
Departamento de Química Analítica y Ecología
Universidad de Córdoba

**LOS FULLERENOS Y DERIVADOS
EN EL ÁMBITO DE LA
ESPECIACIÓN MEDIOAMBIENTAL**

*FULLERENES AND DERIVATIVES
IN THE FIELD OF
ENVIRONMENTAL SPECIATION*

Tesis Doctoral
Josefa Rodríguez Baena

Córdoba, Octubre 2001

Mediante la defensa de esta Memoria se pretende optar a la obtención del Doctorado Europeo, habida cuenta que la doctoranda reúne los requisitos exigidos para tal mención:

1. Se cuenta con los informes favorables de dos doctores pertenecientes a Instituciones de Enseñanza Superior de países europeos distintos al nuestro.
 2. En el Tribunal que ha de evaluar la Tesis existe un miembro de un centro de Enseñanza Superior de otro país europeo.
 3. Parte de la defensa de la Memoria se realizará en la lengua oficial de otro país europeo.
 4. La doctoranda ha realizado una parte del trabajo experimental en el *Micro and Trace Analysis Center* de la Universidad de Amberes (Bélgica), gracias a la concesión de una ayuda para estancias en el extranjero asociada a la beca de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte.
-

A mis incansables directores de Tesis, Mercedes Gallego y Miguel Valcárcel, que se han enfrentado sabiamente a la labor de orientarme tanto científica como personalmente. Sólo espero haber estado a la altura de la fe que siempre habéis depositado en mi persona. Por vuestro incondicional apoyo y confianza, mi más sincera gratitud.

Al Departamento de Química Analítica, por ser una fuente inagotable de amistad y compañerismo, antes, ahora y siempre. Estéis donde estéis, gracias a todos.

A los amigos que me han brindado su apoyo durante estos años, siempre dispuestos a acompañarme en los buenos y malos momentos. Gracias por recordarme que cuento con vosotros.

Special thanks should be given to Professor Freddy C. Adams, for offering me the opportunity to work with him at the Micro and Trace Analysis Centre at the University of Antwerp. I am deeply grateful to Professor Adams and to his warm working group, for their kindness and help during my stay in the Belgian country. The time I spent among you was a pleasant and unforgettable experience. All of you, thanks.

Quiero agradecer a la Dirección General de Universidades del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte la concesión de una beca de FPU que ha posibilitado mi dedicación a este trabajo durante cuatro años.

A mi familia,
sin cuyo apoyo habría sido imposible la realización de este trabajo.
Gracias por animarme a continuar día tras día.



Índice



Index

ÍNDICE

OBJETO	15
LISTADO DE ACRÓNIMOS	21
CAPÍTULO I	
<hr/>	
INTRODUCCIÓN	23
I. 1. Aproximación general a la especiación	25
I. 2. Especiación de plomo	45
I. 3. Fullerenes in Analytical Sciences	67
CAPÍTULO II	
<hr/>	
HERRAMIENTAS EMPLEADAS EN LA TESIS DOCTORAL	91
II.1. Estándares y Reactivos	94
II.2. Sistemas de flujo continuo	97
II.3. Espectrómetro de absorción atómica	98
II.4. Cromatógrafo de gases	98
II.5. Detectores acoplados al cromatógrafo de gases	99
II.5.1. MS	
II.5.2. MIP-AES	
II.5.3. ICP-TOFMS	
II.6. Otra instrumentación	109
CAPÍTULO III	
<hr/>	
ESPECIACIÓN MEDIANTE FAAS	111
III. 1. Speciation of inorganic lead and trialkyllead compounds by FAAS following continuous selective preconcentration from aqueous solutions	115
III. 2. Group speciation of metal dithiocarbamates by sorption on C ₆₀ fullerene	133

CAPÍTULO IV

SCREENING Y ESPECIACIÓN DE PLOMO MEDIANTE FAAS Y GC/MS	147
IV. 1. Speciation of inorganic lead and ionic alkyllead compounds by GC/MS in prescreened rainwaters	151
IV. 2. A fast unit for the simultaneous preconcentration and derivatization of ionic alkyllead species followed by GC/MS	171

CAPÍTULO V

INFLUENCIA DEL DETECTOR DEL CROMATÓGRAFO DE GASES EN LA ESPECIACIÓN DE PLOMO	183
V. 1. Comparison of three coupled gas chromatographic detectors (MS, MIP-AES, ICP-TOFMS) for organolead speciation analysis	187

CAPÍTULO VI

EMPLEO DE NUEVOS DERIVADOS DE FULLERENOS PARA LA ESPECIACIÓN DE PLOMO	207
VI. 1. New fullerene derivative for metal preconcentration. A case study in lead speciation	211

CAPÍTULO VII

RESUMEN Y DISCUSIÓN	229
VII.1. Discusión general de los resultados	231
VII.1.1. Evolución del trabajo experimental	
VII.1.2. Hilos conductores de la Memoria	
VII.1.3. Elementos diferenciales de la Memoria	
VII.1.4. Resultados analíticos	
VII.2. Resumen de las conclusiones más relevantes	248
VII.3. “Productos” de la Tesis	250
VII.4. Limitaciones del estudio	251
VII.5. Futuras vías de investigación	253

APÉNDICES

A. Artículos derivados de la Tesis Doctoral	265
B. Patente de invención	267
C. Comunicaciones a congresos	269



Objeto

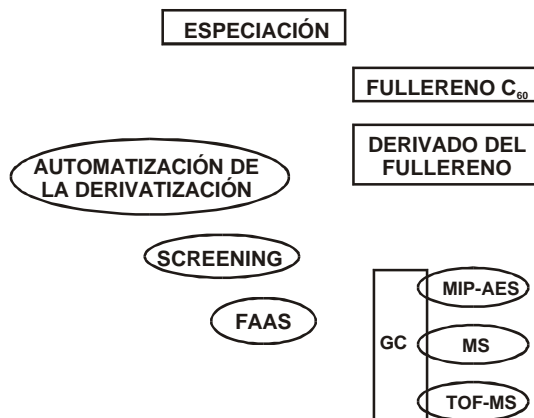
Aim

Los trabajos desarrollados en esta Memoria se inscriben en la línea de investigación del grupo FQM 215 “Simplificación, automatización y miniaturización del proceso analítico” de la Junta de Andalucía. Los objetivos globales que se han marcado son:

- a) introducir innovaciones en el ámbito de la especiación medioambiental;
- b) demostrar las ventajas que implica el empleo de los fullerenos en la especiación;
- c) desarrollar metodologías analíticas que ofrezcan ventajas sustanciales respecto a las ya descritas; y
- d) demostrar la utilidad de la criba previa de muestras (pre-screening) en el ámbito de la especiación medioambiental.

Como es habitual en el desarrollo de la investigación científica, también han surgido nuevos objetivos relevantes tales como el empleo de derivados de fullerenos, la simplificación de los procesos analíticos, la comparación sistemática de los detectores acoplados en línea con un cromatógrafo de gases, etc.

La Memoria se estructura de tal forma que en sus capítulos se muestra la combinación de los elementos básicos que la componen y que se muestran en el siguiente esquema:



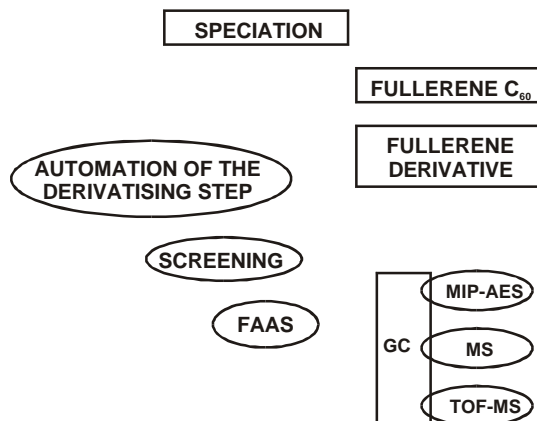
Así, cada apartado ofrece una orientación inicial en función del sorbente utilizado para la preconcentración y el clean-up (fullereno y su derivado dietilditiocarbámico), de la metodología desarrollada (automatización de la derivatización y/o screening de muestras) y de los instrumentos utilizados para llevar a cabo la determinación de las distintas especies de interés (AAS, GC/MS, GC/MIP-AES, GC/ICP-TOFMS).

The work described in this Report was conducted within the research framework of Group FQM 215 “Simplification, Automation and Miniaturization of the Analytical Process”, under the auspices of the Andalusian Regional Government. The principal goals of this research were as follows:

- (a) To introduce innovations in the area of environmental speciation;
- (b) to demonstrate the advantages of using fullerenes for speciation;
- (c) to develop analytical methodologies substantially improving on existing ones; and
- (d) to demonstrate the usefulness of pre-screening in environmental speciation.

As usual while conducting scientific research, new aims arose such as exploiting the potential of fullerenes, simplifying analytical processes, systematically comparing the types of detectors usually coupled on-line to gas chromatographs, etc.

This Report is organized in such a way that its chapters expound the combination of its basic elements as shown in the following scheme:



Thus, each section introduces the specific methodology used (to automate derivatization and/or screen samples) and the instruments employed (AAS, GC/MS, GC/MIP-AES, GC/ICP-TOFMS) to determine the different target species.

LISTADO DE ACRÓNIMOS

AAS	Espectrometría de absorción atómica
ADTP	Ácido dietilentriamino pentaacético
AEDT	Acido etilendiamintetraacético
AES	Espectrometría de emisión atómica
AFM	Microscopía de fuerza atómica
APDC	Pirrolidín ditiocarbamato amónico
CCP	Plasma por acoplamiento capacitativo
CE	Electroforesis capilar
CFS	Sistemas de flujo continuo
CI	Ionización química
DCP	Plasma generado por corriente directa
DEL	Dietilplomo
DML	Dimetilplomo
ECD	Detector de captura de electrones
EI	Impacto electrónico
ETAAS	Espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica
EV	Válvula de elución
FAAS	Espectrometría de absorción atómica con atomización por llama
FI	Inyección en flujo
FID	Detección de ionización de llama
FPD	Detección fotométrica de llama
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
GC	Cromatografía de gases
HG	Generación de hidruros
HIV	Virus inmunodeficiencia humana
IBMK	Isobutil metil cetona
ICP	Plasma acoplado por inducción
INSHT	Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo

Listado de Acrónimos

LC	Cromatografía líquida
MIP	Plasma inducido por microondas
MRC	Material de referencia certificado
MS	Espectrometría de masas
MTEL	Metiltriethylplomo
NaDDC	Dietilditiocarbamato sódico
NMR	Resonancia magnética nuclear
ODS	Sílice con grupos octadecilo
PAHs	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PCBs	Bifenilos policlorados
PTFE	Politetrafluoro etileno
PV	Válvula de preconcentración
PZ	Piezoeléctrico
QMB	Microbalanza de cuarzo
RF	Radiofrecuencia
RSD	Desviación estándar relativa
SAW	Sensor de ondas acústicas
SIM	Monitorización selectiva de iones
SPE	Extracción en fase sólida
STM	Microscopía de barrido electrónico
TBL	Tributilplomo
TeEL	Tetraetilplomo
TEL	Trietilplomo
TeML	Tetrametilplomo
THF	Tetrahidrofurano
TML	Trimetilplomo
TOFMS	Espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo
TPhL	Trifenilplomo
TPL	Tripentilplomo
VLA	Valor límite admisible
XRD	Difracción de rayos X



Capítulo I



Introducción

Chapter I

Introduction

I.1 APROXIMACIÓN GENERAL A LA ESPECIACIÓN

La investigación medioambiental ha puesto de manifiesto el hecho de que metales y metaloides pueden aparecer en la naturaleza en diversos estados de oxidación y formando parte de muy diferentes compuestos; estas distintas formas químicas son normalmente conocidas como “especies” y su distribución, así como su efecto sobre los distintos organismos, es muy variable. Algunos elementos son esenciales para varias formas de vida, pero pueden ser tóxicos a dosis altas; en muchas ocasiones, los efectos producidos en el organismo dependen de la forma en la que se encuentre presente el elemento, variando su toxicidad en intensidad e incluso en el mecanismo de actuación. La información clásica sobre el contenido total de un elemento en una muestra determinada ya no es suficiente para definir esa muestra. Por el contrario, cada vez se extiende más la idea general de que es necesario conocer la distribución del elemento entre sus diversas especies para satisfacer las demandas informativas planteadas por multitud de áreas: toxicológica, clínica, química medioambiental, geoquímica, industrial, etc.

DEFINICIONES

El término “**especiación**” ha sido reiteradamente empleado en la multitud de metodologías desarrolladas recientemente para realizar esta discriminación entre especies. Sin embargo, se ha aplicado tanto a la transformación de especies como a su distribución así como al procedimiento analítico empleado para detectar su presencia y/o determinar su concentración de forma discriminada. La confusión derivada de la gran variedad de acciones englobadas bajo el mismo término¹ revela la necesidad de una definición única y directa, de vital importancia para la comunicación interdisciplinar y aplicable dentro y fuera de la comunidad científica para implicar a los responsables de la legislación y a los grupos de consumidores. Desde 1784, se conocen varios significados para el término “especiación”: uno de ellos se emplea actualmente con poca frecuencia en el ámbito de la Química Orgánica y se refiere a “*reacción específica*”; los restantes significados aún mantienen su vigencia y conviene hacer una distinción entre ellos. Para ello se han utilizado las recomendaciones de la IUPAC en este contexto² que se materializan en los vocablos que deben ser sustituidos para conseguir una terminología estándar que se esquematiza en la Figura I.1.

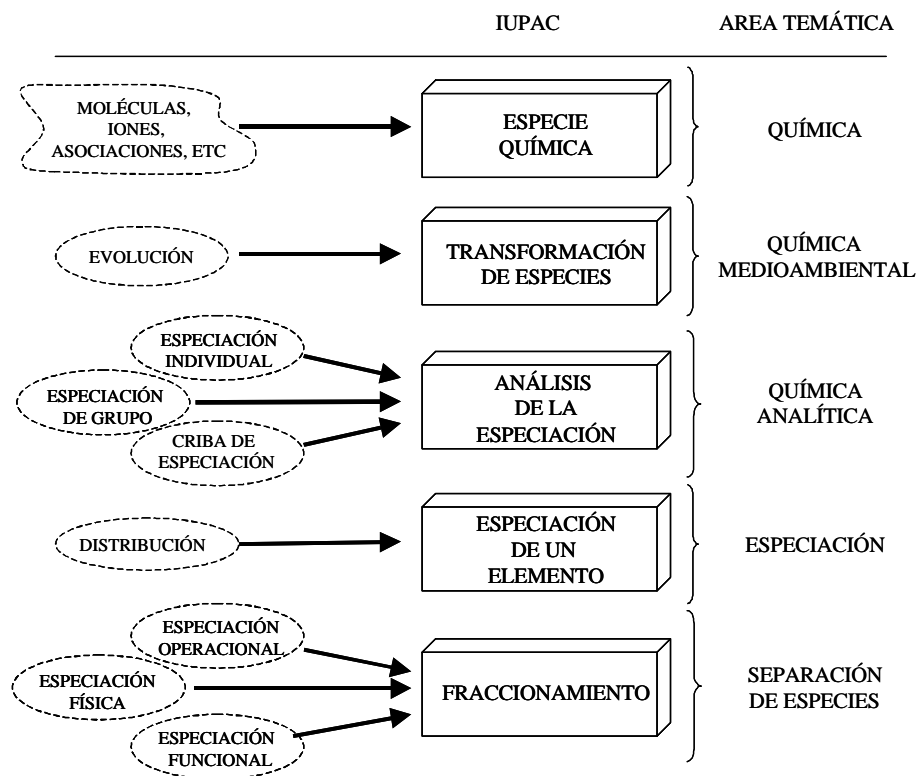


Figura I.1. Terminología relacionada con la especiación

En biología, la palabra especiación se emplea para describir la evolución de las especies, en el sentido del desarrollo por parte de una subpoblación aislada de cambios genéticos en que la transforman en un grupo de individuos estadísticamente distintos de la población original. Basándose en este concepto, el término especiación se ha empleado frecuentemente en Geoquímica y Química Medioambiental para designar las transformaciones que tienen lugar durante los ciclos en los que toman parte los elementos (ej. la acumulación de elementos traza en suelo y lodos y su posterior distribución en el medio acuático). Para evitar confusiones, la IUPAC³ recomienda emplear “**transformación de especies**” en estos casos.

En el ámbito de la Química Analítica, el uso más extendido del término especiación se refiere a la actividad analítica implícita en la identificación y cuantificación de las distintas especies químicas y su distribución, normalmente para indicar que la información que suministra una nueva metodología es más

completa que la proporcionada por métodos convencionales que ofrecen una información global no discriminada. En función de la extensión del análisis, se ha distinguido entre “*criba de especiación*”, si el objetivo del análisis es la detección y/o determinación de una única especie, “*especiación de grupo*”, si se pretende obtener información sobre un grupo específico de compuestos o elementos que muestran una respuesta global a un determinado parámetro, o “*especiación individual*”, si se obtiene la máxima información sobre todas las especies presentes en cuanto a identificación (estructura molecular, electrónica o nuclear) y a determinación³. El término “**análisis de la especiación**”^{*} está explícitamente recomendado por la IUPAC para englobar estas actividades analíticas.

La última acepción reconocida por la IUPAC aconseja el empleo de “**especiación de un elemento**” para indicar la distribución de especies de un determinado elemento en una muestra o matriz en particular, y sólo en este caso. El equivalente empleado hasta ahora sería la “*distribución de especies*”³ muy usado en análisis de tipo medioambiental o ecotoxicológico, entre otros campos.

La separación de las distintas especies en grupos con similares propiedades no puede ser considerada especiación, aunque es una herramienta muy útil para llevar a cabo la determinación de las especies de interés. El concepto de “*especiación física*”³ entendido como la determinación de las diferentes formas de una misma especie química (ej. fracción soluble y fracción suspendida, empleo de extracciones secuenciales, etc.), así como los términos de “*especiación operacional*” o “*especiación funcional*” para definir la caracterización de grupos formados por compuestos diferentes entre sí, pero que reaccionan de forma similar a una operación metodológica determinada o que provocan una idéntica respuesta biológica en el organismo, respectivamente, no deben ya ser empleados. En su lugar la IUPAC introduce el término “**fraccionamiento**” que abarca los procesos de clasificación de un analito o grupo de analitos según sus propiedades físicas (ej. tamaño, solubilidad) o químicas (ej. tipo de enlace, carga, reactividad).

Una vez definida la especiación como la distribución de un elemento entre distintas especies químicas en un sistema dado, se impone la necesidad de

* La traducción al castellano del término “speciation analysis” propuesto por la IUPAC no es fácil. Se ha optado por la opción más directa para evitar confusiones terminológicas. En realidad la palabra análisis debería referirse más a las muestras que a los analitos (especies).

definir claramente la palabra “especie” en el área que nos interesa. Según la IUPAC, “**especie química**” es una forma específica de un elemento definida por su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación, y/o su estructura molecular o compleja.

Todos estos términos están claramente relacionados entre sí (Figura I.2), de manera que el concepto de especie química es la base que permite la definición de la especiación de un elemento. A su vez, las distintas formas en las que se distribuye un elemento dependen de las transformaciones que sufran las especies como consecuencia de su interacción con otros componentes de la matriz o las alteraciones a las que se someta durante el proceso de la determinación de su concentración (análisis de la especiación). Este proceso cuenta con el apoyo del fraccionamiento de la muestra como una herramienta de gran utilidad.

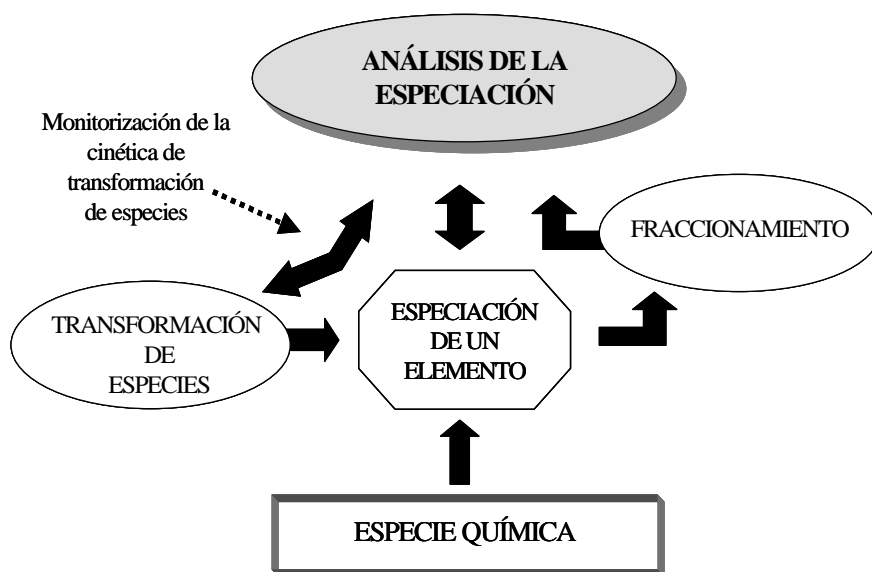


Figura I.2. Relación entre los términos relacionados con la especiación

EVOLUCIÓN HISTÓRICA DEL CONCEPTO DE ESPECIACIÓN

El concepto de especiación elemental, interpretado como el reconocimiento de la existencia de distintas formas de un metal, data de la década de los 50's, cuando un grupo de investigadores geoquímicos separó las fracciones de "metal disuelto" y "metal particulado" con una simple filtración a través de una membrana de 0.45 μm . Más adelante, el desarrollo de la electroquímica hizo posible la discriminación entre metal libre y metal complejoado en muestras de agua. Sin embargo, no fue hasta 1976 cuando se publicó una metodología que podía ser considerada como "especiación global". Por primera vez se llevó a cabo la separación minuciosa de cada una de las siete formas químicas y físicas que el autor estimaba posibles en muestras de agua (metal libre, metal en complejos orgánicos lábiles, metal en complejos orgánicos estables, metal en complejos inorgánicos lábiles, metal en complejos inorgánicos estables, metal adsorbido en materia orgánica y metal adsorbido en materia inorgánica).⁴ Por otra parte, el desarrollo de las técnicas instrumentales era emergente, y en 1966 se describió el primer acoplamiento entre un cromatógrafo de gases y un espectrómetro de absorción atómica con atomización por llama, para la determinación de compuestos organoplomados en gasolina. Aunque la eficacia de estas primeras metodologías pueda ser cuestionable, son un claro reflejo de la inquietud que la comunidad científica ha mostrado por el conocimiento de la distribución de metales y metaloides en el medioambiente, especialmente en los últimos cinco años. Sin embargo, esta preocupación no fue compartida por las autoridades y la población en general hasta que una serie de desastres naturales o económicos alertaron del alcance de su importancia: la enfermedad de Minamata, causada por la emisión de compuestos organomercúricos en la bahía de Minamata (Japón), el naufragio en el Mar Mediterráneo del buque SS Cavtat, cargado con 200 toneladas de compuestos organoplomados, la elevada mortalidad de ostras en las granjas de la bahía de Arcachon (Francia) provocada por la contaminación con compuestos organoestannosos, o la contaminación del agua potable con compuestos organoarsenicales detectada en varias zonas de Bangladesh. Actualmente, la legislación es bastante ambigua en este tema, y en la mayoría de los casos sólo considera los niveles totales de metales, pero no las concentraciones de las especies individuales. Este es el caso de gran parte de las directivas europeas, junto con la "WHO Drinking Water Guidelines" o la lista de contaminantes acordada en la Tercera Conferencia del Mar del Norte de 1990.

Aun en las directivas en las que se contemplan especies metálicas, la definición es muy imprecisa, Y se refiere a “mercurio y sus compuestos”, “arsénico y sus formas inorgánicas”, o “cadmio y sus derivados orgánicos”. Por lo tanto, existe una evidente necesidad de mejorar la legislación existente respecto a las formas químicas de los elementos y de desarrollar estándares escritos que permitan una mejor comunicación entre los investigadores y la sociedad en general.

ÁREAS DE INTERÉS EN ESPECIACIÓN

Los objetivos principales de la especiación de metales y metaloides se centran en aspectos relacionados con la toxicidad respecto a diversos sistemas biológicos. En esquema (ver Figura I.3), las áreas implicadas en análisis de especiación son medio ambiente, alimentación, salud e industria. Los efectos nocivos de conocidas formas metálicas (ej. organoplomados, organoestannosos, especies de mercurio) sobre diversos **compartmentos medioambientales** (aire, aguas naturales, sedimentos, suelos) se han estudiado ampliamente y han

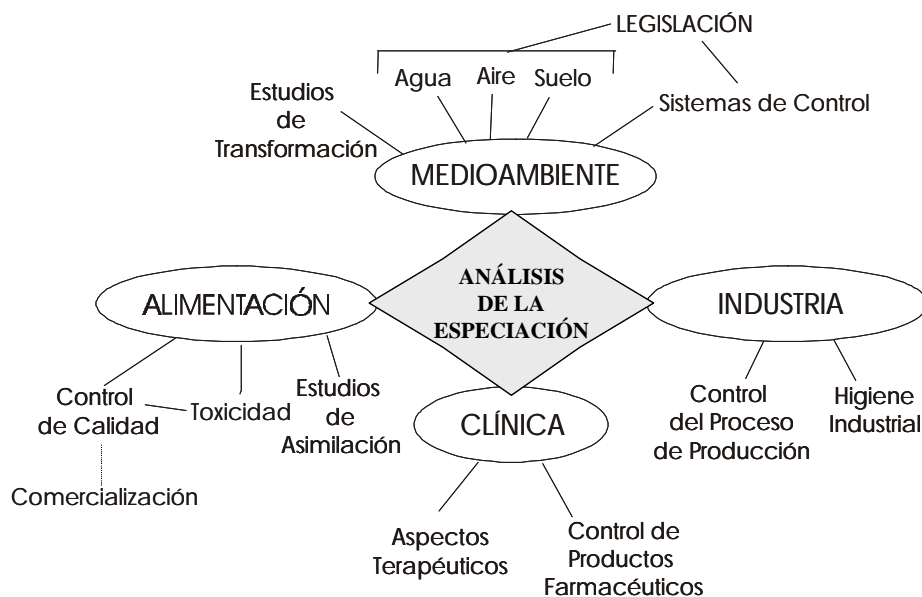


Figura I.3. Campos de aplicación del análisis de la especiación

constituido el núcleo del desarrollo del análisis de especiación. Consecuencia directa del mejor conocimiento de la toxicidad de ciertas especies es la aparición de regulaciones y legislación para el tema, aunque diste mucho de ser específica. Otros objetivos secundarios de la investigación de las diversas especies son la evaluación de los efectos de una exposición prolongada a niveles de concentración bajos, los estudios de transformación biológica y geológica, y la mejora de la calidad de los resultados analíticos para la implantación de sistemas de control. No obstante, existen otros muchos sectores interesados en la determinación de las diversas especies de metales y metaloides, fundamentalmente en el control de procesos industriales, la industria relacionada con la alimentación, y las áreas de bioquímica y farmacia.

La especiación de elementos traza en **productos alimenticios** está justificada desde varios aspectos. En primer lugar, la asimilación de un elemento en el proceso metabólico depende críticamente de la forma química en la que está presente en la dieta. La cantidad total de un elemento contenida en un alimento no nos proporciona mucha información acerca de cómo será absorbido y utilizado por el organismo que lo ingiere. Necesitamos conocer su naturaleza química, cómo se comporta en el tracto gastro-intestinal, cómo se absorbe y qué ocurre una vez que se ha absorbido, sin olvidar que pueden producirse interacciones con otros elementos que tengan efectos tan dispares como la mejora de la asimilación o la variación de la toxicidad. En función de la información obtenida, puede adaptarse la forma óptima de ingestión en cada caso para el tratamiento más efectivo de carencias de elementos esenciales. El *Codex Alimentarius* recoge algunas consideraciones acerca de la especiación de estos elementos, pero no existen recomendaciones legales que puedan orientar al consumidor. El segundo aspecto de interés concierne a la discriminación entre formas tóxicas y no tóxicas del elemento traza en cuestión. Se necesitan datos concretos sobre las especies predominantes en los alimentos y su comportamiento en el intestino para un estudio realista de las evaluaciones de riesgo que permitan el establecimiento de los límites en los que se sobrepasan los requisitos biológicos y se da la intoxicación. También se contempla el caso de contaminación de productos alimenticios por contaminantes específicos (ej. organoestannosos en ostras y mejillones, metilmercurio en pescado), que ha originado la aparición de rígidos controles en los mercados de exportación para formas particulares de elementos o compuestos. En este sentido, un estricto

control de calidad de los productos destinados a la alimentación exige la implantación de análisis de especiación.

La **química clínica** es un campo muy prometedor para el análisis de especiación. Los metales son componentes de una gran variedad de drogas terapéuticas, y se estudia el empleo de metales como platino, oro y selenio en tratamientos contra el cáncer. Los compuestos organoestannosos se emplean como catalizadores en los procesos de producción de productos farmacéuticos, y también como estabilizadores de polímeros usados como materiales de relleno. La ausencia de estas especies en el producto final debe asegurarse mediante el análisis de especiación pertinente.

Uno de los sectores que experimenta una mayor demanda de especiación es el de la **industria**, tanto en el control del proceso de producción como en higiene industrial. En la sociedad actual, la toma de decisiones se apoya en la calidad de la información. Las decisiones en este sector suelen tener importantes consecuencias económicas y no siempre pueden estar basadas en la información incompleta obtenida por determinaciones totales del contenido en metal. Por ese motivo, la identificación de especies metálicas tiene gran importancia en el proceso industrial de producción. Muchas industrias emplean compuestos organometálicos como catalizadores; la implantación de un sistema de control de la integridad molecular del catalizador reduciría el coste de producción y mejoraría la eficiencia global de todo el proceso de producción, además de asegurar la calidad adecuada del producto final. Respecto a la higiene industrial, la industria se compromete a efectuar un seguimiento de sus productos en todo momento, y es responsable de la salud de sus trabajadores, los consumidores y el público en general. La identificación de riesgos es de suma importancia y requiere un cuidadoso estudio epidemiológico y toxicológico de las diferentes especies; la evaluación más compleja se presenta en la evaluación del impacto de las especies presentes en la superficie de partículas generadas por la actividad industrial. En concreto, la caracterización de la capa superficial de aerosoles metálicos encontrados en la atmósfera de trabajo de la industria del cromo es especialmente preocupante, porque es posible que estas especies sean capaces de interactuar con las células, membranas y otros componentes del sistema respiratorio.

PROBLEMAS DE LA ESPECIACIÓN

Según la nomenclatura recomendada por la IUPAC, cada una de las distintas conformaciones, estados de oxidación, o formas transitorias de un elemento, junto con sus átomos de coordinación y las moléculas de las que forma parte constituye técnicamente una especie diferenciada. La identificación y determinación de cada una de las especies de un elemento que están presentes en una muestra determinada es una tarea complicada que está sometida a severas dificultades (Figura I.4), especialmente por los aspectos que se detallan a continuación:

- ❑ Diversidad de analitos y de muestras,
- ❑ Bajos niveles de concentración de los analitos,
- ❑ Distribución de los compuestos entre los diferentes sustratos medioambientales,
- ❑ Inestabilidad de las especies metálicas,
- ❑ Asequibilidad y calidad de los estándares de medida, y
- ❑ Dificultades en los procesos analíticos
 - Toma, conservación y preparación de la muestra
 - Separación y detección de especies
 - Validación de datos

El **número de especies a determinar** en cada muestra depende de las formas químicas en las que se distribuye el elemento en cuestión, de las características intrínsecas de la muestra que pueden estar íntimamente relacionadas con la distribución del metal, y por último de los objetivos concretos que se deben satisfacer con el análisis de especiación (fit for purpose). Ciertamente, el problema de la especiación de selenio en un ecosistema determinado ha de ser abordado de forma muy diferente al problema originado por el uso de catalizadores organometálicos en el proceso de producción de un producto farmacéutico. En el primer caso, han de determinarse todas las especies posibles (metal libre, metal complejoado en distintos complejos, compuestos organometálicos, etc.) en varios tipos de muestra (aire, agua, suelo, sedimentos) para conocer la distribución del elemento en los distintos compartimentos medioambientales mientras que en el segundo es suficiente un control del

catalizador y sus compuestos de degradación en el efluente de la línea de producción.

El número de especies a las que puede dar origen un único elemento y la **concentración** en la que pueden encontrarse es muy variable. Una de las especies o un grupo de ellas puede ser la predominante en una muestra dada mientras que las restantes constituyen un porcentaje menor y esta situación puede invertirse en una matriz diferente en función de la estabilidad relativa de las especies. La distribución de un elemento entre sus especies es primordial fundamentalmente en el caso de que alguna de ellas presente una toxicidad elevada a niveles de concentración muy bajos, como de hecho suele ocurrir. Por ejemplo, los compuestos organometálicos suelen ser más tóxicos que las formas inorgánicas del mismo elemento, excepción hecha del arsénico. La mayor parte de los compuestos organometálicos que aparecen actualmente en el medio ambiente han sido generados por el hombre para utilizarlos como catalizadores en procesos industriales (Ni, Ru, Hg), agentes de limpieza para embarcaciones y fungicidas (Sn), antidetonantes en gasolina (Pb), etc. Una vez en el medio ambiente, se degradan parcialmente a la forma inorgánica, pero también pueden sufrir procesos de alquilación natural (especialmente metilación y etilación), produciendo así un número de especies intermedias muy elevado y en concentraciones que suelen oscilar entre los $\mu\text{g/L}$ y los ng/L . Estas concentraciones son suficientes para inducir graves efectos tóxicos en diversos organismos, como es el caso del tributilestaño, que produce esterilidad a concentraciones de 5 ng/L .



Figura I.4. Dificultades en el análisis de la especiación medioambiental

Uno de los aspectos más preocupantes de la contaminación es que no se reduce al sustrato en el que se origina, sino que se extiende rápidamente al resto de los compartimentos medioambientales. Los mecanismos de **distribución** de los compuestos son muy variados y dependen en gran medida de su naturaleza y estabilidad. Las sustancias volátiles pueden recorrer grandes distancias arrastradas por las corrientes de aire como moléculas independientes o adsorbidas sobre partículas. Estos compuestos pueden sufrir reacciones de degradación que suelen tener origen fotoquímico, bien por fotólisis directa o bien por interacción con radicales generados por esta vía, y cuyo producto son especies iónicas que vuelven a la superficie terrestre arrastradas por la lluvia. Una vez en el suelo, la velocidad de degradación dependerá de la actividad fotoquímica a la que esté sometido el compuesto y de los metales con los que pueda entrar en contacto y actuar como catalizadores. Por otra parte, pueden darse reacciones de

complejación con sales inorgánicas, compuestos orgánicos, que pueden facilitar la asimilación de los elementos metálicos por parte de los organismos del sistema. Las especies pueden distribuirse a través de las aguas superficiales hasta alcanzar depósitos naturales, lagos, océanos, etc; simultáneamente, y en función de la composición del terreno, se producirá la difusión hasta una cierta profundidad en la que encuentre una capa impermeable, llegando a aparecer también en los acuíferos a los que tenga acceso. De igual forma, una especie liberada en el mar puede ser absorbida en las costas y difundida a través de los acuíferos tierra adentro, no necesariamente como la especie original. También es común la acumulación en sedimentos, en los que la concentración de ácidos húmicos y fúlvicos es relativamente alta y tienen una gran capacidad para retener especies metálicas. Se han descrito casos de biometilación anaeróbica de metales en estas acumulaciones naturales, aunque la contribución de estas especies naturales es mínima comparada por la generada por la actividad industrial. El equilibrio de distribución de las especies entre los distintos sustratos (agua, partículas suspendidas, sedimentos, suelos, aire) y la propia **inestabilidad** de las especies está influenciada por propiedades físico-químicas como la solubilidad y el coeficiente de distribución entre fases, siendo muy importante el papel que ejercen los complejantes de diversos tipos. A partir de una especie inicial se produce por tanto la formación de multitud de especies distintas, que aparecen en diversas matrices y en concentraciones muy pequeñas. En consecuencia, el estudio de la especiación de un elemento se convierte en un problema dinámico tanto espacial como temporalmente, lo que presenta un gran número de dificultades en todos los campos implicados, incluyendo la Química Analítica.

La gran diversidad de analitos y la creciente complejidad de las muestras (ej. sedimentos, residuos industriales) requiere el desarrollo de metodologías analíticas avanzadas y a menudo **técnicas instrumentales** sofisticadas capaces de discriminar entre las diversas especies sin alterar la información original. El objetivo es satisfacer dos requisitos indispensables: selectividad para asegurar que la medida corresponde a las especies de interés, y sensibilidad para alcanzar el nivel de concentración del analito en la muestra, que normalmente es muy bajo. La nueva generación de instrumentación surgida se basa en el acoplamiento de una técnica de separación de alta resolución (ej. cromatografía líquida, de gases y de fluidos supercríticos, o electroforesis capilar) con un detector selectivo para el elemento metálico en cuestión y extraordinariamente sensible en algunos casos (ej. espectrometría de absorción o emisión atómica, de masas,

fluorescencia atómica, ICP, MIP). Los acoplamientos más comunes se describen en la Tabla I.1. En general, la cromatografía de gases (GC) es la técnica de separación más utilizada por su gran capacidad de resolución y sensibilidad. Entre los acoplamientos más utilizados se encuentran aquellos en los que se emplea una técnica de espectrometría atómica, AS, (MIP-AES, ICP-AES) debido a la eficiencia en la introducción de la muestra (casi 100%), la escasa pérdida de energía asociada a la vaporización del disolvente, y la selectividad de la respuesta hacia el elemento metálico. La aparición en el mercado de un instrumento GC/MIP-AES y la cada vez mayor facilidad con que se pueden adaptar las fuentes de plasma en los laboratorios ha contribuido al crecimiento exponencial que ha experimentado el número de aplicaciones del acoplamiento GC/AS.

Tabla I.1. Acoplamientos de técnicas usados en el ámbito de la especiación medioambiental

Técnica	Tipo de acoplamiento	Observaciones	Ejemplos de aplicaciones
GC/EI-MS	Acoplamiento sencillo	Sólo aplicable a analitos volátiles o tras una derivatización. Existen instrumentos comerciales	Determinación de compuestos organometálicos en matrices medioambientales, metaloporfirinas en petróleo
GC/FAAS	Tubo de boro como línea de transferencia, lo más corto posible para evitar ensanchamiento de picos. Se evita el nebulizador	Sensibilidad a menudo insuficiente para muestras medioambientales	Determinación de compuestos organometálicos (Pb, Sn, As, Se) en muestras medioambientales
GC/ETAAS	La muestra se lleva al tubo de grafito, que se mantiene a la temperatura de atomización.	El tiempo de vida del tubo se reduce drásticamente	Determinación de especies de Sn en sedimentos de río, especiación de cromo en muestras biológicas
GC/FPD	Acoplamiento sencillo		Determinación de compuestos de Sn y Ge en muestras de agua y sedimentos
GC/MIP-AES	El efluente del GC puede introducirse en el plasma sin apagarlo, a través de una línea a alta temperatura	El sangrado de la columna puede dañar el tubo de descarga. El instrumento se puede adquirir comercialmente	Determinación de compuestos de Pb, Hg y Sn en muestras medioambientales y de Hg en sangre
GC/ICP-AES	Los analitos llegan al plasma a través de una línea de transferencia a alta temperatura	Grandes volúmenes muertos. La ionización de los elementos no metálicos no es efectiva	Análisis de especiación de Pb y Hg en nieve y muestras de agua.
GC/ICP-MS	La misma interfase que en GC/ICP-AES		Determinación de Sb, Pb, Se, Te, Hg y Bi en aguas naturales tras una preconcentración.
LC/EI-MS	Varios tipos de interfases: particle beam, ionización química a presión atmosférica, electrospray	La composición de la fase móvil puede dañar al detector. Equipos comerciales	Especiación de compuestos organoestannosos
LC/FAAS	Acoplamiento sencillo	El mechero o el nebulizador pueden bloquearse. La diferencia de flujos produce una dilución de los analitos: menor sensibilidad	Determinación de organoestannosos en agua, sedimentos y tejidos de moluscos
LC/ETAAS	El efluente forma un aerosol en un capilar de sílice que lo conecta con el horno	Sólo aplicable a especies bien separadas y a ciertos disolventes y tampones	Determinación de especies de Sn y compuestos organoplomados. Especiación de Cr en suelos

Tabla I.1. (Continuación)

Técnica	Tipo de acoplamiento	Observaciones	Ejemplos de aplicaciones
LC/AES	Acoplamiento sencillo mediante un nebulizador		Especiación de V en aguas naturales
LC/ICP-AES	Aspiración convencional a través del nebulizador neumático del ICP	Poca eficiencia en el transporte. El ICP no es directamente compatible con los disolventes orgánicos	Especies de Fe, Mn, P y Pt en aguas, complejos de Al, Fe y Mn en suelos
LC/ICP-MS	Hay que separar los analitos de la fase móvil	Los disolventes orgánicos pueden apagar el plasma	Especiación de Al, Sb, Hg, Pb y Cr. Distribución de Se en el organismo
HG/AAS	Acoplamiento muy simple	Sólo aplicable a metales que forman hidruros volátiles	Determinación de As, Se, Sn, Bi, Te, Sb, Pb y Hg
LC/UV-ICP-MS	Igual que LC/ICP-MS, tras pasar por la celda de UV		Especiación de Al, Fe y Cu en suelos
LC/IR	Detección on-line		Complejos de Cu, Cr y ácidos fúlvicos en suelos
CE/FAAS	Acoplamiento complicado técnicamente	Los flujos no suelen ser compatibles	
CE/EI-MS			
CE/ICP-MS	Inyección directa a través de un nebulizador	La interfase provoca una gran dilución de los analitos	Especiación de Se, determinación de metaloproteínas y complejos de Cd y Fe en muestras biológicas
CE- Photon-induced X-ray emission			Determinación de As, Pb, Se en aguas

La cromatografía líquida también ha sido empleada en sus diversas modalidades (exclusión por tamaño, cambio iónico, cromatografía en fase reversa) aunque los detectores más comunes asociados a esta técnica (UV-Vis) no ofrecen una sensibilidad adecuada. En su lugar, se suele emplear la fluorescencia, detectores electroquímicos o acoplamientos con espectrometría atómica o de masas. La electroforesis capilar ha surgido recientemente como una técnica alternativa en especiación que presenta la ventaja de ser compatible con medios acuosos y tienen mayor capacidad de resolución y frecuencia de muestreo que la cromatografía de líquidos para analitos cargados. Sin embargo, no está muy extendida por la dificultad de acoplar un detector selectivo en continuo.

En casos concretos, no son necesarios los acoplamientos instrumentales y pueden cumplirse los objetivos con herramientas más simples. Así, la polarografía y la voltamperometría son técnicas que permiten diferenciar entre los distintos estados de oxidación de los elementos y analizar muestra que contengan ácidos húmicos y fúlvicos y que se usan muy a menudo en laboratorios instalados en barcos que desarrollan estudios oceánicos. La resonancia magnética nuclear es otra técnica cuyo campo de aplicación se va ampliando cada vez más a pesar de la escasa sensibilidad para algunos núcleos.

La clave del éxito en el análisis de la especiación es la conservación de la información original contenida en la muestra durante el **proceso analítico** global, desde el muestreo hasta la detección final de las distintas especies. Para ello es necesario que ninguna de las etapas del proceso altere las concentraciones iniciales de las especies presentes; de hecho, la mayoría de los resultados erróneos tienen su origen en esta alteración. La operación de **muestreo** es una de las etapas más importantes de cualquier proceso analítico, pero en el caso de la especiación cobra una especial relevancia ya que el equilibrio existente entre las distintas especies metálicas puede verse fácilmente afectado. Deben tomarse las precauciones generales, como el empleo de contenedores de material y forma adecuados para evitar pérdidas de los analitos por adsorción en las paredes del recipiente o contaminación por alguno de los componentes del mismo. Si las especies metálicas son susceptibles de oxidación, la recogida de la muestra debe realizarse en atmósfera de nitrógeno. Ciertos tipos de muestra requieren precauciones especiales, como evitar el uso de agujas de acero para realizar la toma de muestra en sangre, ya que puede originar contaminación por Fe, Cr o Ni; las agujas de diámetro interno pequeño también deben ser evitadas independientemente de su composición, porque pueden destruir los eritrocitos. Para el resto de tejidos biológicos, se recomienda el uso de instrumentos de cuarzo en lugar de acero, el tiempo de muestreo corto y la congelación inmediata de las muestras. En el caso de muestras sólidas como suelos o sedimentos, la representatividad se consigue tomando una cantidad de muestra suficientemente grande; de esta manera los equilibrios en los que están implicadas las distintas especies se conservan intactos en la fracción central. En el caso de los sedimentos la perturbación del equilibrio entre el sedimento y la fase líquida sobrenadante es inevitable.

Durante la **preparación de la muestra** es probable que surjan problemas de inestabilidad en el almacenamiento, o en etapas posteriores como la extracción

en muestras sólidas o la preconcentración en muestras líquidas. En concreto, es particularmente difícil que la **etapa de extracción** no lleve asociada ninguna pérdida, contaminación o alteración de las especies iniciales, ya que no existe ningún esquema de extracción general aplicable a los problemas de especiación. Una de las alternativas es el procedimiento de la extracción secuencial, que consiste en someter a la muestra sólida (suelo o sedimento) al ataque sucesivo de varios reactivos con diferentes propiedades químicas (acidez, potencial redox, actividad quelatante) para extraer distintas fracciones del elemento.⁵ El esquema de extracción secuencial más conocido es el descrito por Tessier y col.,⁶ que a su vez ha originado multitud de modificaciones posteriores.⁷ Sin embargo, estos procedimientos presentan como inconvenientes la poca selectividad de los reactivos empleados en el fraccionamiento y la redistribución de los metales extraídos entre las fases,⁸ lo que conduce a una falta de uniformidad en los resultados obtenidos utilizando diferentes procedimientos de extracción. En un intento de armonizar los métodos existentes para el análisis de especiación de metales para muestras con matrices complicadas en las que es necesaria una etapa de extracción sólido-líquido, el BCR ha propuesto un protocolo de extracción secuencial en tres etapas⁹ en las que los metales se dividen en solubles o intercambiables en medio ácido, oxidantes o reductores. El método ha demostrado ser reproducible y proporciona buenas recuperaciones respecto a la digestión ácida, pero, al igual que otros esquemas de este tipo, adolece de falta de especificidad.¹⁰

Las metodologías analíticas desarrolladas para hacer posible el análisis de especiación con la suficiente sensibilidad suelen hacer uso de técnicas instrumentales en las que un cromatógrafo de líquidos o de gases se acopla con un detector selectivo del metal a determinar. Los compuestos organometálicos volátiles pueden detectarse de forma directa en un cromatógrafo de gases y algunas especies pueden ser determinadas a través de su espectro UV tras su separación empleando cromatografía líquida. Sin embargo, las propiedades físico-químicas de la mayoría de los compuestos metálicos no permiten su determinación directa (volatilidad insuficiente, inestabilidad térmica, espectro UV con poca información), y los analitos deben ser modificados químicamente para facilitar su análisis. A pesar del notable aumento de la sensibilidad que se consigue con la **derivatización**, normalmente no es aconsejable ya que se introduce un cambio que puede inestabilizar las especies presentes. Por ejemplo, si las especies de interés presentes en la muestra son menos estables que los complejos formados como consecuencia de la adición de un agente complejante

adicional, la identificación de las especies originales es prácticamente imposible y se produce una pérdida importante de la información inicial de la muestra. En general, las reacciones de derivatización suelen ser poco selectivas y sus mecanismos no están totalmente controlados, especialmente en matrices complejas,¹¹ motivo por el cual deben ser cuidadosamente estudiadas en cuanto a los efectos que pueda producir sobre la muestra real antes de su aplicación. La *cromatografía de gases* es la técnica más utilizada debido a su elevada eficiencia de separación y a su versatilidad respecto a los sistemas de detección, pero presenta el serio inconveniente de que la volatilidad y estabilidad térmica de la mayoría de los analitos deben ser modificadas para hacer posible su análisis. Las opciones de derivatización empleadas en este área se basan en dos tipos de reacciones: generación de hidruros y alquilación (con reactivos de Grignard o con sales de boro tetravalente). La generación de hidruros presenta la ventaja de ser muy rápida y relativamente simple de manejar, pero sólo es aplicable a aquellas especies cuyos hidruros metálicos sean estables frente a reacciones de disociación o desproporción en las condiciones de trabajo. En cambio, las reacciones de alquilación utilizando reactivos de Grignard tienen un campo de aplicación mucho más amplio. En función de las características del analito se puede escoger el grupo alquílico más adecuado, teniendo en cuenta que los grupos de cadena corta dan lugar a especies muy volátiles, óptimas desde el punto de vista de la separación cromatográfica, pero cuyo manejo implica una serie de precauciones para evitar pérdidas parciales durante el tratamiento de la muestra y resultados erróneos. El principal inconveniente de este sistema de derivatización se deriva de la inestabilidad del reactivo de Grignard frente a la humedad y el aire, que exige el desarrollo de la reacción en atmósfera inerte en un medio orgánico libre de trazas de agua y la posterior eliminación del exceso de reactivo. Esto hace que el tratamiento sea especialmente largo y tedioso. Como alternativa, el empleo de sales de borato permite llevar a cabo la reacción de alquilación “*in situ*” en medio acuoso, lo que supone un gran ahorro de tiempo y esfuerzo; la destrucción del reactivo derivatizador ya no es necesaria, pero esto implica un mayor tiempo de contacto con la muestra y un aumento del riesgo de inducción de reacciones de transalquilación entre las especies a determinar.

En *cromatografía líquida*, la derivatización tiene dos objetivos claramente diferenciados: en primer lugar se pretende afectar a los coeficientes de partición de los analitos para controlar la distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria y mejorar así los tiempos de retención y la resolución. En segundo lugar, la modificación post-columna de los analitos puede tener la

finalidad de alterar alguna propiedad, normalmente óptica, que permita una mejora en la sensibilidad de la detección (ej. fluorescencia, quimioluminiscencia). Los procedimientos de complejación y derivatización en LC suelen ser rápidos y poco laboriosos, en contraste con la gran variedad de etapas y precauciones necesarias en GC.

Otra fuente de error se encuentra en la etapa de **separación** de los analitos, concretamente en aquéllas técnicas que introducen en el sistema una fase estacionaria. Las fases estacionarias pueden provocar la destrucción de las especies, así como pérdidas por adsorción y/o contaminación por parte de los constituyentes de la columna. También se han observado alteraciones de la relación metal/ligando, intercambios de metal entre distintos ligandos, y generalmente una disminución de la estabilidad de los complejos.¹² Para controlar dentro de lo posible la extensión de estos fenómenos, deben emplearse balances de masa o bien usarse inyecciones sucesivas de la misma muestra; si la separación es adecuada, debe obtenerse la misma respuesta tanto cualitativa como cuantitativa. Debe tenerse en cuenta que la identificación de las especies basada sólo en el tiempo de retención puede ser errónea, especialmente si la técnica es de baja resolución; la mejor solución es recurrir a una técnica de confirmación adecuada (ej. EI-MS).

La etapa de **detección** y cuantificación no está libre de errores; éstos se deben a tres factores fundamentales: los problemas de interferencias espectrales y químicas que a menudo presentan los detectores selectivos de especies metálicas, (solapamiento espectral, corrección de fondo errónea) y los relacionados con la calibración (patrones impuros, disoluciones inestables, desarrollo inadecuado) que según el SM&T Programme/EU representan el motivo del 25% de los resultados erróneos.¹¹ Una de las mejores soluciones para evaluar la presencia de errores en las nuevas metodologías es el empleo de materiales de referencia certificados (MRC). La confirmación experimental de los resultados certificados asegura el correcto comportamiento del sistema en una muestra real (salvando las imprecisiones derivadas de que la matriz del MRC no sea idéntica a la de la muestra). Asimismo, permite evaluar la cadena de la trazabilidad, que suele romperse en etapas como la precipitación, destrucción de la matriz o digestión de la muestra debido a la alteración de la distribución de especies inicial (por pérdidas, contaminación o reacciones de desplazamiento o transalquilación). Desgraciadamente, la elaboración de MRC en este contexto no es fácil debido a la inestabilidad de la mayoría de las especies y a la dificultad de evitar todos los errores posibles. Por esta razón, el número de MRC disponibles es mucho menor

del que sería deseable y a menudo no es posible encontrar el adecuado al análisis que se pretende controlar. Hasta el momento la mejor opción posible es el empleo de muestras de referencia que se suministran junto con un procedimiento estándar escrito para el proceso de extracción y que proporcionan una concentración conocida en disolución que está certificada como “concentración extraíble” del elemento (en lugar de concentración total).

REFERENCIAS

- 1 M. Bernhard, F. E. Brinckman, P. J. Sadler, *The Importance of Chemical Speciation in Environmental Processes*, Springer Verlag, Berlin (1986).
- 2 D. M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L. G. Danielsson, H. Muntau, H. P. Van Leeuwen, R. Lobinski, *Pure Appl. Chem.* 72 (2000) 1453.
- 3 A. Kot, J. Namiesnik, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 69.
- 4 G. E. Batley, T. M. Florence, *Anal. Lett.* 9 (1976) 379.
- 5 A. Ure, Ph. Quevauviller, H. Muntau, B. Griepink, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51 (1993) 129.
- 6 A. Tessier, P. G. C. Campbell, M. Bisson, *Anal. Chem.* 51 (1979) 844.
- 7 M. Kersten, U. Förstner, in: A. M. Ure, C. M. Davidson, (Eds.), *Speciation of trace elements in sediments and combustion wastes in Chemical speciation in the environment*, Blackie Academic and Professional, Glasgow, 1995.
- 8 C. M. Davidson, A. L. Duncan, D. Littlejohn, A. M. Ure, L. M. Garden, *Anal. Chim. Acta* 363 (1998) 45.
- 9 A. M. Ure, Ph. Quevauviller, H. Muntau, B. Griepink, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 51 (1993) 135.
- 10 C. Whalley, A. Grant, *Anal. Chim. Acta* 291 (1994) 287.
- 11 Ph. Quevauviller, E. A. Maier, B. Griepink, in: S. Caroli (Ed.) *Element speciation in bioorganic chemistry*. Wiley, New York, 1994.
- 12 B. Michalke, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 2.

I.2. ESPECIACIÓN DE PLOMO

El plomo es uno de los primeros materiales que el hombre ha utilizado de forma constante y más o menos profusa a lo largo de su historia.¹ Cinco milenios atrás, la producción de plomo se incrementó notablemente como consecuencia del desarrollo de técnicas para fundir minerales como la galena y obtener aleaciones de plomo-plata de las que es posible extraer el metal precioso y el plomo como subproducto. Su empleo seguiría aumentando continuamente durante las edades de Cobre, Bronce e Hierro, estimulado por el acuñamiento de monedas de plata (en aquellos tiempos, se obtenía unas 300 veces más de plomo como subproducto en la producción de plata) y el desarrollo de la Civilización Griega. En el período más deslumbrante del Imperio Romano, hace aproximadamente dos mil años, se llegaron a producir unas 80000 toneladas por año, cantidad equivalente a la que se alcanzó en plena Revolución Industrial. De hecho, el envenenamiento por plomo es una de las hipótesis que se proponen para justificar el declive del poder romano. El plomo era omnipresente: se empleaba en todo tipo de utensilios y la mayoría de las localizaciones mineras del Viejo Mundo eran conocidas y explotadas, especialmente las situadas en España, los Balcanes, Grecia y Asia Menor. Con la caída del Imperio Romano, disminuyó también la producción de plomo hasta alcanzar un mínimo durante la Edad Media, antes de aumentar de nuevo en el primer milenio de nuestra era con el descubrimiento de las minas de plomo y plata en Europa Central, la obtención de plata en el Nuevo Mundo y la Revolución Industrial. Hasta entonces las emisiones habían sido básicamente de plomo inorgánico; la aparición del motor de explosión y con él los automóviles trajo consigo el empleo de nuevas especies organometálicas y un aumento vertiginoso de la producción de plomo, así como de su correspondiente emisión atmosférica.

