In this sense, the main reagents used by each procedure were evaluated from the point of view of risk, safety and environmental contamination **Table 5** shows the evaluation of the reagents (1: the most harmful reagent). As it can be seen the most contaminating reagents are used in the Nessler and Indophenol methods. So these two methods should not be recommended from the point of view of toxicity and environmental contamination. Taking into account the reagents types and the amount consumed and the generated wastes, we classified the methods in the following order, from less to more contaminating: ISE, Roth's modified and SPE-indothymol, Luminol and indothymol, Peroxioxalate reaction, Indophenol and Nessler.

*Adaptation of the methods to the requirements of the analysis.*

**Figure 2** shows the levels of ammonium concentration found in the literature corresponding to waste water [19-22], river water [8, 21, 23-25], lake waters [26], rain water [5, 25], sea water [27, 28] and tap waters [29-30]. In addition maximum reference values stabilised by the European community are given (first column in Figure 2). Then, the detection limit is the most important factor to select the appropriate method for each type of water sample. As can be seen, the found concentrations are very much depending on the water type, ranging from low levels in sea or tap water ( $\text{ng mL}^{-1}$ ) up to waste water with high levels ( $\text{mg L}^{-1}$ ).

**Table 5.** Toxicity of the main reagents and generated wastes.

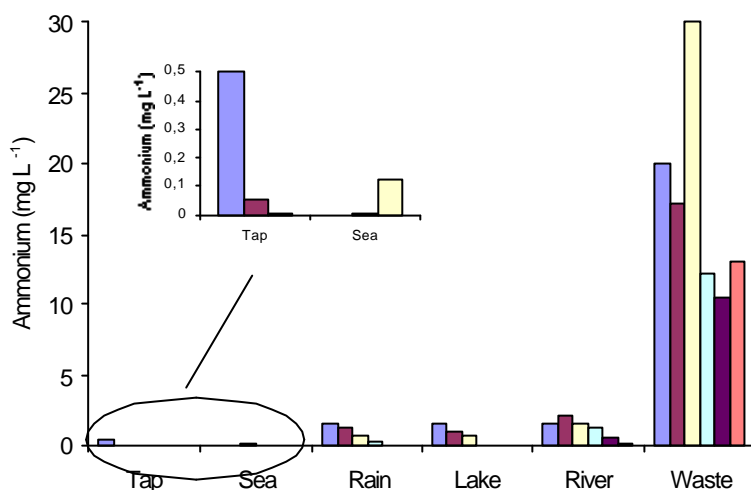
Method	Reagents	Hazard code	Comment	Generated wastes
<i>Nessler</i>	HgCl <sub>2</sub>	1	Very toxic and dangerous for environment	1
<i>Indophenol</i>	Fenol	1		2
<i>Indothymol</i>	Nitro-prusside	2	Very toxic and dangerous for environment	3
<i>SPE- indothymol</i>	Nitro-prusside	2	Reduction in the toxicity by using SPE-disks	4
<i>ISE</i>	-	-	-	5
<i>Modified's Roth</i>	OPA	5	Irritating to eyes, respiratory system and skin	4
<i>TCPO</i>	MeCN	3	Flammable, Harmful by inhalation, in contact with skin	2
	THF	4	Flammable. Form explosives. Irritating	
	Dns-Cl	2	Causes burns	
	TCPO	5	Irritating to eyes, respiratory system and skin	
<i>Luminol</i>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2	Causes burns	3
	Luminol	5	Irritating to eyes, respiratory system and skin	
	HClO	2	Causes burns. Liberate toxic gases with acids.	

1: the most toxic and more wastes generated,

Another limiting factor to select a adequate methodology is the necessity of a quantitative analysis or only a testing analysis. A quantitative analysis must be done when the requirements are to know the exact concentration of ammonium, for example in the case of traces of eutrophization for estimation of biogeochemical ammonium in waters and for control analysis. However some times it is necessary to respond to social problems in a rapid and expectations way. Qualitative analysis can be a solution in such cases.

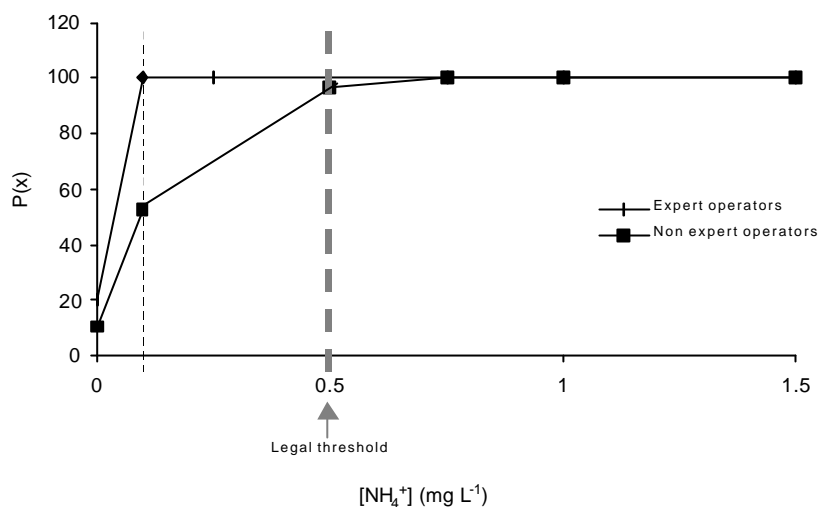
As an example, the indothymol method was tested by several operators, two experts and six non experts in the procedure. A set of standards between 0 and 1.5 mg L<sup>-1</sup> of ammonium with five replicates for each concentration was assayed. The results of the assay were positive or negative as function of the colour. Performance criteria and characteristics of the screening test methods are key aspects as mentioned by M. Varcarcel *et all* [31] and K. Ashley *et all* [32,33]. **Figure 3** shows the probability of obtaining a positive response P(x) vs ammonium concentration by using the responses of the eight operators. Two curves were constructed, one for the responses of the two

experts and the other with the responses of the operators without any training and indications about colour. We chosen that situation in order to know the results in the best and in the worst case. As can be seen, the curve obtained by the non expert operators adjust the response to the legal threshold. However the expert operators minimised the false positive zone (between 0 and 0.1 mg L<sup>-1</sup> sample of ammonium) . The screening procedure is orientative and always is possible to measure values in order to delimitate the ammonium content.



**Figure 2.** Ammonium concentration for the sample analysed in the literature and ammonium reference values (first column).