Sin duda la **aplicación** de mayor trascendencia histórica es el empleo del plomo metálico y sus óxidos (PbO , PbO_2) en la fabricación de baterías de plomo, muy conocidas por su extensa utilización como acumuladores de energía eléctrica en los vehículos de motor. Mucho más antiguo es el uso del plomo como colorante para tejidos y barnices o como pigmento en cerámica, debido a los colores de las sales de plomo. En cuanto a los óxidos, desde tiempos remotos se han utilizado como revestimiento en cerámica y como elemento vitrificante en alfarería, además de emplearse de forma usual como insecticida y herbicida

[$\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$, $\text{Pb}_3(\text{AsO}_2)_2$], y en pinturas de exteriores e interiores, bien como pigmento (PbCO_3) o como agente anticorrosivo (Pb_3O_4).² No obstante, el desarrollo de nuevas tecnologías también ha dado lugar a la aparición de nuevas aplicaciones de distintos compuestos de plomo, como los fosfatos y fosfitos de plomo, que se utilizan como estabilizantes en plásticos, el borosilicato de plomo, que se emplea en la fabricación de fibra óptica, o el PbTiZrO_3 , que es un componente de equipos de sonido y módulos de memoria de ordenadores. Por su parte, las aleaciones de plomo se utilizan como soldadura para unir metales entre sí o a vidrio, en circuitos impresos en electrónica, para fabricar elementos decorativos o como protección para aislar fuentes de radiaciones (centrales nucleares, radiaciones ionizantes, etc.), además de servir como electrodos en diversos tipos de baterías.³

Ambientalmente, los derivados del plomo de mayor interés son los compuestos organoplomados tetravalentes R_4Pb formados con el grupo metilo y etilo, es decir, terametilplomo, tetraetilplomo, y sus derivados. Estos compuestos se añaden a la gasolina para retrasar la explosión del carburante y aprovechar así al máximo la caída del pistón, generando una mayor potencia. Sin embargo, el plomo debe ser eliminado del motor para evitar la formación de depósitos metálicos, y para ello se añaden también pequeñas cantidades de dibromuro y dicloruro de etileno. El objetivo es la formación del dihaluro volátil correspondiente, con lo cual el plomo entra en la atmósfera como PbBrCl , PbCl_2 y PbBr_2 . Después, mediante reacciones fotoquímicas provocadas por la luz solar, se forma PbO , que queda en la atmósfera en forma de partículas que pueden ser transportadas por el viento durante horas antes de depositarse.² Asimismo, los compuestos organoplomados pueden entrar en la atmósfera como tales, por evaporación directa de la gasolina, y viajar en forma gaseosa lejos del foco de emisión. Los tetraalquilplomados no son solubles en agua, pero se absorben rápidamente a través de la piel y pasan directamente a los tejidos, donde se transforman en los cationes trialquilados, de mayor toxicidad a nivel neurológico. Como resultado de la degradación de los R_4Pb en las capas altas de la atmósfera también se originan R_3Pb^+ , R_2Pb^{2+} y RPb^{3+} (aunque este último es muy inestable y se descompone a Pb^{2+} casi inmediatamente), que son muy solubles en agua y que son arrastrados por el agua de lluvia hasta caer a la superficie terrestre.

FUENTES DE EXPOSICIÓN

El plomo es un componente normal de la corteza terrestre y se encuentra ampliamente distribuido por la naturaleza. No obstante, la mayor parte de la exposición a la que está expuesto el medio ambiente, incluido el hombre, tienen un carácter antropogénico. En general, podemos distinguir tres fuentes principales de exposición:⁴

A) Exposición en el medio industrial.- En la industria se utilizan todo tipo de especies de plomo, tanto plomo metálico como sus compuestos orgánicos e inorgánicos. Por lo tanto, la intoxicación por plomo inorgánico y sales de plomo se produce con más frecuencia en las industrias en las que se emplean grandes cantidades de estos compuestos, especialmente en industrias que se dedican a fundir, soldar o pulir plomo o sus aleaciones. Otro foco de importancia se localiza en el sector de la minería, ya que la explotación de las menas de blenda (PbS_2) supone una de las principales fuentes para la obtención del metal y principalmente del azufre, muy apreciado por la industria en la forma de ácido sulfúrico. También las actividades relacionadas con la fabricación de baterías o cables y aquéllas en las que se utilizan pigmentos, antioxidantes o esmaltes están directamente expuestas a los efectos del plomo, que puede ser fácilmente absorbido por los trabajadores. Los compuestos orgánicos de plomo se encuentran muy localizados en algunos aceites lubricantes que contienen naftenato de plomo y sobre todo en las gasolinas, en cuya composición se incluyen el tetraetilo y el tetrametilo de plomo como agentes antidetonantes.

B) Exposición en el medio doméstico.- Se debe al uso no profesional de productos comerciales que contienen compuestos de plomo inorgánico en su formulación, especialmente la pintura con minio (Pb_3O_4) o los esmaltes de la alfarería doméstica, pero sobre todo a la ingestión por vía respiratoria de partículas de plomo metálico provenientes del polvo de la calle o de la casa. El óxido de plomo atmosférico procedente de diversas fuentes (pinturas, fundiciones, industria, etc.) se deposita en el suelo, agua, frutas y vegetales, y entra fácilmente en la cadena trófica, ya que es fácilmente absorbido por las plantas.

C) *Exposición debida a las emisiones de los vehículos de motor.*- Una gran proporción del plomo ambiental proviene del que es emitido por los automóviles, que es degradado por distintos agentes en la atmósfera y se transforma en su mayor parte en la especie inorgánica. Una parte de los compuestos organometálicos de la gasolina entra directamente en el organismo por inhalación de las especies como moléculas en estado de vapor o bien adsorbidas sobre partículas de polvo; otra parte es ingerida de forma indirecta junto con la comida en la que se ha depositado plomo.

TOXICOLOGÍA

A niveles altos, el plomo es un veneno metabólico general.² Su toxicidad se debe a la capacidad de la forma iónica para combinarse con grupos sulfidrilo de las proteínas, inhibiendo su acción mediante el bloqueo de los sitios activos que deberían estar disponibles para otros cationes. Interfiere el transporte de iones Ca^{2+} , en la síntesis y liberación de algunos neurotransmisores y en la activación de varias proteínas. Desde el punto de vista neurológico hay alteraciones en el sistema nervioso central en forma de irritabilidad, alteraciones de la memoria, dificultades de concentración y cefaleas, que pueden evolucionar con convulsiones, coma y, en casos extremos, la muerte. También produce alteraciones de los nervios periféricos, en forma de afecciones del sistema motor en extremidades superiores, de las cuales la más significativa es la parálisis radial.

Otra de las acciones tóxicas más importantes del plomo es la inhibición de la síntesis del grupo hemo de la hemoglobina.⁴ El plomo inhibe las enzimas responsables de la inserción del hierro en el anillo de protoporfirina para formar el grupo hemo, lo que origina como consecuencia una disminución de la producción de hematíes y un acortamiento de su vida media.

Además de las alteraciones neurológicas y de la anemia, el cuadro clínico de la exposición por plomo se completa con signos digestivos como anorexia, estreñimiento, dolores abdominales y vómitos, acompañado frecuentemente de lesiones hepáticas.

La vía de absorción depende en gran medida de la especie de plomo en concreto: así, los compuestos inorgánicos de plomo se absorben por la vía respiratoria y la digestiva; en cambio, los compuestos organoplomados se absorben por vía cutánea.

Una vez que el plomo ha penetrado en el organismo se concentra en la sangre, hasta que se alcanza el nivel de saturación y comienza una lenta difusión hacia los tejidos blandos, órganos y huesos. Se estima que el 90% del plomo se deposita en los huesos, donde sustituye al calcio dado el similar tamaño de Pb^{2+} y Ca^{2+} y el 10% restante se distribuye por otros órganos, especialmente cerebro, hígado y riñones. De hecho, la absorción de plomo aumenta considerablemente en personas con deficiencia de calcio y también en niños, debido a que su cerebro está creciendo continuamente. El plomo tiene un efecto acumulativo en el organismo, y su toxicidad es proporcional a la cantidad presente en los tejidos y órganos. Se considera que la vida media del plomo depositado en los huesos puede aproximarse a los 30 años, pero en esta localización es relativamente inactivo.

Los derivados orgánicos del plomo se comportan de forma diferente a las especies de plomo inorgánico, ya que el carácter hidrofóbico que le confieren los radicales orgánicos facilitan el tránsito a través de las membranas celulares. Esta característica implica una mayor toxicidad que el Pb^{2+} , ya que pasan a los tejidos y órganos de forma casi cuantitativa. Mientras que el plomo inorgánico se almacena preferentemente en los huesos y provoca anemia y alteraciones en las proteínas, estas especies orgánicas tienen afinidad prioritaria por el sistema nervioso central, atacando estas células de manera casi inmediata. Causan cefalea, insomnio, síndrome maniaco y, en casos graves, convulsiones, coma y muerte, como se descubrió hace años después de las muertes de varios trabajadores de las compañías que originalmente producían estos compuestos. Además, producen dermatitis irritativa y, si la exposición ha sido intensa y prolongada, afectación hepática, renal y muscular.

LEGISLACIÓN

Como es común en especiación, a pesar de la diferencia en la toxicidad de las distintas especies de plomo y de los distintos tipos de exposición a la que tanto los seres humanos como el medio ambiente están sometidos, la legislación se refiere únicamente al contenido total del elemento, sin mencionar distinción alguna entre especies. Así, tanto la Directiva europea que regula la contaminación atmosférica⁵ como las que controlan la calidad en aguas, bien superficiales⁶ o bien para el consumo humano,⁷ sólo establecen límites máximos para el contenido en plomo, a partir de los cuales debe iniciarse una acción para

la disminución de la contaminación. En ese valor se engloban todas las especies de plomo, sin tener en cuenta que los R_3Pb^+ y R_2Pb^{2+} son solubles en agua y asimilables a través de la piel, o que la volatilidad de los R_4Pb hace que su concentración en el aire aumente de forma alarmante en áreas próximas a depósitos de gasolina. El ámbito de la industria es el único hasta el momento cuya legislación, en función de las exigencias de la Ley de Prevención de Riesgos Laborales⁸ y de la Directiva 98/24/CEE⁹ relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo, impone a los Estados miembros el establecimiento de valores límite nacionales de exposición profesional para los agentes químicos que tengan fijado un valor límite indicativo de exposición a escala comunitaria. El Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT) ha establecido **valores límite admisibles (VLA)** para distintas especies de plomo, incluyendo el tetrametilplomo y el tetraetilplomo, además del plomo inorgánico, aunque actualmente sólo con carácter de recomendación. La mayor sensibilización existente en este área posiblemente sea debida al hecho de que las primeras intoxicaciones con organoplomados se produjeron precisamente en laboratorios de investigación o en las propias compañías que comercializaban estos compuestos.

Tras el primer incidente en una compañía petrolera norteamericana en 1924, en el que murieron 5 personas y otras 35 resultaron contaminadas a causa de la intoxicación por organoplomados, se tuvo conciencia del peligro potencial que estos compuestos suponen para la salud humana.¹⁰ En algunos estados de USA se prohibió la venta de gasolina con plomo, aunque sólo temporalmente, ya que la industria del momento se apoyaba en el empleo de los antidetonantes plomados para el progreso del país. En 1925, se llega en USA a la conclusión de que no era necesario prohibir el uso de los organoplomados mientras su producción, distribución y ventas estuviesen adecuadamente regulados. Pero en este esquema no se tenía en cuenta la constante emisión atmosférica que suponía el empleo indiscriminado de estos compuestos en un número creciente de automóviles. Al cabo de treinta años, se apreció un aumento significativo de los niveles de plomo tanto en los norteamericanos como en el medio ambiente, y no sólo en las ciudades, sino también en zonas rurales. Cuando se analizaron las relaciones isotópicas de las muestras medioambientales y se compararon con los antidetonantes plomados, se comprobó que las emisiones de los automóviles constituían la principal fuente de la contaminación atmosférica. La primera acción restrictiva relacionada con el empleo de carburantes con plomo fue

dictada en 1970 en Los Ángeles, y permitía a las autoridades controlar o prohibir cualquier aditivo de las gasolinas que pudiese afectar a la salud pública. A partir de 1975, se tomaron varias medidas como la aparición de automóviles con convertidores catalíticos y la venta de gasolina sin plomo para estos coches, y la reducción progresiva del contenido en plomo de las gasolinas comunes. En la Unión Europea, las medidas preventivas comenzaron en 1986 con la sustitución de los aditivos de plomo y la reducción del contenido total en plomo de 0.57 g/L en 1970¹¹ a 0.15 g/L desde 1989.¹² En posteriores Directivas, las emisiones de los vehículos de motor han sido reducidas paulatinamente, hasta llegar a la prohibición de la comercialización de la gasolina con plomo a partir del año 2000.¹³ En esta directiva se limita el contenido de plomo a 0.005 g/L y se contempla también la posibilidad de los estados miembros de solicitar una prórroga para la aplicación de dicha prohibición, en el caso de que se demostrara que tal prohibición implicaría graves dificultades socio-económicas y que globalmente, no tendría consecuencias benéficas para el medio ambiente o para la salud. Como resultado de la petición de prórroga, el Estado Español fue autorizado a permitir la venta de gasolina con plomo en su territorio hasta el 31 de diciembre de 2001,¹⁴ pero el desarrollo de las denominadas gasolinas de sustitución ha permitido adelantar la fecha de la prohibición de gasolinas con plomo al 1 de agosto del 2001, siendo empleada la citada gasolina de sustitución, que emplea como aditivos sales de potasio (entre 8 y 20 mg/Kg de potasio) para el correcto funcionamiento de los automóviles que no estén convenientemente equipados para el empleo de gasolina sin plomo.¹⁵

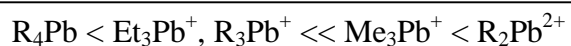
METODOLOGÍAS ANALÍTICAS

La determinación de las diversas especies de plomo que están presentes en un sustrato medioambiental presenta varios problemas, derivados en su mayoría de la propia naturaleza de los analitos. Uno de los factores más relevantes está asociado a los **bajos niveles de concentración** de los compuestos organoplomados, tanto respecto a la muestra en sí como a la proporción de plomo inorgánico que supone. La concentración de las especies orgánicas de plomo es variable en función de la matriz, la localización geográfica y la época del año, pero se sitúa en la región de unidades o fracciones de ng/L, y se estima que constituye aproximadamente entre el 0.1 – 1% del contenido total en plomo.¹⁶ Por lo tanto, el principal objetivo del análisis de especiación de plomo consiste en

desarrollar metodologías analíticas capaces de alcanzar la sensibilidad adecuada para adaptarse a los requisitos de las muestras medioambientales, evitando que la distribución original de las especies en el sistema sufra alteración alguna a lo largo del proceso analítico. En este sentido, la **toma y conservación de la muestra** son etapas de especial interés, ya que un muestreo no representativo o una redistribución de las especies provocada por no tomar las precauciones necesarias implican la obtención de un resultado erróneo, independientemente del resto del proceso analítico. En general, la estabilidad y características físico-químicas de los analitos imponen ciertos requisitos adicionales para cada uno de los sustratos medioambientales sujetos a estudio que se detallan a continuación:

1) *Muestras líquidas:*

- a) Los R_4Pb son compuestos muy volátiles y con gran tendencia a adsorberse sobre las paredes de los contenedores. Para evitarlo, se recomienda el empleo de contenedores con cierre hermético de teflón o polietileno, previamente tratado con disolventes orgánicos para eliminar cualquier resto de contaminación.¹⁷
- b) La filtración homogeneiza la muestra, pero provoca pérdidas de compuestos tetraalquilplomados debido a su elevada volatilidad. Se recomienda sólo para muestras con gran turbidez.
- c) Los compuestos organoplomados se descomponen fácilmente en disolución por acción de la luz, en un proceso que se acelera en presencia de ciertos organismos e impurezas.¹⁸ La velocidad de descomposición depende de la matriz de la muestra y del número de radicales unidos al plomo. Así, el orden de estabilidad sea ajusta a la siguiente secuencia:



- d) Se recomienda el almacenamiento a 4 °C, protegido de la luz, hasta un máximo de tres meses.

2) *Muestras sólidas:*

- a) A partir de una cierta profundidad, las muestras de suelo y sedimentos están aisladas de la influencia oxidante del aire y de la luz. En estos casos, el muestreo debe hacerse evitando el contacto con la atmósfera y la luz, ya que la exposición al aire provoca una rápida redistribución de las especies de plomo.¹⁹

- b) El almacenamiento debe llevarse a cabo por secado al aire, secado en horno o congelación, preferentemente.²⁰
- 3) *Muestras de aire:*
- a) La mayor fracción corresponde a plomo inorgánico en forma de partículas de PbBrCl procedente del empleo de Me₄Pb y Et₄Pb como antidetonantes en los automóviles. No obstante, una pequeña parte está constituida por restos de tetraalquilplomados que pasan al aire por evaporación directa desde la gasolina, y sus productos de degradación.
 - b) La opción más común consiste en el empleo de un filtro para retener las partículas, seguido de una trampa para eliminar el vapor de agua y otra trampa final con un material adecuado para retener las especies orgánicas de plomo.²⁰ Se aconseja mantener el soporte a temperatura criogénica para evitar la volatilización de los tetraalquilplomados y la eliminación del ozono del sistema mediante un filtro de sulfato ferroso para impedir la descomposición de los organometálicos a plomo inorgánico.

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA

El tratamiento de la muestra es variado y dependerá en gran medida del tipo de detección a emplear, pero suele incluir una etapa de preconcentración para aumentar la sensibilidad del método. Debe prestarse una especial atención a este proceso, ya que constituye una fuente importante de error en cuanto a pérdidas de analitos por evaporación o adsorción en el material de laboratorio, contaminación o cambios en la especiación del plomo. Los principales procedimientos para la separación de los analitos de la matriz cuentan con una etapa de extracción o digestión, en función del tipo de muestra. En el caso de **muestras líquidas**, los compuestos tetraalquilados son fácilmente extraíbles en disolventes orgánicos alifáticos como *n*-hexano o *n*-pentano; para la extracción de las especies iónicas de plomo en estos disolventes es necesaria una reacción previa de complejación, usualmente con dietilditiocarbamato o ditizona. Si la determinación de Pb²⁺ no es el objetivo del análisis, y en el caso de detectores que puedan verse afectados por el exceso de esta especie respecto a los analitos organometálicos, se puede evitar su co-extracción en medio orgánico empleando AEDT.²¹ Sin embargo, estas extracciones deben tener lugar en un intervalo de pH muy estrecho, a veces incluso prácticamente puntual, que convierte la etapa de preconcentración en un proceso lento y delicado que requiere la total atención del

analista e introduce alteraciones en el sistema.²² Para **muestras sólidas**, los principales problemas no surgen tanto de la posibilidad de contaminación como de la extracción incompleta de las especies, ya que las interacciones con la matriz pueden ser muy intensas. En este punto cabe hacer una distinción entre las muestras de tipo biológico como tejidos y fluidos, y muestras de origen mineral, como suelos y sedimentos, ya que las especies a determinar, y por tanto su forma de extracción, suelen ser distintas.

La especiación de plomo en **muestras biológicas** puede tener como objetivo la determinación de las proteínas, aminoácidos y péptidos que poseen la capacidad de enlazarse al plomo, además de la determinación de las especies de diferente toxicidad (fundamentalmente Pb^{2+} y compuestos organometálicos). En el primer caso, este tipo de análisis se puede llevar a cabo por inyección directa en cromatografía líquida de exclusión por tamaño tras la correspondiente preparación: centrifugación en el caso de fluidos biológicos y extracción fraccionada con distintos agentes complejantes en el caso de tejidos.²³ En cambio, si el objetivo del análisis es la determinación de compuestos organoplomados, la muestra debe ser digerida, ya que estas especies son absorbidas a través de los tejidos y pueden penetrar en las membranas celulares, de manera que no son fácilmente extraíbles. El procedimiento más apropiado es una hidrólisis en condiciones moderadas, con enzimas como la lipasa o la proteasa, o bien empleando un reactivo moderado como el hidróxido de tetrametilamonio.²⁴ Las digestiones drásticas deben evitarse, ya que pueden provocar reacciones de descomposición o de transalquilación de los compuestos organoplomados. Una vez eliminado el tejido, las especies de plomo pueden ser extraídas en medio orgánico, con la ayuda de un agente complejante si es necesario.

Los estudios de especiación de **plomo en suelos** suelen basarse en la separación de las distintas especies con la ayuda de diversos reactivos y disolventes orgánicos. Las fracciones así obtenidas son analizadas posteriormente, y el contenido en plomo de cada fase se puede relacionar con un tipo de compuesto determinado. El empleo de reactivos como el ácido etilendiamino tetraacético (AEDT), ácido dietilentriamino pentaacético (ADTP), ácido acético, acetato amónico o cloruro cálcico permiten la clasificación de distintas especies metálicas como plomo extraíble con agentes complejantes, enlazado a carbonatos, enlazado a óxidos de Fe y Mn, y enlazado a moléculas orgánicas, entre otras.²⁵ Por otra parte, los suelos y sedimentos no interaccionan de forma intensa con los compuestos organoplomados, que se depositan

superficialmente por mecanismos de adsorción o complejación con material orgánico presente. En la mayoría de los casos, el *acid leaching* de los analitos con extracción simultánea en un disolvente orgánico es suficiente para separar las especies de plomo de la matriz. Sin embargo, algunos estudios²⁶ indican que esta forma de destrucción de la matriz no es eficaz y que la recuperación de los analitos no es completa; se aconseja un procedimiento más drástico, aunque podría llevar a la destrucción o alteración de las especies originales.²⁷ Tras la separación de la muestra sólida, los analitos pueden ser extraídos en un disolvente orgánico adecuado en caso necesario, en forma de complejo. De nuevo, la preparación de la muestra aparece como el principal inconveniente del análisis, que es lento, tedioso, y requiere personal especializado. Estos problemas pueden reducirse notablemente con la aplicación de **sistemas por inyección en flujo** (FI), que no sólo permite incrementar la sensibilidad de los métodos mediante el acoplamiento en continuo de la preconcentración y el detector, sino que también reduce los riesgos de contaminación y pérdidas de analitos y simplifica los procedimientos para la especiación de diversos metales, haciéndolos por fin asequibles a los laboratorios de rutina. Así, se han descrito métodos para la preconcentración de compuestos orgánicos e inorgánicos de plomo mediante FI-FAAS, FI-ETAAS, FI-LC y FI-GC/AAS.²⁸

DERIVATIZACIÓN

En ocasiones, la eliminación de la matriz y la preconcentración obtenida a través de la extracción no son suficientes para alcanzar las bajas concentraciones presentes en las muestras reales (ng/L), o bien los analitos han de ser derivatizados para adquirir las propiedades físico-químicas que permitan el empleo de un sistema de separación/detección adecuado, como ocurre con el empleo de la cromatografía de gases y, en menor medida, de líquidos.

La separación de compuestos organoplomados por **cromatografía líquida** ofrece varias ventajas: no es necesaria una derivatización inicial, la separación se lleva a cabo a temperaturas no demasiado elevadas, con lo que se evita el riesgo de la descomposición térmica de los compuestos, y la preparación es muy simple para muestras líquidas. Sin embargo, la derivatización en la columna o a la salida de la fase líquida tiene como finalidad la mejora de la sensibilidad de la técnica de detección empleada, que suele ser espectroscopía UV-Visible o fluorescencia. Así, la reacción con 4-(2-piridilazo) resorcinol

(PAR) que permite obtener especies intensamente coloreadas a partir de los R_2Pb^{2+} ,²⁹ o la derivatización “on-column” con tioglicolato de metilo³⁰ han sido utilizadas con este propósito.

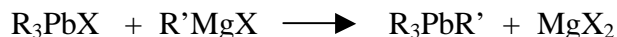
En cambio, la **cromatografía de gases** proporciona una sensibilidad adecuada, a pesar de la limitación en cuanto al volumen de inyección, especialmente en combinación con detectores muy sensibles como MIP-AES o ICP-MS. Normalmente, se recomienda el empleo de fases no polares convencionales para la separación de compuestos organoplomados, aunque recientemente se han aplicado con éxito las columnas multicapilares,³¹ logrando separaciones notablemente más rápidas. La derivatización en este caso viene impuesta por la incompatibilidad inicial existente entre la naturaleza de los analitos y las propiedades físico-químicas necesarias para hacer posible la separación cromatográfica. De entre los distintos compuestos del plomo, sólo los R_4Pb poseen las características adecuadas en cuanto a volatilidad y estabilidad térmica para ser determinados de forma directa en cromatografía de gases. El resto de especies han de ser transformadas en los correspondientes tetraalquilplomados, en una reacción de derivatización que puede ser realizada utilizando varios reactivos:

Tetraetilborato sódico (NaBEt₄).- Efectúa una etilación del analito iónico. Se trata de un reactivo relativamente estable en medio acuoso, que puede ser añadido directamente a la muestra y facilita en gran medida el procedimiento para la determinación de ciertos organometálicos, sobre todo de mercurio y



estaño.³² Sin embargo, no es el reactivo más adecuado para la especiación de plomo, ya que tanto Pb^{2+} como Et_3Pb^+ y Et_2Pb^{2+} conducen al mismo derivado final, Et_4Pb , lo que hace imposible su discriminación.

Reactivos de Grignard (RMgX).- Son haluros de alquilmagnesio, ampliamente usados en síntesis orgánica como agentes de alquilación. Para el



análisis de la especiación de plomo, se han utilizado el cloruro o bromuro de propil-, butil-, pentil- y fenilmagnesio, que permiten la discriminación entre las especies de mayor interés (Pb^{2+} , Me_3Pb^+ , $\text{Me}_2\text{Pb}^{2+}$, Et_3Pb^+ y $\text{Et}_2\text{Pb}^{2+}$). Se ha observado que los derivados con menor número de átomos de carbono presentan mayor volatilidad, lo que reduce la duración de las separaciones cromatográficas.³³ No obstante, los reactivos de Grignard son muy inestables frente a la oxidación atmosférica y en presencia de agua se hidrolizan para formar óxido de magnesio. Por lo tanto, deben ser estabilizados en éter y conservados en atmósfera inerte. Su empleo exige una serie de precauciones tales como la eliminación de las trazas de agua que puedan quedar en la fase orgánica tras la extracción con el agente complejante, la eliminación del exceso de reactivo derivatizador mediante la adición de agua o ácido para evitar su influencia negativa sobre el nivel de la señal del blanco y una segunda extracción en un volumen mínimo de disolvente orgánico para posibilitar la inyección en el cromatógrafo.

Sales de boro tetravalente (MBR₄).- De la misma familia que el NaBEt_4 , su síntesis y estabilización sólo ha sido posible recientemente. El empleo del tetrabutylborato de tetrabutylamonio³⁴ en primer lugar, y del tetrapropilborato sódico³⁵ más tarde, introdujeron la posibilidad de preconcentrar y derivatizar compuestos organoplomados *in-situ*, directamente en la fase acuosa y sin necesidad de etapa previa de complejación. Solo es necesaria una única extracción en medio orgánico para llevar los analitos ya derivatizados al cromatógrafo de gases. Al igual que ocurre con los reactivos de Grignard, los reactivos más favorables son aquéllos que incorporan la cadena alquílica más corta.

La composición mixta de la molécula de los compuestos organoplomados le confiere una serie de propiedades que facilitan el empleo de ciertas técnicas de detección alternativas. Los sistemas de **generación de hidruros** constituyen un claro ejemplo de esta adaptación. En comparación con el plomo inorgánico, los compuestos organometálicos de plomo forman hidruros mucho más estables, y la volatilización de los analitos puede llevarse a cabo fácilmente en un sistema de inyección en flujo. Así, mediante el acoplamiento del sistema FI (en el que se originan los hidruros volátiles) con detectores específicos para el elemento metálico, como ETAAS³⁶ o ICP-AES,³⁷ se alcanzan límites de detección del orden de hasta 10 – 20 ng/L.

TÉCNICAS INSTRUMENTALES

Las primeras aplicaciones desarrolladas con el objetivo de estudiar la especiación del plomo, así como de otros metales, encontraron una dificultad prácticamente insalvable en las concentraciones sumamente pequeñas en las que las distintas especies se encontraban en muestras reales. A pesar del aumento de sensibilidad que supone el empleo de diversas metodologías de preconcentración, los detectores convencionalmente empleados en cromatografía (UV-Visible, FID, ECD) no alcanzan los límites de detección requeridos para el análisis. La gran selectividad y sensibilidad de los detectores basados en el reconocimiento de las líneas espectrales atómicas los convierten en sistemas idóneos para la especiación elemental, si bien es necesaria la separación previa de las distintas especies. En los últimos años, se han realizado varios estudios enfocados al acoplamiento de detectores apropiados para distinguir las diversas especies elementales con las técnicas de separación más indicadas en cada caso. El problema de mayor importancia que surge de la idea del acoplamiento reside en el diseño de la interfase y las dificultades técnicas en su materialización. Los acoplamientos de mayor relevancia son aquéllos en los que el detector se basa en la espectrometría de absorción/emisión atómica (FAAS, ETAAS, AES) y, sobre todo recientemente, los que emplean la espectrometría de masas en sus diversas modalidades de ionización de la muestra (EI, CI, MIP, ICP) y de detección (cuadrupolo, sector magnético, trampa de iones o TOF).

Absorción atómica

La espectroscopía de absorción atómica con **atomización por llama (FAAS)** fue una de las primeras técnicas acopladas en continuo a un cromatógrafo de gases o de líquidos, dada la simplicidad de la interfase. Las únicas precauciones necesarias consisten en ajustar los flujos de salida de la fase móvil y de aspiración del nebulizador en cromatografía líquida y mantener el tubo de transferencia a temperatura suficientemente elevada para evitar la condensación de las especies en cromatografía de gases. En ocasiones, y para aumentar la sensibilidad en la determinación de compuestos organoplomados, el efluente del cromatógrafo de gases se refuerza con una corriente de hidrógeno. Aun así, y pese a la gran selectividad que aporta la técnica, no se suelen alcanzar

los límites de detección que exige el análisis de especiación en la mayoría de muestras medioambientales.³⁸

Por lo tanto, la opción más ampliamente utilizada en lo que respecta a la absorción atómica es el uso de la **atomización electrotérmica (ETAAS)**, que permite un incremento de la sensibilidad de dos-tres órdenes de magnitud respecto a la atomización por llama. Para el acoplamiento con un cromatógrafo de gases, la solución más simple consiste en sustituir el flujo del gas de purga del horno de grafito por el efluente del cromatógrafo de gases, aunque éste también puede ser introducido a través de un brazo termostatzado.³⁹ Sin embargo, el acoplamiento con un cromatógrafo de líquidos es más complejo debido al carácter discontinuo de la introducción de la muestra en el horno, que es claramente incompatible con el flujo continuo del efluente cromatográfico. La alternativa más común es utilizar algún tipo de nebulización para formar un aerosol a partir del efluente e introducirlo en el horno de forma indirecta.⁴⁰

Emisión atómica

Las técnicas de emisión presentan ciertas ventajas frente a la absorción atómica, como la determinación de varios elementos simultáneamente, la mayor sensibilidad que alcanzan (frente a la atomización por llama) y el fácil acoplamiento con un cromatógrafo, ya que estos detectores emplean un flujo de gas para la atomización de la muestra. La eficacia del sistema de atomización reside en que la muestra se ioniza en el seno de un plasma controlado a temperaturas muy elevadas. Un plasma es un gas neutro parcialmente ionizado generado por un campo electromagnético que puede ser de distinta naturaleza, dando así lugar a los diversos tipos de plasma: plasma generado por corriente directa (DCP), por corriente alterna (ACP), inducido por microondas (MIP), por acoplamiento inductivo (ICP) o por acoplamiento capacitativo (CCP). De todos ellos, los que se utilizan con más frecuencia en el ámbito de la especiación son, con diferencia, el MIP y el ICP, en combinación con la técnica de separación cromatográfica más conveniente en cada caso. El gas plasmógeno puede ser argón o helio, aunque se prefiere este último porque origina una señal más baja del ruido de fondo, y además posee una energía de excitación mayor que el argón. Esto hace posible la determinación de un amplio número de elementos, incluyendo algunos elementos no metálicos. Cuando se emplea la cromatografía de gases para la separación de los analitos, la fuente de excitación más

recomendable para la detección basada en la espectroscopía de emisión atómica es el MIP, por las razones que se enumeran a continuación:

El acoplamiento con el cromatógrafo de gases es muy simple; consiste en una línea de transferencia termostatazada para evitar la condensación de los analitos que se introduce directamente en el tubo de descarga del plasma. El equipo puede adquirirse comercialmente.

El efluente del cromatógrafo puede introducirse directamente en el plasma sin extinguirlo, ya que carece de moléculas de agua o grandes cantidades de hidrocarburos.

El gas portador puede usarse como plasmógeno auxiliar, proporcionando una línea de base muy estable.

El frente del disolvente puede ser desviado fácilmente (*venting option*) para evitar que alcance el plasma y lo extinga.

El flujo de helio que se emplea no origina una dilución excesiva de los analitos como ocurre en el ICP, de forma que la sensibilidad no se ve afectada.

El acoplamiento GC/MIP-AES se ha utilizado con éxito en repetidas ocasiones para la determinación de compuestos organoplomados, entre otros compuestos organometálicos, en varios tipos de muestras (agua, nieve, sedimentos).^{33, 34, 41}

En cambio, el mayor tamaño del plasma generado por acoplamiento inductivo permite alcanzar temperaturas más altas, surgiendo así como una fuente con un enorme poder de ionización capaz de admitir volúmenes de muestra y de disolvente mayores que el MIP. Aun así, es necesario tener en cuenta ciertas consideraciones acerca de la composición de la fase móvil para asegurar la eficiencia del plasma, sobre todo en el acoplamiento con un cromatógrafo de líquidos. Un alto contenido en sales puede provocar la obstrucción del nebulizador y el mechero. Además, debe evitarse en lo posible el exceso de alcoholes y disolventes orgánicos, porque reducen las propiedades de excitación del plasma, produciendo alteraciones en la señal y pudiendo llegar incluso a extinguirlo. Otro problema adicional es la baja eficacia de la nebulización de la muestra y los efectos de dilución de los analitos con el gas plasmógeno, que afectan sobre todo a la sensibilidad. Actualmente, se han ensayado varios sistemas de introducción, desde el empleo de nebulizadores convencionales de vidrio fritado hasta vaporizadores de termospray o

ultrasónicos, pero los mejores resultados se obtienen mediante nebulización por inyección directa.⁴²

Espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica que ha evolucionado vertiginosamente en los últimos años hacia la consecución de límites de detección cada vez más bajos, introduciendo cambios significativos tanto en las fuentes de ionización (impacto electrónico, ionización química, ICP) como en los sistemas de separación/detección (cuadrupolo, sector magnético, trampa de iones, tiempo de vuelo). La combinación de ambos componentes determina las características analíticas y las posibles aplicaciones del instrumento resultante. Los equipos más fácilmente asequibles por los laboratorios debido a su relativamente bajo coste cuentan con una fuente de ionización química o por impacto electrónico, que envía el flujo de iones hacia un cuadrupolo en el cual se separan en función de su relación m/z . Esta separación es secuencial; en un determinado instante de tiempo sólo atraviesa el cuadrupolo una m/z seleccionada, mientras el resto se desecha. Esta pérdida de información, unida a la baja energía que se emplea en la ionización, hace que la sensibilidad no supere a la obtenida con detectores basados en espectrometría atómica. La adquisición de datos en modo SIM en lugar de full scan puede mejorar la sensibilidad entre 10 y 100 veces, y la resolución puede aumentarse de forma significativa con el empleo del sector magnético. Aún así, las concentraciones de las especies orgánicas de plomo son demasiado pequeñas para ser detectadas de forma directa. Sin embargo, con una etapa previa de preconcentración, ha sido posible llevar a cabo la especiación de plomo en muestras de agua de lluvia mediante un GC/MS comercial.^{33,43} El espectro de masas de una molécula es particularmente útil para la confirmación de su estructura, pero a pesar de su excelente capacidad para la identificación molecular y su evidente utilidad en estudios sobre la transformación de especies, la espectrometría de masas no se ha empleado de forma extensiva en los análisis de la especiación hasta la llegada de las fuentes de ionización por acoplamiento inductivo. La eficiencia del plasma para la producción de iones con una carga positiva lo convierte en una fuente idónea para el espectrómetro de masas, aunque las altas temperaturas que se alcanzan en el plasma destruyen totalmente la posibilidad de obtener información molecular. Esta información se sacrifica a cambio de un aumento de la sensibilidad (en

general de dos órdenes de magnitud), que alcanza ahora los niveles óptimos para su empleo en la especiación de metales en muestras medioambientales.⁴⁴ La incorporación al mercado de los espectrómetros de tiempo de vuelo, en los que la determinación de todas las m/z es simultánea, supone un aumento en la sensibilidad y en la rapidez de la adquisición de los espectros, de forma que es especialmente aconsejable para la medida de relaciones isotópicas y señales transitorias, como las originadas por el efluente de un cromatógrafo.⁴⁵

Al igual que ocurre con las técnicas de emisión atómica, el ICP-MS puede ser acoplado a un cromatógrafo de gases o de líquidos, con las mismas características comentadas en el apartado anterior y siendo el último caso el más complejo. En el acoplamiento de un cromatógrafo de líquidos a la fuente ICP del espectrómetro de masas,⁴⁶ es necesario un nebulizador adecuado y un control continuo del contenido del efluente en sales y disolventes orgánicos, ya que los depósitos de carbón o sales inorgánicas pueden obstruir los orificios de los conos de muestra y **skimmer**, impidiendo la entrada del flujo de iones y disminuyendo así la sensibilidad.

Otras técnicas

La cromatografía de **fluidos supercríticos** reúne en un principio el poder de resolución de la cromatografía de gases sin los inconvenientes del control de temperatura, y de presión respecto a la cromatografía de líquidos, convirtiéndola en una técnica ideal para especies térmicamente inestables. Además, se elimina el empleo de disolventes orgánicos tóxicos y su acoplamiento en sistemas continuos resulta técnicamente viable. Sin embargo, su empleo en el ámbito de la especiación se encuentra aún bajo estudio, y hasta la fecha sólo se han desarrollado algunas aplicaciones que utilicen esta opción para evitar la derivatización de las especies organoplomadas en muestras medioambientales.⁴⁷

El principal requisito que se exige a las técnicas de detección en el análisis de la especiación, junto con una sensibilidad adecuada a las bajas concentraciones de los analitos, es la capacidad de no ejercer ningún impacto sobre la distribución original de los analitos en la muestra y no dejarse influir por otras especies, dada la complejidad de muchas muestras medioambientales y biológicas. Precisamente el primero de estos requisitos constituyó el impulso inicial para la aplicación de la **electroforesis capilar** a la especiación, ya que su

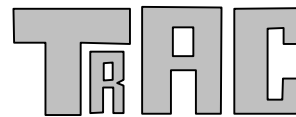
capacidad para mantener la integridad de las especies es universalmente reconocida.⁴⁸ Sin embargo, el análisis trazas de especies metálicas en matrices medioambientales dista mucho de estar resuelto. En primer lugar, la aplicación a muestras reales de separaciones optimizadas empleando una disolución estándar suele revelar severas interferencias y problemas de irreproducibilidad en los tiempos de migración y en la forma de los picos, debido a la diferente composición de la matriz de la muestra. En segundo lugar, la mayoría de los equipos de CE suministrados por distintas casas comerciales están equipados con detectores fotométricos, que no son los más adecuados para llevar a cabo la especiación elemental debido a la pobre sensibilidad y selectividad que proporcionan, que hacen imposible la determinación de los analitos a los niveles a los que se encuentran en las muestras reales.⁴⁹ En este sentido, el acoplamiento de técnicas de detección más apropiadas, fundamentalmente ICP-MS, ofrece mejoras sustanciales en sensibilidad, que puede ser aumentada en un factor que oscila entre 10 y 10⁵ veces la obtenida a través de la medida de la absorbancia en la región ultravioleta.⁵⁰ Aun así, este acoplamiento requiere el diseño de nuevas interfases que minimicen la dilución del analito y que permitan una transferencia más eficaz del contenido del capilar. CE/ICP-MS puede adquirir una gran importancia en el campo de la especiación siempre que se resuelvan estos problemas técnicos y se reduzcan los costes de adquisición.

- 1 S. Hong, J. P. Candelone, C. C. Patterson, C. F. Boutron, *Science* 265 (1994) 1841.
- 2 C. Baird, *Química Ambiental*, Reverté, Barcelona, 2001.
- 3 *Locating and estimating air emissions from sources of lead and lead compounds*, Office of air quality planning and standards, U.S. Environmental Protection Agency, May 1998.
- 4 F. Barranco, J. Blasco, A. Mérida, M. A. Muñoz, A. Jareño, J. Cozar, R. Guerrero, J. Gil, C. Martín, J. C. Rodríguez, *Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos*, Sociedad Andaluza de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias (SAMIUC) www.uninet.edu/tratado/
- 5 Directiva 99/30/CEE relativa a los valores límite para dióxido de azufre, dióxido de nitrógeno y óxidos de nitrógeno, materia particulada y plomo en la atmósfera.
- 6 Directiva 76/464/CEE, relativa a las aguas superficiales
- 7 Directiva 98/83/CEE, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano (DOCE L 330 del 5/12/98)
- 8 Ley 31/1995
- 9 Directiva 98/24/CEE del Consejo, de 7 de abril de 1998, relativa a la protección de la salud y la seguridad de los trabajadores contra los riesgos relacionados con los agentes químicos durante el trabajo.
- 10 D. Rosner, G. Markowitz, *Am. J. Public Health*, 75 (1985) 344.
- 11 Directiva 70/220/CEE del 20 de marzo de 1970
- 12 J. O. Nriagu, *Sci. Total Environ.* 95 (1990) 13.
- 13 Directiva 88/76/CEE por la que se modifica la Directiva 70/220/CEE
- 14 Decisión de la Comisión Europea del 20 diciembre 1999
- 15 Real Decreto 785/2001, BOE nº 162
- 16 R. Lobinski, F. C. Adams, *Analisis* 20 (1992) M28.
- 17 M. Betti, P. Papoff, *CRC Cxrit. Rev. Anal. Chem.* 19 (1988) 271.
- 18 R. J. A. Van Clevenbergen, W. Dirx, P. Quevauviller, F. C. Adams, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 47 (1992) 21.
- 19 M. Kersten, U. Foster, *Water Sci. Technol.* 18 (1986) 121.
- 20 D. E. Wells, *Mikrochimica Acta* 109 (1992) 13.
- 21 M. Heisterkamp, T. De Smaele, J. P. Candelone, L. Monees, R. Dams, F. C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1077.

- 22 R. Lobinski, C. F. Boutron, J. P. Candelone, S. Hong, J. Szpunnar-Lobinska, F. C. Adams, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2510.
- 23 G. S. may, X. Zhu, E. G. Martin, *Anal. Commun.* 36 (1999) 93.
- 24 C. S. Epler, T. C. O'Harer, G. C. Turk, *J. Anal. At. Spectrom.* 9 (1994) 79.
- 25 M. Yaman, Y. Dilgin, S. Gucer, *Anal. Chim. Acta* 410 (2000) 119.
- 26 S. Zhang, Y. K. Chau, A. S. Chau, *Appl. Organomet. Chem.* 5 (1991) 431.
- 27 F. Adams, S. Slaets, *Trends in Anal. Chem.* 19 (2000) 80.
- 28 A. K. Das, M. de la Guardia, M. L. Cervera, *Talanta* 55 (2000) 1.
- 29 H. Blaskewicz, G. Baumhoer, B. Neidhart, *Fresenius J. Anal. Chem.* 325 (1986) 129.
- 30 K. Cammann, R. Robecke, J. Bettmer, *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 30.
- 31 R. Lobinski, V. Sidelnikov, Y. Patrushev, I. Rodríguez, A. Wasik, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 449.
- 32 R. Reuther, L. Jaeger, B. Allard, *Anal. Chim. Acta* 394 (1999) 259.
- 33 R. Zufiaurre, B. Pons, C. Nerín, *J. Chromatogr. A* 779 (1997) 299.
- 34 M. Heisterkamp, F. C. Adams, *Fresenius J. Anal. Chem.* 362 (1998) 489.
- 35 M. Heisterkamp, F. C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 1307.
- 36 D. Rever, J. Bettmer, K. Cammann, *Fresenius J. Anal. Chem.* 349 (1994) 738.
- 37 H. Elfering, J. T. Andersson, K. G. Poll, *Analyst* 123 (1998) 669.
- 38 K. Bergman, B. Neidhart, *Fresenius J. Anal. Chem.* 356 (1996) 57.
- 39 W. M. R. Dirx, M. B. de la Calle, M. Ceulemans, F. C. Adams, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 51.
- 40 J. S. Blais, G. M. Momplaisir, W. D. Marshall, *Anal. Chem.* 62 (1990) 1161.
- 41 R. Lobinski, J. Szpunnar-Lobinska, F. C. Adams, *Analisis* 22 (1994) M54.
- 42 L. Ebdon, E. H. Evans, N. W. Barnett, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 505.
- 43 C. Nerín, B. Pons, *Química Analítica* 13 (1994) 209.
- 44 I. Rodríguez, S. Mounicou, R. Lobinski, V. Sidelnikov, Y. Patrushev, M. Yamanaka, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4534.
- 45 M. Heisterkamp, F. C. Adams, *Fresenius J. Anal. Chem.* 370 (2001) 597.
- 46 M. K. Donais, *Spectroscopy* 13 (1998) 32.
- 47 J. M. Carey, N. P. Vela, J. A. Caruso, *J. Anal. At. Spectrom.* 7 (1992) 1173.
- 48 A. R. Timerbaev, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 165.
- 49 W. Liu, H. K. Lee, *J. Chromatogr. A* 796 (1998) 385.

50 J. W. Olesik, in: J. A. Caruso, K. L. Sutton, K. L. Ackley (Eds.), *Elemental Speciation – New Approaches for Trace Element Analysis*, Elsevier, Amsterdam, 2000.

Acceptado el 17/09/2001



Fullerenes in analytical sciences

J. R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel*

Analytical Chemistry Division, University of Córdoba,
14071, Córdoba, Spain

Abstract

An overview of the impact of fullerenes in analytical chemistry in the framework of the general applications of these interesting materials is presented and discussed. Fullerenes can be on the one hand, the target analytes; methods for their separation, identification and quantification are systematically considered. On the other hand, the use of fullerenes as chromatographic stationary phases, materials for building both electrochemical and optical sensors and sorbent materials for automatic on-line clean-up and preconcentration is fully dealt with. The analytical prospects of fullerenes are finally discussed.

Keywords: Fullerenes; Separation and determination; Chemical sensors; Sorbent materials

1. Introduction

Buckminsterfullerenes are closed-cage carbon molecules containing pentagonal and hexagonal rings in such a way that they follow the structure C_{20+m} , being m a natural number. They are the third allotropic form of carbon, with graphite and diamond. Fullerenes comprise a wide range of isomers and homologous series, from the most studied C_{60} or C_{70} , to the so called higher fullerenes, C_{240} , C_{540} and C_{720} . These compounds were first discovered in 1985 in the interstellar dust through spectrometric measurements and later their structure confirmed in the laboratory by Kroto, Smalley and Curl, who received the Nobel Prize in 1996 for their work¹. However, the macroscopic obtention of these compounds was not possible until five years after their discovery.² Fullerenes and their synthesis became a topic that attracted a great deal of interest because of their unique structure and properties showing promises for exceptional applications in many fields. Physicists, chemists, material scientists or engineers, among others, found an unusual potential in these new spherical carbon structures to be used as superconductor materials, source of new compounds, self-assembling nanostructures or several optical devices.³ This initial attention produced an increasing number of

investigations that showed special properties of fullerenes, some of which could lead to practical applications. First small-scale, and then targeted applications would be developed in a short time following the first optimistic observations. However, even when a wide group of fields have been explored and several applications have been developed, fullerenes are not fulfilling the initial spectacular promises.

2. Overview on the applications of fullerenes

Research on the application of fullerenes has actually proven to be slower than expected, but it must not be considered unsuccessful considering the great advances in the knowledge of the physical and chemical characteristics of fullerenes. Thanks to the additional information supplied during the last years, these compounds have been found to be really useful in several fields, specially in solid state applications. For instance, the relatively high transition temperature T_c observed for C_{60} (33 K) makes it a suitable material for superconductivity studies, obtaining better results ($T_c \sim 18$ K) with alkali metal-doped fullerenes,⁴ also known as endohedral fullerenes. On the other hand, the fabrication of the current generation of microelectronic devices requires

lithographic resolution of $\sim 0.18 \mu\text{m}$, close to the physical limits of the resolution of photolithography that seem to lie at $0.1 \mu\text{m}$. However, the intention in the future is the achievement of further miniaturization, not only to increase component packing density, but also to exploit quantum effect devices. Thus, other methods must be developed that extend the miniaturization into the sub – $0.1 \mu\text{m}$ regime. One increasingly used option to get nanoresolution is electron beam lithography, a technique in which an electron beam is employed to irradiate an electron sensitive resist material; the irradiated zone of the substrate is degraded or cross-linked, depending on each material, forming products with different solubility in a certain solvent that can be easily separated from the original material. Hence, the smallest definable pattern will be at least as large as the molecular area of the substrate. Therefore, it is desirable that the area of the resist molecules be as small as possible, and in this sense, fullerenes and their derivatives appear as a great alternative to polymer molecules, widely used for this purpose in nanolithography.⁵

Another interesting property of fullerene and fullerene-like materials is their photoactivity and their potential use in solar energy conversion. C_{60} shows a semiconductor diode-like behaviour, and although the photore-

sponse is complex, photoactivity is displayed when C_{60} is illuminated within a wide range of insolation near the solar spectral maximum of 1.4 eV . However, fullerene solar cells provide a low power compared to that achieved with electrodes made from more conventional materials, so novel solar cells are on continuous development. Recently, fullerene derivatives have been used to improve the electron transfer efficiency and to diminish the high dark current occurring when using pristine C_{60} fullerene.⁶

The study of the biological applications of fullerenes has attracted increasing attention despite the low solubility of the carbon spheres in physiological media. The unique characteristics of fullerenes regarding size, hydrophobicity and electron transfer capacity make think of these compounds as promising candidates for use in biology. Recently, a well documented review⁷ has covered the main achievements in the biological applications of fullerenes and derivatives up to 1999, namely: (i) the DNA cleaving capacity, which makes possible the use of fullerenes in photodynamic therapy and in the study of genetic transcription, (ii) the inhibitor effect produced over HIV protease, owing to the shape and size of C_{60} that can fit inside the quasispherical hydrophobic cavity of the enzyme, and

Table 1
Current trends in the biological use of fullerene and derivatives

Biological effect	Target specie	Disease	Active fullerene	Ref.
Antioxidant agent	Low density lipoproteins	Arteriosclerosis	Hexasulfobutyl-C ₆₀ fullerene	[8]
Neuroprotector	Amyloid beta protein	Alzheimer	Fullerenol-1	[9]
	Cerebellar granule cells	Oxidative stress	C ₃ -Fullero-tris-methanocarboxylic acid	[10]
Antibacterial agent	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tuberculosis	Cationic fullerene derivatives	[11]
	<i>Escherichia coli</i>	Bacterial Meningitis	C ₆₀ Fullerene	[12]

(iii) the activity of fullerenes and derivatives as radical scavengers against apoptosis or neurodegenerative diseases or their behaviour as antibacterial agents. As can be seen in Table 1, last efforts have been focused on the study of the activity of water soluble fullerene derivatives as antioxidant or free radical scavengers,⁸ neuroprotector agents^{9,10} and inhibitors of bacterial growth.^{11,12} When compared to other substances commonly used for the same purpose, similar or better results are obtained with lower doses. The neuroprotective activity of fullerenol-1 is based on the inhibition of amyloid β protein (A β protein), which plays an important role in neuronal degeneration through the elevation of cytosolic free calcium among other effects. Some antioxidants such as U83836E and vitamin E have been used to diminish the release of Ca²⁺

associated to A β protein, with different efficiency (26% and 40%) and concentration (10 μ M and 140 μ M). However, the level of Ca²⁺ induced by A β protein declined by 73% by using fullerenol-1 in a concentration as low as 1 μ M. Other example is found in the antimycobacterial activity of cationic fullerene derivatives in the inhibition of two strains of *Mycobacterium tuberculosis*: H37 Rv (reference strain) and H6/99 (particularly virulent and resistant). Whilst the strains were resistant or only sensitive to the action of reference compounds (*e.g.* isoniazida, rifampicin), a 100% inhibition was observed for some fullerene derivatives at doses of 5 μ g/mL.

Regarding analytical chemistry, fullerenes can be observed under two different points of view, namely:

fullerenes as analytes, involving determination of fullerenes in several samples such as biological tissues or geologic materials, and fullerenes as analytical tools, including their use as chromatographic stationary phases, different electrochemical sensors based in the activity of fullerenes as electron mediators, and the exploit of their unique superficial characteristics as sorbent materials in continuous flow systems.

3. Characterization and Preparation

3.1. Characterization

From their discovery, elucidation of the structure of fullerenes has been an active research topic. Currently, even higher fullerenes have been perfectly identified mainly through their nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) spectra. UV-visible spectroscopic data, as well as Fourier transformed infra-red (FTIR) and Raman spectra enabled the assignation of a suitable electronic structure for each one of them, throwing some light into the interpretation of the peculiar optic properties of fullerenes in general. X-ray diffraction (XRD) patterns have revealed temperature-dependent phase transitions for C_{60} and C_{70} that are particularly interesting in the search for a novel fullerene-based superconductor material.³

Concerning analytical sciences, two different branches must be considered: synthesis of new materials with potential analytical applications and deposition of fullerene films over different substrates for the development of electrodes or sensors. Novel materials are usually characterized using ^{13}C and ^1H NMR, especially indicated if C_{60} fullerene is involved. The ^{13}C NMR spectrum of pristine C_{60} fullerene consists of an only peak at $\delta = 143$ ppm, and the presence of any other peak in the purified adduct, as well as a shift in the initial signal implies a covalent union to C_{60} . The best resolution is achieved dissolving the fullerene derivative in the deuterated solvent (e.g. toluene, benzene, CHCl_3 , CS_2). Unfortunately, the low relative abundance of ^{13}C versus ^{12}C (1.1%) results in a very low sensitivity when measuring this element. However, sensitivity is easily enhanced by applying different techniques as solid state ^{13}C NMR or magic angle spin (MAS) NMR. In this latter technique, the resonance energy of ^1H (much more abundant) is transferred to the ^{13}C atoms, enhancing the signal. XRD, UV-visible and FTIR data are also used for characterization of fullerene derivatives,¹³ although to a lesser extent and always as complementary techniques.

On the other hand, fullerene-based films are analyzed employing tech-

niques that allow the determination of the approximated number of layers deposited over the initial substrate, since the thickness of the film is deeply related to the electrochemical properties of the resulting electrode. Hence, surface science techniques are very useful in this context.³ Among them, scanning tunnelling microscopy (STM) is an especially powerful technique to study the interaction between fullerenes and surfaces, which is usually much stronger than the C_{60} - C_{60} interaction in the case of metal surfaces, being the opposite applied to oxide surfaces. In addition, atomic force microscopy (AFM) has also been applied to the study of fullerene films;¹⁴ single fullerene molecules can be imaged, the maximum diameters for the molecules can be measured after a proper calibration of the instrument, and the thickness of the layer can be also measured in a transversal cut.

3.2. *Separation*

Fullerene molecules are formed in the laboratory from carbon-rich vapours which can be obtained in a variety of ways, e.g. resistive heating of carbon rods in a vacuum, plasma discharge between carbon electrodes in He gas, laser ablation of carbon electrodes in He gas and oxidative combustion of benzene/argon gas mixtures. Most methods for the produc-

tion of large quantities of fullerenes simultaneously generate a mixture of stable fullerenes (C_{60} , C_{70} ,...) impurity molecules such as polyaromatic hydrocarbons and carbon-rich soot. Therefore, a suitable separation technique is required in order to separate and purify the different fullerenes, being liquid chromatography (LC) the best choice to perform this application, although supercritical fluid chromatography has also been used for rapid separations of C_{60} , C_{70} and higher fullerenes on a TCP column using CO_2 modified with CH_2Cl_2 as the mobile phase.¹⁵ In the last years, the efficiency of several LC stationary phases has been tested,¹⁶ including conventional octadecylsilica (ODS) phases as well as other novel stationary phases specially designed for this goal. Reversed-phase LC stationary phases exhibit reasonable fullerene selectivity, but the retention decreases with increasing solubility of the target compound in the mobile phase. Hence, when strong solvents as toluene or 1-methylnaphtalene are used, these compounds can not be separated. This lack of resolution is evidenced by the absence of retention of the light fullerenes, which are eluted at the same time. Separation of C_{60} and C_{70} poses severe difficulties, being only possible when using mobile phases in which the fullerenes are poorly soluble (hexane, acetonitrile,

dichloromethane) and disabling thus the separation of large amounts of fullerenes. The retention mechanism for compounds including six-membered phenyl rings in their structure is still being elucidated,¹⁷ but it is reasonable to assume that a critical chain length exists to interact effectively with fullerenes, with longer being better. Thus, C₈ chains have proven to be too short to have an effective interaction with fullerene molecules,¹⁸ being unable to separate C₆₀ from C₇₀. For C₁₈ phases, although better separation was achieved, the resolution decreased when increasing the temperature. In comparison to these phases, monomeric type C₃₀ alkyl chain silica bonded stationary phases have been successfully employed for preparative and large scale separation of fullerenes using a high toluene concentration in the mobile phase,¹⁸ overcoming the main disadvantage of reversed-phase LC stationary phases.

Despite the recent advances in conventional ODS phases, their efficiency is still lower than that showed by novel stationary phases for the preparative separation of fullerenes. The first phase to become commercially available is known as "Bucky-clutcher" and consists of immobilized 3,3,3-tri-dinitrophenyl silica.¹⁹ Based on its π -acidic character, it can separate C₆₀ and C₇₀ in pure toluene as

mobile phase through a charge transfer mechanism, but the retention factors and selectivity are low, being their use feasible only with weak solvents. A more effective retention is achieved using other packing materials with large size ligands that can interact with a large fraction of the surface of the fullerene molecule. Some of them are immobilized 2-(1-pyrenyl)ethyl-silica ("Buckyprep")²⁰ or 3-[(pentabromobenzyl)oxy] propylsilyl silica (PBB)²¹ phases, which also exhibit sufficiently large separation factors only with relatively weak solvents. But doubtlessly, among the currently available stationary phases, the best results regarding selectivity and efficiency for preparative applications are provided by immobilized tetraphenylporphyrin on silica.²²

In addition, fullerene chemistry leads to a wide group of chiral fullerene derivatives, since even when the initial reagents are achiral, chirality arises from the different addition patterns possible. For the separation of these compounds, charge transfer chromatography has proven to be a suitable technique, and several chiral stationary phases have also been developed for this purpose.²³ However, it has been recently proved that a strong π donor-acceptor interaction is a necessary, but not sufficient requirement for chiral discrimination,

and more progresses are expected to follow in this field in the near future.

4. Determination of fullerenes

Fullerene determination is of special interest in geological samples, since they have been recently identified in some forms of common carbon soot: fulgurite and shunguite. In the case of fulgurite specimens, the presence of fullerenes has been identified with lightning strikes between the mineral layers. Shunguite, on the other hand, is a very old geological mineral deposit, which predate living plants, and is of particular interest, regarding its origin. Other ordinary materials such as gasoline or coal have also been reported as source materials for the production of fullerenes.³ For the determination of C₆₀ and C₇₀ in several types of samples, LC with UV or MS detection has proven to be an excellent and reliable technique. The analysis of geological materials is carried out at room temperature by LC-UV, which is non-destructive (fullerenes can be recovered) and is easily calibrated with synthetic fullerenes. In addition, a previous separation of fullerenes from organics greatly empowers the final determination.²⁴

On the other hand, and in order to check the possible toxicity of C₆₀, many biological studies have been developed²⁵ showing that C₆₀ accumu-

lates preferentially in spleen and liver depending the distribution on the animal specie. However, although the chromatographic separation of C₆₀ from solutions is simple, sample preparation for biological samples such as plasma,²⁶ blood or tissues usually involves several steps of sonication and stirring, being highly tedious and time-consuming. The reason is that C₆₀ is difficult to extract from aqueous colloidal media, even using organic solvents as toluene or CS₂. Thus, after several hours of stirring, the extraction yields often range between only 65 and 90%.

5. Analytical applications of fullerenes

The primary applications of fullerenes are illustrated in Fig. 1. So, C₆₀ and C₇₀ fullerene bonded silica phases as well as fullerene containing polysiloxanes have been employed as stationary phases in LC and gas chromatography (GC), respectively. But currently the most widely extended analytical use of C₆₀ and C₇₀ fullerenes is the direct preconcentration of metal and organometallic traces by using on-line flow configurations.

5.1. Chromatographic stationary phases

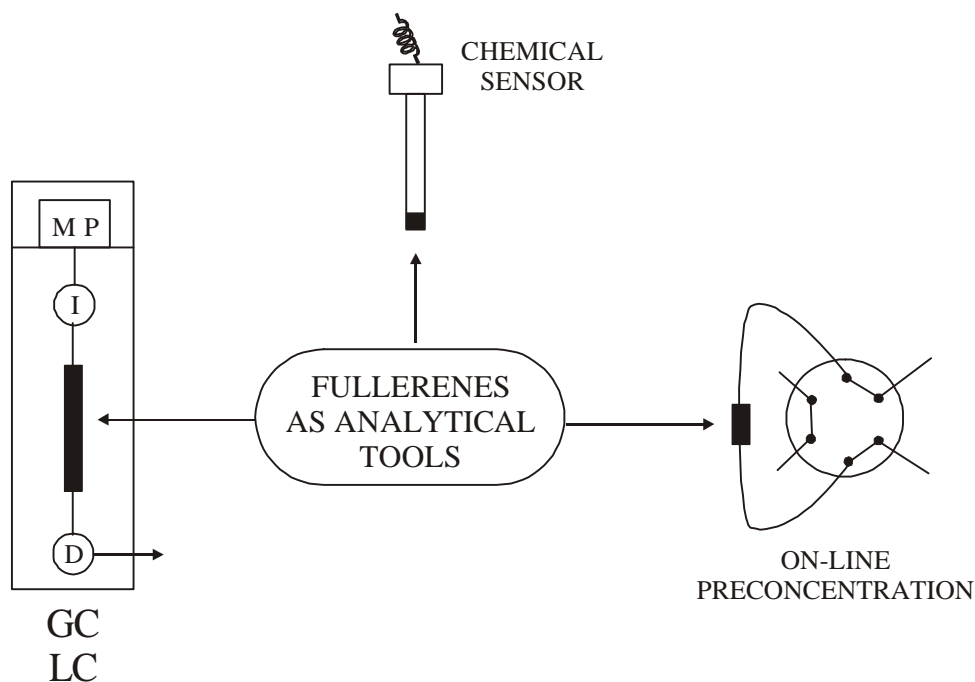


Figure 1

The three main possibilities for direct use of fullerenes in analytical processes. MP, mobile phase; I, injector; D, detector; GC and LC, gas and liquid chromatograph.

Studies focused on the separation and isolation of fullerenes by LC revealed that bonded stationary phases with phenyl ligands in their structure could interact with fullerenes *via* π - π interactions.²⁷

The knowledge of this capacity leads to the investigation of fullerenes as stationary phase, first for LC and later for GC. The retention of PAHs (polyaromatic hydrocarbons) onto several fullerene stationary phases for LC was first studied by Jinno et al.,²⁸ who used C_{60} fullerene bonded silica phases, as well as C_{60} itself, for the separation of PAHs and alkylben-

zenes.²⁹ In general, when using ODS stationary phases, the retention values of PAHs in LC have a high correlation with the F number, being F one of the molecular descriptors for these compounds that takes into consideration structure details such as number of double bonds or rings. The retention increases with increasing the F number, and hence similar retention times are expected for compounds with similar chemical structure. However, when using C_{60} -bonded stationary phases, planar PAHs were retained longer than non-planar solutes having the same F number, enabling

thus the separation of these compounds. Fullerene showed a higher selectivity for aromatic compounds and planar molecules than conventional ODS phases, clearly indicating that C₆₀ bonded phases have an unique molecular recognition capability. This selectivity was also found by Stalling et al.³⁰ in the separation of PCBs (polychlorinated biphenyls) using a polymer-based fullerene bonded phase. In this study, polystyrene divinylbenzene was covalently bonded to C₆₀ and C₇₀, and coplanar PCBs were successfully separated from other isomers. The retention was governed by the formation of charge complexes of the molecules to be separated with the fullerene molecules, based on an “electron donor-acceptor” mechanism from solutes to fullerene.

Last efforts have been focused on the development of fullerene-based stationary phases for GC. The first application in this field involved a C₆₀ coating on a glass column in the study of the retention of high-boiling organic compounds such as aromatic and aliphatic hydrocarbons, amines, alcohols and esters.³¹ Satisfactory results were obtained, but some dispersive interactions with different analytes were found. More recently, fullerene-containing polysiloxanes have been synthesized in order to study their behaviour as GC stationary

phases.³²⁻³⁴ They show excellent thermostability and wide operational temperature (up to 360 °C), high column efficiency and good selectivity, specially for compounds such as alkanes, alcohols, ketones and aromatic compounds (including PAHs, PCBs or phthalic esters). As described in the case of LC, the retention mechanism is attributed to strong π - π and donor-acceptor interactions of fullerene with the analytes, and the selectivity increases with the planarity of the target molecule.

5.2. *Chemical sensors*

In order to establish the analytical features of fullerenes as sensors, adsorption studies of organic molecules onto fullerenes were initially carried out. For this purpose, the adsorption of gases and organic vapours was studied in fullerene coated devices sensitive enough to detect changes in mass or pressure related to the adsorption of gas molecules to the fullerene layer, such as surface acoustic wave sensors (SAW) or quartz microbalances (QMB)^{35,36} Through these first investigations, the retention of certain monomeric gas molecules was demonstrated, and the possible use of C₆₀ films as analytical sensors for volatile polar gases (e.g. NH₃)³⁷ was considered. Gas adsorption onto the fullerene film decreases the film resistance, resulting in the appropriate

charge transfer to the electronic system. Sensitivity levels of few mg/l NH_3 in air were achieved, but there were still some pitfalls such as the lack of selectivity versus other gas vapours (that were also adsorbed leading to the same electrical signal), response times on the order of seconds, influence of the humidity level in the calibration, or instability of the sensor when exposed several times to air.

Nevertheless, the use of fullerenes as modifiers in several fields was found to be a promising research topic, specially as coating in QMB and SAW, since it is well known the fact that the presence of fullerene improves the electrochemical characteristics of the film or membrane by reducing the resistivity. In the last years, various reusable and sensitive piezoelectric (PZ) quartz crystal membrane sensors were developed to detect organic/inorganic vapours and organic/inorganic biologic species in solutions. Fullerene C_{60} and fullerene derivatives, among others, were synthesized and applied as coating materials on quartz crystals of the PZ crystal sensors.³⁸ As pressure and mass sensitive devices, the oscillating frequency of the quartz crystal decreases due to the adsorption of organic species onto the coating material molecules on the crystal surface; this shift is related to the concentration of the analyte in the medium, providing thus

the analytical signal. The system is also employed to study the interaction between fullerene C_{60} and several organic molecules. Thus, chemisorption on C_{60} fullerene was observed for amines, diamines, dithiols, dienes and alkynes, and only physical adsorption was found for carboxylic acids, aldehydes, alcohols, acetones, alkenes and alkanes. This seems to imply that the nucleophilic addition to fullerene by polar electron donor groups, such as amines and thiols, is easier than electrophilic addition. Furthermore, diamines and dithiols showed greater interactions than those for the monodentate form, this behaviour being attributed to the formation of stable cyclic compounds between fullerene and the bidentate ligand.

In independent studies, fullerene has been widely used as electron mediator in electrodes since the incorporation of C_{60} significantly reduces the electrical resistance of the coating membrane. By way of example, a iodide sensitive sensor was reported,³⁹ in which the bilayer lipid membrane supported on a copper wire that acted as modified electrode contained also C_{60} fullerene. The resulting electrode was further used in a three electrode system for the determination of iodide in solution, obtaining a detection limit of 10 nM. But the latest investigations about fullerene electrodes point out to them as very promising compounds as

mediators in amperometric biosensors.⁴⁰ The activity of a biosensor is based on the catalytic action of the immobilised enzyme, requiring a fast and efficient regeneration in order to work properly. This regeneration can be achieved via natural cofactors (O_2 , NAD^+) or via compounds added for this purpose (mediators) and establish an electron flow from the enzyme to the electrode surface yielding the analytical signal. The most efficient electron transfer is provided by artificial mediators, and among them fullerenes are an interesting alternative. They have multiple redox states in a wide range of potentials, very low solubility in aqueous solutions, and the electron transfer between soluble enzymes and the electrode interface is highly efficient, increasing the sensitivity with the greater content in C_{60} fullerene, while the response time decreases. As a model, the fullerene-mediated amperometric biosensor for glucose oxidase containing $1.7 \mu\text{g}$ of C_{60} provided a detection limit of $13 \mu\text{M}$ and a response time between 2 and 5 min, depending on the concentration of glucose in the solution analyzed.

Recently, the optical properties of C_{60} have been also applied to the development of a sensitive oxygen sensing system based on the quenching of the photoexcited triplet state of the fullerene molecules.⁴¹ Although the

amperometric oxygen electrode has been the most popular sensing system for this element, its instability in the oxygen diffusion barrier, as well as in the electrode surface itself, is nowadays claiming for a practical alternative. In this direction, much attention has been given to optical sensing systems based on luminescence quenching of an indicator (organic dyes, PAHs or transition metal complexes). C_{60} fullerene can also be used as indicator seeing that it can easily form thermally stable films with polymers such as polystyrene and possesses useful electronic and photochemical properties, such as a fairly long lifetime of the photoexcited triplet state ($\sim 100 \mu\text{s}$). This lifetime is effectively quenched by oxygen, and decreases with increasing oxygen concentration. Using time-resolved spectroscopy with laser flash photolysis, a highly sensitive oxygen sensor is obtained.

5.3. On-line sorbent phases for clean-up and preconcentration

Several approaches have been devised for separating analytes from matrix elements and preconcentrating the formers using a variety of techniques such as liquid-liquid extraction and liquid-solid extraction. Nowadays, however, the disadvantages inherent to liquid-liquid extraction (viz. laborious, time-consuming manipulations, the need of using large

volumes of sample and organic solvents, and the formation of emulsions) are all well known. Solid-phase extraction (SPE) has rapidly established itself as an alternative to sample preparation as it provides many advantages, including high recoveries of analytes, effective concentration, highly purified extracts, the ability to simultaneously extract analytes of widely variable polarity, easy automation and reduced organic solvent consumption. A survey of SPE available literature can give the impression that innovation in such a widely explored field is virtually impossible. However, the use of new solid materials can open previously unexpected prospects; such is the case of fullerenes as new sorbent materials for clean-up and preconcentration purposes. The

analytical potential of C_{60} fullerene as a sorbent material for the preconcentration of various species has seemingly been developed only by the authors' group.

Columns of C_{60} were made from PTFE capillaries (3 mm i.d.) packed with 60-100 mg of sorbent and sealed on both ends with small cotton wool beds; the columns were initially flushed with 0.1 M nitric acid and subsequent use of eluent was sufficient to make the columns ready for reuse for at least 6 months. The C_{60} column was located into the loop of an injection valve, and therefore only continuous flow systems (CFS) for automated sample pretreatment have been developed. The CFS operation comprises two steps: sorption (sample and reagent introduction) and elution.

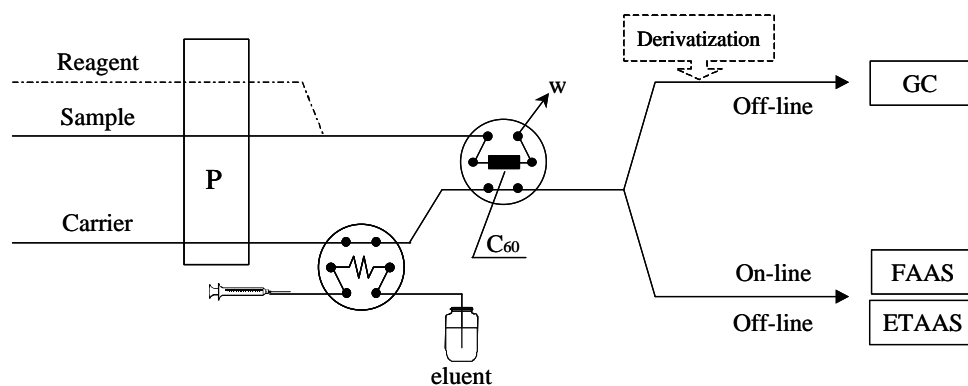


Figure 2

Configurations of an SPE-based continuous flow system using fullerenes as sorbent for the automated sample pretreatment coupled off-line or on-line with different instruments. See text for details.

The final extract can be introduced off-line or on-line to the instrument. Fig. 2 shows the manifold used for this purpose. In the clean-up and preconcentration step, the sample (with volume-based sampling) and reagent streams are continuously merged and passed through the loop of the first injection valve and then sent to waste. The reaction product (neutral chelate or ion-pair) is retained on the C_{60} column. The loop of the second injection valve is loaded with eluent (viz. isobutyl methyl ketone, *n*-hexane). In a second step, the organic plug carried out by an air or water stream, is led into the sorbent column, thereby effecting the rapid desorption of the compound. From this point, the analyte is: (i) directly transported to the nebulizer of a flame atomic absorption spectrometer (FAAS) or the autosampler's cup of an electrothermal atomic absorption spectrometer (ETAAS) or (ii) collected in a glass vial containing the derivatizing reagent (the derivatizing reagent can also be spiked to the eluent) and after derivatization, aliquots manually injected into the gas chromatograph. The most relevant aspects of each application are summarized in Table 2.

The first application of C_{60} fullerenes as sorbent material was done by using a model system for the determination of lead traces by using

ammonium pyrrolidine dithiocarbamate (APDC) as ligand; for comparison, two systematic studies using C_{18} bonded silica and activated carbon as sorbents were also performed.⁴² The C_{60} exhibits the highest preconcentration factor, lowest detection limit and widest pH range (at pH 0 – 5). Nevertheless, the most interesting feature of the new sorbent material is its selectivity. The effect of many common metal ions that can form complexes with APDC in the determination of cadmium by FAAS (see Fig. 2) is showed in Fig. 3.⁴³ In this determination the results obtained with C_{60} fullerene were compared with RP- C_{18} sorbent. As can be seen, the selectivity was highest for C_{60} fullerene; this may have been the result of its larger surface area relative to C_{18} , in addition to its higher interstitial volume. The adsorptive potential of C_{60} and C_{70} fullerenes for the preconcentration of trace copper from aqueous solutions was also examined⁴⁴ using the formation of a neutral chelate with APDC, cationic chelates with 1,10-phenantroline and neocuproine ligands forming ion-pairs with sodium dodecylsulfate, and an anionic complex with dodecyltrimethylammonium bromide. The best analytical results (sensitivity and selectivity) were obtained with the neutral chelate and adsorption on C_{70} fullerene thanks to its large surface area and high

Table 2
Application of fullerenes as sorbents in continuous systems

Analyte	Sample	Technique ^a	Detection limit (ng/ml)	R.S.D. (%)	Comments	Ref.
Pb	Waters	FAAS	5	2.1	Study of adsorption isotherms.	[42]
Cd	Biological	FAAS	0.3 – 2.0	1.9 – 2.3	Comparison of APDC and 8-hydroxyquinoleine as chelating reagents.	[43]
Cu	Waters	FAAS	0.3 – 3.0	1.7 – 3.1	Comparison of C ₆₀ and C ₇₀ fullerene. Sorption of neutral chelates and ion-pairs.	[44]
Cd	Waters	ETAAS	0.002		Tungstene coil atomizer.	[45]
Pb			0.023			
Ni			0.075			
Co	Wheat flour	ETAAS	0.008	4.0	Comparative study of C ₆₀ fullerene and RP-C ₁₈ . Autosampler as interface.	[46]
Lead species	Waters	FAAS	0.5 – 4	3.5	Precipitation of inorganic lead. Selectivity related to column conditioning.	[47]
Organic and organo-metallic compounds	Waters	GC/FID, FAAS	5 – 15	2.4 – 3.0	Systematic study of retention of organic and organometallic compounds on C ₆₀ fullerene.	[48]
Alkyllead species	Waters	FAAS, GC/MS	0.5 0.001 – 0.004	6.0	Screening by FAAS and speciation by GC. Derivatization with Grignard reagent.	[49]
Alkyllead species	Waters	GC/MS	0.004 – 0.012	4.5	In-situ derivatization with NaBPr ₄ .	[50]
Dithiocarbamates of Zn, Mn and Fe	Grain	FAAS	1 – 5	2.5	Group speciation according to the metal present in the fungicide.	[51]

^a FAAS, flame atomic absorption spectrometry; ETAAS, electrothermal atomic absorption spectrometry; GC/FID, gas chromatography with flame ionization detector; GC/MS, gas chromatography/ mass spectrometry; R.S.D., relative standard deviation, n=11

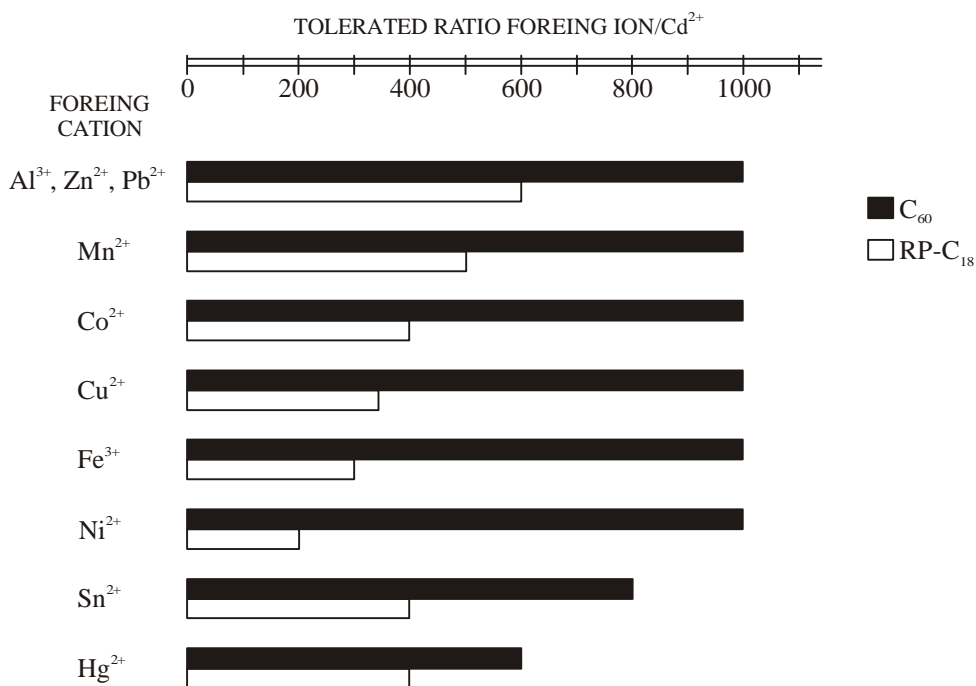


Figure 3 Comparative study of interferences on the determination of 10 ng/mL of Cd²⁺ in a continuous flow system coupled to FAAS furnished with C₆₀ and RP-C₁₈ minicolumns.

volume relative to C₆₀ fullerene. Other applications^{45,46} using FAAS and ETAAS techniques are listed in Table 2.

The continuous flow system of Fig. 2 has been also applied for the determination of organic and organometallic compounds by using off-line gas chromatography technique. C₆₀ fullerene adsorbs many types of organic substances (*e.g.* N-methylcarbamates, phenols, PAHs, amines) with efficiencies that depend on the nature of the compound concerned and never exceed 60%; conventional sorbents such as XAD-2 or

polyurethane foam are more efficient than C₆₀ for this purpose.⁴⁷ Organometallic compounds as metalloenes are quantitatively adsorbed on C₆₀ via the formation of neutral complexes with APDC reagent.

The rapidly growing interest in elemental speciation has propitiated the development of a new generation of analytical techniques that enable discrimination among the different forms of a metal. A simple and novel screening method for lead compounds in environmental waters was proposed in which the analytes, in an acetic medium, were sorbed on a C₆₀

fullerene column as diethyldithiocarbamate (DDC) complexes and subsequently eluted with isobutyl methyl ketone, the lead being determined by FAAS (Chapter III, Part III.1). The screening method acts as filter and indicates whether the target analytes are present above or below the detection limit of the method (0.5 ng/ml), giving no false positives. Positive samples were speciated by GC/MS. Inorganic lead and ionic di- and trialkyllead compounds as DDC complexes were sorbed on C₆₀ and eluted with *n*-hexane. The eluted analytes were manually derivatized with propylmagnesium chloride prepared under an argon atmosphere (Chapter IV, Part IV.1). To overcome the problems associated with Grignard reagents, the potential of other easier to handle derivatizing reagents that could be directly added to the eluent were also assayed. Following this idea, sodium tetrapropylborate, as the most suitable derivatizing reagent, was spiked to the eluent in order to achieve the complete automation of the pretreatment unit (Chapter IV, Part IV.2). The automatic method is the simplest of all available for ionic alkyllead speciation as it enables sequential preconcentration, clean-up and derivatization with minimal sample manipulation, which ensures a high accuracy (minimal contamination/ losses) and also a high throughput. Similar experiments

involving RP-C₁₈ as sorbent showed that the sensitivity and selectivity of the method were at least twice for C₆₀ fullerene as a consequence of its better sorbent properties relative to RP-C₁₈. On the other hand a systematic overview about the advantages and disadvantages of several detectors (MS, MIP-AES, ICP-TOFMS) coupled to GC, for the speciation of organolead compounds on the basis of sensitivity, selectivity and reliability has also been carried out by using an automatic SPE unit with C₆₀ off-line to the instrument (see Fig. 2); the most sensitive, with absolute detection limits of 15 fg of organolead species for 5 ml sample volume was GC/ICP-TOFMS (Chapter V, Part V.1).

6. Final remarks

Probably one of the bottle-necks of the use of fullerenes in analytical chemistry were both their unavailability and high cost. Nowadays, fullerenes are provided by many firms at reasonable price. The advantages of their use as sorbent materials, chromatographic stationary phases and active microzones in sensors based on their unique characteristics shown in this paper will be consolidated and extended in the near future.

One of the foreseeable trends in this context is the use of synthetic fullerene derivatives exhibiting better

properties than the original fullerenes. The introduction of radicals in the fullerene spheres can lead to increasing the reversible sorption of organic molecules as well as to direct retention-elution of metal traces by covalent binding of typical ligands such as EDTA , DDC, etc. The unusual electrical properties of fullerenes can be fully exploited by progressively substituting the conventional carbon forms in building macro and micro-electrodes. Fullerene derivatives non-soluble in ordinary organic solvents used as mobile phases in LC will overcome the well-stated problems of the deterioration of the fullerenes in stationary phases.

REFERENCES

- [1] H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl, R. E. Smalley, *Nature* 318 (1985) 162.
- [2] W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos, D. R. Huffman, *Nature* 347 (1990) 354.
- [3] M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Eklund, *Science of fullerene and carbon nanotubes*, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [4] T. Tanigaki, S. Kuroshima, J. Fujita, T. W. Ebbesen, *Appl. Phys. Lett.* 63 (1993) 2351.
- [5] A. P. G. Robinson, R. E. Palmer, T. Tada, T. Kanayama, E. J. Shelley, D. Philp, J. A. Preece, *Chem. Phys. Lett.* 312 (1999) 469.
- [6] Y. Kureishi, H. Tamiaki, H. Shiraishi, K. Maruyama, *Bioelectrochemistry and bioenergetics* 48 (1999) 95.
- [7] T. Da Ros, M. Prato, *Chem. Commun.* (1999) 663.
- [8] Y. T. Lee, L. Y. Chiang, W. J. Chen, H. C. Hsu, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 224 (2000) 69.
- [9] H. M. Huang, H. C. Ou, S. J. Hsieh, L. Y. Chiang, *Life Sci.* 66 (2000) 1525.
- [10] M. Bisaglia, B. Natalini, R. Pellicciari, E. Straface, W. Malorni, D. Monti, C. Franceschi, G. Schettini, *J. Neurochem.* 74 (2000) 1197.
- [11] S. Bosi, T. Da Ros, S. Castellano, E. Banfi, M. Prato, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10 (2000) 1043.
- [12] N. Tsao, P. P. Kanakamma, T. Y. Luh, C.K. Chou, H. Y. Lei, *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 (1999) 2273.
- [13] R. Taylor, *Lecture notes on fullerene chemistry*, Imperial college Press, London, 1999.
- [14] L. Jiang, T. Iyoda, D. A. Tryk, J. Li, K. Kitazawa, A. Fujishima, K. Hashimoto, *J. Phys. Chem. B* 102 (1998) 6351.
- [15] M. Lin, A. Thienpont, M. H. Delville, G. Felix, C. Netter, *J. High Resolut. Chromatogr.* 17 (1994) 104.
- [16] K. Jinno (Ed.), *Separation of Fullerenes by Liquid Chromatography*, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [17] Y. C. Guillaume, E. Peyrin, C. Grosset, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1301.

- [18] H. Ohta, Y. Saito, N. Nagae, J. J. Pesek, M. T. Matyska, K. Jinno, J. Chromatogr. A 883 (2000) 55.
- [19] C. J. Welch, W. H. Pirkle, J. Chromatogr. 609 (1992) 89.
- [20] K. Kimata, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, J. Org. Chem. 58 (1993) 282.
- [21] K. Kimata, T. Hirose, K. Moriuchi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, Anal. Chem. 67 (1995) 2556.
- [22] D. E. Coutant, S. A. Clarke, A. H. Francis, M. E. Meyerhoff, J. Chromatogr. A 824 (1998) 147.
- [23] B. Gross, V. Schurig, I. Lamparth, A. Hirsch, J. Chromatogr. A 791 (1997) 65.
- [24] D. Heymann, L. P. F. Chibante, R.E. Smalley, J. Chromatogr. A 689 (1995) 157.
- [25] F. Moussa, M. Pressac, E. Genin, S. Roux, F. Trivin, A. Rassat, R. Céolin, H. Szwarc, J. Chromatogr. B 696 (1997) 153.
- [26] T. Santa, D. Yoshioka, H. Homma, K. Imai, M. Satoh, I. Takayanagi, Biol. Pharm. Bull. 33 (1995) 1171.
- [27] K. Jinno, K. Tanabe, Y. Saito, H. Nagashima, Analyst 122 (1997) 787.
- [28] K. Jinno, K. Yamamoto, J. C. Fetzer, W. R. Biggs, J. Microcolumn Sep. 4 (1992) 187.
- [29] K. Jinno, K. Fukuoka, J. C. Fetzer, W. R. Biggs, J. Microcolumn Sep. 5 (1993) 517.
- [30] D. L. Stalling, C. Y. Guo, S. Saim, J. Chromatographic Sci. 31 (1993) 265.
- [31] R. V. Golovnya, M. B. Terenina, E. L. Ruchkina, V. L. Karnatsevich, Medeleev. Commun. 6 (1993) 231.
- [32] A. Glausch, A. Hirsch, I. Lamparth, V. Schurig, J. Chromatogr. A 809 (1998) 252.
- [33] Y. Y. Chen, P. F. Fang, Z. R. Zeng, J. H. Fan, Chem. Lett. 6 (1999) 499.
- [34] P. F. Fang, Z. R. Zeng, J. H. Fan, Y. Y. Chen, J. Chromatogr. A 867 (2000) 177.
- [35] M. H. Abraham, C. M. Du, J. W. Grate, R. A. McGill, W. J. Shuely, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 24 (1993) 1863.
- [36] J. W. Grate, M. H. Abraham, C. M. Du, R. A. McGill, W. J. Shuely, Langmuir 11 (1995) 2125.
- [37] A. W. Synowczyk, J. Heinze, Springer series in solid state sciences, vol 117, Springer-Verlag, Berlin, 1993.

- [38] Y. C. Chao, J. S. Shih, *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 39.
- [39] L. G. Wang, X. Wang, A. L. Ottova, H. T. Tien, *Electroanalysis* 8 (1996) 1020.
- [40] V. G. Gavalas, N. A. Chaniotakis, *Anal. Chim. Acta* 409 (2000) 131.
- [41] Y. Amai, K. Asai, I. Okura, *Analyst* 125 (2000) 523.
- [42] M. Gallego, Y. Petit de Peña, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 66 (1994) 4074.
- [43] Y. Petit de Peña, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 453.
- [44] Y. Petit de Peña, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2524.
- [45] M. M. Silva, M. A. Z. Arruda, F. J. Krug, P. V. Oliveira, Z. F. Queiroz, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 255.
- [46] M. M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.* 14 (1999) 711.
- [47] E. Ballesteros, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 101.



Capítulo II

Herramientas empleadas en la Tesis Doctoral

Chapter II
Tools involved in this
Doctoral Thesis

El desarrollo de la presente Memoria ha sido posible gracias al empleo de diversas herramientas analíticas, considerando como tales todos los elementos utilizados, desde los distintos reactivos necesarios para el tratamiento de la muestra hasta los instrumentos más sofisticados, sin olvidar los patrones de los análisis, los componentes de los sistemas de flujo continuo con columnas de fullereno y de su derivado dietilditiocarbámico, y otros reactivos tales como ácidos, bases o disolventes orgánicos. En los siguientes apartados se aborda una descripción detallada de cada uno de los elementos empleados.

II.1. ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Salvo en los casos en los que se indica lo contrario, los reactivos empleados en la Memoria fueron de grado analítico. En este apartado se incluyen los analitos (estándares), materiales sorbentes para empaquetar las columnas del sistema de flujo, reactivos complejantes y derivatizadores, así como reactivos generales (disolventes, ácidos y bases).

Analitos:

- PbNO_3 . Patrón primario para la preparación de la disolución de plomo inorgánico. Se disuelve en ácido nítrico al 1% hasta obtener una concentración de 1 g Pb/L.
- Compuestos organoplomados: Acetatos de trimetil, tributil y tripentilplomo, y cloruros de trietil y trifenilplomo. Se preparan en concentraciones de 0.5 g/L (expresado como concentración de plomo) en los disolventes adecuados, ya sea agua, etanol, ácido acético al 4% o acetonitrilo. Los derivados dialquilplomados son muy inestables y no se comercializan como sales sólidas. Por ello, han de ser obtenidos en el laboratorio a partir de los correspondientes trialquilplomados mediante una reacción con ICl descrita en detalle en el apartado IV.1. Todos los analitos se conservaron a 4 °C, protegidos de la luz.
- Fungicidas ditiocarbámicos: Ziram, zineb, propineb, mancozeb, maneb y ferbam, todos ellos de calidad pestanal. En función del analito, se escoge el disolvente más apropiado entre acetonitrilo, dimetilsulfóxido y agua ultrapura (ver apartado III.2). Las disoluciones resultantes (50 – 100 mg/L del metal correspondiente) también se almacenan en el frigorífico protegidos de la acción de la luz.

Materiales sorbentes:

- Fullerenos C_{60} . En las primeras metodologías desarrolladas (apartados III.1, III.2 y IV.1), el material disponible era de una pureza mayor del 99.4%. Posteriores investigaciones sobre la síntesis y purificación de fullerenos permitieron la puesta en el mercado de fullerenos C_{60} con un grado de pu-

reza del 99.999% a un precio asequible, que fue empleado en los trabajos sucesivos (apartados IV.2, V.1 y VI.1).

- Derivado dietilditiocarbámico del fullereno C_{60} . Este compuesto fue sintetizado en el laboratorio con el objetivo de permitir la retención directa de los compuestos organoplomados. La unión covalente del fullereno con la molécula de dietilditiocarbamato sódico se produce mediante una reacción fotoquímica empleando radiaciones en la región espectral del Visible. El derivado se purifica empleando diferentes técnicas de separación entre las que se incluye una columna de gel de sílice (ver apartado VI.1).

Reactivos

- Complejantes: Pirrolidinditiocarbamato amónico (APDC) y dietilditiocarbamato sódico (NaDDC). Ambos empleados para formar quelatos neutros con los derivados organoplomados y hacer posible su retención sobre el fullereno C_{60} . Se demuestra que el NaDDC es el más adecuado para este objetivo (ver apartado III.1)
- Derivatizadores. En este grupo se engloban tanto los reactivos empleados para separar el plomo inorgánico del medio de reacción (dodecilsulfato sódico y cromato potásico, apartado III.1 de la Memoria) como los empleados para convertir los compuestos organoplomados en derivados volátiles con vistas a su separación por cromatografía de gases. En el último grupo se encuentran el cloruro de propilmagnesio (apartado IV.1), un reactivo de Grignard muy inestable al contacto con el aire y que debe ser empleado bajo atmósfera inerte y en ausencia de humedad, y el tetrapropilborato sódico (apartado IV.2), un reactivo sintetizado recientemente que es compatible con el medio acuoso, lo que simplifica en gran medida el tratamiento de la muestra.

Otros reactivos

- Disolventes orgánicos. Se han empleado tanto para preparar las disoluciones de los patrones como para actuar como eluyentes en los distintos sistemas de flujo o para la síntesis del derivado del fullereno. Metanol, etanol, acetona, acetonitrilo, cloroformo, dimetilsulfóxido, acetato de etilo, to-

lueno, *n*-hexano o metil isobutil cetona son algunos de los disolventes de pureza analítica utilizados.

- Ácidos y bases. Los ajustes de pH se han llevado a cabo usando disoluciones de diversas concentraciones de hidróxido sódico o amónico y ácido nítrico, todos ellos de calidad analítica. Asimismo, se ha empleado ácido acético glacial para evitar la interferencia del hierro en la retención de los analitos sobre la columna de fullereno (apartado III.1).
- Otros reactivos como cloruro de yodo y gel de sílice han sido utilizados para obtener los patrones alquilplomados y purificar el derivado del fullereno, respectivamente.

II.2. SISTEMAS DE FLUJO CONTINUO

La búsqueda de un grado creciente de automatización y simplicidad en el tratamiento de la muestra ha constituido uno de los pilares de la presente Memoria. La implantación de la extracción en fase sólida en los sistemas de flujo continuo permite el desarrollo de operaciones de preconcentración y limpieza de una forma rápida, evitando los tediosos procedimientos manuales que a menudo llevan asociados severos riesgos de pérdidas de analitos o de contaminación debido a operaciones de trasvase y agitación, entre otras. Para el desarrollo de las distintas metodologías, se han empleado bombas peristálticas (Gilson Minipuls-2) para facilitar la aspiración de la muestra y los reactivos a través de tubos de cloruro de polivinilo de distinto diámetro; las disoluciones son transportadas a través de las conducciones de PTFE (0.5 mm d.i.) de los sistemas de flujo hasta los puntos de confluencia y las válvulas de inyección (Rheodyne), que pueden ser empleadas también como válvulas de selección en función de las necesidades del sistema. La preconcentración de los analitos se lleva a cabo en minicolumnas fabricadas en el laboratorio a partir de tubos de PTFE de 3 mm d.i. que se rellenan con el material sorbente (fullereno C₆₀ o su derivado dietilditiocarbámico) y se sellan con pequeñas porciones de algodón o lana de vidrio para evitar pérdidas del material.

También se han utilizado dos unidades de filtración. La primera de ellas (apartado III.1) consistió en una columna (Scientific System, 0.5 – 105) con un filtro interior de acero inoxidable de 0.5 μm de tamaño de poro, 580 μL de volumen interno y un área total de filtración de 3 cm². El segundo de los sistemas empleado (apartado III.2) fue una cámara de PTFE (Omnifit) modificado con canales circulares en ambos extremos para aumentar su volumen interna a 100 μL, provisto de filtros de PTFE con un área de filtración de 3 cm².

En el caso del empleo de un reactivo de Grignard como derivatizador (apartado IV.1), es necesario el uso de un sistema estanco para albergar dicho reactivo y permitir que la reacción de derivatización se realice en ausencia de humedad. Para ello, en una caja seca con atmósfera de argón, se introdujo el volumen apropiado de cloruro de propilmagnesio en viales de 2 mL que fueron posteriormente sellados con un séptum. En estas condiciones, el reactivo es esta-

ble durante al menos dos días en atmósfera normal de trabajo, y la adición de los analitos puede realizarse fácilmente mediante la inyección a través del séptum.

II. 3. ESPECTRÓMETRO DE ABSORCIÓN ATÓMICA

En los apartados III.1, III.2 y IV.1 de la presente Memoria se empleó un espectrómetro de absorción atómica (Perkin Elmer, Modelo 380) con atomización por llama de aire-acetileno, equipado con un nebulizador de bola de impacto y lámparas de cátodo hueco para cada metal a determinar. Se seleccionaron las líneas de absorción a 283.3, 279.5, 248.3 y 213.9 nm, para la determinación de Pb, Mn, Fe y Zn, respectivamente, utilizando un ancho de rendija de 0.2 nm en todos los casos. Las medidas de Zn fueron realizadas mediante el empleo de un corrector de fondo de arco de deuterio para evitar interferencias moleculares. Los caudales de aire y acetileno se ajustaron hasta obtener una llama azul limpia.

II. 4. CROMATÓGRAFO DE GASES

La cromatografía de gases se ha empleado como técnica de separación para los compuestos organoplomados, tras la correspondiente formación de derivados volátiles. En la mayor parte de las metodologías desarrolladas se ha utilizado un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas Fisons, Modelo GC8000/MD800 (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1). La muestra (1 μ L) se inyecta en el portal de inyección a 250 °C en el modo de división de flujo (1:25) y pasa a la columna arrastrada por He ultrapuro que actúa como gas portador y que fluye a un caudal de 0.9 mL/min. La separación se lleva a cabo en una columna capilar HP-5 (30 m x 0.25 mm d.i.) de sílice fundida recubierta con una película de fenilmetilpolisiloxano al 5% de 0.25 μ m de espesor. La interfase con el espectrómetro de masas consiste en una línea de transferencia que introduce el capilar en la cámara de ionización del analizador cuadrupolar y que se mantiene a 200 °C para evitar la condensación de los analitos.

En el apartado V.1 de la presente Memoria se describe la comparación de tres detectores acoplados a un cromatógrafo de gases. En esta ocasión se empleó

una columna capilar HP-1 (25 m x 0.32 mm d.i.) revestida con dimetilpolisiloxano entrecruzado al 100%. Los sistemas GC/MS y GC/MIP-AES utilizaron He de alta pureza como portador, mientras que en el caso del GC/ICP-TOFMS, se usó H₂ con un 1% de xenón para facilitar la formación del plasma. Por otra parte, los cromatógrafos acoplados a los distintos detectores también difieren en el modelo, aunque las condiciones de separación son esencialmente coincidentes. Así, el detector MIP-AES fue acoplado a un cromatógrafo HP Modelo 5890 serie II provisto de un sistema de inyección “on-column”, al igual que el cromatógrafo CP 9001 empleado para la separación de las especies previa a su detección en el ICP-TOFMS.

II.5. DETECTORES ACOPLADOS AL CROMATÓGRAFO DE GASES

II.5.1. ESPECTRÓMETRO DE MASAS CON ANALIZADOR CUADRUPOLAR

Uno de los detectores acoplados a la salida del cromatógrafo de gases empleados en la presente Memoria es un espectrómetro de masas con fuente de impacto electrónico y analizador cuadrupolar. El fundamento básico de la espectrometría de masas se puede resumir como la producción de iones en fase gaseosa que son después separados, en función de su relación masa-carga (m/z), y detectados.¹ El espectro de masas así resultante es una representación de la abundancia relativa de los fragmentos generados, que ofrece la capacidad de identificación inequívoca de casi cualquier tipo de sustancia, desde átomos o compuestos sencillos hasta moléculas extraordinariamente complejas y lábiles. El esquema del detector empleado en la Memoria aparece en la Figura II.1.

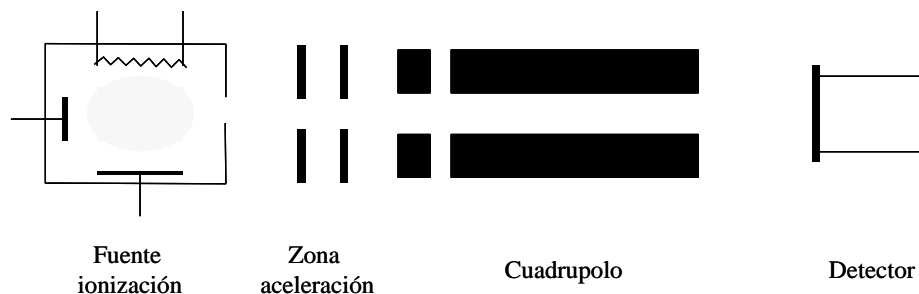


Figura II.1. Representación esquemática de los componentes de un EI-MS

La introducción del efluente de la columna capilar en el detector no representa ningún problema ya que el flujo constante de gas portador es fácilmente tolerado por el sistema de bombeo del espectrómetro de masas, que es capaz de mantener un vacío adecuado (la presión es inferior a 10^{-6} mbar) . Por lo tanto, se puede efectuar un acoplamiento directo en el que la columna llega hasta el interior de la fuente de iones, a través de una línea calentada para evitar condensaciones. Una vez en la fuente de ionización, las moléculas de la muestra son bombardeadas con electrones de una cierta energía (normalmente 70 eV), capaces de provocar la emisión estimulada de un electrón en cada molécula, obteniendo los correspondientes iones. Además de la ionización molecular, también se produce la fragmentación de la molécula debido a la descomposición de iones con exceso

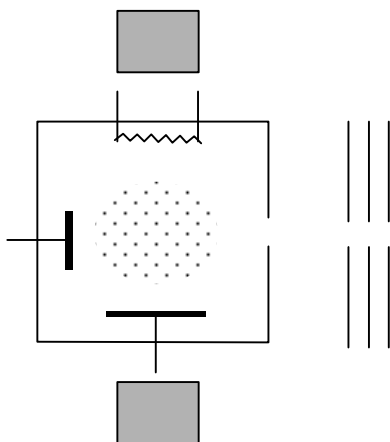


Figura II.2. Esquema de una fuente de impacto electrónico

de energía. El tipo y proporción relativa de cada uno de estos fragmentos es característico de la molécula analizada y constituye el patrón de fragmentación.

En la figura II.2 se observan los componentes de una fuente de impacto electrónico. En la parte superior e inferior se sitúan unos pequeños imanes cuyo objetivo es conseguir que los electrones sigan una trayectoria en forma de espiral desde el filamento hacia el ánodo, para aumentar el recorrido y por tanto la probabilidad de colisión. Una placa repulsora con potencial positivo (repeller) se encarga de expulsar de la fuente a los cationes formados tras las colisiones y que, a través de una rendija, son dirigidos a la zona de aceleración. En esta zona se encuentran dos rendijas a las que se aplican pequeños voltajes crecientes (entre 5 y 20 V) para dirigir los iones hasta el analizador, con distinta velocidad en función de su masa.

Tras la zona de aceleración, los iones alcanzan el analizador cuadrupolar. Este analizador es básicamente un filtro de masas formado por cuatro barras o polos de sección cilíndrica alineadas paralelamente entre sí y equidistantes una distancia r_0 de un eje central situado sobre el eje Z. Las barras opuestas están sometidas a voltajes variables de corriente continua y de radiofrecuencia (RF) superpuestos, de manera que la RF puede reforzar o disminuir el campo total, que puede definirse de forma aproximada según la ecuación:

$$V_{x,y} = (U + V \cos \omega t) \frac{(x^2 - y^2)}{r_0^2}$$

$$V_z = 0$$

Las partículas que entran en el cuadrupolo se ven sometidas a la acción de una fuerza “F” que le produce una aceleración “a”:

$$F = m a = q E \text{ , , } E = \text{intensidad del campo} = -\nabla V$$

si consideramos el movimiento en cada uno de los ejes cartesianos:

$$m x'' = -q \frac{\delta^2 V}{\delta^2 x} \quad m y'' = -q \frac{\delta^2 V}{\delta^2 y} \quad m z'' = 0$$

por lo tanto:

$$m x'' = q (U + V \cos \omega t) \frac{-2x}{r_0^2}$$

$$m y'' = q (U + V \cos \omega t) \frac{-2y}{r_0^2}$$

$$m z'' = 0$$

Los iones comienzan a oscilar al penetrar en el túnel formado por el cuadrupolo en un plano perpendicular a las barras y con una trayectoria que depende de la relación masa/carga y de los potenciales aplicados según la ecuación. Sólo los iones cuya relación m/z corresponda a una trayectoria estable alcanzarán el detector, mientras que el resto es desviado fuera del conjunto de barras porque las trayectorias son inestables y la amplitud de la oscilación tiende a infinito (ver

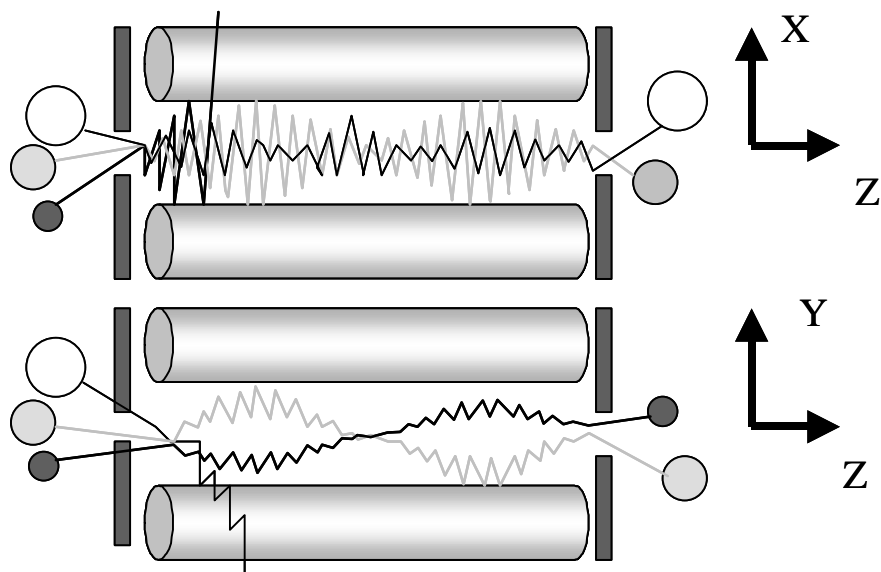


Figura II.3. Trayectorias de los iones en el interior del cuadrupolo

figura II.3). Variando convenientemente los voltajes se enfoca sucesivamente las diferentes masas presentes, obteniendo el correspondiente espectro.²

Por último, los iones provenientes del analizador se aceleran en un dínodo de conversión en el que se emiten electrones. Estos electrones son a su vez acelerados hacia un detector de fósforo, de manera que cuando impactan en él, la luz emitida se convierte en la señal analítica medida a través de un fotomultiplicador.

II.5.2. PLASMA INDUCIDO POR MICROONDAS CON DETECCIÓN DE EMISIÓN ATÓMICA (MIP-AES)

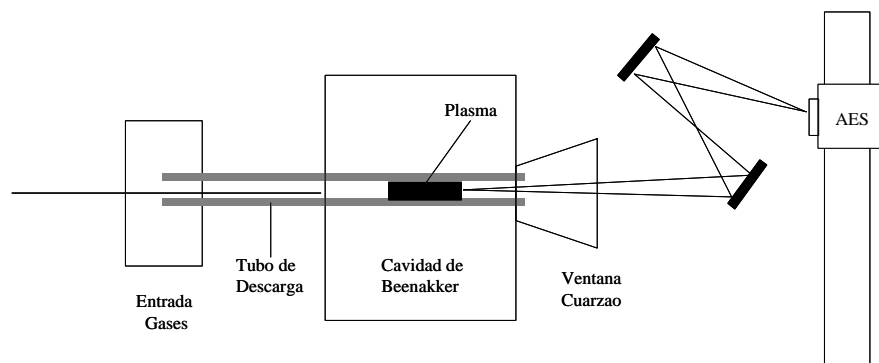


Figura II.4. Esquema de los componentes del MIP-AES

La especiación de compuestos organoplomados también se realizó empleando un equipo comercial GC/MIP-AES (Hewlett-Packard). Consiste en el cromatógrafo HP Modelo 5890 Serie II ya mencionado anteriormente acoplado con un detector de emisión atómica HP 5921 a través de una línea de transferencia.³ Así, la columna capilar puede ser introducida directamente en el tubo de descarga, situado delante del plasma (ver Figura II.4). Un plasma es un gas eléctricamente neutro pero altamente ionizado que está constituido por iones, electrones y átomos. La energía que mantiene el plasma proviene de un campo eléctrico o magnético; como es común en los acoplamientos de GC con MIP, en la Memoria se utiliza la cavidad de Beenakker,⁴ que es una modificación de una cavidad TM_{010} para de transferir la energía al resonador de manera que se puede mantener el plasma a presión atmosférica usando argón o helio, como en este caso. Esta cavidad debe estar situada en la zona de máxima intensidad del campo eléctrico, y debe ser tan pequeña como sea posible para garantizar la mayor densidad electrónica para una potencia dada. La radiación de microondas de 2.45 GHz de frecuencia se genera con un magnetrón y se transporta al lugar de la descarga a través de una guía rectangular. El plasma se origina por la interacción de esta energía con los átomos de helio en el tubo de descarga, situado en el centro de la cavidad. Una de las principales modificaciones introducidas por este sistema es la refrigeración de este tubo recubierto de poliimida para reducir la erosión

debida a reacciones de la muestra gaseosa con las paredes del tubo.⁵ Además, el equipo cuenta con una opción de desvío de flujo integrada para evitar que un exceso del disolvente orgánico alcance el detector, ya que podría dañar el tubo de descarga o incluso extinguir el plasma. En condiciones normales de medida, el efluente proveniente de la columna capilar se dirige directamente hacia el plasma, junto con la corriente de gas plasmógeno para ionizar los analitos y originar la señal correspondiente en el espectrómetro de diodos en fila que se utiliza como detector. Mientras tanto, una corriente extra de helio actúa como purga a la salida después del plasma, en dirección perpendicular a la columna, recogiendo los gases tras su paso por el plasma, y saliendo del sistema a través de una válvula solenoidal provista de un regulador de presión. Para evitar que el disolvente llegue al tubo de descarga, la válvula solenoidal se gira, de manera que la corriente de purga sólo puede salir de la cavidad a través del plasma llevando consigo al efluente de la columna. Una vez eluido el frente del disolvente, la válvula puede volver a su posición original para recoger las señales de los analitos. Esta opción también puede usarse para evitar la medida de otros compuestos que puedan afectar el tiempo de vida del tubo de descarga, en el caso de que no suponga pérdida de información de los analitos. Sin embargo, en los casos en que no es posible aplicar el desvío de flujo, un exceso de compuestos orgánicos puede provocar depósitos de carbón o de óxidos en las paredes del tubo. Para evitar interferencias en las medidas de los analitos, la radiación emitida se recoge axialmente al tubo.

La detección a través de un espectrómetro de diodos en fila permite la medida simultánea de hasta 4 elementos, siempre que sus emisiones se encuentren en un rango de 40 nm en la región de 160 a 800 nm.⁶ Así, se amplían las posibilidades de identificación ya que pueden compararse los picos obtenidos. Además, este detector proporciona una notable sensibilidad mediante la aplicación de una corrección de fondo en tiempo real, ya que tanto la emisión de los analitos como la señal de fondo se recogen simultáneamente.

II.5.3. PLASMA ACOPLADO POR INDUCCIÓN - ESPECTRÓMETRO DE MASAS CON ANALIZADOR DE TIEMPO DE VUELO

La detección de compuestos organoplomados fue llevada a cabo empleando un instrumento comercial Renaissance ICP-TOFMS (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA). El principio del análisis de masas mediante el tiempo de vuelo es muy sencillo. Los iones generados por la fuente de plasma por acoplamiento inductivo de forma instantánea se aceleran en un campo de extracción de algunos keV y recorren una cierta distancia hacia el detector. La velocidad de los iones tras la aceleración con la misma energía depende de su masa, de manera que el tiempo de vuelo es proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z , como se observa en la ecuación:

$$qV = \frac{1}{2}mv^2 \xrightarrow[v = l/t]{} \frac{m}{q} = \frac{2V}{l^2} t^2$$

Por la tanto, el registro del tiempo en el que los distintos iones alcanzan el detector constituye un espectro de masas completo. Ya que todos los iones de cada paquete analizado son detectados, el analizador TOF posee una alta eficacia inherente respecto a los detectores secuenciales en los que sólo se puede medir un valor de m/z en un tiempo dado, lo que implica también una mayor sensibilidad. Además, la frecuencia de adquisición de datos de un TOF se encuentra limitada tan sólo por el tiempo que tarda el ion más pesado en recorrer el tubo de vuelo, con lo que se pueden generar cerca de 20000 espectros cada segundo.