Comparison between **Figure 2** and LOD and working ranges in **Table 3**, shows that residual water could be analysed with all of the procedures. ISE method will be suitable, without the necessity of diluting the sample, with direct determination and low cost, as long as amines were not present in the sample. For river, lake and rain water Nessler, indophenol, indothymol, modified's Roth's and luminol will be adequate methods to determine ammonium in term of sensitivity. Thus, selectivity, working range, number of samples to analyse and other characteristics will provided the best procedure. In the case of sea, tap and waters with low content of ammonium TCPO and SPE-indothymol methods are the best ones.



**Figure 3.** Probability of obtaining a positive response vs ammonium concentration using the responses of two expert operators and six non expert operator

By using the different procedures. Some sample were analysed with different procedures in order to test accuracy. **Table 6** summarises the found concentrations. The results obtained indicated that all the procedures and the calibration methods chosen were adequate providing good results.

**Table 6.** Ammonium concentration in the different types of water analysed.

	Ammonium concentration (mg L <sup>-1</sup> )							
	Nessler	Indo phenol	Indo thymol	SFE-indothymol	ISE	Roth	TCPO	Luminol
Irrigation ditch			0.52±0.052	0.56±0.01				0.52±0.04
Waste	17.1±0.5 232±3 **				16.8±1.0	14.1±0.2 213±3**		
Fountain						0.37±0.02	0.367±0.012	0.35±0.05
Lake			0.93±0.13	1.15±0.03				0.92±0.15
River				0.070±0.005		0.089±0.001		
Dam				0.56±0.01		0.46±0.03		
Treated Water				0.58±0.08		0.59±0.03		
Sea							0.098	N.D.

\*from a water treatment plant.

\*\* Concentration of total after Kjendahl.



#### 4. Conclusions.

1. The method based on OPA-NAC (Roth's modified) is a good alternative for routine analysis of ammonium. It is cheap, no contaminant, quick, ammonium selective, rather sensitive with adequate accuracy and precision. It is applicable to several water types, and required very low of sample amount.
2. The method based on luminol reaction is recommended procedure to estimate ammonium content if other amino compounds are not present in the sample.
3. When very low concentrations need to be detected, the most sensitive procedure will be the one based on the peroxioxalate reaction. As a cheap alternative will be the (SPE-Reflectance diffuse) by processing 10 ml of sample. This method can also be used as a detector support for visual inspection.
4. Although the cheapest method is the ISE, it is not enough sensitive at low level concentrations, present amine interference and not applicable for samples like sea water.
5. The indothymol method can be employed as a visual assay with only positive and negative responses.
6. Nessler and Indophenol methods offer acceptable analytical properties, however they are not recommended specially due to the use of toxic reagents.

#### Acknowledgements.

The authors are grateful to the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain for the financial support received from the Project BQU2003-06138 and to the Conselleria d'Empresa, Universitat i Ciència by the research group aid Grupos 03/178. S.M.LL and Y.M.M express their grateful to Ministerio de Educación y Cultura for their predoctoral grants

#### References.

- [1] G. Karakoc, K. Unlu, H. Katircioglu, *Environment International*, 29 (2003) 21.
- [2] S. Meseguer, C. Molins and P. Campins *Intern. J. of Environ. Anal. Chem.* 82 (2002)475.
- [3] Díaz Santos S.A. *Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales*. Ed. Apha-Awwe-WPCF . Ed 1992.
- [4] M. Menezes, F. Freire and H. Bergamin. *Anal Chim Acta* 261(1992)339.
- [5] W. Qin, Z.J. Zhang, B.X. Li and Y.Y. *Talanta* 48 (1999)225.
- [6] M.T. Oms, A. Cerda, A. Caldera, V. Cerda and R. Forteza. *Anal Chim Acta* 318 (1996) 251.
- [7] Y. Moliner, R. Herraez and P.Campins *Anal Chim Acta*, in press.
- [8] F. Jüttner, *Fresenius Anal Chem* 363 (1999) 128.
- [9] M. P. Arena, M. D. Porter and J. S. Fritz, *Anal. Chem.* 74 (2002) 185.
- [10] M. P. Arena, M. D. Porter and J. S. Fritz, *Anal. Chim Acta* 482 (2003) 197
- [11] H. Schwarz and G. Pausch. *J. Anal Chem* 366 (2000)825.
- [12] S. Meseguer, J. Verdu, C. Molins and P. Campins. *Talanta*, in press

- [13] A. Aminot, R. Kerouel, D. Birot *Water Research* 35 (2001) 177.
- [14] R. Kerouel and A. Aminot, *Mar Chem* 57 (1997) 265.
- [15] S. Meseguer, C. Molins, J. Verdu and P. Campins. *J of Cromatography A*. 1035 (2004) 75.
- [16] M. Cobos, M. Silva *J of Cromatography A* 848 (1999)105.
- [17] J. Li, P. Purnenedu and K. Dasgupta. *Anal. Chim Acta* 398 (1999)33.
- [18] J. Li and P.K. Dasgupta. *Anal Chim Acta* 398 (1999) 33.
- [19] L. Wang, T.J. Cardwell, R.W. Cattrall, M.D. Luque and S.D. Kolev. *Anal Chim Acta* 416 (2000) 177
- [20]B. Roig, F. Pouly, C. Gonzalez and O. Thomas. *Anal Chim Acta* 437 (2001) 145
- [21] R. Nunes and B. Reis. *Talanta* 58 (2002)729.
- [22] M. El-Shahat, H. Adbel and A. El-Din Mokhtar. *Mikrochim Acta* 140 (2002) 51.
- [23]J.P. Hart, A.K. Abass, D. Cowell and A. Chapel. *Electroanalysis* 11 (1999) 406
- [24]H. Parham and M. Mobarakzadeh *Talanta* 58 (2002) 281.
- [25] M. Mori, K. Tanaka, M. Helaleh, Q. Xu, M. Ikedo, Y. Ogura, S. Saito, W. Hu and K. Hasebe. *J of Chromatogr A* 997 (2003)191.
- [26] M.F. Lehmann, S.M. Bernasconi and J.A. McKenzie. *Anal Chem* 73(2001)4717.
- [27]Y. Huang S. Mou and J.M. Riviello. *J. Of Cromatogr. A* 868 (2002)209
- [28] S.C. Pai, Y.T. Tsau and .I Yang *Anal Chim Acta* 434 (2001) 209
- [29] H. Mana and U. Spohn *Fresenius J. Anal Chem* 366 (2000) 825.
- [30] R. Lanem C. Chow, D. Davey. D. Mulcahy and S. McLeaod *Analyst* 122(1997)1549.
- [31] B.M. Simonet, a. Rios and M. Varcарcel. *Anal. Chim. Acta*. 516 (2004) 67
- [32] K. Ashley, R. Song, P.C. Schelecht. *Am. Lab.* 34 (2002) 32.
- [33]R. Song, P.C. Schelecht and K. Ashle y. *J. Hazard. Meter.* 83 (2004) 29.