En la presente Memoria se utilizó un plasma acoplado inductivamente como fuente de ionización para el TOF. En el ICP la transferencia de energía desde un generador externo al gas plasmógeno se consigue por medio de una bobina de autoinducción.⁷ El gas (argón) se hace circular a través de esta bobina por medio de una antorcha de cuarzo, que consta de tres tubos concéntricos de diferente tamaño. Por el tubo central circula la muestra en forma de aerosol en un flujo de argón laminar, y los tubos intermedio y exterior soportan caudales más altos de gas (auxiliar y plasma) para formar el plasma y enfriar la antorcha, respectivamente. Al conectar un generador de radiofrecuencias (27-40 MHz), la corriente de alta frecuencia que pasa por la bobina genera un campo magnético

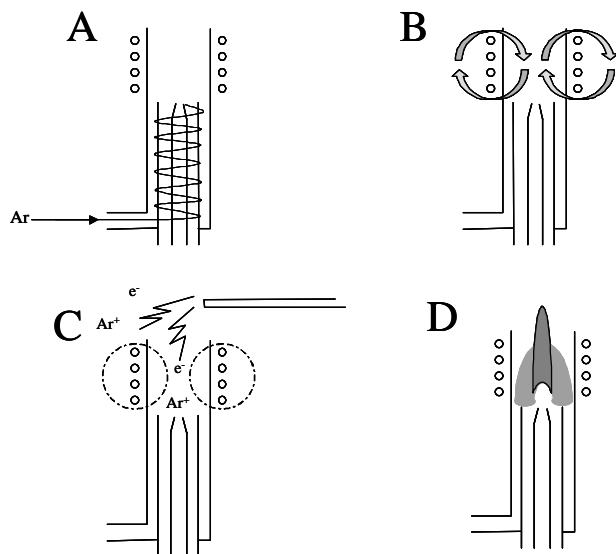


Figura II.5. Representación de la antorcha del plasma y la bobina de inducción. A, movimiento del argón a través de la antorcha; B, aplicación de radiofrecuencia; C, siembra de electrones; D, plasma encendido

alterno y el correspondiente campo eléctrico asociado, cuyas líneas de fuerza se cierran axialmente rodeando la bobina y, por tanto, la punta final de la antorcha a través de la cual circula el gas, como se muestra en la Figura II.5. Sin embargo, si no existen cargas eléctricas en el interior de la bobina, el campo magnético no puede cederle su energía, de forma que la descarga no se produce. Por lo tanto es preciso “sembrar” los primeros electrones en el flujo del gas, lo cual se consigue por medio de una chispa de un Tesla. Estos electrones libres son acelerados por el campo eléctrico y adquieren la energía cinética suficiente para ionizar los átomos del gas plasmógeno, que a su vez producen más electrones que serán también acelerados y provocan una ionización aún mayor. Esta ionización por colisión continua es una reacción en cadena que convierte al gas en un plasma con una alta densidad de electrones, iones positivos y especies metaestables y neutras. La zona analítica se encuentra aproximadamente a 1 cm de la bobina y ofrece la mayor sensibilidad. La temperatura del plasma en esta zona es de 5000 – 8000 K, suficiente para que la mayoría de las muestras sean totalmente atomizadas, aunque algunas especies moleculares (N_2 , N_2^+ , OH, C_2 , etc.) persistan en el plasma.

Para emplear el ICP como fuente de iones para el TOFMS, encontramos una serie de problemas a resolver, ya que es necesario extraer los iones del plasma, que actúa como fuente continua a presión atmosférica y alta temperatura, e introducirlos en el espectrómetro de masas TOF, que por el contrario opera a alto vacío, temperatura moderada y con paquetes de iones para evitar la llegada simultánea al detector de fragmentos con diferente m/z . El primer paso consiste en reducir la presión y la temperatura en pasos sucesivos para no alterar el espacio libre de colisiones necesario en el espectrómetro. El proceso tiene lugar en tres cámaras, señaladas en la Figura II. 6. La primera de ellas está situada inmediatamente después del cono de muestreo, que posee un orificio central de alrededor de 1 mm a través del cual fluyen los iones formando un aerosol supersónico,

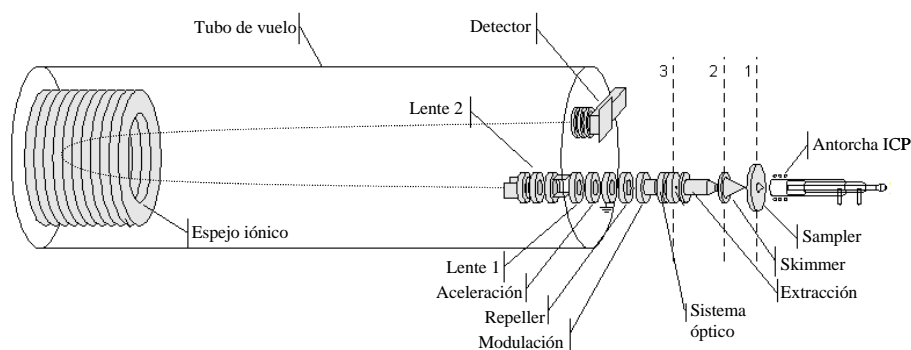


Figura II.6. Esquema del sistema ICP-TOFMS on-axis

favorecido por el prevacío existente en esta primera cámara ($P=2-3$ Torr). La parte central de este aerosol pasa por el orificio del segundo cono o “skimmer”, situado a varios mm del cono de muestreo y cuyo orificio central de 0.5-0.9 mm de diámetro se alinea con el cono de muestreo. El paso de los iones a través de los conos se produce a gran velocidad debido al efecto del alto gradiente de vacío creado por la siguiente cámara ($P=1 \times 10^{-3}$ Torr). Después del skimmer hay otro orificio, que permite la entrada de los iones en el espectrómetro de masas TOF propiamente dicho, con una última disminución de la presión ($P= 1 \times 10^{-6}$ Torr). Aunque el sistema de conos no restringe en forma alguna el paso de electrones o átomos neutros hasta el detector, los cationes pueden ser dirigidos en la dirección

del último orificio empleando un sistema óptico basado en la aplicación de potenciales distintos a los conos y a dos lentes incluidas en el instrumento con este propósito, de manera que los cationes son acelerados hacia el tercer orificio, que está sometido al mismo potencial que las lentes.⁸

El segundo paso consiste en extraer paquetes concretos de iones de la corriente continua que atraviesa el orificio de la tercera cámara. La modulación de la corriente puede realizarse de diversas formas, pero en este caso se emplea una geometría llamada “on-axis”. El sistema consiste en un cilindro al que se aplica un potencial negativo para retener los iones de la corriente continua que llega del plasma. Cuando se ha recogido un paquete de 1.5 cm de longitud, el potencial cambia de signo, de manera que el resto de los cationes son rechazados.

El paquete de iones seleccionados por el modulador se dirigen al electrodo de repulsión (“repeller”). En este electrodo se aplica un potencial positivo que se mantiene durante 1 μ s, impulsando a los cationes hacia el tubo de vuelo y comunicándoles la energía cinética final. Tras la aceleración, los iones pasan a través de un sistema óptico de lentes cuyo objetivo es enfocar y dirigir los iones hacia el detector, para aumentar en lo posible la transmisión de iones a lo largo del tubo de vuelo.

Uno de los problemas que impedía el uso extensivo del analizador de tiempo de vuelo a pesar de ser uno de los primeros espectrómetros desarrollados era la falta de resolución, debida principalmente a la falta de diferencias significativas en las velocidades de vuelo y a la dispersión en energías de los iones formados en la fuente. Estos problemas se solucionan en gran medida utilizando un dispositivo conocido como “reflectrón” o espejo iónico. Está constituido por una serie de lentes planas con diferentes voltajes, formando un campo reflectante, de manera que los iones son enviados de vuelta para encontrarse en su trayectoria con el detector. Además de duplicar la longitud del tubo de vuelo, se consigue reducir la dispersión energética, ya que los iones con mayor energía penetran en mayor profundidad en el espejo iónico, consumen más tiempo en regresar hacia el detector, y se unen a los iones con menor energía cinética. De esta manera, la dispersión disminuye notablemente y los iones alcanzan el detector simultáneamente. Por otra parte, los fotones y las especies neutras no son reflejadas, de manera que se evita que lleguen al detector donde contribuirían a aumentar el ruido de fondo del instrumento.

II.6. OTRA INSTRUMENTACIÓN

La caracterización del derivado dietilditiocarbámico del fullereno C_{60} sintetizado en el curso de los estudios descritos en la presente Memoria (apartado VI.1) ha implicado el manejo de diversos equipos, así como la interpretación de los datos obtenidos. La evolución de la reacción se monitorizó mediante el estudio de la variación con el tiempo del espectro UV-Visible de la mezcla. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro HP 8453 (Agilent Technology, Madrid, Spain).

La confirmación de que el producto final es efectivamente distinto de la simple mezcla de los reactivos iniciales viene dada por datos de difracción utilizando el método de polvo. Se empleó para ello un difractómetro Siemens D5000 (Siemens, Munich, Alemania) con fuente correspondiente a la radiación $K\alpha$ del Cu y monocromador de grafito.

Datos adicionales de resonancia magnética nuclear permiten la asignación de la estructura, junto con el análisis elemental suministrado por el Centro de Microanálisis Elemental de la Universidad Complutense de Madrid. Para la adquisición de los espectros de ^{13}C se utilizó un espectrómetro Bruker ACP-400 (Bruker, Madrid, Spain) a 4100 Hz, empleando la técnica de ángulo mágico (MAS).

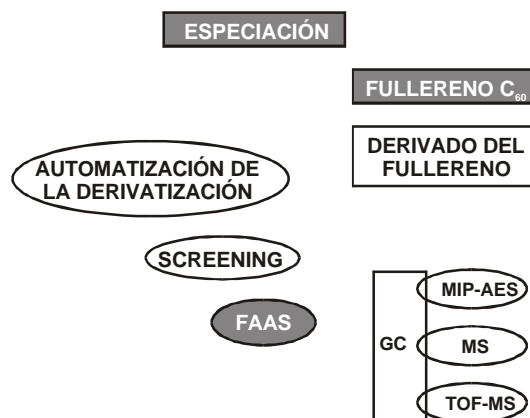
-
- 1 L. Esteban, La espectrometría de masas en imágenes, ACK Comunicación, 1993.
 - 2 W.M.A. Niessen, Current practice of gas chromatography-mass spectrometry, Marcel Dekker, Inc., New York, 2001.
 - 3 B. D. Quimby, J. J. Sullivan, Anal. Chem. 62 (1990) 1027.
 - 4 C.I.M. Beenakker, Spectrochim. Acta 32B (1977) 173.
 - 5 B. Rosenkranz, J. Bettmer, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 138.
 - 6 J.J. Sullivan, B.D. Quimby, Anal. Chem. 62 (1990) 1034.
 - 7 J.J. Laserna, D. Pérez Bedito, Temas avanzados de análisis químico, Edinford, Málaga, 1994.
 - 8 Manual del software Renaissance, LECO Corp., St. Joseph, MI, USA, 1998.



Capítulo III

Especiación Mediante FAAS

Chapter **III** Speciation by FAAS



El análisis de la especiación ha despertado el interés de la comunidad científica en los últimos años debido a la trascendencia de la información que suministra. Sin embargo, las bajas concentraciones de los analitos de interés suelen imponer el empleo de largos y tediosos tratamientos de muestra, así como el uso de sofisticados sistemas de detección. En esta Memoria, se demuestra la eficacia del fullereno C_{60} como material sorbente para la preconcentración de especies metálicas en forma de compuestos orgánicos neutros, mostrando una gran selectividad frente a otros componentes de la matriz.

El presente Capítulo consta de dos apartados que tienen en común la discriminación entre especies de la misma familia, la preconcentración y clean-up sobre una columna de fullereno C_{60} y la detección de los analitos mediante espectrometría de absorción atómica con atomización por llama (FAAS), como puede verse en el esquema orientativo. En el primer apartado (III.1), se aborda el análisis de la especiación de plomo inorgánico y compuestos trialkylplomados en muestras acuosas por FAAS, tras una etapa de preconcentración sobre una columna de C_{60} . En el segundo apartado (III.2), se plantea la discriminación entre fungicidas ditiocarbámicos en función del metal que contienen. Al igual que en el apartado anterior, la retención de los analitos en C_{60} permite su determinación por FAAS.



Speciation of inorganic lead and trialkyllead compounds by flame atomic absorption spectrometry following continuous selective preconcentration from aqueous solutions

Josefa R. Baena, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel

Analytical Chemistry Division, Faculty of Sciences, University of Córdoba, E-14004 Córdoba, Spain

Abstract

A new method for the speciation of inorganic lead and trialkyllead compounds involving the selective separation of the analytes in a continuous system and their subsequent introduction into a flame atomic absorption spectrometer was developed. The proposed flow system consists of two units. In the first unit, total inorganic lead at concentrations from 8 to 200 ng/mL is continuously precipitated as lead chromate and the filtrate, containing trialkyllead cations, is collected in a vessel, the precipitate then being dissolved in diluted acid and driven to the instrument. In the second unit, trimethyllead (TML⁺) and triethyllead (TEL⁺) cations at ng/mL levels are complexed with sodium diethyldithiocarbamate and retained on a C₆₀ pre-conditioned fullerene column; the mixture of both species was resolved by conditioning the sorbent column with *n*-hexane or isobutyl methyl ketone solvents. Detection limits of 1-2 ng/mL can be achieved by using a sample volume of 50 mL. Special attention was given to the reliability and robustness of the global flow injection method in assessing its applicability to both types of organolead compounds and inorganic lead present in different proportions. Trimethyllead provides the poorest results as consequence of its low adsorption constant on C₆₀; however, the three different types of species (Pb²⁺ /TML⁺ /TEL⁺) can be effectively determined in proportions from 1:1:1 to 30:12:1 with relative errors less than 10%.

1. Introduction

The speciation of elements discharged into the atmosphere plays a prominent role in their long-range transport over the globe and on their eventual pollution of remote environments.^{1,2} Environmental contamination of lead is widespread; the main anthropogenic source of this element is burning of leaded gasoline.³ Vehicular emissions of tetraalkyllead undergo atmospheric breakdown to trialkyllead and dialkyllead, all three forms being scavenged from the atmosphere by rainfall. As a result, trimethyllead and triethyllead are frequently found in surface water and, recently, in polar snow.⁴ In response to the need for monitoring of these compounds, the BCR recently started to issue reference materials for trimethyllead content.⁵ The growing interest in speciation has reflected in the development of hyphenated analytical techniques to discriminate among different forms of an element.^{2,6} The speciation of organolead compounds has so far been performed by using gas or liquid chromatography (HPLC) for the separation of species, in combination with specific detection systems such as atomic absorption spectrometry

(AAS),^{7,8} inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES),⁹ microwave induced plasma atomic emission spectrometry (MIP-AES)¹⁰⁻¹³ and inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS).¹⁴⁻¹⁷ These techniques, however, are generally based on a combination of different sample preparation steps including extraction and derivatization, as well as microwave assisted purge-and-trap procedures.⁶ Without a hyphenated chromatographic technique, speciation is next to impossible. In fact, there is only one solid-phase extraction method for discriminating tetraalkyl-lead from the combination of inorganic lead and organolead species by FAAS.¹⁸ Different materials, including chelating sorbents and resins, and eluents were assayed and functionalised cellulose sorbent was found to provide the best dynamic characteristics; thus, tetraethyllead was eluted with ethanol whereas inorganic lead, and methyllead and ethyllead compounds, were only eluted with 1 mol/L nitric acid.

The analytical potential of C₆₀ fullerene as a sorbent material for the preconcentration of metals was first demonstrated by Gallego *et al.*;¹⁹ subsequent experiments with C₆₀ and C₇₀

fullerenes in continuous systems showed both to be better sorbents for metal preconcentration than are conventional solid materials such as RP-C₁₈, activated carbon and resins.²⁰ In addition, better sensitivity and selectivity were obtained with neutral chelates than with ion-pairs.^{20,21} In separate studies, Abraham *et al.*^{22,23} demonstrated for the first time the potential of fullerene for the adsorption of organic vapours. More recently, adsorption of these compounds on fullerene has also been studied using a piezoelectric crystal detection system.²⁴

In this paper an alternative approach to inorganic lead and trialkyllead speciation was studied in which chromatographic techniques were avoided and only a flame atomic absorption spectrometer for measurements was employed. For this purpose, trialkyllead diethyldithio-carbamates were adsorbed on C₆₀ fullerene. The selectivity of the sorbent is related with its conditioning, using different solvents, before the chelate adsorption. The effect of inorganic lead was evaluated and its speciation from organolead compounds required precipitation and filtration as inorganic salt; organolead compounds are determined in the filtrate solution and inorganic lead by dissolving the precipitate.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

A Perkin-Elmer (Überlingen, Germany) Model 380 atomic absorption spectrometer equipped with a bead impact system in the burner chamber and without background correction was used throughout. The instrument output was connected to a Radiometer REC-80 Servograph recorder. The hollow cathode lamp for lead was operated at 10 mA, with a spectral slit width of 0.2 nm, to isolate the 283.3nm resonance line. The air-acetylene flame was adjusted to obtain a clean blue flame.

The flow system used for the precipitation of inorganic lead and speciation of organolead compounds consisted of two Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-2 peristaltic pumps furnished with poly (vinyl chloride) pumping tubes, five Rheodyne (Cotati, CA, USA) 5041 injection valves -three were adapted as switching valves- and PTFE tubing of 0.5 mm id for coils. A Scientific System 0.5-105 column with a removable screen-type stainless steel filter (pore size 0.5 µm, chamber inner volume 580 µl, and filtration area 3 cm²), which was originally designed as a cleaning device for HPLC, was employed for filtration purposes. Two

custom-made sorption columns packed with 80 and 160 mg of C₆₀ fullerene were also employed. The columns were made from PTFE capillaries of 3 mm id and sealed on both ends with small cotton wool beds to prevent material losses.

2.2. Reagent and standard solutions

The chemicals used as analyte standards and reagents were reagent-grade or better. C₆₀ fullerene (> 99.4 %) was obtained from Hoechst (Frankfurt, am-Main, Germany). Ammonium pyrrolidini-dithiocarbamate (APDC), sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC), triethyllead (TEL⁺) chloride, tri-butyllead (TBL⁺) acetate, tri-pentyl-lead (TPL⁺) acetate, tri-phenyllead (TPhL⁺) chloride and tetraethyllead (TeEL) were all supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Trimethyllead (TML⁺) acetate was purchased from Alfa (Barcelona, Spain). Sodium dodecylsulphate (SDS), lead nitrate and potassium chromate were supplied by Merck (Madrid, Spain). All solvents used [methanol, ethanol, acetone, acetonitrile, *n*-hexane, ethyl acetate and iso-butyl methyl ketone (IBMK)] were obtained from Romil Chemical

(Loughborough, England).

A 1000 mg/L lead standard solution was prepared by dissolving 1.598 g of lead nitrate in 1 l of 1% v/v nitric acid. Organolead standard solutions at metal concentrations of 0.5 mg/mL were prepared as follows: TBL⁺, TPL⁺ and TeEL were dissolved in ethanol and the last stored below 0° C; TML⁺ and TEL⁺ solutions were made by dissolving appropriate amounts of the respective alkyllead salts in 1 mL of glacial acetic acid (100%) and diluting to 25 mL with water; standard solutions (0.2 mg/mL as Pb) of TPhL⁺ were made in acetonitrile. Standards were always stored in the dark. Dilute standards of each organolead compound and their mixtures were prepared on a daily basis by dissolving the stock standards in ultrapure (Milli-Q) water. Individual aqueous solutions (3×10⁻³ mol/L) of APDC, SDS and NaDDC (which remained stable for 3 days) were also prepared.

2.3. Procedures

2.3.1. Separation of inorganic lead from trialkyllead compounds. Determination of Pb²⁺

III.1 Speciation of inorganic lead and trialkyllead compounds by FAAS following continuous selective preconcentration from aqueous solutions

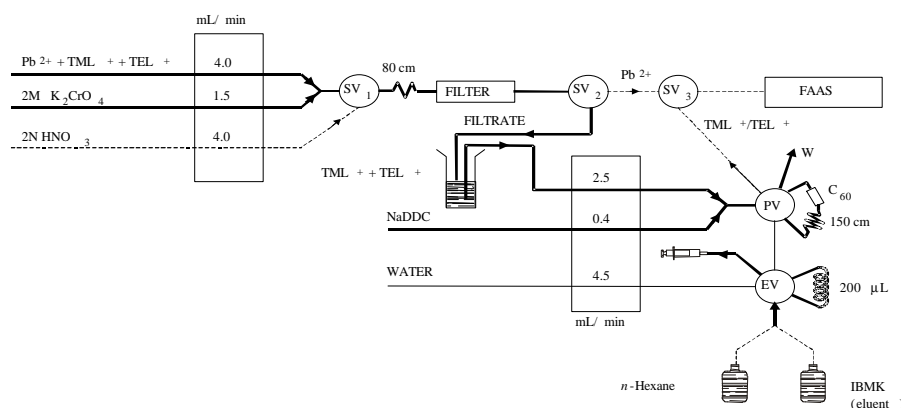


Figure 1
FI manifold for the speciation of Pb^{2+} , trimethyllead (TML^+) and triethyllead (TEL^+) compounds. Bold lines are those relevant to the individual steps of Pb^{2+} precipitation and TML^+ and TEL^+ sorption on C_{60} . SV, PV, and EV denote switching, preconcentration and elution valves, respectively; W, waste; NaDDC, sodium diethyldithiocarbamate; IBMK, isobutyl methyl ketone; FAAS, flame atomic absorption spectrometer.

The manifold used is illustrated at the top of Fig. 1. A 5 mL volume of aqueous sample containing Pb^{2+} (100–1500 ng/mL) and trialkyllead (TML^+ and TEL^+) compounds was continuously pumped into the system and mixed with the precipitating reagent solution (2 mol/L K_2CrO_4). PbCrO_4 was precipitated in the 80 cm coil and retained on the stainless-steel filter, inorganic lead thus being isolated from the organic lead compounds. The solution containing the organic compounds and excess precipitating reagent (filtrate fraction, ca. 7 mL), carried by air, was collected in a vessel for fur-

ther speciation and determination. The determination of Pb^{2+} was performed by dissolving the precipitate in a stream of 2 mol/L nitric acid and driving it to the spectrometer for measurement. The peak height of the signal yielded by dissolved lead was proportional to its concentration in the sample.

2.3.2. Speciation of trialkyllead compounds

The filtrate fraction (ca. 7 mL) containing TML^+ and TEL^+ , was inserted into the sorbent system to resolve the mixture as shown in Fig.1. In

the preconcentration step, the filtrate, containing TML^+ (30-600 ng/mL as Pb) and TEL^+ (20-300 ng/mL as Pb), was continuously pumped at 2.5 mL/min through the system and mixed with the chelating reagent (3×10^{-3} mol/L NaDDC). Chelates formed in the reaction coil (150 cm long) were then retained on the sorbent C_{60} column (80 mg) located in the loop of the preconcentration valve (PV) while the sample matrix (containing excess precipitating reagent) was sent to waste. In this step, a water carrier was pumped at 4.5 mL/min to the instrument in order to flush the nebuliser after each measurement, and the loop of the elution valve (EV) was filled with eluent (IBMK) or the conditioning solvent (*n*-hexane, IBMK) by means of a syringe. In the elution step, both injection valves were switched simultaneously to inject 200 μl of IBMK into the aqueous carrier and pass them through the sorbent column, so that the chelates would be desorbed and transferred to the detector. Peak height was used as analytical measurement and a blank consisting of 200 μl of IBMK ($A = 0.030$ units) was also used.

The mixture of species was resolved by conditioning the C_{60} column with different solvents. Thus, by passing 600 μl of *n*-hexane (three sequen-

tial injections of 200 μl) through the column prior to preconcentrating the filtrate fraction, TML^+ and TEL^+ chelates were quantitatively retained, so the signal was proportional to the concentration of both organolead compounds. Only TEL^+ was adsorbed, and the signal was directly proportional to its concentration in the sample, when the column was conditioned with 600 μl of IBMK. TML^+ was determined by the difference between the analytical signals obtained in both steps. Because determining both organolead compounds involves using two filtrate portions, two sequential precipitations of inorganic lead are obviously required to obtain them. Moreover, by using 50 mL of sample volume the sensitivity of the method increases ten times, so Pb^{2+} , TML^+ and TEL^+ can be determined at few ng/mL levels (*viz.* 3-10 ng/mL).

3. Results and discussion

3.1. Adsorption-elution of organolead compounds on fullerene

A previous study showed that the best performance of fullerenes as sorbent materials for metal ions was obtained with neutral chelates.^{20,21} In order to test C_{60} fullerene for the

preconcentration of organolead compounds, a new adsorption study was conducted in the presence and absence of chelating agents. For this purpose, standards of each organolead compound (TML⁺, TEL⁺, TBL⁺, TPL⁺, TPhL⁺ and TeEL) containing 3 µg/mL as Pb, at different pH values (1-6), were prepared. Each solution was passed through a fullerene column (80 mg of C₆₀) at 3 mL/min and the atomic signal for lead was recorded before and after the sorbent column. As expected, no adsorption took place for trialkyllead cations, and only tetraethyllead (TeEL) was slightly retained (*ca.* 10%), as a result of its neutral character. TeEL was discarded for further experiments owing to its low adsorption. Obtainment of neutral trialkyllead compounds was assayed by ion-pair and chelate formation. Sodium dodecylsulphate (SDS) was added as counterion for trialkyllead cations at concentrations of 3×10⁻³ mol/L to the aqueous standards, and

the previous adsorption study was repeated. Only trialkyllead-SDS ion-pairs, with bulkier alkyl groups, were retained (*ca.* 30-40%) on C₆₀ throughout pH range studied (1-6) for TBL⁺ and TPL⁺; and only above pH 5 for TPhL⁺. The differential behaviour of trialkyl and triaryllead compounds can be ascribed to protonation in organolead with aryl groups prevailing over ion-pair formation at low pH values. As the sorption efficiency was lower in all instances, the chelating reagents most frequently used with FAAS technique, APDC and NaDDC (at 3×10⁻³ mol/L), were tested for organolead preconcentration. As expected, all organolead compounds formed chelates with both reagents; the TML⁺ chelate, however, was only slightly adsorbed. Adsorption increased with increasing length of the carbon chain in the trialkyllead compound, probably as result of the alkyl group contributing to retaining the chelate.

Once the sorption of organolead species on C_{60} was confirmed not to be selective, their discrimination would obviously require using selective elution. For this purpose, a previously reported simple FI system²¹ similar to that at the bottom of Fig. 1 was used; APDC and NaDDC as chelating reagents, and organic solvents of variable polarity as eluents, were also employed. Organolead compounds were prepared at concentrations of 200 ng/mL in aqueous media (pH *ca.* 5) taking into account the preconcentration ratio required, and 200 μ l of eluent were carried by water. Because the Pb-PDC chelate is completely adsorbed on C_{60} and eluted with IBMK,¹⁹ the elution efficiency was calculated by assuming 100% recovery of the chelate of inorganic lead with APDC or NaDDC for each eluent tested; in

this way, the effect of dispersion (for water miscible solvents) was cancelled. However, the Pb-PDC chelate is not eluted by *n*-hexane, so the elution efficiency with this solvent was calculated by assigning 100% efficiency to the TEL-PDC chelate. Table 1 shows the elution efficiency for the five trialkyllead compounds with different eluents. In all instances, the column was conditioned with the organic solvent used as eluent. The most relevant conclusions from these results are as follows: (i) acetonitrile was the water-miscible eluent that provided the worst results; the elution efficiency was higher than 100% for TEL⁺, TPL⁺ and TPhL⁺ (generally with APDC as chelating reagent) and methanol or acetone as eluent, probably because of the increased solubility of these organolead chelates relative to the inor-

Table 1
Elution efficiency (%) for organolead-PDC/DDC chelates after sorption on C_{60} , calculated with respect to the inorganic lead chelate (by exception, those values denoted with superscript^a are relative to DEL-PDC).

Organolead chelate	Acetonitrile	Methanol	Acetone	IBMK	Ethyl acetate	n-Hexane
TML-DDC	10	10	20	0	0	138
TML-PDC	12	20	18	35	9	28 ^a
DEL-DDC	100	89	147	118	36	214
DEL-PDC	37	156	88	135	97	100 ^a
TBL-DDC	53	50	73	38	17	0
TBL-PDC	49	100	35	65	25	20 ^a
TPL-DDC	58	47	80	60	50	38 ^a
TPL-PDC	51	156	53	55	33	22 ^a
TPhL-DDC	62	68	63	45	28	41 ^a
TPhL-PDC	82	211	147	100	64	41 ^a

Table 2
Overall sorbent extraction efficiency of TML-DDC chelate on different sorbents.

	C ₆₀	AC	RP-C ₁₈
IBMK	0	25	77
<i>n</i> -hexane	62	12	25
IBMK ^a	100	29	78

^a Sorbent column conditioned with *n*-hexane.

ganic chelate. (ii) Ethyl acetate was the worst among the water-immiscible eluents tested and IBMK the best, although *n*-hexane dissolved organolead-PDC chelates (28-100%) and no inorganic lead-PDC chelate (0%). (iii) No significant differences between both chelating reagents were observed as regards adsorption; there were, however, differences in elution, related to the type of eluent used; thus, NaDDC proved more selective than APDC for immiscible water eluents.

When using NaDDC as chelating agent, TML⁺ was eluted by *n*-hexane but not by IBMK; the opposite was true with TBL⁺; and TEL⁺, TPL⁺ and TPhL⁺ were eluted by both agents. Discriminating between them was thus impossible, so only TML⁺ and TEL⁺, the two most abundant organolead compounds in the environment,¹ were studied. TML-DDC was only adsorbed at concentrations in the ng/mL region when the column was condi-

tioned with *n*-hexane; once the chelate was retained, elution with *n*-hexane or IBMK was quantitative. Therefore, the speciation of TML-DDC and TEL-DDC was done, first by conditioning with *n*-hexane (TML⁺ and TEL⁺ were determined jointly), and second by conditioning with IBMK (only TEL⁺ was determined); IBMK was used as eluent in both cases because it provided higher sensitivity than *n*-hexane, probably because the atomisation efficiency of lead was higher in the IBMK medium. Finally, as TML⁺ was the alkyllead with lowest adsorption constant, the adsorption capacity of C₆₀ fullerene for TML-DDC was compared with those of RP-C₁₈ and activated carbon as sorbents by using columns packed with 80 mg of each in all instances. IBMK and *n*-hexane were used as eluents (200 µl) and conditioning solvents (500 µl). The results are given in Table 2. C₆₀ fullerene behaved differently from the

other two sorbents, since it requires conditioning with *n*-hexane before the aqueous TML-DDC chelate is adsorbed. This suggests some specific interaction between C₆₀ fullerene and *n*-hexane molecules. X-ray diffraction and IR spectra revealed the absence of faced-centred cubic (fcc) structure distortion and occlusion of *n*-hexane in octahedral and tetrahedral sites; the interaction must thus be in the form of physical retention of *n*-hexane by C₆₀ fullerene. This favours adsorption of the trialkyllead chelates, probably because *n*-hexane increases the hydrophobic character of C₆₀, thereby raising its adsorption capacity.

3.2. FI conditions for the separation of inorganic lead and the speciation of trimethyllead and triethyllead compounds

Real samples with significant amounts of TML⁺ and/or TEL⁺ also contain Pb²⁺ in excess.¹ The above experiments revealed that the Pb-DDC chelate was quantitatively eluted by IBMK and only partially by *n*-hexane, so it did not discriminate the organolead compounds. For this reason, lead separation was needed prior to the speciation/ determination of TML⁺-TEL⁺. Separation of inorganic lead from organoleads is usually ac-

complished by using aqueous EDTA to mask Pb²⁺, followed by addition of a reagent and an organic solvent to extract and preconcentrate the organolead compounds.^{1,5} On the other hand, Pb²⁺ can be determined as an EDTA complex at concentrations in the µg/mL region in aqueous phase according to the sensitivity of the FAAS technique; in addition, the separation of organoleads in highly dilute samples is not always quantitative.²⁵ In order to enhance the sensitivity and selectivity of the mixture resolution, a preconcentration system was developed for the selective precipitation of inorganic lead in the presence of organolead compounds (TML⁺ and TEL⁺).

The easiest procedure for lead precipitation at the ng/mL level as a basic salt in a continuous system,²⁶ was discarded as organo-lead compounds also precipitated with ammonia. Various precipitants for aqueous Pb²⁺ (potassium iodide, rubeanic acid and potassium chromate) were studied, and K₂CrO₄ was selected because it provided the highest signals for Pb²⁺ and negligible signals for organolead compounds. The precipitation/ dissolution system for the Pb²⁺ preconcentration/ determination by FAAS was optimised by using a FI system such as that depicted at the top of Fig. 1. After

the whole sample was aspirated, an air stream was inserted into the FI system to remove excess K_2CrO_4 , which would otherwise instabilise the flame during measurements. The most relevant parameters are listed in Table 3. The filter was cleaned with the reagent solution in an ultrasonic bath for 10 min each day.

The TML^+ and TEL^+ determinations were optimised in two sequential steps by using an FI system similar to that depicted at the bottom of Fig. 1. In the first step, the C_{60} fullerene column was conditioned with 500 μ l of *n*-hexane, which was followed by aspiration of 5 mL of aqueous standards containing 100 ng/mL TML^+ and TEL^+ and mixing with a stream of NaDDC so that both chelates would be adsorbed and subsequently eluted with IBMK. In the second step, the column was conditioned with 500 μ l of IBMK and the above experiment repeated; in this case, however, only TEL-DDC was adsorbed on C_{60} and then eluted with IBMK. TML^+ can be determined by the difference between the results obtained in both steps. The optimal parameter values for the speciation of both compounds are given in Table 3.

Table 3
Flow injection conditions for the speciation of inorganic lead and trialkyllead compounds.

	Optimum range	Selected value
<i>Inorganic lead variables</i>		
K ₂ CrO ₄ concentration (mol l ⁻¹)	1 – 2	2.0
HNO ₃ concentration (mol l ⁻¹)	> 1.5	2.0
Sample flow rate (ml min ⁻¹)	1 – 4	4.0
K ₂ CrO ₄ flow rate (ml min ⁻¹)	1 – 2	1.5
HNO ₃ flow rate (ml min ⁻¹)	> 3.5	4.0
<i>Trialkyllead variables</i>		
Sample pH	1 – 9	3.5
NaDDC concentration (mol l ⁻¹)	1×10 ⁻³ – 3×10 ⁻³	3×10 ⁻³
Sample flow rate (ml min ⁻¹)	0.5 – 3.0	2.5
NaDDC flow rate (ml min ⁻¹)	0.2 – 0.6	0.4
Reaction coil (cm)	100 – 350	200
Eluent volume (μl)	200	200

Table 4
Figures of merit for the speciation of Pb²⁺, TML⁺ and TEL⁺ using K₂CrO₄ or NaDDC as reagent.

Compound	Sample volume/(ml)	Regression equation ^a	Range/ (ng ml ⁻¹)	Det. limit/ (ng ml ⁻¹)	RSD/ (%)
Pb(II)	5	A= 0.001 + 1.4×10 ⁻⁴ X	100-1500	50	3.0
TEL(I) ^b	5	A= 0.002 + 4.5×10 ⁻⁴ X	25-400	12	2.5
TEL(I) ^c	5	A= 0.002 + 6.2×10 ⁻⁴ X	20-300	10	3.2
TML(I) ^c	5	A= 0.003 + 2.6×10 ⁻⁴ X	30-600	20	3.6
Pb(II)	50	A= -0.001 + 1.5×10 ⁻³ X	8-200	4	3.5
TEL(I) ^b	50	A= 0.002 + 4.2×10 ⁻³ X	4-40	2	3.2
TEL(I) ^c	50	A= 0.003 + 5.9×10 ⁻³ X	3-30	1	3.0
TML(I) ^c	50	A= 0.002 + 2.5×10 ⁻³ X	5-60	2	4.0

^a A, absorbance; X, lead concentration (ng ml⁻¹).

^b C₆₀ column conditioned with IBMK.

^c C₆₀ column conditioned with n-hexane.

3.3. Speciation of Pb^{2+} , trimethyllead and triethyllead compounds. Figures of merit

For the speciation of lead in an aqueous medium, the two FI systems previously used to preconcentrate organolead compounds on C_{60} fullerene and precipitate inorganic lead were coupled as in Fig. 1. Following precipitation of Pb^{2+} , the filtrate, containing all organolead compounds from 5 or 50 mL of sample, and excess K_2CrO_4 , was collected in a vessel and completely aspirated into the sorbent system; during this step, inorganic lead

was determined by connecting SV_2 and SV_3 to the spectrometer.

Several calibration graphs for each lead compound were constructed under the optimum conditions by using a sample volume of 5 or 50 mL and a column packed with 60 mg of C_{60} . Two calibrations with TEL^+ standards were done, using *n*-hexane and IBMK as conditioners. The calibration graphs exhibited excellent linearity over the concentration ranges studied, as reflected in the regression coefficients ($r = 0.999$ in all instances). As regards the data of Table 4, detection limits were calculated as three times the

Table 5
Analysis of various synthetic TML^+ / TEL^+ mixtures by sorption on C_{60} .

Conc. taken / (ng ml ⁻¹)		TML^+		TEL^+	
TML^+	TEL^+	Found ± sd / (ng ml ⁻¹)	Rel error / (%)	Found ± sd / (ng ml ⁻¹)	Rel error / (%)
100	100	101 ± 9	1.0	102 ± 8	2.0
100	200	102 ± 4	2.0	199 ± 4	-0.5
100	300	97 ± 6	-3.0	307 ± 6	2.3
75	300	72 ± 8	-4.0	309 ± 4	3.0
60	300	56 ± 7	-6.7	310 ± 4	3.3
50	300	45 ± 5	-10.0	308 ± 6	2.7
30	300	25 ± 4	-16.7	307 ± 6	2.3
50	50	53 ± 4	6.0	51 ± 4	2.0
100	50	101 ± 5	1.0	49 ± 3	-2.0
150	50	155 ± 6	3.3	49 ± 5	-2.0
200	50	197 ± 9	-1.5	51 ± 5	2.0
250	50	252 ± 10	0.8	47 ± 4	-6.0
300	50	295 ± 8	-1.7	51 ± 5	2.0
400	50	397 ± 10	-0.8	52 ± 6	4.0
500	50	485 ± 12	-3.0	52 ± 5	4.0
600	50	587 ± 14	-2.2	53 ± 6	6.0

standard deviation of the absorbance obtained for 20 blanks (200 μl of IBMK) for organolead compounds and in 20 determinations of the same standard (10 or 100 ng/mL) for inorganic lead. The precision of the method (expressed as the relative standard deviation) was checked on 11 standard solutions containing 100 or 15 ng/mL Pb^{2+} , TML^+ and TEL^+ (as lead) for 5 or 50 mL of sample, respectively.

3.4. Resolution of aqueous synthetic mixtures

The performance of the proposed adsorption method was initially assessed by resolving several synthetic mixtures of both alkyllead compounds; subsequently, the global FI method was applied to synthetic mixtures of the three lead species. The concentration of each organolead compound in these standard mixtures was determined from the difference in the absorbances obtained under the two sets of experimental conditions (by conditioning C_{60} with *n*-hexane or IBMK), by using a suitable calibration graph among those of Table 4. The concentrations found, their stan-

dard deviations, and the relative errors made in four replicate analyses of each aqueous sample are shown in Table 5. As can be seen, with TEL^+ concentrations higher than those of TML^+ , good results were obtained up to a 1:6 ratio. The errors were negative for TML^+ as a result of the lower adsorption constant of the TML-DDC chelate; hence, TML-DDC was not retained on the column at high TEL^+ concentrations. The aqueous standards of the three lead species were prepared at three constant $\text{TML}^+ : \text{TEL}^+$ ratios (*viz.* 1:1, 12:1 and 1:3), using increasing Pb^{2+} concentrations up to the highest within the linear range. The results (see Table 6) were satisfactory for inorganic lead; however, above 1000 ng/mL Pb^{2+} the PbCrO_4 precipitate probably acts as a scavenger and the organolead compounds were partially adsorbed on it. As can be seen, the proposed FI method allows the resolution of Pb^{2+} - TML^+ - TEL^+ mixtures in proportions from 1:1:1 to 30:12:1 with relative errors less than 10%. These results are quite favourable and testify to the goodness of the method.

Table 6
Analysis of various synthetic mixtures of Pb²⁺/TML⁺/TEL⁺ using the global FI method.

Conc. taken / (ng ml ⁻¹)			Pb ²⁺		TML ⁺		TEL ⁺	
Pb ²⁺	TML ⁺	TEL ⁺	Found ± sd / (ng ml ⁻¹)	Rel error/ (%)	Found ± sd / (ng ml ⁻¹)	Rel error/ (%)	Found ± sd / (ng ml ⁻¹)	Rel error/ (%)
100	100	100	101 ± 4	1.0	99 ± 12	-1.0	101 ± 7	1.0
100	600	50	103 ± 4	3.0	590 ± 14	-1.7	52 ± 6	4.0
100	100	300	99 ± 7	-1.0	97 ± 8	-3.0	305 ± 7	1.7
300	100	100	298 ± 10	-0.7	101 ± 9	1.0	101 ± 6	1.0
300	600	50	301 ± 7	1.2	585 ± 12	-2.5	51 ± 5	2.0
300	100	300	303 ± 9	3.4	102 ± 8	2.0	307 ± 9	2.3
500	100	100	503 ± 9	0.6	99 ± 7	-1.0	102 ± 10	2.0
500	600	50	507 ± 11	1.4	587 ± 16	-2.2	49 ± 5	-2.0
500	100	300	515 ± 8	3.0	102 ± 8	2.0	304 ± 8	1.3
1000	100	100	1007 ± 7	0.7	91 ± 10	-9.0	98 ± 8	-2.0
1000	600	50	1012 ± 10	1.2	583 ± 12	-2.8	47 ± 4	-6.0
1000	100	300	1034 ± 6	3.4	88 ± 9	-12.0	297 ± 9	-1.0
1500	100	100	1510 ± 8	0.7	84 ± 9	-16.0	96 ± 10	-4.0
1500	600	50	1523 ± 7	1.5	578 ± 13	-3.7	45 ± 6	-10.0
1500	100	300	1537 ± 10	2.5	80 ± 10	-20.0	292 ± 12	-2.7

4. Conclusions

Speciation analyses involve both long sample preparation times and expensive equipment (*viz.* chromatographs, atomic instruments) that calls for skilled operators. In addition, governmental and industrial quality control laboratories require that procedures be simplified, analyst skill levels lowered and sample throughput raised in order to reduce allocated time per use of expensive analytical instrumentation.⁶ The proposed method is fully compliant with these requirements;

thus, it involves minimal sample preparation, and low solvent and reagent consumption, and requires no expensive instruments. The lower sensitivity achieved for inorganic lead is an advantage as its concentration in environmental samples is typically several orders of magnitude greater than those of ionic alkyllead compounds.⁸ Finally, fullerene possesses a high potential for preconcentrating trialkyllead compounds in the form of chelates, and is superior to conventional solid materials in this respect, consistent with the above described

experiments for Pb^{2+} .¹⁹

Acknowledgements

This work was supported by grant PB95-0977 from Spain's DIGI-CyT.

REFERENCES

- [1] R. Lobinski, *Analyst* 120 (1995) 615-621.
- [2] J. Szpunar, V.O. Schmitt, O.F.X. Donard, R. Lobinski, *Trends Anal. Chem.* 15 (1996) 181-187.
- [3] R.J.C. van Cleuvenbergen, F.C. Adams, in *Handbook of Environmental Chemistry*, O. Hutzinger (Ed.), Springer Verlag, Berlín, 1990, p. 97.
- [4] F.C. Adams, M. Heisterkamp, J.P. Candelone, F. Laturmus, K. van de Velde, C.F. Boutron, *Analyst* 123 (1998) 767-772.
- [5] Ph. Quevauviller, L. Ebdon, R.M. Harrison, Y. Wang, *Analyst* 123 (1998) 971-976.
- [6] R. Lobinski, I. Rodríguez Pereiro, H. Chassaigne, A. Wasik, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.* 13 (1998) 859-867.
- [7] J.S. Blais, W.D. Marshall, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 271-277.
- [8] J.S. Blais, W.D. Marshall, *J. Anal. At. Spectrom.* 4 (1989) 641-645.
- [9] M. Ibrahim, T.W. Gilbert, J.A. Caruso, *J. Chromatogr. Sci.* 22 (1984) 111-115.
- [10] M. Paneli, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, M. Ceulemans, F.C. Adams, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 357 (1997) 756-762.
- [11] I.R. Pereiro, R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1381-1385.
- [12] I.R. Pereiro, A. Wasik, R. Lobinski, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 359-370.
- [13] M. Heisterkamp, F.C. Adams, *Fresenius' J. Anal. Chem.* 362 (1998) 489-493.
- [14] M. Heisterkamp, T. Desmaele, J.P. Candelone, L. Moens, R. Dams, F.C. Adams *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 1077-1081.
- [15] L. Moens, T. Desmaele, R. Dams, P. van den Broeck, P. Sandra, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1604-1611.
- [16] L. Ebdon, S.J. Hill, C. Rivas, *Spectrochim. Acta Part B*, 53 (1998) 289-297.
- [17] T. Desmaele, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. van der Eycken, J. van Dyck, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 99-106.
- [18] A.M. Naghmush, K. Pyrzynska, M. Trojanowicz, *Talanta* 42 (1995) 851-860.
- [19] M. Gallego, Y. Petit de Peña, M. Valcárcel *Anal. Chem.* 66 (1994) 4074-4078.

- [20] Y. Petit de Peña, M. Gallego, M. Valcárcel, *Anal. Chem.* 67 (1995) 2524–2529.
- [21] Y. Petit de Peña, M. Gallego, M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.* 12 (1997) 453–457.
- [22] M.H. Abraham, C.M. Du, J.W. Grate, R.A. McGill, W.J. Shuely, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1993) 1863-1864.
- [23] J.W. Grate, M.H. Abraham, C.M. Du, R.A. McGill, W.J. Shuely, *Langmuir* 11 (1995) 2125–2130.
- [24] Y.C. Chao, J.S. Shih, Adsorption study of organic molecules on fullerene with piezoelectric crystal detection system. *Anal. Chim. Acta* 374 (1998) 39–46.
- [25] R. Lobinski, C.F. Boutron, J.P. Candelone, S. Hong, J. Szpunar-Lobinska, F.C. Adams, *Anal. Chem.* 65 (1993) 2510–2515.
- [26] P. Martínez-Jiménez, M. Gallego, M. Valcárcel, *Analyst* 112 (1987) 1233–1236.

Group speciation of metal dithiocarbamates by sorption on C₆₀ fullerene

Josefa R. Baena, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel*

*Analytical Chemistry Division, Faculty of Sciences, University of Córdoba,
E-14004, Córdoba, Spain*

THE
ANALYST

A simple flow injection system for the on-line preconcentration of metal dithiocarbamates (fungicides) by sorption on a C₆₀ fullerene column was developed. Neither the acid hydrolysis needed by the conventional method to release CS₂ nor derivatization is required as the fungicides are directly retained on the sorbent column and subsequently then eluted from it with dilute HNO₃. The eluted fraction is directly fed into a flame atomic absorption spectrometer. Group speciation can be done according to the metals present in the dithiocarbamate (*viz.*, dithiocarbamates of Zn²⁺, Mn²⁺, or Fe³⁺) but no within-group discrimination is possible (ziram, zineb and propineb provide a global response). The analytical figures of merit of the proposed method are as follows: limits of detection (3σ) from 1 to 5 ng/mL, precision (RSD) *ca.* 2.5%; and preconcentration factor 45 (using 10 mL of sample). No interference from metals such as Zn, Mn or Fe, as inorganic salts, was observed. The method was applied to the resolution of synthetic mixtures as well as to the speciation/determination of ziram, maneb and ferbam in spiked grain samples, all with quite acceptable recoveries.

1. Introduction

Dithiocarbamates are widely used as fungicides in agriculture, and as vulcanization accelerators and antioxidants in the rubber industry. These fungicides are toxic to the liver and were recently found to be carcinogenic in a pathological study which revealed that their toxicity is enhanced through formation of metal complexes.¹ Residues of these compounds in foodstuffs and in the environment also pose a serious threat to public health. Most determinations of dithiocarbamates are based on Clark's method,² which involves their decomposition to carbon disulphide (CS_2) in an acidic medium, followed by titrimetry, spectrophotometry,³ head space gas chromatography⁴ or differential pulse-polarography,⁵ among others, of the CS_2 evolved. However, most of these methods are non-specific as all dithiocarbamates (*e.g.* ziram, zineb, ferbam, maneb, nabam) yield CS_2 . Diethyldithiocarbamates (DDCs) have been determined by spectrophotometry at the $\mu\text{g/mL}$ levels,⁶⁻⁸ by using bioenzymic sensors with amperometric detection at the ng/mL levels;^{9,10} adsorptive stripping voltammetry¹¹ and flame atomic absorption spectrometry (FAAS)¹² have also been used for this

purpose. In the last work, DDCs were continuously extracted into isobutyl methyl ketone following complexation with excess copper (II), the metal being determined by FAAS. This method is scarcely selective; thus, it only provides the total dithiocarbamate content in the sample, so no discrimination between DDC families is possible. As a result, it cannot be used for speciation, but only as a screening procedure.

Solids in flow systems coupled on-line to atomic spectroscopic instruments are gaining increasing interest because they can help dramatically improve, simplify and automate the preliminary operations of the analytical process.¹³ In this context, a survey of available literature may give the impression that innovation in such a widely explored field is virtually impossible.¹⁴ However, our group recently demonstrated new ways for advancement based on the use of new materials such as fullerenes. The adsorptive potential of C_{60} and C_{70} fullerenes for the preconcentration of trace metals from aqueous solutions was examined using the formation of neutral chelates¹⁵ and ion-pairs.¹⁶ The best analytical results were obtained with neutral chelates; also, the adsorption constant was dramatically increased for dithiocarbamate reagents

(*viz.* APDC) relative to others.¹⁷ More recently, a simple, novel screening/speciation method for lead compounds in water was reported.¹⁸

According to IUPAC,¹⁹ speciation analysis is the process leading to the identification and determination of the different chemical and physical forms of an element existing in a sample. In practice, this term also includes the characterization of groups of compounds exhibiting a similar response to a methodical operation (operationally defined speciation), as well as compounds that have the same biological impact or function within the organism (functionally defined speciation).²⁰⁻²³ Chemical speciation²⁴ includes various types of analysis, namely: (i) screening speciation, which leads to the search for and determination of one definite analyte; (ii) group speciation, which focuses on the determination of groups or classes of chemical species at the specific oxidation level; (iii) distribution speciation, which is connected with analyses of biological samples; and (iv) individual speciation, which entails the search for and determination of all chemical species existing in a sample.

This paper reports a simple flow injection (FI) system for the group speciation of dithiocarbamate fungicides containing different metals (*viz.* Zn²⁺, Mn²⁺ and Fe³⁺). The fungicides

are preconcentrated onto a C₆₀ sorbent column and then driven to a flame AAS. Each fungicide group is speciated according to the particular metal present in the dithiocarbamates. Fungicides containing the same metal give a global response that precludes their individual determination. Unlike CS₂ based methods, which are non-specific, the proposed method affords discrimination among carbamates of different metals. In addition, the FI method is quite selective as cations, anions and a large number of organic compounds pass through the fullerene column with negligible retention.

2. Experimental

2.1. Apparatus

A Perkin-Elmer 380 atomic absorption spectrometer equipped with a bead impact system in the burner chamber and with an air-acetylene flame was used for Zn, Fe and Mn determinations. The hollow cathode lamps used were operated at the recommended currents, and the Zn, Fe and Mn absorption lines at 213.9, 248.3 and 279.5 nm, respectively, were used. A monochromator band-pass of 0.2 nm was employed for all metals; deuterium arc background

correction was used for zinc measurements only. The acetylene flow rate was 1.5 L/min and an air flow rate of 15.5 L/min was employed to ensure a clean blue flame. The instrument output was connected to a Radiometer REC-80 Servograph recorder.

A simple FI manifold was used throughout the study. It was assembled from a six-port injection valve (Rheodyne 5041, Cotati, CA, USA) with a laboratory-made adsorption column inserted into the sample loop, and from poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) tubes of 0.5 mm id. Solutions were delivered by a peristaltic pump (Gilson Minipuls 2, Villiers-le-Bel, France) furnished with poly(vinyl chloride) pumping tubes. A PTFE filter (Omnifit 3303, Madrid, Spain) was modified by using circular channels on both ends in order to increase the chamber inner volume up to 100 µl and the filtration area to 3 cm²; the filter was furnished with PTFE disks of 1 µm (Millipore, Seville, Spain). The column (1.7 cm in length and 3 mm id), containing 80 mg of C₆₀, was made from a PTFE capillary and sealed with a small glass-wool bead to prevent material losses.

2.2. Reagents and standards

C₆₀ fullerene (> 99.4%) was purchased from Hoechst (Frankfurt, am-

Main, Germany). All other reagents and solvents were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). The following dithiocarbamate fungicides, Pestanal quality, were used: ziram, zineb, propineb, mancozeb, maneb and ferbam, all of which were obtained from Riedel-de Haën (Seelze, Germany).

Stock solutions, at concentrations of 50–100 µg/mL, were prepared by dissolution of each carbamate in the appropriate solvent (*viz.* acetonitrile, for ziram and ferbam; dimethylsulfoxide for zineb and propineb; and ultrapure water for maneb and mancozeb). All solutions were stored at 4°C in the dark. Dilute standards were prepared on a daily basis by dilution of the stock solutions with ultrapure (Milli-Q) water.

2.3. Sample preparation

Grain samples from various Spanish locations were ground in a metal rolling mill to obtain flours that were prepared as follows: an accurately weighed amount of 5/10 g was extracted with 5/10 mL of chloroform in a separating funnel. The mixture was shaken gently for 5 min and then filtered through glass-wool in vacuum. The filtered organic phase was transferred to a glass tube and evaporated under an N₂ stream. The residue was

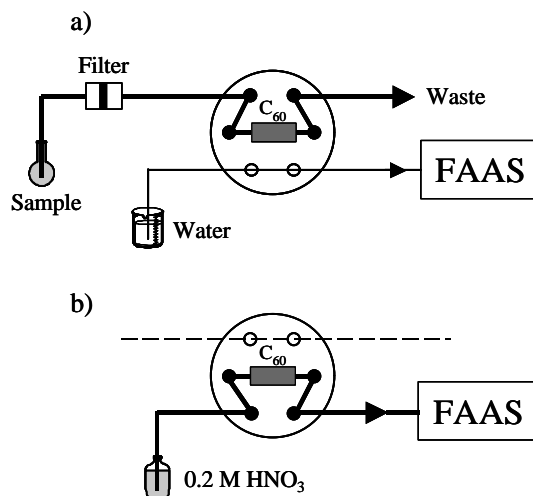


Figure 1

Flow injection manifold for group speciation of metal dithiocarbamates. (a) and (b), preconcentration and elution step, respectively. Sample and eluent (0.2 mol/L HNO_3) flow rates, 3 and 5 mL/min, respectively. FAAS = flame atomic absorption spectrometer.

dissolved in 0.3 mL of acetonitrile and made up to 10 mL with ultrapure water. Each sample was immediately analysed upon preparation by inserting it into the manifold of Fig. 1.

2.4. Preconcentration procedure

The continuous preconcentration and elution system used is shown in Fig. 1. In the preconcentration step, a volume of 10 mL of standard or treated sample, containing 30-3500 ng of metal dithiocarbamates at pH 5.0-6.5, was continuously passed at 3 mL/min through a filter in order to avoid clogging the sorbent column. All

dithiocarbamates were adsorbed on the C_{60} column, located inside an injection valve, the sample matrix being sent to waste. In this step, a water carrier was pumped to the instrument in order to flush the nebulizer after each measurement. In the elution step, the injection valve was switched to pass 0.2 mol/L HNO_3 at 5 mL/min through the column in order to elute the chelates. Each fungicide group was speciated according to the metal present in the dithiocarbamates. Peak height was used for analytical measurements and no blank was required. If needed, the C_{60} column can be occasionally flushed with 0.5 mL of ethanol.

3. Results and discussion

Fullerene is a new sorbent material for the preconcentration of trace metals complexed with organic chelating agents such as dithiocarbamates.¹⁵⁻¹⁷ Dithiocarbamate fungicides containing heavy metals (Zn, Mn and Fe) can thus be directly sorbed and determined by using a simple flow configuration coupled on-line to an atomic absorption spectrometer. Initially, we studied all metal-containing dithiocarbamates commercially available as fungicides, namely ziram, zineb, propineb, ferbam, mancozeb and maneb. Ziram, zineb and propineb are different chelates of Zn²⁺, so only a global response for them is provided by the AAS technique; we thus used ziram as a model among them. On the other hand, mancozeb is a mixture of complexes of Mn (20%) and Zn (2.55%), which hinders its discrimination from fungicides containing Zn or Mn. The analytes finally selected as models for group speciation of these fungicides were thus ziram (a monomeric chelate of Zn²⁺ with two dithiocarbamate molecules), ferbam (a monomeric chelate of Fe³⁺ containing three molecules of chelating agent) and maneb (a polymeric chelate of Mn²⁺). The pro-

cedure followed to optimize the continuous sorption/elution process is described below.

3.1. Influence of sample pH and eluent

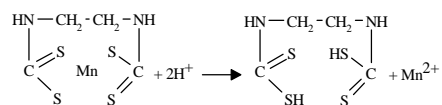
The knowledge of the equilibrium constants involved in the formation of the fungicides ziram, maneb and ferbam, and the assumption of high sorption constants for the metal dithiocarbamates¹⁵ allowed us to study the influence of the sample pH on the sorption on C₆₀ fullerene. For this purpose, solutions containing 20, 50 and 100 ng/mL of ziram, maneb and ferbam, respectively, were sequentially passed through a sorbent column containing 80 mg of C₆₀ that was located in the loop of an injection valve. A time-based technique equivalent to using only 6 mL of sample (sample flow rate, 3 mL/min; pumping time, 2 min) and an 0.2 mol/L HNO₃ stream as eluent were initially employed (Fig. 1). The sample pH was adjusted with dilute HNO₃ or NaOH in all cases. The individual determination of each fungicide was performed according to the metal present in the fungicide chelate (*viz.* Zn²⁺ in ziram, Mn²⁺ in maneb and Fe³⁺ in ferbam). Chelate adsorption was maximal at pH 5.0-6.5 for ziram, 3.3-7.7 for maneb and 4.9-6.6 for ferbam. In acid or alkaline media,

the acid-base constant of the dithiocarbamate or the precipitation equilibrium of the cation prevailed over complex formation, so the metals were released and chelate sorption reduced as a result. Consequently, samples were prepared in ultrapure water, which provided a pH of *ca.* 6.

According to the literature, dithiocarbamates can be extracted into organic solvents,¹² decomposed in an acid medium to release the metals;²⁵ alternatively, the metal present in the fungicide can be released by ligand exchange.^{6,7} The elution of adsorbed chelates from the C₆₀ column was thus investigated using different solutions, namely: (i) organic solvents (*n*-hexane, IBMK); (ii) HNO₃ at different concentrations; and (iii) ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt (EDTA) at different concentrations. The results obtained in these experiments were satisfactory for the three fungicides. However, the blank signals in IBMK and *n*-hexane was *ca.* 0.030, 0.030 and 1.000 A.u. for maneb, ferbam, and ziram, respectively. No blank signal for any fungicide was observed with nitric acid, however. EDTA provided negligible blanks for maneb and ferbam, but *ca.* 0.200 A.u. for ziram; in addition, the presence of sodium from the EDTA solution was found to instabilize the flame during measurements. The final choice was nitric

acid, which yielded the best results at concentrations between 0.05 and 1 mol/L for the three fungicides and required using no blank. A concentration of 0.2 mol/L eluted the chelates very rapidly, which minimized dispersion during transport of the sample plug to the instrument.

The mechanism of the hydrolysis reaction¹¹ involved in the elution step, exemplified for maneb, could be as follows:



3.2. Sample and eluent flow rates

Taking into account the simplicity of the proposed flow method for the determination of the three dithiocarbamates in aqueous medium (*e.g.* no organic reagents or reaction coils is needed), the only variables potentially affecting performance would be the sample and eluent flow rates. Changes in the flow rate of the sample (6.0 mL) between 0.5 and 3.5 mL/min resulted in very small variations in the signal, which was found to decrease at higher flow rates –slightly for maneb and ferbam and more markedly for ziram–through a decreased residence time inside the sorbent column. On the other hand, the elution process was found not to depend on the flow rate of

Table 1

Figures of merit of the determination of dithiocarbamate fungicides by FAAS

Compound	Regression equation ^a (absorbance vs ng/mL)	Range/ ng/mL	Det. limit/ ng/mL	RSD (%)
Ziram	$A = -0.001 + 4.3 \times 10^{-3}X$	3 – 45	1	3.0
Maneb	$A = 0.002 + 1.4 \times 10^{-3}X$	5 – 125	2	2.0
Ferbam	$A = 0.003 + 4.4 \times 10^{-4}X$	15 – 350	5	2.5

^a For a sample volume of 10 mL.

the 0.2 mol/L HNO₃ solution above 3.5 mL/min thanks to the increased nebuliser efficiency and minimal sample dispersion. Based on these considerations, we chose a sample and eluent flow rate of 3 and 5 mL/min, respectively; the tubing length between the switching valve and the nebuliser did not influence peak height below 50 cm (longer lengths increased the dispersion of eluted metals).

3.3. Analytical performance

The performance and reliability of the proposed on-line FI method (Fig. 1) were assessed by determining the regression equation, linear range, analyte detectability and relative standard deviation for the three dithiocarbamates. Table 1 gives the equations for the standard curves (correlation coefficients ranged from 0.997 to 0.999) and other analytical figures of merit obtained by processing 10 mL of sample. Because blank signals were

negligible, limits of detection were calculated as 3 times the standard deviation of the peak height for 10 determinations of the same sample at the lowest concentration within the linear range in each case. The precision of the method was checked on 11 standard solutions containing 10, 25 and 50 ng/mL of ziram, maneb and ferbam, respectively. Concentration factors of about 45, calculated as the ratios between the slopes of the calibration graphs (expressed as concentrations of Zn, Mn and Fe) obtained with the proposed method and by direct aspiration of metal standards in dilute HNO₃, were readily achieved.

3.4. Interferences

The study of potential interferences with the proposed method involved three different types of species, namely: (i) cations forming more stable complexes with dithiocarbamates

than the native metals in the three fungicides studied and thus capable of replacing them in the original chelate (*e.g.* Cu²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺, Hg²⁺, *etc*); (ii) cations present in the fungicide chelate and precipitating in the weakly acid medium used, which would also be retained on the C₆₀ column, which can also act as filter (*viz.* Fe³⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺); and (iii) organic compounds that would be adsorbed to a variable extent on C₆₀ fullerene and block its active sites, thus restricting adsorption of the analytes. The effect of cations replacing Zn, Mn or Fe in ziram, maneb or ferbam, respectively, was not studied because, if the metal in the native samples was exchanged, it was in an uncontrolled chemical reaction which was beyond the scope of this work, as the fungicides would not be in their native form so they would not be detected as ziram, maneb and ferbam. Regarding the adsorption of organic compounds on C₆₀ fullerene, previous adsorption studies²⁶ involving organic substances in an aqueous medium that were eluted with organic solvents for determination by gas chromatography with flame ionization detection led to the following conclusions: C₆₀ fullerene has limited use as a sorbent for organic compounds. Its adsorption efficiency decreases with increasing polarity of the organic compound, consistent with the adsorp-

tion mechanism assigned to fullerenes –primary via π -electron interactions–; thus, the average sorption efficiency for standard solutions of 100-300 ng/mL of each organic compound was 60, 50, 40 and 20% for N-methylcarbamates (*viz.* carbaryl and propoxur) and their hydrolysis products, phenolic compounds, PAHs (*viz.* naphthalene, phenantrene, anthracene) and amines, respectively. These compounds are not eluted in 0.2 mol/L HNO₃ as they are retained on C₆₀ fullerene in acid medium; however, they are easily eluted in organic solvents such as ethyl acetate, acetone, and ethanol. Therefore, if any of them is present in real samples and is retained on the sorbent column, it can be removed by periodically flushing the column with 0.5 mL of ethanol.

The effect of Mn²⁺, Zn²⁺ and Fe³⁺ on the determination of maneb, ziram and ferbam, respectively, was investigated individually in order to identify potential interferences arising from precipitation of the cations in the weakly acid medium used and from the C₆₀ fullerene column acting as a mixing filter/sorption device. Experiments involving Zn²⁺ (for ziram) and Mn²⁺ (for maneb) revealed the absence of interferences with the determination of 10 ng/mL ziram or 25 ng/mL maneb at the highest metal concentration as-

sayed (1 µg/mL). Fe³⁺ interfered above 0.1 µg/mL (ferbam concentration, 50 ng/mL) by increasing the iron signal through precipitation of ferric hydroxide at the working pH; the hydroxide was retained on the column and subsequently dissolved by the eluent (0.2 mol/L HNO₃). Various masking agents (acetate, cyanide and oxalate) were tested to avoid the interference of Fe³⁺, the results being unacceptable in all cases. A commercially available filter furnished with disks of paper, nylon or

tested (1 µg/mL).

3.5. Sequential resolution of analyte mixtures

In order to examine the possibility of determining all the fungicides sequentially, various synthetic mixtures of the three dithiocarbamates selected as models were prepared in different ratios within the linear range in a sample volume of 10 mL. The concentrations found, their standard deviations,

Table 2
Resolution of various synthetic ternary mixtures of ziram, maneb and ferbam by sorption on C₆₀

Conc. taken/ ng ml ⁻¹			Ziram		Maneb		Ferbam	
Ziram	Maneb	Ferbam	Found±SD ng ml ⁻¹	Rel. error (%)	Found±SD ng ml ⁻¹	Rel. error (%)	Found±SD ng ml ⁻¹	Rel. error (%)
5.0	5.0	15.0	4.8 ± 0.2	-4.0	4.9 ± 0.3	-2.0	15.7 ± 0.6	+4.7
3.0	6.0	30.0	2.8 ± 0.1	-6.7	6.2 ± 0.3	+3.3	29.2 ± 0.8	-2.7
5.0	50.0	15.0	5.3 ± 0.2	+6.0	50.0 ± 1.0	0.0	16.0 ± 0.7	+6.7
5.0	50.0	50.0	5.1 ± 0.2	+2.0	53.0 ± 2.0	+6.0	48.0 ± 2.0	-4.0
15.0	15.0	15.0	13.7 ± 0.8	-8.7	14.4 ± 0.6	-4.0	15.5 ± 0.7	+3.3
15.0	15.0	75.0	15.5 ± 0.7	+3.3	15.3 ± 0.6	+2.0	74.0 ± 2.5	-1.3
30.0	15.0	15.0	30.9 ± 2.0	+3.0	15.0 ± 0.3	0.0	15.6 ± 0.8	+4.0
45.0	15.0	75.0	44.0 ± 1.0	-2.2	14.4 ± 0.7	-4.0	77.5 ± 3.5	+3.3
45.0	15.0	15.0	45.0 ± 1.5	0.0	14.7 ± 0.6	-2.0	14.6 ± 0.7	-2.7
45.0	45.0	15.0	46.0 ± 1.0	+2.2	44.0 ± 1.5	-2.2	14.9 ± 0.5	-0.7
45.0	90.0	15.0	43.7 ± 2.0	-2.9	90.2 ± 3.0	+0.2	15.7 ± 0.6	+4.7
45.0	120.0	15.0	45.9 ± 1.0	+2.0	122.4 ± 4.0	+2.0	16.0 ± 0.8	+6.7

PTFE with pore sizes from 0.45 to 5 µm was included at the entry to the sample aspiration channel (see Fig. 1). The best results were obtained with PTFE membrane disks of 1 µm pore size; by using this filter, Fe³⁺ was tolerated at the highest concentration

and the relative errors made in four replicate analyses of each aqueous sample are shown in Table 2. The mixtures contained the lowest possible concentration of ferbam taking into account its scant use as an agricultural fungicide. As expected, the proposed

FI method accurately resolved mixtures of ziram, maneb and ferbam in proportions from 1:1:1 to 3:8:1, with relative errors less than 10%.

3.6. Speciation and determination of dithiocarbamates in grain samples

Various types of grain samples were used to examine the effect of the matrix on recoveries. Initially, 5.0 g of each grain type was analysed and, if negative results were obtained, the amount of sample was increased to 10.0 g. No samples containing fungicide residues at detectable concentrations could be found, so a recovery test was carried out. For this purpose, 5.0 g of uncontaminated grain (*viz.* wheat, barley, rye, rice, maize and oat) was spiked with 1 mL of acetone containing variable concentrations of ziram, maneb and ferbam between 0.25 and 1.0 $\mu\text{g/mL}$; the amounts spiked, in μg per g of grain, were within the maximum residual limits (*viz.* from 0.05 to 0.2 $\mu\text{g g}^{-1}$ total carbamates in grains)^{27,28} in all instances. Following acetone evaporation for *ca.* 30 min, each sample was prepared as described under Experimental. Chloroform was used as extractant on account of the high solubility of the fungicides in it.⁷⁻⁹ Satisfactory results were obtained at a sample/extractant ratio of 1:1 (g/mL).

Each sample was spiked four times ($n = 4$). The results were satisfactory for all samples, with recoveries of 92–98%. Finally, wheat and maize samples were spiked with mixtures of ziram, zineb and propineb (chelates of Zn^{2+}). The global response of zinc dithiocarbamates (concentrations expressed as Zn) was in good agreement with the amount spiked. Therefore, the proposed method affords the group speciation in grain samples, and also, probably, in vegetables and fruits, as they act as surface deposits and hence contain residues of undecomposed fungicides.⁶

4. Conclusions

The proposed method is simple and sensitive enough for application to grain samples containing the analytes at levels near the legally established limits. Its most salient advantage over conventional methods based on the formation of CS_2 , which only provide the global response for total dithiocarbamates, is the ability to perform group speciation among dithiocarbamates containing different metals; by contrast, the proposed method does not afford speciation of dithiocarbamates that contain no metal (*e.g.* nabam, thiram, vapam and dibam).

Those methods that hydrolyse the fungicides to release their metals and then detect the metals following derivatization are inadequately selective as the metals present as inorganic salts in real samples and other metal dithiocarbamates give false positives. The proposed method is highly selective as a result of chelates being selectively retained on C₆₀ and then hydrolysed in order to determine the metal.

Acknowledgements

This work was supported by grant PB950-00977 from Spain's DIGICyT.

REFERENCES

- [1] M. Marinovich, M. Guizzetti, F. Ghilardi, B. Viviani, E. Corsini and C.L. Galli, *Arch. Toxicol.*, 1997, 71, 508.
- [2] D.G. Clark, H. Baum, E. L. Stanley and W. E. Hester, *Anal. Chem.*, 1951, 23, 1842.
- [3] C.H. Hall, *J. Assoc. Off. Agric. Chem.*, 1960, 43, 37.
- [4] M. Palov and B. Renzo, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1986, 37, 931.
- [5] W. Schwack, B. Bruger and S. Nyanzi, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1995, 351, 297.
- [6] J. Kapoor, A. Kumar, U. Gupta and A.L.J. Rao, *Talanta*, 1994, 41, 2061.
- [7] A. Kumar and A.L.J. Rao, *Talanta*, 1997, 44, 177.
- [8] R. Kesari and V.K. Gupta, *Talanta*, 1998, 45, 1097.
- [9] M. T. Pérez Pita, A.J. Reviejo, F.J. Manuel de Villena and J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta*, 1997, 340, 89.
- [10] T. Noguer, A. Gradinaru, A. Ciucu and J.L. Marty, *Anal. Lett.*, 1999, 32, 1723.
- [11] M.S. Lin, B.I. Jan, H.J. Leu and J.S. Lin, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 388, 111.
- [12] O. Jiménez de Blas, J.L. Pereda de Paz and J. Hernández Méndez, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1990, 5, 693.
- [13] M. Valcárcel and M. Gallego, *Talanta*, 1997, 44, 1509.
- [14] *Flow Analysis with Atomic Spectrometric Detectors*, ed. A. Sanz-Medel, Elsevier, Amsterdam, 1999.
- [15] M. Gallego, Y. Petit de Peña and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 4074.
- [16] Y. Petit de Peña, M. Gallego and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 1995, 67, 2524.
- [17] Y. Petit de Peña, M. Gallego and M. Valcárcel, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1997, 12, 453.
- [18] J.R. Baena, S. Cárdenas, M. Gallego and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 2000, 72, 1510.
- [19] Ph. Quevauviller, in *Plasma Winter Conference*, Ghent, Belgium, 1997.

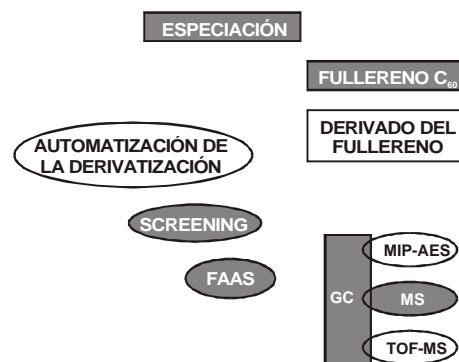
- [20] S. Caroli, in *Element Speciation in Bioorganic Chemistry*, ed. S. Caroli, Wiley, New York, 1996.
- [21] S. Hetland, I. Martinsen, B. Radzuk and Y. Thomassen, *Anal. Sci.*, 1991, 7, 1029.
- [22] Ph. Quevauviller, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 345, 515.
- [23] B. Michalke, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1999, 363, 439.
- [24] A. Kot and J. Namiesnik, *Trends Anal. Chem.*, 2000, 19, 69.
- [25] *The Pesticide Manual*, ed. C. Tomlin, The British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry, UK, 10th edn., 1994.
- [26] E. Ballesteros, M. Gallego and M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A*, 2000, 869, 101.
- [27] Community Directive 93/58 EEC, *Off. J. Eur. Commun. L 211/6*, European Community, Brussels, 1993.
- [28] FAO, *Agriculture towards 2010; C 93/24 Document of 27th Session of FAO Conference*, FAO, Rome, 1993.



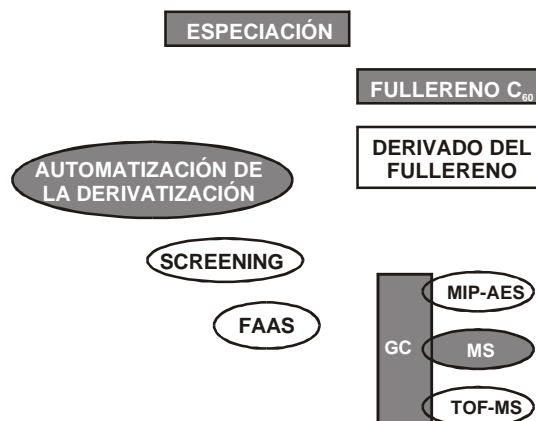
Capítulo IV

Screening y Especiación de Plomo mediante FAAS y GC/MS

Chapter **IV** Lead Screening and Speciation by FAAS and GC/MS



Los sistemas de screening son de gran utilidad en procesos de rutina en los que es necesario controlar el nivel de determinados parámetros en un número elevado de muestras. Suelen ser sistemas sencillos con una instrumentación asequible y de respuesta rápida, que permiten descartar las muestras que no requieren un análisis más detallado. De esta forma, sólo las muestras que originan una respuesta positiva en el sistema de screening serán analizadas siguiendo una metodología más compleja, con lo que se reduce el tiempo empleado y los costes por análisis. En el primer apartado del presente capítulo (IV.1), se desarrolla un sistema de screening de muestras de agua para evaluar el contenido total de plomo por FAAS. La retención de los analitos (plomo inorgánico y compuestos organoplomados), en forma de quelatos neutros sobre una columna de C₆₀ permite alcanzar límites de detección aplicables a muestras reales. La confirmación de las muestras positivas se realiza por GC/MS, para lo cual es preciso introducir una etapa adicional de derivatización. En este caso, se emplea un reactivo de Grignard para la derivatización, que debe hacerse fuera de línea.



En el segundo apartado del Capítulo (IV.2), se consigue la completa automatización del proceso de derivatización. Los compuestos organoplomados, junto con el plomo, se retienen en una columna de C₆₀, mientras que la matriz de la muestra es conducida al desecho. La elución de los analitos implica también el inicio de su transformación en especies volátiles, ya que el eluyente contiene una concentración adecuada del reactivo derivatizador (NaBPr₄). Una vez transcurrido el tiempo de derivatización, crítico en estos casos, se procede a la inyección en el GC/MS, siendo ésta la única etapa manual del proceso.

**Speciation of Inorganic Lead and Ionic
Alkyllead Compounds by GC/MS in
Prescreened Rainwaters**

**Josefa R. Baena, Soledad Cárdenas, Mercedes Gallego and
Miguel Valcárcel**

*Analytical Chemistry Division, Faculty of Sciences,
University of Córdoba.E-14004 Córdoba, Spain*

A simple and novel screening method for lead compounds in environmental waters is proposed. The analytes, in an acetic medium, are sorbed on a C₆₀ fullerene column as DDC complexes and subsequently eluted with IBMK, the lead being determined by flame atomic absorption spectrometry. The screening method acts as filter and indicates whether the target analytes are present above or below the detection limit of the method (0.5 ng/mL), giving no false positives. Positive samples were speciated by GC/MS, using a flow system similar to that of the screening method. Lead(II) and ionic di- and trialkyllead are derivatized with a Grignard reagent. Both methods use similar chemical and flow variables except for the eluent, IBMK in the screening method and *n*-hexane in the speciation method. The GC/MS speciation method is very sensitive; it exhibits a linear range of 0.02–5 ng/mL and detection limits of 1–4 ng/L are achieved. Also, its repeatability, as RSD, is less than 6%. The method was applied to the speciation of Pb²⁺ and di- and trialkyllead in positive pre-screened rainwater samples from three different urban areas.

1. Introduction

Many recent environmental studies involving metals and metalloids require information from all the chemical species in which a given element may occur in a sample. Some metals such as lead are discharged into the environment as organolead compounds (from leaded gasoline) that can undergo further transformation.¹ Ionic alkyllead species are degradation products of tetraalkylleads, which are employed largely as anti-knock agents. The environmental degradation pathway for tetraalkyllead compounds involves ionic di- and trialkyllead species in addition to inorganic lead; monoalkylleads are only occasionally present owing to their instability.^{2,3} All these compounds are more toxic than inorganic lead because they are fat-soluble and hence readily absorbed by the skin and lungs.⁴

The rapidly growing interest in elemental speciation has propitiated the development of a new generation of analytical techniques which enable discrimination among the different forms of a metal. These species-specific techniques have recently been reviewed.^{3,5} Organolead compounds have so far been speciated using gas chromatography (GC) or liquid chromatography (HPLC) in conjunction with an element-selective, sensitive

detector. HPLC in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) has been employed for this purpose^{6,7} but it has generally proved inadequately sensitive for speciation of alkylleads in environmental samples.² On the other hand, GC is unmatched in terms of resolution and sensitivity of available detectors but requires preliminary derivatization of ionic alkyllead species to render them sufficiently volatile and thermally stable to be separated. Specially prominent among methods for the speciation of alkyllead compounds are GC microwave induced plasma atomic emission spectrometry (MIP-AES)⁸⁻¹⁰ and GC-ICP¹¹ techniques on account of their sensitivity and resolution in this kind of analyses. Although the GC/MS technique provides comparable results and is easier to implement, only a few authors¹²⁻¹⁴ have used it to speciate lead.

The most common derivatization methods for organolead compounds involve the use of a Grignard reagent,^{13,15,16} following chelation and extraction into a water-free solvent, under an inert atmosphere. *In-situ* derivatization in an aqueous medium is possible using sodium tetraethylborate, NaBEt₄,^{14,17,18} however, this reagent only discriminates methylated species. Sodium tetra (*n*-propyl) bo-

rate¹¹ and tetrabutylammonium tetrabutylborate,^{19,20} which were synthesized only recently, allow major alkyllead compounds (methylated and ethylated species) to be derivatized while preserving their specific information. Liquid–liquid extraction has traditionally been the separation technique of choice in speciation analysis; recently, however, it has been superseded by liquid–gas extraction followed by cryopreconcentration which is normally used for the automation of routine speciation analyses.³ Thus, alkyllead and inorganic lead are volatilized *in-situ* via a suitable derivatization reaction (hydride generation or ethylation with NaBEt₄) and the resulting derivatives purged and cryofocused at –100 °C. The trap then is heated to release the species onto a multicapillary column for atomic spectrometric detection.³ Solid-phase extraction has also been used to discriminate lead compounds in a flow system.²¹ The flow manifold consisted of two units; in the first, total inorganic lead was precipitated and then dissolved and driven to a flame atomic absorption spectrometer (FAAS); in the second, the filtrate, containing trimethyl- and triethyllead cations, was complexed and adsorbed on a C₆₀ fullerene column. The novelty of this proposal lies in the use, for the first time, of C₆₀ as sorbent for organolead compounds; in previous

studies, C₆₀ fullerene was found to perform better as a metal concentrator than do conventional solid materials.²² The growing interest in this material since its discovery reflects in the large number of papers, reviews and monographs^{23,24} published on it to date.

The state-of-the-art and the potential of sample screening systems in analytical chemistry were recently reviewed.²⁵ The most favourable situation is when the sample screening system can be used with no sample pretreatment. The first purpose of this work was thus to develop a simple automatic screening system for lead species in water. For this purpose, a simple flow system for the continuous preconcentration of the analytes onto a C₆₀ sorbent column was used in which lead compounds can be detected at concentrations of a few ng/mL by means of a selective detector (FAAS). The binary (yes/no) response of the target lead species is completely unambiguous; as a result, the proposed screening method avoids the need to speciate those samples that give a “no” response. The second purpose of this work was to use the above-mentioned flow system in combination with derivatization, to check whether the “yes” response corresponded to one or several lead species. Speciation is accomplished by using a chromatographic technique (GC) to separate the target species,

which are then unequivocally characterized by MS.

2. Experimental section

2.1. Reagent and standard solutions

C₆₀ fullerene (> 99.4%) was obtained from Hoechst (Frankfurt, am-Main, Germany). Sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC), tetraethyllead (TeEL), iodine monochloride and the Grignard reagent, a 2.0 mol/L propylmagnesium chloride (PrMgCl) solution in diethyl ether, were supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Trimethyllead (TML⁺) acetate and triethyllead (TEL⁺) chloride were purchased from Alfa (Barcelona, Spain). Other chemicals and solvents including lead nitrate, sulfuric and acetic acids, *n*-hexane and isobutyl methyl ketone (IBMK) were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

A lead stock solution (1000 mg/L) was prepared by dissolving 1.598 g of lead nitrate in 1 L of 1% v/v nitric acid. All trialkyllead stock solutions (0.5 mg/mL as lead) were prepared by dissolving appropriate amounts of the respective salts in water. Dimethyl- and diethyllead (DML²⁺ and DEL²⁺) chloride were synthesized by reaction between trimethyl- and triethyllead solutions, respectively, and 0.1 mol/L iodine monochloride in concentrated hydrochloric acid (35% v/v), at a trialkyllead/ICl molar ratio of 0.19. All

organolead standards were stored at 4 °C in the dark. Individual and mixed working standard solutions were prepared daily from the stock solutions, in 0.017 mol/L acetic acid (pH 3.5), by addition of 1 mL of glacial acetic acid (17.5 mol/L) per mL of standard solution. Individual aqueous solutions of 3×10⁻³ mol/L NaDDC (which remained stable for 3 days) and 0.1 mol/L sulfuric acid were also prepared.

In order to avoid decomposition of the Grignard reagent, which is air- and moisture-sensitive, aliquots of 70 mL were placed into 2-mL crimp amber vials (32 mm × 11mm) and sealed with a hand crimper in a dry box under an argon atmosphere. Once sealed, the vials, used to derivatize the alkylleads, can be handled out of the dry box without deterioration of the derivatizing reagent for 2 days.

2.2. Apparatus

A Model 380 atomic absorption spectrometer from Perkin-Elmer (Überlingen, Germany) equipped with a bead impact system in the burner chamber and a hollow cathode lead lamp was used. The wavelength, spectral slit width and lamp current used were 283.3 nm, 0.2 nm and 10 mA, respectively; deuterium arc background correction was never employed. The air-acetylene flame was adjusted to obtain a clean blue flame.

The spectrometer output was connected to a Radiometer REC-80 Servograph recorder.

The speciation of alkyllead compounds was carried out on a Fisons GC8000/ MD800 gas chromatograph/mass spectrometer from Thermo (Madrid, Spain) based on a quadrupole analyser and a photomultiplier detector, and governed via MASSLAB software (also from Thermo). A fused-silica capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d.) coated with 5% phenyl-methylpolysiloxane, film thickness 0.25 μm (Supelco, Madrid, Spain), was utilized for analyses. Ultrapure grade helium (6.0, Air Liquide, Seville, Spain) at a flow rate of 0.9 mL/min was also employed. The injection port and transfer line temperature were maintained at 250 °C. The ion source temperature was kept at 200 °C. The mass spectrometer was operated in the scan mode (scan range m/z 70–500). The ionization mode was electron ionization at 70 eV. The temperature of the chromatographic oven was held at 50 °C for 3 min, followed by ramping to 250 °C at 15 °C/min. The sample volume (1 μL) was injected in the split mode (1:25). Three characteristic ions per analyte were monitored (including the m/z corresponding to lead and that for $[\text{M} - \text{CH}_3]^+$ or $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_5]^+$ ions) for identification and

quantification purposes. The m/z values selected for each derivative compound were (quantification mass underlined): TML^+ 208, 253, 281; DML^{2+} 208, 281, 309; TEL^+ 208, 237, 309; DEL^{2+} 208, 251, 322; Pb^{2+} 208, 251, 337; TeEL 208, 237, 295.

The flow system used for the screening and speciation of lead compounds consisted of a Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-2 peristaltic pump furnished with poly(vinyl chloride) pumping tubes, two Rheodyne (Cotati, CA, USA) 5041 injection valves and PTFE tubing of 0.5 mm i.d. for coils. The sorbent column was made from PTFE capillaries of 3 mm i.d., packed with 80 or 160 mg of C_{60} fullerene and sealed on both ends with small cotton wool beds to prevent material losses. The column remained serviceable for at least 1 year, requiring occasional flushing with IBMK or 1 mol/L HNO_3 .

2.3. Screening Procedure

A continuous-flow system coupled on-line to an atomic absorption spectrometer as depicted in Figure 1 was used. Volumes of 10–50 mL of standards or water samples in 0.017 mol/L acetic acid at pH 3.5 containing 35–1250 ng of lead compounds (inorganic and organic) were continuously fed into the system and mixed with the chelating reagent (3×10^{-3} mol/L

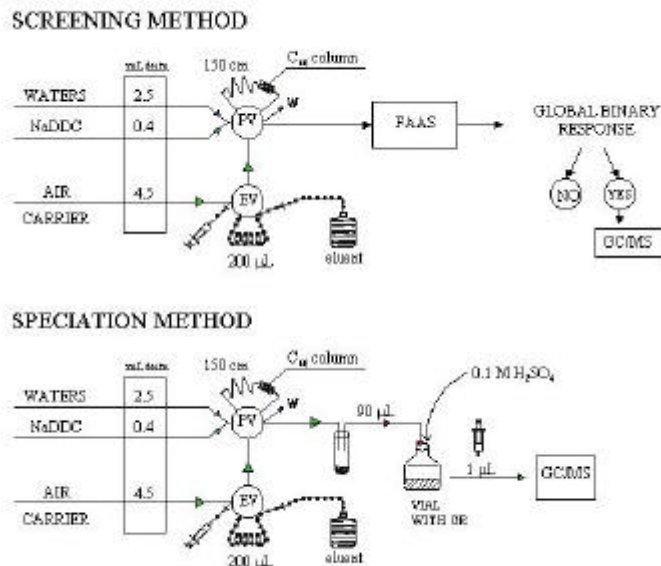


Figure 1.

FI manifold for the atomic screening and GC/MS speciation of lead species. PV and EV denote pre-concentration and elution valves, respectively; W, waste; NaDDC, sodium diethyldithiocarbamate; IBMK, isobutyl methyl ketone; GR, Grignard reagent; FAAS, flame atomic absorption spectrometer; GC/MS, gas chromatograph/mass spectrometer

NaDDC). Chelates were immediately formed in the reaction coil (150 cm long) and retained on the sorbent column (160 mg of C_{60}), located in the loop of the pre-concentration valve (PV), while the sample matrix was sent to waste. During this step, a water carrier was pumped at 4.5 mL/min through the instrument in order to flush the nebulizer after each measurement, the loop (100 mL) of the elution valve (EV) being filled with eluent (IBMK) by aspirating the solvent with a syringe located at the end

of the loop. In the second step, both valves were switched and the loop contents were injected into the water carrier and passed through the sorbent column, in order to have the chelates eluted and driven to the detector. Peak height was used as analytical measurement and a blank consisting of 100 mL of IBMK ($A \approx 0.020$ units) was also used. Peak height was proportional to the total amount of lead species present in the sample; Pb^{2+} was the main contributor to the signal as real samples with significant amounts

of trialkyl and/or dialkyllead compounds also contain excess Pb^{2+} . In order to determine the individual concentrations of lead species in the water samples, all positive results required discrimination by GC/MS as described below.

2.4. GC/MS Speciation Procedure

The flow system used by the speciation method was similar to of Figure 1, slightly altered to enable a subsequent derivatization reaction with propylmagnesium chloride. Thus, 5–25 mL of standards or water samples containing 0.1–25 ng of lead species (as lead) in 0.017 mol/L acetic acid (pH 3.5) were fed into the system and merged with a 3×10^{-3} mol/L NaDDC stream to obtain neutral chelates that were retained on the fullerene column (80 mg of C_{60}). After preconcentration, an air stream was passed through the column at 4.5 mL/min for 30 seconds in order to remove residual aqueous phase from the column and connections. In that time, the loop of the elution valve was filled with 200 μL of *n*-hexane (containing 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TeEL as internal standard) by using a syringe that aspirated the eluent from a bottle which was tightly stoppered to avoid evaporation losses of TeEL. On switching the elution valve, the chelates were eluted and the organic solution was collected in a glass tube containing

anhydrous sodium sulfate. All subsequent reactions were carried out manually.

A fraction of 90 μL of the *n*-hexane extract was injected into a 2-mL vial containing 70 μL of 2 mol/L propylmagnesium chloride in diethyl ether; the propylation reaction completed within 8 min of standing, after which excess of Grignard reagent was destroyed by adding 1 mL of 0.1 mol/L sulfuric acid to the 2-mL vial, which afforded separation of the two phases in a few seconds. A 1 μL aliquot of the upper (organic) phase was then aspirated with a syringe and manually injected into the gas chromatograph. Relative area was used for quantitation and a blank consisting ultrapure water instead of sample was also used. The C_{60} column was occasionally flushed with IBMK and conditioned with 200 μL of *n*-hexane.

3. Results and discussion

The speciation of organolead compounds in water usually starts with the liquid–liquid extraction of tetraalkyllead (native) and ionic alkyllead-DDC complexes, which must be conducted over a narrow pH range in order to ensure efficient extraction and is time consuming. The use of small volumes of organic solvents for preconcentration purposes hinders the recovery of large enough aliquots of

the extract for derivatization; on the other hand, the extensive manipulation involved in transferring operations for subsequent reactions introduce hazards through uncontrolled evaporation losses.²⁶ The shortcomings of liquid–liquid extraction can be avoided or minimized by using a solid phase extraction system as described below.

3.1. Optimization of the Screening Method

The proposed screening method is based on the formation of the chelates of inorganic lead and organolead compounds with diethyldithiocarbamate and their retention on a C₆₀ fullerene column. In this way the solid phase extraction makes the method sensitive enough to detect these compounds in natural water by virtue of the high preconcentration factors achieved. Inorganic lead concentrations are typically several orders of magnitude greater than those of ionic

Table 1
Chemical and flow variables of the atomic screening and GC/MS methods for inorganic and alkyllead compounds

Variable	Optimum range	Selected value
<i>Screening method</i>		
sample pH	0–5 (Pb ²⁺) 1–8 (alkyllead)	0.017 mol/L acetic acid (pH 3.5)
NaDDC (mol/L)	1×10^{-3} – 3×10^{-3}	3×10^{-3}
eluent (IBMK), mL	100	100
sample flow rate (mL/min)	0.5–3.0	2.5
NaDDC flow rate (mL/min)	0.4	0.4
reaction coil length (cm)	100–200	150
amount of C ₆₀ fullerene (mg)	50–230	160
<i>GC/MS method</i>		
sample pH	1.5 – 8.0	0.017 mol/L acetic acid (pH 3.5)
NaDDC (mol/L)		as in the screening method
eluent (<i>n</i> -hexane), mL	200	200
flow variables		as in the screening method
Grignard reagent (2 mol/L propylmagnesium), mL	60 – 80	70
derivatization time (min)	8 – 9	8

alkyllead compounds in waters, so positive results are easily obtained for mixtures containing low ng/mL concentrations of all lead species. The flow system was similar to one described elsewhere²⁷ and optimized with standard solutions of the analytes (Pb^{2+} , TML^+ , DML^{2+} , TEL^+ and DEL^{2+}) at a concentration of 10 ng/mL (expressed as lead) each. Initially, 25 mL of standards in ultrapure water (pH ca. 4) and 200 mL of *n*-hexane (eluent) were employed and chemical variables were optimized by using a flow system similar to that at the top of Figure 1 which included a column packed with 80 mg of C_{60} fullerene. The optimum range of values and the selected values are listed in Table 1. The effect of pH on chelate adsorption was different in each case; thus, adsorption was maximal at pH 0–5 for Pb^{2+} and at 1–8 for alkyllead compounds. Formation of the inorganic chelates prevailed over protonation of the ligand and Pb^{2+} hydrolysis below pH 0.5 and above pH 3, respectively, probably as a result of the high adsorption constant for fullerene.²⁷ On the other hand, the signal for alkylleads decreased above pH 8 as the likely result of the hydroxyl group competing with the reagent to form a hydrophilic compound (Pb -trialkyl-OH, Pb -dialkyl-(OH)₂).^{26,28} Compared to conventional liquid-liquid extraction with *n*-hexane,

the optimum pH range was fairly narrow (ca. 8–9) for most of the analytes studied; also, the precision and recovery were both low owing to the decomposition of NaDDC and the instability of the chelates in aqueous media.²⁶ The use of C_{60} fullerene as sorbent overcame these shortcomings.

Isobutyl methyl ketone (IBMK) and *n*-hexane were tested as eluents; for inorganic lead, IBMK was the most efficient (100% elution) as a result of the high solubility of the inorganic chelates in this solvent relative to *n*-hexane (65% elution). On the other hand, the better choice (100% elution) for alkyllead chelates was *n*-hexane; however, IBMK is equally usable for this purpose if the C_{60} column is preconditioned with *n*-hexane. As the amount of inorganic lead in environmental samples is typically several orders of magnitude greater than those of ionic alkyllead compounds,¹⁶ the optimal conditions for inorganic lead were adopted in order to increase the sensitivity of the screening method. Therefore, IBMK was selected as eluent, which also ensured solubilization of other inorganic complexes formed between DDC and metals (viz. Cu^{2+} , Fe^{3+}) present in real water samples. The sample and reagent flow rates were maintained at 2.5 and 0.4 mL/min, respectively, to avoid sample dilution. Formation of the chelates was instan-

taneous, so the length of the reaction coil was not a significant variable. A volume of 100 mL of eluent provided the highest analytical signal with no carry-over. Under the selected conditions, listed in Table 1, the blank (100 mL of IBMK) gave a negligible response.

3.2. Sensitivity and Selectivity of the Method

The screening method provides a reliable response to lead species in water thanks to the high selectivity of the detector. However, it is impossible to discriminate among them, so the sensitivity of the method has to be expressed as inorganic lead. A single calibration graph was thus used for all compounds, at a sampling time of 10 min (sample volume = 25 mL),

$$A = 0.002 + 4.6 \times 10^{-3} [\text{Pb}^{2+}]$$

where A is the absorbance difference and $[\text{Pb}^{2+}]$ is expressed in ng/mL. The linear range was 1.5 – 50 ng/mL. The detection limit, calculated as three times the standard deviation of the peak absorbance for 15 injections of 100 mL of IBMK (blank), was 1 ng/mL. The precision (as relative standard deviation) was checked on 11 standards containing 5 ng/mL Pb^{2+} and found to be 2.5%. In order to increase the sensitivity of the screen-

ing method, higher sample volumes were tested. Several calibration graphs were run for 30, 40, 50, 70 and 100 mL of sample, using a constant amount of Pb^{2+} between 35 and 1250 ng. These experiments allowed the following conclusions to be drawn: (i) the amount of C_{60} fullerene to be used as sorbent is directly related to the sample volume; (ii) a column of 1.1 cm \times 3 mm, packed with 80 mg of C_{60} , allows one to preconcentrate up to 35 mL of sample (with larger volumes signals drop as a result of the chelates being eluted from the end of the column). In order to increase the sample breakthrough volume and hence thus the sensitivity, longer columns were tested; a 3 cm \times 3 mm column containing 230 mg of C_{60} sufficed to preconcentrate up to 100 mL of sample. A C_{60} column containing 160 mg of sorbent was thus selected for sample volumes of 50 mL; the linear range and detection limit thus achieved were 0.7–25 ng/mL and 0.5 ng/mL, respectively.

The influence of metals present at significant concentrations in the water that might react with NaDDC and displace lead from the original chelates was investigated in order to identify potential interferences. Both IBMK and *n*-hexane were tested as eluents. Major elements commonly found in waters (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) were discarded as they do not react

with the chelating reagent; thus, only trace elements such as Mn^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} and Fe^{3+} were studied, at concentrations up to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. None of these metals was found to interfere with the determination of 5 or 10 ng/mL Pb^{2+} using IBMK and *n*-hexane, respectively, at pH 3.5 (sample volume = 25 mL); by exception, Fe^{3+} interfered at concentrations 10 and 4 times higher than that of Pb^{2+} with IBMK and *n*-hexane, respectively. As Fe^{3+} normally occurs at concentrations 10–100 times higher

than that of Pb^{2+} in water, different masking reagents for the former were tested including citrate, ascorbic acid, ammonium thiocyanate and ammonium acetate, all at concentrations of 0.1% (w/v), the sample pH being adjusted to 3.5 in all cases. The interference of iron was experimentally checked by using a hollow cathode lamp for the metal to measure its signal in the IBMK or *n*-hexane eluate fraction. Citrate and ascorbic acid provided the poorest results; ammonium thiocyanate masked Fe^{3+} par-

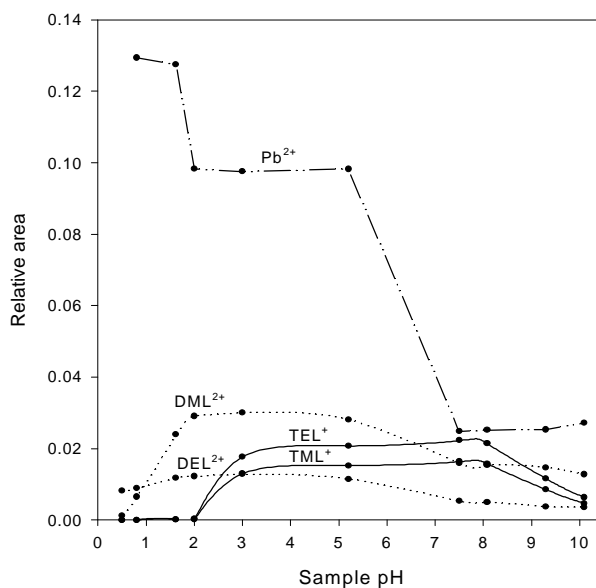


Figure 2
Effect of sample pH on the retention of lead species on C_{60} fullerene. Sample volume, 5 ml containing 0.5 ng/ml of each organolead compound.

tially at concentrations up to 20 or 10 times higher than that of Pb^{2+} , and ammonium acetate raised the tolerated level of Fe^{3+} to 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 5 and 10 ng/mL Pb^{2+} (with IBMK and *n*-hexane, respectively). The interference was avoided by virtue of Fe^{3+} forming an iron(III) acetate complex which was not adsorbed on the C_{60} column, so no iron signal was obtained for the eluate fraction. The selectivity was higher with IBMK than with *n*-hexane as the likely result of the higher solubility of the former. The selectivity can be increased by preparing the samples in 0.1 mol/L HNO_3 ,²⁷ at the expense of hydrolysis of organolead species to inorganic lead; this poses no a serious problem to the screening method but makes it impossible to speciate organolead compounds. The standard solutions of lead species used in subsequent experiments were thus prepared in the buffer–masking solution of pH 3.5 (0.017 mol/L acetic acid).

Finally, an artificial rainwater¹³ (prepared by dissolving in Milli-Q water the following high-purity salts: NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) was spiked with 2 ng/mL and showed no matrix interferences.

3.3. *Optimization of the GC/MS method*

Once unequivocal information about the presence of lead species in

the water samples is obtained with the screening method, one must identify the species actually present. Speciation requires using a chromatographic technique to separate each compound. GC/MS was selected for this purpose, even though it requires prior derivatization of ionic alkyllead compounds in order to make them both volatile and thermally stable. A Grignard reagent is used for this purpose; specifically, we chose propylmagnesium chloride as it provides short retention times and acceptable detection limits.^{14,16} This type of reagent must be handled under inert atmosphere as it is air- and moisture-sensitive. Initially, 40 μL of 2 mol/L propylmagnesium chloride in diethyl ether were placed in 2-mL vials and tightly sealed under an argon atmosphere. A flow system similar to that of Figure 1 was employed. *n*-Hexane was employed as eluent here since organolead-DDC complexes are more efficiently eluted with it than with IBMK. The sample pH was the first chemical variable examined. For this purpose, 5 mL of standard solutions containing TML^+ , DML^{2+} , DEL^{2+} and TEL^+ at concentrations of 0.5 ng/mL each were aspirated into the system. The standards were prepared at pH 0.5–10.0, which was adjusted with dilute nitric acid or sodium hydroxide. The results obtained are shown in Figure 2. The optimum pH range was

quite wide for all compounds, being nearer to the acid region for both dialkyl species. The signal decreased in a strong acidic medium through decomposition of the organolead species to inorganic lead. This effect went unnoticed in the screening method as it only provided a global response. In an alkaline medium, hydroxyl ions competed with the chelating reagent and decreased the relative area of the chromatographic peak for all compounds. Inorganic lead was not

included in this study because all organolead compounds tended to disproportionate to Pb^{2+} ,²⁸ so it was always detected as tetrapropyllead in addition to the native amount present in the water samples. As a result, the corresponding signal fell outside the chromatogram for this organometallic derivative. On the other hand, the signal for inorganic lead from decomposed organoleads peaked below pH 5 (Figure 2) and increased below pH 2, where degradation of organolead

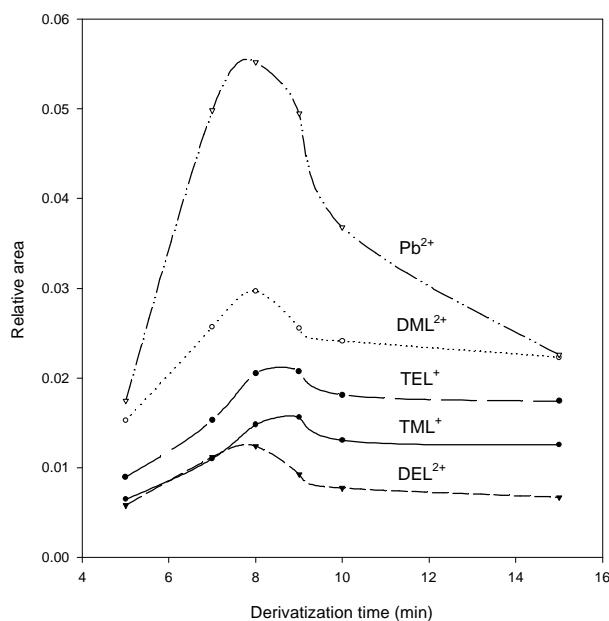


Figure 3
Influence of the time in the derivatization reaction of lead species with propylmagnesium chloride. Sample volume, 5 ml containing 0.5 ng/ml of each organolead compound.

compounds was more marked.

The derivatizing reagent (10–80 mL of 2 mol/L propylmagnesium in diethyl ether) was added to 2-mL vials under an argon atmosphere; a volume of 90 mL of the eluate from the C₆₀ column was injected into each vial as shown in Figure 1. The peak area remained virtually constant above 60 mL; a volume of 70 mL was thus selected in order to ensure thorough propylation of ionic organolead compounds. The reaction time was also varied by allowing the vial contents to stand for 5 to 15 min before excess of Grignard reagent was removed. As can be seen in Figure 3, quantitative derivatization of all compounds (including inorganic lead owing to partial degradation of organoleads) was achieved at 8–9 min, beyond which the signal decreased as a result of the derivative compounds (in the upper part of the vials) reached the headspace owing to their high volatility. Once thermodynamic equilibrium between organic and argon phases inside the 2-mL vial was achieved, analyte signals remained constant. After the derivatization reaction, excess Grignard reagent was removed by adding 1 mL of 0.1 mol/L sulfuric acid.

The effect of other chemical variables such as the concentration of NaDDC, and that of the flow variables, was the same as in the screen-

ing method (see Table 1). The eluent, *n*-hexane, also contained the internal standard (1 mg/mL of TeEL).

3.4. Analytical Features of the GC/MS Speciation Method

The high sensitivity of the GC/MS method and the ubiquity of organolead compounds can impose severe blank limitations in speciation analyses for these lead species. In previous work,^{16,26} DEL²⁺ and/or TML⁺ were found to contribute to the blank signal, which was ascribed to the atmospheric contamination, the glassware and the Grignard reagent used. In this work, contamination due to air and glassware was minimized by performing the extraction and preconcentration steps within a flow system (consisting of PTFE material); only the derivatization step was conducted in open glass vials; as can be seen from Figure 1, however, the residence time of the organic extract in the glass tube (air-exposed) was minimal and the vial containing the PrMgCl was sealed under an argon atmosphere. Therefore, the main contribution to the blank signal must be that of the Grignard reagent. In order to evaluate it, aliquots of 90 mL of the blank eluate from the C₆₀ column (ultrapure water as sample) were injected into the vials containing variable amounts of the derivatizing reagent. The variation of the relative

area with the PrMgCl concentration fitted a straight line passing through the origin for DML²⁺ alone, which confirms that the impurities are due to the Grignard reagent and rules out any other contributions. In order to determine both the magnitude and the reproducibility of the impurity under the optimized conditions, 11 blanks of ultrapure water were processed and injected in a vial containing 70 mL of Grignard reagent. As a result, a signal distinguishable from background noise and reproducible within it was obtained in the DML²⁺ region. Such a contribution must therefore be taken into account in establishing the regression equation for DML²⁺. No correction was needed for the other lead species.

By using the manifold depicted in

Figure 1 and the conditions given in Table 1, several calibration curves for all the organolead compounds were run. The figures of merit of the calibration graphs are summarized in Table 2. Based on the calibration plot for DML²⁺, the contribution of the blank was about 20 ng/L. Detection limits (calculated as three times the standard deviation of background noise) ranged from 4 to 15 ng/L. The precision of the GC/MS method, expressed as relative standard deviation (RSD), was checked on 11 individual samples containing 0.5 or 1 ng/mL of the analytes and was found to be ca. 6% (within-day). As can be seen, the sensitivity (slope of the regression equation) of the method is very high and the detection limits are comparable to those of conventional GC/MS

Table 2
Analytical figures of merit for the speciation of organolead compounds (sample volume, 5 mL)

Compounds	m/z^a	Regression equation ^b	Linear range (ng/mL)	DL (ng/mL)	RSD (%)
TML ⁺	253	$Y=5.8 \times 10^{-4} + 2.9 \times 10^{-2} X$	0.04 – 4	0.010	6.1
DML ²⁺	281	$Y=5.1 \times 10^{-4} + 5.9 \times 10^{-2} X$	0.02 – 2	0.008	5.8
TEL ⁺	309	$Y=8.2 \times 10^{-4} + 4.1 \times 10^{-2} X$	0.02 – 3	0.004	5.6
DEL ²⁺	251	$Y=1.7 \times 10^{-3} + 2.1 \times 10^{-2} X$	0.05 – 5	0.015	5.9
Pb ²⁺	251	$Y=2.7 \times 10^{-2} + 2.86 X$ $Y=0.352 + 13.25 \times 10^{-2} X$	0.01 – 1.4 1.4 – 75	0.008	5.1

methods (2–4 pg), which use sample volumes of 100–500 mL.^{2,13} The highest sensitivity for organolead compounds was obtained with ICP-MS (detection limits, 0.7 pg/s) and MIP-AES (detection limits, 0.1–1 pg).² With the proposed method, detection limits at the pg level were also obtained for 5 mL of sample that can be improved by using higher sample volumes. Thus, with 25 mL of sample, the sensitivity is five times higher; also, detection limits are 1–4 ng/L under these conditions.

Two calibration graphs were obtained for each lead species that exhibited differential slopes, linear ranges, etc; however, only the most sensitive are included in Table 2 owing to the low species levels present in the real samples. By contrast, inorganic lead was present at high concentrations in all real samples, so both of its calibration graphs are included in the Table.

3.5. Analysis of Rainwater

The proposed method was used to analyse three types of rainwater. Samples were collected at different locations in north-western Spain (viz. at an urban park, in the neighbourhoods of a petrol station and in an industrial area) after a dry period of 1–2 months. In order to ensure no interferences with the screening and speciation methods samples (refrigerated at 4 °C or below and kept in the dark immediately upon collection until analysis) were prepared in 0.017 mol/L acetic acid by adding 1 mL of 17.5 mol/L (glacial acetic acid) to 1 L of rainwater and analysed as soon as received.

Firstly, a volume of 50 mL of each water was aspirated into the flow screening manifold. As the three rainwaters gave positive responses, the speciation method was then applied to discriminate if the signal cor-

Table 3

Results of the analyses of rainwater samples from an urban park (1), the neighbourhood of a petrol station (2) and an industrial area (3). Sample volume, 25 mL

sample	Concentration found (ng/L)				
	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺	Pb ²⁺
1	< 2	70 ± 5	140 ± 8	80 ± 5	1350 ± 100
2	< 2	100 ± 6	125 ± 6	100 ± 7	740 ± 50
3	< 2	30 ± 3	30 ± 2	40 ± 3	1010 ± 70

± Standard deviation, n = 6.

responded to inorganic lead or the samples also contained organolead compounds. For the speciation method 25 mL of rainwater were enough due to its high sensitivity. The results obtained are listed in Table 3. The speciation method allowed the individual identification and quantitation of all lead species presented in the sample. As can be seen, TML⁺ was the only organolead species that went undetected, probably as a result of environmental degradation to DML²⁺ and Pb²⁺. All other species were detected, their concentrations

being maximal in the area near the petrol station (surprisingly, concentrations were lower in the industrial area). Inorganic lead was found in all water samples, at concentrations one order of magnitude higher than alkyllead species, which is consistent with their eventual environmental degradation to Pb²⁺. Inorganic lead concentrations included the contribution of Pb²⁺ (native) in the water and Pb²⁺ resulting from decomposition of the organolead compounds during derivatization. Figure 4 shows the chromatogram for rainwater 2, where

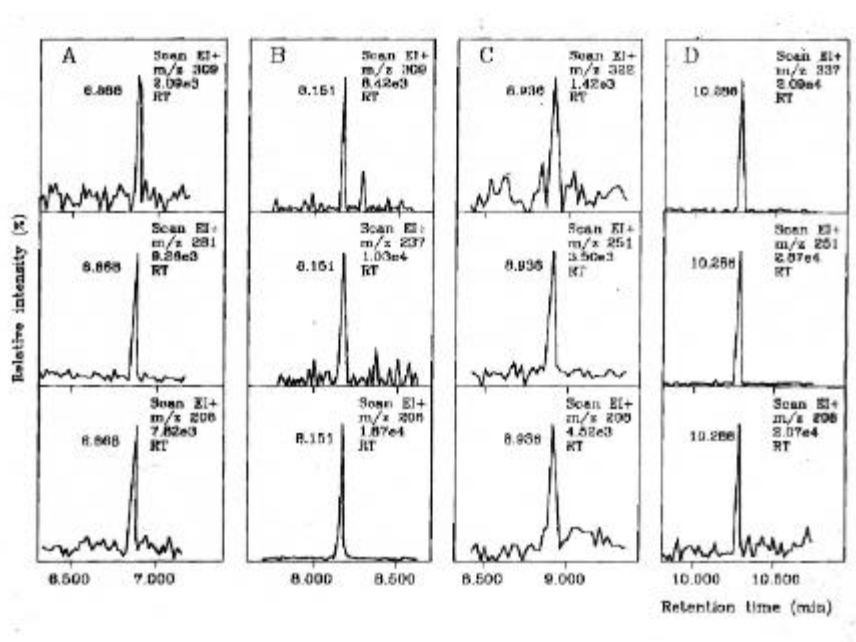


Figure 4. Chromatograms of the ion currents at m/z values selected for specific monitoring of (a) DML²⁺ propylated derivative, (b) TEL⁺ propylated derivative, (c) DEL²⁺ propylated derivative and (d) Pb²⁺ propylated derivative, all detected in a rainwater from a petrol station, by using a sample volume of 25 ml.