## Apéndice 5.

Y. Moliner Martínez<sup>a</sup>, P. Campíns Falcó<sup>a</sup>, P. J. Worsfold<sup>b</sup> and M. Keith-Roach<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

<sup>b</sup>School of Earth, Ocean and Environmental Sciences, University of Plymouth.

*The impact of a disused mine on uranium transport in the River Fal, South West England.*

J. Environ. Monit. **6** (2004) 1.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).



## **Apéndice 6.**

A. Sevillano Cabeza, Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua and P. Campíns Falcó.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Rapid fluorimetric assay for primary amine groups in water samples.*

Anal. Bioanal. Chem **376** (2003) 918.

Enlace URL: [www.spingeronline.com](http://www.spingeronline.com).



### **Apéndice 7.**

Y. Moliner Martínez, C. Molins Legua and P. Campíns Falcó.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Analysis of primary aliphatic short-chain monoamines by LC in water samples.*

Talanta **62** (2004) 374.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).





## Apéndice 8.

### REVISED PAPER.

#### **Advantages of Capillary LC for screening of ammonium and primary amino nitrogen and its contribution to eutrophication.**

Y. Moliner Martínez, R. Herráez Hernández and P. Campíns Falcó\*

*Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Valencia  
C/Dr. Moliner 50, E46100- Burjassot, Valencia. SPAIN*

#### **Abstract.**

A simple and sensitive method for screening of ammonium and primary amino compounds in water samples, using OPA-NAC as derivatizing reagent and capillary LC with UV-vis and fluorescence detection has been proposed. Recent attempts to control eutrophication makes screening of amino compounds of special interest. The aim of this work was to evaluate the features (sensitivity, resolution, accuracy and precision) of the capillary LC and to compare them with those obtained with conventional HPLC. Detection limits were from 8 to 50  $\mu\text{g L}^{-1}$  with UV-vis detection and from 0.4 to 10  $\mu\text{g L}^{-1}$  with fluorescence detection. LOD with fluorescence detection were between 700 and 200 times lower than those achieved with conventional HPLC. Screening analysis of ammonium, short chain aliphatic amines and amino acids were done in real water samples (fresh, waste and rain waters). Sample volume of 100  $\mu\text{L}$  was used. Ammonium was screened in irrigation ditch, lake, waste and rain water samples. Methylamine was found in a irrigation ditch water sample at concentration near the LOD and in the waste water. Several amines and amino acids were also found in the waste water. Satisfactory precision and accuracy were obtained for all the samples.

\*corresponding author: Tel 34-96-3543002; Fax 34-96-3544436  
E-mail address: [pilar.campins@uv.es](mailto:pilar.campins@uv.es)

## 1. Introduction.

Nitrogen is a key nutrient in natural waters, but excess N inputs lead to eutrophication. The dominant N species in waters are: dissolved inorganic N (ammonium, nitrite and nitrate), dissolved organic N (the largest fraction is made up of amino acids and peptides and it is often called amino N) and particulate organic and inorganic N (1). Inputs of dissolved organic nitrogen (DON) to natural waters are largely a result of autochthonous biological processes. Additionally, external sources of DON arise from sewage and industrial effluents, terrestrial run-off and atmospheric deposition (2). DON content in water has largely been ignored, difficulties in measuring DON, its chemical character remains poorly described and an underlying assumption that it is biologically inert can be the causes (2).

Aliphatic amines are important DON inputs owing to the high number of applications in which they are involved in the industries and its presence in different kind of waters is documented (3). They are also products of degradation of organic material such as proteins and amino acids. In addition, they can form carcinogenic nitrosamines by reaction with certain compound containing nitrogen (4). The concentration levels of these compounds in natural water samples make necessary to use sensitivity detection system (3) or the inclusion of a preconcentration step (5). This work attempts in this direction, the improvement of the sensitivity without any additional step.

Reactions with OPA in combination with a thiol such as N-Acetyl-cysteine (NAC) have been widely used for the analysis of amino acids and primary amines outside the chromatographic system (6) and under HPLC (5). The principal advantages of this reagent are the formation of products in relatively short times, the better responses of OPA derivatives, either UV absorbance and fluorescence, compared with the reagent and its selectivity as it only reacts with primary amines.

During the last years, miniaturization of HPLC has been one of the most important trends in analytical chemistry (7). The narrow column diameter and the low flow rates are the principal features of this chromatographic system. The main advantages of the capillary liquid chromatography are: the reduction of the consumption and disposal of solvents, the ability to work with limited sample amounts and easier and more efficient interfacing with other instruments, e.g. electrospray ionization (ESI) MS (8,9). In addition column switching systems has been used to improve the efficiency of the miniaturization process in LC (10). Capillary has been used to separate biomolecules such as proteins and peptides (11,12). It has been also applied to analysis of drugs (12,13).

In this work, we report the screening analysis of ammonium, short-chain aliphatic amines and amino acids by using capillary liquid chromatography combined with UV-vis and fluorescence detection. In fact, this is, to our knowledge, the first method using capillary LC for this analysis. Sensitivity, resolution, accuracy and precision of the procedure were evaluated and compared with conventional chromatography. This work contributes to know the nature of DON in water samples and then, the proposed method can be useful for studies about eutrophication.

## 2. Experimental.

### 2.1. Apparatus.

The capillary chromatographic system used consisted of a capillary pump (Agilent Series 1000) equipped with a high-pressure six port valve (Rheodyne model 7725) with a 2  $\mu\text{L}$  internal loop. All the components of the system were linked with fused silica tubing (length 550 mm and i.d. 50  $\mu\text{m}$ ).

UV-vis and fluorescence detection were done with a UV-vis detector (Hewlett-Packard 1100 Series) and a fluorescence detector (Agilent 1100 Series). The detectors were equipped with a 1  $\mu\text{L}$  micro flow cell and an 8  $\mu\text{L}$  cell respectively. The wavelength used was 330 nm for UV-vis and for fluorescence  $\lambda_{\text{ex}}$  and  $\lambda_{\text{em}}$  were 330 and 440 nm, respectively.

### 2.2. Reagents.

All the reagents were of analytical-reagent grade, unless stated otherwise. Solutions were prepared with ultrapure water from a Nanopure II system (Sybron, Barnstead). Methylamine, ethylamine, propylamine, butylamine and pentylamine were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA). Amino acids (alanine, arginin, aspartic acid, cystine, glutamic acid, glycin, histidin, isoleucine, leucine, lisyln, methionine, phenylalanine, serine, treonine, triptophan, tyrosin and valine) were obtained from Aldrich (Steinheim, Germany) and ammonium chloride from Probus (Badalona, Spain). Triazines (simasine, atrazine, propazine, ametryne, prometryne and terbutryne) were from Fluka (Steinheim, Germany).

o-Phthaldialdehyde and N-Acetyl-L-Cysteine were obtained from Sigma-Chemie (Steinheim, Germany); boric acid was from Panreac (Barcelona, Spain). Methanol HPLC gradient grade and sodium hydroxide were from J.T. Baker (Deventer, Holland). Urea, humic acids and acetamide were obtained from Prolabo (Barcelona, Spain)

### 2.3. Columns and mobile phases.

A Zorbax SB C18 (150 x 0.5 mm i.d., 5  $\mu\text{m}$  particle diameter) (Agilent) column was used for separations of the analytes. Mixtures of methanol and water were used as mobile phases at flow rates of 5, 10 and 15  $\mu\text{L min}^{-1}$ .

Two different mobile phases were used depending on the detection system. For the UV-vis detection of amino-acids and aliphatic amines, the gradient was methanol:water 0:100 at 25 min at flow rate 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ , methanol:water 30:70 at 35 min, methanol:water 50:50 at 50 min, methanol:water 100:0 at 60 min and methanol:water 0:100 at 80 min at 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  (*Gradient 1*). When only, aliphatic amines and ammonium were present in the standards and/or samples, gradient elution mode at 10  $\mu\text{L min}^{-1}$  was methanol:water 30:70 at zero time, methanol:water 50:50 at 15 min, methanol:water 100:0 at time 20 min and methanol:water 30:70 at time 25 (*Gradient 2*).

When fluorescence detection was done, flow rate was 15  $\mu\text{L min}^{-1}$  in all cases. For amino acids and aliphatic amines the gradient was methanol:water 0:100 at 25 min, methanol:water 20:80 at 35 min, methanol:water 50:50 at 50 min, methanol:water 100:0 at 60 min and methanol:water 0:100 at 80 min (*Gradient 3*). If only aliphatic amines and ammonium were present, gradient elution mode was methanol:water 20:70 at time 20:80,

methanol:water 50:50 at time 22 min, methanol:water 50:50 at time 27 min and methanol:water at time 20:80 (*Gradient 4*)

All the mobile phases were daily filtered with 0.45 mm nylon membranes (Teknokroma, Barcelona, Spain) and degassed with the on line degasser (Agilent 1100 Series).

#### 2.4. Preparation of solutions.

Working standard solutions of amines ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), amino acids ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ), ammonium ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), urea ( $0.05 \text{ M}$ ), acetamide  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , humic acids ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) and triazines ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) were prepared by diluting the standard solutions in water. OPA-NAC solution  $7.4 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  (1:1) was employed. NAC reagent was prepared in water and OPA solution in water containing methanol. OPA/NAC solutions prepared by mixture of the two reagents contained 1.4 % of methanol. The reagent solution was prepared weekly. Borate buffer  $0.5 \text{ M}$  at pH 8 was prepared by dissolving the necessary amount of boric acid in water and adjusting pH with NaOH  $1 \text{ M}$ .

#### 2.5. Derivatization procedure.

1 mL of blank, working standard solution of the analytes or samples were mixed with 0.1 mL of OPA-NAC  $2.2 \cdot 10^{-2} \text{ M}$  and 0.1 mL of borate buffer. After the reaction time, solutions were filtered with  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  Iso-disc filters (diameter 13 mm) (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and injected in the capillary chromatographic system.

In order to reduce the necessary volume of samples, the same procedure was done reducing 10 times volumes of standard solutions (0.1 mL), OPA-NAC reagent (0.010 mL) and borate buffer (0.010 mL).

Analysis was done by filling the internal loop of the injection valve

#### 2.6. Analysis of real water samples.

The procedure was applied to eight real water samples collected in different points of the Comunidad Valencia and a synthetic sample. Samples from S1 to S6 were natural samples ( S1 irrigation ditch 1, S2 dam, S3 field, S4 river, S5 irrigation ditch 2 and S6 lake), sample S7 was a water sample collected after the treatment in a water-treatment plant and sample S8 was a waste water sample from a fungicides factory. After their collection, samples from S1 to S8 were filtered were filtered through  $0.45 \text{ }\mu\text{m}$  filters and acidified to pH 2 with HCl in order to storage them. Before the analysis the pH was adjusted with NaOH to pH 7. The synthetic samples S9 was prepared by dissolving humic acids ( $25 \text{ mg L}^{-1}$ ) in water. Sample S10 was rain water taken from the surface of vegetation (availed volume of sample 0.5 mL). Samples from S1 to S4 were spiked with known concentrations of primary amines ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of each amine). The other samples were spiked only with the analyte or analytes they contained. The analytes were derivatized as described above followed by the injection in the capillary LC system.

### 3. Results and discussion.

#### 3.1. Screening analysis.

For UV-vis detection, two chromatographic conditions were used depending on the analytes. Separations of the five primary amines and seventeen amino acids were done with *Gradient 1* (see experimental section). **Figure 1A**, shows the chromatogram obtained for a mixture of amino acids and amines. As can be seen in Figure 1A, amines eluted separately after 30 min. Amino acids, alanine, arginin, aspartic acid, cysteine, glutamic acid, glycin, histidin, methionine, serine, treonine and tyrosin coeluted in various peaks even with 100 % of water and decreasing the flow from 10 to 5  $\mu\text{L min}^{-1}$ . In those conditions, valine, triptophan, phenilalanine, isoleucine, leucine and lysine were separated (see Figure 1A). Therefore, Gradient 1 was suitable for screening analysis of aliphatic amines and amino acids, such as valine, triptophan, phenilalanine, isoleucine, leucine and lisyne.