DML²⁺, TEL⁺, DEL²⁺ and Pb²⁺ (traces shown) were detected (see Table 3).

The blank sample was an artificial rainwater¹³ prepared in 0.017 mol/L acetic acid (pH 3.5). The blank sample was analysed the speciation method. Only the peaks for TeEL (an internal standard spiked to the eluent) and DML²⁺ impurities (from the Grignard reagent) were detected; the size of the former was similar to that obtained for the real rainwater samples, thus confirming that the presence of TeEL in the real samples originates mainly from the internal standard used.

4. Conclusions

An automatic and robust sample screening system which provides a reliable response to one or several lead species with no sample treatment was developed; the binary response is related to the detection limit of the method (0.5 ng/mL). If a positive result is obtained, the sample concerned is analysed with the speciation method, which discriminates among the lead species at the picogram level. The speciation method cannot be fully automated owing to the special requirements of the Grignard reaction (an inert atmosphere). Obviously, with an easily handled derivatizing reagent available, the method could have been completely automated.

Alternatives to Grignard reagent should thus be found in order to increase the volatility and stability of these organometallic compounds. Finally, although GC is the most wide used technique for this purpose as it provides higher sensitivity and resolution than HPLC, it should be noted that the presence of the organolead derivative dramatically shortens the lifetime of the chromatographic column (about four times) relative to other pollutants (e.g.. phenols, pesticides, PAHs).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant PB-95-0977 from Spain's DGICYT.

REFERENCES

- [1] Harrison, G.F.; Branica, M.; Konrad Z. (ed.), Lead in the Marine Environment, Pergamon, Oxford, 1980.
- [2] Lobinski, R. *Analyst* 1995, 120, 615.
- [3] Szpunar, J.; Lobinski, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 363, 550.
- [4] Seeber, A.; Kiesswetter, E.; Neidhart, B.; Blaszkewicz, M. *Neurotoxicol. Teratol.* 1990, 12, 653.
- [5] Lobinski, R. *Appl. Spectrosc.* 1997, 51, 260 A.
- [6] Szpunar, J.; Pellerin, P.; Makarov, A.; Doco, T.; Williams, P.; Medina, B.; Lobinski, R. *J. Anal. At. Spectrom.* 1998, 13, 749.
- [7] Ebdon, L.; Hill, S.J.; Rivas, C. *Spectrochim. Acta B* 1998, 53, 289.
- [8] Pereiro, I.R.; Wasik, A.; Lobinski, R. *Chemia Analityczna* 1997, 42, 799.
- [9] Pereiro, I.R.; Lobinski, R. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 1381.
- [10] Pereiro, I.R.; Wasik, A.; Lobinski, R. *J. Chromatogr. A* 1998, 795, 359.
- [11] Desmaele, T.; Moens, L.; Dams, R.; Sandra, P.; van der Eycken, J.; van Dyck, J. *J. Chromatogr. A* 1998, 793, 99.
- [12] Forsyth, D.S.; Iyengar, J.R. *Appl. Organom. Chem.* 1989, 3, 211.
- [13] Nerín, C.; Pons, B. *Quím. Anal.* 1994, 13, 209.
- [14] Zufiaurre, R.; Pons, B.; Nerín, C. *J. Chromatogr. A* 1997, 779, 299.
- [15] Heisterkamp, M.; Desmaele, T.; Candelone, J.P.; Moens, L.; Dams, R.; Adams, F.C. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 1077.
- [16] Lobinski, R.; Adams, F.C. *Anal. Chim. Acta* 1992, 262, 285.
- [17] Ceulemans, M.; Adams, F.C. *J. Anal. At. Spectrom.* 1996, 11, 201.
- [18] Craig, P.J.; Dewick, R.J.; van Elteren, J.T. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1995, 351, 467.
- [19] Bergmann, K.; Neidhart, B. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1996, 356, 57.
- [20] Heisterkamp, M.; Adams, F.C. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 362, 489.
- [21] Baena, J.R.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *Spectrochim. Acta B* 1999, in press.
- [22] Petit de Peña, Y.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 453.

- [23] Dresselhaus, M.S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P.C. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [24] Jino K.(ed.), *Separation of Fullerenes by Liquid Chromatography*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 1999.
- [25] Valcárcel, M.; Cárdenas, S.; Gallego, M. *Trends Anal. Chem.* 1999, in press.
- [26] Lobinski, R.; Boutron, C.F.; Candelone, J.P.; Hong, S.; Szpunar-Lobinska, J.; Adams, F.C. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2510.
- [27] Gallego, M.; Petit de Peña, Y.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4074.
- [28] Aylett, B.J. *Organometallic Compounds. The Main Group Elements*, Vol. 1, Part 2, Chapman and Hall, London, 1979.

A Fast Unit for the Simultaneous Preconcentration and Derivatization of Ionic Alkyllead Species, Followed by GC/MS Determination

Josefa R. Baena, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel,
Analytical Chemistry Division, University of Córdoba, Córdoba, Spain.

Abstract

The speciation of inorganic lead and organolead compounds in waters can be implemented by using a solid phase extraction unit in which the analytes were sorbed on C₆₀ fullerene and then eluted with n-hexane; however, derivatization with Grignard reagent requires manual operations. This paper examines the potential of sodium tetra-*n*-propylborate as derivatising reagent, which is easier to handle than Grignard reagents, with a view to the complete automatization of the previous method. Experiments were conducted in order to reduce the analysis time and improve the efficiency and robustness of the automatic unit with minimal costs. The proposed method was used to monitor lead species in rainwater by GC/MS.

1. Introduction

Organolead compounds enter the atmosphere mainly via incomplete combustion or evaporation of both anti-knocking and leaded gasoline.¹ Most of them are volatile and more toxic than inorganic lead compounds; also, they exhibit variable effects on higher and lower species.² Organometallic contaminant analyses in the environment require complex procedures involving various steps such as extraction and purification, which enable discrimination among the different forms of a metal. Speciation analyses are usually performed using a chromatographic separation technique such as gas chromatography (GC) or liquid chromatography prior to application of an element-selective, sensitive detection method.³⁻⁵ GC is unmatched in terms of resolution and sensitivity of available detectors but requires preliminary derivatization of ionic alkyllead species to render them sufficiently volatile and thermally stable to be separated. The most common derivatization methods for these compounds involve the use of a Grignard reagent, following chelation and extraction into a water-free solvent, under an inert atmosphere.⁶⁻⁸ In situ derivatization in an aqueous medium is possible using sodium tetraethylborate;^{9,10} however, this reagent only discriminates methylated species. Sodium tetra-*n*-propylborate (NaBPr₄)

and tetrabutylammonium tetrabutylborate, both only recently synthesized, allow major alkyllead compounds to be derivatized in an aqueous medium.^{11,12}

A simple flow system for the continuous preconcentration of organolead compounds onto a C₆₀ fullerene sorbent column was reported elsewhere where eluted analytes are manually derivatized with propylmagnesium chloride prepared under an argon atmosphere; speciation is accomplished by using a gas chromatograph – mass spectrometer combination.¹³ This paper reports a simplified flow system for sample pretreatment in which ionic alkyllead species are separated from the matrix by using a C₆₀ fullerene column and then eluted with *n*-hexane containing NaBPr₄ as derivatising reagent. The automatic unit is highly robust and features a reduced total analysis time for lead species. The proposed method for lead speciation was successfully applied to rainwater obtained from various urban areas.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

Stock solutions of trimethyllead (TML⁺) acetate and triethyllead (TEL⁺) chloride were prepared by dissolving appropriate amounts of the respective salts (Alfa, Barcelona, Spain) in Milli-Q H₂O (18 MΩ). Di-

methyl and diethyllead (DML²⁺ and DEL²⁺) choride were synthesized by reacting TML⁺ and TEL⁺ with iodine monochloride as described elsewhere.¹³ All stock solutions were stored in the dark at 4 °C. Working standard solutions of lower concentrations were prepared daily by appropriate dilution in 17 mM acetic acid (pH 3.5). Aqueous solutions of 3 mM sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC), 100 ppm tetraethyllead (TeEL) in *n*-hexane (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and 1.2 M sodium tetra-*n*-propylborate (NaBPr₄) in ethanol (Galab, Geesthacht, Germany), were also prepared.

2.2. Instrumental

A model GC8000/MD800 GC/MS system from Thermo-Quest (Madrid, Spain) with electronic pressure control was used at its normal settings for

separation/determination of derivatized ionic alkyllead species. The analytical column (30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 µm HP-5-MS) was connected to the transfer line (at 250 °C). The system was operated in the constant-flow mode (0.9 mL/min), using helium as the carrier gas. The GC temperature programme was as follows: initial temperature, 50 °C; hold for 3 min; ramp, 15 °C/min to 250 °C. The injection port and ion source temperature were maintained at 200 °C. The mass spectrometer was used in the electron-ionization mode, over the scan range *m/z* 70-500. The sample volume (1 µL) was injected in the split mode (1:25) and three characteristic ions per analyte were monitored (including the *m/z* for lead and that [M-CH₃]⁺ or [M-C₂H₅]⁺ ion) for identification/ quantification (Table 1).

Table 1
Quantification of Ionic Alkyllead Compounds^(a)

	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺
Retention time (min)	6.4	8.9	10.2	11.1
<i>m/z</i> selected ^(b)	253, 281	281, 309	237, 309	251, 322
Detection limit (ppt) ^(c)	6	12	4	8
Linear range (ppb) ^(c)	0.02 – 4	0.03 – 2	0.01 – 2	0.03 – 4
Correlation coefficient (r ²)	0.999	0.997	0.995	0.996
Precision (RSD, %)	5.1	3.6	4.3	4.5

^(a) Internal standardization used (TeEL, *t*_R = 9.3 min, *m/z* = 237). ^(b) Each derivative was also identified at *m/z* 208; quantification mass in italics. ^(c) Sample volume, 5 mL.

2.3. Design of the solid phase extraction and derivatization system

The preconcentration/ derivatization unit was laboratory made and specially designed for the requirements of ionic alkyllead speciation by GC/MS. The sorbent column was made from PTFE capillaries of 3 mm i.d. that were packed with 80 mg of C₆₀ fullerene (Dynamic Enterprises Ltd, Berkshire, England). Only one solid phase extraction (SPE) unit for preconcentrating ionic alkyllead species had so far been reported,¹³ even though this separation technique is commonly used to preconcentrate and clean up organic compounds prior to their determination by GC with excellent selectivity, precision and sensitiv-

ity. In this work, ionic alkyllead compounds in an acetic medium are sorbed as diethyldithiocarbamate complexes on a C₆₀ fullerene column located in the loop of an injection valve, (IV₁ in Figure 1) and subsequently eluted with *n*-hexane. Automatic derivatization was accomplished by spiking the derivatising reagent (24 mM NaBPr₄) to the eluent (containing the internal standard, TeEL). The purified extract (200 µL) was collected in a stoppered glass vial where the propylation reaction completed within 3 min of standing (Figure 1). A 1 µL aliquot was then injected into the gas chromatograph. A blank consisting of ultrapure water instead of sample was used, and the

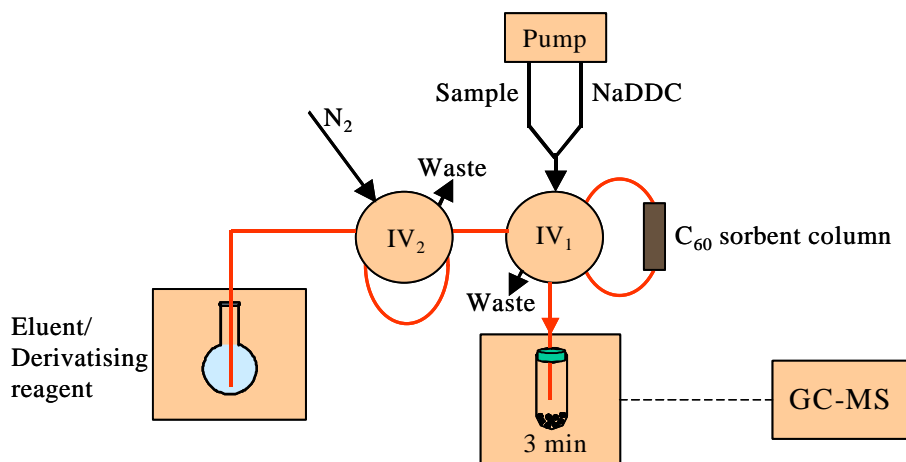


Figure 1
Schematic of the automatic system for the preconcentration/ derivatization of ionic alkyllead compounds

C₆₀ column was occasionally (*viz.* at the end of a day' work) flushed with isobutyl methyl ketone and conditioned with *n*-hexane.

3. Results and Discussion

3.1. Derivatization of ionic alkyllead species

Experiments involving various organic solvents as eluents (*viz.* *n*-hexane, ethyl acetate, chloroform and petroleum ether) were performed in order to evaluate the solubility, stabil-

ity and efficiency of NaBPr₄ in the derivatization of ionic alkyllead compounds. Eluents were saturated with the derivatising reagent to ensure the highest possible yield in every case and TeEL was spiked as internal standard. As can be seen from Figure 2, maximal yields for di- and tri-alkyllead species were achieved with *n*-hexane as eluent/derivatising medium; in addition, this solvent gave cleaner chromatograms than other more polar solvents tested. Increasing the solvent polarity decreased the

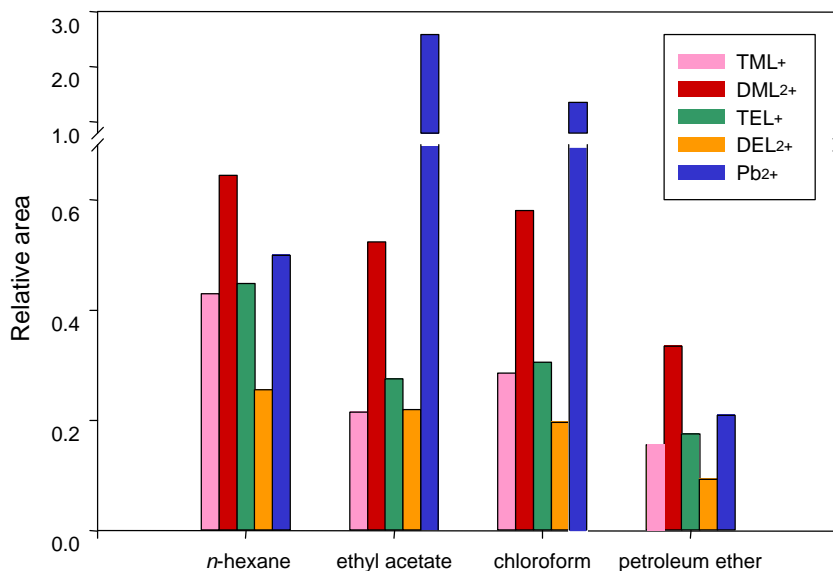


Figure 2

Comparison of signals for ionic alkylleads as a function of the eluent saturated with derivatising reagent (NaBPr₄)

efficiency of the elution/derivatization process, especially for TML⁺; also, it resulted in higher degradation of the organoleads (petroleum ether excepted) to inorganic Pb²⁺, which was detected as a tetrapropyllead derivative. The preconcentration of aqueous standards containing di- and trialkyllead compounds, and their subsequent elution/derivatization in the absence of the internal standard (TeEL) posed little problem; however, when tetraethyllead was present in the extract injected into the GC/MS, the peak for TEL⁺ increased and a new peak at 10.5 min corresponding to the methyl-diethyllead derivative appeared (see in Figure 3), which we suspected was due to the internal standard. For confirmation we used an aqueous standard containing only TML⁺, and TeEL in the eluent; in this case, the peaks for TEL⁺ and methyl-diethyllead were also observed. We can therefore conclude that TEL⁺ resulted from degradation of TeEL (Figure 3a) and methyl-diethyllead from a transalkylation reaction^{2, 14} involving TML⁺ and TeEL (Figure 3b). Ultrapure water must thus be used as blank to check for degradation of TeEL. Degradation of TeEL and the extent of the transalkylation reaction increased relative to *n*-hexane when chloroform was used as eluent (followed by ethyl acetate and petroleum ether).

The instability of NaBPr₄ when exposed to air (particularly when the commercial bottle was opened more than 10 times) precluded its use for saturation of the *n*-hexane eluent; in addition, sodium tetraalkylborates are scarcely soluble in alkanes.¹⁵ In order to solve this problem and simplify handling of the reagent, tetrahydrofuran (THF), which was recently reported to be an effective solvent for preparing NaBPr₄ solutions stable for at least 1 month¹⁴ was used. On the other hand, polar solvents which increase the solubility of NaBPr₄, hinder elution of organolead compounds. Taking into account these opposite effects, small volumes (100 μL) of concentrated solutions (1.2 M) of NaBPr₄ in THF or ethanol were added to larger volumes (5 mL) of *n*-hexane, and the resulting solutions were used as eluent/derivatising media. As expected, signals decreased with increasing polarity of the second solvent, so TML⁺ recoveries were significantly lower than with pure *n*-hexane saturated with NaBPr₄, the effect being even more marked for THF. The eluent, 24 mM NaBPr₄ (derivatising reagent) in 2:98 (v/v) ethanol-*n*-hexane containing TeEL as internal standard, yielded recoveries of 95% for all the ionic alkylleads except TML⁺, which was recovered by only 70% relative to the signals obtained with pure *n*-hexane saturated

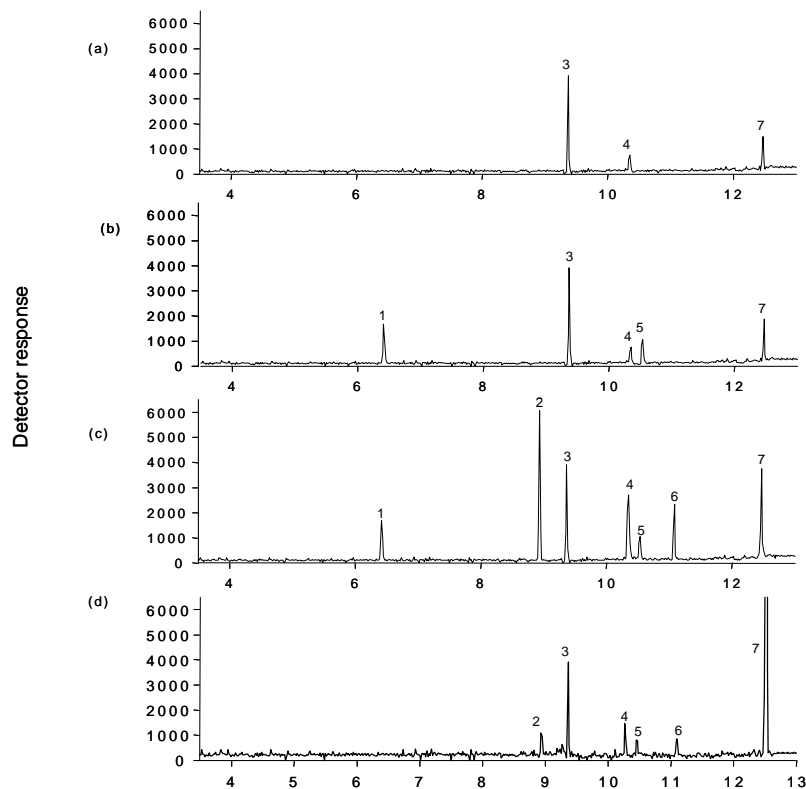


Figure 3
Chromatograms for the ion currents at m/z 208 used to monitor all propylated species. (a) Ultrapure water blank; (b) aqueous standard solution of 0.5 ppb TML^+ ; (c) aqueous standard solution containing 0.5 ppb TML^+ , DML^{2+} , TEL^+ and DEL^{2+} ; and (d) rainwater from the vicinity of a petrol station in northern Spain. Eluent: *n*-hexane saturated with NaBPr_4 containing 0.5 ppm TeEL.

with NaBPr_4 as eluent. Accordingly, in order to diminish deterioration of such an expensive reagent on successive exposure to air, minimize costs and simplify handling (*viz.* avoiding working under inert atmosphere) NaBPr_4 was prepared in ethanol, in which it remained stable for at least 1 month. Once spiked to the eluent, the reagent only remained stable for 1 day

because it was degraded to a diborane compound that exhibited a sharp peak at 9.6 min in the chromatogram.

Variable concentrations of the derivatising reagent were tested by adding between 10 and 150 μL of 1.2 M of NaBPr_4 (in ethanol) to 5 mL of eluent (*n*-hexane), always keeping the ethanol content in the eluent constant. Very similar, optimal chromatograms

(with minimal backgrounds) were obtained at volumes of the derivatising reagent above 100 μL . Finally, we examined the influence of time on the derivatization reaction by allowing the stoppered vial contents to stand for several minutes prior to injection into the GC/MS. All ionic alkyllead compounds required standing for at least 3 min; however, above 5 min, peak areas decreased as a result of the derivatives reaching the headspace owing to their high volatility.

3.2. *Features of the proposed automatic method*

Ionic alkyllead compounds were quantified by GC/MS, using TeEL as internal standard (IS); however, because it was less efficiently sorbed on C_{60} as it did not react with NaDDC to form a chelate, it was directly spiked to the eluent/derivatising mixture reagent. On the other hand, the ubiquity of organolead compounds can impose severe blank constraints in speciation analysis; thus, in previous work,¹⁶ DEL^{2+} and/or TML^+ were found to contribute to the blank signal, which was ascribed to atmospheric contamination, the glassware and the Grignard reagent. In previous experiments we showed PrMgCl (Grignard reagent) to contribute to the blank signal for DML^{2+} species.¹³ In this work, contamination due to air, glassware and reagents was mini-

mized by performing the preconcentration and derivatization steps within a flow system (consisting of PTFE material). Degradation of the IS (Figure 3a) to TEL^+ was corrected by using ultrapure water as blank. Relevant data, including linear ranges and detection limits (defined as three times the standard deviation of baseline noise divided by the sensitivity) are listed in Table 1. Replicate analyses ($n = 11$) of a mixed standard solution were conducted to assess the precision of the method, which was estimated to be 4-5%.

Omitting the inevitable differences in the condition of the analytical GC column, detection limits (DLs) between 4 and 12 ppt were easily achieved by using 5 mL of sample that can obviously be improved by using 25 mL of sample; by contrast, comparable DLs in conventional batch GC/MS methods require using large sample volumes (100 – 500 mL). Similar DLs can also be obtained with more sensitive detectors for organolead compounds, *viz.* ICP-MS (DLs, 0.7 pg/s) and MIP-AES (DLs, 0.1 – 1 pg), but using large sample volumes and tedious sample preparation procedures.¹⁷

3.3. *Applicability of the proposed GC/MS method to rainwater*

The applicability of the proposed method to rainwater samples collected

Table 2
Quantitative analysis of rainwater^(a)

Sample ^(c)	Concentration found (ppt) ^(b)			
	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺
1	<1	40 ± 2	80 ± 5	60 ± 4
2	<1	75 ± 4	95 ± 5	80 ± 5
3	<1	90 ± 5	110 ± 6	100 ± 6
4	<1	10 ± 1	34 ± 2	36 ± 3
5	<1	25 ± 2	36 ± 2	50 ± 4
6	<1	60 ± 4	75 ± 5	70 ± 4

^(a) Sample volume, 25 mL. ^(b) ± Standard deviation (n = 6). ^(c) Samples from an urban park (1,4), industrial area (2,5) and the vicinity of a petrol station (3,6) collected in northern (1-3) and southern Spain (4-6).

at different locations in northern and southern Spain was analysed. The results are listed in Table 2. TML⁺ was the only ionic alkyllead species not detected (not even by using 50 mL of sample), probably as a result of environmental degradation to DML²⁺ and Pb²⁺. The chromatograms exhibited three peaks that were identified by their *m/z* values (Table 1) as DML²⁺, TEL⁺ and DEL²⁺. An additional peak was identified as the methyl-diethyllead derivative, but it could not be quantified as there was no external standard available for this compound; it was found to be native in the samples as the transalkylation reaction in the system was not possible because TML⁺ was absent from them. Inorganic lead was also detected in all water samples (as PbPr₄), at concentrations one order of magnitude higher

than alkyllead species, which is consistent with their potential environmental degradation to Pb²⁺. By way of example, Figure 3(d) shows the chromatogram for a rainwater sample. An artificial rainwater sample prepared as described elsewhere¹³ exhibited no matrix interferences as only the peaks for TeEL (IS) and TEL⁺ (from TeEL degradation) were detected, similarly to an ultrapure water blank (see Figure 3a).

Conclusions

Organometallic speciation is frequently required in environmental analyses; however, all reported methods for this purpose involve liquid-liquid extraction, clean-up and derivatization steps, which are time-consuming. The proposed method demonstrates the possibility of using a

simple unit for sample preparation. Based on our results, the following conclusions can be drawn:

- The proposed automatic method is the simplest of all available for ionic alkyllead speciation as it enables sequential preconcentration, clean-up and derivatization with minimal sample manipulation, which ensures a high accuracy (minimal contamination/losses) and an also high throughput.
- Our experiments show that the combined use of the automatic unit and GC/MS detection is a powerful means of screening water samples for the presence of ionic alkyllead species and to identify them when no reference compounds for use as external standards are available.

- The method should allow the preconcentration/derivatization of other types of organometallic compounds and environmental matrices (air, atmospheric particulates), and be amenable to use with more sensitive detectors (ICP-MS, MIP-AES).

Finally, the organoleads dramatically shorten the lifetime of the GC column relative to other contaminants such as pesticides or PAHs.

REFERENCES

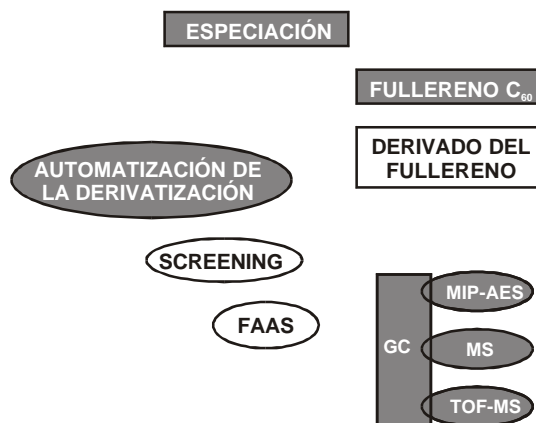
- [1] M. Heisterkamp and F.C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14, 1307-1311 (1999).
- [2] M. Hempel, J. Kuballa and E. Jantzan, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 470-475 (2000).
- [3] R. Lobinski, *Appl. Spectroscopy*, 51, 260A-278A (1997).
- [4] S. Slaets, F.C. Adams and F. Laturnus, *LC GC Int.*, 11 (9), 580-586 (1998).
- [5] J. Szpunar and R. Lobinski, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363, 550-557 (1999).
- [6] R. Lobinski and F.C. Adams, *Anal. Chim. Acta*, 262, 285-297 (1992).
- [7] C. Nerín and B. Pons, *Quím. Anal.*, 13, 209-213 (1994).
- [8] M. Heisterkamp, T. Desmaele, J.P. Candelone, L. Moens, R. Dams and F.C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 12, 1077-1081 (1997).
- [9] P.J. Craig, R.J. Dewick, J.T. van Elteren, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, 467-472 (1995).
- [10] M. Ceulemans, F. C. Adams, *J. Anal. At. Spectrom.*, 11, 201-210 (1996).
- [11] T. Desmaele, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. van der Eycken and J. van Dick, *J. Chromatography A*, 793, 99-106 (1998).
- [12] M. Heisterkamp and F.C. Adams, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 362, 489-493 (1998)
- [13] J.R. Baena, S. Cárdenas, M. Gallego and M. Valcárcel, *Anal. Chem.*, 72, 1510-1517 (2000).
- [14] P. Schubert, E. Rosenberg and H. Grasserbauer, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, 356-360 (2000).
- [15] S. Rapsomanikis, *Analyst*, 119, 1429-1439 (1994).
- [16] R. Lobinski, C.F. Boutron, J.P. Candelone, S. Hong, J. Szpunar-Lobinska and F.C. Adams, *Anal. Chem.*, 65, 2510-2515 (1993).
- [17] R. Lobinski, *Analyst*, 120, 615-621 (1995).



Capítulo V

Influencia del Detector del Cromatógrafo de Gases en la Especiación de Plomo

Chapter V
Influence of the GC Detector in
Lead Speciation



La gran variedad de metodologías orientadas a la determinación de las especies entre las que se distribuye el plomo en muestras medioambientales implica el empleo de diversas herramientas. Múltiples opciones de tratamiento de muestra, técnicas de separación y sistemas de detección se ofrecen al analista, que no siempre dispone de todos los elementos necesarios para extraer la información sobre las posibilidades prácticas de cada sistema. Con el objetivo de establecer una comparación sistemática entre distintos sistemas de detección, en este Capítulo se describe el análisis de la especiación de plomo en muestras de agua de lluvia, empleando para ello el mismo sistema de tratamiento de muestra en continuo descrito en el apartado anterior de la Memoria. Los analitos, preconcentrados sobre C₆₀ y derivatizados en el sistema automático en las mismas condiciones experimentales, se inyectan en un cromatógrafo de gases acoplado a tres detectores distintos: MS, MIP-AES e ICP-TOFMS. Las características analíticas, así como las ventajas e inconvenientes prácticos de cada uno de ellos son resaltados.

Comparison of Three Coupled Gas Chromatographic Detectors (MS, MIP-AES, ICP-TOFMS) for Organolead Speciation Analysis

Josefa R. Baena, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel

Analytical Chemistry Division, University of Córdoba,
E-14071 Córdoba, Spain

Joeri Leenaers, Freddy C. Adams

Department of Chemistry, University of Antwerp (UIA),
Universiteitsplein 1, 2610 Wilrijk, Belgium

An automatic unit for the screening of rainwater is used for the determination of organolead compounds using different detectors coupled to a gas chromatograph. A systematic overview is given of the advantages and disadvantages of several detectors (electron ionization mass spectrometry, EI-MS, microwave induced plasma atomic emission spectrometry, MIP-AES, and inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry, ICP-TOFMS) for the speciation of organolead compounds on the basis of sensitivity, selectivity and reliability. C₆₀ fullerene and RP-C₁₈ were used as sorbent materials for these compounds. The primary assets of the fullerene sorbent compared to C₁₈ sorbent are high sensitivity and selectivity, resulting from efficient adsorption due to large surface area and interstitial volume. Among the detection systems GC/ICP-TOFMS is the most sensitive, with absolute detection limits of ca. 15 fg of organolead compounds (as lead) using 5 mL sample volumes. Except for diethyllead, similar sensitivities were obtained by MIP-AES. GC/MS is intrinsically the most specific option, as the species are detected directly from molecular information. The precision is similar for all detectors. The screening of rainwater from different locations showed that samples collected in countries in which leaded gasolines are now banned contain organolead species at concentrations below 2 pg/mL, levels that can only be detected for sample volumes of 25 mL and using MIP-AES or ICP-TOFMS as detectors, their determination being impossible by GC/MS.

1. Introduction

Elemental speciation analysis became an important subject of analytical chemistry research mainly as a result of the growing environmental concern that the toxicity and mobility of elements depend on their chemical form.¹ For instance, the organometallic form of an element usually has a higher toxicity than its inorganic form;² even in the case of arsenic, which trivalent methylation intermediates are specially toxic.³

In this context, the speciation of organolead compounds has special relevance, since they are used worldwide as antiknocking agents in gasoline and are thus discharged in enormous quantities into the atmosphere.⁴ The determination of individual organolead species requires the separation of the compounds and their measurement with highly sensitive detection techniques able to perform analyses at the ng/L level. This goal is achieved by coupling powerful chromatography techniques with sensitive and specific detection systems based on electron impact ionisation mass spectrometry (EI-MS),⁵⁻⁷ atomic absorption spectrometry (AAS),^{8,9} inductively coupled plasma or microwave-induced plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES^{10,11} or MIP-AES^{4,12-14}), or inductively cou-

pled plasma mass spectrometry (ICP-MS).^{2,15-17}

In general, gas chromatography (GC) is superior to liquid chromatography with regards to resolution, and very often also in terms of separation time and sensitivity,¹ but organolead compounds occurring as salts, need to be derivatized into a volatile and thermally stable form prior to their separation by GC. Derivatization methods are of two distinct types: those based on the use of tetraalkylborates (ethylation,^{18,19} butylation^{4,9,20} or propylation^{4,7,16}), and those applying alkylation through Grignard reagents.^{5, 6, 21, 22} In both cases, an extraction step is needed, completed by a series of clean-up operations which lengthen the analysis time. Hence, a lot of efforts regarding sample preparation procedures have been focused on shortening the duration of the major steps (extraction, derivatization) and reducing the overall number of individual steps.²³ To implement this idea, flow injection (FI) systems arise as a promising option in sample preparation for speciation analysis.²⁴ Up to now only one FI system for the continuous preconcentration of organolead compounds has been reported.⁶ It is based onto a C₆₀ fullerene sorbent column and derivatization of the eluted analytes with a Grignard reagent in an argon atmosphere, the measurement being

accomplished by GC/MS. The Grignard derivatization method was surpassed by the introduction of a tetraalkylborate reagent (sodium tetrapropylborate, NaBPr₄) that can be directly spiked to the eluent in a sample preparation that can be completely automated.⁷

Many reviews on speciation analysis of organometallic compounds can be found in the literature.^{23,25,26} They include the use of different detection techniques and various methods for sample pretreatment and preconcentration and provide presently available knowledge on the actual state-of-the-art of many methods with the main advantages and pitfalls under specific working conditions. The present paper provides a critical comparison of 3 gas chromatographic detectors (EI-MS, MIP-AES and ICP-TOFMS), using the same sample preconcentration/derivatization system⁷ for the speciation of organolead compounds in rainwater and describes the analytical figures of merit and the relevant points to take into account when working with these particular detectors. The advantages of the automatic solid phase extraction *versus* manual liquid-liquid extraction are also discussed.

2. Experimental section

2.1. Apparatus

The samples were preconcentrated and derivatized using a flow system consisting of a Minipuls-2 peristaltic pump (Gilson, Villiers-le-Bel, France) furnished with polyvinylchloride pumping tubes, two injection valves (Rheodyne, Cotati, CA) and PTFE tubing (0.5 mm i.d.) for coils. The sorbent column is laboratory-made using PTFE capillaries (3 mm i.d.) packed with 80 mg of C₆₀ fullerene or RP-C₁₈ and sealed with small cotton wool beds to prevent loss of sorbent material.

Capillary GC employing a HP-1 column (25 m × 0.32 mm i.d. × 0.17 μm film) coated with 100% cross-linked dimethylpolysiloxane (Supelco, Madrid, Spain) was applied for separation of the species. Ultrapure grade helium (99.9999%) was used as carrier gas for the GC/MS system (Air Liquide, Sevilla, Spain) and for the GC/MIP-AES system (L'Air Liquide, Liège, Belgium). In the case of GC/ICP-TOFMS, the carrier gas was hydrogen (99.9997% containing 0.1% xenon (99.995% purity) obtained also from L'Air Liquide.

The separation-detection of the organolead compounds was done using the analytical systems summarised in Table 1. A Fisons GC8000/MD800 gas chromatograph/electron impact mass spectrometer (Thermo, Madrid, Spain) is

based on a quadrupole analyser and a photomultiplier detector; instrumental control and data acquisition were done using Masslab software (also available from Thermo). A HP Model 5890 Series II gas chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA) is hyphenated with a HP Model 5921 A atomic emission detector (AED) and governed via HP 5895 A GC ChemStation with HP 35920 A GC-AED software. A CP 9001 gas chromatograph (Chrompack, Bergen op Zoom, The Netherlands) equipped with an air-cooled on-column injection system is hyphenated with the ICP torch of a commercially available Renaissance ICP-TOFMS system (LECO Corporation, St. Joseph, MI, USA), via an in-house constructed heated transfer line.² Data were recorded using Renaissance software (LECO) and Origin Professional 6.0 Software (Microcal Software Inc., Northampton, MA, USA). Injection of the analytes was done by means of a narrow tip Hamilton 75N syringe (5 μ L, Chrompack).

2.2. Reagents

C₆₀ fullerene (99.999%) provided by Dynamic Enterprises LTD (Berkshire, England) and RP-C₁₈ LC sorbent, 60 – 100 μ m particle size purchased from Millipore, (Madrid, Spain) were used as sorbent materials. Stock solutions of trimethyllead

(TML⁺) acetate and triethyllead (TEL⁺) chloride, purchased from Alfa (Barcelona, Spain) were prepared by dissolving the respective salts in ultrapure Milli-Q water (Millipore). Dimethyl- (DML²⁺) and diethyllead (DEL²⁺) chloride were synthesised by reaction of TML⁺ and TEL⁺ solutions with iodine monochloride (0.1 mol/L in concentrated hydrochloric acid) in the appropriate molar ratio.⁶ Standard solutions (0.5 mg/L as lead) were stored in the dark at 4°C and diluted solutions were prepared daily by dilution in 1.7×10^{-2} mol/L acetic acid (pH 3.5). A 3×10^{-3} mol/L aqueous solution of sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC), supplied by Sigma-Aldrich (Madrid, Spain) was also employed.

NaBPr₄ was purchased from Galab (Geesthacht, Germany) and dissolved in ethanol in a concentration of 1.2 mol/L. Other chemicals and solvents were supplied by Merck (Darmstadt, Germany).

2.3. Analytical Method

The preconcentration/ derivatization unit is shown in . Volumes of 5–25 mL of aqueous standards or water samples containing organolead species at pg to ng levels (as lead) in 1.7×10^{-2} mol/L acetic acid were aspirated (flow rate, 2.2 mL/min) and mixed with a 3×10^{-3} mol/L NaDDC stream (flow rate, 0.4 mL/min). Diethyldithiocarbamate complexes were

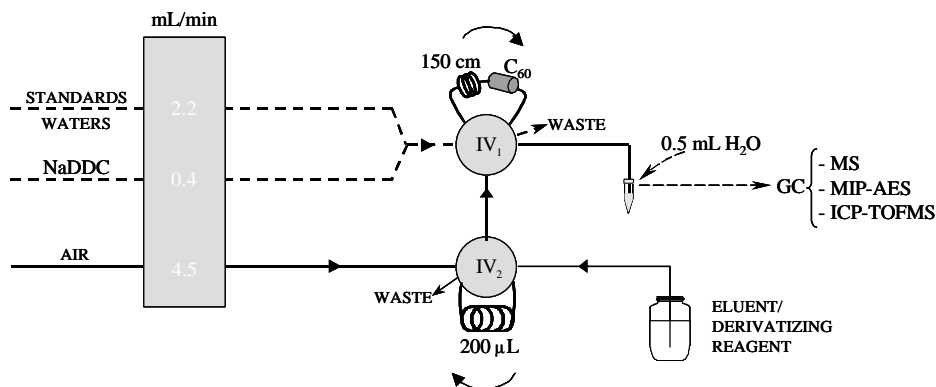


Figure 1
Automated unit for the preconcentration/propylation of ionic alkyllead compounds in waters. IV, injection valve; GC, gas chromatograph coupled to EI-MS, MIP-AES and ICP-TOFMS. Preconcentration and elution steps in discontinuous and bold lines, respectively.

formed in the reaction coil (150 cm) and then sorbed on a C_{60} fullerene column. The elution/derivatization was performed using 2.4×10^{-3} mol/L $NaBPr_4$ as derivatizing reagent in *n*-hexane (eluent). An air stream (flow rate, 4.5 mL/min) was used first to remove any residual water from the system and then as the carrier of the eluent/derivatizing reagent. The organic eluate ($\approx 200 \mu\text{L}$) was collected in an eppendorf vial and left to settle for 3 min to complete the derivatization; the excess of $NaBPr_4$ was removed by adding 0.5 mL of ultrapure water (this step was not necessary for GC/MS measurements). Aliquots of 1 μL of the *n*-hexane phase were manually injected into the gas chromatograph. A blank consisting of ultrapure water instead of sample was used and

the C_{60} column was flushed at the end of each working day with isobutyl methyl ketone and conditioned with 200 μL of *n*-hexane.

Table 1
Operating conditions of GC/MS, GC/MIP-AES and GC/ICP-TOFMS

	MS	MIP-AES	ICP-TOFMS
		<i>injection parameters</i>	
vol mode	1 μ L split, 1:25	1 μ L cooled injection system in on-column mode	1 μ L on-column
temp	250 °C	270 °C	45 °C
		<i>GC parameters</i>	
carrier gas, inlet pressure	He, 50 kPa	He, 130 kPa	H ₂ , 200 kPa
oven program	45 °C→30 °C/min→270 °C	45 °C→30 °C/min→270 °C	60 °C→3 °C/min→200 °C
transfer line	HP-1 column	HP-1 column	self-constructed, heated copper/nickel tube
transfer line temp	250 °C	270 °C	270 °C
		<i>detection parameters</i>	
	characteristic <i>m/z</i> , quantification <i>m/z</i> underlined	Wavelength: 405.783 nm, 261.410 nm	Isotopes: ²⁰⁴ Pb, ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb, ¹²⁴ Xe, ¹²⁶ Xe
	TML ⁺ 208, <u>253</u> , 281 DML ² 208, <u>281</u> , 309 TEL ⁺ 208, 237, <u>309</u> DEL ² 208, <u>251</u> , 322 ⁺ Pb ²⁺ 208, <u>251</u> , 337	Operating mode, scan mode	rf power, 1.20 kW
	scan range <i>m/z</i> , 70 – 500	He make-up gas flow: 300 mL/min, measured at the cavity vent scavenger gases: H ₂ pressure 621 kPa (90 psi) O ₂ pressure 138 kPa (20 psi)	rf frequency, 40. 68 MHz
	ionization mode, electron ionization ion energy, 70 eV	spectrometer purge flow, 1.5 L/min of N ₂ solvent vent-off program , on (2.75 min)→off (3.10 min) →on	make-up flow, 0.96 L/min auxiliary gas flow, 1.25 L/min
	ion source temperature, 200 °C	column-detector coupling, column to cavity cavity temperature, 270 °C	plasma gas flow, 16.0 L/min integration time, 102 ms spectral-generation frequency, 20.000 kHz

3. Results and discussion

Recently developed procedures for the speciation of organolead compounds are based on *in situ* propylation with NaBPr₄ in an acetic acid-sodium acetate buffer medium of pH 4.5 following liquid-liquid extraction of the now apolar propylated species with *n*-hexane.^{2,4} Separation and de-

tection of the different species was carried out using GC/MIP-AES⁴ or GC/ICP-TOFMS.² An automated alternative was developed using a solid-phase extraction system, in a method based on the formation of neutral chelates between ionic alkyllead compounds and NaDDC, which were then preconcentrated on a C₆₀ sorbent column.⁷ The elution with

n-hexane containing the derivatizing reagent (NaBPr₄) enabled the complete automation of the derivatization step. In the present work, this latter method is applied to compare the analytical features of the 3 detectors after GC separation. For the GC separation a suitable oven program must be applied in order to obtain baseline separation of the organolead species within a sufficiently short time. The oven program conditions used are summarized in Table 1, as well as the other working conditions. A description of the automated sample preparation as well as a discussion of the different detection systems is summarized below.

3.1. Automated Sample Preparation

The influence of all variables affecting the sample preparation and derivatization was studied by using GC/MS detection. Ionic alkyllead species were complexed with NaDDC; chelate adsorption on C₆₀ fullerene was maximum for all compounds at pH 1.5–8.0. As other metals present in water are able to react with the chelating reagent, displacing organolead compounds from the original chelate, a systematic study was made. It appeared that only Fe³⁺ interfered at concentrations 600 times higher (ca. 50 ng/mL) than that of organolead compounds (as lead). Unless samples are highly contami-

nated, the Fe³⁺ concentration does not exceed a few µg/mL but even such content interferes with the proposed method. The interference was avoided by preparing the samples in 1.7×10⁻² mol/L acetic acid (pH 3.5) and the iron (III) acetate complex is not adsorbed on the C₆₀ column.

Experiments involving various organic solvents as eluents saturated with the NaBPr₄ derivatizing reagent were also performed. Increasing the solvent polarity decreased the efficiency of the elution/derivatization process, especially for TML⁺, and increased the degradation of the organolead compounds to inorganic Pb²⁺ (which is detected as a tetrapropyllead).

Tetraethyllead (TeEL) is often spiked as internal standard to the eluent but causes several problems in the chromatograms: (i) a peak corresponding to TEL⁺ is observed which resulted from the degradation of TeEL; (ii) a peak corresponding to the methyldiethyl derivative appeared due to a transalkylation reaction involving TML⁺ (from an aqueous standard) and TeEL.^{27,28} Hence, it was decided to omit its use, although the fluctuations of the plasma during a working day could be corrected using a suitable internal standard, such as exotic elements (not present in real samples). On the other hand the instability of NaBPr₄ when exposed to

air precluded its use for saturation of the *n*-hexane eluent. Therefore, the derivatizing reagent at concentrations 1.2 mol/L NaBPr₄ was prepared in ethanol and aliquots of 100 μL were added to 5 mL of *n*-hexane to obtain a final concentration of the derivatizing reagent of 2.4×10^{-3} mol/L. In these conditions the derivatizing reagent remains stable for at least 1 month in ethanol. The stability is reduced to

only 1 day in *n*-hexane because the reagent degrades to a diborane compound. Finally, the influence of time on the derivatization reaction was examined by allowing the stoppered eppendorf vial contents to stand several minutes prior to injection into the GC/MS. All ionic alkyllead compounds required standing for at least 3 min.

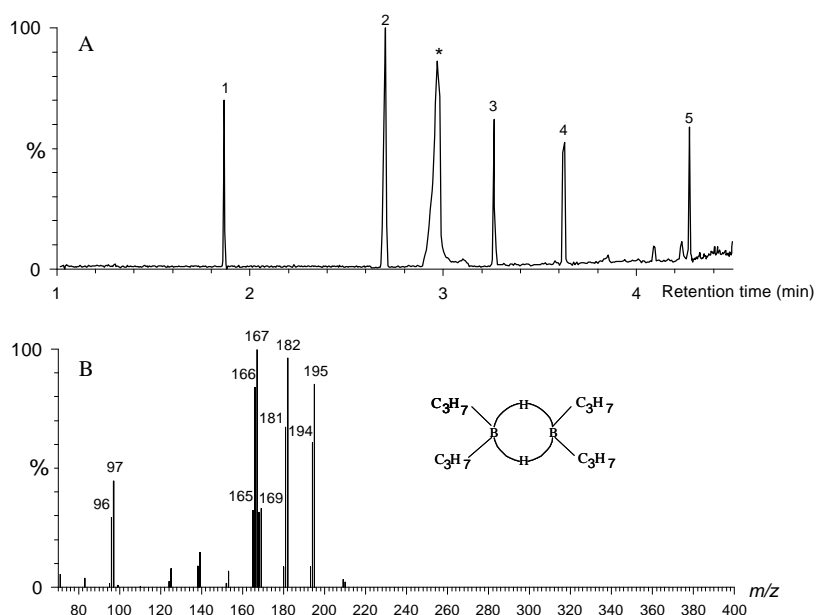


Figure 2

(A) Chromatogram of the ion current at m/z 208 used to monitor all propylated species (B) Full-scan EI mass spectrum from the diborane compound (asterisk peak). Sample: aqueous standard solution containing 0.5 ng/mL TML⁺(1), DML²⁺ (2), TEL⁺ (3) and DEL²⁺ (4). Eluent: *n*-hexane saturated with NaBPr₄. Peak 5 corresponds to inorganic Pb²⁺. For details see text.

3.2. GC/MS

Mass spectrometry enables the unequivocal identification of the species by means of the selection of characteristic fragment ions for each compound in their individual mass spectra. Taking into account that organometallic species are subject to transalkylation or decomposition reactions^{7,27} and the fact that no reference compounds are available for confirmation of the products of such reactions, this property is very useful. Indeed, it was possible to assign peaks in the chromatograms that do not correspond to the analytes. For example, the compound methyl-diethyllead, resulted from a transalkylation reaction involving TML⁺ and TeEL in organic medium, can be easily detected. In addition, it was also possible to trace the decomposition of the propylating reagent (NaBPr₄) in organic phases (*n*-hexane, chloroform, ethyl acetate and petroleum ether) which was transformed into a diborane compound [(C₃H₇)₄B₂H₂]. A shows the chromatogram of an aqueous standard solution of organolead compounds. It shows the decomposition of the derivatizing reagent which can be followed by a broad peak (denoted with an asterisk) whose intensity increases with the length of time that the borate remained in the saturated *n*-hexane phase. Unambiguous identification is

possible through the study of its EI mass spectrum (see Figure 2B). The degradation of the organolead standards to inorganic Pb²⁺ can also be detected as the tetrapropyllead (peak 5 in Figure 2) but this peak also includes a contribution due to inorganic lead present in the original sample.

Using the manifold depicted in Figure 1 and the above conditions, several calibration graphs were measured for all the organolead compounds. Detection limits were calculated as three times the standard deviation of the baseline noise divided by the sensitivity. Absolute detection limits take into account the sample (5 mL), eluent (200 μL) and injection (1 μL) volumes. Replicate analyses (n=11) of a mixed standard solution (0.5 mg/mL) to assess the precision of the method provide the RSDs and figures of merit summarized in Table 2. It shows that the combined use of the automatic unit and GC/MS detection is a suitable tool for the analysis of organolead compounds in waters, since the detection limits achieved (4 – 12 pg/mL for 5 mL of sample) are similar to those provided by more sensitive detectors in conventional batch methods using large sample volumes and several-steps preparation procedures, such as ICP-MS or MIP-AES with DLs of 0.1 – 1 pg.²⁹

Table 2

Analytical characteristics for speciation analysis of organolead compounds in aqueous samples. (Sample volume, 5 mL)

	<i>GC/MS</i>				<i>GC/MIP-AES^d</i>				<i>GC/ICP-TOFMS</i>			
	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺
detection limit (pg/mL as Pb)	6	12	4	8	0.42 (0.4)	0.46 (1.5)	0.58 (1.3)	0.83 (1.5)	0.40	0.47	0.47	0.60
absolute detection limit (fg as Pb)	150	300	100	200	11 (11)	12 (38)	15 (33)	21 (38)	10	12	12	15
linear range (pg/mL as Pb)	20–400	30–200	10–200	30–400	1-250 (1–100)	1-100 (3-70)	1.5-250 (3-100)	2-400 (3-100)	1-500	1-500	1.5- 500	2-500
RSD (%), n=11	5.1	3.6	4.3	4.5	4.9 (5.8)	3.0 (4.3)	3.6 (4.0)	3.4 (3.8)	2.9	4.9	3.2	4.9
regression coefficient	0.999	0.998	0.997	0.998	0.999 (0.999)	0.998 (0.994)	0.999 (0.998)	0.999 (0.997)	0.997	0.997	0.999	0.998

^a In brackets results obtained with RP-C₁₈

3.3. GC-MIP-AES

Due to the small size of the microwave induced plasma, it is very prone to interferences. If too large amounts of organic compounds reach the plasma with the GC effluent, the baseline noise is increased and the lifetime of the discharge tube drastically shortens. It was reported previously that the amount of borate added for the manual derivatization should be limited to avoid carbon com-

pounds accumulation in the discharge tube.⁴

Direct injection of the eluate from the eppendorf vial (see Figure 1) into the GC/MIP-AES was not possible due to the formation of a white precipitate (presumably refractory oxides of boron) on the walls of the discharge tube, severely damaging or even destroying it. In order to evaluate the interferences due to the introduction of excess of NaBPr_4 on the

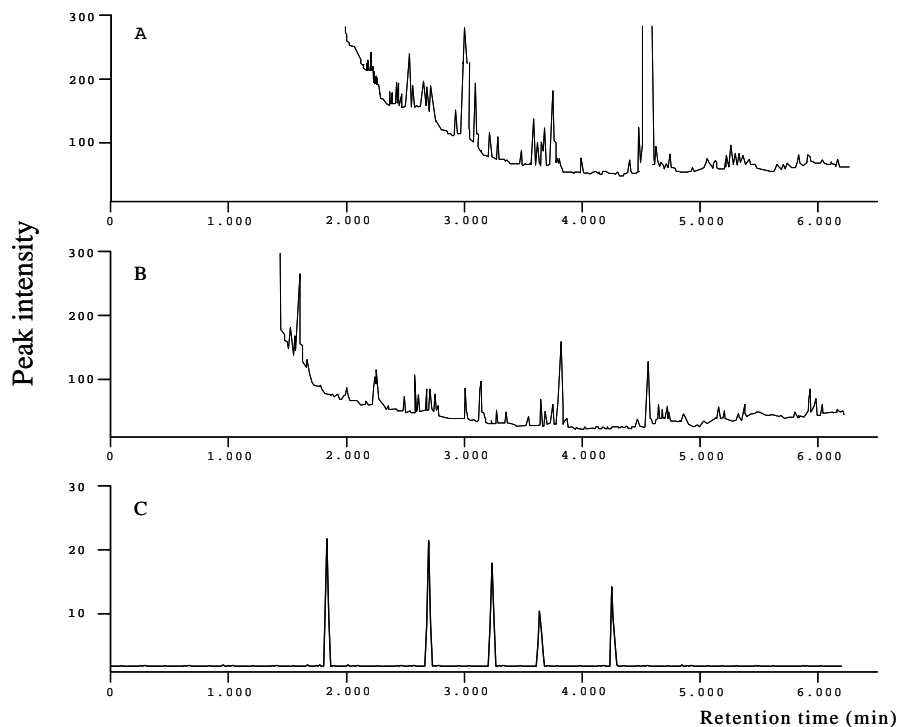


Figure 3

Chromatogram of a mixture of propylated organolead standards (50 pg/mL (as lead) of each species with simultaneous determination of carbon (A, B) at 247.587 and lead (C) at 261.418 nm. Without (A) and with (B) elimination of the excess of derivatizing reagent in the final *n*-hexane phase

reliability of the method, as well as to protect the discharge tube, measurements were made of a lead- and a carbon-specific wavelength within the same chromatographic run. The AED is equipped with a photodiode-array detector allowing simultaneous determination of up to four elements provided their emissions are in a wavelength range of 20 nm in the visible and 40 nm in the ultraviolet region.³⁰ Lead and carbon can be measured at different wavelengths, but only the lines at 247.857 nm for carbon and 261.418 nm for lead can be measured simultaneously. Although the lead emission at 261.418 nm is 2.4 times less sensitive than the line which is commonly used for lead measurements at 405.783 nm, these lines were selected for the study using standard solutions of the analytes (TML⁺, DML²⁺, TEL⁺ and DEL²⁺) at a concentration of 50 pg/mL (as lead) each. The eluent (*n*-hexane) contained the derivatizing reagent at a concentration 2.4×10^{-3} mol/L. Several carbon-containing compounds, that were well separated from each other and also from the lead-containing analytes, were detected in the chromatogram of the eluate (Figure 3A). They were intense enough to damage the discharge tube. The most intense of these peaks (retention times, 3.0 and 4.6 min) could be prevented from reaching the plasma by using a sol-

vent venting option between the DML²⁺ and TEL⁺ peaks and after 4.3 min, but this precaution was unable to avoid the white precipitation formation on the discharge tube. The compounds eluted before 3.0 min in the chromatogram, hence needed to be decreased and this was achieved by adding 0.5 mL of water to the eluate, thus extracting the excess of borate from the organic phase (Figure 3B). Employing this additional step, the lifetime of the discharge tubes was remarkably increased, as well as the sensitivity of the method. This clean-up step was manually performed as shown in Figure 1.