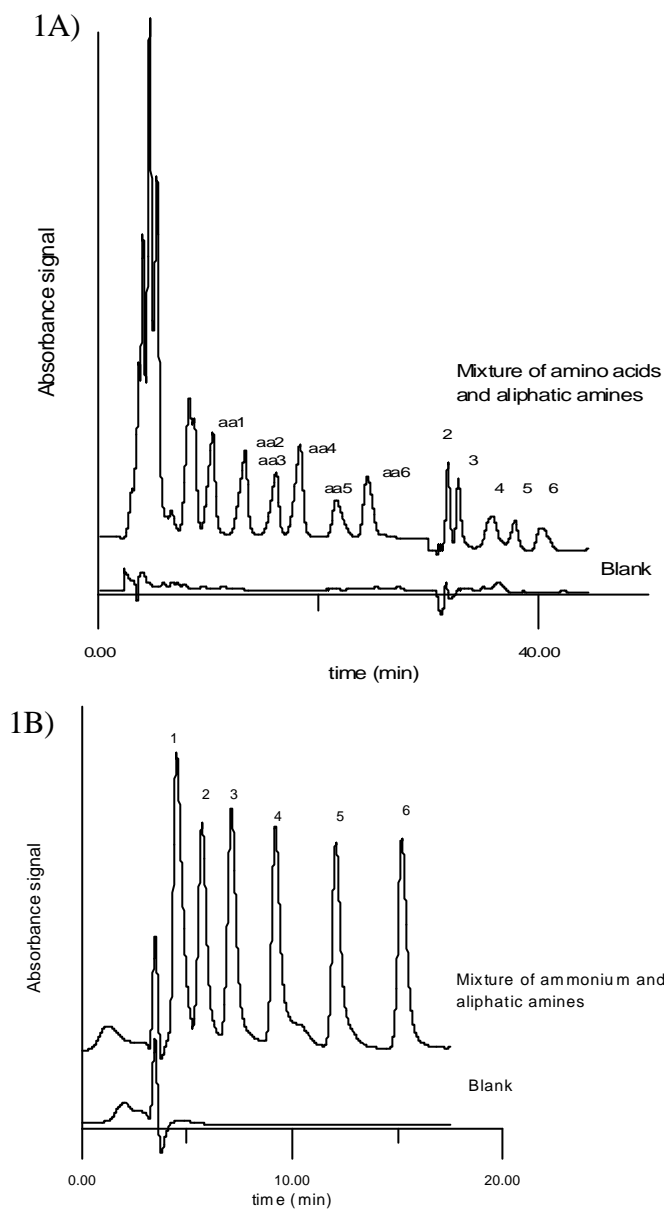
In samples without amino acids or with low concentrations of amino acids, *Gradient 1* could be a time-consuming procedure for screening of aliphatic amines. Thus, *Gradient 1* was modified in order to reduce analysis time. *Gradient 2* was employed to elucidate a mixture of amines. The chromatograms obtained for that mixture and the blank are depicted in **Figure 1B**. In addition, ammonium was also in that mixture. As can be seen in Figure 1B, *Gradient 2* was appropriate for the screening analysis of the amines and ammonium when amino acids were not present in the sample. If *Gradient 2* was applied to a mixture of amino acids and amines, screening analysis of methylamine was difficult owing to the coelution of the amino acids in two peaks, one of them at the same retention time as methylamine.

For fluorescence detection, the flow rate was 15  $\mu\text{L min}^{-1}$  in all cases owing to the volume of the flow cell (8  $\mu\text{L}$ ). Separations of the seventeen amino acids and the five amines were done with *Gradient 3*. **Figure 2A** shows the chromatogram for the mixture of amino compounds and for the blank. Good separation was obtained for the five amines. In that case, screening of amino acids were not possible, because they coeluted in various peaks, even with 100% of water, owing to the flow (15  $\mu\text{L min}^{-1}$ )

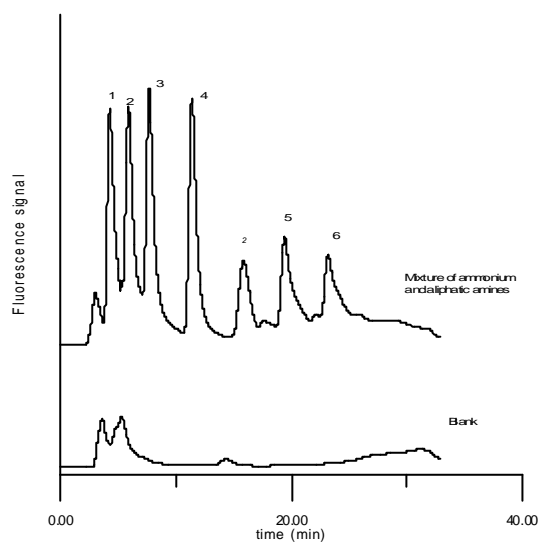
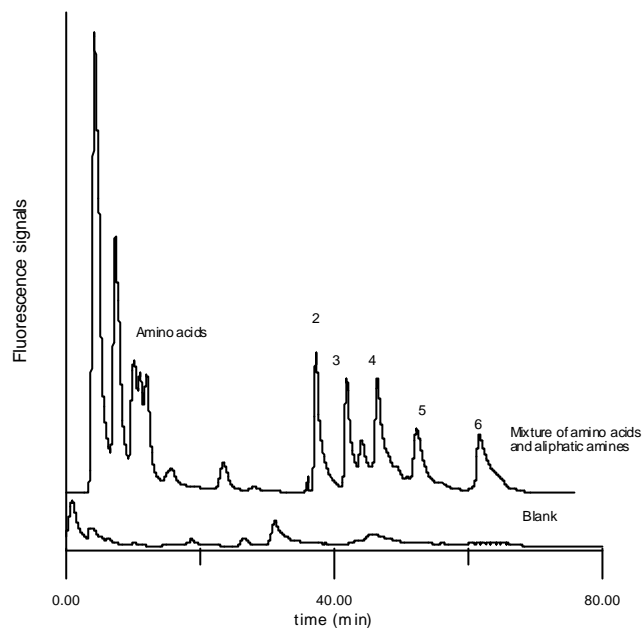
As in the case of UV-vis detection, *Gradient 3* was modified for the screening of a mixture of the five amines and ammonium. Typical chromatograms obtained with *Gradient 4* for the blank, amines and ammonium are shown in **Figure 2B**.

The UV-vis and fluorescence signals for ammonium were completely separated from all the amines. Thus, screening of methylamine, ethylamine, propylamine, butylamine, pentylamine and ammonium could be done with *Gradient 2* and *Gradient 4* for UV-vis and fluorescence detection respectively. *Gradient 1* and *3* was not used for ammonium identification or quantification because, its peak coeluted with peaks of the amino acids. If ammonium, amino acids and aliphatic amines were present in a sample, only screening of the amines could be done.

**Table 1** shows the experimental detection limits for the primary aliphatic amines and ammonium obtained with UV-vis detection (*Gradient 2*) and with fluorescence detection (*Gradient 4*). The same values were obtained with *Gradient 1* and *3* for the aliphatic amines.



**Figure 1.** Chromatograms obtained with UV-vis detection for A) amino acids ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ ) and aliphatic amines ( $\text{MA } 0.25 \text{ mg L}^{-1}$  and EA, PA, BA, PenA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradient 1) and B) ammonium ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) and aliphatic amines ( $\text{MA } 0.25 \text{ mg L}^{-1}$  and EA, PA, BA, PenA  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradient 2). 1: Ammonium, 2: methylamine, 3: ethylamine, 4 propylamine, 5: butylamine and 6: pentylamine. aa1: valine, aa2: triptophan, aa3: phenilalanine, aa4: isoleucine, aa5: leucine and aa6: lisyne.



**Figure 2.** Chromatograms obtained with fluorescence detection for A) amino acids ( $0.5 \text{ mg L}^{-1}$ ) and aliphatic amines (MA  $0.05 \text{ mg L}^{-1}$  and EA, PA, BA, PenA  $0.1 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradient 3) and B) ammonium ( $2 \text{ mg L}^{-1}$ ) and aliphatic amines (MA  $0.08 \text{ mg L}^{-1}$  and EA, PA, BA, PenA  $0.16 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Gradient 4). 1: Ammonium, 2: methylamine, 3: ethylamine, 4 propylamine, 5: butylamine and 6: pentylamine

As can be seen, fluorescence detection allowed reaching lowest detection limits, but the limitation of the system (flow cell volume) made that the resolution of mixtures of amines was better with UV-vis detection than with fluorescence detection.

Other amino compounds such as urea a mixture of simazine, atrazine, propazine, ametryne, prometryne and terbutryne (0.70 mg L<sup>-1</sup> each) and acetamide were measured. In addition the solution of humic acids was analysed. Any peak was obtained for those compounds.

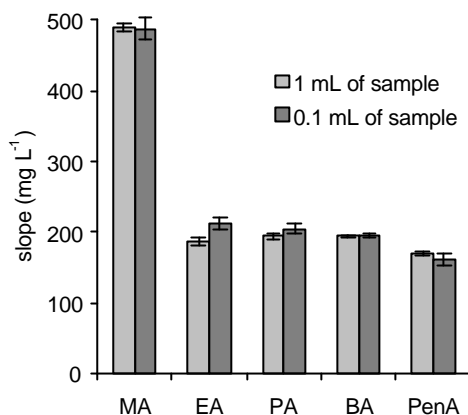
**Table 1.** Some analytical figures of merit for derivates of OPA with UV-vis (Gradient 2) and fluorescence detection (Gradient 4).

	$a \pm s_a$	$b \pm s_b$ (mg L <sup>-1</sup> )	n	S <sub>x/y</sub>	R <sup>2</sup>	LOD (mg L <sup>-1</sup> )
<i>UV-vis</i>						
MA	4±3	488±16	7	48	0.9943	8
EA	7±3	212±8	7	51	0.9823	10
PA	7±2	204±7	7	36	0.9956	10
BA	1±8	195±2	7	15	0.9920	50
PenA	13±5	161±2	7	9	0.9997	50
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-11±15	135±12	6	18	0.9920	50
<i>Fluorescence</i>						
MA	-18±7	3238±30	6	12	0.9996	0.40
EA	38±30	1395±63	6	51	0.9919	0.50
PA	82±53	1653±60	6	53	0.9820	0.50
BA	-21±15	1413±32	6	27	0.9980	1.25
PenA	13±20	676±43	6	20	0.9838	2.50
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	42±27	420±19	6	36	0.9957	10

### 3.2. Quantification of ammonium and aliphatic amines.

The amine calibrations graphs peak area *versus* concentration (mg L<sup>-1</sup>) and other analytical parameters using UV-vis detection and *Gradient 2* were calculated for 1mL of sample and for 0.1 mL of sample. **Figure 3** shows the slope of the linear calibration graphs for both procedures, sensitivities were similar in the two cases. No differences were found in the other analytical parameters. Therefore, 0.1 mL of sample, 0.01 mL of OPA-NAC and 0.01 mL of buffer were used for further experiments.





**Figure 3.** Slopes obtained with UV-vis detection for the linear calibration graphs with 1 mL of sample and 0.1 mL of sample.

**Table 1** shows the calibrations graphs obtained when the volume of the blank, standards or samples was reduce ten times. Good linearity was obtained for the aliphatic amines from 0.5 to 10 mg L<sup>-1</sup>. The detection limit was determined experimentally and they were from 8 to 50 µg L<sup>-1</sup> (Table 1).

Figures of merit for the amines and fluorescence detection (*Gradient 4*) are shown in **Table 1**. Good linearity was obtained for methylamine from 0.05 to 1 mg L<sup>-1</sup> and for ethylamine, propylamine, butylamine and pentylamine from 0.1 to 1 mg L<sup>-1</sup>. LOD were from 0.4 to 10 µg L<sup>-1</sup>.

Ammonium linear calibration curves were also obtained from 0.5 to 2 mg L<sup>-1</sup> with UV-vis detection and from 0.5 to 2 mg L<sup>-1</sup> for fluorescence detection. The analytical parameters are shown in **Table 1**.

Variation coefficients were calculated for UV-vis and fluorescence signals as well as for retention time. Two concentration levels were assayed with both detection systems. **Table 2** shows the values expressed as %RSD. The intra and interday values for UV-vis signals were adequate at the concentration levels of the analytes. The same conclusions were obtained from the %RSD values with fluorescence detection.

### 3.3. Comparison with conventional LC.

Sensitivity of the procedure was compared with the sensitivity obtained in a previous work in which screening of the same amines was done with HPLC and fluorescence detection [5]. Capillary liquid chromatography provided lowest detection limit than HPLC as can be seen in **Table 3** The detection limits were better than those obtained with the solid-support assisted on-line derivatization, in which a preconcentration step was included. In addition, capillary LC was also advantageous owing to the lower sample volume used. Although it requires more analysis time because the system needs more time to be re-equilibrate.

**Table 2.** Reproducibility data (%RSD) for Capillary LC.

	[Amine] (mg L <sup>-1</sup> )	Intraday %RSD (n=3)		Interday %RSD (n=6)	
		t <sub>R</sub>	Area	t <sub>R</sub>	Area
<b>UV-vis</b>					
MA	0.25	2.5	6.0	6.0	10.4
	2.5	0.2	6.1	6.0	7.1
EA	0.5	2.2	6.6	0.7	6.1
	5	6.3	5.2	6.7	8.4
PA	0.5	1.1	8.2	6.8	12.0
	5	1.1	6.1	5.3	8.1
BA	0.5	1.1	8.4	7.7	7.7
	5	0.2	3.6	3.4	8.5
PenA	0.5	0.7	3.4	9.0	3.8
	5	0.09	1.5	2.6	12.0
<b>Fluorescence</b>					
MA	0.05	1.8	13	7.6	16.1
	0.5	4.4	1.2	5.0	15.0
EA	0.1	1.8	12.4	7.2	20.0
	1	1.9	1.0	4.6	16.3
PA	0.1	1.2	8.8	5.6	10.0
	1	1.0	1.3	4.9	19.4
BA	0.1	0.4	5.6	2.0	8.6
	1	0.3	2.9	4.8	8.7
PenA	0.1	1.1	5.0	0.4	10.5
	1	0.1	7.9	1.4	20.4

Reproducibility of the capillary LC was also compared. The coefficients of variation (RSD) for retention times obtained with capillary LC and fluorescence detection (Table 2) were compared with the RSD obtained with conventional HPLC (Table 4). In general, the %RSD for conventional HPLC were lower than for capillary LC, but both values varied from 0.2 to 4 % for HPLC and from 0.1 to 7.6 % for capillary LC.