The analytical figures of merit are listed in Table 2. The FI method provides detection limits between 2 and 9 times lower than those achieved using manual preconcentration/derivatization of the sample⁴ and they are similar to those obtained with ICP-TOFMS.² This increase in sensitivity with respect to liquid-liquid extraction used in manual procedures can be ascribed to the high sorption capacity of C₆₀ fullerene as a result of its large surface area.³¹ Organolead compounds are only retained if complexed and other compounds (viz. NaDDC, acetic acid) which are employed in the method or present in samples are not adsorbed on C₆₀, thus increasing the selectivity. The chromatograms obtained in the solid

phase extraction method are also cleaner than those of manual alternatives, yielding a very stable baseline and therefore enhancing the signal to noise ratio (see Figure 3C).

A comparison between the EI-MS and MIP-AES detection using the proposed method can be made through the results listed in Table 2. Absolute detection limits (in fg as lead) are about 4 and 25 times lower for MIP-AES than for EI-MS in agreement with literature data which show MIP-AES to be ca. 10 times more sensitive than EI-MS.^{5,29} The highest enhancement was obtained for DML²⁺ and the lowest for DEL²⁺, probably due to condensation losses of the later in the transfer line of the instrument since higher temperatures are required for its elution. In this comparison it was not considered that for MS detection split injection 1:25 was used, so on-column injection should provide higher sensitivity. The precision (50 pg/mL of standards, n=11) is similar for both techniques as it is mainly due to the automatic sample preparation unit.

3.4. GC/ICP-TOFMS

The high popularity of ICP-MS is mainly due to advantages such as low detection limits, the multi-element capabilities, the wide linear dynamic range or the ability to obtain isotopic information on the elements. The

coupling of GC to ICP for speciation studies requires a more complicated interface between both instruments than that for MS and MIP (see Table 1). In this work, the transfer line consists of a chromatographic capillary inserted in a heated nickel and copper tube (3.17 mm inner diameter, 1.5 m length), mounted externally to the gas chromatograph and extended 80 mm within the central channel of the ICP torch. This transfer line ensures the required flexibility in order to allow small movements in all directions to adjust the ICP torch position.²

Precautions must be taken into account concerning the plasma, especially the salt content of the sample is critical since both sampler and skimmer cones can be eroded by large amounts of salt. This affects the ion input aperture regulating the ion stream and therefore the sensitivity. In the proposed method, the eluent contains a high concentration of NaBPr₄ which could produce the above mentioned effect in case that it reaches the ICP torch. In order to overcome this problem, it was decided to extract the excess of the derivatizing reagent by adding 0.5 mL of water to the eluate (as with the MIP-AES detector). This clean-up step ensured the integrity of the interface and the reliability in the measurements.

Table 2 summarizes the analytical characteristics of the method using this detector. The sensitivity achieved as absolute detection limits is similar to that provided by liquid-liquid extraction,² since the baseline noise in ICP-TOFMS is mainly due to the plasma fluctuations. Comparable results were obtained with MIP-AES for all the organolead compounds except for DEL²⁺, whose detection limit was decreased up to 15 fg (as lead). Moreover, the use of ICP-TOFMS provides a wider linear range than the other detectors, especially favouring the measurement of DML²⁺. Since the analytical features are almost identical than those for MIP-AES, similar conclusions were achieved when ICP-TOFMS was compared with EI-MS: the detection limits were about 8 and 25 times lower than those obtained with EI-MS. In this case TEL⁺ is the least enhanced compound instead of DEL²⁺ (as happened using MIP-AES). The precision (50 pg/mL of standards, n=11) was similar in all detectors.

3.5. Comparison of C₆₀ and RP-C₁₈ Sorbents using GC/MIP-AES

RP-C₁₈ has been extensively used as sorbent material to preconcentrate metals (as neutral chelates) and organic compounds. In a model system, pyrrolidine dithiocarbamate was used to form a chelate with lead in a FI

system; the chelate was subsequently adsorbed on a C₆₀ minicolumn and eluted into an atomic absorption spectrometer. Results were compared with those obtained using a RP-C₁₈ bonded silica minicolumn, the primary assets of the C₆₀ fullerenes in this respect are a high sensitivity arising from efficient adsorption and a high selectivity derived from the special features of this new sorbent material.³²

A comparison between C₆₀ and RP-C₁₈ sorbents for the preconcentration of organolead compounds is assessed here for the first time. For this purpose, two minicolumns were packed with 80 mg of C₆₀ fullerene (1.1 cm × 3 mm i.d.) and 80 mg of RP-C₁₈ (1.6 cm × 3 mm i.d.) and the FI system depicted in Figure 1 was used. The effect of pH on the alkyllead chelates adsorption was studied over the range 1–10 by adjusting the organolead standard solution with dilute nitric acid or sodium hydroxide. The optimum adsorption range was different in each case. The maximum adsorption was achieved at pH 1.5–6.0 or 3.0–8.0 for dialkyl/trialkyllead species, and 4.5–6.2 or 5.1–7.9 for dialkyl/trialkyl species, respectively when using C₆₀ and RP-C₁₈. The wider optimum pH range for C₆₀ is due to larger adsorption capacity than for RP-C₁₈.³² Chelate formation prevails over the ligand protonation and the hydrolysis of the com-

pounds in acid medium. The signal for alkylleads decreased above pH 6 as the likely result of the hydroxyl group competing with the reagent to form a hydrophilic compound (Pb-ionic alkyl-OH).⁶ The effect of other chemical variables (viz. NaDDC concentration, eluent) as well as flow variables, was the same for C₆₀ and RP-C₁₈. Therefore, the same flow system can be used with both sorbent materials.

Under the optimal chemical conditions, the manifold depicted in Figure 1 was used with two C₆₀ or RP-C₁₈ columns and a sample volume of 5 mL to investigate the analytical characteristics using GC/MIP-AES technique. Several calibration graphs were run with aqueous standards of organolead compounds at pH 3.5 and 5.5 for C₆₀ and RP-C₁₈ sorbents, respectively. Table 2 lists the figures of merit for both sorbents. Detection limits for C₆₀ fullerene were about

two or three times lower than for RP-C₁₈. The sensitivity (slope of the calibration graph) was higher for C₆₀ fullerene than for RP-C₁₈ probably because of the higher adsorption capacity of fullerenes; so for C₆₀ enhancement factors between 1 and 3 times higher than for RP-C₁₈ were obtained. The precision (50 pg/mL, n=11) was similar for all compounds.

The effect of metal ions present at significant concentrations in rain-water, that are able to form complexes with the reagent (NaDDC) was also examined by using the two columns. Major elements (Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺) do not react with NaDDC; thus only the common transition elements such as Fe³⁺, Cu²⁺, Co²⁺, Zn²⁺ and Mn²⁺ were studied at concentrations up to 50 ng/mL together with organolead compounds at 50 pg/mL. The tolerance limit of each foreign specie was taken as the largest amount yielding a response less than

Table 3
Tolerated ratios of foreign cations to analyte in the determination of 50 pg/mL (as lead) of organolead compounds

foreign cation	tolerated ratio			
	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺
Co ²⁺	1000 ^a , 700 ^b	1000 ^{a,b}	1000 ^a , 700 ^b	1000 ^{a,b}
Mn ²⁺	1000 ^a , 600 ^b	1000 ^{a,b}	1000 ^a , 600 ^b	1000 ^{a,b}
Cu ²⁺	1000 ^a , 500 ^b	1000 ^{a,b}	1000 ^a , 500 ^b	1000 ^{a,b}
Zn ²⁺	1000 ^a , 300 ^b	1000 ^a , 500 ^b	1000 ^a , 500 ^b	1000 ^{a,b}
Fe ³⁺	1000 ^a , 400 ^b	1000 ^{a,b}	1000 ^{a,b}	1000 ^a , 600 ^b

^a With C₆₀ fullerene. ^b With RP-C₁₈

the analytical signal \pm three times its standard deviation for 50 pg/mL of the analyte. As follows from Table 3, the selectivity is higher for C₆₀ fullerene owing to its larger surface area relative to RP-C₁₈; this allows the adsorption of both analyte and interferent chelates. In addition, the higher interstitial volume of C₆₀ ensures a more uniform distribution of the chelates throughout the column and hence a readier elution. On the other hand, the lower pH of the sample when using C₆₀ (pH 3.5) relative to RP-C₁₈ (pH 5.5) also influences the selectivity. Trialkylleads are subject to more severe interferences than dialkyllead when using RP-C₁₈, probably because their adsorption

constants are lower. As was mentioned before, the only interferent found when using C₆₀, namely Fe³⁺, can be avoided by preparing the samples in acetic acid medium at pH 3.5.

3.6. *Applicability of the Method to Rainwater Samples*

Residues of alkyllead compounds in rainwater were determined by the automatic FI method using the different detectors. Samples were collected at different locations in Spain and Belgium and analysed within 24 hours after their collection. The results are significantly different for both countries as can be seen in Table 4. Taking into account the low concentration of these species in surface

Table 4
Concentrations (pg/mL) and percent RSDs (n=3) of organolead species from various rainwaters from Spain (1–3) and Belgium (4–9)

sample	concentration found (pg/mL)			
	TML ⁺	DML ²⁺	TEL ⁺	DEL ²⁺
1	<1	10.4 (4.8)	34.2 (5.8)	36.1 (6.1)
2	<1	25.7 (5.4)	36.3 (5.2)	50.5 (6.5)
3	<1	60.9 (4.6)	75.5 (5.3)	70.6 (5.1)
4	0.80 (5.0)	<0.09	0.72 (5.5)	0.66 (6.1)
4 ^a	0.76 (3.9)	<0.09	0.77 (5.2)	0.62 (8.1)
5	2.09 (4.3)	<0.09	<0.12	1.03 (5.8)
5 ^a	2.20 (3.2)	<0.09	<0.09	0.98 (7.1)
6	1.43 (4.2)	0.14 (7.2)	<0.12	0.85 (4.7)
6 ^a	1.37 (3.6)	0.15 (6.6)	<0.09	0.90 (6.7)
7	0.89 (5.6)	0.52 (5.8)	<0.12	0.54 (7.4)
7 ^a	0.93 (4.3)	0.49 (6.1)	<0.09	0.58 (8.6)
8	0.58 (5.2)	4.0 (5.0)	<0.09	2.56 (3.5)
9	0.55 (5.5)	20.6 (3.9)	<0.09	11.8 (6.2)

Samples analyzed by MS (1–3), MIP-AES (4–7) and ICP-TOFMS (4^a–7^a, 8,9)

waters a sample volume of 25 mL was taken in order to achieve low detection limits. The concentration in the samples from Spain (1–3) were considerably higher than those obtained in Belgium. (4–9), probably because leaded gasoline is not yet completely ruled out in Spain. The composition appeared also to be dependent on the specific location, the Spanish samples having a lower concentration in TML⁺ (below the detection limit), while this compound prevails over the other species in the Belgian samples. Several samples (4–7) were analysed with two detectors (MIP-AES and ICP-TOFMS) and the results show a good agreement. All detection systems provide good reliability but GC/MS was not sensitive enough to quantify most of the samples collected in Belgium. The samples with higher contents (8–9) correspond to rainwater which is exposed to atmospheric contamination for several days before their collection.

4. Conclusions

A study about the behaviour of three different GC detectors (EI-MS, MIP-AES and ICP-TOFMS) using the same method has been developed. The main conclusions that can be extracted from this study are summarised below:

- ICP-TOFMS is the most sensitive detector. Detection limits of around 0.5 pg/mL (as lead) can be achieved using only 5 mL of sample volume. Similar results are provided by MIP-AES, except for DEL²⁺. The results obtained with EI-MS are less sensitive for all the organolead compounds, the detection limits ranging between 4 and 12 pg (Pb)/mL. A study of several variables affecting the sorption process, such as the sample breakthrough, showed that volumes up to 25 mL can be used to achieve 5 times lower detection limits. On the other hand, large sample volumes mean longer analysis time, restricting the practical applicability of the method.
- Despite its lower sensitivity, GC/MS is intrinsically the most specific option: the organometallic compounds can be detected in their molecular chemical form after derivatization (in absence of transalkylation reactions). Moreover, the analytes can be identified not only by their reten-

tion time, but also on the basis of distinctive features of the fingerprint mass spectra. Interferences for compounds with similar retention times than the analytes thus are virtually excluded. MIP-AES and ICP-TOFMS detectors, on the other hand, base their selectivity on the measurement of a specific distinctive spectrometric feature (a lead emission line or a specific ion mass or isotopic pattern); this provides information about the presence of lead in the original compound but does not validate the compound itself, whose identity rests entirely on the chromatographic retention time.

- The precision of the method is similar for the three detectors, since it is mainly due to the ruggedness of the FI system employed for sample preparation. It ranges from 3 to 5% (expressed as RSD).
- Precautions must be taken into account when working with the most sensitive detectors to preserve the components and their integrity. For instance, an additional clean-up step is required for MIP-AES and ICP-TOFMS to remove the excess of derivatizing reagent. On the other hand, interfaces between the gas chromatograph and the detectors are less complicated for EI-MS than for MIP-AES and ICP-TOFMS, since no commercial instruments are available for these latter instruments. With the

greater complexity of the instruments, more experienced operators are required.

Compounds of environmental interest such as methyltriethyllead (MTEL), tetramethyllead (TeML) or TeEL can not be determined using this method since tetraalkyllead compounds are not able to form chelates with NaDDC, being thus not retained on the C₆₀ fullerene column.

REFERENCES

- [1] Vanhaecke, F.; Moens, L. *Fresenius J. Anal. Chem* 364 (1999) 440.
- [2] Leach, A. M.; Heisterkamp, M.; Adams, F. C.; Hieftje, G.M. *J. Anal. At. Spectrom.* 15 (2000) 151.
- [3] Le, X.C.; Lu, X.; Ma, M.; Cullen, W.R.; Aposhian, H.V.; Zheng, B. *Anal. Chem.* 72 (2000) 5172.
- [4] Heisterkamp, M.; Adams, F. C. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 1999, 14, 1307.
- [5] Nerín, C.; Pons, B. *Quím. Anal*, 1994, 13, 209.
- [6] Baena, J. R.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1510.
- [7] Baena, J. R.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *LC•GC Europe* 2000 13, 830.
- [8] Nagshamush, A. M.; Pyrzynska, K.; Trojanowicz, M. *Talanta* 1995, 42, 851.
- [9] Bergmann, K.; Neidhard, B. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996 356, 57.
- [10] Lespes, G.; Pontin-Goutier, M., Astruc, A. *Environ. Sci. Technol.* 1992, 13, 207.
- [11] Uden, P. *J. Chromatogr. A*, 1995 703, 393.
- [12] Paneli, M.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M.; Ceulemans, M.; Adams, F. C. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997 357, 756.
- [13] Pereiro, I. R.; Lobinski, R. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 1997 12, 1381.
- [14] Pereiro, I. R.; Wasik, A.; Lobinski, R. *J. Chromatogr. A* 1998, 795, 359.
- [15] Szpunar, J.; Pellerin, P.; Makarov, A.; Doco, T.; Williams, P.; Melina, B.; Lobinski, R. *J. Anal. At. Spectrom.* 1998, 13, 749.
- [16] Desmaele, T.; Moens, L.; Dams, R.; Sandra, P.; van der Eucken, J.; van Dyck, J. *J. Chromatogr. A* 1998, 793, 99.
- [17] Heisterkamp, M.; Desmaele, T.; Candelone, J. P.; Moens, L.; Dams, R.; Adams, F. C. *J. Anal. At. Spectrom.* 1997, 12, 1077.
- [18] Craig, P. J.; Dewick, R. J.; van Elteren, J. T. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1995, 351, 467.
- [19] Ceulemans, M.; Adams, F. C. *J. Anal. Atom. Spectrom.* 1996, 11, 201.
- [20] Heisterkamp, M.; Adams, F. C. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1998, 362, 489.
- [21] Wang, Y.; Turnbull, A. B.; Harrison, R. M. *Appl. Organomet. Chem.* 1997, 11, 889.

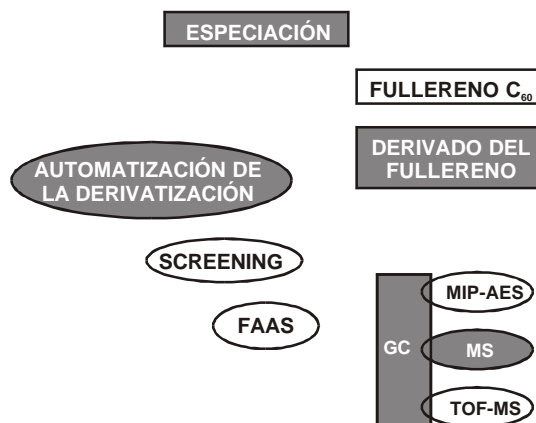
- [22] Abdel-Moati, M. A. R. *Environ. Pollution* 1996, 91, 97.
- [23] Szpunar, J.; Lobinski, R. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1999, 363, 550.
- [24] Szpunar-Lobinska, J.; Ceulemans, M.; Lobinski, R.; Adams, F.C. *Anal. Chim. Acta*, 1993, 278, 99.
- [25] Quevauviller, P. *Trends Anal. Chem.* 2000, 19, 195.
- [26] Lobinski, R.; Rodriguez Pereiro, I.; Chassaigne, H.; Wasik, A.; Szpunar, J. J. *Anal. Atom. Spectrom.* 1998, 13, 859.
- [27] Hempel, M.; Kuballa, J.; Jantzen, E. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 470.
- [28] Schubert, P.; Rosenberg, E.; Grasserbauer, M. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000, 366, 356.
- [29] Lobinski, R. *Analyst*, 1995 120, 615.
- [30] Sullivan, J. J.; Quimby, B. D. *Anal. Chem.* 1990, 62, 1034.
- [31] Ballesteros, E.; Gallego, M.; Valcárcel, M. J. *Chromatogr. A* 2000, 869, 101.
- [32] Gallego, M.; Petit de Peña, Y.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4074.



Capítulo VI

Empleo de Nuevos Derivados de Fullerenos para la Especiación de Plomo

Chapter **VI**
Use of New Fullerene Derivatives
in Lead Speciation



A pesar de su gran estabilidad física, los fullerenos han resultado poseer una reactividad química muy superior a la esperada. En concreto, se comportan más como enormes dienos conjugados que como sistemas aromáticos, lo que los convierte en moléculas con una gran capacidad aceptora de electrones. Esta propiedad favorece la retención de especies a través de interacciones de tipo π , pero también permite la formación de nuevos derivados de fullerenos. En este Capítulo de la Memoria se describe la síntesis y caracterización de un derivado del fullereno C_{60} basado en una reacción de fotólisis entre el C_{60} y un reactivo complejante. El resultado es un monoadducto que incorpora una molécula de dietilditiocarbamato al núcleo del fullereno. La inclusión de una minicolumna del nuevo derivado en el sistema de preconcentración/derivatización permite la simplificación del mismo, ya que la corriente de reactivo quelatante ya no es necesaria. El método es aplicable a la determinación de compuestos organoplomados por GC/MS en muestras de agua de lluvia.

Recibido el 17/08/2001

**ANALYTICAL
CHEMISTRY**

New Fullerene Derivative for Metal Preconcentration. A Case Study In Lead Speciation

Josefa R. Baena, Mercedes Gallego and Miguel Valcárcel

Analytical Chemistry Division, University of Córdoba, E-14071 Córdoba, Spain

A novel fullerene derivative including a chelating group attached to the fullerene core has been prepared by photoreaction of C₆₀ and sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC) in toluene-methanol medium. The optimization of the synthesis procedure was monitored by UV-Visible spectroscopy using the spectrum of C₆₀ fullerene as reference; the new material, a C₆₀-NaDDC monoadduct, showed a shoulder at 430 nm and an increase in the absorption band comprised between 425 and 500 nm. The solid was obtained by photolysis reaction in about 24 hours requiring further purification by preparative chromatography. Characterization of the brown product was accomplished by XRD and solid state ¹³C MAS NMR; chemical modification was confirmed through the appearance of peaks close to the fullerene core peak located at 146.9 ppm, which can be assigned to carbon atoms of C₆₀ that are covalently bonded to the diethyldithiocarbamate group to form a pyrrolidine ring-fused fullerene monoadduct. The ability of the new material for the preconcentration of metallic and organometallic compounds was assessed by using lead species as a model. The most interesting conclusions of the results were high adsorption efficiency, selectivity and stability of the C₆₀-NaDDC derivative (the packed material can be used for at least six months).

1. Introduction

Since the discovery of fullerene carbon clusters and their successful laboratory synthesis,¹ tremendous interest has been evoked in evaluating their structure and properties. The large-scale synthesis of fullerenes² has made C₆₀ readily available and chemical modification of fullerenes has since attracted considerable attention.³⁻⁵ In particular, the combination of the unique molecular characteristics of fullerene with other compounds through chemical modification has increased their interest. A handful of patents cover possible fullerene applications in several fields such as physic, chemistry or materials sciences, among others, although the holders agree that fullerene is not achieving the original perspectives yet. Regarding analytical chemistry, C₆₀ itself as well as fullerene derivatives have been used as stationary phases in liquid chromatography (LC)^{6,7} as well as in gas chromatography (GC).^{8,9} In addition, the multiple redox states that C₆₀ exhibits enable its use as a promising electrochemical biosensor for several species.¹⁰ But maybe the most active research topic in this sense is the use of C₆₀ and C₇₀ fullerenes for preconcentration of metal and organometallic traces. Abraham et al.¹¹ demonstrated the analytical potential of fullerene for the

adsorption of organic vapors using a surface acoustic wave (SAW) sensors. In independent studies, the characteristics of C₆₀ and C₇₀ fullerene as sorbent materials for the preconcentration of metals in continuous systems were described;¹² further experiments showed both to be better sorbents in metal preconcentration than are conventional solid materials such as RP-C₁₈, activated carbon or resins. Neutral chelates provided the best sensitivity and selectivity when compared to charged chelates or ion pairs.¹³

Derivatization of C₆₀ has played a key role in the studies of fullerene applications. The introduction of a suitable pendant group not only can modify the solubility of the fullerene, but also provides a handle to anchor C₆₀ to a specific target analyte.¹⁴ During the past years, glycine esters have been directly added to C₆₀ under photolysis to form pyrrolidine ring-fused fullerenes;¹⁵ this reaction has also been applied to aminopolycarboxylic esters such as tetramethyl ethylenediaminetetraacetate (EDTA ester) and pentamethyl dimethylenetriaminepentaacetate (DTPA ester).¹⁶ The attachment of polidentate ligands to C₆₀ should open the scope for their potential applications. However, in the study of the chemical modification of the fullerenes, it has been found that well-characterized fullerenes are difficult to get, as mul-

multiple addition occurs readily yielding a mixture of multiple addition products. Some di-, tetra- and hexa-adducts of C₆₀ have been reported.¹⁷

The aim of this paper is the synthesis, characterization, and analytical application of a novel fullerene derivative based on the photolysis reaction between C₆₀ and a classical complexing reagent for metals as sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC). Through a simple procedure, a single and symmetric adduct is obtained that incorporates a molecule of NaDDC to the fullerene core, joining thus the chelating properties of the pendant group to the well-known sorbent capacity of fullerene.

2. Experimental section

2.1. Reagents

All reagents were obtained from commercial sources, and, unless noted otherwise, were reagent grade or better. C₆₀ fullerene (99.999%) was provided by Dynamic Enterprises LTD (Berkshire, England). Sodium diethyldithiocarbamate (NaDDC), silica gel 40 (0.06 – 0.20 mm particle size), 4-Cl-2-methylphenol (as internal standard) and iodine monochloride were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Trimethyllead (TML⁺) acetate and triethyllead (TEL⁺) chloride were supplied by Alfa (Barcelona, Spain). Sodium tetrapropylborate (NaBPr₄) was ob-

tained from Galab (Geesthacht, Germany). Organic solvents such as toluene, acetone, ethanol, methanol, ethyl acetate, *n*-hexane, isobutyl methyl ketone and other chemicals including sodium hydroxide and nitric acid were provided by Merck (Darmstadt, Germany).

Stock solutions of TML⁺ and TEL⁺ were prepared by dissolving the appropriate amounts of the respective salts in ultrapure Milli-Q water (Millipore) to yield a concentration of 0.5 mg/mL expressed as lead. Dimethyl- and diethyllead (DML²⁺ and DEL²⁺) were synthesized by reacting TML⁺ and TEL⁺ solutions with 0.1 mol/L iodine monochloride as described elsewhere.¹⁸ All organolead solutions were stored at 4° C in the dark to avoid their decomposition to inorganic lead, and diluted solutions were dairy prepared from these standards. 1 g of NaBPr₄ was dissolved in 1 mL of ethanol and stored at –20° C in the dark. Diluted solutions (7.5 mg/mL) were prepared in ethyl acetate on a dairy basis.

2.2. Instrumentation

The elemental analysis used for the characterization of the C₆₀-sodium diethyldithiocarbamate (C₆₀-NaDDC) fullerene derivative was performed at the Elemental Microanalysis Center in the Complutense University of Madrid, Spain. A HP 8453 UV-Visible

spectrophotometer (Agilent Technology, Madrid, Spain) was used to record the UV-Visible spectra of the target compound. Powder X-Ray diffraction (XRD) data were collected by a Siemens D5000 diffractometer (Munich, Germany) provided with Cu-K α radiation and graphite monochromator. Signals were recorded using step scans of 0.04° 2 θ step size and 2 s duration. Solid state nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were carried out using a Bruker ACP-400 spectrometer (Madrid, Spain) working at a spinning rate of 4100 Hz. For ^{13}C magic-angle spinning (MAS) NMR measurements, 10500 transients were acquired using a repetition time of 5 s.

Organolead compounds speciation was accomplished by using a Fisons GC8000/MD800 GC/MS system (ThermoQuest, Madrid, Spain) with electronic pressure control and governed via MASSLAB software (also from ThermoQuest) Separation of the analytes was achieved in a capillary column (30 m \times 0.25 mm i.d., 0.25 μm) HP-5-MS (Supelco, Madrid, Spain) using ultrapure grade helium (6.0, Air Liquide, Seville, Spain) at a constant flow-rate of 0.9 mL/min. The GC injection port, GC/MS interface and MS sources temperatures were kept at 250, 250 and 200° C, respectively. The column temperature was initially set at 50° C for 1 min and

then raised at 30° C/min to 250° C, where it was held for 1.5 min. A 1 μL aliquot of the sample was injected in the split mode (1:25). Mass spectra were obtained in the electron impact ionization mode at 70 eV and the mass spectrometer was operated in the selective ion monitoring (SIM or SIR) mode, being the characteristic ions selected for identification and quantitation (underlined) of each analyte as follows: TML $^+$ 208, 253, 281; DML $^{2+}$ 208, 281, 309; TEL $^+$ 208, 237, 309; DEL $^{2+}$ 208, 251, 322; Pb $^{2+}$ 208, 251, 337; 4-Cl-2-methylphenol 77, 107, 142.

The flow system comprised a Gilson (Villiers-le-Bel, France) Minipuls-2 peristaltic pump furnished with poly(vinyl chloride) tubes, two Rheodyne (Cotati, CA) 5041 injection valves, PTFE tubing of 0.5 mm i.d. for coils and a laboratory-made minicolumn containing the C $_{60}$ -NaDDC derivative. The minicolumns were made from PTFE capillaries of 3 mm i.d., and sealed on both ends with small cotton beds to prevent material losses. In order to avoid abrupt changes in the column compacity that would stop the solution flow and disengage the system connections, every two C $_{60}$ -NaDDC segments (ca. 1.0 cm long) must be separated by one of glass beads (ca. 0.5 cm long, 0.9 – 1.2 mm o.d.).

2.3. *Synthesis Procedure*

All the reactions were carried out in open atmosphere without any special caution to exclude air. The derivative of C₆₀ was synthesized as follows: 50 mL of a NaDDC solution (90 mg/mL) in methanol was added into a 250 mL glass beaker containing 100 mL of a C₆₀ fullerene solution (37.5 mg/mL) in toluene. The mixture was magnetically stirred and exposed to a 60 W household light bulb as source light until the solution color changed from purple to dark red and the precipitation of a brownish by-product is completed (about 24 hours); methanol was evaporated during this time. Then, the solution was placed in an extraction funnel and 100 mL of water were added; the mixture was manually shaken to remove the precipitate from the organic phase (this extraction/clean-up step was accomplished by triplicate with fresh aliquots of water). Once separated from the aqueous phases, toluene was evaporated to air-dry in the dark at ambient temperature, protected from draughts, for 24 h, and the dark brown solid obtained washed with 25 mL of acetone. The filtered residue was then dissolved in the minimum volume of toluene (ca. 30 mL) and purified on a silica gel 40 preparative column (2.5 cm × 15 cm) previously conditioned

with ethanol. Toluene (ca. 200 mL) was employed as mobile phase being the eluate collected in a glass beaker and the solvent evaporated to air-dry in the dark; a dark brown solid (303 mg) was obtained as the final product of the synthesis (Patent P200101466, June 2001, University of Córdoba, Spain).

2.4. *Speciation Procedure*

Volumes of 5 mL of standard or sample solutions containing 0.1 – 200 ng/mL of inorganic lead and/or organolead compounds at pH 7 – 10 were aspirated into a flow system similar to one described elsewhere¹⁹ and pushed through the sorbent column located into the loop of an injection valve (preconcentration valve). In the preconcentration step, the different lead species were retained in the C₆₀-NaDDC derivative column (80 mg); in the meanwhile, the 200 µL loop of the elution valve was filled with ethyl acetate (eluent) containing the derivatizing reagent (NaBPr₄, 7.5 mg/mL) and 4-Cl-2-methylphenol (10 µg/mL) as internal standard. In the elution step, both preconcentration and elution valves were switched; once the eluent reached the C₆₀-NaDDC column, the flow was stopped for 2 min to allow a deeper contact between the analytes and the eluent/derivatizing reagent, favoring thus the elution. After this time, the

eluate was collected in a 0.5 mL ependorf and let to settle for another 2 min to ensure complete derivatization. Finally, a 1 μ L fraction was injected into the GC/MS.

2.5. Solubility of C_{60} -NaDDC

The solubility of C_{60} fullerene is already established for the most common organic solvent and aqueous solution; C_{60} is essentially insoluble in polar and H-bonding solvents, sparingly soluble in alkanes, and quite soluble in aromatic solvents.²⁰ However, since the addition of a functional group can modify the fullerene properties, evaluating the solubility of the C_{60} -NaDDC derivative is mandatory. In undertaking this work, aqueous solutions at different pH values, as well as several organic solvents (ethanol, acetone, ethyl acetate and *n*-hexane) were assayed as follows: an amount of ca. 10 mg of C_{60} -NaDDC was placed in a narrow glass bottle (2.5 cm long \times 0.5 cm diameter), and 1 mL of the aqueous solution or solvent was added. The solution was magnetically stirred in the dark by using a 5 mm \times 2 mm PTFE-coated stirring bar for 24 h to ensure equilibration. The saturated solution was then filtered through a 0.5 μ m PTFE filter (Millipore, Seville, Spain) or paper (Watman n° 1) filter for organic and aqueous solutions, respectively. The solid residue (non-dissolved solid) was air-

dried and then weighed. The solubility was established by difference between both weights.

3. Results and discussion

3.1. C_{60} -NaDDC Derivative

Secondary and tertiary aminocarboxylates can be added to C_{60} under photolysis, as has been recently demonstrated through irradiation of tetramethyl ethylenediaminetetraacetate (EDTA methylated ester) in the presence of C_{60} fullerene.¹⁶ The result of this reaction is a fullerene monoadduct containing the EDTA molecule as methylated ester; when carboxylic acids are employed for the synthesis, decarboxylation occurs and organodihydrofullerenes are formed that can not be used as active chelating reagents. A careful selection of the initial reagents could make photolysis a simple and effective tool for the synthesis of active fullerene complexes. In order to select a suitable reagent to be bonded to C_{60} yielding a product which showed chelating properties, a rigorous study over the classical reagents that form stable complexes with metallic cations was performed; the appropriate reagents must contain carbon atoms which are adjacent to an amine group (electron-donor) and that are also available to be covalently bonded to C_{60} through the formation of a pyrrolidine-type

ring, being thus the chelating functional group unaltered. Taking into account these considerations, the sodium salt of the diethyldithiocarbamate acid (NaDDC) was used as reagent since in addition its highly symmetrical structure would produce a single photolysis product by reaction with C_{60} . In this way, the adduct would show the ability to form stable complexes with a large number of metallic cations, besides the well-known sorption capacity of fullerene.

The solid adduct was prepared with different concentrations of NaDDC (30 – 90 mg/mL) in methanol and a constant concentration of C_{60} (37.5 mg/mL) in toluene. The mixture

was irradiated with a household light bulb (60 W) to induce the photochemical reaction; the photolysis was reflected by a color change from the characteristic purple of C_{60} solution in toluene (reference solution) to dark red with the apparition of a brownish precipitate. The color changes became greater from a NaDDC concentration of at least 70 mg/mL. Thus, a concentration of 90 mg/mL was selected in order to ensure an excess of NaDDC versus C_{60} . On the other hand, several light sources (UV lamp, household light bulb and natural sunlight) were assayed, obtaining no significant differences when using natural sunlight or household light bulbs with variable

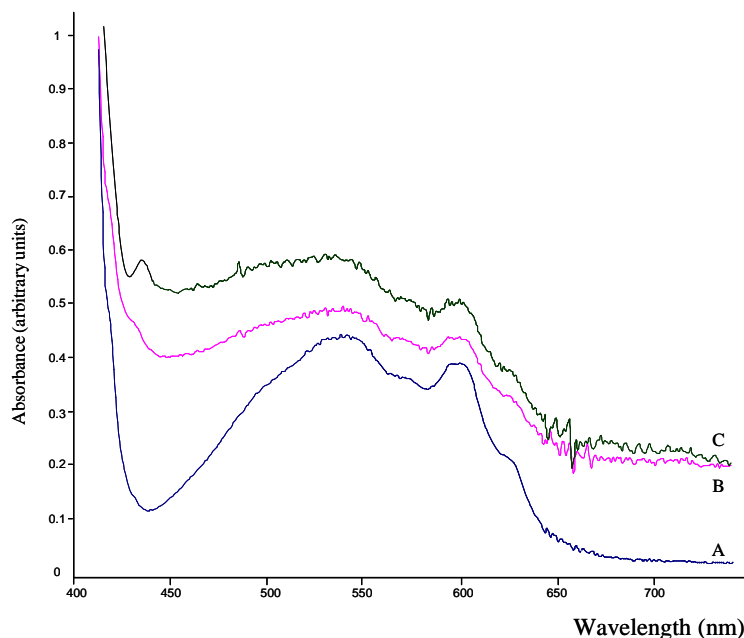


Figure 1
UV-Visible absorption spectra of (A) C_{60} in toluene and C_{60} -NaDDC solution after a reaction time of (B) 2 hours and (C) 24 hours

power supply. No reaction was observed with UV source after two days and therefore a household light bulb of 60 W was selected. The optimization of the reaction time was accomplished by recording the UV-Visible spectrum of the supernatant solution at short time intervals of 10 min that were increased up to 60 min as the reaction progressed; the obtained spectra were compared with those of the reference solution (C_{60} in toluene) under the same conditions. The absorption spectrum of the reference solution was found to be constant through the time showing two intense absorption bands in the UV region ($\lambda_{\max} = 213$ and 329 nm) and a broad band in the visible region from 450 to 650 nm. As can be seen in Figure 1, the absorption spectrum of the adduct (assigned to C_{60} -NaDDC compound) initially showed an increase in the absorption band observed between 425 and 500 nm that along the time reached the intensity of the C_{60} maximum located at $\lambda_{\max} = 540$ nm. On the other hand, it was also observed the appearance of a weak shoulder at $\lambda_{\max} = 430$ nm, assigned to addition at the [6,6] junction to form a pyrrolidine ring which is characteristic of fullerene adducts.^{16,21} The absorption spectrum of the product remained unchanged from 22 to 28 hours, decreasing above this period of time. A

reaction time of 24 hours was selected.

The solution containing C_{60} -NaDDC in toluene and the brownish precipitate was then purified in order to obtain a solid final product. The brownish precipitate was eliminated by extraction with water taking into account its solubility in it; UV-Visible spectrum of the aqueous solution was also recorded to establish the precipitate composition, concluding that it is probably a decomposition product of the great excess of NaDDC, since no fullerene bands were observed. The toluene phase was evaporated, washed and purified by column chromatography using silica gel as stationary phase, as indicated in the synthesis procedure section. Toluene was first employed as mobile phase, and two different chromatographic bands were clearly observed inside the column: a reddish band, which was easily eluted and collected in a separated fraction, and a light brown band, that remained on the top of the column and was only eluted when ethyl acetate was employed as mobile phase. Again, UV-Visible spectra were recorded revealing that the characteristic fullerene bands only appeared in the reddish fraction of toluene. Thus, after the evaporation of toluene from this fraction, a dark brown product was obtained. Finally, this product was dissolved in toluene and the UV-Visible

spectrum also recorded, being similar to that obtained for the initial dark red solution.

3.2. Characterization of C_{60} -NaDDC Derivative

In order to elucidate the chemical structure of the synthesized dark brown product, several characterization techniques were employed. Firstly, the presence of additional elements in C_{60} like nitrogen or sulfur was examined through elemental analysis revealing the following composition: %C = 91.32, %H = 1.84, %N = 1.16, %S = 4.74. This information agrees with the chemical structure proposed in Figure 2 for a yield of 66% on the basis of converted C_{60} , as reported for similar photoreactions involving fullerene.¹⁶

The X-ray diffraction (XRD) pat-

tern of the compound C_{60} -NaDDC showed prominent peaks at $2\theta = 9.16, 10.40, 16.76, 17.64, 18.92, 19.56, 19.88, 20.28$ and 21.20° , as can be seen in Figure 3A. The patterns of C_{60} and NaDDC are also shown (Figure 3B and 3C, respectively), both obtained from toluene solutions in order to detect a possible crystallization in a different phase owing to solvent molecules-fullerene interactions, as described for other organic solvents such as benzene²² or tribromomethane.²³ By comparison it becomes evident that the fullerene derivative is entirely different in structure from C_{60} and NaDDC alone. If the product was a simple mixture of C_{60} and NaDDC, then the X-ray diffraction pattern would have shown peaks corresponding to both individual components exactly at the same

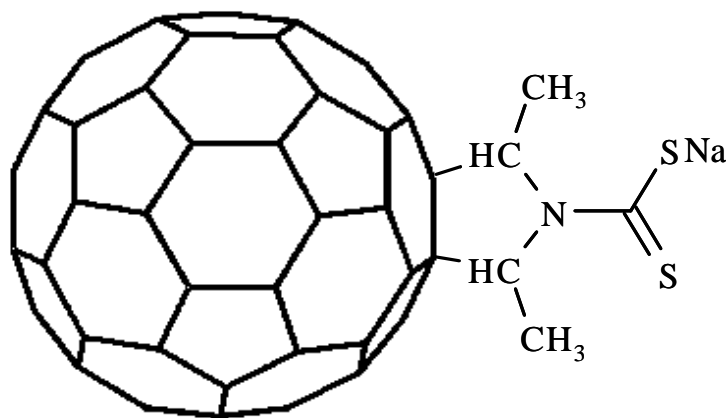


Figure 2
Structure of C_{60} -NaDDC derivative.

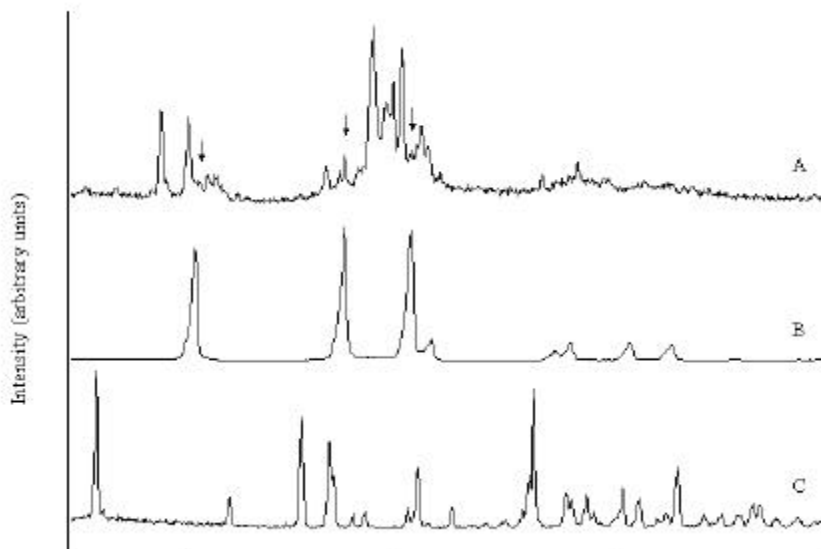


Figure 3
Powder XRD pattern of (A) C_{60} -NaDDC derivative, (B) C_{60} fullerene and (C) NaDDC; all the compounds were obtained from toluene solutions

positions; however, only a small contribution of unreacted fullerene is observed (peaks denoted with an arrow in Figure 3A). On the other hand, and according to Bragg's law of diffraction ($n\lambda = 2d \sin\theta$) the location of XRD lines depends on the wavelength of radiation, the angle of the collimated X-ray beam with a plane of atoms (θ), and the distance between planes (interplanar spacing, d).²⁴ Hence, the presence of signals at lower 2θ values than those observed for free C_{60} can be interpreted as an indicator of a higher interplanar spacing in C_{60} -NaDDC derivative, as could be expected if a new derivative was formed. Nevertheless, the interca-

lation of NaDDC molecules between the planes of C_{60} fullerenes could also increase the interplanar spacing leading to similar effects; for that reason, XRD must be considered in this case as a complementary characterization technique that provides useful, but not definitive information.

The ^{13}C NMR data enabled the elucidation of the structure of the mono-NaDDC adduct of C_{60} . The signals from saturated solutions were not intense enough to allow their assignment, thus solid state ^{13}C magic spin angle (MAS) NMR was employed. As can be seen from Figure 4, the solid state ^{13}C MAS NMR spectrum of C_{60} -NaDDC showed two nar-

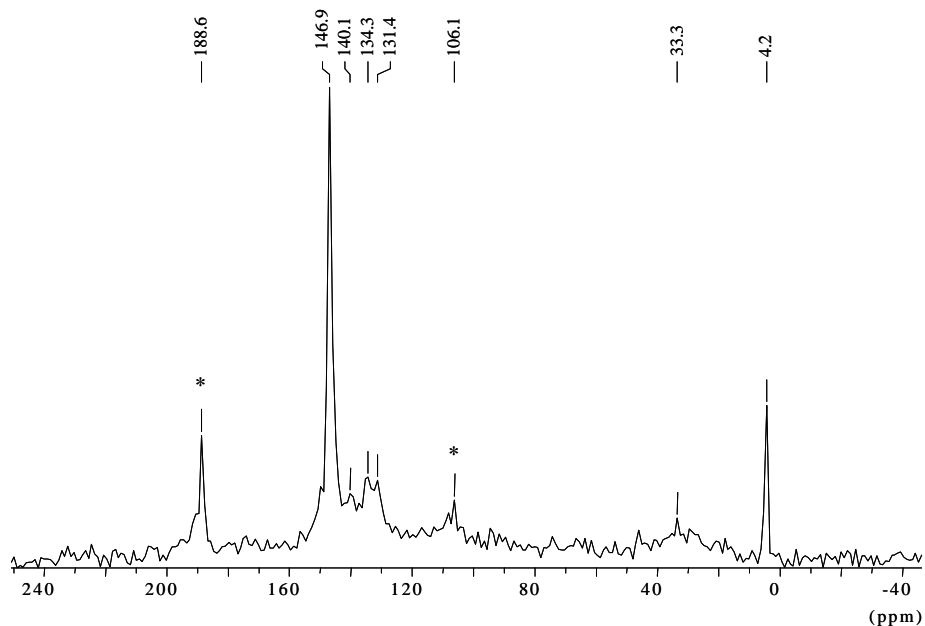


Figure 4
 ^{13}C MAS NMR spectrum of C_{60} -NaDDC derivative

row peaks at 4.2 and 146.9 ppm and four wide peaks of carbon atoms at 33.3, 131.4, 134.3 and 140.1 ppm, respectively. The two peaks denoted with an asterisk at 106.1 and 188.6 ppm are the first spinning sidebands (SSB) of the main peak at 146.9 ppm. Based on the chemical shift data and intensity ratio of the peaks, we assign the peak at 146.9 ppm to the fullerene core; the peaks at 140.1, 134.3 and 131.4 ppm can be assigned to carbon atoms of C_{60} whose structural environment has been modified. Because these atoms are receiving electrons from the pyrrolidine ring, a shielding effect occurs, resulting in the appear-

ance of these absorption peaks at lower chemical shift values. On the other hand, the peaks located at 4.2 and 33.3 ppm can be assigned to CH_3 - (2 groups) and $\text{C}_{60}\text{-CH-N=}$ (2 groups) respectively; the fact that two carbon atoms can be included in each signal implies that they seem to have the same structural environment, indicating the high symmetry of the molecular structure. We can also see that the signals have quite different spreads, being the peak at 4.2 ppm the narrowest one; this indicates that this group is the only one whose rotation is not quenched since it is not involved in the rigid pyrrolidine ring.

As previously reported for other fullerene-based materials,²⁵ the peak assigned to the fullerene core is about +4 ppm upfield shift, i.e. deshielded, from free C₆₀, due to its participation in the bonding. Although the signal corresponding to =N-CS₂Na was not observed in the MAS spectrum due to the poor signal to noise ratio that is inherent to the technique, its presence was demonstrated in further experiments using ¹³C CP-MAS NMR as a signal in the characteristic region of C-S binding at 194.8 ppm.

3.3. Case Study: Speciation of Organolead Compounds

To further demonstrate the ability of the novel fullerene derivative for the preconcentration of metallic and organometallic compounds, C₆₀-NaDDC was used as chelating material in the speciation of organolead compounds in rainwaters. For this purpose, the solubility of C₆₀-NaDDC in several organic solvents as well as its stability in aqueous solutions of different pH values was studied since those solutions were to be passed through the column during the preconcentration and elution steps. The solubility was lower than 0.1 mg/mL for ethanol, acetone and ethyl acetate, and notably higher (ca. 0.8 mg/mL) for *n*-hexane. Regarding stability in acidic or alkaline solutions, the derivative showed a great stability

from pH 1 (hydrolysis of C₆₀-NaDDC occurred in an extension of only 1%, detected through UV-Visible measurements of NaDDC) to pH 13 (no hydrolysis detected). Based on the previous results, a minicolumn packed with the C₆₀-NaDDC derivative was included into a continuous system. In this work, a slight modification of a recently developed flow system¹⁹ was employed; a 5 mL sample volume containing 0.5 ng/mL of TML⁺, DML²⁺, TEL⁺ and DEL²⁺ was directly aspirated into the minicolumn (located into the loop of the preconcentration valve) and the analytes eluted with ethyl acetate containing the derivatizing reagent (introduced into the system by means of a second injection valve), as described in the speciation procedure section. Aliquots of 1 µL of the derivatized eluate were injected into the GC/MS for analysis. The chemical and flow variables were optimized. The adsorption capacity was found to depend mainly on the pH of the sample solution; the optimum pH ranged between 7 and 10; samples were adjusted to weak alkaline medium with dilute NaOH. Other variables as amount of sorbent material (optimum range 50 – 80 mg), eluent volume, and sample and eluent/derivatizing solution flow rates were also studied, being the selected values listed in Table 1.

Table 1
Experimental conditions and analytical characteristic for speciation analysis of organolead compounds in aqueous samples (5 mL)

<i>experimental conditions</i>	<i>optimum range</i>		<i>selected value</i>	
sample pH	7 – 10		7 – 10	
amount of sorbent (C ₆₀ -NaDDC), mg	50 – 80		80	
NaBPr ₄ concentration, mg/mL	7.5 – 10		7.5	
eluent volume (ethyl acetate), μ L	200		200	
elution/derivatization time, min	3 – 7		4	
sample flow rate, mL/min	0.3 – 2.0		2.0	
eluent flow rate, mL/min	0.6 – 1.2		0.6	
<i>analytical features</i>	<i>TML</i> ⁺	<i>DML</i> ²⁺	<i>TEL</i> ⁺	<i>DEL</i> ²⁺
linear range, ng/mL as Pb	0.02 – 4	0.04 – 4	0.02 – 3	0.03 – 4
detection limit, pg/mL as Pb	5	15	4	10
RSD (%), n=11	5.5	4.6	4.8	5.8

On the other hand, it is well known that derivatization time is a critical parameter in organolead speciation.²⁶ The elution of the analytes first implies their reaction with the derivatizing reagent in order to release the lead species from the chelating column; for this goal, an air stream (carrier of the eluent/derivatizing reagent, 200 μ L) of 0.6 mL/min was chosen, since lower flow rates resulted in less reproducible measurements and at higher flow rates the residence time of the eluent inside the column was not enough to complete the elution. Furthermore, the flow was stopped for 2 minutes. After collecting the eluate in a closed vial, an additional derivatization time of 2 min was also necessary to complete the propylation of all the organolead

compounds, being TML⁺ especially affected by this variable. Under these working conditions, the column packed with C₆₀-NaDDC was reusable for at least 6 months.

By using the selected conditions given in Table 1, several calibration graphs for all the organolead compounds were run. The figures of merit of the calibration graphs are also summarized in this Table. Detection limits (calculated as three times the standard deviation of background noise) ranged from 4 to 15 pg/mL. The precision (for 11 individual samples containing 0.5 ng/mL of each organolead compound) was found to be ca. 5% (within day). The degradation of the organolead standards to inorganic Pb²⁺ can be detected in the chromatogram as tetrapropyllead; this

peak also includes a contribution due to inorganic lead present in the original sample.

The effect of the presence at significant concentrations in rainwater of metal ions that are able to form complexes with NaDDC was also examined. Major elements (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+) do not react with NaDDC; thus, only the common transition elements such as Fe^{3+} , Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , and Mn^{2+} were studied at concentrations up to $0.5 \mu\text{g/mL}$, together with organolead compounds at 0.5 ng/mL . As these elements can be precipitated in the weak alkaline medium in which samples are prepared (pH 7 – 10), a commercial HPLC filter was placed at the entry to the sample aspiration channel, in order to avoid that any particle reached the column. No interferences were observed probably due to the potential interferents being precipitated and retained on the filter, preventing them from competing with the analytes for the functional group of the sorbent.

Finally the proposed method was applied to the analysis of two rainwaters. Samples were collected in Spain in different seasons. Aliquots of 25 mL (breakthrough volume) of rainwater were preconcentrated onto the flow system. TML^+ was undetected ($< 1 \text{ pg/mL}$) in both samples probably as a result of environmental degradation to DML^{2+} and Pb^{2+} . All

other species were detected, being their concentrations 20 and 80 pg/mL (DML^{2+}), 30 and 150 pg/mL (TEL^+), and 45 and 90 pg/mL (DEL^{2+}), for sample 1 and 2, respectively.

3.4. Comparison of C_{60} -NaDDC Derivative

With C_{60} . C_{60} fullerene itself, as well as C_{70} , have proven to be effective sorbent materials for the preconcentration of metallic cations, after the formation of a suitable neutral chelate to be adsorbed via π - π interactions. Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate¹² and NaDDC¹⁸ have been employed for the determination of lead and organolead compounds, among other metals, in similar flow systems to the one used in this work; those systems included an additional stream of the suitable chelating reagent that must be mixed with the sample stream and also a reaction coil long enough to ensure the complete formation of the chelate before retention onto the C_{60} fullerene column. However, by using a column packed with C_{60} -NaDDC the flow system is greatly simplified as the sample can be directly preconcentrated onto the column. On the other hand, conditioning of the C_{60} column is needed for the retention of certain organolead compounds. Thus, the retention of TML -DDC chelate is enhanced when the C_{60} is conditioned with n -

hexane;²⁷ the solvent molecules are adsorbed at the surface of the crystals of C_{60} ,²⁸ constituting a liquidlike phase in which TML-chelate would be dissolved. The C_{60} -NaDDC derivative can overcome these difficulties, since owing to the different retention mechanism (chelate formation instead of π - π interactions) there is no reason for TML^+ to be retained in a lesser extension than the other lead species. The most relevant difference between both sorbent materials is the pH range in which formation of the chelate is favored. Thus, when employing C_{60} fullerene, adsorption was maximal in a wider pH range (1 – 8) as the likely result of the chelate being formed in the aqueous medium (in excess of NaDDC) preceding its adsorption on C_{60} . On the contrary, when using the C_{60} -NaDDC column, maximum analyte adsorption was achieved at a higher sample pH (7 – 10), but a previous plateau was obtained between pH 1 and 6, in addition to a decrease in the chromatographic signal by about 15% (for DML^{2+} and DEL^{2+}) and 30% (for TML^+ and TEL^+) relative to the first plateau. This suggests that the chelate formation on the C_{60} -NaDDC material is enhanced in a weak alkaline range in which the chelating reagent is negatively charged.

The main advantages of the new derivative relative to C_{60} are as follows: nor chelating reagents neither

column conditioning are needed, being the flow system notably simplified as a result of the employ of C_{60} -NaDDC derivative. Regarding column stability, both columns have proved to be reusable for at least six months on a daily working basis. Finally, the only drawback of the C_{60} -NaDDC derivative column relying on its pH range (weak alkaline medium) is not applicable since it induces the precipitation of other metal ions that could compete with the organolead compounds for the chelating group, increasing thus the selectivity of the method through filtration.

4. Conclusions

From the foregoing the following conclusions can be withdrawn: (a) C_{60} can be covalently bonded to classical chelating reagents, leading to stable fullerene derivatives that join the advantages of both compounds; (b) the C_{60} -NaDDC derivative synthesized in the present work can be employed as sorbent material for the preconcentration of metallic, organometallic, and probably organic compounds at trace levels; (c) further applications of the novel material could be developed, such as immobilization on solid surfaces, assembling of optically transparent electrodes, or employment as stationary phase in chromatographic processes.

ACKNOWLEDGMENT

Financial support from the Spanish DGICYT (Grant PB95-0977) is gratefully acknowledged, as well as the aid of J. I. Corredor (SCAI – NMR unit, University of Córdoba) in the NMR studies and F. J. Fernández (Inorganic Chemistry Department, University of Córdoba) in the X-ray experiments.

REFERENCES

- [1] Kroto, H. W.; Heath, J. R.; O'Brien, S. C.; Curl, R. F.; Smalley, R. E. *Nature* 1985, 318, 162.
- [2] Kratschmer, W.; Lamb, L. D.; Fostiropoulos K.; Huffman, D. R. *Nature* 1990, 347, 354.
- [3] Fagan, P. J.; Krusic, P. J.; McEwen, C. N.; Lazar, J.; Parker, D. H.; Herron, N.; Wasserman, E. *Science* 1993, 262, 404.
- [4] Dresselhaus, M.S.; Dresselhaus, G.; Eklund, P.C. *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, Academic Press, San Diego, CA, 1996.
- [5] Taylor, R.; *Lecture Notes on Fullerene Chemistry*, Imperial College Press, London, UK, 1999.
- [6] Jinno, K.; Yamamoto, K.; Fetzer, J. C.; Biggs, W. R. *J. Microcolumn Sep.* 1992, 4, 187.
- [7] Stalling, D. L.; Guo, C. Y.; Saim, S. J. *Chromatographic Sci.* 1993, 31, 265.
- [8] Golovnya, R. V.; Terenina, M. B.; Ruchkina, E. L.; Karnatsevich, V. L. *Mendeleev. Commun.* 1993, 6, 231.
- [9] Fang, P. F.; Zeng, Z. R.; Fan, J. H.; Chen, Y. Y. *J. Chromatogr. A* 2000, 867, 177.
- [10] Gavalas, V. G.; Chaniotakis, N. A. *Anal. Chim. Acta* 2000, 409, 131.
- [11] Abraham, M. H.; Du, C. M.; Grate, J. W.; McGill, R. A.; Shuely, W. J. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1993, 24, 1863.
- [12] Gallego, M.; Petit de Peña, Y.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 1994, 66, 4074.
- [13] Petit de Peña, Y.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 1995, 67, 2524.
- [14] An, Y. Z.; Chen, C. H. B.; Anderson, J. L.; Sigman, D. S.; Foote, C. S.; Rubin, Y. *Tetrahedron* 1996, 52, 5179.
- [15] Gan, L. B.; Zhou, D. J.; Luo, C. P.; Tan, H. S.; Huang, C. H.; Lu, M. J.; Pan, J. Q.; Wu, Y. J. *Org. Chem.* 1996, 61, 1954.
- [16] Gan, L.; Jiang, J.; Zhang, W.; Su, Y.; Shi, Y.; Huang, C.; Pan, J.; Lü, M.; Wu, Y. J. *Org. Chem.* 1998, 63, 4240.
- [17] Chuard, T.; Deschenaux, R.; Hirsch, A.; Schonberger, H. *Chem. Commun.* 1999, 20, 2103.

- [18] Baena, J. R.; Cárdenas, S.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *Anal. Chem.* 2000, 72, 1510.
- [19] Baena, J. R.; Gallego, M.; Valcárcel, M.; Leenaers, J.; Adams, F. C. *Anal. Chem.* 2001, 73, 3927.
- [20] Ruoff, R. S.; Tse, D. S.; Malhotra, R.; Lorents, D. C. *J. Phys. Chem.* 1993, 97, 3379.
- [21] Dai, L.; Mau, A. W. H.; Zhang, X. J. *Mater. Chem.* 1998, 8, 325.
- [22] He, H.; Barras, J.; Foulkes, J.; Klinowski, J. *J. Phys. Chem. B* 1997, 101, 117.
- [23] Collins, C.; Duer, M.; Klinowski, J. *Chem. Phys. Lett.* 2000, 321, 287.
- [24] Jaffe, H. W. *Introduction to Crystal Chemistry*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1988.
- [25] Wei, X.; Hu, C.; Suo, Z.; Wang, P.; Zhang, W.; Xu, Z.; Alyea, E.C. *Chem. Phys. Lett.* 1999, 300, 385.
- [26] Baena, J. R.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *LC•GC Europe* 2000, 13, 830.
- [27] Baena, J. R.; Gallego, M.; Valcárcel, M. *Spectrochim. Acta, Part B* 1999, 54, 1869.
- [28] Skokan, E. V.; Privalov, V. I.; Arkhangel'skii, I. V.; Davydov, V. Ya.; Tamm, N. B. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 2050.



Capítulo VII



Resumen
y
Discusión

Chapter **VII**
Summary and Discussion

VII.1. DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS

En esta Memoria se ha abordado la discriminación entre especies fundamentalmente en el contexto del análisis medioambiental mediante el empleo de un nuevo tipo de sorbentes (fullerenos y derivados). Se han descrito diversas metodologías con diferente grado de simplificación y automatización que implican o no la derivatización de los analitos. La mayor parte de los procesos analíticos descritos se basan en el uso de un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC/MS), aunque se han utilizado otros detectores acoplados al cromatógrafo de gases (GC/MIPAES y GC/ICP-TOFMS) a efectos comparativos. Asimismo, la espectrometría de absorción atómica con atomización por llama (FAAS) se ha empleado como técnica de detección tanto para la especiación directa como para un sistema de screening de muestras previo a la especiación propiamente dicha por cromatografía de gases.

En este apartado se pretende ofrecer una panorámica general de los resultados más relevantes alcanzados en esta Memoria. Para evitar repeticiones con los capítulos anteriores, se ha considerado oportuno focalizar la discusión en los aspectos transversales convergentes o divergentes de mayor interés. En **primer lugar**, se aborda de forma globalizada el desarrollo del trabajo de investigación a través de los cambios que se han implantado y que han propiciado avances científicos-técnicos constatables. En **segundo lugar**, se contemplan los elementos comunes a todos los capítulos que comprenden tanto el objetivo analítico global (especiación) como las herramientas analíticas utilizadas en todos los capítulos anteriores (empleo de fullerenos y derivados, sistemas de flujo continuo y quelatos metálicos derivados del ligando dietilditiocarbamato). En **tercer lugar**, se discuten los elementos que introducen una diferenciación entre los capítulos: tipo de fullerenos, muestras, analitos, derivatización, grados de automatización y simplificación, screening, separación cromatográfica y detección. En **cuarto lugar**, se analizan los resultados obtenidos en las diversas metodologías desarrolladas y validadas.

VII. 1. 1. EVOLUCIÓN DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

El desarrollo de los trabajos que constituyen esta Memoria ha implicado la evolución lógica de la línea de investigación hacia la mejora continua. Así, se ha avanzado en diversos aspectos, entre los que cabe destacar los siguientes:

- Del empleo de fullereno C₆₀ a su derivado dietilditiocarbámico.
- Del uso de FAAS como detector al empleo de GC/MS, GC/MIP-AES y GC/ICP-TOFMS.
- De la formación manual (off-line) de derivados volátiles de los analitos a su implementación on-line e “in-situ”.
- De la necesidad de emplear una atmósfera inerte impuesta por el uso de un reactivo de Grignard, muy inestable, a la posibilidad del trabajo en atmósfera abierta usando una sal de B(IV).
- Del uso del ligando dietilditiocarbamato en medio acuoso a su empleo inmovilizado covalentemente al fullereno C₆₀.
- Del uso de módulos de flujo complejos con varias bombas peristálticas, válvulas y canales de flujo a módulos más simples, robustos y fiables.

Estos cambios implican que algunos objetos, herramientas y procesos analíticos sean diferentes, aunque ciertos elementos hayan permanecido constantes a lo largo del desarrollo de la investigación. A continuación se van a comentar los aspectos que establecen las similitudes y las diferencias más significativas entre los capítulos que constituyen esta Memoria.

VII. 1. 2. HILOS CONDUCTORES DE LA MEMORIA

Los hilos conductores de esta Memoria son la especiación, y el empleo de herramientas analíticas comunes tales como son los fullerenos y derivados, los sistemas de flujo continuo y los dietilditiocarbamatos metálicos, que se comentan brevemente a continuación.

El objetivo analítico global de la Memoria es la **especiación**, fundamentalmente en el ámbito medioambiental, aunque también se aborda en el agroalimentario. En el apartado I.1 de la Memoria se ofrece una visión actual de la especiación en Química Analítica. La discriminación entre especies se ha logrado

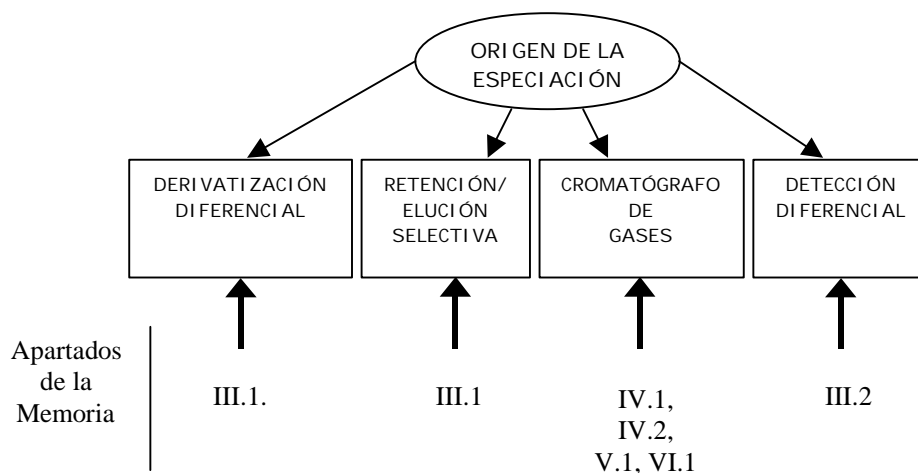


Figura VII.1. Etapas del proceso analítico donde se produce la discriminación implícita en la especiación

en esta Memoria en diversas etapas de los procesos analíticos desarrollados, tal como se muestra en la Figura VII.1.

La especiación de plomo en muestras medioambientales se realiza mediante derivatización diferencial (apartado III.1) por precipitación/filtración/disolución del Pb^{2+} inorgánico mediante dicromato. En este mismo apartado, la retención selectiva del trimetilplomo en función del acondicionamiento de la minicolumna de fullereno C_{60} permite su discriminación del resto de organoplomados. La mayor parte de los trabajos desarrollados sobre la especiación de plomo se basan en la discriminación de las especies derivatizadas en un cromatógrafo de gases acoplado a distintos detectores (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1). En estos casos, si bien la separación de los analitos se realiza en la columna cromatográfica, el empleo de un espectrómetro de masas como detector permite la identificación inequívoca de los mismos a través de sus espectros de fragmentación. Otras alternativas tales como la atomización por plasma (apartado V) permiten aumentar drásticamente la sensibilidad. La especiación de ditiocarbamatos metálicos que se emplean como fungicidas (apartado III.2) se basa en la detección selectiva de los metales (Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+}) por FAAS: la diferenciación tiene lugar en el detector.

La utilización de **fullereno C₆₀ y su derivado dietilditiocarbámico** constituye el núcleo de esta Memoria. La utilización de sorbentes es clave para los procesos de especiación medioambiental dada la pequeña concentración de las especies y las potenciales perturbaciones de otras especies que se encuentran en la matriz de la muestra. La preconcentración y el “clean-up” mediante la denominada SPE (extracción en fase sólida) se han extendido ampliamente en los procesos analíticos. La búsqueda de nuevos sorbentes (ej. los MIPs, polímeros grabados con moléculas) es un tema candente en la investigación analítica. En esta Memoria se utilizan por primera vez los fullerenos y derivados para la retención/elución de las diversas especies de plomo y fungicidas (ditiocarbamatos metálicos); una panorámica general del impacto de los fullerenos en Química Analítica se expone en el apartado I.3 de la Memoria. Con fines comparativos se ha estudiado sistemáticamente el comportamiento de sorbentes tradicionales (ej. sílice-C₁₈) para establecer las ventajas en sensibilidad y selectividad que ofrecen los fullerenos.

Para reducir la participación humana en el proceso analítico, mejorar propiedades analíticas básicas (ej. precisión) y reducir costes y riesgos (ej. disminución del consumo de reactivos tóxicos y/o costosos), todas las metodologías que comprende la Memoria se basan en **sistemas de flujo continuo** (FI) que realizan una amplia variedad de funciones: medición del volumen de muestra líquida introducida, derivatización de los analitos y desarrollo de técnicas analíticas de separación no cromatográficas tales como la precipitación/disolución y sorción/desorción, entre otras. La complejidad del montaje automático es muy diferente tal como puede comprobarse en la Tabla VII.1. Para la especiación directa de plomo usando FAAS (apartado III.1) se necesitan dos bombas peristálticas, cinco válvulas y seis líneas de flujo, mientras que para la especiación de fungicidas se utiliza una sola bomba, una válvula y una sola línea. La mayoría de las configuraciones restantes para la especiación de plomo emplean una sola bomba, dos válvulas de inyección y tres líneas de flujo, excepto en el caso del derivado ditiocarbámico del C₆₀ (apartado VI.1), en el que obviamente se prescinde de la línea del reactivo para la formación del quelato. Cabe destacar que la configuración básica del módulo puede usarse para la derivatización final de los analitos y así hacer posible su análisis por cromatografía de gases (apartado IV.2.).

Tabla VII.1. Características generales de los sistemas de flujo continuo utilizados en esta Memoria

APARTADO DE LA MEMORIA	MÉTODO	FUNCIONES DEL SISTEMA	COMPLEJIDAD DEL MÓDULO			ACOPLAMIENTO AL DETECTOR
			Número			
			Bombas Peristálticas	Válvulas Selección/ Inyección	Líneas de Flujo	
III.1	Especiación directa de plomo mediante FAAS	Medida volumen Precipitación-Filtración Derivatización Sorción/Elución	2	5	6	ON-LINE
III.2	Especiación de fungicidas mediante FAAS	Medida volumen Sorción/Elución	1	1	2	ON-LINE
IV.1	Screening de muestras	Medida volumen Derivatización Sorción/Elución	1	2	3	ON-LINE
	Especiación de plomo por GC/MS	Medida volumen Derivatización Sorción/Elución	1	2	3	OFF-LINE
IV.2	Especiación de plomo con NaBPr ₄	Medida volumen Derivatización Sorción/Elución Derivatización	1	2	3	OFF-LINE
V.1	Comparación de detectores	Medida volumen Derivatización Sorción/Elución Derivatización	1	2	3	OFF-LINE
VI.1	Especiación de plomo con derivado del C ₆₀	Medida volumen Sorción Elución-Derivatización	1	2	2	OFF-LINE

El hecho de que la formación de especies volátiles se lleve a cabo “in-situ” en el propio módulo supone un gran avance sobre metodologías anteriores, ya que permite disponer de un sistema rápido, fiable y robusto para la especiación de plomo en muestras medioambientales que puede ser acoplado a distintos detectores. La integración de la detección on-line en el sistema depende en gran medida de las características intrínsecas del detector, siendo decisiva la forma de introducción de la muestra: continua (FAAS) o discontinua (cromatógrafo); en este último caso, el acoplamiento con el detector debe ser manual.

La eficiencia del grupo ditiocarbamato como ligando se basa en el marcado carácter liberador de electrones del grupo $R_2N - CS_2$. El orbital π enlazante localizado entre los dos átomos de azufre (Figura VII.2) supone una fuente idónea para la transferencia de carga hacia los orbitales d vacíos del átomo metálico. El caso del plomo tetravalente es especialmente favorable debido a que la pérdida de electrones de niveles inferiores queda sólo parcialmente compensada por los radicales orgánicos. Por lo tanto, el NaDDC actúa como ligando bidentado hasta satisfacer la deficiencia electrónica del metal, de forma que el quelato requiere una o dos moléculas de NaDDC según la carga inicial de la especie metálica. La densidad electrónica que posee el quelato favorece la retención sobre el fullereno, la cual ocurre también a través de interacciones de tipo $\pi-\pi$. Por ese motivo, la transferencia de carga no es posible si los radicales que acompañan al átomo de

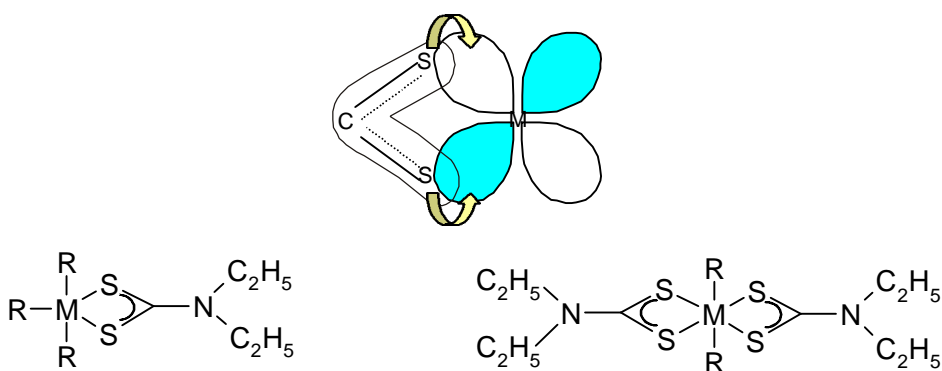


Figura VII. 2. Representación esquemática del enlace ligando→ metal en el complejo Pb-DDC

plomo son demasiado voluminosos; es el caso del tributilplomo, tripentilplomo y trifenilplomo, que no son adsorbidos cuantitativamente sobre el C_{60} (apartado III.1). Por otra parte, las especies de plomo tetravalente cuya esfera de coordinación esté completa (ej. tetrametilplomo, tetraetilplomo, trimetiletilplomo) no forman el correspondiente quelato y por lo tanto no pueden ser detectados usando este sistema de preconcentración.

VII. 1. 3. ELEMENTOS DIFERENCIALES DE LA MEMORIA

La constante evolución hacia la consecución de los diversos objetivos planteados en la Memoria inevitablemente conlleva la inclusión de nuevas herramientas analíticas que permitan la mejora de los resultados sin alterar de modo significativo la filosofía del planteamiento inicial. Las principales diferencias introducidas en los distintos apartados de la Memoria afectan al tipo de fullerenos empleados, los analitos a determinar, las muestras y su tratamiento, tipos de derivatización, grado de automatización y simplicidad, el desarrollo de un sistema de screening, el uso o no de separación cromatográfica para las distintas especies y finalmente el empleo de distintos tipos de detectores. A continuación se discuten de forma detallada estos elementos.

Para la preconcentración de las especies y el “clean-up” de la muestra que los contiene se han utilizado **dos tipos de fullerenos**. El fullereno C_{60} se ha usado para retener las especies metálicas derivatizadas en forma de quelatos con el ligando dietilditiocarbamato en la mayor parte de los capítulos de esta Memoria (apartados III.1, III.2, IV.1, IV.2 y V.1). En el capítulo VI.1 se describe la síntesis, caracterización y aplicación a la especiación de plomo del derivado dietilditiocarbámico del fullereno C_{60} , lo cual implica la retención directa de las especies inorgánicas y organometálicas de plomo y por ello se simplifica el montaje experimental.

Los **analitos** que se han detectado/determinado en esta Memoria pueden considerarse divididos en dos grupos. Se han determinado dietilditiocarbamatos usados como fungicidas (apartado III.2)

- Ziram, zineb, propineb, expresados como ziram
- Maneb y mancozeb, expresados como maneb
- Ferbam

Pero la mayor parte del trabajo que se presenta (apartados III.1, IV.1, IV.2, V.1 y VI.1) se centra en la especiación de plomo, es decir, en la determinación /detección de las siguientes especies:

- Trimetilplomo
- Trietilplomo
- Dimetilplomo
- Dietilplomo
- Pb^{2+} inorgánico

También se ha abordado la determinación total de plomo como base del sistema de screening de muestras descrito en el apartado IV.1. El estado actual de la especiación de plomo en Química Analítica se ha resumido en el apartado I.2 de esta Memoria.

Las **muestras** que se han analizado en esta Memoria son de dos tipos, que se diferencian tanto en su estado de agregación como en su complejidad. El primer tipo lo constituyen las muestras sólidas de granos de cereales en las que se ha determinado trazas de ziram, maneb y ferbam (apartado III.2). El segundo tipo está compuesto por las aguas de lluvia de diferente procedencia en las que se ha abordado la especiación de plomo. La etapa de **tratamiento de la muestra** es muy diferente. En el primer caso las muestras sólidas deben someterse a molienda, extracción líquido-sólido, filtración y evaporación a sequedad del extracto clorofórmico y disolución del residuo. En el segundo caso, las muestras líquidas pueden introducirse directamente en los sistemas de flujo, aunque en algunos casos se opta por una filtración continua.

La **derivatización** se ha llevado a cabo en esta Memoria con diversos propósitos usando la variedad de alternativas que se exponen esquemáticamente en la Figura VII.3. Sólo en un caso (apartado III.2) no está implicada una etapa de derivatización ya que los analitos son los dietilditiocarbamatos metálicos. Para diferenciar el plomo inorgánico del organometálico se realiza una precipitación/disolución en continuo (apartado III.1) usando el dicromato como precipitante. La formación de quelatos metálicos de plomo es la clave para la retención de las diferentes especies en la columna sorbente de fullereno. En la mayor parte de los trabajos realizados (apartados III.1, IV.1, IV.2 y V.1) la reacción de quelación tiene lugar en el serpentín cuando confluyen en el mismo las corrientes de muestra y dietilditiocarbamato sódico al pH adecuado; la formación de quelatos transcurre en la fase sólida cuando se emplea el dietilditiocarbamato covalente-

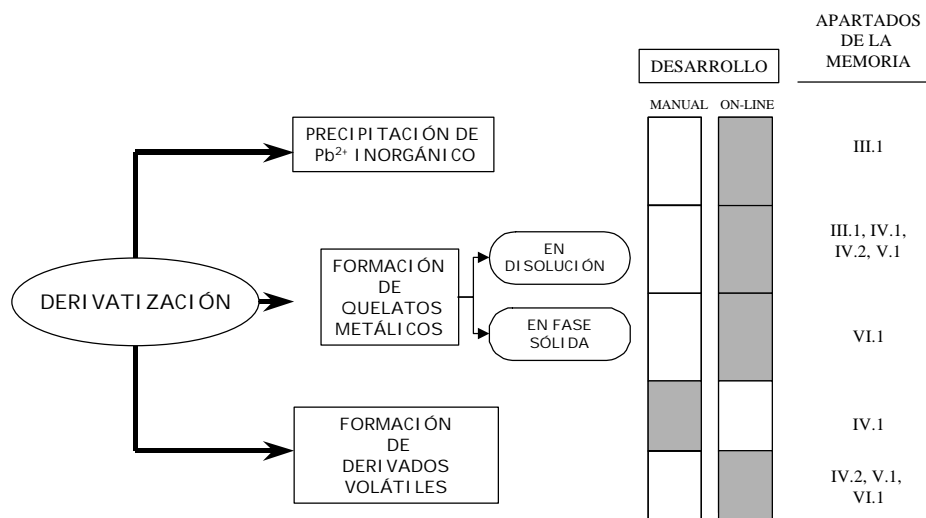


Figura VII. 3. Tipos de derivatización llevadas a cabo en esta Memoria

mente enlazado al fullereno C₆₀ (apartado VI.1). La formación de derivados volátiles de las especies de plomo es una obvia etapa previa a su separación cromatográfica. La derivatización consiste en la transferencia de radicales al plomo tetravalente hasta que se encuentre totalmente alquilado. En primer lugar se realizó una reacción de propilación a través de un reactivo de Grignard (apartado IV.1) que si bien ofrece buenos resultados en cuanto a sensibilidad, exige a cambio las máximas precauciones en su manipulación, incluyendo el empleo de una atmósfera inerte para evitar en todo momento el contacto con el aire o el agua. Por tanto, una vez eluidos de la columna, los analitos deben ser llevados manualmente a un vial sellado en el que se realizará la derivatización y a continuación la eliminación del exceso de reactivo. Estas etapas manuales llevaron a la búsqueda de un derivatizador alternativo, y provocaron su sustitución por el tetrapropilborato sódico (apartados IV.2, V.1 y VI.1), que actúa también como agente propilante, pero puede ser utilizado en medio acuoso y atmósfera normal. La derivatización se lleva ahora a cabo en continuo, ya que el reactivo se añade al disolvente orgánico para facilitar la elución, especialmente en el caso de la complejación en fase sólida (apartado VI.1).

Tabla VII.2. Grado de automatización de los procesos analíticos descritos en la Memoria

		OPERACIONES DEL PROCESO ANALÍTICO QUE SE REALIZAN CON/SIN INTERVENCIÓN HUMANA					
APARTADO DE LA MEMORIA	MÉTODO	TRATAMIENTO DE MUESTRA	DERIVATIZACIÓN (I)		SORCIÓN/ ELUCIÓN	DERIVATIZACIÓ N (II)	CONEXIÓN CON EL DETECTOR
			PRECIPITACIÓN CON CrO ₄ ⁼	FORMACIÓN DE QUELATOS		FORMACIÓN ESPECIES VOLÁTILES	
III.1	Especiación directa de plomo mediante FAAS	AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO
III.2	Especiación de fungicidas mediante FAAS	MANUAL			AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO
IV.1	Screening de muestras	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO
	Especiación de plomo por GC/MS	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	MANUAL	MANUAL
IV.2	Especiación de plomo con NaBPr ₄	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	MANUAL
V.1	Comparación de detectores	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	AUTOMÁTICO	MANUAL
VI.1	Especiación de plomo con derivado del C ₆₀	AUTOMÁTICO		AUTOMÁTICO (simultáneo)		AUTOMÁTICO	MANUAL

El **grado de automatización** alcanzado en los diversos procesos analíticos descritos en esta Memoria es muy variable, tal como puede comprobarse en la Tabla VII.2. La propia naturaleza del detector introduce una diferencia en la forma de introducción de los analitos, que es automática en el caso de FAAS (apartados III.1, III.2 y IV.1 screening) y manual cuando debe inyectarse en el cromatógrafo de gases (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1). Por otra parte, aun usando una detección en continuo (FAAS), cabe distinguir entre aquellas muestras que requieren un tratamiento previo a su introducción en el sistema FIA (apartado III.2) y las que por el contrario pueden ser continuamente aspiradas en el canal de muestra (apartado III.1 y IV.1 screening), alcanzando el grado máximo de automatización tanto en el tratamiento de la muestra como en su detección. Para la especiación de organoplomados usando la cromatografía de gases el grado de automatización se ha incrementado a lo largo del desarrollo de la Memoria. Así, de la derivatización manual para formar especies volátiles (apartado IV.1 especiación) se evoluciona hasta la completa automatización de la misma (apartados IV.2, V.1 y VI.1). Las etapas de formación de quelatos y sorción en el soporte sólido quedan sintetizadas en una sola con la inclusión en el sistema de una minicolumna de del C₆₀-NaDDC (apartado VI.1).

El **grado de simplicidad** de las metodologías analíticas descritas en la Memoria es también muy variado, y evoluciona de forma creciente a lo largo de la misma. Como queda reflejado en la Tabla VII.1, se han iniciado estas investigaciones con un módulo relativamente complejo, que ha evolucionado a otro en el que se consigue reducir significativamente el número de componentes e incluso el número de líneas de flujo y los reactivos a utilizar. Sin embargo, el avance más relevante concierne a la derivatización previa a la inyección en el cromatógrafo de gases, tanto por su incorporación en el sistema de flujo como por la selección y empleo de reactivos adecuados. El método manual para la especiación de plomo usando reactivos de Grignard consta en primer lugar de una extracción líquido-líquido con estricto control del pH con el objetivo de preconcentrar las especies de plomo y acondicionar el medio para la reacción de formación de derivados volátiles. Esta derivatización debe transcurrir en atmósfera inerte dada la inestabilidad de este tipo de reactivos frente al oxígeno y al agua, con las precauciones que ello implica. El empleo de las sales de boro tetravalente (NaBPr₄, NBu₄BPr₄) permite la derivatización “in situ” en medio acuoso, con una única extracción con un volumen mínimo de disolvente orgánico para evitar la dilución de los analitos. En ambos casos es deseable un material hermético adecuado para

evitar pérdidas de analitos o contaminación durante la reacción que además permita la extracción de un pequeño volumen de disolvente orgánico, además de personal cualificado para llevar a cabo las diferentes tareas. El empleo de los sistemas de flujo descritos en esta Memoria (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1) simplifica enormemente ambos procedimientos hasta el punto de conseguir la completa automatización de la especiación de los compuestos organometálicos de plomo de interés medioambiental.

Una de las aportaciones más relevantes de esta Memoria es el diseño y desarrollo del **sistema de screening de muestras** previo a la especiación, descrito en el apartado IV.1. Con dicho sistema se pretende obtener, tras un simple tratamiento de la muestra, una respuesta binaria rápida y fiable para indicar si los analitos están presentes en la muestra por encima o por debajo de una cierta concentración (el límite de detección del sistema para el volumen de muestra a utilizar) que es de gran relevancia práctica. La preconcentración de la muestra en el sistema de flujo permite la determinación del contenido total en plomo mediante FAAS a niveles de trazas, suficientes para detectar la presencia de organoplomados. Debido a la selectividad inherente a la técnica de detección utilizada, la presencia de plomo es inequívocamente confirmada de manera que el sistema de screening no proporciona falsos positivos; este hecho supone una alta fiabilidad, ya que sólo son posibles los falsos negativos en muestras en las que la suma de todas las especies de plomo presentes, incluyendo el plomo inorgánico, sea menor de 0.5 ng/mL. Cuando el resultado obtenido para una muestra es positivo, una segunda porción de la misma se somete al sistema de especiación, descartándose así las muestras que den resultados negativos y reduciendo de manera significativa el número de muestras a analizar. Se cumplen por tanto los objetivos básicos de todo sistema de screening al obtener una respuesta rápida y fiable mediante un método automático sencillo y robusto que minimiza tanto los costes de reactivos como los de instrumentación.

La **separación cromatográfica** es también un elemento diferenciador en el conjunto de trabajos que componen esta Memoria. Para el método de los fungicidas carbámicos no fue necesaria ninguna etapa de separación, dada la selectividad propia del detector atómico (apartado III.2). Las distintas especies de plomo fueron determinadas usando técnicas de separación no cromatográficas como la precipitación/filtración o la sorción selectiva en función del acondicionamiento de la columna de fullereno (apartado III.1) previas a su posterior detección por

FAAS. Las restantes metodologías desarrolladas (apartados III.2, IV.1, IV.2, V.1 y VI.2) incluyen una etapa de separación cromatográfica para permitir la detección de un mayor número de analitos a niveles de concentración también menores. A cambio de esta mayor sensibilidad se sacrifica a veces la simplicidad del sistema de flujo, que en ocasiones no es totalmente automático debido al paso adicional de derivatización que se requiere para transformar los analitos en especies suficientemente volátiles para su determinación por cromatografía de gases.

Los **detectores** que se han empleado en esta Memoria difieren considerablemente en fundamento y capacidad para la especiación metálica. La absorción atómica de llama es sin duda el detector ideal cuando se trata de discernir entre especies de distintos metales (apartado III.2), pero sólo proporciona información global acerca de la presencia de un determinado metal independientemente de la forma en que se encuentre. No obstante, esta respuesta rápida y global es la clave para su empleo como detector de un sistema de screening de muestras sumamente eficaz debido a que los falsos positivos quedan descartados por la propia naturaleza de la detección (apartado IV.1). El poder de separación de la cromatografía de gases puede combinarse con distintos detectores para exaltar bien la sensibilidad o bien la capacidad de identificación de las especies presentes. En esta Memoria la espectrometría de masas se ha empleado en diversas ocasiones (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1) y se ha demostrado su gran capacidad de discriminación enfocada no sólo hacia los analitos, que pueden ser inequívocamente identificados, sino también hacia otras especies de interés en el ámbito de la especiación como es el caso de productos de reacciones de transalquilación entre las distintas especies a determinar (apartado IV.2) o de degradación de los reactivos que se utilizan (apartado V.1). También se han utilizado otros detectores acoplados al cromatógrafo como MIP-AES o ICP-TOFMS (apartado V.1), cuya sensibilidad es muy superior a la proporcionada por el espectrómetro de masas basado en un sistema de cuadrupolo convencional y que permiten el análisis de muestras de agua de lluvia con niveles de contaminación muy bajos (décimas de ppt).

VII. 1. 4. RESULTADOS ANALÍTICOS

Los trabajos desarrollados a lo largo de la presente Memoria están orientados hacia el objetivo de desarrollar metodologías analíticas eficaces para la

resolución de un problema bien definido consistente en la especiación de distintos elementos (fungicidas carbámicos y compuestos organometálicos de plomo), utilizando para ello los fullerenos y derivados entre otras herramientas analíticas. En cada uno de los apartados de la Memoria se recogen las pertinentes características analíticas del método propuesto, resumidas en la Tabla VII.3 para el volumen total de muestra empleado en cada caso. Se pretende ofrecer aquí una visión global de los resultados analíticos obtenidos en los distintos trabajos, con el fin de destacar la información más relevante que se desprende de su comparación respecto a varios aspectos: número y tipo de analitos, sensibilidad, precisión, selectividad y frecuencia de muestreo.

En el desarrollo del trabajo experimental se han determinado distintos tipos de **analitos**, todos ellos relacionados con el ligando dietilditiocarbamato de una u otra forma. Los analitos han sido tanto elementos metálicos capaces de formar un quelato con el carbamato (organoplomados) como quelatos que tienen utilidad práctica como tales, bien en forma individual (ferbam) o como quelatos poliméricos (zineb, maneb). El número de especies que pueden ser discriminadas entre sí depende de forma crítica de la selectividad del detector. La espectrometría de absorción atómica es insustituible cuando se pretende diferenciar entre compuestos que contienen elementos metálicos distintos (apartado III.2) u obtener un índice global para el contenido de un metal en una muestra determinada, pero requiere algún tipo de separación previa para discernir entre especies del mismo metal (apartado III.1). La incorporación de una técnica de separación cromatográfica ofrece la posibilidad de aumentar el número de analitos hasta englobar las especies iónicas de plomo de interés medioambiental (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1). Sin embargo, la necesidad de proporcionar a los analitos la suficiente volatilidad y estabilidad térmica requiere una drástica reacción de derivatización en la que se origina Pb^{2+} ; esta contribución aleatoria hace que la cuantificación de Pb^{2+} mediante este método tenga un carácter meramente orientativo.

Tabla VII. 3. Características analíticas de los métodos descritos en la Memoria

APARTADO DE LA MEMORIA	MÉTODO	DETECTOR	VOLUMEN DE MUESTRA	ANALITOS	RESULTADOS			
					Rango Lineal (ng/mL)	LD (ng/mL)	RSD (%)	Frecuencia de muestreo (h ⁻¹)
III.1	Especiación directa de plomo mediante FAAS	FAAS	5 mL	Pb ²⁺ TML ⁺ TEL ⁺	100 – 1500 30 – 600 20 - 400	50 20 10	3.0 3.6 3.2	8
III.2	Especiación de fungicidas mediante FAAS	FAAS	10 mL	Ziram Maneb Ferbam	3 – 45 5 – 125 15 – 350	1 2 5	3.0 2.0 2.5	5
IV.1	Screening de muestras	FAAS	50 mL	Pb	0.75 – 50	0.5	2.5	3
	Especiación de plomo por GC/MS	GC/MS	25 mL	TML ⁺ DML ²⁺ TEL ⁺ DEL ²⁺ Pb ²⁺	8 10 ⁻³ – 0.8 4 10 ⁻³ – 0.4 4 10 ⁻³ – 0.6 1 10 ⁻⁴ – 0.5 2 10 ⁻³ – 15	2.0 10 ⁻³ 1.6 10 ⁻³ 0.8 10 ⁻³ 3.0 10 ⁻³ 1.6 10 ⁻³	6.1 5.8 5.6 5.9 5.1	3
IV.2	Especiación de plomo con NaBPr ₄	GC/MS	25 mL	TML ⁺ DML ²⁺ TEL ⁺ DEL ²⁺	4 10 ⁻³ – 0.8 6 10 ⁻³ – 0.4 2 10 ⁻³ – 0.4 6 10 ⁻³ – 0.8	1.2 10 ⁻³ 2.4 10 ⁻³ 0.8 10 ⁻³ 1.6 10 ⁻³	5.1 3.6 4.3 4.5	3
V.1	Comparación de detectores	GC/MIP-AES	25 mL	TML ⁺ DML ²⁺ TEL ⁺ DEL ²⁺	2 10 ⁻⁴ – 0.05 2 10 ⁻⁴ – 0.02 3 10 ⁻⁴ – 0.05 4 10 ⁻⁴ – 0.08	0.8 10 ⁻⁴ 0.9 10 ⁻⁴ 1.2 10 ⁻⁴ 1.7 10 ⁻⁴	4.9 3.0 3.6 3.4	4
		GC/ICP-TOFMS	25 mL	TML ⁺ DML ²⁺ TEL ⁺ DEL ²⁺	2 10 ⁻⁴ – 0.1 2 10 ⁻⁴ – 0.1 3 10 ⁻⁴ – 0.1 4 10 ⁻⁴ – 0.1	0.8 10 ⁻⁴ 0.9 10 ⁻⁴ 0.9 10 ⁻⁴ 1.2 10 ⁻⁴	2.9 4.9 3.2 4.9	4
VI.1	Especiación de plomo con derivado del C ₆₀	GC/MS	25 mL	TML ⁺ DML ²⁺ TEL ⁺ DEL ²⁺	4 10 ⁻³ – 0.8 8 10 ⁻³ – 0.8 4 10 ⁻³ – 0.6 6 10 ⁻³ – 0.8	1.0 10 ⁻³ 3.0 10 ⁻³ 0.8 10 ⁻³ 2.0 10 ⁻³	5.5 4.6 4.8 5.8	4

TML⁺, trimetilplomo; TEL⁺, trietilplomo; DML²⁺, dimetilplomo; DEL²⁺, dietilplomo

El empleo de un sistema de preconcentración para aumentar la **sensibilidad** de la metodología se hace ineludible dado el bajo nivel de concentración al que estos analitos se encuentran en las muestras reales (ppt). La elevada capacidad de retención del fullereno C₆₀ y su derivado ditiocarbámico permiten alcanzar estos niveles especialmente si se emplea un volumen de muestra suficientemente alto (25 – 50 mL) y un detector apropiado. El cambio más relevante se aprecia al sustituir el detector FAAS por un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo, lo que origina la disminución de los límites de detección en cuatro órdenes de magnitud (ppt).

A través de la comparación de estos resultados incluidos en la Tabla VII.3 con los de GC/MIP-AES y GC/ICP-TOFMS, ampliamente comentados en el apartado V.1, se observa una mejora de tan sólo un orden de magnitud respecto al GC/MS, suficiente para alcanzar fácilmente los niveles de las décimas de ppt necesarios para la especiación de plomo en agua de lluvia de países poco contaminados por fuentes antropogénicas y combustibles fósiles. Los detectores empleados también afectan al **rango lineal** de la determinación, que pasa de ser de un orden de magnitud en FAAS a dos órdenes en GC/MS, para alcanzar el máximo intervalo en el GC/ICP-TOFMS, como era de esperar. En cuanto a la **precisión** (Tabla VII.3), es similar en todos los casos tomando en consideración la desviación que es común al empleo de un sistema FI con diversos detectores: FAAS (aprox. 3% RSD) o inyección en GC (aprox. 5% RSD).

Los sistemas que basan su funcionamiento en la capacidad de sorción/elución sobre un material sólido pueden adolecer de falta de **selectividad** hacia los analitos, bien por mostrar mayor afinidad hacia otras especies, o bien porque los interferentes se encuentran en concentraciones tan altas que desplazan a los analitos de los sitios activos de la columna sorbente. El comportamiento de los sistemas descritos en la Memoria frente a otros iones metálicos capaces de formar quelatos estables con el NaDDC (ej. Mn²⁺, Fe³⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺) y que pueden ser considerados como potenciales interferentes se contempla en la Memoria (apartados IV.1, V.1 y VI.1), así como el mecanismo de eliminación de la interferencia en caso necesario. En los sistemas que utilizan fullereno C₆₀ como material sorbente, la única interferencia observada es la ocasionada por el Fe³⁺ (aunque a concentraciones superiores en 4 veces a las de organoplomados), y se

evita fácilmente mediante la adición a la muestra de ácido acético para la formación de un complejo cargado que no es retenido en la columna (la relación tolerada en este caso de al menos 200 veces más). La comparación de la selectividad respecto a otros sorbentes convencionales como sílice-C₁₈ (apartado V.1) resulta más satisfactoria para el C₆₀, dada su mayor capacidad superficial y el medio de pH ligeramente ácido en el que tienen lugar las determinaciones. También el valor de pH, ligeramente básico, en el que se desarrolla la especiación de organoplomados empleando una columna empaquetada con el derivado ditiocarbámico del fullereno C₆₀ es el principal responsable de la ausencia de interferencias en este caso, ya que la mayoría de los iones metálicos han precipitado como hidróxidos y quedan en el filtro inicial, de forma que no alcanzan la zona de pre-concentración.

La **rapidez** constituye una de las ventajas fundamentales de los sistemas de flujo en relación con las metodologías que implican el tratamiento manual de la muestra. En función del detector empleado, se aprecian dos factores condicionantes claramente definidos. Para las metodologías desarrolladas en la Memoria que utilizan FAAS como sistema de detección (apartados III.1, III.2 y IV.1), la etapa controlante de la rapidez del análisis es la introducción de la muestra en el sistema: a mayor volumen, mayor sensibilidad, pero también más tiempo de aspiración. A pesar de la baja frecuencia de muestreo observada para el sistema de screening, éste no debe ser descartado teniendo en cuenta que posibilita la detección de organoplomados con una instrumentación asequible y sin los costes y complicaciones que supone el uso de reactivos derivatizadores. En cambio, los métodos cuyo detector está acoplado a un cromatógrafo de gases están condicionados por la duración de la etapa de separación cromatográfica y recuperación de la temperatura inicial del horno, lo que se traduce en frecuencias de muestreo similares (apartados IV.1, IV.2, V.1 y VI.1).

VII.2. RESUMEN DE LAS CONCLUSIONES MÁS RELEVANTES

Al finalizar cada uno de los capítulos de esta Memoria se incluye un conjunto de conclusiones particulares al estudio desarrollado. En este apartado se presentan las conclusiones más generales teniendo en cuenta tanto el grado de innovación alcanzado como su impacto práctico.

1. Se ha demostrado por primera vez la idoneidad del fullereno C_{60} como material sorbente para la especiación medioambiental, aportando ventajas sustanciales respecto a los sorbentes clásicos (ej. C_{18} enlazado a sílice).
2. Se ha sintetizado y caracterizado por primera vez el derivado dietilditiocarbámico del fullereno C_{60} , que muestra ventajas prácticas respecto al empleo del C_{60} para la especiación medioambiental y particularmente en los costes de reactivos y en la simplificación del proceso (automático) de tratamiento/derivatización implícito(s).
3. Se ha puesto de manifiesto la gran repercusión práctica del concepto de criba (screening) de muestras en la especiación medioambiental, que mejora las propiedades analíticas productivas (ej. rapidez, costes, factores personales) del laboratorio.
4. Se ha contribuido significativamente a la simplificación y automatización de las operaciones previas del proceso analítico para la especiación, empleando para ello sistemas de flujo continuo diseñados ad hoc que permiten llevar a cabo las operaciones implícitas tanto de tratamiento como de derivatización.
5. Se ha establecido por primera vez una comparación sistemática entre tres tipos de detectores de un cromatógrafo de gases (MS, MIP-AES e ICP-TOFMS) que permite sacar conclusiones relevantes referidas fundamentalmente a la sensibilidad y selectividad de los procesos analíticos orientados a la especiación medioambiental.
6. Se han diseñado, optimizado y validado un conjunto de procesos analíticos completos para la especiación de ditiocarbamatos (fungicidas) en granos de cereales y la especiación de plomo en aguas de lluvia. Los resultados obtenidos han sido debidamente contrastados en términos de exactitud (incertidumbre) y trazabilidad. Todos ellos implican herramientas asequibles para ser implantados en laboratorios de monitorización medioambiental.

7. La sensibilidad alcanzada en los métodos analíticos desarrollados para la especiación de plomo (nivel ppt) ha permitido discriminar directamente las aguas de lluvia procedentes de países en los que la venta de gasolina con plomo estaba permitida durante la realización de la Tesis, como ocurría en España, con respecto a otros países en los que su empleo se prohibió desde hace tiempo, como es el caso de Bélgica.

VII.3. “PRODUCTOS” DE LA TESIS DOCTORAL

La ISO 9000:2000 define al producto como resultado de un sistema de actividades que utilizan recursos para transformar entradas (inputs) en salidas (outputs). El nuevo concepto de producto abarca pues entes tanto tangibles (ej. herramientas analíticas) como intangibles (ej. conceptos, servicios, metodologías). En este contexto y a la luz de las conclusiones generales comentados en el apartado anterior, se pueden inferir los “productos” más relevantes de esta Memoria:

- ❑ Fullerenos y derivados como sorbentes para las operaciones previas de procesos analíticos orientados a la especiación medioambiental.
- ❑ Concepto de “screening” (criba previa) en la especiación medioambiental.
- ❑ Automatización y simplificación de procesos analíticos para la especiación medioambiental.
- ❑ Procesos analíticos validados para la determinación de fungicidas en granos de cereales y especiación de plomo en agua de lluvia con un grado creciente de automatización y simplificación.

VII.4. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Los principales problemas que surgieron a lo largo de la investigación se han resuelto en sucesivas etapas durante el desarrollo de la misma. Se puede comprobar la evolución a lo largo de los capítulos: de la falta de sensibilidad que era el principal inconveniente de la especiación de plomo mediante FAAS (apartado III.1) a sistemas más sensibles pero sólo parcialmente automatizados (apartado IV.1), hasta conseguir la completa automatización con el empleo de un reactivo alternativo a los de Grignard (apartado IV.2) y la disminución de los límites de detección mediante el empleo de detectores más sensibles a niveles de décimas de ppt (apartado V.1). Por último, la síntesis de un nuevo derivado ditiocarbámico del fullereno C₆₀ supone el empleo de la configuración más sencilla posible para la especiación de plomo. Sin embargo, hay ciertas restricciones que es conveniente resaltar de forma crítica y que se detallan a continuación:

- ❑ Las metodologías descritas sólo son aplicables a compuestos capaces de reaccionar con el dietilditiocarbamato. Por lo tanto, los compuestos tetraalquilados de plomo como tetrametil, tetraetil, o trimetiletilplomo, también interesantes desde el punto de vista ambiental, no pueden ser determinados.
- ❑ El derivado ditiocarbámico del C₆₀ se satura con facilidad, por lo que su uso sólo es conveniente para la determinación de analitos a niveles de trazas.
- ❑ No se ha abordado una amplia variedad de muestras (se reducen a agua de lluvia de diferentes procedencias y granos de cereales).
- ❑ No se incide en los puntos débiles de la especiación (toma y conservación de la muestra, por ejemplo).
- ❑ No se ha dispuesto de referencias adecuadas para el contraste de los resultados y el establecimiento de su trazabilidad, como por ejemplo materiales de referencia certificados, por lo que las metodologías sólo han podido ser validadas a través de los patrones primarios.

- La mayor sensibilidad requiere el empleo de detectores costosos (MIP-AES, ICP-TOFMS).

- Si bien el término de especiación de grupo se ha aceptado para designar la discriminación entre distintas familias de compuestos similares, suele aplicarse más a menudo al campo medioambiental o clínico que al ámbito agroalimentario en el que aquí se engloba (apartado III.2).

VII.5. FUTURAS VÍAS DE INVESTIGACIÓN

A la luz de las aportaciones recogidas en la presente Memoria se vislumbran otras líneas de investigación que se pueden orientar hacia el núcleo de la Tesis, los fullerenos y sus derivados, y también hacia la especiación de nuevos analitos en diversos tipos de muestras. En lo que respecta al primer objetivo, la síntesis de nuevos derivados del **fullereno** despierta grandes expectativas en cuanto a sus potenciales aplicaciones dentro y fuera del campo de la especiación. A continuación se ofrece una visión general de algunas de estas posibilidades analíticas:

- ❑ Uso de fullerenos modificados como fases estacionarias para discriminar especies en cromatografía líquida y así minimizar los problemas prácticos que presentan los fullerenos.
- ❑ Inmovilización de fullerenos y derivados sobre soportes sólidos metálicos para la fabricación de electrodos redox orientados a la determinación de compuestos neutros.
- ❑ Deposición de fullerenos y derivados sobre láminas de materiales ópticamente transparentes para la formación de optoelectrodos.
- ❑ Desarrollo de sistemas en flujo continuo en los que se produzca la doble retención selectiva tanto de especies metálicas a través del grupo funcional del derivado como de compuestos orgánicos sobre la matriz del fullereno.

Por otra parte, el campo de la especiación aún requiere de sistemas rápidos y simples para minimizar los errores cometidos en la más problemática de las etapas del proceso analítico, la preparación de la muestra. En este sentido, la aplicación de sistemas de flujo continuo puede ser de gran utilidad; a continuación se enumeran algunas de las posibles aplicaciones:

- ❑ Determinación de compuestos organometálicos de interés medioambiental, para establecer controles de su emisión y degradación. El caso del estaño es especialmente preocupante, ya que, a pesar de que su empleo está actual-

mente restringido de forma severa, el uso indiscriminado durante años como pintura para evitar incrustaciones en los cascos de las embarcaciones junto con la gran estabilidad que presentan estos compuestos aseguran su presencia en los ecosistemas marinos al menos durante los próximos 150 años.

- Determinación de compuestos asociados a metales que actúan como indicadores de la calidad del ecosistema en el que se encuentran. Los animales responden a una concentración excesiva de ciertos metales pesados en su organismos sintetizando proteínas (melalotioneínas) que se enlazan al metal y lo retiran del torrente sanguíneo, bloqueando en parte su efecto. La determinación de la concentración de estas proteínas en individuos de la misma especie de procedencia distinta permite establecer una comparación entre los niveles de metales pesados en sus correspondientes hábitats naturales.
- Análisis de muestras de diversa naturaleza, incluyendo matrices biológicas, muestras atmosféricas y de suelos y sedimentos.

VII.2. SUMMARY OF THE MOST SALIENT CONCLUSIONS

Each chapter of this Report ends with some specific conclusions relevant to the work described in it. This section summarizes the more general conclusions in terms of both degree of innovation and practical impact.

1. C₆₀ fullerene has for the first time been shown to be a suitable sorbent material for environmental speciation, with substantial advantages over classical sorbents such as silica-bonded C₁₈ materials.
2. The diethyldithiocarbamate derivative of C₆₀ has for the first time been synthesized and characterized. This new material provides some practical advantages over C₆₀ in environmental speciation, particularly as regards cost and simplicity of the (automatic) treatment/derivatization process involved.
3. The high significance of sample screening to environmental speciation (where it results in decreased costs, increased throughput, and also increased personnel safety and comfort) has been shown.
4. The preliminary operations of the speciation analytical process have been substantially simplified and automated by using specially designed continuous-flow systems to perform the treatment and derivatization operations involved.
5. The performance of three types of detectors used with gas chromatographs (viz. MS, MIP-AES and ICP-TOFMS) has for the first time been systematically compared and valuable conclusions regarding their sensitivity and selectivity in environmental speciation analytical processes have been drawn.
6. A series of self-contained analytical processes have been designed, optimized and validated for the speciation of dithiocarbamates (fungicides) in cereal grain and that of lead in rainwater. The results were checked for accuracy (uncertainty) and traceability. All these processes use analytical tools accessible to the average environmental monitoring laboratory.

7. The sensitivity of the analytical methods developed for the speciation of lead (at the parts-per-trillion level) allowed the direct discrimination of rainwater from countries where leaded gasoline was being sold at the time the doctoral work was conducted (Spain included) from rainwater collected in other countries where this type of fuel was banned years ago (e.g. Belgium).

VII.3. “PRODUCTS” OF THE DOCTORAL THESIS

ISO 9000:2000 defines “product” as the result of a system of activities using resources to transform inputs into outputs. This new concept of product therefore encompasses both tangible (e.g. analytical tools) and intangible entities (e.g. concepts, services, methodologies). In this context, and in the light of the general conclusions of the previous section, the most salient “products” of this Thesis are as follows:

- ❑ Fullerene and its derivatives as sorbents for the preliminary operations of analytical processes aimed at environmental speciation.
- ❑ The concept of screening in environmental speciation.
- ❑ The automation and simplification of analytical processes for environmental speciation.
- ❑ Validated analytical processes for the determination of fungicides in cereal grain and the speciation of lead in rainwater, all with increasing automation and simplification.

VII.4. RESTRICTIONS OF THE STUDY

The most serious problems encountered during this research were solved in successive steps. The changes introduced in response to the problems are apparent from the chapter contents: from the lack of sensitivity, which was the main shortcoming of the speciation of lead by FAAS (Chapter III, Part III.1) to more sensitive but only partially automated systems (Chapter IV, Part IV.1), to completely automated systems using an alternative to Grignard's reagent (Chapter IV, Part IV.2) and the reduction of detection limits (to a few tens of a part-per-million) by use of more sensitive detectors (Chapter V, Part V.1). Finally, the synthesis of a new dithiocarbamate derivative of C₆₀ fullerene allowed the use of the simplest possible configuration for the speciation of lead. However, there are still several restrictions that warrant some comment:

- The proposed methodologies are only applicable to compounds reacting with diethyl dithiocarbamate. Consequently, tetraalkyl-lead compounds (tetramethyl-, tetraethyl- and trimethylethyllead), which are environmentally significant, cannot be determined in this way.
- The dithiocarbamate derivative of C₆₀ fullerene is easily saturated, so its use is restricted to analytes present at trace levels.
- The range of samples examined was restricted to cereal grain and rainwater of variable origin.
- The main weaknesses of speciation (e.g. sample collection and storage) were not addressed.
- No appropriate standards for checking the results and establishing their traceability (e.g. certified reference materials) were available, so the proposed methodologies could only be validated through primary standards.

- The increased sensitivity required calls for the use of expensive detectors (MIP-AES, ICP-TOFMS).

- Although “group speciation” is an accepted term for designating discrimination among different families of similar compounds, it is more frequently used in the environmental and clinical fields than in connection with agricultural food analyses (Chapter III. Part III.2).

VII.5. FUTURE RESEARCH LINES

The contributions described in this Report allow one to envisage new research lines aimed at the targets of this Thesis (viz. fullerenes and their derivatives) and also at the speciation of other analytes in various types of samples. The synthesis of new **fullerene** derivatives is arousing great expectations regarding their potential uses not only for speciation but also for other, various purposes. These are but a few of their potential analytical applications:

The use of modified fullerenes as stationary phases for discriminating species in liquid chromatography with a view to minimizing their practical shortcomings.

The immobilization of fullerenes and their derivatives onto metal solid supports for manufacturing redox electrodes for the determination of neutral compounds.

The deposition of fullerenes and their derivatives onto layers of optically transparent materials for the construction of optoelectrodes.

The development of continuous-flow systems allowing the dual selective retention of metal species via the functional group in the derivative and organic compounds in the fullerene matrix.

On the other hand, speciation applications still call for rapid, simple systems for minimizing errors made in the most troublesome of all steps in the analytical process: sample preparation. Continuous-flow systems can be of great help in this context. The following are some of their potential applications:

The determination of environmentally significant compounds with a view to establishing controls on their release and degradation. The situation of tin is especially worrisome since, although its use is currently severely restricted, its indiscriminate usage as anti-fouling paint to avoid scaling in vessel hulls in the past, and the high stability of its compounds, ensure its presence in marine ecosystems over at least the next 150 years.

The determination of metal-bound compounds acting as quality indicators for their environment. Animals respond to excessive concentrations of some heavy metals by synthesizing special proteins (metalloproteins) that bind the metal and withdraw it from the bloodstream, thereby partially blocking its effects. The determination of the concentration of metalloproteins in individuals of the same species but a different origin allows one to compare the levels of heavy metals in the corresponding habitats.

The analysis of various types of samples including biological, atmospheric, soil and sediment matrices.



Apéndices



Appendices

APÉNDICE A. ARTÍCULOS DERIVADOS DE LA TESIS DOCTORAL

1. J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel, "Speciation of inorganic lead and ionic compounds by flame atomic absorption spectrometry, following continuous selective preconcentration from aqueous solutions" *Spectrochimica Acta Part B* 54 (1999) 1869.
2. J.R. Baena, S. Cárdenas, M. Gallego y M. Valcárcel, "Speciation of inorganic lead and ionic alkyllead compounds by GC/MS in prescreened rainwaters" *Analytical Chemistry* 72 (2000) 1510.
3. J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel, "Group speciation of metal dithiocarbamates by sorption on C₆₀ fullerene" *Analyst* 125 (2000) 1495.
4. J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel, "A fast unit for the simultaneous preconcentration and derivatization of ionic alkyllead species, following by GC/MS determination" *LC· GC Europe* 13 (2000) 830.
5. J.R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel, J. Leenaers y F.C. Adams, "Comparison of three coupled gas chromatographic detectors (MS, MIP-AES, ICP-TOFMS) for organolead speciation analysis" *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3927.
6. J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel, "Fullerenes in analytical sciences"
Aceptado para su publicación en *Trends in Anal. Chem.* 2001-09-29
7. J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel, "New fullerene derivative for metal preconcentration. A case study in lead speciation"
Enviado para su publicación en *Anal. Chem.* 2001.

APÉNDICE B. PATENTE DE INVENCIÓN

El trabajo descrito en la Memoria ha dado lugar a la solicitud de una patente de invención que recoge la síntesis, caracterización y aplicaciones analíticas del derivado quelatante del fullereno.

Patente “*Síntesis y aplicaciones de derivados quelatantes de los fullerenos*”,
J. Rodríguez, M. Gallego, M. Valcárcel, Universidad de Córdoba.
Nº 200101466.

APÉNDICE C. COMUNICACIONES A CONGRESOS

“Speciation of inorganic lead and ionic alkyllead compounds by GC/MS in pre-screened rainwaters”; J.R. Baena, S. Cárdenas, M. Gallego y M. Valcárcel. **Comunicación oral** presentada en el “*IX Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography*”, celebrado en Oporto (Portugal) del 10 al 13 de Octubre de 1999.

“Usefulness of fullerene as a sorbent for individual determination of ethylenebis(dithiocarbamate) fungicides in waters by flame atomic absorption spectrometry”; J.R. Baena, M. Gallego y M. Valcárcel. **Póster** presentado en la “*8th International Conference on Flow Analysis*”, celebrada en Varsovia (Polonia) en Junio de 2000.

“Comparison of three coupled gas chromatographic detectors (MS, MIP-AES, ICP-TOFMS) for Organolead Speciation Analysis”, J.R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel, J. Leenaers y F.C. Adams. **Comunicación oral** presentada en la “*XII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica*”, celebrada en Huelva del 19 al 21 de Septiembre de 2001.

“Innovations in the speciation of organolead compounds in waters: towards a more rational, rapid and simple analytical process”, J.R. Baena, M. Gallego, M. Valcárcel, **Comunicación oral** presentada en el Workshop “*Analysis, Toxicity and Biodegradation of Organic Pollutants in Groundwater from Contaminated Land, Landfills and Sediments*”, celebrado en Barcelona entre el 8 y el 10 de Noviembre de 2001.