**Table 3.** Comparison instrumental features and detections limits obtained with conventional HPLC with and without preconcentration and Capillary LC with fluorescence detection

	Conventional HPLC		Capillary LC
	Without Preconcentration	With preconcentration	
Flow ( $\mu\text{L min}^{-1}$ )	1000	1000	15
Mobile phase	Borate buffer:MeOH	OPA-NAC/Borate buffer: MeOH	Water: MeOH
Injection volume ( $\mu\text{L}$ )	30	150	2
Secondary column	-	Hypersyl ODS-C18 (30 $\mu\text{m}$ ) (20x2.1 i.d.) mm	-
Primary column	LiChrosphere 100RP C18 (5 $\mu\text{m}$ ) (125x4.1 i.d) mm	LiChrosphere 100RP C18 (5 $\mu\text{m}$ ) (125x4.1 i.d) mm	Zorbax SB C18 (5 $\mu\text{m}$ ) (150x0.5 i.d) mm
<b>LOD</b> ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )			
<b>MA</b>	310	2	0.4
<i>EA</i>	220	15	0.5
<i>PA</i>	840	20	0.5
<i>BA</i>	700	30	1.25
<i>PenA</i>	500	40	2.5

**Table 4.** Reproducibility data (%RSD) for conventional HPLC [5]

	[Amine] ( $\text{mg L}^{-1}$ )	%RSD for retention time	
		Intraday	Interday
		(n=3)	(n=6)
<b>MA</b>	2	0.8	0.9
<b>EA</b>	5	0.4	0.5
<b>PA</b>	5	0.2	3
<b>BA</b>	5	0.6	2
<b>PenA</b>	5	3	4

### 3.4. Analysis of real water samples.

The procedure was applied to ten water samples. The accuracy of the method was validated by spiking samples S1, S2, S3 and S4 with known amount of the five amines. Found concentrations with UV-vis detection and recoveries are shown in **Table 5**. The values obtained were satisfactory, bearing in mind the concentration levels. The rest of the samples were spiked only with the analyte or analytes that they contained. In case of samples S5 and S6 that contained ammonium, the recoveries obtained with fluorescence detection were  $104\pm 4\%$  and  $99\pm 3\%$  respectively. Thus, matrix effects were not found for any analyte either with UV-vis or fluorescence detection.

Ammonium was found in natural water samples S5 and S6. Concentrations are shown in **Table 6**. In the case of samples S5 and S6 both detection modes were used owing to the high content of ammonium (*Gradient 2 and 4*). In addition, *Gradient 1* was applied to sample S6 to assure that the entire signal was from the ammonium and not from the amino acids. Any amino acids were found in that sample.

**Table 5.** Found concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ ) and recoveries (%) for spiked samples with  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  of MA, EA, PA, BA and PenA

	Concentration ( $\text{mg L}^{-1}$ )				
	MA	EA	PA	BA	PenA
S1	0.48±0.01	0.54±0.03	0.55±0.04	0.57±0.02	0.54±0.1
S2	0.49±0.02	0.49±0.020	0.547±0.003	0.51±0.03	0.51±0.03
S3	0.52±0.02	0.52±0.04	0.56±0.07	0.53±0.02	0.52±0.05
S4	0.52±0.02	0.53±0.03	0.58±0.05	0.52±0.03	0.50±0.02
	Recovery (%)				
	MA	EA	PA	BA	PenA
S1	97±2	109±7	111±8	111±7	109±2
S2	98±4	99±6	105±1	102±7	103±7
S3	104±3	103±8	103±1	106±4	104±9
S4	103±4	105±6	110±2	104±5	100±4

Screening of sample S1 showed that methylamine was present at concentrations near of the detection limit. The application of *Gradient 2* and *Gradient 4* to samples S8 (waste water), indicated that amino acids could be present in that samples. Therefore, *Gradient 1* and *3* were applied to that sample. UV-vis detection showed that some amino acids were in the sample, but at lower concentration level. Ammonium, methylamine, ethylamine and pentylamine were found with UV-vis and fluorescence detection (see **Table 6**). **Figure 4A** depict the chromatogram obtained for the waste water sample obtained with fluorescence detection with both gradient (*3 and 4*). The application of *Gradient 4* to that sample showed that ethylamine, propylamine and pentylamine were

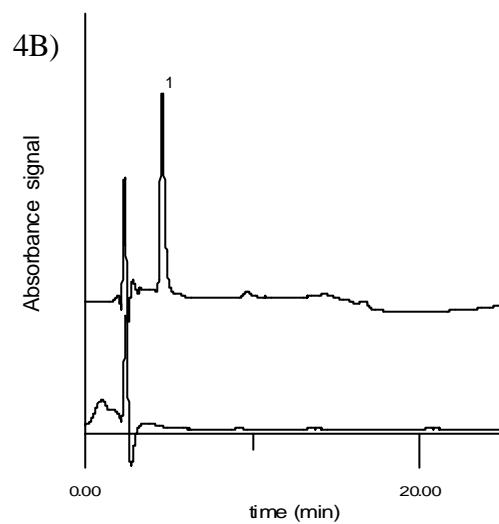
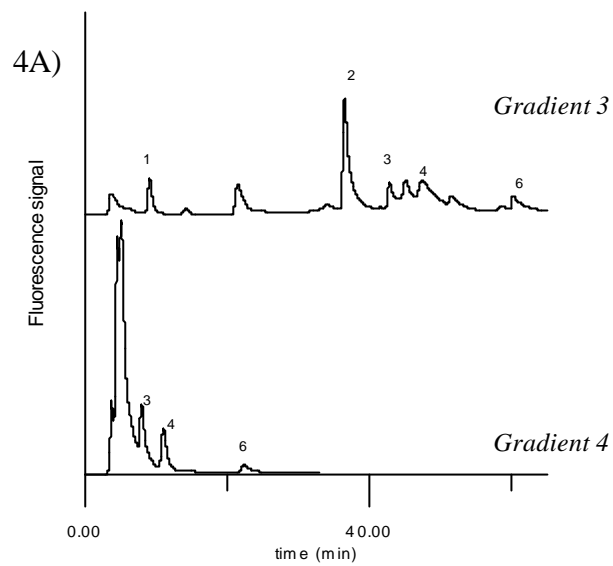
present. It was not possible to conclude if ammonium or methylamine were in that sample owing to the coelution of various peaks in this region. *Gradient 3* showed that methylamine was in the sample. The peak at time 9 min was from ammonium and not from amino acids. The recoveries obtained for all the analytes in that sample were near 100%.

**Table 6.** Found concentration for real water samples ( $\text{mg L}^{-1}$ )

	UV-vis detection	Fluorescence detection
	Found analyte/s ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Found analyte/s ( $\text{mg L}^{-1}$ )
<i>S1</i>	-	MA, LOD
<i>S5</i>	( $\text{NH}_4^+$ )= $1.47 \pm 0.03$	( $\text{NH}_4^+$ )= $1.43 \pm 0.04$
<i>S6</i>	( $\text{NH}_4^+$ )= $9.8 \pm 0.2$	( $\text{NH}_4^+$ )= $9.4 \pm 0.5$
<i>S8</i>	( $\text{NH}_4^+$ )= $0.80 \pm 0.07$ (MA)= $0.60 \pm 0.02$ (EA)= $0.26 \pm 0.03$ (PA)= $0.27 \pm 0.02$ (PenA)= $0.26 \pm 0.03$	( $\text{NH}_4^+$ )= $0.82 \pm 0.08$ (MA)= $0.57 \pm 0.04$ (EA)= $0.28 \pm 0.03$ (PA)= $0.22 \pm 0.07$ (PenA)= $0.239 \pm 0.008$
<i>S10</i>	( $\text{NH}_4^+$ )= $1.00 \pm 0.09$	( $\text{NH}_4^+$ )= $0.92 \pm 0.08$

The procedure was also useful for micro-samples, such as rain water on the surface of leaves (*S10*, 0.5 mL). UV-vis and fluorescence detection were used for the screening of that sample. **Figure 4B** shows the chromatogram obtained for the blank and the sample with UV-vis detection, as can be seen ammonium was found in that sample (see Table 6).

Amines, ammonium or amino acids were not found in samples *S2*, *S3*, *S4*, *S7* and *S9*.



**Figure 4.** A) Chromatogram corresponding to the waste water sample obtained with Gradient 3 and 4 (fluorescence detection). 1. ammonium, 2: methylamine, 3: ethylamine, 4: prepylamine and 5 pentylamine. B) Chromatogram corresponding to the rain water sample obtained with Gradient 2 (UV-vis detection); 1: ammonium.

#### 4. Conclusions.

This work has evaluated the capacity of the novel capillary liquid chromatography for the screening some amino compounds, such as amino acids, short chain aliphatic amines and ammonium. The identification and quantification of the analytes at low ppb levels without the necessity of a preconcentration step was the main advantage of this technique. In addition, sample volume was reduced till 100  $\mu\text{L}$ . Therefore, the procedure was also adequate for screening of the amino compounds in low volume real water samples.

Different gradient elution modes were proposed as function of the analytes and of the detection system. *Gradient 1* was useful for screening analysis of methylamine, ethylamine, propylamine, butylamine, pentylamine, valine, triptophan, phenilalanine, isoleucine, leucine and lysine with UV-vis detection. *Gradient 2* was employed for screening analysis of amines and ammonium in samples without amino acids and with UV-vis detection. The same was done with fluorescence detection. *Gradient 3* for screening of amines in the presence of amino acids and *Gradient 4* for amines and ammonium.

Precision results obtained with capillary LC were compared with those obtained with HPLC. No significative differences were found.

Different types of real water samples (fresh, waste or rain water) were analysed with both detection systems. The methodology has proven to be a promising tool to the screening and quantification of amino compounds. This new analytical technique may offer an important advance for screening analysis in real water samples at low concentration range and with low volume samples.

#### Acknowledgements.

The authors are grateful to the Ministerio de Ciencia y Tecnologia of Spain for the financial support received for the realization of Project BQU2003-06138. Y.M.M. expresses her gratitude to the Ministerio de Educacion y Cultura (Spain) her predoctoral grant.

#### References.

- [1] T.P. Burt, A.L. Heathwaite, S.T. Trudgill. *Nitrate: Processes, Patterns and Management*. John Wiley & Sons, New York 1993.
- [2] E.-S. A. Badr, E.P. Achterberg, A.L. Tappin, S.J. Hill, C.B. Braungardt, *Trends Anal. Chem.*, 22 (2003) 819.
- [3] S. Meseguer-Lloret, C. Molins-Legua, J. Verdú Andrés and P. Campíns Falcó. *J. Chromatogr. A*, 1035 (2004) 75.
- [4] P. Simon, C. Lemacon. *Anal. Chem.*, 59 (1987) 480.
- [5] Y. Moliner-Martinez, C. Molins-Legua, P. Campíns-Falcó. *Talanta*, 62 (2004) 373.
- [6] P. Campíns-Falcó, C. Molins-Legua, A. Sevillano-Cabeza, L.A. Tortajada-Genaro *J. Chromatogr. B*, 759 (2001) 285.
- [7] T. Tsuda, M. Novotny. *Anal. Chem.*, 50 (1978) 632.
- [8] T. Takeuchi. *Anal. Bioanal. Chem.*, 375 (2003) 26.
- [9] W. Haskins, Z. Wang, C. Watson, R. Rostand, S. Witowski, D. Powell, R. Kennedy. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 5005.

- [10] E. Pitarch, F. Hernandez , J. Hove , H. Meiring , W. Niesing , E. Dijkman , L. Stolker , E. Hogendoorn . *J. Chromatogr. A*, 1031 (2004) 1.
- [11] Y. Shen , N. Tolíć , R. Zhao, L. Pasa-Tolic , L. Li , S. Berger , R. Harkewicz., G. Anderson , M. Belov , R. Smith. *Anal. Chem.*, 73 (2001) 3011.
- [12] E. Varesio , S. Rudaz , K. Krause , J. Veuthey. *J. Chromatogr. A*, 974 (2002) 135.
- [13] P. Vallano, V. Remcho. *J. Chromatogr. A*, 888 (2000) 2.



## **Apéndice 9.**

Y. Moliner Martínez and P. Campíns Falcó.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Detector supports: application to aliphatic amines in wastewater.*

Talanta **65** (2005) 217.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



**Apéndice 10.**

Y. Moliner Martínez, P. Campíns Falcó, R. Herráez Hernández and J. Verdú Andrés.

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*Evaluation of C<sub>18</sub> adsorbent cartridges for sampling and derivatization of primary amines in air.*

Anal. Chim Acta **502** (2004) 235.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).



### **Apéndice 11.**

Y. Moliner Martínez, P. Campíns Falcó and R. Herráez Hernández

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad de Valencia.

*A method for the determination of dimethylamine in air by collection on solid support sorbent with subsequent derivatization and spectrophotometric analysis.*

J. Chromatogr. A **1059** (2004) 17.

Enlace URL: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com).